

Chip-Kalorimetrie zur zeitaufgelösten Untersuchung von mitochondrialen Stoffwechselaktivitäten

DISSERTATION

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Alexander Le Blanc
aus Hannover

Tübingen
2013

Tag der mündlichen Qualifikation: 04.11.2013

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Günter Gauglitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Udo Weimar

Ohne innere Wärme ist nichts Großes noch Schönes im Leben vollbracht worden.

EDUARD HANSLICK

für Mela

Danksagung

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz möchte ich mich ganz herzlich für das Vertrauen und die hervorragenden Bedingungen zur Fertigstellung dieser Arbeit bedanken. Vielen Dank für die vielen Freiheiten, die Bereitschaft, mal einen Fehler zu verzeihen und dafür, dass Sie mir auch viele Einblicke jenseits des Labors ermöglicht haben. Ich fühle mich bestens von Ihnen auf das weitere Berufsleben vorbereitet.

Herrn Prof. Dr. Udo Weimar möchte ich herzlich für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit bedanken. Vielen Dank auch an die ganze AG Weimar für die stets freundliche Atmosphäre im Verfügungsgebäude.

Herrn PD Dr. Johannes Lerchner möchte ich danken für den Bau des Chip-Kalorimeters, die gute Einführung in die Bedienung, die engagierte Hilfe bei der Installation und für viele, interessante Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Doron Rapaport danke ich für das Interesse und die große Bereitschaft zur Kooperation. Seinen Mitarbeitern Herrn Tao Tan und Herrn Dr. Drazen Papic danke ich für die Bereitstellung von Probenmaterial und Herrn Dr. Kai Stefan Dimmer für hilfreiche Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lothar Leidner, der mit großer Geduld meine Ideen ertrug und mit viel mathematischem Sachverstand die gelegentlich ins Stocken geratenen Herleitungen entscheidend voranbrachte. Ohne seine Programmierkünste wäre ein entscheidender Teil der Arbeit nicht umsetzbar gewesen. Ihm sowie Frau Barbara Schwarz und Herrn Urs Hilbig danke ich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Dr. Mats Carlquist und Herrn Tomas Bonn von der KaroBio AB in Schweden danke ich für die Gastfreundschaft und die kompetente Hilfe bei der Herstellung und Markierung des Estrogenrezeptors während meines Aufenthalts in Huddinge.

Dem ganzen AK Gauglitz möchte ich für das gute Arbeitsklima, die vertrauensvolle Zusammenarbeit in Projekten und eine Menge Spaß auch jenseits des Labors danken. Herrn Dr. Peter Fechner danke ich für die vertrauensvolle Zusammenarbeit in dem Projekt Cascade NoE und für kreative Problemlösungen im Labor und auf Reisen. Frau Dr. Chistine Schleifenbaum danke ich für die engagierte Hilfe bei den TIRF Messungen. Frau Melanie Ewald, Herrn Valentin Frimmer und Herrn Urs Hilbig danke ich für die engagierte Bearbeitung der Projekte und die gute Zusammenarbeit während ihrer Diplomarbeit. Meinen Mitstreitern im Verfügungsgebäude danke ich für die nette Gesellschaft und interessante Diskussionen.

Zu guter Letzt möchte ich noch den wichtigsten Menschen in meinem Leben danken, meinen Eltern Waltraud und Sebastian Le Blanc und meiner Freundin Melanie Schützner. Ohne das Vertrauen in Euren Rückhalt wäre mir so manches schwerer gefallen.

Inhalt

1	Einleitung und Motivation.....	9
2	Theoretische Grundlagen	11
2.1	Physikalische Grundlagen	11
2.1.1	Grundlagen der Thermodynamik.....	11
2.1.1.1	Wärme und Temperatur.....	11
2.1.1.2	Innere Energie und Enthalpie.....	12
2.1.1.3	Reaktionsenthalpie	13
2.1.1.4	Entropie und freie Enthalpie.....	15
2.1.1.5	Chemisches Potential und Gleichgewicht.....	16
2.1.1.6	Redoxreaktionen.....	18
2.1.2	Transporterscheinungen	19
2.1.2.1	Wärmefluss.....	20
2.1.2.2	Thermodiffusion und Thermoelektrizität.....	21
2.1.3	Isotherme Kalorimetrie.....	24
2.1.4	Kinetik.....	26
2.1.4.1	Enzymreaktionen.....	28
2.2	Biochemische Grundlagen.....	32
2.2.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
2.2.1.1	Aufbau der Zelle.....	32
2.2.1.2	Mitochondrien.....	33
2.2.1.3	Proteinimport.....	35
2.2.2	Energiestoffwechsel von <i>S. cerevisiae</i>	37
2.2.2.1	Glykolyse und alkoholische Gärung.....	37
2.2.2.2	Citratzyklus.....	38
2.2.2.3	Atmungskette.....	40
2.2.2.4	Physikalisch-chemische Betrachtungsweisen	43
3	Material und Methoden	45
3.1	Materialien.....	45
3.1.1	Chemikalien und Biochemikalien	45
3.1.2	Lösungen.....	45
3.1.3	Mitochondrien.....	46
3.2	Geräte und Software.....	46
3.2.1	Chip-Kalorimeter.....	46
3.2.1.1	Kalorimeter.....	47
3.2.1.2	Fluidik.....	48
3.2.1.3	Ansteuerung.....	50
3.2.2	Software.....	50

3.2.3	Laborgeräte	50
3.3	Methoden.....	51
3.3.1	Probenbehandlung.....	51
3.3.2	Messabläufe.....	51
3.3.3	Signalprozessierung.....	53
3.3.4	Datenauswertung	54
4	Ergebnisse.....	55
4.1	Dynamische Korrektur.....	55
4.1.1	Herleitung eines Modells für die Signaldynamik	55
4.1.1.1	Konstante Wärmeleistung in der Messzelle.....	55
4.1.1.2	Sprunghafte Änderung der Wärmeleistung.....	56
4.1.1.3	Änderung der Wärmeleistung nach einer Kinetik erster Ordnung	57
4.1.1.4	Anwendung des Modells für die Signaldynamik und Separation der Zeitkonstanten	64
4.1.2	Dynamische Korrektur der Daten	67
4.1.2.1	Dynamische Korrektur bei sprunghafter Änderung der Wärmeleistung.....	67
4.1.2.2	Dynamische Korrektur bei Änderung der Wärmeleistung nach einer Kinetik erster Ordnung	68
4.1.3	Glättung der Daten.....	70
4.1.4	Anwendung der dynamischen Korrektur und Glättung auf reale Datensätze	72
4.2	Messungen mit Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	74
4.2.1	Bestimmung von Kenngrößen des Testverfahrens.....	74
4.2.1.1	Abhängigkeit der Signalintensität von der Mitochondrienkonzentration	74
4.2.1.2	Bestimmung der einzusetzenden Mitochondrienkonzentration.....	78
4.2.2	Einfluss der Kulturbedingungen auf die Stoffwechselaktivität.....	80
4.2.3	Einfluss des Substrats auf die Stoffwechselraten von Wildtyp Mitochondrien ..	81
4.2.4	Einfluss der Mutationen auf die Stoffwechselraten	84
5	Zusammenfassung.....	88
6	Abkürzungen.....	90
7	Literaturverzeichnis.....	93
8	Anhang.....	95
8.1	Publikationsliste.....	95
8.2	Vorträge.....	95
8.3	Akademische Lehrer	96
8.4	Lebenslauf.....	97

1 Einleitung und Motivation

Die isotherme Kalorimetrie ist eine Methode zur Untersuchung von chemischen Reaktionen in homogener Phase, die ohne den Einsatz von Markierungen auskommt. Die Reaktionswärme sorgt dabei für geringe Temperaturänderungen in einer Messzelle, welche über eine Thermosäule mit einer Wärmesenke in Kontakt steht. Durch die Temperaturdifferenz zwischen Zelle und Senke wird an der Thermosäule eine Spannung generiert, die in einem gewissen Temperaturbereich proportional zur Temperaturdifferenz ist. Die Signale stellen sich auf Werte ein, die proportional zur Wärmeleistung sind.

Im Fall der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) ist es beispielsweise möglich, zwischenmolekulare Wechselwirkungen zu charakterisieren. Um detektierbare Signale zu erhalten, ist es allerdings nötig, ausreichend große Wärmemengen zu generieren. Um dies zu erreichen, muss meist eine relativ große Menge der Stoffe eingesetzt werden, die in einem großen Volumen gelöst werden müssen, um ausreichend geringe Konzentrationen zu erzielen.

Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit ein von Herrn Dr. Lerchner an der TU Freiberg entwickeltes, miniaturisiertes Gerät genutzt. Dieses hat ein Zellvolumen von nur 20 μl , sodass es auf Reaktionen ausgelegt ist, bei denen eine hohe Wärmeleistung pro Volumen vorliegt. Dies ist beispielsweise bei Untersuchungen des Stoffwechsels von Mikroorganismen gegeben. Da aufgrund des geringen Probenvolumens die Wärmekapazität gering ist, liegen die Zeitkonstanten im Bereich von wenigen zehn Sekunden. Gegenüber gängigen ITC Aufbauten, bei denen die Zeitkonstanten typischerweise im Bereich von Minuten liegen, kann die Kinetik der Reaktionen in dem miniaturisierten Aufbau besser erfasst werden. Die vorliegende Arbeit widmet sich der Etablierung von Testverfahren zur Quantifizierung des Stoffwechsels von Hefemitochondrien, sowie Methoden zur Datenprozessierung zur weiteren Verbesserung der zeitlichen Auflösung.

Bisher wurden diese Reaktionen vor allem elektrochemisch über den Verbrauch von Sauerstoff verfolgt. Kalorimetrische Verfahren haben den Vorteil, dass auch sauerstoffunabhängige Reaktionen beobachtet werden können. Dies ist insbesondere wichtig für Untersuchungen anderer Mikroorganismen, da beispielsweise viele interessante Bakterien ausschließlich anaeroben Stoffwechsel betreiben.

Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) stellen ein interessantes Modellsystem für das Verständnis dieser Zellorganellen dar. Da der Organismus nur auf wenige der Funktionen seiner Mitochondrien tatsächlich angewiesen ist, können Hefen in der Regel selbst mit schwerwiegenden Mutationen in mitochondrialen Genen überleben, bei deren Anwesenheit die Zellen anderer Organismen zugrundegehen würden. Viele mitochondriale Gene sind in *S. cerevisiae* und im Menschen homolog zueinander, einigen davon wird eine Schlüsselrolle in diversen Krankheiten zugeschrieben. Da das Genom von *S. cerevisiae* gut charakterisiert ist und viele Techniken zu Genmanipulation gut etabliert sind, handelt es sich um einen besonders interessanten Modellorganismus für ein grundlegendes Verständnis diverser Genfunktionen [1-3].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Rapaport, Herrn Tan und Herrn Dr. Papic ein Messverfahren etabliert, mit dessen Hilfe der Energiestoffwechsel von Mitochondrien zeitaufgelöst beobachtet werden kann. Dieses Verfahren wurde genutzt, um zwei Mutationen in Genen für mitochondriale Proteine hinsichtlich ihres Effekts auf den Energiestoffwechsel zu untersuchen. Die Ergebnisse sind auf Stoffwechselreaktionen von

Mikroorganismen übertragbar und können als Grundlage für diverse Untersuchungen dienen. Denkbar sind beispielsweise Studien zur Wirkung antimikrobieller Substanzen oder zur Ausbildung, Wachstum und Resistenzbildung von Biofilmen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Physikalische Grundlagen

Grundlage der Kalorimetrie ist die Messung von Reaktionswärmern. In diesem Kapitel sollen daher zunächst die Grundlagen der Thermodynamik diskutiert werden. Begonnen wird mit den Themen Wärme und Temperatur, die in der Kalorimetrie eine zentrale Rolle spielen. Die Energetik von chemischen Reaktionen wird in den Kapiteln zur inneren Energie und Enthalpie sowie zur Reaktionsenthalpie diskutiert. Im Folgenden wird die Freiwilligkeit bzw. die Richtung einer Reaktion thematisiert, die eng mit der Entropie verknüpft ist. Diese wird mit der Enthalpie zur freien Enthalpie verbunden, aus der sich wiederum das chemische Potential ableitet. Abschließend wird auf den Einfluss der freien Enthalpie und des chemischen Potentials auf das chemische Gleichgewicht eingegangen.

Da in der isothermen Kalorimetrie Wärmeflüsse zwischen der Messzelle und einer Wärmesenke stattfinden, sollen zunächst Transporterscheinungen allgemein diskutiert werden, mit deren Hilfe sich Wärmeflüsse beschreiben lassen. Dies ist wichtig für die im Ergebnisteil diskutierte dynamische Korrektur der Messergebnisse zur Verbesserung der zeitlichen Auflösung.

Neben einigen grundlegenden Eigenschaften isothermer Kalorimeter und deren Anwendungen wird im folgenden Abschnitt besonders auf die Thermoelektrizität eingegangen, auf der die Messung von Wärmeleistungen beruht.

Nachdem im Abschnitt zur Thermodynamik die Größen definiert wurden, anhand derer sich Aussagen zur Freiwilligkeit von Prozessen treffen lassen, beschäftigt sich der Abschnitt zur Kinetik mit dem zeitlichen Verlauf verschiedener, chemischer Reaktionen, wobei besonderes Augenmerk auf Enzymreaktionen gelegt wird.

Wenn nicht anders angegeben, orientieren sich die Diskussion und die Nomenklatur in Kapitel 2.1 an dem „Lehrbuch für Physikalische Chemie“ von Gerd Wedler in der fünften Auflage [4].

2.1.1 Grundlagen der Thermodynamik

2.1.1.1 Wärme und Temperatur

Unter Wärme versteht man ungeordnete Molekülbewegung, die kinetische Energie der Moleküle wird als thermische Energie oder Wärmemenge (Q) bezeichnet. Der in der Literatur häufig als nullter Hauptsatz der Thermodynamik bezeichnete Zusammenhang besagt, dass zwei Systeme, die jeweils mit einem dritten System im thermischen Gleichgewicht stehen, auch untereinander thermisch im Gleichgewicht sind. Gemeinsam ist Systemen im thermischen Gleichgewicht die Temperatur (T). Bei einem Temperaturunterschied kommt es zu einem Wärmefluss von dem System höherer Temperatur zu dem niedrigerer Temperatur.

Die Änderung der Temperatur und die Änderung der Wärmemenge hängen über die Wärmekapazität (C) zusammen. Die Wärmekapazität ist dabei die Wärmemenge, die einem System zugeführt werden muss, um eine bestimmte Temperaturänderung zu erzeugen. Da die

Wärmekapazität und die, auf die Stoffmenge (n) bezogene, molare Wärmekapazität (c) temperaturabhängig sind, muss die Temperaturdifferenz klein gewählt werden.

$$C = \frac{dQ}{dT} \quad 2-1$$

$$c = \frac{1}{n} \cdot \frac{dQ}{dT} \quad 2-2$$

Die Temperaturabhängigkeit der Wärmekapazität ergibt sich aus dem Gleichverteilungssatz [4, S. 84 ff.]. Dieser besagt, dass auf jeden Freiheitsgrad der Translation, Rotation und Schwingung eines Moleküls im Mittel die gleiche Energie entfällt. Jeder Freiheitsgrad geht dabei quadratisch in die Energie des Moleküls ein. Im Fall der Schwingung gehen allerdings wegen der Überlagerung von kinetischer und potentieller Energie je zwei quadratische Freiheitsgrade in jede Schwingung ein. Allerdings werden hier nur die bei gegebener Temperatur anregbaren Freiheitsgrade berücksichtigt, deren Anzahl temperaturabhängig ist. Ein Molekül, in dem bei einer bestimmten Temperatur viele Freiheitsgrade angeregt sind, enthält bei dieser Temperatur mehr Energie als ein Molekül mit einer geringeren Anzahl an anregbaren Freiheitsgraden.

2.1.1.2 Innere Energie und Enthalpie

Die innere Energie (U) ist der Anteil der Energie eines Systems, der sich aus der thermischen Energie und den Wechselwirkungsenergien der Teilchen des Systems zusammensetzt. Für reine, homogene Stoffe, in denen keine Reaktion stattfindet, wird sie oft als Funktion von Temperatur, Volumen (V) und den Stoffmengen der einzelnen Komponenten (k) beschrieben [4, S. 24 ff.]

$$U = f(T, V, n_1, n_2, \dots, n_k) \quad 2-3$$

Unter Berücksichtigung einer Reaktion oder Phasenumwandlung lautet das totale Differential der inneren Energie

$$dU = \left(\frac{\partial U}{\partial T}\right)_{V, n_j} dT + \left(\frac{\partial U}{\partial V}\right)_{T, n_j} dV + \left(\frac{\partial U}{\partial n_1}\right)_{T, V, n_{j \neq 1}} dn_1 + \dots + \left(\frac{\partial U}{\partial n_k}\right)_{T, V, n_{j \neq k}} dn_k \quad 2-4$$

Die innere Energie ist eine Zustandsfunktion, das heißt die Änderung der inneren Energie ist wegunabhängig. Wäre dies nicht der Fall, so wären Kreisprozesse denkbar, mit denen Energie aus dem Nichts erzeugt werden könnte, also ein Perpetuum mobile erster Art. Dies würde dem Energieerhaltungssatz widersprechen. Der erste Hauptsatz der Thermodynamik besagt also, dass die Änderung der inneren Energie gleich der Summe aus ausgetauschter Arbeit (W) und ausgetauschter Wärmemenge ist.

$$dU = \delta W + \delta Q \quad 2-5$$

Eine Form von Arbeit, die mit der Umgebung ausgetauscht werden kann, ist die Volumenarbeit (W_{vol}). Dabei muss die Expansion des Systems gegen einen äußeren Druck (p) erfolgen, es muss also Arbeit geleistet werden. Die ausgetauschte Volumenarbeit ist für reversible Prozesse gegeben durch

$$dW_{vol} = -pdV \quad 2-6$$

Wird in einem reversiblen Prozess nur Volumenarbeit mit der Umgebung ausgetauscht, so kann man schreiben

$$dU = \delta Q_{rev} - pdV \quad 2-7$$

Für isochore Prozesse ist $dV = 0$, die Änderung der inneren Energie ist dann also gleich der mit der Umgebung ausgetauschten Wärmemenge. Bei isobaren Prozessen wird hingegen Volumenarbeit geleistet, hier ist die mit der Umgebung ausgetauschte Wärmemenge also durch die Summe $(U + pV)$ gegeben. Dafür wurde die Enthalpie (H) eingeführt, die definiert ist als

$$H = U + pV \quad 2-8$$

beziehungsweise

$$dH = dU + pdV + Vdp \quad 2-9$$

Wobei bei isobaren Prozessen der Ausdruck Vdp den Wert 0 annimmt. Auch die Wärmekapazitäten unterscheiden sich für den isochoren und isobaren Fall

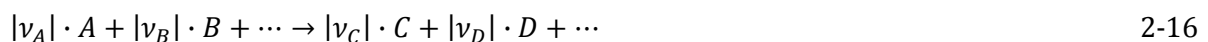
$$dU_V = \delta Q_V \quad 2-10 \quad C_V = \left(\frac{dU}{dT}\right)_V \quad 2-11 \quad c_V = \frac{1}{n} \cdot \left(\frac{dU}{dT}\right)_V \quad 2-12$$

$$dH_p = \delta Q_p \quad 2-13 \quad C_p = \left(\frac{dH}{dT}\right)_p \quad 2-14 \quad c_p = \frac{1}{n} \cdot \left(\frac{dH}{dT}\right)_p \quad 2-15$$

Da das in dieser Arbeit verwendete Chip-Kalorimeter stets einen Druckausgleich zwischen der Zelle und der Umgebung ermöglicht, wird hier mit der Enthalpie argumentiert. Im Fall von Flüssigkeiten ist allerdings aufgrund der geringen Kompressibilität der Anteil der Volumenarbeit und damit der Unterschied zwischen innerer Energie und Enthalpie gering.

2.1.1.3 Reaktionsenthalpie

Findet im System eine Reaktion statt, so ändert sich der Energiegehalt der Verbindung.



Ein oder mehrere Edukte (A, B,...) reagieren dabei in einem bestimmten stöchiometrischen Verhältnis zu den Produkten (C, D,...), wobei der Faktor ν_i die Stöchiometrie angibt. Die stöchiometrischen Faktoren sind dabei für die Edukte negativ und für die Produkte positiv. Die Reaktionslaufzahl (ξ) gibt dabei an, wie oft eine solche Reaktion abgelaufen ist. Die Änderung von ξ ist definiert als die Änderung der Stoffmenge eines Stoffes geteilt durch seinen stöchiometrischen Faktor

$$d\xi = \frac{dn_i}{\nu_i} \quad 2-17$$

Die Enthalpie lässt sich als eine Funktion von Temperatur, Druck, den Ausgangsstoffmengen der Edukte (n_i^a) beschreiben [4, S. 33 ff.]

$$H = f(T, p, n_1^a, \dots, n_k^a) \quad 2-18$$

Berücksichtigt man, dass die Ausgangsstoffmengen n_i^a Konstanten sind ($dn_i^a = 0$) und die Stoffmengenänderungen über die Reaktionslaufzahl beschrieben werden, so folgt für das totale Differential

$$dH = \left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_{p,\xi} dT + \left(\frac{\partial H}{\partial p}\right)_{T,\xi} dp + \left(\frac{\partial H}{\partial \xi}\right)_{T,p} d\xi \quad 2-19$$

Für isotherme ($dT = 0$) und isobare ($dp = 0$) Prozesse gibt $\left(\frac{\partial H}{\partial \xi}\right)_{T,p}$ die Wärmemenge an, die bei einem gewissen Umsatz mit der Umgebung ausgetauscht werden. Es ist üblich, für die Differentiation nach der Reaktionslaufzahl den Operator Δ einzusetzen

$$\frac{\partial H}{\partial \xi} = \Delta H \quad 2-20$$

Nach dem Heßschen Satz ist die Enthalpie die Differenz aus den Enthalpien des Ausgangszustands und des Endzustands und unabhängig vom Weg, über den der Endzustand erreicht wird. Der Einfachheit halber werden Bildungsenthalpien ($\Delta_B H$) eingeführt, welche der Reaktionsenthalpie für die Bildung eines Stoffes aus seinen Elementen entspricht. Man kann nun eine chemische Reaktion beschreiben als den Zerfall der Edukte in die Elemente sowie die Bildung der Produkte aus den Elementen. Die Reaktionsenthalpie ergibt sich dann zu

$$\Delta H = \sum \Delta_B H(\text{Produkte}) - \sum \Delta_B H(\text{Edukte}) \quad 2-21$$

Für Standardzustände ($p = 1,013 \text{ bar}$, $T = 298,15 \text{ K}$, reine Phase) sind Standardbildungsenthalpien ($\Delta_B H^\ominus$) für zahlreiche Substanzen tabelliert. Wenn eine Reaktion nicht unter Standardbedingungen abläuft, so kann die Bildungsenthalpie nach den Kirchhoffschen Sätzen umgerechnet werden

$$\Delta_B H_T = \Delta_B H^\ominus + \int_{298,15 \text{ K}}^T \Delta C_p dT \quad 2-22$$

beziehungsweise

$$\Delta_B H_p = \Delta_B H^\ominus + \int_{1,013 \text{ bar}}^p \left(\Delta V - T \left(\frac{\partial \Delta V}{\partial T} \right)_p \right) dp \quad 2-23$$

Im bisherigen Fall wurde von idealen Mischungen ausgegangen und Wechselwirkungen zwischen den Komponenten des Systems ignoriert. Desweiteren müssen also kalorische Effekte berücksichtigt werden, die beispielsweise durch Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel

entstehen. Es müssen also die Enthalpien zur Entfernung des Eduktes aus der Lösung und zum Lösen des Produktes addiert werden.

2.1.1.4 Entropie und freie Enthalpie

Die Entropie ist eine Zustandsfunktion, die die Richtung von Prozessen vorgibt [4, S. 67 ff. und S. 272 ff.]. Die Änderung der Entropie ist nach Clausius definiert als der Quotient aus der mit der Umgebung reversibel ausgetauschten Wärmemenge und der Temperatur.

$$dS = \frac{dQ_{rev}}{T} \quad 2-24$$

In einem abgeschlossenen System ist die Entropie konstant, wenn ausschließlich reversible Prozesse ablaufen. Für jeden irreversiblen Prozess erhöht sich hingegen die Entropie. Wäre eine Verringerung der Entropie möglich, so wären Prozesse denkbar, bei denen Wärme spontan in Arbeit umgewandelt wird. Ein solches Perpetuum Mobile zweiter Art widerspricht allerdings den Erfahrungen und wird im zweiten Hauptsatz der Thermodynamik ausgeschlossen.

In Flüssigkeiten und Feststoffen ist die Entropie aufgrund der geringen Kompressibilität nur wenig druckabhängig, die Temperatur spielt allerdings eine Rolle. Für isobare Prozesse entspricht die Änderung der Enthalpie der Änderung der Wärmemenge. Über die Definition von C_p ergibt sich die Temperaturabhängigkeit der Entropie zu

$$dS = \frac{C_p}{T} dT \quad 2-25$$

Für die Reaktionsentropie (ΔS) gilt analog zur Reaktionsenthalpie

$$\Delta S = \sum \Delta_B S(\text{Produkte}) - \sum \Delta_B S(\text{Edukte}) \quad 2-26$$

Die Enthalpie und die Entropie können als Gegenspieler aufgefasst werden. Eine hohe Reaktionsenthalpie kann eine negative Reaktionsentropie kompensieren und umgekehrt. Zusammenfassend hat Gibbs die freie Enthalpie (G) definiert

$$G = H - T \cdot S \quad 2-27$$

Bei konstantem Druck und konstanter Temperatur ist dG im Gleichgewicht null und kleiner als null für spontan ablaufende Prozesse. Analog ergibt sich für isochore Prozesse aus der inneren Energie die freie Energie (A)

$$A = U - T \cdot S \quad 2-28$$

2.1.1.5 Chemisches Potential und Gleichgewicht

Das chemische Potential (μ) eines Stoffes ist dessen partielle, molare, freie Enthalpie, sie ist ein Maß für die Triebkraft von Prozessen wie chemischen Reaktionen und Phasenübergängen [4, S. 283 ff.]. Bei konstantem Druck und konstanter Temperatur ist

$$\mu = \left(\frac{\partial G}{\partial n} \right)_{p,T} \quad 2-29$$

Die Änderung der freien Enthalpie ergibt sich bei Änderung der Stoffmengen der einzelnen Komponenten einer Phase zu

$$(dG)_{p,T} = \sum_i \mu_i dn_i \quad 2-30$$

Das chemische Potential der Komponente (i) ist in einer Mischphase geringer als in der reinen Phase im gleichen Aggregatzustand (μ_i^*). Für ideale Mischungen, in denen sich innere Energie, Enthalpie, Wärmekapazität und Volumen additiv aus den Beiträgen der einzelnen Komponenten zusammensetzen, ist das chemische Potential (μ_i^{id}) abhängig vom Molenbruch (x_i), nach

$$\mu_i^{id} = \mu_i^* + RT \cdot \ln x_i \quad 2-31$$

Da Mischungseffekte in der Regel nicht vernachlässigbar sind und zu Abweichungen vom idealen Verhalten führen, wird der Molenbruch durch die Aktivität (a_i) ersetzt, die sich aus einem Korrekturfaktor, dem sogenannten Aktivitätskoeffizienten (f_i), und dem Molenbruch zusammensetzt

$$a_i = f_i \cdot x_i \quad 2-32$$

$$\mu_i^{real} = \mu_i^* + RT \cdot \ln a_i = \mu_i^* + RT \cdot \ln x_i + RT \cdot \ln f_i \quad 2-33$$

Der Bezugszustand μ_i^* ist so gewählt, dass für die reine Phase der Aktivitätskoeffizient gleich eins ist.

Wenn ein Stoff allerdings in Lösung vorliegt und sich bei gleichem Druck und gleicher Temperatur nicht im gleichen Aggregatzustand befindet, wird als Bezugszustand ein hypothetischer Zustand gewählt, in dem von dem Verhalten in ideal (unendlich) verdünnter Lösung auf die reine Phase des Stoffes extrapoliert wird.

$$\mu_i^{real} = \mu_i^\infty + RT \cdot \ln x_i + RT \cdot \ln f_i^\infty \quad 2-34$$

In diesem Fall geht für unendliche Verdünnung der Aktivitätskoeffizient f_i^∞ gegen eins und die reale Lösung verhält sich wie im Bezugszustand.

Analog zur Reaktionsenthalpie und Reaktionsentropie ist die freie Reaktionsenthalpie (ΔG) definiert als die Ableitung der freien Enthalpie nach der Reaktionslaufzahl

$$\left(\frac{\partial G}{\partial \xi}\right)_{p,T} = \Delta G = \sum v_i \mu_i \quad 2-35$$

Man kann nun μ_i gemäß Gleichung 2-33 mit dem chemischen Potential eines beliebigen Standardzustands (μ_i^0) darstellen [4, S. 372 ff.]

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \cdot \ln a_i \quad 2-36$$

$$\Delta G = \sum v_i \mu_i^0 + RT \sum v_i \ln a_i = \sum v_i \mu_i^0 + RT \sum \ln a_i^{v_i} \quad 2-37$$

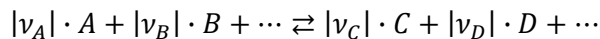
Da die Summe über Logarithmen gleich dem Logarithmus des Produktes eines Operanden ist

$$\sum \ln a_i^{v_i} = \ln \prod a_i^{v_i} \quad 2-38$$

ergibt sich

$$\Delta G = \sum v_i \mu_i^0 + RT \ln \prod a_i^{v_i} = \Delta G^0 + RT \ln \prod a_i^{v_i} \quad 2-39$$

Für eine Gleichgewichtsreaktion des Typs



ergibt sich für den Ausdruck ($\prod a_i^{v_i}$) aufgrund der unterschiedlichen Vorzeichen von v_i

$$\prod a_i^{v_i} = \frac{a_C^{|v_C|} \cdot a_D^{|v_D|} \cdot \dots}{a_A^{|v_A|} \cdot a_B^{|v_B|} \cdot \dots} \quad 2-40$$

Dieser Ausdruck ist im Gleichgewicht identisch mit der thermodynamischen Gleichgewichtskonstante (K). Da im Gleichgewicht ΔG den Wert null annimmt, ergibt sich

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad 2-41$$

oder

$$K = \exp\left(-\frac{\Delta G^0}{RT}\right) \quad 2-42$$

Die Lage des Gleichgewichts ist abhängig von ΔG^0 , der Temperatur und dem Druck, wobei letztere Abhängigkeit in Flüssigkeiten wegen der geringen Kompressibilität nicht ins Gewicht fällt. Die van't Hoffsche Reaktionsisobare beschreibt die Temperaturabhängigkeit bei konstantem Druck

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T}\right)_p = \frac{\Delta H^0}{RT^2} \quad 2-43$$

Im Falle einer exothermen Reaktion ($\Delta H^0 < 0$) besitzt der Term auf der rechten Seite ein negatives Vorzeichen, bei einer endothermen Reaktion entsprechend ein positives. Bei zunehmender Temperatur ($\partial T > 0$) ist das Vorzeichen des linken Terms positiv, bei abnehmender Temperatur negativ. Beispielsweise wird also bei einer exothermen Reaktion durch Temperaturerhöhung K verringert und somit das Gleichgewicht in Richtung der Edukte verschoben.

2.1.1.6 Redoxreaktionen

Im Fall von Redox-Reaktionen wird anstelle des chemischen Potentials das elektrochemische Potential ($\tilde{\mu}_i$) verwendet [4, S. 448 ff.], bei dem das elektrische Potential der an der Reaktion beteiligten, geladenen Teilchen (Elektronen, Ionen) berücksichtigt wird

$$\tilde{\mu}_i = \mu_i + z_i F \varphi \quad 2-44$$

mit der Faraday-Konstante (F), dem Galvani-Potential (φ) und der Anzahl der an der Reaktion beteiligten Elektronen (z_i). Das Galvani-Potential ist das elektrische Potential eines geladenen Teilchens im inneren einer Phase (z.B. einer Elektrolytlösung oder einer Elektrode) bezogen auf den wechselwirkungsfreien Raum. Die Differenz zwischen den Galvani-Potentialen in der Lösung und in einer Elektrode ergibt die Galvani-Spannung ($\Delta\varphi$), die jedoch nicht einzeln, sondern nur gegen eine andere Elektrode gemessen werden kann. Für die Elektrodenpotentiale (E) ergibt sich

$$E = \Delta\varphi_1 - \Delta\varphi_2 \quad 2-45$$

Per Definition wird die Galvani-Spannung der Standard-Wasserstoffelektrode gleich null gesetzt und die anderen Elektrodenpotentiale darauf bezogen. Die Elektrodenpotentiale sind abhängig von der Aktivität der beteiligten Redoxpartner und ergeben sich nach der Nernstschen Gleichung zu

$$E = E^0 - \frac{RT}{zF} \ln \prod a_i^{v_i} \quad 2-46$$

mit dem Standard Elektrodenpotential (E^0). Das Produkt aus der Potentialdifferenz und der Anzahl der übertragenen Elektronen ist die elektrische Energie, mit der Arbeit verrichtet werden kann. Da ΔG angibt, wie viel Arbeit aus einem Prozess entnommen werden kann, sodass dieser noch freiwillig abläuft, lassen sich diese gleichsetzen

$$\Delta G = -zFE \quad 2-47$$

bzw. unter Standardbedingungen

$$\Delta G^0 = -zFE^0 \quad 2-48$$

Das Minuszeichen ergibt sich aus der Konvention, dass E für freiwillig ablaufende Reaktionen positiv ist, ΔG hingegen negativ.

2.1.2 Transporterscheinungen

Transporterscheinungen treten generell auf, wenn ein Gradient einer zu transportierenden Größe (Γ) besteht [4, S. 814 ff.]. Γ ist an die Teilchen im System gebunden, die Transportgröße pro Teilchen sei $\bar{\Gamma}$. Im Fall von Wärmeleitung ist Γ die Wärme, bei Diffusionsvorgängen die Dichte einer Teilchenart. Durch den Gradienten von Γ ist auch das chemische Potential im System nicht konstant und es kommt zu einem Ausgleich durch einen Transportvorgang. In dem hier betrachteten Fall soll allerdings ein stationärer Nichtgleichgewichtszustand betrachtet werden, bei dem der Gradient zeitlich konstant ist.

Der Fluss (J_Γ) ist die Menge an Γ , die pro Zeit (t) in z-Richtung durch eine Fläche (A) transportiert wird, die an der Stelle z_0 in der x-y-Ebene aufgespannt ist.

$$J_\Gamma = \frac{d\Gamma}{A dt} = -a \cdot \text{grad}\Gamma \quad 2-49$$

a ist dabei der Transportkoeffizient. Der Transport von Γ sei zunächst an den Transport von Teilchen gebunden. Die Transportgröße wird aus beiden Richtungen zu der Fläche A transportiert. Zu klären ist, wie groß die Differenz des Transports aus beiden Richtungen ist.

Wenn bei jedem Zusammenstoß der Teilchen ein vollständiger Ausgleich der Transportgröße stattfindet, dann besitzen die auf A auftreffenden Teilchen im Mittel denjenigen Wert von $\bar{\Gamma}$, den sie besaßen, als es das letzte Mal zu einem Stoß kam. Die z-Koordinate, an der der letzte Stoß vor Auftreffen auf A stattfand, entspricht für Teilchen, die aus der einen Richtung kommen, der Summe aus der Koordinate z_0 und der mittleren, freien Weglänge (λ_M) oder für Teilchen aus der anderen Richtung der Differenz aus der Koordinate z_0 und λ_M . Die Differenz zwischen $\bar{\Gamma}$ an z_0 und an $z_0 \pm \lambda_M$ ist das Produkt aus der Steigung des Gradienten von $\bar{\Gamma}$ in z-Richtung $\left(\frac{d\bar{\Gamma}}{dz}\right)$ und λ_M .

Um auf den makroskopischen Transport von Γ rückschließen zu können, muss $\bar{\Gamma}$ mit der Anzahl der auf A auftreffenden Teilchen multipliziert werden. Es ergibt sich für das transportierte Γ pro Fläche und pro Zeit

$$\frac{d\Gamma_1}{A \cdot dt} = \frac{1}{4} \cdot {}^1N \cdot \bar{v} \cdot \left(\bar{\Gamma}_{z_0} + \left(\frac{d\bar{\Gamma}}{dz} \right)_{z_0} \cdot \lambda_M \right) \quad 2-50$$

und

$$\frac{d\Gamma_2}{A \cdot dt} = \frac{1}{4} \cdot {}^1N \cdot \bar{v} \cdot \left(\bar{\Gamma}_{z_0} - \left(\frac{d\bar{\Gamma}}{dz} \right)_{z_0} \cdot \lambda_M \right) \quad 2-51$$

Dabei ist 1N die Teilchenzahldichte, also der Quotient aus der Avogadroschen Konstante und dem molaren Volumen (N_A/V_{mol}) und \bar{v} die mittlere Geschwindigkeit der Teilchen. Die komplizierte Herleitung nach [4, S. 786 ff. und S. 999 ff.] basiert auf der eindimensionalen Geschwindigkeitsverteilung der Teilchen, die über die drei Raumrichtungen integriert wird. Dabei werden die Komponenten parallel zur Fläche A in den Grenzen $-\infty$ bis ∞ integriert, die Komponente orthogonal zu A hingegen nur von 0 bis ∞ . Durch Umformen lässt sich die Teilchenbewegung durch die mittlere Geschwindigkeit der Teilchen darstellen, ohne zu

vernachlässigen, dass sich nicht alle Teilchen orthogonal zu A bewegen. Auf die ausführliche Herleitung wird an dieser Stelle verzichtet.

Die Differenz aus den Gleichungen 2-52 und 2-53 entspricht J_T

$$J_T = -\frac{1}{2} \cdot {}^1N \cdot \bar{v} \cdot \lambda_M \cdot \left(\frac{d\bar{\Gamma}}{dz} \right)_{z_0} \quad 2-54$$

2.1.2.1 Wärmefluss

Wie bereits beschrieben ist eine mögliche Transportgröße die Wärme, wenn ein Temperaturgradient vorliegt. Hier soll zunächst die Wärmeleitung in Gasen beschrieben werden. Die mittlere Energie, die durch ein Teilchen transportiert wird, beträgt $\left(\frac{q}{N_A} \right)$, mit der molaren Wärmemenge (q) und der Avogadroschen Konstante (N_A). Der Wärmefluss beträgt dann

$$J_Q = -\frac{1}{2} \cdot \frac{{}^1N}{N_A} \cdot \bar{v} \cdot \lambda_M \cdot \left(\frac{dq}{dz} \right)_{z_0} \quad 2-55$$

Diese Gleichung lässt sich umformen zu

$$J_Q = -\frac{1}{2} \cdot \frac{{}^1N}{N_A} \cdot \bar{v} \cdot \lambda_M \cdot \left(\frac{\partial q}{\partial T} \right)_v \cdot \left(\frac{dT}{dz} \right)_{z_0} \quad 2-56$$

wobei sich $\left(\frac{\partial q}{\partial T} \right)_v$ durch die Wärmekapazität c_v ersetzen lässt. Das Produkt $\left(\frac{{}^1N}{N_A} \cdot c_v \right)$ wird dabei üblicherweise ersetzt durch 1C_v

$$J_Q = -\frac{1}{2} \cdot {}^1C_v \cdot \bar{v} \cdot \lambda_M \cdot \left(\frac{dT}{dz} \right)_{z_0} \quad 2-57$$

Den Ausdruck $\left(\frac{1}{2} \cdot {}^1C_v \cdot \bar{v} \cdot \lambda_M \right)$ fasst man zum Wärmeleitkoeffizienten λ zusammen

$$J_Q = \frac{dQ}{Adt} = -\lambda \cdot \left(\frac{dT}{dz} \right)_{z_0} \quad 2-58$$

In dem Lehrbuch „Gerthsen Physik“ [5] wird die Wärmeleitfähigkeit in Isolatoren analog zu der in Gasen beschrieben. Dabei wird die Energie in Gitterschwingungen, sogenannten Phononen, transportiert, die in einer bestimmten Dichte vorkommen, ebenfalls stoßen können und somit auch eine mittlere, freie Weglänge haben. Die mittlere Geschwindigkeit der Teilchen im Gas wird durch die Schallgeschwindigkeit ersetzt. Auch hier kann ein Wärmeleitkoeffizient λ definiert werden.

In Metallen wird die Wärme hauptsächlich durch die Elektronen im Leitungsband transportiert. Da sich diese Elektronen ähnlich wie im Gas frei bewegen können, kann der Ausdruck für die Wärmeleitfähigkeit in Gasen verwendet werden.

Generell ist die Wärmeleitfähigkeit von Gasen gering, von kondensierten Materialien höher und von Metallen aufgrund der hohen Beweglichkeit der Elektronen besonders hoch.

Um den Wärmefluss von einem Reservoir (1) in ein anderes (2) durch eine Wand der Dicke Δz zu beschreiben, muss nach Variablenseparation in Gleichung 2-58 die eine Teilgleichung von z_1 bis z_2 und die andere von T_1 bis T_2 integriert werden. Auflösen nach dem Schema $\int_{x_1}^{x_2} dx = x_2 - x_1 = \Delta x$ ergibt

$$\frac{dQ}{dt} \equiv \dot{Q} = -\lambda \cdot A \cdot \left(\frac{\Delta T}{\Delta z} \right) \quad 2-59$$

Der Wärmefluss ist also proportional zur Temperaturdifferenz der beiden Reservoirs, sowie der Wärmeleitfähigkeit und der Fläche der Wand und umgekehrt proportional zur Dicke der Wand. Im Fall einer mehrschichtigen Wand, die aus i Schichten aufgebaut ist, resultiert der Wärmefluss

$$\dot{Q} = - \left(\sum \frac{\Delta z_i}{\lambda_i} \right)^{-1} \cdot A \cdot \Delta T \quad 2-60$$

Dabei werden analog zur elektrischen Reihenschaltung die thermischen Widerstände $(\Delta z_i / \lambda_i)$ zum Gesamtwiderstand aufsummiert. Der Kehrwert dieser Summe ist der thermische Leitwert der Wand.

2.1.2.2 Thermodiffusion und Thermoelektrizität

Zum besseren Verständnis der Funktionsweise von Thermosäulen werden hier zunächst die Thermodiffusion und die Thermoelektrizität behandelt. In Abschnitt 2.1.2 wurde von einer konstanten Geschwindigkeit ausgegangen, mit der die Teilchen \bar{v} transportieren. Legt man einen Temperaturgradienten an ein Metall an, so wird dies allerdings zu einem Geschwindigkeitsgradienten der Elektronen im Leitungsband führen. Durch den Geschwindigkeitsgradienten werden die Elektronen auf der kälteren Seite angereichert, da sie sich hier langsamer bewegen. Nach Pelster et al. [6] kommt es dadurch zum Aufbau einer elektrischen Spannung, die als rücktreibende Kraft wirkt und im Gleichgewicht verschwindet der Fluss der Elektronen. Diesen Effekt nennt man Seebeck-Effekt. Die Thermospannung (U_T) berechnet sich nach

$$U_T = - \int_{T_1}^{T_2} Q_S dT \quad 2-61$$

wobei der Seebeck-Koeffizient (Q_S) die Abhängigkeit der mittleren, kinetischen Energie $\bar{\epsilon}$ der Elektronen von der Temperatur beschreibt

$$Q_S = - \frac{1}{3e} \cdot \frac{d\bar{\epsilon}}{dT} \quad 2-62$$

mit der Elementarladung (e). Der Faktor $1/3$ spiegelt die Tatsache wider, dass nur die Geschwindigkeitskomponente parallel zum Temperaturgradienten berücksichtigt wird. Die Verteilung der Elektronen auf verschiedene Energieniveaus wird durch die Fermi-Dirac-Statistik beschrieben. Bei einer kovalenten Bindungen zwischen zwei Atomen kommt es zu einer

Aufspaltung in ein bindendes und ein antibindendes Orbital mit unterschiedlichen Energieniveaus (ε). Das niedrigere Energieniveau wird im Grundzustand mit beiden an der Bindung beteiligten Elektronen besetzt. Ein Metall kann als ein Riesenmolekül aufgefasst werden, es kommt zu einer Aufspaltung in eine Anzahl an Energieniveaus, die der Anzahl der Atome entspricht. Da die Energieniveaus sehr dicht beieinander liegen, spricht man von einem Band. Die Besetzung der Energieniveaus entspricht nicht der Boltzmannstatistik, da die Orbitale nach dem Pauli-Prinzip besetzt werden müssen. Bei einer Temperatur von $T = 0K$ werden die Energieniveaus vom niedrigsten Niveau her mit je zwei Elektronen aufgefüllt, die Hälfte der Orbitale ist also besetzt. Die Lage des höchsten, bei $T=0$ besetzten Energieniveaus bezeichnet man als Fermienergie (ε_F). Bei Temperaturen $T > 0K$ kommt es zur Anregung von Elektronen auf Niveaus oberhalb der Fermienergie. Die Verteilung folgt der Fermi-Diracschen Verteilungsfunktion $f(\varepsilon)$

$$f(\varepsilon) = \frac{1}{\exp\left(\frac{\varepsilon - \varepsilon_F}{kT}\right) + 1} \quad 2-63$$

Für Niveaus, die weit unterhalb der Fermienergie liegen, weicht der exponentielle Term nur für sehr hohe Temperaturen signifikant von 0 ab, sodass diese Niveaus bei moderaten Temperaturen praktisch voll besetzt sind. Für das Niveau, das der Fermienergie entspricht, ist der exponentielle Term 1 und das Niveau halb besetzt. Für Niveaus oberhalb der Fermienergie überwiegt der exponentielle Term immer stärker und die Besetzung geht gegen 0. Je höher die Temperatur ist, desto breiter ist der Bereich, in dem der exponentielle Term weder sehr große Werte annimmt, noch gegen 0 geht. Das bedeutet, dass bei steigenden Temperaturen immer mehr Elektronen aus den Niveaus unterhalb der Fermienergie in solche oberhalb der Fermienergie angeregt werden. Die mittlere Geschwindigkeit der Elektronen ist also temperaturabhängig. Einsetzen ergibt

$$Q_S = -\frac{\pi^2 k^2 T}{2e \varepsilon_F} \quad 2-64$$

wobei die mittlere, freie Weglänge der Elektronen als energieunabhängig angenommen wurde. Auf eine komplizierte Herleitung des Zusammenhangs wird hier verzichtet. Q_S ist umgekehrt proportional zur Fermienergie, also materialabhängig. Außerdem ist Q_S proportional zu T . Wenn allerdings die Temperaturdifferenzen klein sind gegenüber den absoluten Werten der Temperaturen, dann spielt diese eine untergeordnete Rolle und die Thermospannung lässt sich vereinfachen zu

$$U_T = -Q_S \cdot (T_2 - T_1) \quad 2-65$$

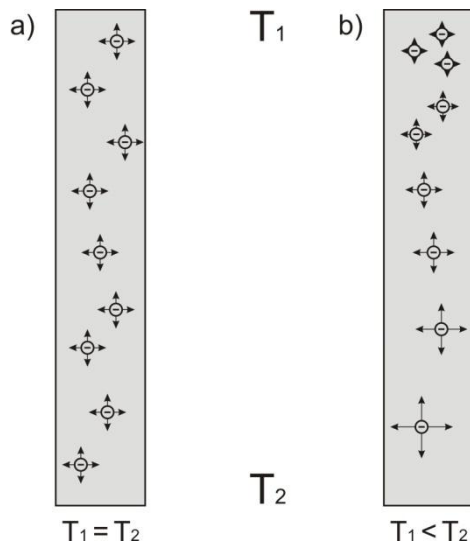


Abbildung 2-1: Ursache von Thermospannungen in Metallen. a) Bei gleichmäßiger Temperaturverteilung besitzen die Elektronen im Mittel überall die gleiche Geschwindigkeit. b) Durch einen Temperaturgradienten kommt es zur Anreicherung von Elektronen auf der kälteren Seite, da hier die mittlere Geschwindigkeit geringer ist

Die Thermospannung führt allerdings nicht zu einem Stromfluss, wenn man aus nur einem Material einen Stromkreis baut, an den man eine Temperaturdifferenz anlegt. Auf jedem der beiden Wege vom warmen zum kalten Ende bildet sich zwar eine Spannung aus, die ist aber dem Betrag nach gleich groß und entgegen gerichtet, so dass sie die beiden Thermospannungen kompensieren. Verbindet man allerdings zwei unterschiedliche Materialien mit unterschiedlichen Seebeck-Koeffizienten miteinander und legt eine Temperaturdifferenz an die beiden Verbindungspunkte an, so sind die resultierenden Spannungen zwar immer noch entgegen gerichtet, allerdings dem Betrag nach nicht mehr gleich groß. Sie kompensieren sich also nicht mehr vollständig und es resultiert ein Strom, den man abgreifen und nutzen kann. Diese Anordnung nennt man Thermoelement. Es lassen sich auch mehrere Thermoelemente in Reihe schalten. Dabei werden die beiden Materialeien alternierend miteinander verbunden. In eine Richtung entlang des Leiters betrachtet liegt dabei immer die Verbindung von Material 1 zu Material 2 auf der einen (beispielsweise wärmeren) Seite (hot junction), und die Verbindung von Material 2 zu Material 1 auf der anderen Seite (cold junction).

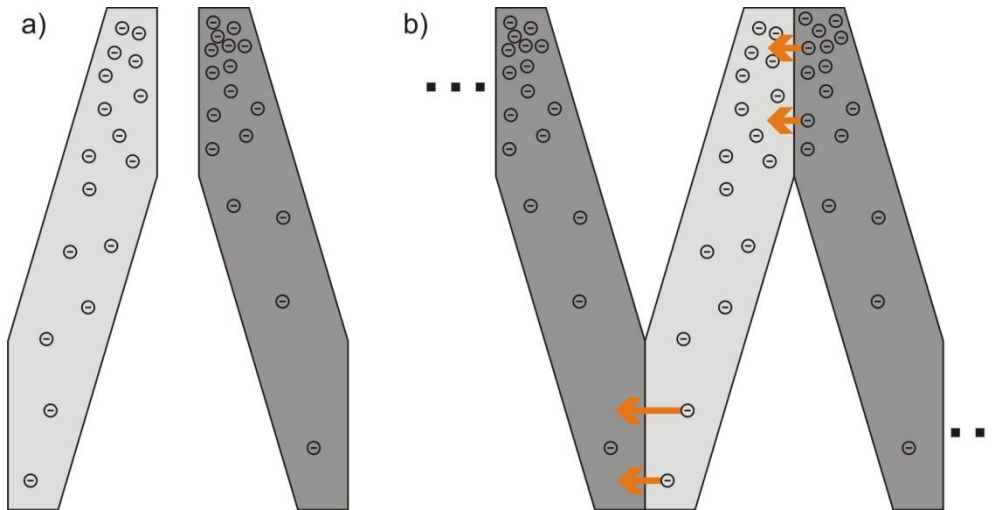


Abbildung 2-2: Funktionsweise einer Thermosäule. a) Unterschiedliche Materialien bilden unterschiedlich starke Thermospannungen aus. b) In einer Reihenschaltung fließen aufgrund der unterschiedlichen Thermospannungen Ströme

2.1.3 Isotherme Kalorimetrie

Isotherme Kalorimetrie ist eine Methode, die genutzt wird, um chemische Reaktionen und andere Vorgänge zeitaufgelöst zu quantifizieren. Die Signalintensitäten sind dabei proportional zur Wärmeleistung (\dot{Q}) des Systems und damit zu der Geschwindigkeit, mit der die Reaktion abläuft. Integration der Signale über die Zeit führt damit zu Größen, die proportional zum Stoffumsatz sind. Die Reaktionen können in homogener Phase oder heterogener Phase ablaufen und es wird keinerlei Markierung benötigt, die die Reaktion beeinflussen könnte. Außerdem ist die Kalorimetrie wenig anfällig bezüglich Artefakten, die durch die Probenmatrix verursacht werden und damit sehr robust. Allerdings können manche Reaktionen nicht verfolgt werden, da die Wärmeleistung nicht ausreichend groß ist.

Die Reaktion findet in einer Messzelle statt, die über eine Thermosäule mit einer exakt thermostatisierten Wärmesenke in Kontakt steht. Bei konstanter Wärmeleistung entsteht ein stationärer Nichtgleichgewichtszustand, der dadurch gekennzeichnet ist, dass die Temperatur in der Zelle um einen gewissen Betrag von der der Wärmesenke abweicht. Die Temperaturdifferenz ist so groß, dass der resultierende Wärmefluss den gleichen Betrag hat, wie die in der Zelle generierte Wärmeleistung. Unter der Annahme konstanter Wärmekapazitäten, von denen in der isothermen Kalorimetrie ausgegangen werden kann, ist die Temperaturdifferenz proportional zu der Wärmeleistung in der Zelle. Zur Detektion der Temperaturdifferenz werden Thermosäulen eingesetzt, die eine Spannung proportional zur Temperaturdifferenz generieren (unter der Annahme konstanter Seebeck-Koeffizienten, auch dies ist in der isothermen Kalorimetrie gut erfüllt). Die gemessene Spannung ist also bei konstanter Wärmeleistung nach einiger Zeit proportional zur Wärmeleistung in der Zelle.

Ändert sich hingegen die Wärmeleistung in der Messzelle, so strebt das System auf eine neue Gleichgewichtstemperatur zu. Um diese neue Gleichgewichtstemperatur zu erreichen, muss, wie zuvor beschrieben, ein Wärmefluss zwischen der Zelle und der Wärmesenke stattfinden. Dieser Prozess unterliegt einer gewissen Kinetik, deren Zeitkonstanten häufig in derselben Größenordnung liegen, wie die von Reaktionen, die sich mit kalorimetrischen Verfahren

untersuchen lassen. Dadurch ist die Kalorimetrie auf vergleichsweise langsame Reaktionen beschränkt. Ist die Reaktion hingegen zu langsam, so ist die Wärmeleistung oft nicht groß genug um ein messbares Signal zu erhalten.

Zwei Strategien können helfen, die zeitliche Auflösung zu verbessern. Eine Möglichkeit bieten Verfahren zur dynamischen Korrektur, die darauf abzielen, die Kinetik des Wärmeflusses mathematisch zu eliminieren, um eine höhere, zeitliche Auflösung zu erhalten. Bei dem Isothermen Titrationskalorimeter TAM 2277 von der Firma TA-Instruments (ehemals Thermometric) wird der Signalverlauf ($f(t)$) um die gewichtete erste und zweite Ableitung korrigiert

$$f_{korrr}(t) = f(t) + (\tau_1 + \tau_2) \frac{df(t)}{dt} + (\tau_1 \cdot \tau_2) \frac{d^2f(t)}{dt^2} \quad 2-66$$

Durch Addition der um die Zeitkonstanten (τ_i) gewichteten, ersten Ableitung wird der Signalverlauf in Bereichen zunehmender Steigung steiler. Ein langsam abklingendes Signal fällt also schneller ab. Im Gleichgewicht ist allerdings die Steigung null und es findet auch keine Korrektur statt. Es wird also mit und ohne dynamische Korrektur derselbe Gleichgewichtswert erreicht, mit Korrektur allerdings schneller. Um eine weitere Verbesserung bei der Anpassung an den zu erwartenden Signalverlauf zu erzielen, wird zusätzlich um die gewichtete zweite Ableitung korrigiert. Dadurch kann die Krümmung des Signalverlaufs moduliert werden. Um die Zeitkonstanten zu bestimmen, wird mit einem Heizelement ein bekanntes Wärmeleistungsprofil generiert und die Zeitkonstanten so angepasst, dass die korrigierten Daten möglichst wenig von dem angelegten Leistungsprofil abweichen. Häufig kommt es aber zu typischen Artefakten, wie einer übermäßigen Korrektur und daraus resultierenden Peaks, die nicht mit realen Vorgängen korreliert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein vereinfachtes Verfahren zur dynamischen Korrektur etabliert, das diese Artefakte weitgehend vermeidet. Dazu wurde ein Modell zur Beschreibung Wärmeflusses bei sich verändernden Wärmeleistungen hergeleitet und ein mathematisches Verfahren etabliert, das es ermöglicht, ausschließlich die durch den langsamen Temperaturausgleich verursachten Effekte zu eliminieren. Dieses Verfahren wird im Ergebnisteil im Detail beschrieben.

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der zeitlichen Auflösung ist die Verringerung des Probenvolumens. Dadurch wird die Wärmekapazität der Probe verringert und weniger Wärme muss ausgetauscht werden, um die neue Gleichgewichtstemperatur zu erreichen. Das bedeutet allerdings nicht, dass eine geringere Wärmeleistung detektiert werden kann. Stattdessen ist also eine höhere Leistungsdichte erforderlich, was in der Regel nur durch eine Erhöhung der Konzentration erreicht werden kann. Gerade bei der Bestimmung von Affinitätskonstanten sind hohe Konzentrationen allerdings oft von Nachteil, da in diesem Fall einer der Interaktionspartner bei jedem Titrationsschritt praktisch vollständig abreagiert. Informationen über Affinitätskonstanten können aber nur erhalten werden, wenn die Reaktion nicht vollständig abläuft, da nur dann die Affinitätskonstante einen messbaren Einfluss auf die Anzahl der stattfindenden Reaktionen hat. In einem großen Volumen hingegen kann man selbst bei relativ niedrigen Konzentrationen eine große Anzahl an Reaktionen ablaufen lassen. Je nach Anwendung kann also ein großes oder kleines Volumen von Vorteil sein.

Eine hohe zeitliche Auflösung ist aber nicht nur wichtig für kinetische Untersuchungen, sondern auch für die Bestimmung der Reaktionsenthalpie, da diese durch Integration der Wärmeleistung über die Zeit bestimmt wird. Durch die Trägheit des Detektors wird also für eine

gewisse Zeit über eine zu hohe oder zu niedrige Wärmeleistung integriert. Dies führt zu ungenauen Ergebnissen.

In dieser Arbeit wurde ein Chip-Kalorimeter verwendet, das von Herrn Dr. Lerchner an der TU Freiberg gebaut wurde. Der Aufbau ist in Abschnitt 3.2.1 im Detail beschrieben. Die Reaktion findet in einer Flusszelle mit einem, für die Kalorimetrie relativ kleinen, Probenvolumen von ca. 20 µl statt. Die Wärmeleistung in der Probe kann im Fluss oder im gestoppten Fluss gemessen werden, über zwei separate Fluidiken können zwei Lösungen in der Zelle gemischt werden. Aufgrund des geringen Probenvolumens sind die Zeitkonstanten relativ gering und die Dauer eines Experiments kann auf wenige Minuten reduziert werden. Allerdings ist auch eine recht hohe Leistungsdichte erforderlich. Besonders stark ist das Gerät in der Untersuchung von Enzymreaktionen und mikrobiellem Stoffwechsel. Messungen von Affinitätskonstanten sind hingegen schwerer zu realisieren.

2.1.4 Kinetik

Im Abschnitt über isotherme Kalorimetrie wurde darauf hingewiesen, dass die Wärmeleistung proportional zur Reaktionsgeschwindigkeit ist. Die Reaktionslaufzahl ξ ist bei der Definition der Reaktionsenthalpie eingeführt worden, die Reaktionsenthalpie wurde definiert als die Ableitung der Enthalpie nach ξ

$$\frac{\partial H}{\partial \xi} = \Delta H \quad 2-20$$

Entscheidend in der Kalorimetrie ist nun die Änderung der Reaktionslaufzahl mit der Zeit. Die Geschwindigkeit einer Reaktion bezogen auf die Stoffmengen (v_n) ist gleich der Ableitung von ξ nach der Zeit t [4, S. 166 ff.]

$$\frac{d\xi}{dt} = v_n \quad 2-67$$

Das Produkt aus der Geschwindigkeit der Reaktion und der Reaktionsenthalpie im isobaren und isothermen Fall ergibt die Wärmeleistung

$$\frac{\partial H}{\partial \xi} \cdot \frac{d\xi}{dt} = \frac{dH}{dt} = \dot{Q} \quad 2-68$$

In der Regel ist es zweckmäßiger, mit Konzentrationen statt mit Stoffmengen zu arbeiten. Dazu wird die Reaktionsvariable (x) eingeführt, die analog zur Konzentration (Stoffmenge/Volumen) definiert ist

$$\frac{\xi}{V} = x \quad 2-69$$

wodurch die Ableitung von x nach der Zeit eine Konzentrationsänderung anstelle einer Stoffmengenänderung beschreibt

$$v = \frac{dx}{dt} = \frac{1}{\nu_i} \cdot \frac{d[i]}{dt} \quad 2-70$$

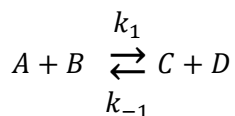
Dabei ist $[i]$ die Konzentration des Stoffes i , und v die Geschwindigkeit der Konzentrationsänderung, vereinfachend als Reaktionsgeschwindigkeit bezeichnet.

Die Reaktionsgeschwindigkeit lässt sich unter Vernachlässigung der Rückreaktion beschreiben durch

$$\frac{dx}{dt} = k \cdot [A]^a \cdot [B]^b \dots \quad 2-71$$

wobei k die Ratenkonstante der Reaktion ist. Im Fall von Elementarreaktionen bezeichnet man die Exponenten als Reaktionsordnung bezogen auf den jeweiligen Stoff, die Summe der Exponenten gibt die Reaktionsordnung der gesamten Reaktion. Die Summe der stöchiometrischen Koeffizienten wird als Molekularität bezeichnet. Im einfachsten Fall sind Reaktionsordnung und Molekularität gleich. Häufig findet man allerdings Abweichungen, beispielsweise bei mehreren, aufeinander folgenden Teilschritten einer Reaktion, bei katalysierten Reaktionen oder bei Reaktionen pseudo-erster Ordnung, bei der ein Reaktionspartner in großem Überschuss vorliegt und seine Konzentration daher als konstant angesehen werden kann.

Betrachtet man eine einfache Gleichgewichtsreaktion, bei der nach Produktbildung eine Rückreaktion stattfinden kann, so werden die Reaktionsgeschwindigkeiten für die Hin- und die Rückreaktion nach einiger Zeit gleich sein. Da die Reaktionsenthalpie für die Hin- und die Rückreaktion zwar den gleichen Betrag, aber ein umgekehrtes Vorzeichen besitzt, ist die Wärmeleistung im Gleichgewicht null. Setzt man die Ausdrücke für die Reaktionsgeschwindigkeiten gleich, so erhält man für die Reaktion



im Gleichgewicht

$$\frac{[C][D]}{[A][B]} = \frac{k_1}{k_{-1}} = K \quad 2-72$$

Die Gleichgewichtskonstanten lassen sich also über das Verhältnis der Ratenkonstanten der Hin- und Rückreaktion beschreiben.

Chemische Reaktionen laufen über Zwischenstufen, bei denen die Bindungen im Edukt bereits gelockert, die neuen Bindungen aber noch nicht voll ausgebildet sind. Diese Zwischenstufe hat die höchste freie Enthalpie. Die Reaktionskoordinate beschreibt den Verlauf einer Reaktion von den Edukten zu den Produkten. Trägt man die freie Standard-Enthalpie gegen die Reaktionskoordinate auf, so erhält man die freie Standard-Aktivierungsenthalpie ($\Delta G^{0\ddagger}$) als Differenz der freien Standard-Enthalpie der Edukte und der Zwischenstufe.

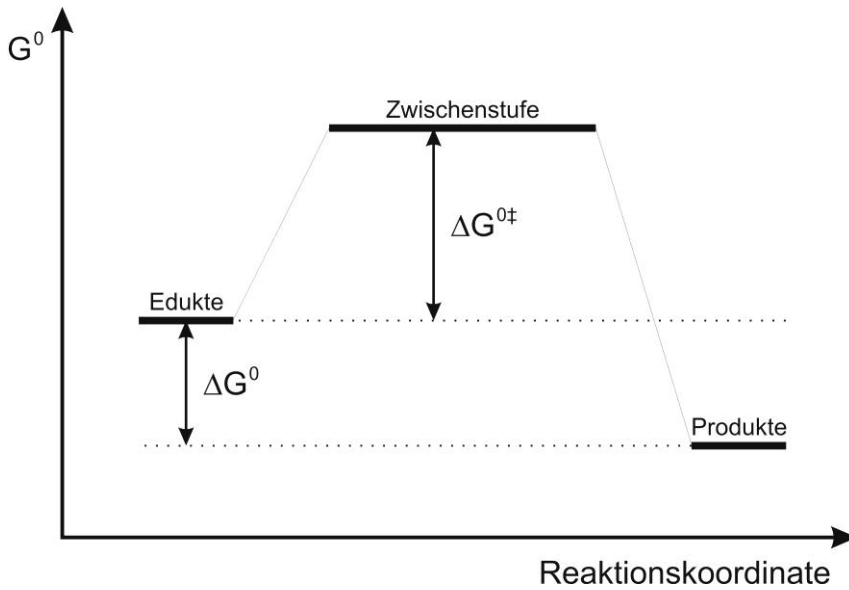


Abbildung 2-3: Auftragung der freien Standard-Enthalpie gegen die Reaktionskoordinate für eine Reaktion ohne Katalysator

Es liegt eine Gleichgewichtsreaktion zwischen den Edukten und der Zwischenstufe vor, die der Produktbildung vorgeschaltet ist. Je höher $\Delta G^{0\ddagger}$ ist, desto geringer ist die Konzentration der Zwischenstufe und desto langsamer findet die Produktbildung statt.

2.1.4.1 Enzymreaktionen

Enzyme übernehmen die Aufgabe eines Katalysators. Sie bilden mit der Zwischenstufe einen Komplex, dessen freie Enthalpie abgesenkt wird. Trägt man für eine katalysierte Reaktion G^0 gegen die Reaktionskoordinate auf, so erkennt man, dass $\Delta G^{0\ddagger}$ abgesenkt wird.

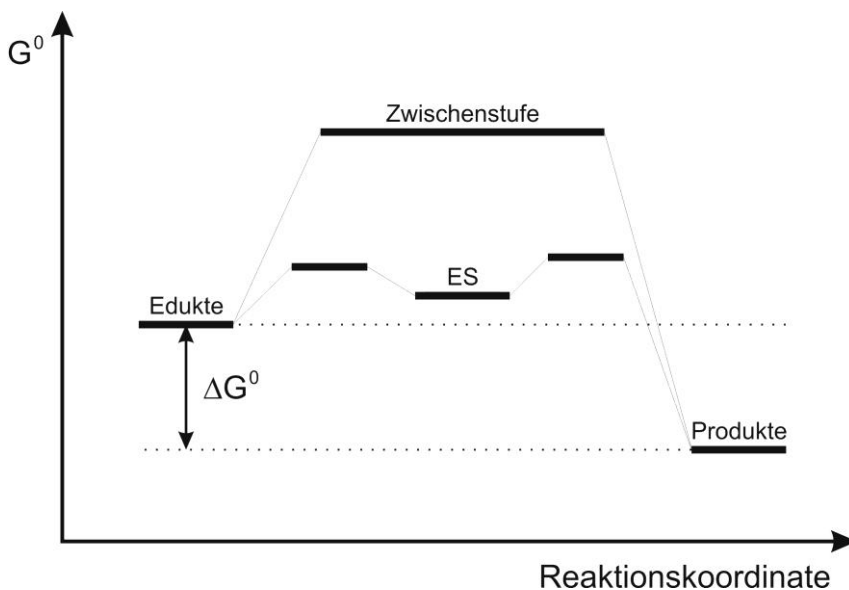
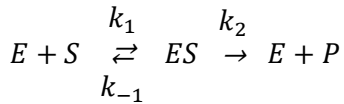


Abbildung 2-4: Auftragung der freien Standard-Enthalpie gegen die Reaktionskoordinate für eine Enzymreaktion. Die freie Standard-Aktivierungsenthalpie ist deutlich abgesenkt

Die Reaktion findet dadurch schneller statt. Da ΔG^0 durch das Enzym allerdings nicht beeinflusst wird, wird auch die Lage des Gleichgewichts zwischen Produkten und Edukten nicht beeinflusst, sondern nur die Geschwindigkeit, mit der sich dieses Gleichgewicht einstellt.

Die Michaelis-Menten-Theorie [4, S. 944 ff.] beschreibt die Kinetik von Enzymreaktionen unter idealisierten Bedingungen. Sie geht aus von dem Reaktionsmechanismus



Im ersten Schritt wird aus dem Enzym (E) und dem Substrat (S) der Enzym-Substrat-Komplex (ES) gebildet. Dieser zerfällt in das freie Enzym sowie das Produkt (P) oder das Substrat. Die Rückreaktion vom Produkt zum Enzym-Substrat-Komplex wird vernachlässigt.

Für die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes $[ES]$ ergibt sich

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 \cdot [ES] \quad 2-73$$

Die Substratkonzentration zu Beginn der Reaktion wird hier nicht verwendet, da sich bereits der Enzym-Substrat-Komplex gebildet hat und somit Substrat verbraucht wurde. Die Konzentration des freien Enzyms $[E]$, ergibt sich aus der Gesamt-Enzymkonzentration $[E_0]$ nach

$$[E] = [E_0] - [ES] \quad 2-74$$

Einsetzen ergibt

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot ([E_0] - [ES]) \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 \cdot [ES] \quad 2-75$$

Es kann sich ein quasi-stationärer Zustand einstellen, bei dem die Bildung und der Zerfall von ES mit der gleichen Geschwindigkeit vonstattengehen. In diesem Fall ändert sich die Konzentration von ES nicht und es gilt

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad 2-76$$

bzw.

$$k_1 \cdot ([E_0] - [ES]) \cdot [S] = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES] \quad 2-77$$

Durch Umformen erhält man

$$\frac{([E_0] - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_M \quad 2-78$$

In der Michaelis-Konstante (K_M) sind die Ratenkonstanten der Teilreaktionen zusammengefasst, auch hier wurde wieder die Rückreaktion vernachlässigt. Daraus lässt sich $[ES]$ berechnen, nach

$$\frac{[E_0] \cdot [S]}{K_M + [S]} = [ES] \quad 2-79$$

Die Geschwindigkeit der Produktbildung ist das Produkt aus k_2 und $[ES]$

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = k_2 \frac{[E_0] \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad 2-80$$

Für sehr hohe Substratkonzentrationen ist das Enzym praktisch vollständig mit Substrat abgesättigt, es gilt $[ES] = [E_0]$. Die Reaktion findet mit seiner maximalen Geschwindigkeit (v_{max}) statt

$$v_{max} = k_2[E_0] \quad 2-81$$

Durch Substitution erhält man die Michaelis-Menten-Gleichung

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad 2-82$$

Ist die eingesetzte Substratkonzentration sehr klein gegenüber K_M , so kann man sie im Nenner vernachlässigen und die Reaktionsgeschwindigkeit ist, wie bei einer Reaktion erster Ordnung, proportional zur eingesetzten Substratkonzentration. Für Substratkonzentrationen, die sehr groß gegenüber K_M sind, kann man hingegen K_M vernachlässigen und die Reaktionsgeschwindigkeit nähert sich an die Maximalgeschwindigkeit an. Sie wird dann unabhängig von der Substratkonzentration, was einer Reaktion nullter Ordnung entspricht. Für Substratkonzentrationen gleich K_M erreicht das Enzym die halbe Maximalgeschwindigkeit.

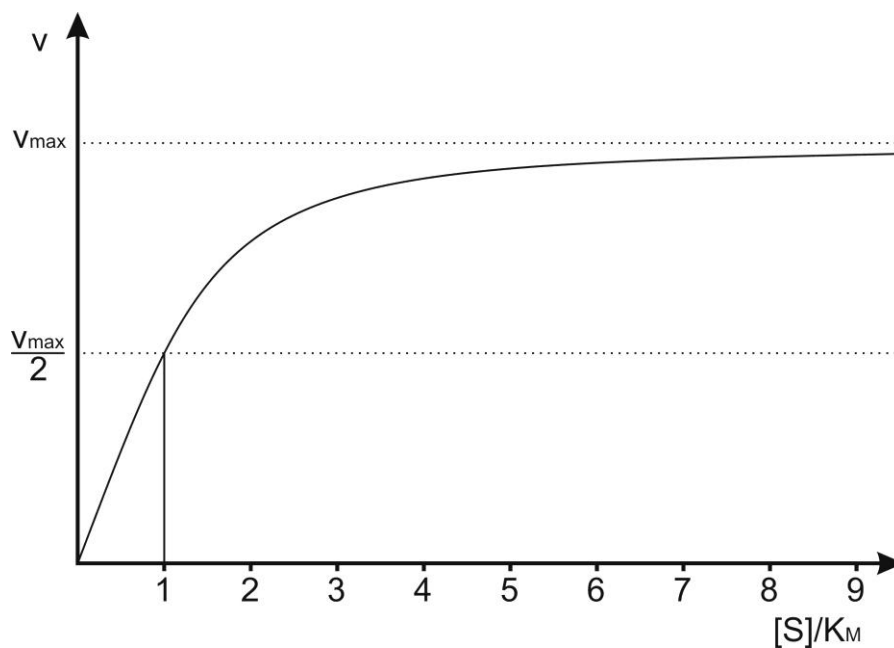


Abbildung 2-5: Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen den Quotienten aus Substratkonzentration und K_M . Für $[S] = K_M$ wird die halbe Maximalgeschwindigkeit erreicht

Entscheidend für die Effizienz eines Enzyms ist bei hohen Substratkonzentrationen die Maximalgeschwindigkeit, bzw. k_2 (in der Literatur häufig auch Wechselzahl oder k_{cat} genannt), die angibt, wie hoch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit pro Enzymmolekül ist. Bei niedrigen Substratkonzentrationen hingegen spielt K_M eine entscheidende Rolle. K_M ist verwandt mit der Affinitätskonstante. Der Wert gibt an, wie schnell sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei steigender Substratkonzentration der Maximalgeschwindigkeit annähert. Für Substratkonzentrationen, die sehr klein gegenüber K_M sind, geht die Michaelis-Menten-Gleichung über in die Form

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M} \quad 2-83$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist damit proportional zu dem Quotienten aus v_{max} und K_M . Enzyme werden häufig nicht über ihre Konzentration quantifiziert, sondern über die Enzymaktivität. Diese wird gemessen als Substratumsatz pro Zeit. Gängig sind die Größen unit, gemessen in $[\mu\text{mol}/\text{min}]$, sowie die aus SI-Einheiten zusammengesetzte Einheit katal, gemessen in $[\text{mol}/\text{s}]$.

In der lebenden Zelle finden viele solcher Enzymreaktionen statt, die man nicht unabhängig voneinander betrachten kann. So können selbst bei thermodynamisch ungünstigen Reaktionen Folgereaktionen auftreten, durch die das Produkt der ersten Reaktion aus dem Gleichgewicht entfernt wird. Im Fall von Konkurrenzreaktionen können die Enzymaktivitäten so gesteuert werden, dass die Reaktion praktisch vollständig kinetisch kontrolliert ist und sich das thermodynamisch günstigere Produkt nicht bildet. Desweiteren werden häufig thermodynamisch besonders günstige Reaktionen, wie beispielsweise die Hydrolyse von ATP, an ungünstige gekoppelt und so das Gleichgewicht in Richtung der Produkte verschoben.

2.2 Biochemische Grundlagen

Nachdem in Abschnitt 2.1 auf den theoretischen Hintergrund zur Messmethode eingegangen wurde, werden hier nun die biochemischen Grundlagen des untersuchten Systems, der Mitochondrien von *S. cerevisiae*, dargelegt. Nach einem einleitenden Abschnitt zum Organismus wird der Aufbau der Zelle diskutiert, wobei bereits hier ein besonderer Schwerpunkt auf der Struktur und der Funktion von Mitochondrien liegt. Zentral in der Biogenese von Mitochondrien ist der Import von Proteinen, die im Zellkern codiert sind.

Untersucht wird die Funktion der Mitochondrien anhand deren Stoffwechselleistung, die zu messbaren Reaktionswärmern führt. Diskutiert werden zunächst die Glykolyse und die alkoholische Gärung, die zwar nicht in den Mitochondrien stattfinden, aber Substrate für den Citratzyklus und die Atmungskette bereitstellen. Der Citratzyklus und die Reaktionen der Atmungskette finden in den Mitochondrien statt, wobei die Redoxäquivalente aus dem Citratzyklus in die Atmungskette eingespeist werden. Da für die Tests Substrate gewählt wurden, die ihre Elektronen direkt oder indirekt in die Atmungskette transferieren, wird diese ausführlicher behandelt.

Um die Verknüpfung zwischen der Messgröße Wärme und der Stoffwechselleistung herzustellen, wird zum Abschluss dieses Abschnitts die Thermodynamik des Energiestoffwechsels diskutiert.

Wenn nicht anders angegeben, orientiert sich der Inhalt in Kapitel 2.2 an dem online erschienenen Buch „Yeast molecular biology“ von Horst Feldmann in der Auflage von 2007 [7].

2.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ist ein einzelliger Pilz. Als fakultativ anaerober Organismus ist sie in der Lage, durch Gärung oder Zellatmung Zucker und andere Substrate als Energiequelle zu nutzen.

S. cerevisiae wird unter anderem in der Herstellung von fermentierten Lebensmitteln verwendet. So wird beispielsweise bei der Herstellung von Brot die Produktion von Kohlendioxid zur Teiglockerung ausgenutzt. Die Bildung von Ethanol ist für die Herstellung von alkoholischen Getränken, aber auch Bioethanol entscheidend.

Bei *S. cerevisiae* kommen sowohl haploide als auch diploide Stadien vor, die sich jeweils durch Knospung vermehren können. Es entstehen zwei genetisch identische Zellen. Bei haploiden Zellen gibt es zwei Paarungstypen, α und a. Es handelt sich dabei um eine einfache Form der sexuellen Differenzierung [8]. Zwei haploide Zellen unterschiedlichen Paarungstyps können zu einer diploiden Zelle verschmelzen, wobei es zur genetischen Rekombination kommt. Teilt sich eine diploide Zelle durch Meiose, so entstehen vier haploide Zellen, je zwei jedes Paarungstyps.

2.2.1.1 Aufbau der Zelle

Die Hülle von Hefezellen setzt sich zusammen aus der **Plasmamembran** und der **Zellwand**, zwischen denen sich der periplasmatische Raum befindet. Die Plasmamembran besteht im Wesentlichen aus Phospholipiden, Sterolen und Proteinen. Die Membran erlaubt der Zelle den

selektiven Stoffaustausch mit der Umgebung. Der periplasmatische Raum enthält diverse Enzyme, wie z.B. Invertase, die Saccharose vor der Aufnahme durch die Zelle in Glucose und Fruktose spaltet, oder saure Phosphatase, die Phosphat aus organischen Verbindungen freisetzt und so für die Zelle verfügbar macht. Die Zellwand ist 100 – 200 nm dick und besteht zu 80 – 90 % aus Polysacchariden, darunter Glucane, Mannane und geringe Mengen Chitin, sowie Proteine und Lipide. Die Zellwand verleiht der Zelle mechanische Stabilität.

Wie bei anderen Eukaryonten enthalten auch die Zellen von *S. cerevisiae* diverse Zellorganellen, also durch eine oder zwei Biomembranen abgetrennte Reaktionsräume. Dazu gehören der Zellkern, die Mitochondrien, das raue und glatte Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, die Vacuole und die Peroxisomen.

Der **Zellkern** enthält den größten Teil der genetischen Information. Hier finden die Genexpression und deren Regulation sowie die Replikation der DNA statt. Der Zellkern ist umgeben von der Kernhülle, die aus zwei Biomembranen besteht und die in das ER übergeht. Zahlreiche Kernporen durchspannen beide Membranen und erlauben den kontrollierten Austausch von Makromolekülen wie Proteinen und RNA.

Das raue und glatte **ER** und der **Golgi-Apparat** sind dünne, membranumhüllte Reaktionsräume, die durch Abschnüren von – und Fusion mit – Vesikeln Material untereinander und mit anderen Organellen austauschen. Die Hauptaufgabe des rauhen ER liegt in der Synthese von nicht-cytosolischen Proteinen. Zahlreiche Ribosomen binden während der Synthese dieser Proteine an die Membran. Die Proteine werden durch die Membran transportiert oder in diese inseriert. Es folgen erste Schritte der posttranslationalen Modifikation und der Weitertransport in Richtung Golgi-Apparat. Dort werden die Proteine weiter modifiziert und zum Ziel transportiert. Am glatten ER findet vor allem die Synthese verschiedener Lipide statt.

Die **Vakuole** dient neben der Aufrechterhaltung des Zellinnendrucks und der Einlagerung diverser Reservestoffe auch dem Verdau von endozytotisch aufgenommenen Makromolekülen.

In **Peroxisomen** finden verschiedene Oxidationsreaktionen statt, einige davon unter Einsatz von elementarem Sauerstoff. Als Nebenprodukte entstehen reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid, daher sind Peroxisomen reich an entsprechenden Entgiftungsenzymen. Bei Hefen ist die β -Oxidation von Fettsäuren auf die Peroxisomen beschränkt, bei vielen anderen Organismen findet sie vor allem in den Mitochondrien statt.

2.2.1.2 Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen, die von zwei Membranen umgeben sind [9]. Die Anzahl der Mitochondrien und deren Morphologie hängen stark von den Kulturbedingungen ab [10]. So findet man bei *S. cerevisiae*, die in einem Nährmedium mit fermentierbarer Kohlenstoffquelle kultiviert wurde, wenige, große und verzweigte Mitochondrien, während man bei Wachstum in einem nicht-fermentierbaren Medium viele, kleine Mitochondrien findet. Der Volumenanteil aller Mitochondrien am Zellvolumen scheint davon aber nicht stark beeinflusst zu werden.

Mitochondrien erfüllen wichtige Aufgaben im aeroben Energiestoffwechsel, sie sind der Ort des Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung (Atmungskette und ATP-Synthese). Im Gegensatz zu Tieren findet bei *S. cerevisiae* die β -Oxidation der Fettsäuren nicht in den Mitochondrien statt, sondern in den Peroxisomen. Weitere Aufgaben von Mitochondrien liegen im Metabolismus von Steroiden, der Regulation des Kalziumhaushalts, der Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern und bei vielzelligen Organismen in der Regulation der Apoptose über die Freisetzung von Cytochrom c.

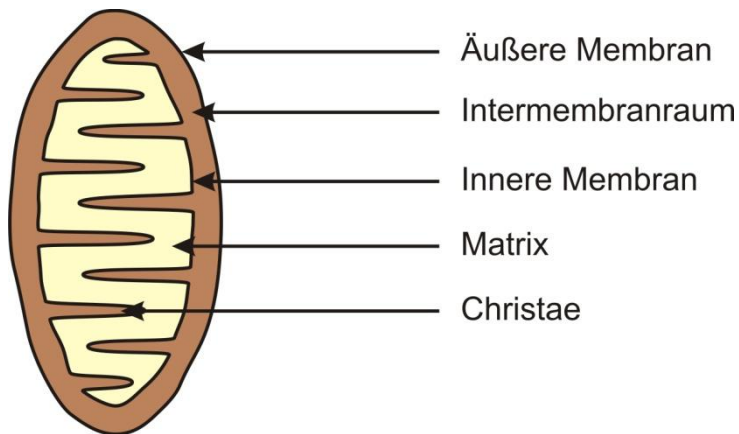


Abbildung 2-6: Zuordnung der Strukturen in Mitochondrien

Nach der **Endosymbiontentheorie** sind Mitochondrien durch die Aufnahme von Proteobakterien in eine Urzelle entstanden, mit der sie eine Symbiose eingingen [11]. Noch immer entstehen neue Mitochondrien durch Teilung aus einem anderen Mitochondrium und können nicht von der Wirtszelle neu gebildet werden. Mitochondrien besitzen ein eigenes Genom, das wie bei Bakterien in zirkulärer Form vorliegt und nicht mit Histonen assoziiert ist. Allerdings ist die meiste Information im Laufe der Evolution in den Zellkern ausgelagert worden. Das Genom der Mitochondrien von *S. cerevisiae* enthält ca. 75.000 Basenpaare, die 35 Gene codieren [12]. 24 dieser Gene codieren für Transfer-RNAs, zwei für ribosomale RNAs und acht für Proteine. Sieben der im mitochondrialen Genom codierten Proteine sind Bestandteile der Atmungskette, eines ist ein ribosomales Protein. Desweiteren ähnelt die mitochondriale Proteinsynthese der von Bakterien. So finden sich in Mitochondrien 70S Ribosomen statt der für Eukaryonten üblichen 80S Ribosomen. Der Sedimentationskoeffizient (S) gibt das Verhalten der Ribosomen bei Zentrifugation an. Dadurch lassen sich bakterielle und eukaryontische (nicht mitochondriale) Ribosomen unterscheiden.

Die **äußere Membran** erscheint in elektronenmikroskopischen Aufnahmen relativ glatt, sie hat einen hohen Lipidanteil von ca. 80 % (w/w). Durch zahlreiche Poren, die durch Porine (VDAC, Voltage-dependent anion-selective channel) gebildet werden, können kleine Moleküle in den Intermembranraum diffundieren. In Abhängigkeit vom Membranpotential findet eine Konformationsänderung statt, die die Selektivität der Poren verändert. Die offene Konformation zeigt dabei eine schwache Anionenselektivität, wohingegen die geschlossene Konformation kationenselektiv ist. Somit kann der Fluss an Metaboliten in Abhängigkeit vom Membranpotential der Mitochondrien gesteuert werden.

Die **innere Membran** hat hingegen eine völlig andere Struktur. Sie bildet zahlreiche Falten und schlauchartige Strukturen aus. Dadurch wird die Oberfläche massiv vergrößert. Der Proteinanteil der inneren Membran ist deutlich höher, er liegt bei ca. 75 % (w/w). Mit der inneren Membran sind unter anderem die Komplexe der Atmungskette und der ATP Synthese assoziiert. Die innere Membran ist impermeabel für eine Vielzahl an Substanzen. Über hochselektive Transporterproteine werden benötigte Substanzen eingeschleust. Durch das aktive Pumpen von Protonen in der Atmungskette wird ein steiler, elektrochemischer Gradient aufgebaut, der von der ATP-Synthase für die Produktion von ATP genutzt wird.

Der Raum zwischen der inneren und der äußeren Membran wird **Intermembranraum** genannt. Während des Elektronentransports werden die Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum gepumpt. Im Intermembranraum finden sich unter anderem Komponenten

der Atmungskette wie z.B. Cytochrom c, Enzyme zur Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies wie die Superoxiddismutase und Cytochrom c Peroxidase, einige Komponenten der Proteinimportmaschinerie, sowie Proteine mit Funktionen im Transfer Eisen-Schwefel-Clustern.

Die **Matrix** wird von der inneren Membran eingeschlossen. Hier befindet sich das mitochondriale Genom, eine vollständige Transkriptions- und Translationsmaschinerie, sowie die Enzyme zur Decarboxylierung von Pyruvat unter Bildung von Acetyl-CoA und des Citratzyklus. Weitere Biosynthesen finden hier statt, u.a. die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern, die von einigen Autoren als einzige, essentielle Funktion von Mitochondrien für *S. cerevisiae* angesehen wird [13].

2.2.1.3 Proteinimport

Das Proteom der Hefe-Mitochondrien beinhaltet ca. 1000 Proteine, von denen allerdings nur acht im Genom der Mitochondrien codiert werden [12, 14]. Alle anderen Proteine werden im Cytosol synthetisiert und gelangen über verschiedene Wege zu ihrem Ziel. Eine Sonderausgabe in *Biochimica et Biophysica Acta* hat sich im Jahr 2011 den Mechanismen des Proteinimports gewidmet, wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Angaben dieses Abschnitts auf diese Publikationen [15-22]. Die meisten dieser Proteine werden zunächst über den TOM-Komplex (Translocase of the Outer Membrane) durch die äußere Membran geschleust und dann in die äußere oder innere Membran insertiert, durch die innere Membran in die Matrix transferiert oder im Intermembranraum weiter modifiziert.

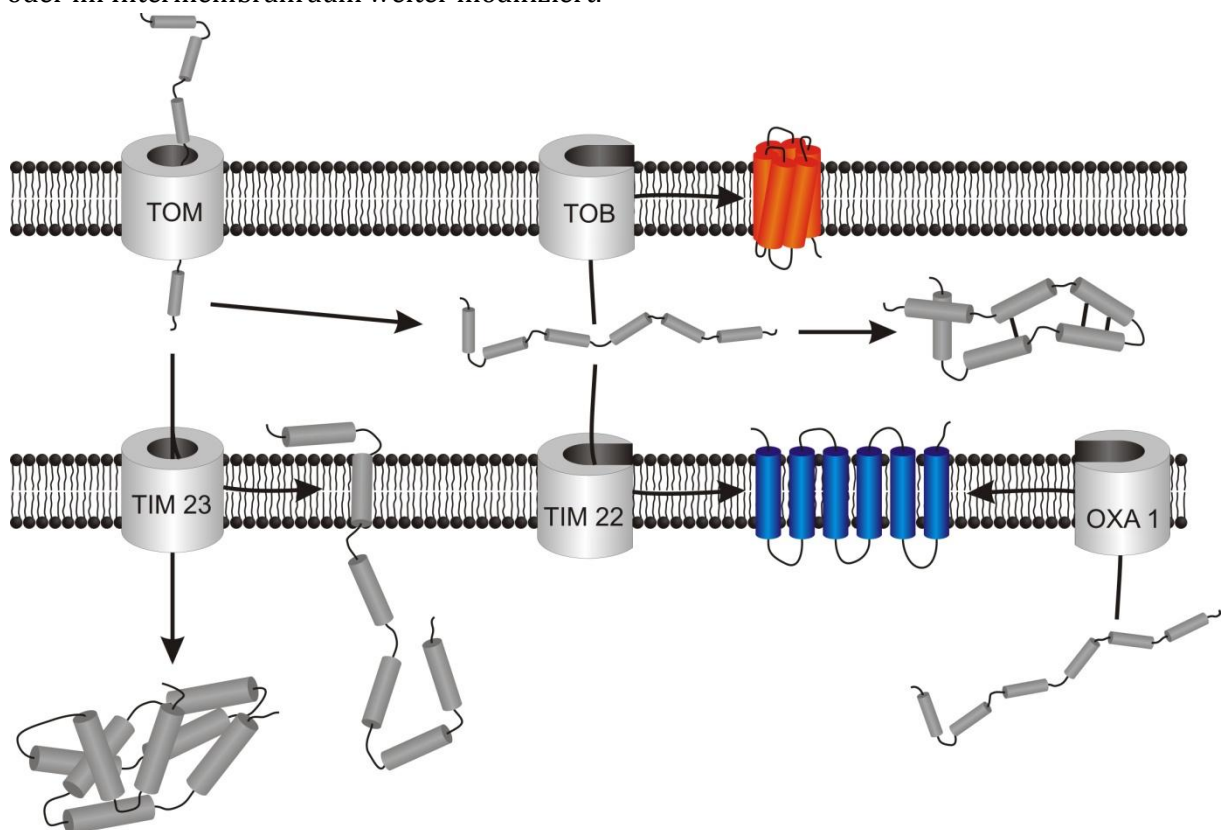


Abbildung 2-7: Übersicht über die wichtigsten Wege des Proteinimports. Erläuterungen im Text

Der **TOM-Komplex** besteht aus einem zentralen β -barrel-Protein, TOM 40, das eine Pore bildet, durch die die Proteine geschleust werden, sowie aus weiteren assoziierten Proteinen, die vor allem für die Erkennung der Importsignale sowie die Stabilität des Komplexes verantwortlich sind.

Die **äußere Membran** enthält ca. 40 verschiedene Proteine. Sie werden im Zellkern codiert und enthalten eine interne, nicht abspaltbare Signalsequenz. Die Proteine der äußeren Membran lassen sich in fünf Gruppen unterteilen, dazu gehören C- und N-terminal verankerte Proteine, bei denen der größte Teil des Proteins auf der cytosolischen Seite liegt, N-terminal verankerte Proteine mit einer Domäne im Intermembranraum, Proteine mit mehreren, α -helicalen Transmembrandomänen und β -barrel Proteine.

Einige der C- und N-terminal verankerten Proteine mit großer, cytosolischer Domäne sowie ein peripheres Membranprotein werden ohne Beteiligung des TOM-Komplexes in die Membran eingebaut, es handelt sich um die einzigen, kerncodierten Proteine der Mitochondrien, die den TOM-Komplex umgehen. Bei C-terminal verankerten Proteinen dieser Guppe gibt es allerdings Ausnahmen. Die Mechanismen der Insertion scheinen nicht für alle diese Proteine einheitlich zu sein und sind relativ schlecht verstanden. Möglich ist eine spontane Insertion, wobei in einigen Fällen andere Proteine für die funktionelle Insertion nötig sind. Häufig spielen cytosolische Faktoren eine entscheidende Rolle in der Adressierung dieser Proteine.

Der Mechanismus der Insertion von Proteinen mit mehreren, helicalen Transmembrandomänen ist noch schlecht verstanden. Es gibt zwar Hinweise auf essentielle Faktoren für die Insertion, die durch eine Behandlung mit Proteasen zerstört werden, dennoch konnte die Route, die diese Proteine nehmen, nicht aufgeklärt werden.

β -barrel Proteine bilden Poren in der Membran aus, durch die eine Vielzahl von Stoffen geleitet wird. Zu ihnen gehören die Porine, die der äußeren Membran eine hohe Durchlässigkeit für kleine Moleküle verleihen, sowie die Untereinheiten der Proteinimport- und -insertionsmaschinerie, die eine Pore ausbilden, durch die die Proteine geleitet werden. β -barrel Proteine werden zunächst durch den TOM-Komplex in den Intermembranraum geschleust, wo sie dann durch Chaperone stabilisiert zum TOB-Komplex (Topogenesis of Outer membrane β -Barrel proteins, auch SAM-Komplex, Sorting and Assembly Machinery, genannt) transferiert werden, der für die Insertion verantwortlich ist [23-25].

Die **innere Membran** hat einen sehr viel höheren Proteinanteil als die äußere Membran, hier finden sich unter anderem die Komplexe der Atmungskette. Für den Einbau cytosolisch synthetisierter Proteine in die innere Membran gibt es zwei Wege, sie führen über zwei unterschiedliche TIM-Komplexe (Translocase of the Inner Membrane).

Der TIM22-Komplex besteht aus zwei Poren, die durch das Protein TIM22 gebildet werden, sowie weiteren Proteinen, die auf der Seite des Intermembranraums das einzubauende Protein erkennen und den TIM22-Komplex stabilisieren. Proteine, die über diesen Komplex inseriert werden, werden über den TOM-Komplex in den Intermembranraum transferiert, wo sie durch Chaperone stabilisiert werden. Nach der Erkennung durch den TIM22-Komplex erfolgt die Insertion in die Membran, die durch den in der Atmungskette aufgebauten Protonengradienten angetrieben wird.

Proteine mit einer abspaltbaren, N-terminalen Signalsequenz werden vom TIM23-Komplex erkannt. Das Protein Tim23 bildet bei diesem Komplex einen Kanal, durch den die Proteine transferiert werden können. Der Komplex enthält außerdem verschiedene weitere Proteine, die verantwortlich sind für die Erkennung der Signalsequenz, die Rekrutierung von diversen Matrixproteinen, sowie den Verschluss der Pore wenn gerade kein Protein transportiert wird.

Letzteres ist wichtig, damit der Fluss von Ionen entlang des Potentialgradienten an der inneren Membran verhindert wird. Während des Importprozesses assoziiert der TIM23-Komplex vorübergehend mit dem TOM-Komplex, so dass das Protein direkt weitergereicht werden kann. Wenn das Protein zusätzlich eine Sequenz für den Einbau in die Membran enthält, so stoppt das Protein TIM21 den weiteren Transfer durch die Membran und sorgt dafür, dass das Protein aus dem Komplex in die Membran entlassen wird.

Proteine, die zum TIM23-Komplex weitergeleitet werden, aber keine Transmembrandomäne besitzen, werden vollständig in die **Matrix** geschleust. Dazu assoziiert auf der Matrixseite der PAM-Komplex (Presequence translocase-Associated Motor) mit dem TIM23-Komplex. Dieser bindet an das Protein und beförderte es unter Hydrolyse von ATP aktiv in die Matrix.

Auch für den Import in den **Intermembranraum** werden die Proteine zunächst durch den TOM-Komplex geleitet. Viele dieser Proteine sind reich an zunächst reduzierten Cysteinresten, die für den Importmechanismus essentiell sind. Das Protein Mia40 erkennt diese Proteine, indem es Disulfidbrücken zu ihnen ausbildet. Vor dieser Reaktion liegt Mia40 oxidiert vor, wird aber durch die Ausbildung von Disulfidbrücken im Substrat selbst reduziert und muss vor dem nächsten Importzyklus wieder oxidiert werden. Dies geschieht durch das Protein Erv1, das die Elektronen aus dem reduzierten Mia40 auf Cytochrom c überträgt und in die Atmungskette einspeist.

Da die meisten der im mitochondriellen Genom codierten Proteine Teil der Atmungskette sind müssen sie in die innere Membran inseriert werden. Dies geschieht durch das Protein Oxa1, das mit den mitochondrialen Ribosomen auf der Matrixseite der Membran assoziiert und die entstehende Proteinkette direkt in die Membran inseriert.

2.2.2 Energiestoffwechsel von *S. cerevisiae*

Wenn eine fermentierbare Kohlenstoffquelle wie beispielsweise Glucose zur Verfügung steht, wird diese vor allem über alkoholische Gärung unter Bildung von Kohlendioxid und Ethanol umgesetzt [26]. Es erfolgt zunächst die Oxidation und Spaltung von Glucose über die Glycolyse, wobei pro Glucosemolekül zwei Moleküle Pyruvat gebildet werden. Diese werden zunächst zu Acetaldehyd decarboxyliert und anschließend zu Ethanol reduziert, wobei reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid ($\text{NADH}+\text{H}^+$) zu seiner oxidierten Form (NAD^+) oxidiert wird und wieder als Reoxpartner für die Glycolyse zur Verfügung steht. Bei nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen ist der Organismus allerdings auf die aerobe Umsetzung angewiesen. Es kommt zur vollständigen Oxidation zu Kohlendioxid und Wasser. Die Elektronen gehen dabei auf NAD^+ und oxidiertes Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) unter Bildung der reduzierten Formen $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 über und werden schließlich in der Atmungskette auf Sauerstoff unter Bildung von Wasser übertragen [27].

2.2.2.1 Glykolyse und alkoholische Gärung

Glucose ist die bevorzugte Energiequelle von *S. cerevisiae*, doch auch andere Hexosen wie Galactose können genutzt werden. Nach der Aufnahme wird Galactose unter Spaltung von ATP in Galactose-1-Phosphat umgewandelt. Dieses wird zu Glucose-1-Phosphat epimerisiert und tritt in die Glycolyse ein. In der Glykolyse wird ein Molekül Glucose zu zwei Molekülen Pyruvat umgesetzt. Dabei werden zwei Moleküle NAD^+ zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ reduziert und zwei Moleküle ATP

aus ADP und Phosphat gebildet. Die Glycolyse findet im Cytosol statt. Pyruvat kann außerdem durch Oxidation von Lactat synthetisiert werden [27].

Das gebildete Pyruvat kann nun auf zwei unterschiedliche Arten weiter metabolisiert werden, nämlich durch Atmung oder alkoholische Gärung. Wenn genügend Glucose vorhanden ist, wird die Atmung auch in Anwesenheit von Sauerstoff unterdrückt. Bei Galactose als Kohlenstoffquelle findet diese Unterdrückung nur in deutlich geringerem Umfang statt.

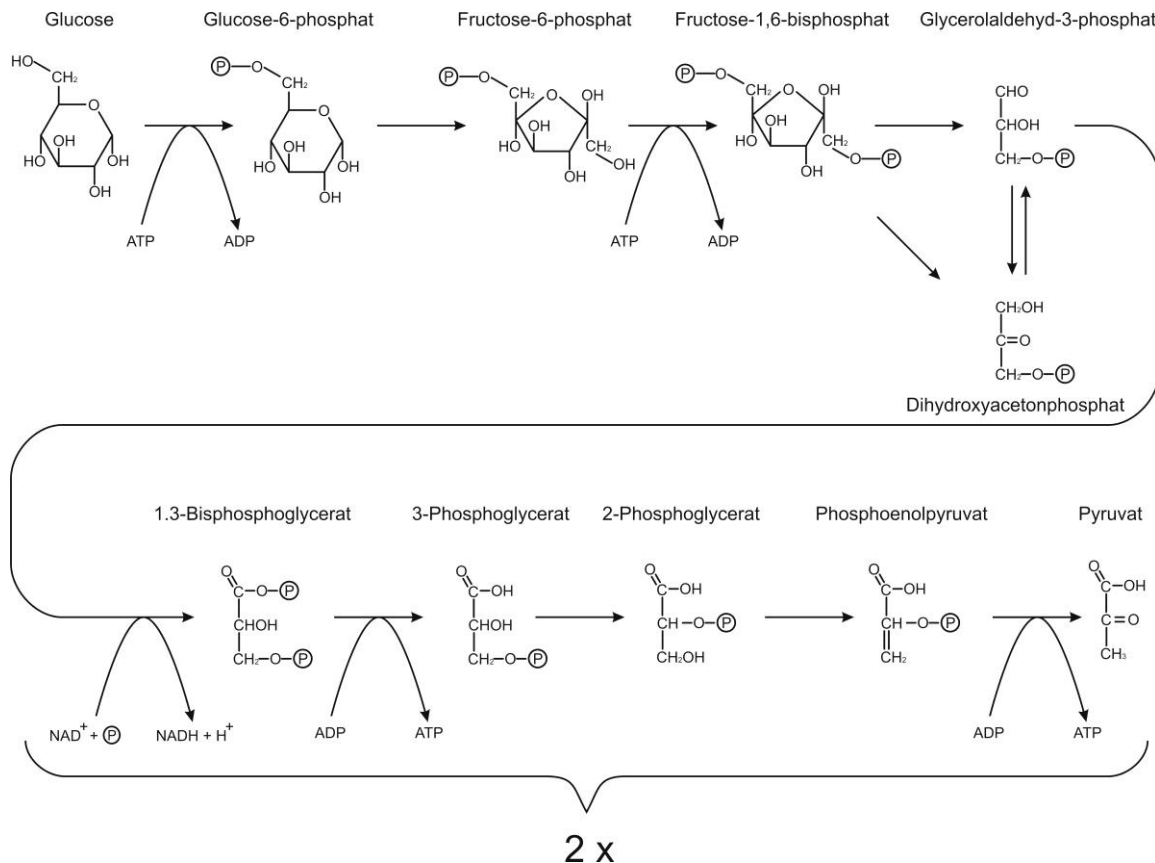


Abbildung 2-8: Glykolyse; die in der unteren Hälfte dargestellten Reaktionen laufen pro Glucosemolekül zweimal ab. Bei der Oxidation von einem Molekül Glucose werden zwei Moleküle ATP und zwei Moleküle NADH gebildet. Letzteres wird in der Atmungskette oder in der alkoholischen Gärung regeneriert

Der erste Schritt der alkoholischen Gärung ist die Decarboxylierung von Pyruvat durch die Pyruvatdecarboxylase unter Bildung von Acetaldehyd und Kohlendioxid. Das Acetaldehyd wird im nächsten Schritt durch die Alkoholdehydrogenase zu Ethanol reduziert, wobei $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ oxidiert wird, welches dann wieder für die Glykolyse zur Verfügung steht. Somit ist *S. cerevisiae* nicht auf Sauerstoff zur Regeneration der Redoxäquivalente angewiesen.

2.2.2.2 Citratzyklus

Unter aeroben Bedingungen und unter Abwesenheit einer leicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle wird der Citratzyklus aktiviert. Dabei wird das Pyruvat zunächst in die Mitochondrien importiert und unter Bildung von Acetyl-CoA decarboxyliert, welches dann im Citratzyklus oxidiert wird. Der Acetylrest wird unter Bildung von Citrat auf Oxalacetat

übertragen. Das Citrat wird über Aconitat zu Isocitrat isomerisiert, zu Oxalosuccinat oxidiert, dann über die Zwischenstufe α -Ketoglutarat zweimal decarboxyliert, wobei Succinyl-CoA entsteht. Der energiereiche Thioester wird unter Bildung von Succinat hydrolysiert, wobei zusätzlich ATP (bei vielen anderen Organismen GTP) gebildet wird. Das gebildete Succinat wird am Komplex II der Atmungskette oxidiert, wobei die Elektronen direkt in die Atmungskette übertragen werden. Aus dem entstehenden Fumarat wird durch Addition von Wasser Malat gebildet, welches weiter zu Oxalacetat oxidiert wird [27].

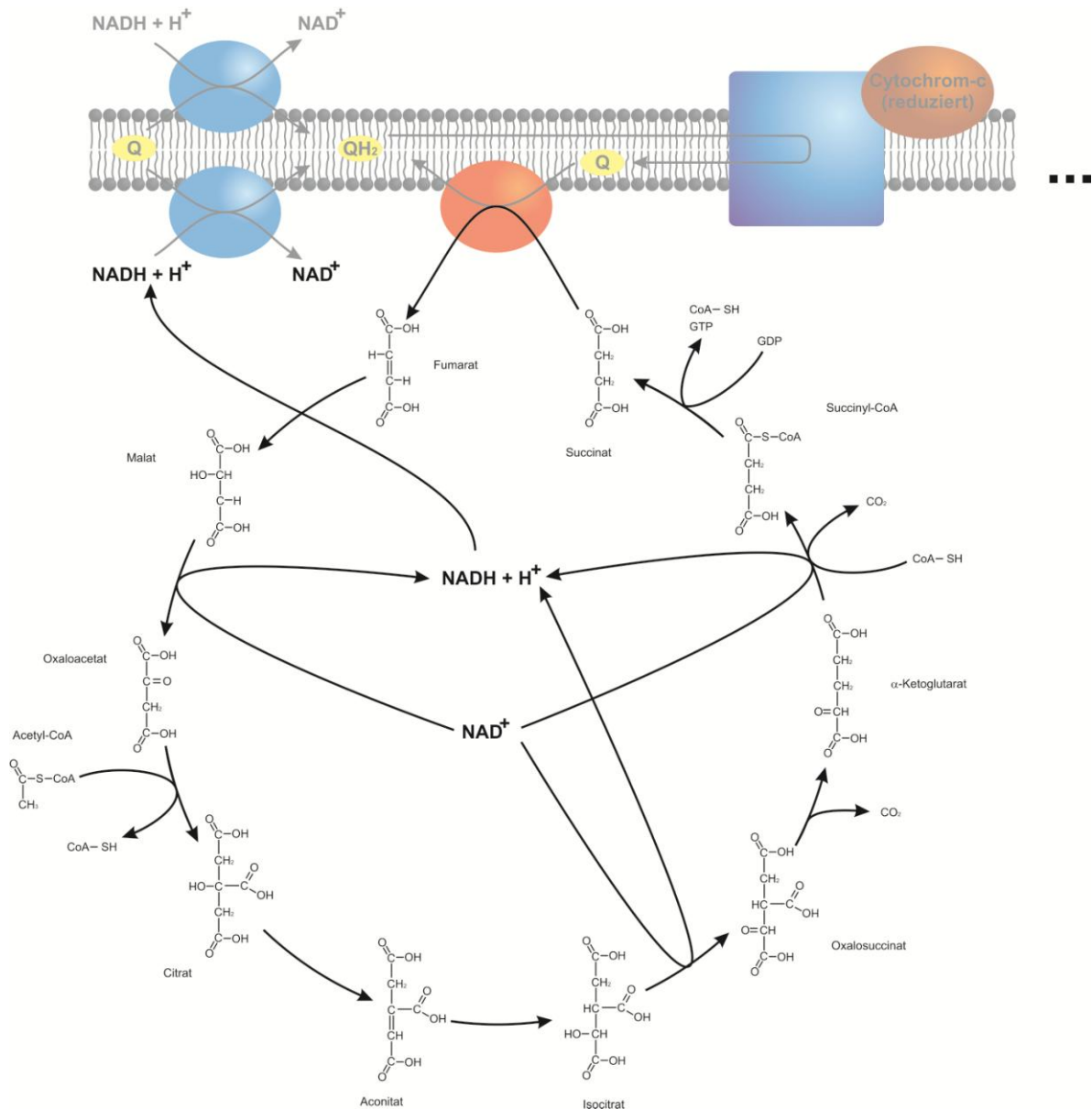


Abbildung 2-9: Citratzyklus mit den Verbindungen zur Atmungskette. Letztere wird in Abschnitt 2.2.2.3 im Detail diskutiert

2.2.2.3 Atmungskette

Die Komponenten der Atmungskette finden sich in der inneren Membran [28]. Dabei läuft eine Kaskade von Redoxreaktionen ab, in der Elektronen, die durch Oxidation von verschiedenen Substraten gewonnen wurden, letztendlich auf Sauerstoff unter Bildung von Wasser übertragen werden. Die Atmungskette von *S. cerevisiae* beinhaltet drei Enzymkomplexe und zwei Arten von mobilen, redoxaktiven Molekülen, die die Elektronen von einem Komplex zum nächsten transferieren. In Analogie zu den Komplexen bei Säugern werden die von *S. cerevisiae* als Komplex II, III und IV bezeichnet. Der Komplex I von Säugern fehlt, seine Aufgabe wird durch andere Enzyme übernommen. Ein Teil der freien Enthalpie dieser Reaktionskaskade wird genutzt, um Protonen von der Matrixseite in den Intermembranraum zu pumpen. Der so entstehende, elektrochemische Gradient wird zur ATP-Synthese an der ATP-Synthase genutzt.

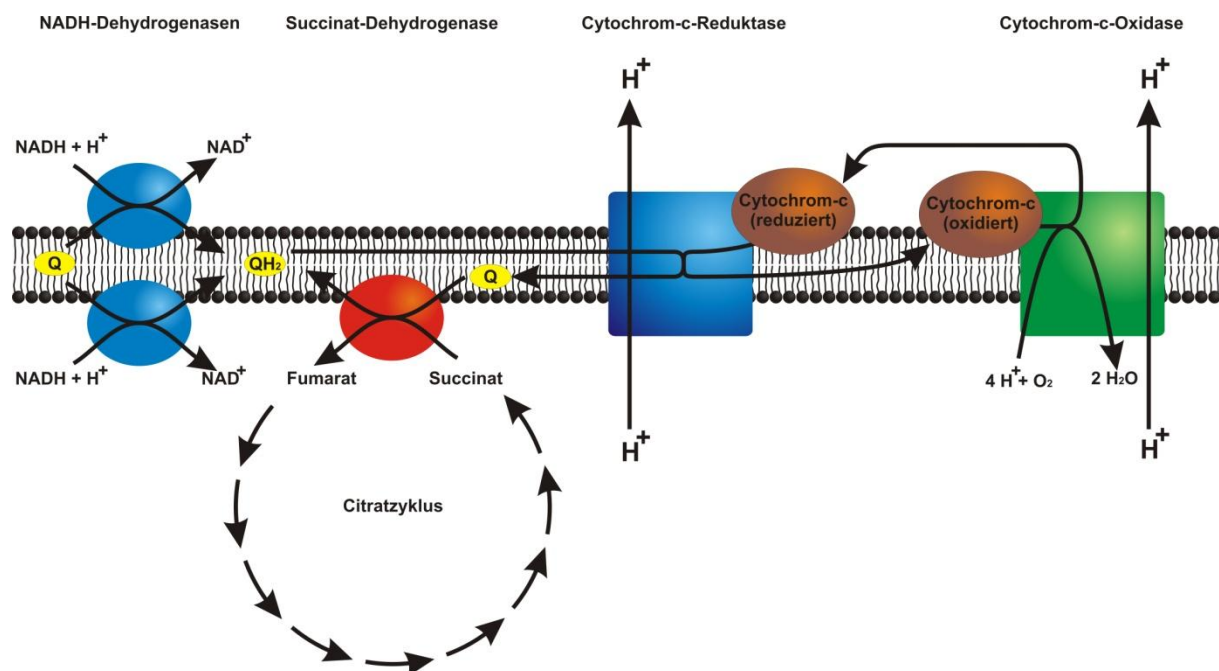


Abbildung 2-10: Stark vereinfachte Darstellung der Atmungskette. Erläuterungen im Text

In der Glykolyse und dem Citratzyklus wurden die Elektronen aus den Substraten zunächst auf NAD⁺ übertragen, wodurch NADH+H⁺ gebildet wurde. Dieses wird durch Oxidation an **NADH-Dehydrogenasen** (bei Säugern Komplex I) wieder regeneriert und steht für weitere Reaktionen zur Verfügung. Die Elektronen aus NADH+H⁺ werden dabei auf Ubichinon, einem der beiden mobilen Elektronenträger, übertragen. Ubichinon wird dabei unter Aufnahme von zwei Elektronen und zwei Protonen zu Ubichinol reduziert. Während bei Säugern diese Reaktion auf der Matrixseite der inneren Membran stattfindet, übernehmen bei *S. cerevisiae* drei NADH-Dehydrogenasen dessen Funktion. Zwei dieser Enzyme sind auf der Außenseite der inneren Membran lokalisiert, sie oxidieren cytosolisches NADH+H⁺ [28]. Das dritte befindet sich auf der Matrixseite der inneren Membran, hier wird das NADH+H⁺ aus dem Citratzyklus oxidiert [29]. Die Redoxäquivalente müssen bei *S. cerevisiae* nicht in die Matrix importiert werden, allerdings pumpen die NADH-Dehydrogenasen im Gegensatz zu Komplex I von Säugern auch keine Protonen.

Auch Komplex II reduziert Ubichinon zu Ubichinol. Er kommt sowohl bei *S. cerevisiae* als auch bei Säugern vor und wird auch **Succinat-Dehydrogenase** genannt. Hier wird das im Citratzyklus gebildete Succinat zu Fumarat oxidiert und die Elektronen auf Ubichinon übertragen. Komplex II ist also gleichzeitig ein Enzym des Citratzyklus.

Ein weiterer Weg, cytosolisches $\text{NADH} + \text{H}^+$ in der Atmungskette zu regenerieren, stellt die **Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase** dar. Dihydroxyacetonphosphat, welches in der Glykolyse gebildet wurde, wird im Cytosol zu Glycerol-3-Phosphat reduziert, wobei NAD^+ regeneriert wird. Das Glycerol-3-Phosphat wird wiederum an der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert und die Elektronen auf Ubichinon übertragen.

Das über einen dieser Wege gebildete Ubichinol wird von Komplex III, der **Cytochrom-c-Reduktase**, oxidiert und seine zwei Elektronen auf zwei Moleküle Cytochrom c übertragen. Cytochrom c ist der zweite, mobile Elektronenträger. Bei der Oxidation von Ubichinol werden zwei Protonen auf der Seite des Intermembranraums freigesetzt, allerdings wird zunächst nur ein Elektron von Ubichinol auf Cytochrom c übertragen und dabei ein Ubisemichinon-Radikal gebildet. Zwei dieser Radikale disproportionieren zu Ubichinon und Ubichinol, wobei letzteres unter Aufnahme von zwei Protonen auf der Matrixseite gebildet wird. Das Ubichinol wird wiederum wie zuvor beschrieben auf der Seite des Intermembranraums oxidiert und gibt zwei weitere Protonen ab. Insgesamt werden durch diesen Zyklus pro Ubichinon vier anstelle von nur zwei Protonen von der Matrixseite in den Intermembranraum transferiert.

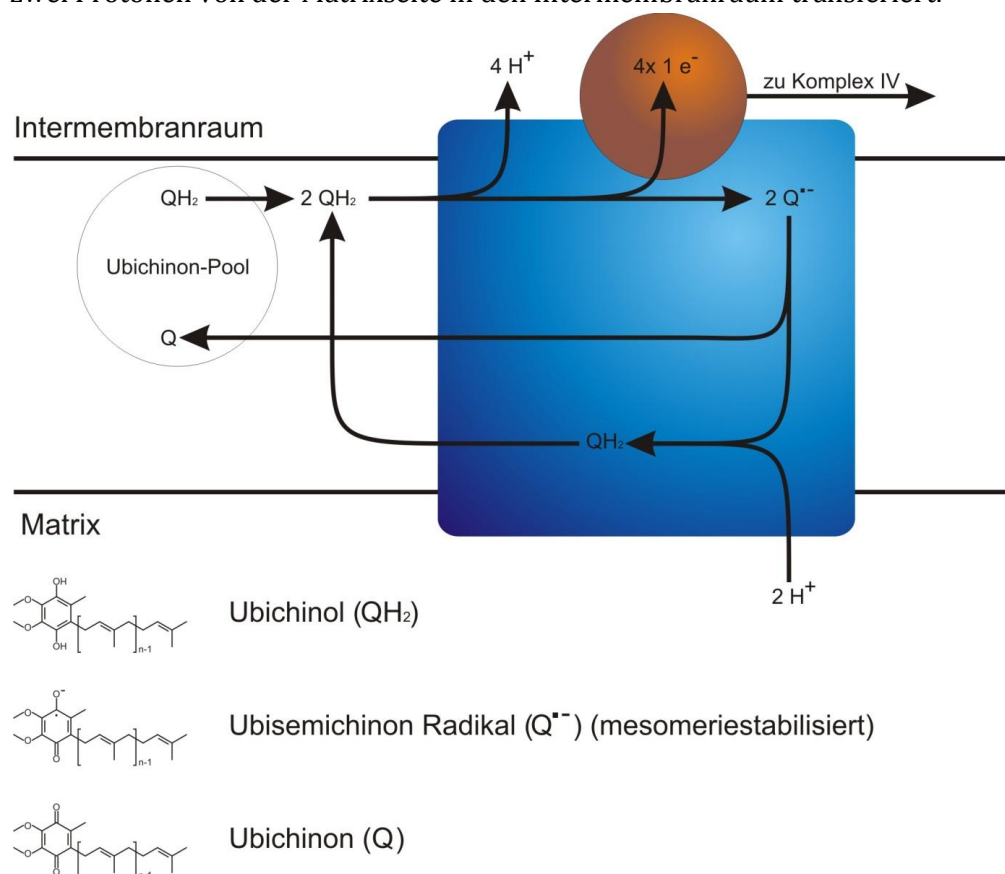


Abbildung 2-11: Vereinfachte Darstellung des an Komplex III ablaufenden Q-Zyklus. Blau: Komplex III; Rot: Cytochrom c. Erläuterungen im Text

Ein weiterer Weg zur Reduktion von Cytochrom c führt bei Hefen über mitochondriale **Lactatdehydrogenasen**. Diese reduzieren Lactat unter Bildung von Pyruvat und übertragen die Elektronen direkt auf Cytochrom c.

Der Komplex IV, auch **Cytochrom-c-Oxidase** genannt, übernimmt je ein Elektron von vier Molekülen Cytochrom c und transferiert diese auf ein Sauerstoffmolekül, welches unter Aufnahme von vier Protonen auf der Matrixseite zu zwei Molekülen Wasser reduziert wird. Außerdem werden bei dieser Reaktion vier weitere Protonen von der Matrixseite in den Intermembranraum gepumpt.

Die **ATP-Synthase** ist ein Superkomplex aus den Komplexen F_0 und F_1 . Durch die ATP-Synthase fließen die in der Atmungskette gepumpten Protonen zurück in die Matrix, die Verringerung der freien Enthalpie wird genutzt, um ATP aus ADP und Phosphat zu synthetisieren. Der F_1 -Komplex beinhaltet drei katalytische Domänen, er assoziiert auf der Matrixseite mit dem membrangebundenen F_0 -Komplex. Teile des F_0 - und Teile des F_1 -Komplexes können unter Protonenfluss in drei Schritten rotieren. Durch die veränderte Position der rotierenden Komponenten gegenüber den statischen werden Konformationsänderungen ausgelöst, aus denen unterschiedliche Affinitäten zu den Zwischenprodukten der ATP-Synthese resultieren. Es gibt drei Zustände, in denen sich die katalytischen Domänen befinden können, die L- (loose), T- (tight) und O- (open) Konformation, je eine Untereinheit befindet sich jeweils in einem dieser Zustände. In der L-Konformation werden ADP und Phosphat gebunden. Der darauf folgende Wechsel in die T-Konformation sorgt dafür, dass ATP so stabil gebunden wird, dass dieses sich spontan bildet. Der energieaufwändige Schritt ist die Überführung der Domäne in die O-Konformation, in dem das gebildete ATP nur noch schwach gebunden ist und von dem Komplex dissoziieren kann.

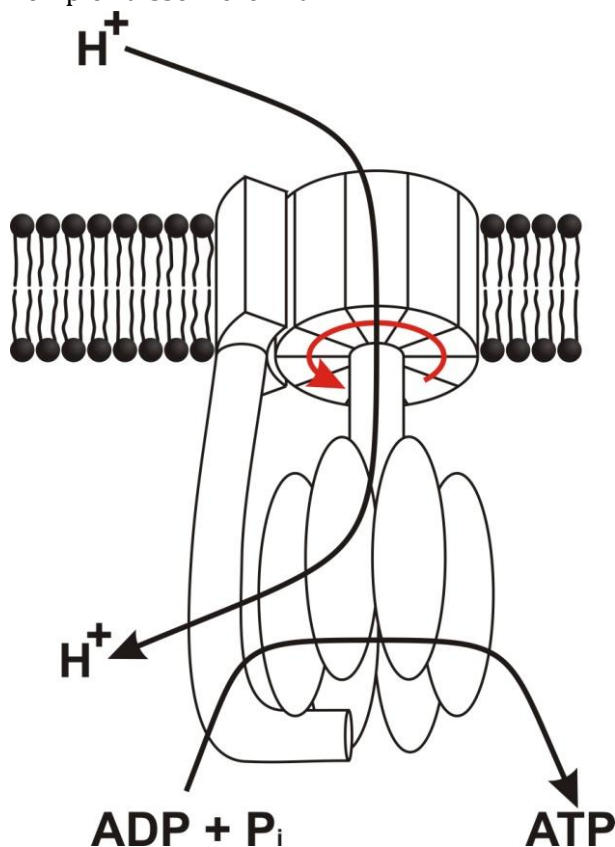


Abbildung 2-12: Schematische Darstellung der ATP-Synthase

Entkoppler der Atmungskette wie beispielsweise 2,4-Dinitrophenol (DNP) sind in der Lage, den Protonengradienten abzubauen. Dazu nimmt dieses ein Proton im Intermembranraum auf, diffundiert durch die innere Membran und gibt es auf der Matrixseite wieder ab. Dann diffundiert es zurück und der Zyklus beginnt von neuem. Die im Protonengradienten gespeicherte Energie wird dabei nicht in die Bildung von ATP investiert, sondern geht als Wärme verloren. Dieser Effekt wurde in den Messungen genutzt, um die Reaktion unabhängig von der Menge an verfügbarem ADP und Phosphat zu machen und um mehr Wärme pro Substratumsatz zu erzeugen.

2.2.2.4 Physikalisch-chemische Betrachtungsweisen

Wie zuvor beschrieben, findet in der Atmungskette eine Kaskade an Redox-Reaktionen statt, deren freie Enthalpie dazu genutzt wird, Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum zu pumpen. Zu beachten sind also einerseits die elektrochemischen Potentialdifferenzen der reagierenden Stoffe, die sich nach der Nernstschen Gleichung (Gleichung 2-46) ergeben und die sich daraus ergebenden freien Enthalpien (Gleichung 2-47). Andererseits wird ein Teil der freien Enthalpie in den Aufbau eines Protonengradienten investiert. Dieser relaxiert über die ATP-Synthase, wobei die freie Enthalpie dieser Reaktion wiederum zur Bildung von ATP aus ADP und Phosphat genutzt wird.

Die freie Enthalpie der Bildung von ATP beträgt $\Delta G'_{ATP} = +34,5 \text{ kJ/mol}$ unter biochemischen Standardbedingungen (wässrige Lösung, 25 °C, alle an der Reaktion beteiligten Stoffe (außer H^+ und Wasser) 1 M, pH 7), das Standard-Elektrodenpotential für die Oxidation von NADH zu NAD^+ liegt unter diesen Bedingungen bei $E^{0'} = -0,320 \text{ V}$. Bei einem Sauerstoff-Partialdruck von 10^{-2} atm , was ein typischer Wert in lebenden Zellen ist, liegt dessen Wert bei $E^{0'} = 0,785 \text{ V}$ [30]. Nach Gleichung 2-47 erhält man für die Übertragung von zwei Elektronen von NADH auf Sauerstoff einen Wert von $\Delta G'_{Redox} = -213,23 \text{ kJ/mol}$. Im Idealfall werden pro oxidiertes Molekül NADH drei Moleküle ATP gebildet. Es ergibt sich

$$\Delta G'_{gesamt} = \Delta G'_{Redox} + 3 \cdot \Delta G'_{ATP} = \Delta G'_{Redox} + 3 \cdot \Delta G'_{ATP} + 3 \cdot RT \ln \frac{[ATP]}{[ADP][P_i]} \quad 2-84$$

Im Gleichgewicht gilt

$$\frac{-\Delta G'_{Redox} - 3 \cdot \Delta G'_{ATP}}{3 \cdot RT} = \ln \frac{[ATP]}{[ADP][P_i]} \quad 2-85$$

oder

$$\exp\left(\frac{-\Delta G'_{Redox} - 3 \cdot \Delta G'_{ATP}}{3 \cdot RT}\right) = \frac{[ATP]}{[ADP][P_i]} \approx 3,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \quad 2-86$$

In der Realität wird dieser Wert allerdings nicht erreicht, typische Gleichgewichtswerte liegen bei in der Größenordnung von $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}$ [31]. Der Ausdruck $(-\Delta G'_{Redox} - 3 \cdot \Delta G'_{ATP})$ besitzt Werte größer als 100 kJ/mol, die Reaktion ist also auch trotz der Synthese von ATP stark exergon.

Wird hingegen der Protonengradient beispielsweise mit DNP entkoppelt, so werden die Protonen an der ATP-Synthase vorbei in die Matrix zurückgeschleust, die Synthese von ATP

findet nicht statt. Die freien Enthalpien für vier in der Arbeit verwendete Substrate sind in Tabelle 2-1 angegeben. D- und L-Lactat wurden als gleich angenommen, da beide zu demselben Produkt umgesetzt werden. Für die Substrate Citrat und Pyruvat ist die Situation komplizierter, da diese keine direkten Substrate der Atmungskette sind, sondern im Citratzyklus oxidiert und die Redoxäquivalente in die Atmungskette eingespeist werden.

Tabelle 2-1: Freie Enthalpien für die Oxidation verschiedener Substrate bei den zuvor definierten Bedingungen

Reduktionsmittel	ΔG_{Redox} [kJ/mol]
NADH	-213,23
Succinat	-145,50
Lactat	-187,18

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

2,4-Dinitrophenol (DNP), befeuchtet mit Wasser, Reinheit ≥ 97.0 %, Aldrich, bei Raumtemperatur gelagert

3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS), Reinheit ≥ 99.5 %, Sigma, bei Raumtemperatur gelagert

β -Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert (NADH), Dinatriumsalz, Hydrat, Reinheit ≥ 97.0 %, Sigma, unter Stickstoff bei -20 °C gelagert

Bradford Reagenz, Sigma, bei $+4$ °C gelagert

Zitronensäure, Reinheit ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, bei Raumtemperatur gelagert

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Reinheit 99,995 %, Aldrich, bei Raumtemperatur gelagert

Kaliumhydroxid (KOH), Fluka, als 1 M und 6 M Lösung bei Raumtemperatur gelagert

Natrium-D-lactat, Reinheit ≥ 99.0 %, Aldrich, bei Raumtemperatur gelagert

Natrium-L-lactat, Reinheit ≥ 99.0 %, Aldrich, bei Raumtemperatur gelagert

Natriumpyruvat, Reinheit ≥ 99.0 %, Fluka, bei Raumtemperatur gelagert

Natriumsuccinat, dibasisch, Hexahydrat, Reinheit ≥ 99.0 %, Sigma-Aldrich, bei Raumtemperatur gelagert

Reinstwasser, hergestellt mit der Reinstwasseranlage PURELAB Classic, Firma: ELGA Labwater, Celle

Saccharose, puriss., gemäß analytischen Spezifikationen von Ph. Eur., BP und NF, Sigma-Aldrich, bei Raumtemperatur gelagert

3.1.2 Lösungen

SEM-Puffer (Saccharose, EDTA, MOPS)

250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS in Reinstwasser gelöst, mit KOH auf pH 7,2 titriert, gelagert bei $+4$ °C

DNP in SEM-Puffer

400 μ M DNP in SEM-Puffer gelöst, pH-Wert überprüft (pH 7,2), gelagert bei $+4$ °C

Substrate in SEM

Je eine 40 mM Lösung von Succinat, NADH, Citrat, D- und L-Lactat sowie Pyruvat wurde in SEM-Puffer hergestellt, pH-Werte überprüft (pH 7,2), gelagert bei +4 °C. Die NADH-Lösung wurde für jede Versuchsreihe frisch angesetzt.

3.1.3 Mitochondrien

Die Präparation der Mitochondrien erfolgte durch Herrn Tao Tan und Herrn Dr. Drazen Papic im Arbeitskreis von Herrn Prof. Doron Rapaport am Interfakultären Institut für Biochemie an der Universität Tübingen und soll hier nur grob beschrieben werden.

Alle verwendeten Stämme von *S. cerevisiae* waren isogen mit dem Stamm W303 α . Es wurden Mitochondrien aus Wildtyp Hefen und Hefen mit zwei verschiedenen Mutationen in Genen, die für mitochondriale Proteine codieren, isoliert. Da die Funktion dieser Gene nicht bekannt ist und noch keine Phänotypen publiziert wurden, wird hier auf Hypothesen zu möglichen Funktionen verzichtet und die Mutanten mit M1 und M2 bezeichnet.

Die Wildtyp Hefen wurden in verschiedenen Medien kultiviert, in denen entweder Glucose, Galactose oder Lactat als Kohlenstoffquelle dienten, wohingegen die Mutanten ausschließlich auf Glactosemedium kultiviert wurden.

Die Isolation der Mitochondrien wurde nach der Prozedur von Daum et al. durchgeführt [32]. Dazu werden die Zellen durch Zentrifugation aus dem Kulturmedium isoliert, gewaschen und mit Zymolyase behandelt, um die Zellwände aufzulösen. Es folgt der Aufschluss der Zellen in einem Dounce Homogenisator, gefolgt von der Abtrennung anderer Zellbestandteile durch differentielle Zentrifugation. Die Mitochondrien wurden in SEM-Puffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Bei dieser Methode können Bestandteile des ER als Verunreinigungen auftreten. Da Mitochondrien, die durch Zentrifugation über einen Percoll-Gradienten weiter aufgereinigt wurden, schwer zu resuspendieren waren, wurde auf diesen Schritt verzichtet.

3.2 Geräte und Software

3.2.1 Chip-Kalorimeter

Das Chip-Kalorimeter des Typs FCC22 wurde von Herrn PD Dr. Johannes Lerchner an der TU Bergakademie Freiberg entwickelt und gebaut. Der Transducer wurde in einer Kooperation mit dem Institut für Photonische Technologien e.V. (IPHT), Jena und der Eurotronics – Gesellschaft für wissenschaftlichen Gerätebau mbH, Leipzig, realisiert. Zahlreiche Publikationen von Herrn Dr. Lerchner charakterisieren den Aufbau und beschreiben verschiedene Anwendungen [33-38]. Im Folgenden werden die Kalorimereinheit, die Fluidik sowie die Software zur Ansteuerung beschrieben.

3.2.1.1 Kalorimeter

Die Kalorimereinheit besteht aus vier Thermosäulen, die sequenziell unter der Flusszelle angeordnet sind. Jede Thermosäule enthält 118 BiSb/Sb Thermoelemente mit darunterliegenden NiCr Heizelementen, die als Dünnschicht auf eine 1 μm dicke SiN-Membran aufgebracht sind. Diese Membran ist freistehend auf einen Rahmen aus Silizium aufgeklebt, der wiederum auf einen Kupferblock als Wärmesenke aufgebracht ist. Die Thermosäulen sind paarweise angeordnet und reichen von beiden Seiten des Rahmens her in die Mitte der Membran. Der Flusskanal liegt über der Mitte der Membran, sodass die Reaktionswärme in der Zelle zu einer Temperaturdifferenz zwischen beiden Seiten der Thermosäule führt. An den Thermosäulen wird eine Spannung von 5,2 V pro W Wärmeleistung generiert.

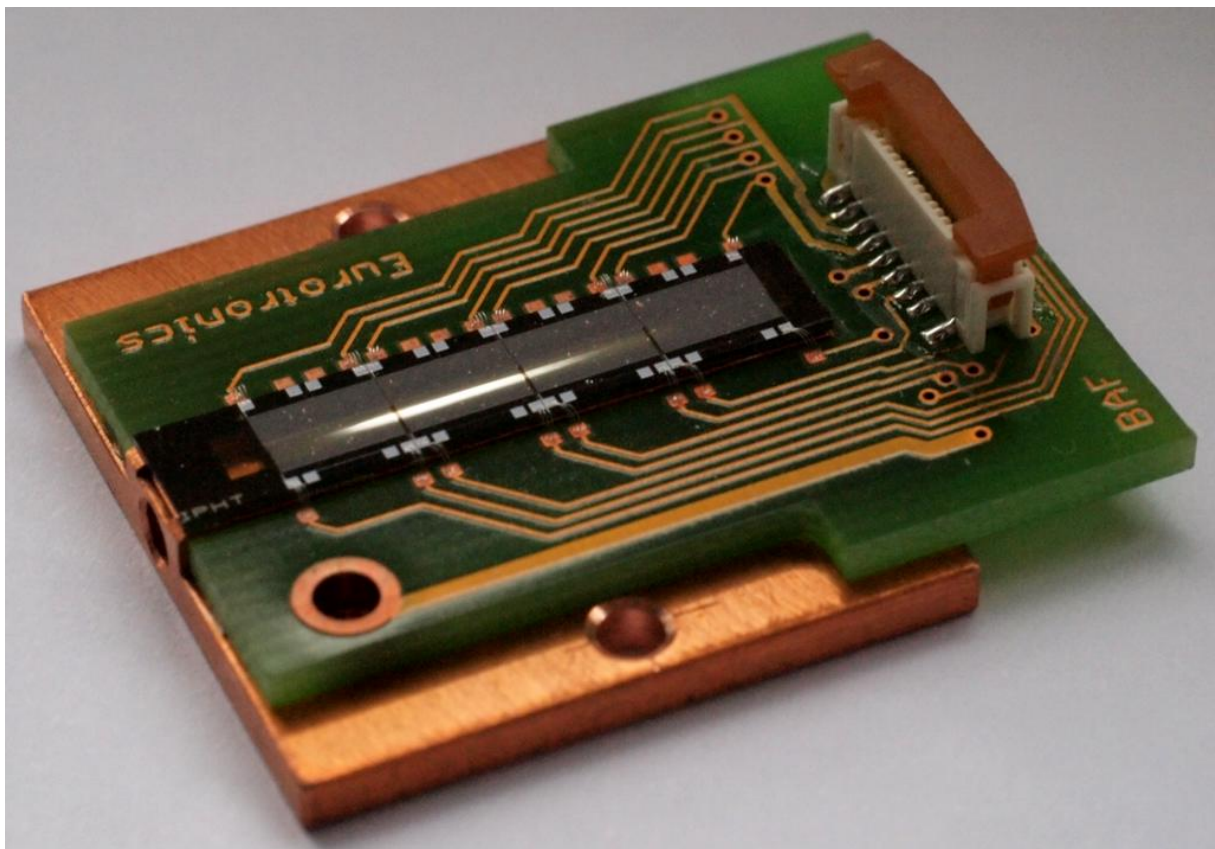


Abbildung 3-1: Kalorimeter Chip. Die silbernen Strukturen in der Mitte sind die vier Thermosäulen, die auf den Siliziumrahmen aufgespannt sind. Unter der Elektronik ist der Kupferblock zu sehen, der als Wärmesenke dient.

Die Kalorimereinheit ist in einem hochpräzisen Thermostaten untergebracht, der eine Thermostatisierung mit Abweichungen von der Solltemperatur von weniger als 100 μK ermöglicht. Die Temperatur der Wärmesenke liegt bei 25,6 $^{\circ}\text{C}$ und wird auf 6 μK genau überwacht. Die Thermostatisierung wird durch einen zweischichtigen Aufbau erreicht, wobei der äußere Thermostat kontinuierlich durch einen Peltier-Kühler gekühlt wird und Heizelemente für eine Anpassung der Temperatur sorgen. Der äußere Thermostat hat eine Solltemperatur von 25 $^{\circ}\text{C}$, der innere von 25,3 $^{\circ}\text{C}$.

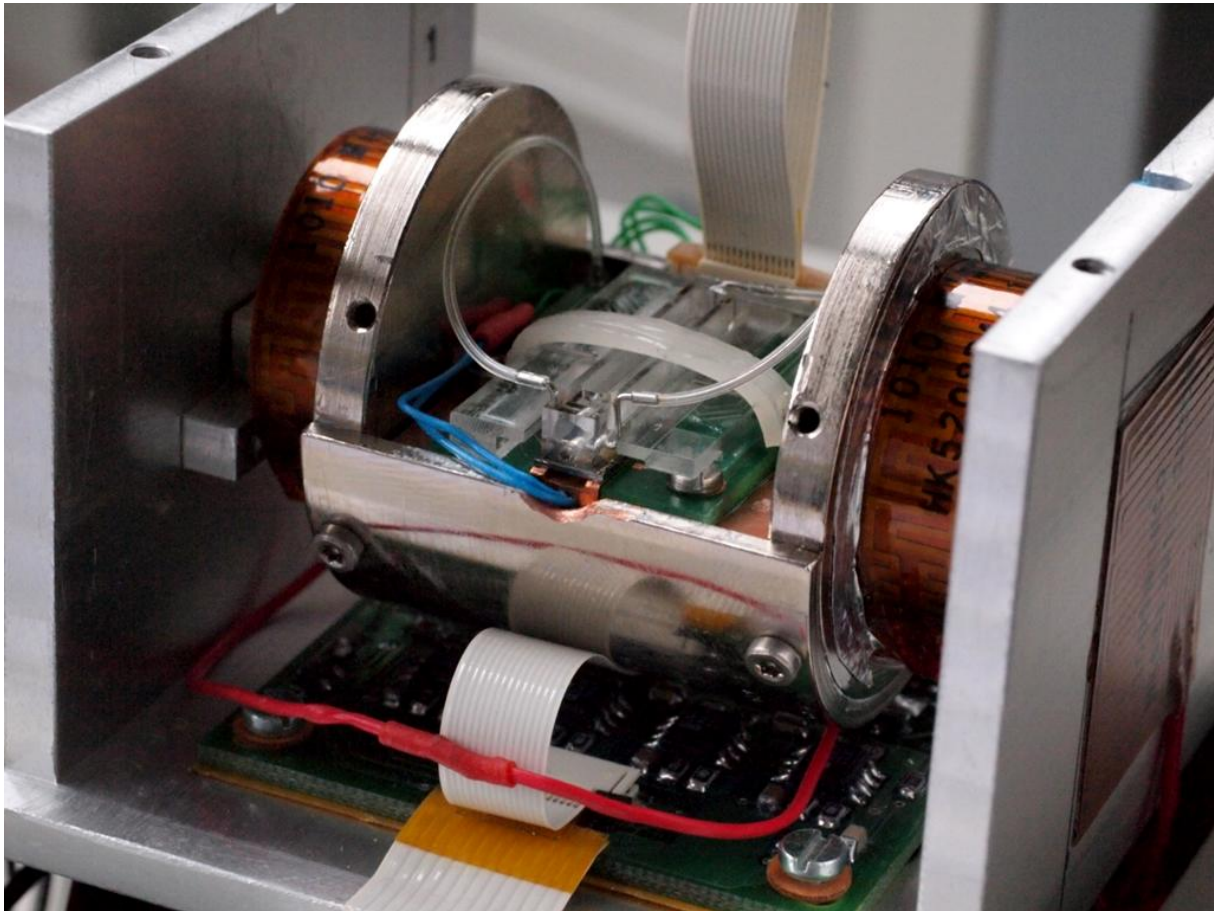


Abbildung 3-2: Kalorimeter Chip mit Flusszelle im Thermostaten. Die Platten rechts und links sind Teile des äußeren Thermostaten, die zylinderförmige Struktur ist der innere Thermostat

3.2.1.2 Fluidik

Zwei identische, voneinander unabhängig ansteuerbare Fluidiken können Lösungen in die Flusszelle des Kalorimeters pumpen. Somit ist es möglich, zwei Lösungen in der Flusszelle zu mischen und die Reaktion zu verfolgen. Herzstück der Fluidiken ist eine Kolbenpumpe mit einer Verdrängung von maximal 280 μl . Diese wird aus einem der Einlassports (In1, 2 und 3) befüllt und pumpt die Lösung über die interne Probenschleife entweder in den Abfall (Out2) oder in Richtung Kalorimetereinheit (Out1). Die interne Probenschleife kann über eine Membranpumpe mit Lösungen aus den Einlassports In4 befüllt werden, dabei wird die Kolbenpumpe umgangen. Bei der Arbeit mit Mitochondriensuspensionen wurde darauf verzichtet, da die Membranpumpe leicht verstopft. Zwischen das Out1-Ventil und das Kalorimeter ist eine externe Probenschleife mit 60 μl bzw. 90 μl Volumen geschaltet, die manuell mit einer Spritze befüllt wird. Die Pumpen und Ventile wurden von der Firma The Lee Company, Westbrook, CT, USA, hergestellt.

Die Temperatur der Lösungen wird vor dem Erreichen der Flusszelle in Wärmetauschern möglichst genau an die Temperatur der Wärmesenke angepasst. Die Flusszelle besteht aus einem PMMA Block, in den ein 2 cm langer, Kanal mit einem Querschnitt von 1 x 1 mm gefräst ist. Auf die Unterseite der Flusszelle ist eine PMMA Folie geklebt, die, mit Paraffinöl bestrichen, auf die Thermosäulen gelegt wird, um die Wärmeübertragung auf die Thermosäulen zu optimieren.

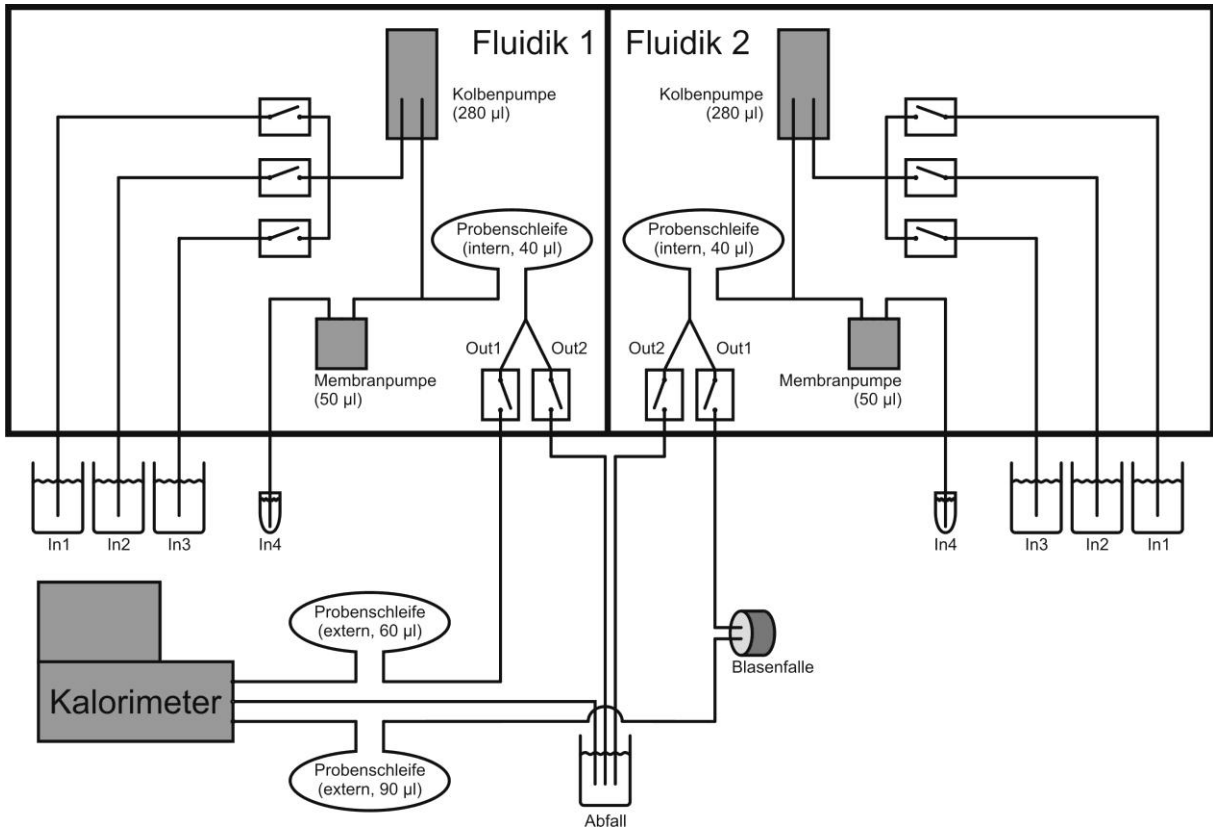


Abbildung 3-3: Schematischer Aufbau der Fluidik des Chipkalorimeters

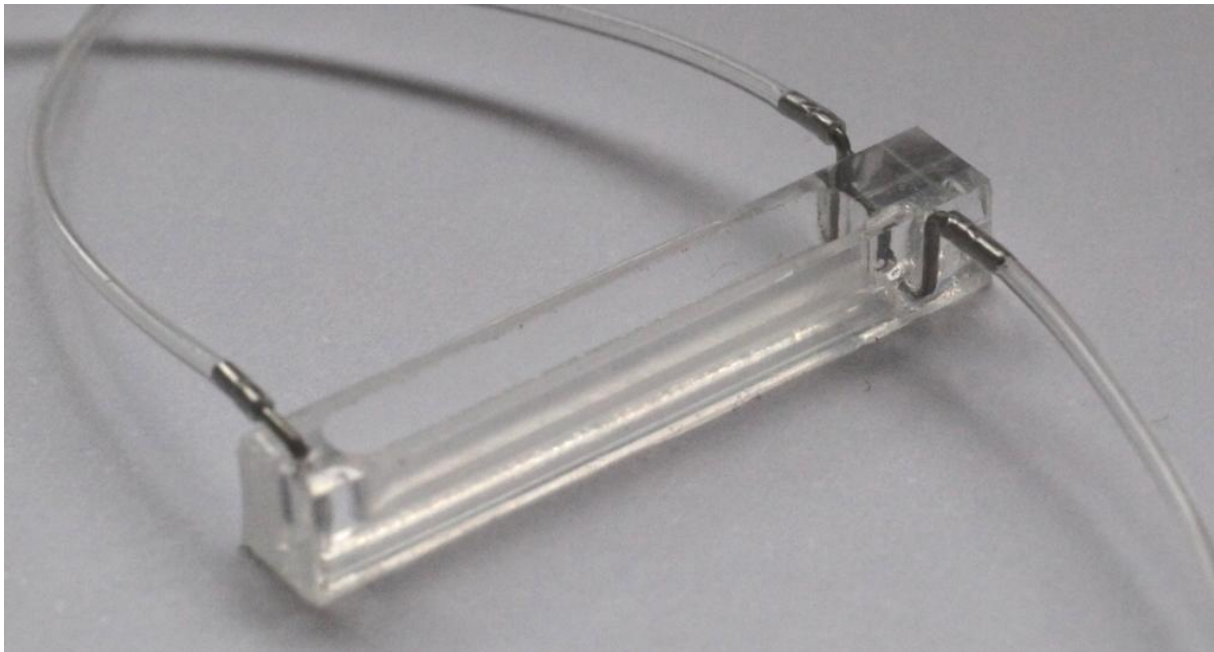


Abbildung 3-4: Flusszelle mit zwei Einlässen und einem Auslass

Da die Wärmetauscher eine begrenzte Wärmekapazität besitzen, wurden Flussgeschwindigkeiten von maximal 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ für Spülschritte und maximal 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ für die Injektion der Probe gewählt.

Für die Verbindungen zwischen Fluidikelementen sowie als Probenschleifen dienen Schläuche aus PTFE. Bei der verwendeten Fluidik wurde eine Blasenfalle der Firma Diba Industries Inc., Danbury, CT, USA, vor die externe Probenschleife geschaltet, um den Kontakt der Probe mit den in der Blasenfalle enthaltenen Materialien PEEK und PTFE zu vermeiden.

3.2.1.3 Ansteuerung

Das Kalorimeter wird durch eine von Herrn Dr. Lerchner in Matlab programmierte Software angesteuert. In einem kontinuierlichen Datenstrom werden in Zeitintervallen von 0,5 s die Temperaturen des inneren und äußeren Thermostaten und der Wärmesenke, die Heizleistungen am inneren und äußeren Thermostaten, sowie die Spannungen der Thermosäulen aufgenommen.

Unabhängig vom Datenstrom wird die Fluidik angesteuert, wobei die Stellung der Ventile im Datensatz vermerkt wird, sodass der Start eines Programms exakt bekannt ist. In den Programmen wird die anzusteuernde Fluidik ausgewählt und die Stellung der Ventile, die Richtung des Pumpvorgangs (Füllen oder Entleeren der Kolbenpumpe), das zu pumpende Volumen und die Flussgeschwindigkeit definiert. Die beiden Fluidiken können gleichzeitig angesteuert werden.

3.2.2 Software

Origin 7 der Firma OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA wurde zur graphischen Darstellung der Daten, zur Kurvenanpassung sowie zur dynamischen Korrektur (ohne Glättung) der Daten verwendet.

Matlab der Firma The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA, wurde zur Ansteuerung des Chip-Kalorimeters sowie zur Glättung der Daten nach der dynamischen Korrektur verwendet. Es wurden verschiedene Versionen benutzt, wobei es sich stets um eine der beiden aktuellsten Versionen handelte. Für die in dieser Arbeit dargestellten Daten wurden die Versionen 2011b bis 2012b verwendet.

MS Excel 2007 der Firma Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA, wurde für diverse Rechnungen genutzt.

3.2.3 Laborgeräte

UV/Vis-Spektrometer Lambda 9 der Firma Perkin Elmer, Waltham, MA, USA

Thermoschüttler Modell Thermomixer Compact der Firma Eppendorf, Hamburg

Mikroliterpipetten der Reference-Serie der Firma Eppendorf, Hamburg, mit Volumina von 0,5 bis 10 μl , 10 bis 100 μl und 100 bis 1000 μl

pH-Meter Modell CG 843 der Firma Schott, Mainz

3.3 Methoden

3.3.1 Probenbehandlung

Die Mitochondriensuspensionen wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zum Auftauen wurde entsprechend der benötigten Verdünnung eisgekühlter SEM Puffer zugegeben und wenn nötig mit einer Pipette vorsichtig resuspendiert. Generell wurden beim Pipettieren die Mitochondriensuspensionen langsam aufgesaugt und zuvor ca. 0,5 cm der Pipettenspitze abgeschnitten, um die Öffnung zu vergrößern und die Scherkräfte zu verringern, da es sonst zu einer Verletzung der Membranen kommen kann. Aufgetaute Proben wurden generell auf Eis gelagert, bis die Inkubation mit verschiedenen Reagenzien erfolgte.

Um Schwankungen im Gehalt an Mitochondrien auszugleichen, wurde als Maß für die Menge an eingesetztem Material ein Bradford-Test durchgeführt. Dabei wird die Probe mit dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau versetzt, welcher sich unspezifisch an die Proteine anlagert und dabei sein Absorptionsspektrum verändert. Bei einer Wellenlänge von 595 nm ist die Extinktion für ein gegebenes Protein proportional zu dessen Konzentration. Die in den kalorimetrischen Messungen eingesetzten Verdünnungen richteten sich nach der gemessenen Extinktion. Die Mitochondriensuspensionen wurden vor der Quantifizierung auf ein Zehntel der Ausgangskonzentration mit SEM Puffer verdünnt. Für den Nullabgleich wurden die Proben- und die Referenzküvette mit 1500 μl Bradfordreagenz und 50 μl SEM Puffer gefüllt. Der Inhalt der Probenküvette wurde dann gegen 1500 μl Bradfordreagenz mit 50 μl der verdünnten Mitochondrienprobe ausgetauscht. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurde der Extinktionswert abgelesen.

Die Verdünnung der Mitochondrien wurde so gewählt, dass bei den Isolaten aus Wildtyp Hefen, die aus einer Kultur in Lactat-Medium gewonnen wurden, je nach Substrat Signale von ca. $-2\text{ }\mu\text{V}$ bis $-10\text{ }\mu\text{V}$ relativ zur Basislinie erhalten wurden. Die Mitochondrien der anderen Hefestämme wurden so verdünnt, dass sie laut Bradford-Test die gleiche Menge an Mitochondrien enthielten.

Für den Test wurde zunächst die Mitochondriensuspension mit SEM Puffer verdünnt und dann zwei Teile dieser Suspension mit einem Teil des DNP Puffers versetzt. Um zu verhindern, dass die Stoffwechselleistung durch die Reaktionswärme der DNP induzierten Depolarisation der Membran überlagert wird, wurde die Probe vor der Zugabe eines weiteren Teils an Substratlösung 30 min bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 300 rpm im Thermoschüttler in geöffneten Probenröhrchen inkubiert.

3.3.2 Messabläufe

Eine typische Messung der Stoffwechselaktivität von Mitochondrien sowie die einzelnen Schritte der Messung sind in Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6 dargestellt.

In Abschnitt 1 beider Abbildungen befindet sich das Laufmedium, hier vollentsalztes Wasser, in der Messzelle. Es wird nicht gepumpt, das Signal befindet sich auf Basislinienniveau. In Abschnitt 2 der Messung findet die Injektion der Probe in die Zelle statt. Die injizierte Flüssigkeit wird zwar zunächst durch einen Wärmetauscher thermisch an die Temperatur der Wärmesenke angeglichen, allerdings kommt es nicht zu einem vollständigen Temperatúrausgleich und die injizierte Flüssigkeit hat beim Erreichen der Messzelle eine etwas zu niedrige Temperatur.

Daraus resultiert ein positives Signal, welches aufgrund der Anordnung der Thermosäulen einem endothermen Prozess entspricht. Rechts des lokalen Maximums erreicht die Probe die Messzelle (3). Da in der Probe eine exotherme Reaktion stattfindet und weil sich an der Front der Probe diese mit dem Laufmedium in einer exothermen Reaktion mischt, fällt das Signal ab. Kurz nach Durchlaufen des lokalen Minimums ist die Flüssigkeit in der Zelle praktisch vollständig gegen die Probe ausgetauscht. Der Fluss wird hier gestoppt, um die Stoffwechselleistung ohne störende Flusseffekte beobachten zu können. Das Signal driftet sich auf ein Niveau deutlich unterhalb der Basislinie ein. Es wird in Abschnitt 4 also zunächst ein exothermer Prozess beobachtet. Die Differenz des Signals zum Basislinienniveau ist proportional zur Stoffwechselleistung der Mitochondrien. An der durch 5 markierten Stelle bricht die Stoffwechselleistung ein, da der Sauerstoff verbraucht ist. Bei geringeren Stoffwechselleistungen tritt dieser Effekt später auf und verläuft langsamer. In Abschnitt 6 wird die Messzelle gespült, zunächst mit dem restlichen Volumen der Kolbenpumpe und dann in einem weiteren Schritt mit dem vollständigen Volumen der Kolbenpumpe. In Abschnitt 7 ist die Messzelle wieder mit dem Laufmedium gefüllt und der Fluss ist gestoppt. Das Signal driftet dadurch wieder auf das Basislinienniveau zurück.

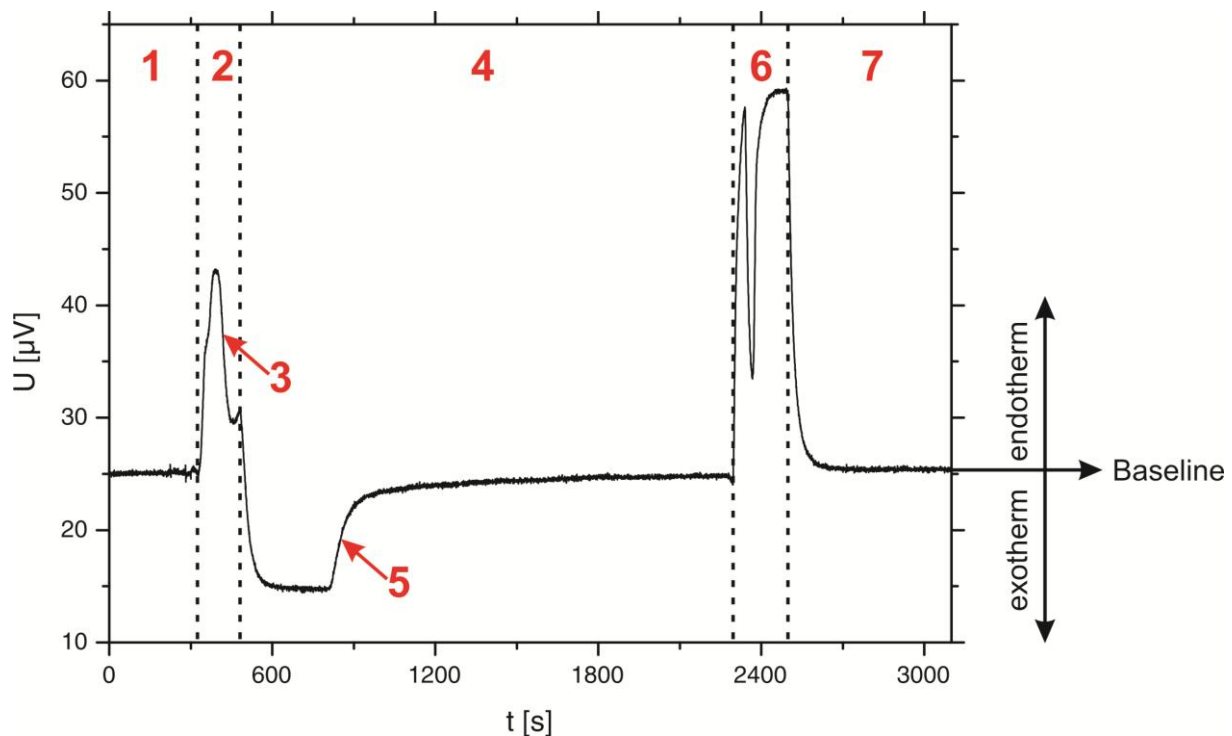


Abbildung 3-5: Typischer Signalverlauf bei der Messung der Stoffwechselaktivität von Mitochondrien. Die gestrichelten Linien markieren Veränderungen im Fluss. Erläuterung im Text

Die Stoffwechselaktivitäten von Mitochondrien wurden stets mit diesem Ablauf gemessen. Um eine gute Reproduzierbarkeit zu erreichen, wurde beim Zumischen des Substrates sofort eine Stoppuhr gestartet und nach exakt einer Minute mit der Messung begonnen. Injiziert wurden in Abschnitt 2 stets 150 µl mit einer Flussrate von 50 µl/min. Die vergleichsweise langsame Injektion wurde gewählt, da Mitochondrien empfindlich auf Scherkräfte reagieren. Der Fluss wurde, wenn nicht anders angegeben, zur Beobachtung der Reaktion in der Regel für 30 min angehalten. In Abschnitt 6 wurden, zunächst ohne die Pumpe neu zu füllen, 100 µl injiziert.

Im zweiten Teil des Spülvorgangs wurden weitere 250 μl des Laufmediums injiziert, die Flussrate beträgt hier 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Vor der darauf folgenden Messung sorgte eine Pause von einigen Minuten dafür, dass die Signale wieder das Basislinienniveau erreichen konnten.

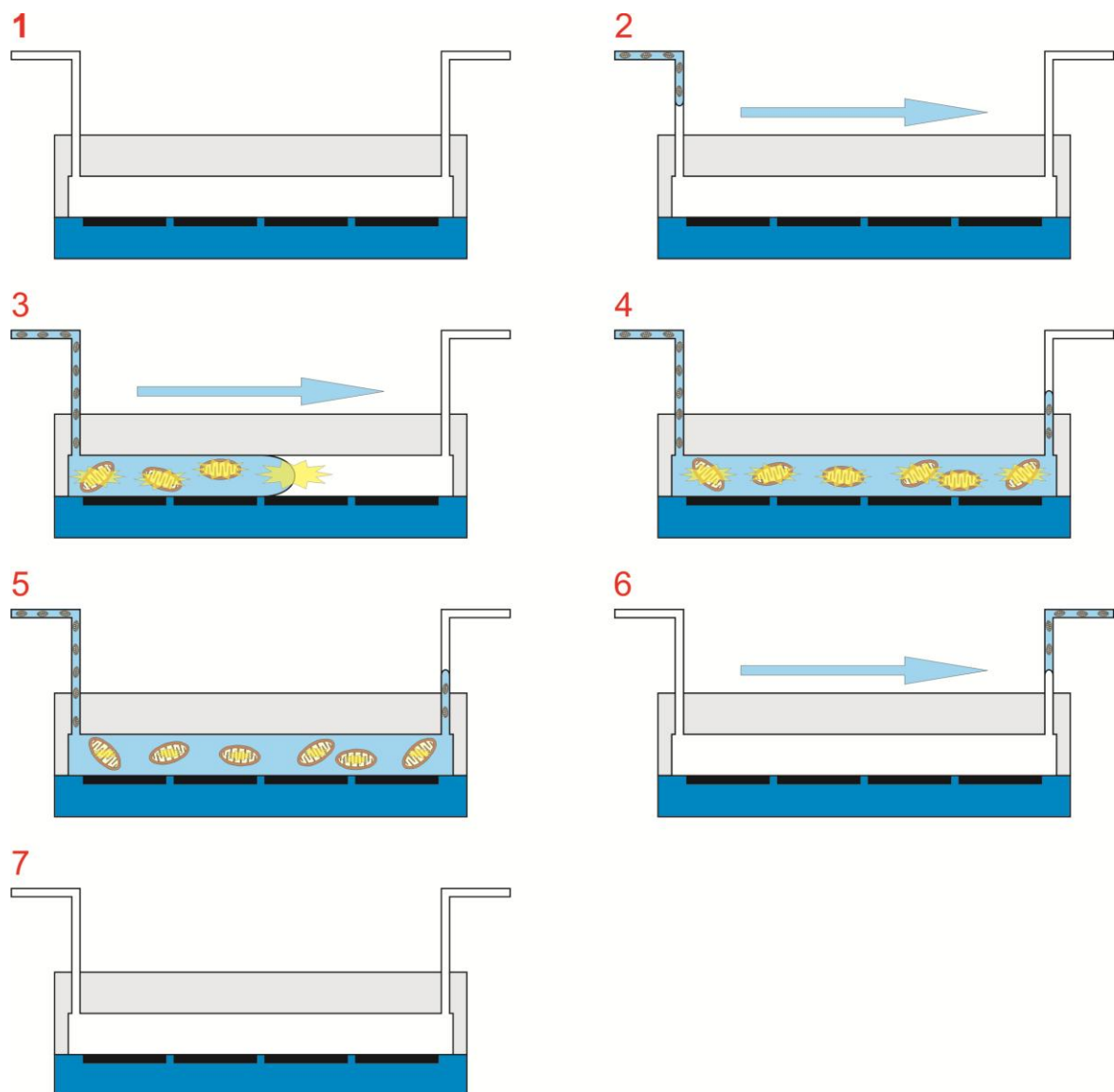


Abbildung 3-6: Zuordnung der in Abbildung 3-5 dargestellten Phasen einer typischen Messung. Erläuterung im Text

3.3.3 Signalprozessierung

Die erhaltenen Rohsignale wurden nach den in Abschnitt 4.1 hergeleiteten Verfahren prozessiert. Dazu wurden die Daten zunächst in Origin 7 eingelesen, geplottet und numerisch differenziert. Die differenzierten Daten wurden mit der Zeitkonstante für den Wärmefluss multipliziert und zu den Rohdaten addiert. Anschließend folgt die Glättung der Daten in Matlab. Dazu wurde auf ein Programm zurückgegriffen, das Herr Dr. Lothar Leidner, wie in Abschnitt 4.1.3 beschrieben, programmiert hat. Es wurde für die Glättung ein symmetrisches Intervall von

insgesamt 61 Datenpunkten um den zu glättenden Punkt gewählt. Die so prozessierten Daten wurden gemäß Abschnitt 3.3.4 ausgewertet.

3.3.4 Datenauswertung

Sämtliche Messungen wurden vor der Auswertung gemäß Abschnitt 3.3.3 prozessiert. Nach der dynamischen Korrektur und der Glättung der Daten ist es noch nötig, eine Basislinienkorrektur durchzuführen. Dazu wird in Origin 7 eine auf vier Punkte gestützte Basislinie manuell angepasst und von den Daten subtrahiert. Zwei Stützpunkte liegen in dem Bereich vor der Injektion der Probe, zwei in dem Bereich nach den Spülschritten (Abschnitte 1 und 7 in Abbildung 3-5). Eine solche Korrektur birgt die Gefahr von Artefakten und lässt sich nicht exakt reproduzieren. Dennoch konnte nicht darauf verzichtet werden, da die Signale häufig von einer Drift überlagert waren, die größere Fehler zur Folge haben, als die hier zu erwartenden.

Kurz nach der Injektion sollten sich die Signale auf ein konstantes Niveau einpendeln, das aufgrund des Überschusses an Elektronendonator und -akzeptor für einige Zeit annähernd konstant bleibt. Erst wenn die Verknappung des Sauerstoffs zu geringeren Reaktionsraten führt (in Abbildung 3-5 mit 5 markierte Phase), sollte sich das Signal von diesem Niveau entfernen. In der Realität wird allerdings häufig ein abweichendes Verhalten beobachtet. So kommt es vor allem bei hohen Mitochondrienkonzentrationen zu einem annähernd linearen Signalanstieg mit geringer Steigung, bevor der Sauerstoff-Effekt einsetzt. Wie in Abschnitt 2.2.2.3 diskutiert wird, liegt dies vermutlich daran, dass sich bei hohen Stoffwechselraten immer stärker ein Protonengradient aufbaut, der durch das zugesetzte DNP nicht ausreichend schnell abgebaut wird. Dadurch kommt es zum Wiederaufbau eines Gradienten, gegen den die Atmungskette immer stärker anarbeiten muss, wodurch sich die Reaktion verlangsamt.

Um diesen Effekt auszugleichen, wurde an diesen linearen Bereich eine Gerade angepasst, mit deren Hilfe auf die Wärmeleistung zum Zeitpunkt der Substratzugabe extrapoliert wurde. Der Bereich, an den die Gerade angepasst wird, beginnt eine Minute nach dem Stopp der Injektion und endet 100 Sekunden später. In diesem Bereich haben sich die Signale dank der dynamischen Korrektur recht genau an die zu erwartenden Wärmesignale angepasst (vergl. Abbildung 4-5), da die Kinetik des Wärmeflusses eliminiert wurde. Aufgrund der bis auf wenige Sekunden genau standardisierten Inkubationszeiten ist der Zeitpunkt relativ genau bekannt, auf den extrapoliert werden muss. Die Wärmeleistung zu Beginn der Reaktion ergibt sich aufgrund der Basislinienkorrektur direkt aus der Geradengleichung. In Abschnitt 4.2.1.1 werden die Vorteile dieses Verfahrens anhand von Messungen belegt.

Wenn nicht anders angegeben, wurde jede Messung dreimal wiederholt und die Standardabweichung des Mittelwertes berechnet. Einzelne Messungen wurden verworfen, wenn es zu offensichtlichen Störungen im Messablauf kam, wie beispielsweise Luftblasen in der Fluidik oder stark bzw. unregelmäßig driftende Basislinien.

Ausgewertet wurden stets die Signale an der zweiten Thermosäule. Diese zeigt die geringsten Artefakte, die durch Druckschwankungen beim Schalten der Ventile entstehen. Bei Messungen im gestoppten Fluss ergeben sich durch Auswertung der anderen Thermosäulen keine Vorteile.

4 Ergebnisse

In diesem Abschnitt wird zunächst ein Verfahren zur dynamischen Korrektur der Signale vorgestellt, das es ermöglicht, das verzögerte Ansprechen des Detektors aus den Daten zu eliminieren. Es folgen die Messungen mit Mitochondrien aus Wildtyp Hefestämmen, mit denen die Testverfahren etabliert wurden. Deren Stoffwechsellleistungen werden im folgenden Abschnitt mit denen der mutierten Hefestämme verglichen.

4.1 Dynamische Korrektur

Wie bereits in Abschnitt 2.1.3 diskutiert wurde, ist die zeitliche Auflösung bei Kalorimetern schlecht im Vergleich zu anderen Methoden wie der Spektroskopie. Der Grund dafür ist die Überlagerung zweier Kinetiken; der der Leistungsänderung des zu beobachtenden Prozesses, die eine Veränderung der Reaktionskinetik widerspiegelt und der des Wärmeflusses zwischen der Messzelle und der Wärmesenke, die zu einem verzögerten Ansprechen des Detektors führt. Dies ist ein wesentlicher Nachteil, wenn es um den Einsatz von Kalorimetern in kinetischen Untersuchungen geht. Auch bei der Bestimmung von Reaktionswärmern, die sich aus der Integration der Leistung über die Zeit ergeben, kommt es zu Artefakten, wenn die Kinetik des Wärmeflusses nicht eliminiert wird. Daher werden zunächst eine mathematische Beschreibung der Signaldynamik und dann ein Verfahren zur Eliminierung der Kinetik des Wärmeflusses hergeleitet. Es hat sich gezeigt, dass das Rauschen durch die dynamische Korrektur amplifiziert wird. Da einige gängige Verfahren zur Glättung der Daten zusätzliche Artefakte erzeugen, wird ein Verfahren zur Glättung von Daten vorgestellt, das eine sprunghafte Änderung der Steigung pro Glättungsintervall zulässt, ohne in der Nähe dieser Stelle Artefakte zu erzeugen.

4.1.1 Herleitung eines Modells für die Signaldynamik

Um zu dem Modell der sich überlagernden Kinetiken zu gelangen, wird zunächst gezeigt, dass es bei einer konstanten Wärmeleistung in der Messzelle im Gleichgewicht zu einer konstanten Temperaturdifferenz zwischen der Zelle und der Wärmesenke kommt. Als nächstes wird diskutiert, wie sich die Temperatur in der Zelle bei einer sprunghaften Änderung der Wärmeleistung an die neue Gleichgewichtstemperatur anpasst. Es folgt die Herleitung des Temperaturverlaufs bei sich verändernden Wärmeleistungen. Die aus der Anpassung des Modells an reale Daten erhaltenen Zeitkonstanten werden in Abschnitt 4.1.2 verwendet, um die dort hergeleitete dynamische Korrektur anzuwenden.

4.1.1.1 Konstante Wärmeleistung in der Messzelle

Wie in Abschnitt 2.1.2.2 gezeigt wurde, wird an der Thermosäule eine Spannung (U) erzeugt, die für geringe Temperaturänderungen proportional zur Differenz der Temperaturen zwischen der Messzelle (T_Z) und der Wärmesenke (T_S) ist.

$$U \sim (T_Z - T_S)$$

4-1

T_S wird dabei als konstant angenommen, da die Wärmekapazität der Senke hoch ist gegenüber der der Probe und da sie vom Gerät konstant gehalten wird. Änderungen in der Spannung sind also proportional zur Änderung von T_Z .

Es findet ein Wärmefluss zwischen der Messzelle und der Wärmesenke (\dot{Q}_{ZS}) statt, wenn eine Temperaturdifferenz besteht. In Abschnitt 2.1.2.1 wurde folgender Zusammenhang hergeleitet

$$\dot{Q}_{ZS} = -\lambda \cdot A \cdot \left(\frac{(T_Z - T_S)}{\Delta Z} \right) \quad 4-2$$

Wird in der Messzelle durch eine Reaktion eine Wärmeleistung (\dot{Q}_R) generiert, so entsteht eine Temperaturdifferenz zwischen der Messzelle und der Wärmesenke. Für eine konstante Wärmeleistung verändert sich die Zelltemperatur so lange, bis die Summe aus Wärmefluss und Wärmeleistung gleich null ist. Im Gleichgewicht gilt

$$\dot{Q}_{ZS} + \dot{Q}_R = 0 \quad 4-3$$

Einsetzen ergibt die Temperaturdifferenz im Gleichgewicht (T_Z^{GGW})

$$\dot{Q}_R = \frac{\lambda \cdot A}{\Delta Z} \cdot (T_Z^{GGW} - T_S) \quad 4-4$$

bzw.

$$(T_Z^{GGW} - T_S) = \frac{\Delta Z}{\lambda \cdot A} \cdot \dot{Q}_R \quad 4-5$$

4.1.1.2 Sprunghafte Änderung der Wärmeleistung

Angenommen das System war im Gleichgewicht und \dot{Q}_R ändert sich dann sprunghaft, so befindet sich das System zum Zeitpunkt der Änderung (t_0) bei der Gleichgewichtstemperatur vor dem Leistungsabfall (T_Z^0) und nähert sich an die neue Gleichgewichtstemperatur (T_Z^{GGW}) an.

$$\dot{Q}_{Gesamt} = \dot{Q}_{ZS} + \dot{Q}_R = -\frac{\lambda \cdot A}{\Delta Z} \cdot (T_Z - T_S) + \frac{\lambda \cdot A}{\Delta Z} \cdot (T_Z^{GGW} - T_S) \quad 4-6$$

$$\dot{Q}_{Gesamt} = \frac{\lambda \cdot A}{\Delta Z} \cdot (T_Z^{GGW} - T_Z) \quad 4-7$$

In der isothermen Kalorimetrie kann man aufgrund der geringen Temperaturschwankungen die Wärmekapazität als konstant annehmen. Damit ist das Produkt aus der Temperaturänderung in der Zelle und der Wärmekapazität gleich \dot{Q}_{Gesamt} .

$$\frac{dT_Z}{dt} \cdot C = \frac{\lambda \cdot A}{\Delta Z} \cdot (T_Z^{GGW} - T_Z) \quad 4-8$$

$$\frac{dT_Z}{dt} = \frac{\lambda \cdot A}{\Delta Z \cdot C} \cdot (T_Z^{GGW} - T_Z) \quad 4-9$$

Um die Temperatur als Funktion der Zeit zu erhalten, muss diese Gleichung integriert werden. Zur Vereinfachung wird zuvor jedoch der Ausdruck $\left(\frac{\lambda \cdot A}{\Delta z \cdot C}\right)$, der als eine Art Ratenkonstante ($k_2 = \frac{1}{\tau_2}$) bezeichnet werden kann und die Dimension $[s^{-1}]$ besitzt, durch $\frac{1}{\tau_2}$ substituiert. τ_2 ist die Abklingzeit des Prozesses.

$$\frac{dT_z}{dt} = \frac{1}{\tau_2} \cdot (T_z^{GGW} - T_z) \quad 4-10$$

Die Ableitung einer Funktion ist gleich der Ableitung der Differenz aus dieser Funktion und einer Konstanten. Man kann daher schreiben

$$\frac{d(T_z - T_z^{GGW})}{dt} = \frac{1}{\tau_2} \cdot (T_z^{GGW} - T_z) \quad 4-11$$

$$\frac{d(T_z - T_z^{GGW})}{T_z - T_z^{GGW}} = -\frac{1}{\tau_2} \cdot dt \quad 4-12$$

Integration führt zu

$$\int_{T_z^0}^{T_z} \frac{d(T_z - T_z^{GGW})}{T_z - T_z^{GGW}} = -\frac{1}{\tau_2} \cdot \int_0^t dt \quad 4-13$$

$$\ln(T_z - T_z^{GGW}) - \ln(T_z^0 - T_z^{GGW}) = -\frac{t}{\tau_2} \quad 4-14$$

$$\frac{T_z - T_z^{GGW}}{T_z^0 - T_z^{GGW}} = \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \quad 4-15$$

$$T_z - T_z^{GGW} = (T_z^0 - T_z^{GGW}) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \quad 4-16$$

$$T_z = (T_z^0 - T_z^{GGW}) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) + T_z^{GGW} \quad 4-17$$

4.1.1.3 Änderung der Wärmeleistung nach einer Kinetik erster Ordnung

Dieser Zusammenhang gilt nur für einen abrupten Abfall der Wärmeleistung. Dieser ist allerdings in der Realität nur selten gegeben. Bei der Beobachtung von chemischen Reaktionen ist beispielsweise die Wärmeleistung proportional zur Geschwindigkeit der Produktbildung. Für eine Reaktion erster Ordnung ($A \rightarrow B$) ist die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zur Konzentration des Stoffes A und nimmt wie diese nach einem einfachen, exponentiellen Zusammenhang ab. Auch andere Prozesse folgen häufig diesem Zusammenhang. Es soll nun betrachtet werden, wie sich die Temperatur in der Zelle ändert, wenn sich die Wärmeleistung von dem Ausgangswert $\dot{Q}_{R,0}$ zum finalen Wert $\dot{Q}_{R,\infty}$ ändert. Der Index „GGW“ wurde zuvor eingeführt als der Wert, den die Temperatur bei konstanter Wärmeleistung in Gleichgewicht

annehmen würde. Da sich hier die Wärmeleistung mit der Zeit ändert, ist dieser Gleichgewichtswert allerdings eine Funktion der Zeit. Daher wird hier der Index ∞ eingeführt, der den Wert angibt, den das System nach unendlicher Zeit annimmt. Dieser Zusammenhang lässt sich beschreiben durch

$$\dot{Q}_R = \dot{Q}_{R,0} - (\dot{Q}_{R,0} - \dot{Q}_{R,\infty}) \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)\right) \quad 4-18$$

bzw.

$$\dot{Q}_R = (\dot{Q}_{R,0} - \dot{Q}_{R,\infty}) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + \dot{Q}_{R,\infty} \quad 4-19$$

wobei τ_1 die Abklingzeit des Leistungsabfalls ist.

Zu jeder Wärmeleistung \dot{Q}_R lässt sich eine Gleichgewichts-Zelltemperatur T_Z^{GGW} zuordnen, auf die die tatsächliche Zelltemperatur T_Z nach dem in Abschnitt 4.1.1.2 hergeleiteten, integrierten Zeitgesetz für die Zelltemperatur zustrebt. Da sich die Wärmeleistung ständig ändert, ändert sich auch die dazugehörige T_Z^{GGW} mit der Zeit. Dabei ist $T_{Z,0}^{GGW}$ die Gleichgewichtstemperatur, die sich aus der Wärmeleistung zum Zeitpunkt t_0 ergibt und $T_{Z,\infty}^{GGW}$ diejenige, die nach unendlich langer Zeit vorliegt.

Durch Einsetzen des Zusammenhangs aus Gleichung 2-59

$$\dot{Q}_R = \frac{\lambda \cdot A}{\Delta Z} \cdot (T_Z^{GGW} - T_S) \quad 2-59a$$

in Gleichung 4-18 erhält man

$$\begin{aligned} \frac{\lambda \cdot A}{\Delta Z} \cdot (T_Z^{GGW} - T_S) &= \frac{\lambda \cdot A}{\Delta Z} \cdot (T_{Z,0}^{GGW} - T_S) - \left(\frac{\lambda \cdot A}{\Delta Z} \cdot (T_{Z,0}^{GGW} - T_S) - \frac{\lambda \cdot A}{\Delta Z} \cdot (T_{Z,\infty}^{GGW} - T_S) \right) \\ &\cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)\right) \end{aligned} \quad 4-20$$

Einfache, arithmetische Umformung ergibt

$$T_Z^{GGW} = T_{Z,0}^{GGW} - (T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)\right) \quad 4-21$$

Wie bereits zuvor diskutiert, nähert sich die Zelltemperatur nach folgendem Zusammenhang an die neue Gleichgewichtstemperatur an

$$\frac{dT_Z}{dt} = \frac{1}{\tau_2} \cdot (T_Z^{GGW} - T_Z) \quad 4-22$$

Setzt man nun die sich nach Gleichung 4-21 verändernde Gleichgewichtstemperatur T_Z^{GGW} in Gleichung 4-22 ein, so erhält man

$$\frac{dT_Z}{dt} = \frac{1}{\tau_2} \cdot \left(T_{Z,0}^{GGW} - (T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) \right) - T_Z \right) \quad 4-23$$

bzw. durch multiplizieren mit τ_2

$$\tau_2 \cdot \frac{dT_Z}{dt} = T_{Z,0}^{GGW} - (T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) \right) - T_Z \quad 4-24$$

Wie bereits in Abschnitt 4.1.1.2 wird $\left(\frac{dT_Z}{dt}\right)$ durch $\left(\frac{d(T_Z - T_{Z,0}^{GGW})}{dt}\right)$ substituiert. Dies ist erlaubt, da $T_{Z,0}^{GGW}$ eine Konstante ist

$$\tau_2 \cdot \frac{d(T_Z - T_{Z,0}^{GGW})}{dt} = T_{Z,0}^{GGW} - (T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) \right) - T_Z \quad 4-25$$

Addition von T_Z und Subtraktion von $T_{Z,0}^{GGW}$ ergibt

$$\tau_2 \cdot \frac{d(T_Z - T_{Z,0}^{GGW})}{dt} + (T_Z - T_{Z,0}^{GGW}) = -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) \right) \quad 4-26$$

Multiplizieren der Gleichung mit $\left(\exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right)\right)$ führt zu einem Ausdruck, der sich nach dem Schema $u \cdot v' + u' \cdot v = (u \cdot v)'$ umformen lässt

$$\begin{aligned} \tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot \frac{d(T_Z - T_{Z,0}^{GGW})}{dt} + \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot (T_Z - T_{Z,0}^{GGW}) \\ = -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) \right) \end{aligned} \quad 4-27$$

Dabei ist

$$\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) = u \quad 4-28$$

$$\exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) = u' \quad 4-29$$

$$(T_Z - T_{Z,0}^{GGW}) = v \quad 4-30$$

$$\frac{d(T_Z - T_{Z,0}^{GGW})}{dt} = v' \quad 4-31$$

Nach der Produktregel lässt sich die linke Seite der Gleichung nun wie folgt substituieren

$$\begin{aligned} \tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot \frac{d(T_z - T_{Z,0}^{GGW})}{dt} + \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot (T_z - T_{Z,0}^{GGW}) \\ = \frac{d\left(\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot (T_z - T_{Z,0}^{GGW})\right)}{dt} \end{aligned} \quad 4-32$$

also ist

$$\frac{d\left(\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot (T_z - T_{Z,0}^{GGW})\right)}{dt} = -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)\right) \quad 4-33$$

bzw.

$$\begin{aligned} d\left(\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot (T_z - T_{Z,0}^{GGW})\right) \\ = -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)\right) \cdot dt \end{aligned} \quad 4-34$$

Es folgt die Integration der rechten Seite in den Grenzen von 0 bis t und der linken Seite in den Grenzen des Ausdrucks $\left(\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot (T_z - T_{Z,0}^{GGW})\right)$, wobei diejenigen Größen eingesetzt werden, die zu den Zeitpunkten 0 und t vorliegen, also von $\left(\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{0}{\tau_2}\right) \cdot (T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,0}^{GGW})\right)$ bis $\left(\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot (T_z - T_{Z,0}^{GGW})\right)$.

$$\begin{aligned} \int_{\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{0}{\tau_2}\right) \cdot (T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,0}^{GGW})}^{\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot (T_z - T_{Z,0}^{GGW})} d\left(\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot (T_z - T_{Z,0}^{GGW})\right) \\ = -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \int_0^t \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)\right) \cdot dt \end{aligned} \quad 4-35$$

Der Übersichtlichkeit halber wird zunächst nur die linke Seite der Gleichung umgeformt. Der Ausdruck $\left(\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{0}{\tau_2}\right) \cdot (T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,0}^{GGW})\right)$ hat den Wert 0, es folgt

$$\int_0^{\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot (T_z - T_{Z,0}^{GGW})} d\left(\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot (T_z - T_{Z,0}^{GGW})\right) = \tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot (T_z - T_{Z,0}^{GGW}) \quad 4-36$$

Umformen der rechten Seite der Gleichung ergibt folgenden Zusammenhang

$$\begin{aligned}
& -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \int_0^t \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)\right) \cdot dt \\
&= -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \int_0^t \left(\exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) - \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)\right) \cdot dt \\
&= -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \int_0^t \left(\exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) - \exp\left(t \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)\right)\right) \cdot dt \\
&= -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(\int_0^t \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot dt - \int_0^t \exp\left(t \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)\right) \cdot dt\right) \\
&= -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \\
&\quad \cdot \left(\tau_2 \cdot \left(\exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) - \exp\left(\frac{0}{\tau_2}\right)\right) \right. \\
&\quad \left. - \frac{\exp\left(t \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)\right) - \exp\left(0 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)\right)}{\left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)}\right) \\
&= -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) - \tau_2 - \frac{\exp\left(t \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)\right) - 1}{\left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)}\right)
\end{aligned} \tag{4-37}$$

Im Folgenden sind die linke und rechte Seite wieder zusammengeführt.

$$\begin{aligned}
& \tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot (T_z - T_{Z,0}^{GGW}) \\
&= -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) - \tau_2 - \frac{\exp\left(t \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)\right) - 1}{\left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)}\right)
\end{aligned} \tag{4-38}$$

Dividieren durch $\left(\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right)\right)$ ergibt

$$\begin{aligned}
(T_z - T_{Z,0}^{GGW}) &= -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \\
&\quad \cdot \left(\frac{\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right)} - \frac{\tau_2}{\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right)} - \frac{\exp\left(t \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)\right) - 1}{\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)}\right)
\end{aligned} \tag{4-39}$$

bzw. nach Kürzen

$$(T_z - T_{Z,0}^{GGW}) = -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(1 - \frac{1}{\exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right)} - \frac{\exp\left(t \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)\right) - 1}{\tau_2 \cdot \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)}\right) \tag{4-40}$$

Da $\frac{1}{\exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right)} = \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)$ ist, folgt

$$(T_z - T_{z,0}^{GGW}) = -(T_{z,0}^{GGW} - T_{z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) - \frac{\left(\exp\left(t \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)\right) - 1\right) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)} \right) \quad 4-41$$

bzw.

$$(T_z - T_{z,0}^{GGW}) = -(T_{z,0}^{GGW} - T_{z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) - \frac{\exp\left(t \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1} - \frac{1}{\tau_2}\right)\right) - \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)} \right) \quad 4-42$$

Zusammenfassen der Exponenten ergibt

$$(T_z - T_{z,0}^{GGW}) = -(T_{z,0}^{GGW} - T_{z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) - \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) - \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)} \right) \quad 4-43$$

bzw.

$$(T_z - T_{z,0}^{GGW}) = -(T_{z,0}^{GGW} - T_{z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) - \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)}{\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)} + \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)} \right) \quad 4-44$$

Erweitern des Ausdrucks $\exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)$ mit $\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)$ ergibt

$$(T_z - T_{z,0}^{GGW}) = -(T_{z,0}^{GGW} - T_{z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(1 - \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot \left(\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)\right)}{\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)} - \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)}{\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)} + \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)} \right) \quad 4-45$$

Nun lassen sich die beiden Terme, die im Zähler den Ausdruck $\left(\exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)\right)$ enthalten, zusammenfassen zu

$$(T_z - T_{Z,0}^{GGW}) = -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(1 - \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)}{\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)} + \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) - \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot \left(\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)\right)}{\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)} \right) \quad 4-46$$

Mit $\left(\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)\right) = \left(1 - \frac{\tau_2}{\tau_1}\right)$ folgt

$$(T_z - T_{Z,0}^{GGW}) = -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(1 - \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)}{\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)} + \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) - \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \cdot \left(1 - \frac{\tau_2}{\tau_1}\right)}{\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)} \right) \quad 4-47$$

und ausmultipliziert

$$(T_z - T_{Z,0}^{GGW}) = -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(1 - \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)}{\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)} + \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) - \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) - \frac{\tau_2}{\tau_1} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)} \right) \quad 4-48$$

wobei sich die Terme $\left(\exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)\right)$ und $\left(-\exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)\right)$ aufheben und die Brüche zusammenfassen lassen zu

$$(T_z - T_{Z,0}^{GGW}) = -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(1 - \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) - \frac{\tau_2}{\tau_1} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)} \right) \quad 4-49$$

Umformen des Nenners ergibt

$$(T_z - T_{Z,0}^{GGW}) = -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(1 - \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) - \frac{\tau_2}{\tau_1} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\frac{\tau_1 - \tau_2}{\tau_1}} \right) \quad 4-50$$

Nach Erweitern mit τ_1 folgt

$$(T_z - T_{Z,0}^{GGW}) = -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(1 - \frac{\tau_1 \cdot \left(\exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) - \frac{\tau_2}{\tau_1} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)\right)}{\tau_1 - \tau_2} \right) \quad 4-51$$

bzw. nach Ausmultiplizieren

$$(T_z - T_{Z,0}^{GGW}) = -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \left(1 - \frac{\tau_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) - \tau_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_1 - \tau_2} \right) \quad 4-52$$

Durch Ausmultiplizieren der rechten Seite

$$(T_z - T_{Z,0}^{GGW}) = -(T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) + (T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \frac{\tau_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) - \tau_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_1 - \tau_2} \quad 4-53$$

und Addition von $T_{Z,0}^{GGW}$ ergibt sich die Temperatur als Funktion der Zeit

$$T_z = T_{Z,\infty}^{GGW} + (T_{Z,0}^{GGW} - T_{Z,\infty}^{GGW}) \cdot \frac{\tau_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) - \tau_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_1 - \tau_2} \quad 4-54$$

Anpassung dieser Funktion an die Daten erlaubt die Bestimmung der Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 . Dabei ist es unerheblich, ob die Zelltemperatur, die Spannung oder die daraus berechnete Wärmeleistung aufgetragen wird, da diese sich in dem betrachteten System proportional zueinander ändern. Da das Gerät Spannungen als Signal liefert, werden diese hier verwendet. Durch statische Kalibrierung wurde zwar der Zusammenhang zwischen der Wärmeleistung in der Zelle und der resultierenden Spannung bestimmt, aufgrund der fehlenden Informationen über Wärmeleitkoeffizienten und der schwer zu beschreibenden Geometrie des Aufbaus lässt sich daraus aber nicht ohne weiteres auf die Zelltemperatur schließen.

τ_1 bestimmt dabei die Kinetik der sich ändernden Wärmeleistung, also des Prozesses, der beobachtet werden soll. τ_2 hingegen beschreibt die Trägheit, die sich aus dem Wärmefluss ergibt. Der aus dem Fit erhaltene Wert für τ_2 wird im folgenden Abschnitt benutzt, um die Kinetik dieses störenden Prozesses zu eliminieren.

4.1.1.4 Anwendung des Modells für die Signaldynamik und Separation der Zeitkonstanten

In Analogie zu Gleichung 4-54 kann der Verlauf der gemessenen Spannung (U^{roh}), die unter den gegebenen Bedingungen als proportional zu der Zelltemperatur T_z angesehen werden kann, für den in Abschnitt 4.1.1.3 dargestellten Zusammenhang wie folgt beschrieben werden

$$U^{roh} = U_\infty + (U_0 - U_\infty) \cdot \frac{\tau_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) - \tau_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_1 - \tau_2} \quad 4-55$$

Dabei ist U_0 die Spannung, die bei einer Zelltemperatur von $T_{Z,0}^{GGW}$ gemessen wird und U_∞ die bei $T_{Z,\infty}^{GGW}$ gemessene Spannung.

Wird ein Fluss durch die Messzelle gestartet, so wird die zugeführte Flüssigkeit im Wärmetauscher nicht vollständig mit der Wärmesenke equilibriert. Da die Umgebungstemperatur geringer als die Temperatur der Wärmesenke war, gelangt Flüssigkeit mit einer etwas zu niedrigen Temperatur in die Flusszelle. Nach kurzer Zeit erreicht die

Temperatur im Fluss einen Gleichgewichtswert, der von der Gleichgewichtstemperatur ohne Fluss abweicht. Damit wird auch eine konstante Spannung U_0 gemessen, die von den Signalen der Basislinie U_∞ abweicht. Wird der Fluss gestoppt, so kommt es zur Angleichung durch einen Wärmeaustausch mit der Wärmesenke. Dieser Effekt wurde genutzt, um die Zeitkonstanten des Wärmeflusses zu bestimmen und damit eine dynamische Korrektur durchführen zu können.

Es konnte allerdings beobachtet werden, dass beim Stoppen der Pumpe der Fluss im System nicht abrupt stoppt, sondern der Tropfen am Abfallschlauch noch wenige Sekunden weiter wächst. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich in der Fluidik beim Pumpen ein Druck aufbaut, der nach dem Stopp der Pumpe relaxiert. Für die Relaxation des Flusses und damit den Verlauf der eingetragenen (negativen) Wärme wird eine Kinetik erster Ordnung angenommen, was dem Modell aus Abschnitt 4.1.1.3 entspricht. Damit wäre ein Signalverlauf nach Gleichung 4-55 zu erwarten, was durch Anpassen des Modells an die Signalverläufe nach dem Stoppen eines Flusses überprüft werden soll.

Wie bei den Experimenten mit Mitochondrien wurde als Laufmedium vollentsalztes Wasser gewählt, als Probe wurden 150 μl SEM Puffer mit einer Flussrate von 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Es wurden die Daten ausgewertet, die in den ersten 150 Sekunden nach Stoppen des Flusses erhalten wurden. Weitere Datenpunkte wurden nicht mit angefitet, da die Fehlerquadrate sonst zu stark von den Werten beeinflusst werden, in denen fast keine Information über die Kinetik des Prozesses mehr enthalten ist. In Abbildung 4-1 sind die Signalverläufe für acht Wiederholungsmessungen und die dazugehörigen Fits dargestellt, die Fitparameter finden sich in Tabelle 4-1.

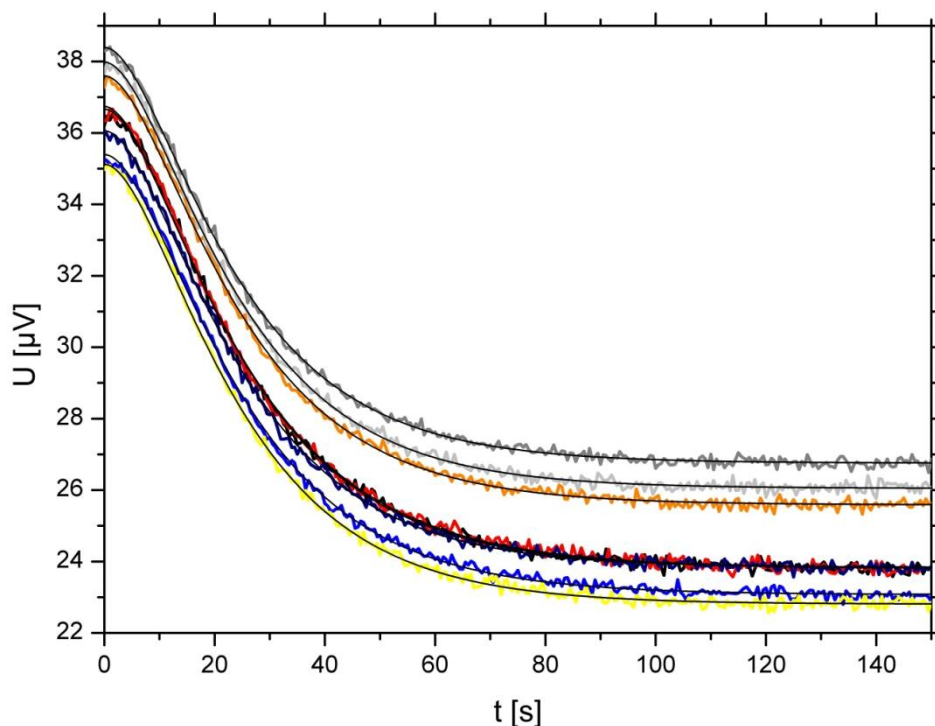


Abbildung 4-1: Signalverläufe nach Stoppen des Flusses und angepasste Kurven nach Gleichung 4-55

Tabelle 4-1: Parameter zu den in Abbildung 4-1 dargestellten Kurvenanpassungen

Messung Nr.	U_{∞} [μV]	$(U_0 - U_{\infty})$ [μV]	τ_1 [s]	τ_2 [s]	Chi ²
1	23,81	12,86	8,23	20,20	0,016
2	23,81	12,93	7,75	20,84	0,016
3	23,07	12,32	8,62	19,42	0,012
4	22,81	12,32	8,49	18,86	0,013
5	23,83	12,22	8,89	18,91	0,011
6	25,59	12,01	8,59	18,82	0,014
7	26,05	11,93	8,52	18,51	0,014
8	26,75	11,64	8,16	18,69	0,011
Durchschnitt	24,47	12,28	8,40	19,28	0,013
Standardabweichung	1,46	0,44	0,35	0,82	

Um die Qualität des Modells besser beurteilen zu können, wurden für jede Anpassung die Residuen als Differenz aus den gemessenen Werten und der angepassten Kurve ermittelt. Diese sind in Abbildung 4-2 für alle Kurven dargestellt.

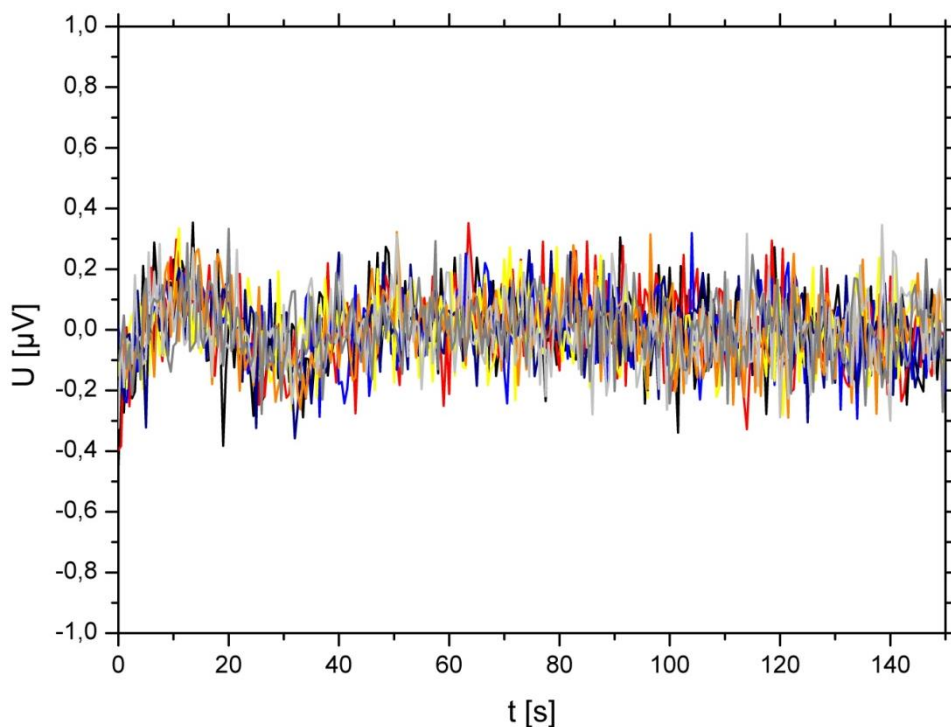


Abbildung 4-2: Residuen zu den in Abbildung 4-1 dargestellten Fits

Es ist zu erkennen, dass es zu leichten, systematischen Abweichungen in den ersten 50 Sekunden nach Stopp des Flusses kommt. Allerdings sind diese Abweichungen relativ klein im Vergleich zum Rauschen. Im Mittel weichen die Kurven an der Stelle der größten Abweichung um etwas mehr als 0,1 μV ab, diese Abweichung ist ca. zwei Größenordnungen kleiner als der gesamte Signalhub. Die Funktion passt sich also gut an die gemessenen Kurven an.

Die Zuordnung der so bestimmten Zeitkonstanten zu den Prozessen des Leistungsabfalls und des Wärmeflusses zwischen Messzelle und Wärmesenke ist nicht unproblematisch. Vertauscht

man die Werte für τ_1 und τ_2 , so werden identische Kurven erhalten. Aus mathematischer Sicht ist die Zuordnung der Parameter zum jeweiligen Prozess also willkürlich. Aufgrund von Beobachtungen des Verhaltens der Fluidik wurde τ_1 der Relaxation des Flusses zugeordnet, da die erhaltene Zeitkonstante gut zu der Zeit passt, die der Tropfen am Ende des Abfallschlauchs sichtbar wächst. In Abschnitt 4.1.4 wird daher die dynamische Korrektur basierend auf τ_2 durchgeführt, um die Kinetik des Wärmeflusses zu eliminieren. Bei der Wahl einer zu großen Zeitkonstante wäre ein Überschießen der Korrektur zu erwarten. Dies wurde allerdings weder bei den dort gezeigten Daten, noch in irgendeiner der späteren Messungen beobachtet. Auch bei anderen Prozessen als dem Stopp des Flusses war nie ein signifikantes Überschießen zu beobachten. Somit ist die korrekte Zuordnung der Zeitkonstanten zu den jeweiligen Prozessen wahrscheinlich.

4.1.2 Dynamische Korrektur der Daten

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass sich der Signalverlauf gut durch den hergeleiteten Zusammenhang für den Temperaturverlauf beschreiben lässt. Für erste Überlegungen soll aber der Einfachheit halber zunächst wieder eine abrupte Änderung der Wärmeleistung angenommen werden, um eine Korrekturfunktion herzuleiten. Diese wird dann später auf die überlagerte Kinetik angewandt.

4.1.2.1 Dynamische Korrektur bei sprunghafter Änderung der Wärmeleistung

In Abschnitt 4.1.1.2 ist die Änderung der Zelltemperatur nach einer abrupten Änderung der Wärmeleistung beschrieben worden, wobei sich die Zelltemperatur nach einem Prozess erster Ordnung an die neue Gleichgewichtstemperatur annähert

$$T_z = (T_z^0 - T_z^{GGW}) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) + T_z^{GGW} \quad 4-56$$

Analog lässt sich dieser Zusammenhang für die Rohdaten der Spannung (U^{roh}) schreiben

$$U^{roh} = (U_0 - U_\infty) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) + U_\infty \quad 4-57$$

Die gemessene Spannung U^{roh} nähert sich also nach einem exponentiellen Zusammenhang an den finalen Wert U_∞ an. Um von dieser Funktion auf einen stufenförmigen Verlauf zu kommen, muss die Funktion an den Stellen extremer Steigung besonders stark korrigiert werden. Hat sich das gemessene Signal allerdings schon fast vollständig an den finalen Wert angenähert, so ist die Steigung gering und nur eine geringe Korrektur nötig. Daher wurde der Ansatz gewählt, die Funktion um ihre Ableitung zu korrigieren. Die Ableitung der gemessenen Wärmeleistung lautet

$$\frac{dU^{roh}}{dt} = -\frac{1}{\tau_2} \cdot (U_0 - U_\infty) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \quad 4-58$$

Multipliziert man diese Gleichung mit τ_2 und addiert sie zu den Rohdaten, so eliminiert man deren zeitabhängigen Summanden. Man erhält eine korrigierte Funktion (U^{korr}), deren Wert überall gleich dem Gleichgewichtswert ist

$$\begin{aligned} U^{korr} &= U^{roh} + \tau_2 \cdot \frac{dU^{roh}}{dt} \\ &= (U_0 - U_\infty) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) + U_\infty + \tau_2 \cdot \left(-\frac{1}{\tau_2} \cdot (U_0 - U_\infty) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)\right) \end{aligned} \quad 4-59$$

also

$$U^{korr} = U_\infty \quad 4-60$$

Die Kinetik des Wärmefflusses wurde für diesen Fall also eliminiert, die korrigierten Werte entsprechen sofort nach dem abrupten Signalabfall dem Gleichgewichtswert. Als nächstes soll diese Korrektur auf die in Abschnitt 4.1.1.3 hergeleitete Temperatur- bzw. Signaländerung angewandt werden.

4.1.2.2 Dynamische Korrektur bei Änderung der Wärmeleistung nach einer Kinetik erster Ordnung

In Abschnitt 4.1.1.3 ist die Temperaturänderung in der Messzelle wie folgt beschrieben worden

$$T_z = T_{z,\infty}^{GGW} + (T_{z,0}^{GGW} - T_{z,\infty}^{GGW}) \cdot \frac{\tau_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) - \tau_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_1 - \tau_2} \quad 4-61$$

Da die Änderung von U^{roh} und T_z proportional sind, lässt sich der Zusammenhang auch wie folgt darstellen

$$U^{roh} = U_\infty + (U_0 - U_\infty) \cdot \frac{\tau_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) - \tau_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_1 - \tau_2} \quad 4-62$$

Es soll nun die in Abschnitt 4.1.2.1 verwendete Korrektur auf diesen Zusammenhang angewandt werden. Dazu wird zunächst die Ableitung gebildet

$$\frac{dU^{roh}}{dt} = (U_0 - U_\infty) \cdot \frac{-\exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_1 - \tau_2} \quad 4-63$$

Anwendung der Korrektur gemäß

$$U^{korr} = U^{roh} + \tau_2 \cdot \frac{dU^{roh}}{dt} \quad 4-64$$

sollte zu dem Spannungsverlauf führen, die dem realen Verlauf der Wärmeleistung \dot{Q}_R folgt. Der Verlauf von \dot{Q}_R war wie folgt angenommen worden

$$\dot{Q}_R = (\dot{Q}_{R,0} - \dot{Q}_{R,\infty}) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + \dot{Q}_{R,\infty} \quad 4-65$$

Analog lässt sich der zu erwartende Verlauf der Spannung formulieren

$$U = (U_0 - U_\infty) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + U_\infty \quad 4-66$$

wobei U hier den Signalverlauf ohne Verzögerung durch den langsamen Wärmefluss darstellt. Es muss nun also überprüft werden, ob folgender Zusammenhang korrekt ist

$$U^{korr} = U \quad 4-67$$

Einsetzen ergibt

$$U_\infty + (U_0 - U_\infty) \cdot \frac{\tau_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) - \tau_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_1 - \tau_2} + (U_0 - U_\infty) \cdot \frac{-\tau_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + \tau_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_1 - \tau_2} = (U_0 - U_\infty) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + U_\infty \quad 4-68$$

Subtrahieren von U_∞ und dividieren durch $(U_0 - U_\infty)$ ergibt

$$\frac{\tau_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) - \tau_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_1 - \tau_2} + \frac{-\tau_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + \tau_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\tau_1 - \tau_2} = \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) \quad 4-69$$

Die Terme in den Zählern, die τ_2 im Exponenten enthalten, heben sich gegenseitig auf

$$\frac{\tau_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)}{\tau_1 - \tau_2} + \frac{-\tau_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)}{\tau_1 - \tau_2} = \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) \quad 4-70$$

Ausklammern von $\left(\exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)\right)$ ergibt

$$\frac{\tau_1 - \tau_2}{\tau_1 - \tau_2} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) = \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) \quad 4-71$$

bzw.

$$\exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) = \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) \quad (\text{Q.E.D.}) \quad 4-72$$

Wie in Abschnitt 4.1.3 dargelegt wird, ist zusätzlich zur dynamischen Korrektur die Glättung der korrigierten Daten nötig. Daher wird an dieser Stelle auf die Anwendung des dynamischen Korrekturverfahrens auf reale Daten verzichtet und erst in Abschnitt 4.1.4 gezeigt.

4.1.3 Glättung der Daten

Bei der Anwendung des in Abschnitt 4.1.2.2 hat sich herausgestellt, dass es zu einer massiven Verstärkung des Rauschens kommt. Bei der Differentiation berechnet das Programm Origin die Steigung zu einem Datenpunkt als den Mittelwert der Steigungen zwischen diesem Punkt und den benachbarten Punkten. Da zur Bestimmung der Steigung die Differenz der Spannungswerte durch das Zeitintervall geteilt wird, wird bei einem recht kleinen Zeitintervall von 0,5 Sekunden das Rauschen amplifiziert, was auch durch die Mittelwertbildung nicht vollständig kompensiert werden kann. Dahingegen spielen sich die Veränderungen der Wärmeleistung im Bereich von Minuten ab, die Steigung wird hier also Werte annehmen, die deutlich geringer sind als der Signalhub ($U_0 - U_\infty$). Es kommt also zu einer drastischen Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Bei der Korrektur nach Gleichung 4-64 muss die Ableitung zusätzlich mit dem Faktor 19,28 s multipliziert werden, was zu einer massiven Verstärkung des Rauschens führt. Es ist also nötig, die Daten nach der Korrektur zu glätten. Nach der Korrektur ist allerdings mit einem besonders abrupten Signalabfall beim Stopp des Flusses zu rechnen.

Bei der Anwendung von einfachen Korrekturverfahren wie dem gleitenden Durchschnitt oder Savitzky-Golay-Verfahren [39], bei denen an ein definiertes Datenintervall um den zu glättenden Punkt ein Polynom verschiedener Ordnung angepasst wird und der geglättete Wert aus der angepassten Kurve abgelesen wird, kommt es zu charakteristischen Abweichungen von dem zu erwartenden Signalverlauf. Eine sprunghafte Signaländerung kann nicht nachvollzogen werden.

Spline-Interpolation ist ein Verfahren, bei dem Datenpunkte durch Polynome interpoliert werden, wobei für jedes Intervall ein neues Polynom angepasst wird. Es wird meist mit kubischen Funktionen gearbeitet. Die Randbedingungen für die Polynome lauten, dass sie durch die Datenpunkte laufen müssen und mit den benachbarten Polynomen verbunden eine zweifach stetig differenzierbare Funktion bilden müssen. Splineglättung hingegen ist ein Verfahren, bei dem kubische Splines genutzt werden, die allerdings nicht durch jeden Datenpunkt laufen müssen [40]. Die Splines werden so angepasst, dass einerseits die Fehlerquadrate und andererseits die Krümmung der Funktion minimiert werden, wobei durch einen Faktor eine Gewichtung dieser Parameter erreicht wird. Je stärker die Krümmung gewichtet wird, desto stärker wird die Kurve geglättet. Allerdings hat sich gezeigt, dass bei ausreichend starker Glättung die Sprungstelle mit anschließendem Signalabfall nicht zufriedenstellend nachgebildet werden kann.

Die Glättung durch Fourier-Filter ist eine weitere Möglichkeit [41]. Dabei wird die Fourier-Transformierte des Datensatzes gebildet, wobei das Rauschen in den hochfrequenten Anteilen enthalten ist. Diese Anteile werden abgeschnitten und es wird rücktransformiert. Allerdings hat sich herausgestellt, dass die hochfrequenten Anteile nötig sind, um die abrupte Signaländerung zu beschreiben, sodass es auch hier zu Artefakten kommt.

Gesucht ist also eine Glättungsmethode, die es ermöglicht, Daten vor oder nach einer Sprungstelle zu glätten, ohne dass die Werte auf der anderen Seite der plötzlichen Änderung einen starken Einfluss auf die Glättung haben. Es wurde eine Funktion gefunden, die sich ähnlich wie im Savitzky-Golay-Verfahren abschnittsweise anpassen lässt, allerdings kaum Artefakte bei Sprungstellen produziert.

$$y = -\frac{a}{b} \cdot \ln(1 + e^{-b \cdot (x-c)}) + d \cdot (x - c) + e \quad 4-73$$

Diese Funktion wurde durch Integration und weiteren Umformungen aus einer Logistikkfunktion abgeleitet. Sie besitzt zwei Asymptoten mit den Steigungen a und d, die sich an

der Stelle c und dem y -Wert e schneiden. Die Krümmung in der Nähe des Schnittpunkts kann durch den Parameter b eingestellt werden.

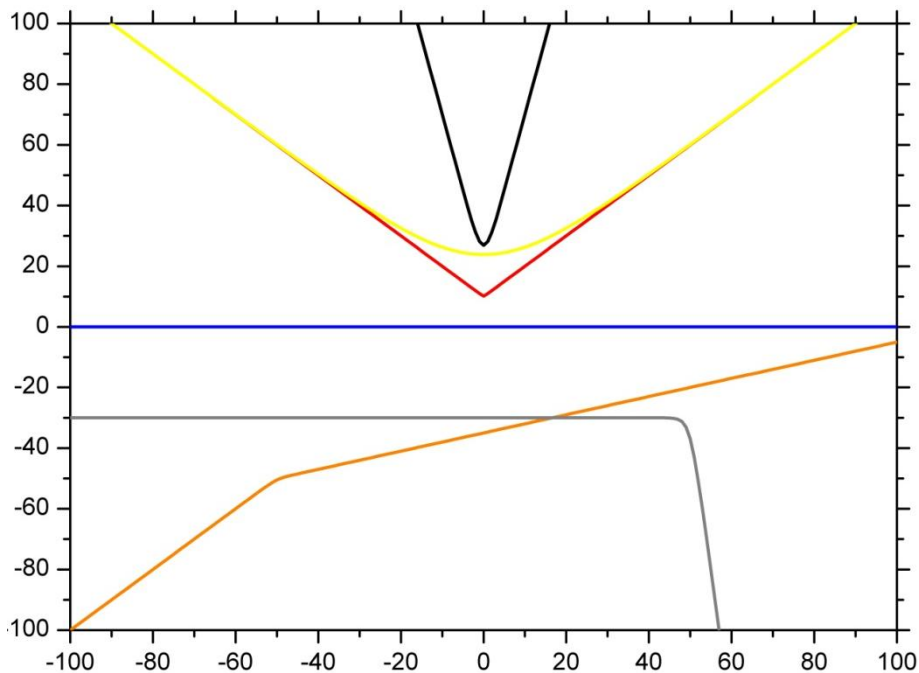


Abbildung 4-3: Beispiele für Gleichung 4-73 mit verschiedenen Parametern. Die Steigungen der Asymptoten, deren Schnittpunkt und die Krümmung um den Schnittpunkt sind frei wählbar

Mit Hilfe von Herrn Dr. Leidner wurde ein Programm in Matlab geschrieben, das das Polynom im Savitzky-Golay-Verfahren durch Gleichung 4-73 ersetzt. Die Anpassung der Funktion an die Intervalle läuft nach dem Levenberg-Marquardt-Verfahren mit maximal 100.000 Funktionsevaluierungen und maximal 100.000 Iterationen. Für die Parameter wurden keine Grenzen gesetzt. Da diese Funktion bei schlecht initialisierten Parametern schnell Gefahr läuft, in lokale Minima zu laufen, wurden die Parameter wie für jeden Datenpunkt wie folgt neu initialisiert:

- Die Parameter c und e entsprechen den x - und y -Koordinaten des zu glättenden Punktes
- Für die Parameter a und d werden die Steigungen zwischen dem zu glättenden Punkt und den Punkten an den beiden Grenzen des Intervalls eingesetzt
- die Krümmung um den Schnittpunkt erwies sich als unempfindlich und b wurde mit dem Wert 1 initialisiert

Bei der Benutzung des Verfahrens ist zu beachten, dass die Funktion Wendepunkte nicht nachvollziehen kann. Ist die Krümmung auf einer Seite des Wendepunkts allerdings gering, so lässt sich dieser Bereich hinreichend gut durch eine der beiden Asymptoten approximieren und das Verfahren liefert gute Werte. Das Verfahren der dynamischen Korrektur und Glättung wird im folgenden Abschnitt auf reale Datensätze angewandt.

In Abbildung 4-4 wurden verschiedene Glättungsverfahren mit Origin 7 auf simulierte Daten ohne Rauschen angewendet. Es ist zu erkennen, dass eine Sprungstelle innerhalb des Glättungsintervalls zu charakteristischen Artefakten führt. Beim Savitzky-Golay-Verfahren ist zu

beachten, dass bei der Glättung über Polynome hoher Ordnung die Artefakte zwar geringer werden, diese Funktion allerdings auch die Daten schwächer glättet, da besonders bei kleinen Intervallen das Rauschen durch diese Polynome relativ gut nachvollzogen werden kann. Bei dem neu entwickelten Verfahren ist die Abweichung von den simulierten Daten am geringsten. Das Glättungsverfahren wird im folgenden Abschnitt auf reale Daten angewendet.

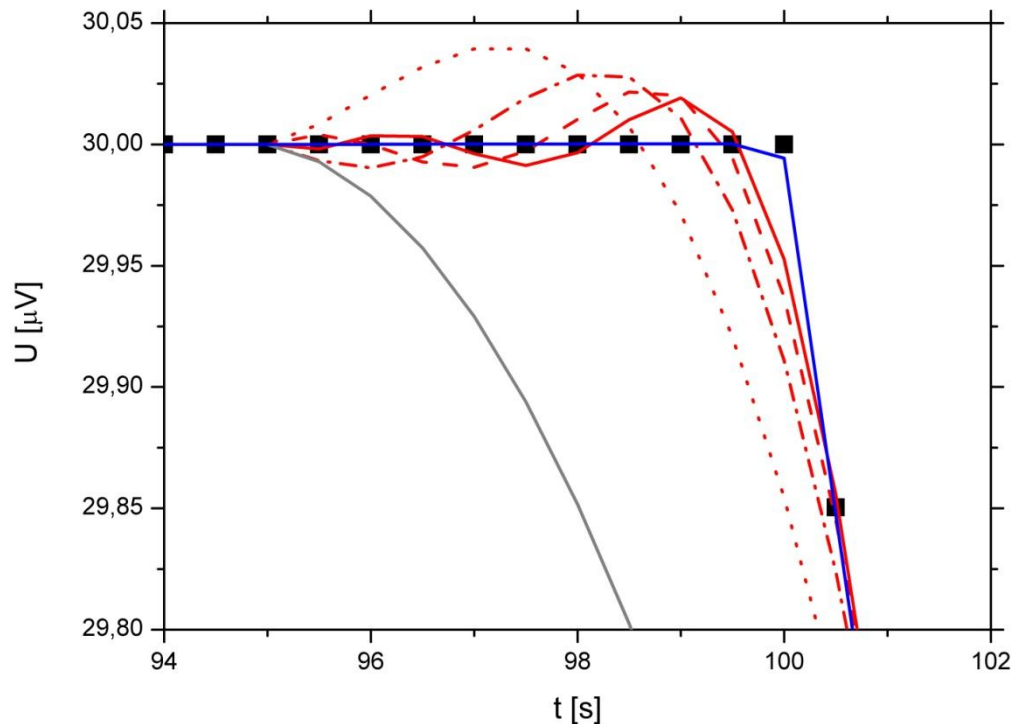


Abbildung 4-4: Behandlung simulierter Daten mit verschiedenen Glättungsfunktionen. Geklättet wurde mit einem symmetrischen Intervall von 21 Punkten. Schwarz: Simulierte Daten ohne Rauschen; Grau: gleitender Durchschnitt; Rot, gepunktet: Savitzky-Golay 2. Ordnung; Rot, Strich-Punkt: Savitzky-Golay 4. Ordnung; Rot, gestrichelt: Savitzky-Golay 6. Ordnung; Rot, durchgezogen: Savitzky-Golay 8. Ordnung; Blau: zuvor vorgestelltes Glättungsverfahren.

Eine Alternative zu dem hier vorgestellten Verfahren wäre, die Signale auf Sprungstellen zu analysieren und dann eine abschnittsweise Glättung zwischen diesen Sprungstellen mittels Splineglättung durchzuführen. Allerdings wäre ein solcher Ansatz deutlich schwerer umzusetzen gewesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Ansatz daher nicht verfolgt.

4.1.4 Anwendung der dynamischen Korrektur und Glättung auf reale Datensätze

Um zu untersuchen, inwieweit die dynamische Korrektur und die Datenglättung sinnvolle Ergebnisse für reale Daten liefern, wurden beide Verfahren auf eine Messung der Stoffwechselaktivität von Mitochondrien angewandt und mit dem Kurvenverlauf nach Gleichung 4-66 verglichen. Um die fehlenden Parameter zu erhalten, wurde eine Kurvenanpassung nach Gleichung 4-55 wie bei der dynamischen Kalibrierung vorgenommen, wobei allerdings der Parameter τ_2 mit 19,28 s festgesetzt wurde. In Abbildung 4-5 ist dies für Mitochondrien aus Wildtyp Hefen gezeigt, die mit Galactose als Kohlenstoffquelle kultiviert wurden. Die

Mitochondrien wurden 1:400 verdünnt, als Substrat diente NADH unter den üblichen Reaktionsbedingungen.

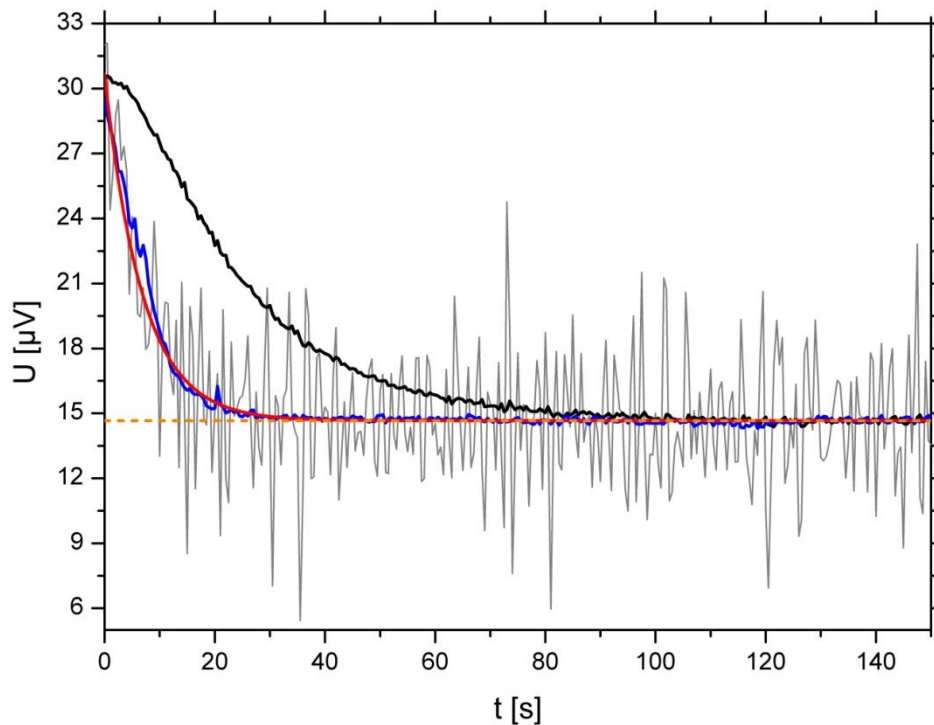


Abbildung 4-5: Messung von Mitochondrien aus einem Wildtyp Stamm, kultiviert mit Galactose als Energiequelle. Schwarz: Rohdaten; Grau: Dynamisch korrigierte Daten ohne Glättung; Blau: Dynamisch korrigierte und geglättete Daten; Rot: Abklingende Funktion nach einer Kinetik erster Ordnung mit der für diese Rohdaten bestimmten Zeitkonstante τ_1

Es ist zu erkennen, dass im Falle der korrigierten Daten der Gleichgewichtswert sehr viel schneller erreicht wird, als bei den Rohdaten. Im Falle der korrigierten Daten ist dies nach ca. 30 Sekunden der Fall, wohingegen bei den Rohdaten nach 100 s noch größere Abweichungen bestehen. Kurz nach Stopp der Injektion kommt es allerdings zu leichten Abweichungen zwischen der korrigierten und der simulierten Kurve. Aufgrund der großen Steigung in diesem Bereich ist die Kurve empfindlich gegenüber leichten Schwankungen in den Zeitkonstanten. Nichtsdestotrotz lässt sich mithilfe des Korrekturverfahrens sehr viel schneller ein Gleichgewichtswert ablesen, was eine drastische Verkürzung der Messzeiten möglich macht. Außerdem führt bei einer Integration der Kurven die Kinetik des Wärmeflusses nicht zu Artefakten. Da es sich bei der Kinetik, die der Relaxation des Flusses zugrundeliegt, um einen realen, thermischen Effekt handelt, ist es nicht sinnvoll, diesen zusätzlich zu eliminieren, um den Gleichgewichtswert noch schneller zu erhalten, auch wenn dies mathematisch möglich wäre.

4.2 Messungen mit Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Für die im Folgenden diskutierten Messungen mit Mitochondrien wurden zunächst Referenzmessungen durchgeführt, um die Abhängigkeit des Signals von der Konzentration der Mitochondrien und verschiedene Kenngrößen des etablierten Tests zu ermitteln. Es folgen Messungen mit Mitochondrien aus einem Wildtyp Stamm, die unter unterschiedlichen Kulturbedingungen produziert wurden. Als nächstes wird der Metabolismus verschiedener Substrate durch Mitochondrien aus dem Wildtyp Stamm diskutiert. Diese Messungen dienen als Grundlage, um den Einfluss zweier Mutationen auf verschiedene Stoffwechselwege zu untersuchen.

4.2.1 Bestimmung von Kenngrößen des Testverfahrens

Die Messungen der Stoffwechselleistung von Mitochondrien wurden in dieser Arbeit wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben durchgeführt, wobei Daten ähnlich denen in Abbildung 3-5 erhalten wurden. Bei höheren Mitochondrienkonzentrationen wurden höhere Signalintensitäten zu Beginn der Messung erhalten. Allerdings bricht die Stoffwechselleistung nach einer gewissen Zeit ein, wobei dieser Effekt schneller auftritt, wenn eine hohe Stoffwechselleistung gemessen wird. Als Ursache für diesen Effekt ist entweder der Verbrauch des Substrats oder des Sauerstoffs denkbar. Bei Vorversuchen, bei denen die Mitochondrien entgegen des später üblichen Protokolls mit allen Komponenten (incl. Substrat) unter Sauerstoffzufuhr inkubiert und in regelmäßigen Abständen Proben aus dem Ansatz entnommen wurden, wurden ca. eine Stunde lang ähnliche Signalintensitäten gemessen, bevor diese langsam abnahmen. Bei Stoffwechselraten in dieser Größenordnung brechen die Signale in der Messzelle (also ohne Sauerstoffzufuhr) im Normalfall aber bereits nach wenigen Minuten ein. Der Grund für den Signalabfall ist also nicht der Verbrauch des Substrats, sondern ist auf den Verbrauch des Sauerstoffs zurückzuführen.

Um den Verbrauch des Sauerstoffs als Grund für den Signalabfall zu verifizieren, wäre es interessant gewesen, die Probe mit Sauerstoff anzureichern. Allerdings weisen die Schläuche eine hohe Permeabilität für Sauerstoff auf, so dass es nicht möglich war, definierte Reaktionsbedingungen zu erzeugen. Daher wurden die Experimente nicht durchgeführt.

4.2.1.1 Abhängigkeit der Signalintensität von der Mitochondrienkonzentration

Wichtig für die weiteren Arbeiten ist der Zusammenhang zwischen der eingesetzten Menge an Mitochondrien und der Signalintensität. Dazu wurden definierte Verdünnungen der Mitochondrien-Präparation mit SEM Puffer hergestellt, mit DNP versetzt, 30 min inkubiert und dann mit Succinat versetzt. Exakt eine Minute nach Zugabe der Succinat Lösung erfolgte der Start der Messung. In Abbildung 4-6 sind die Signalverläufe nach der Injektion dargestellt. Auffällig ist, dass bei hohen Konzentrationen die Signalintensitäten nur noch schwach ansteigen, die Kurve allerdings eine immer größere Steigung aufweist. Die Auswertung erfolgte durch Anpassen von Ausgleichsgeraden an die Werte zwischen $t = 540$ s (eine Minute nach Ende der Injektion) und $t = 640$ s.

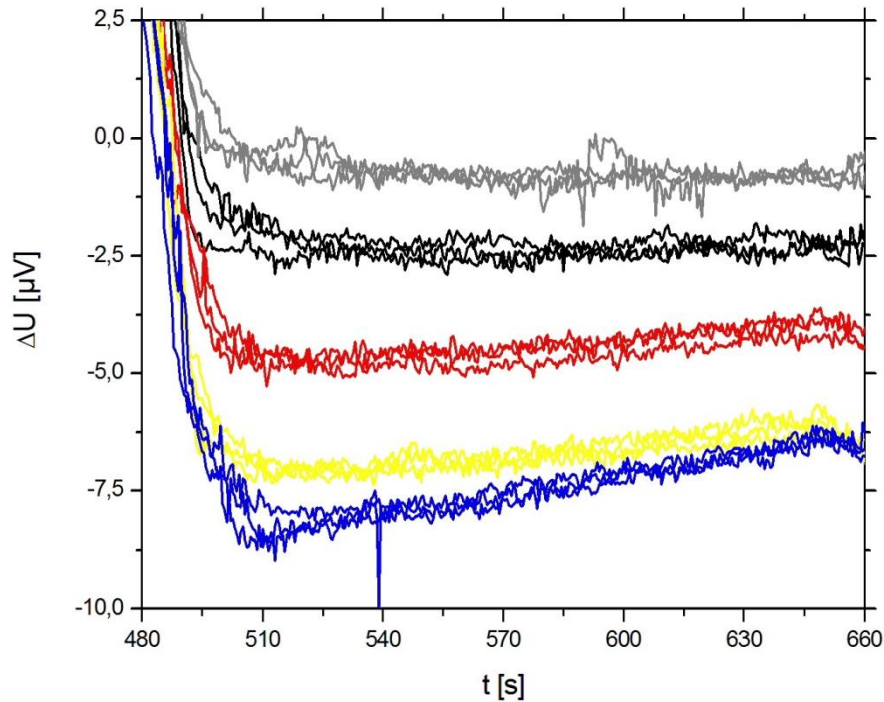


Abbildung 4-6: Abhängigkeit der Signalintensität von der eingesetzten Menge an Mitochondrien nach dynamischer Korrektur, Glättung und Basislinienkorrektur. Verwendet wurden Wildtyp Mitochondrien, die in Lactat-Medium produziert wurden. Grau: keine Mitochondrien zugesetzt; Schwarz: Verdünnung der Mitochondrien-Präparation 1:400; Rot: Verdünnung der Mitochondrien-Präparation 2:400; Gelb: Verdünnung der Mitochondrien-Präparation 3:400; Blau: Verdünnung der Mitochondrien-Präparation 4:400

In Abbildung 4-7 sind die Werte der Ausgleichsgeraden zum Zeitpunkt $t = 540$ s gegen die Mitochondrienkonzentration relativ zur unverdünnten Präparation aufgetragen. Auch hier ist zu erkennen, dass bei hohen Konzentrationen die Signalintensität nur noch leicht ansteigt. Ein möglicher Grund dafür ist, dass bei hohen Stoffwechselraten so viele Protonen gepumpt werden, dass die Konzentration an DNP nicht ausreicht, um den sich aufbauenden Gradienten vollständig kurzzuschließen. Es baut sich daher mit der Zeit ein immer stärkerer Potentialgradient auf. Da die Redox-Kaskade der Atmungskette an das Pumpen der Protonen gekoppelt ist, führt dieser Effekt zu einer Verlangsamung der Reaktion und somit zu einer abnehmenden Wärmeleistung.

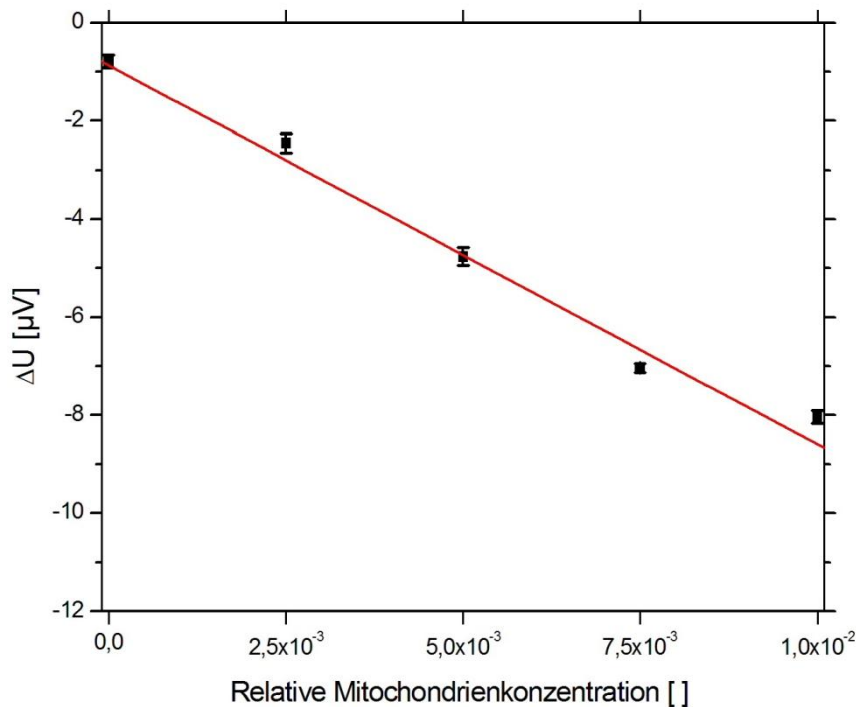


Abbildung 4-7: Werte der Ausgleichsgeraden, die an die Kurven in Abbildung 4-6 angepasst wurden, zum Zeitpunkt $t = 540$ s. Fehlerbalken: Standardabweichung des Mittelwerts aus drei Messungen; Rot: Ausgleichsgerade. Die Standardabweichung der Kurvenanpassung beträgt $3,52 \mu V$

Zum Zeitpunkt der Zugabe der Succinat Lösung kann sich ein solcher Protonengradient noch nicht aufgebaut haben. Daher wurde versucht, die Ausgleichsgerade auf den Zeitpunkt der Substratzugabe zu extrapolieren. Die dazugehörigen Werte sind in Abbildung 4-8 gegen die relative Mitochondrienkonzentration aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass der lineare Zusammenhang zwischen der eingesetzten Konzentration und den erhaltenen Signalen bei auch bei hohen Konzentrationen besser erfüllt wird. Allerdings machen sich beim Extrapolieren bereits geringe Abweichungen in der Steigung der Ausgleichsgeraden bemerkbar, sodass die Standardabweichungen der Mittelwerte hier größer sind als ohne Extrapolation. Nichtsdestotrotz verringert sich die Standardabweichung der Kurvenanpassung von $3,52 \mu V$ auf $1,05 \mu V$.

In dieser Messreihe wurden für geringere Konzentrationen höhere Standardabweichungen des Mittelwerts gefunden. Erfahrungsgemäß schwanken die Standardabweichungen allerdings eher zufällig und unabhängig von der Konzentration. Schwer zu kontrollierende Faktoren wie z.B. durch Schwankungen der Klimaanlage verursachte, unregelmäßige Drifts der Basislinie, oder die Tendenz der Mitochondrien zur Aggregation sind mögliche Gründe für diese Abweichungen.

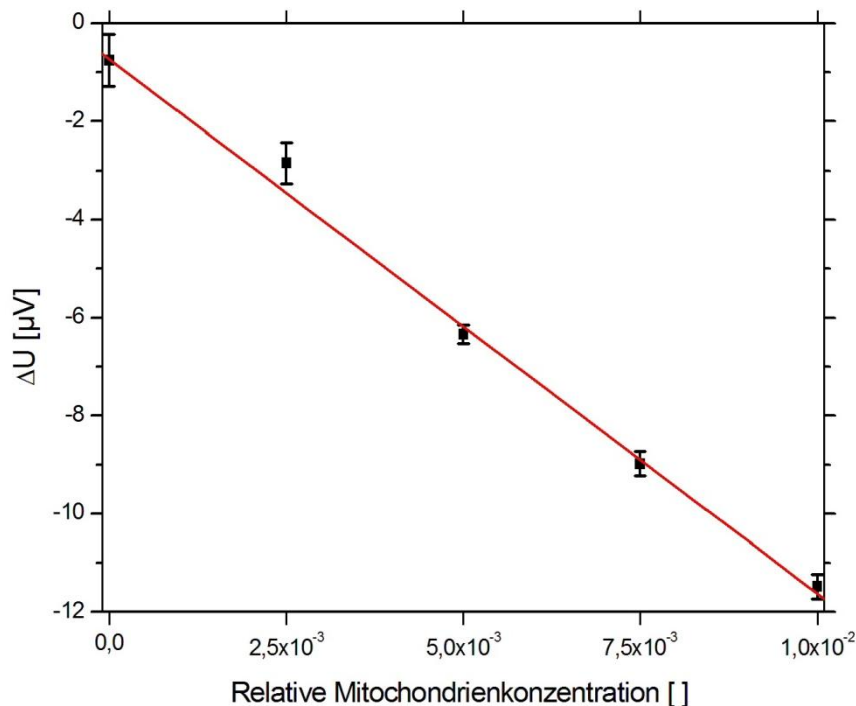


Abbildung 4-8: Werte der Ausgleichsgeraden, die an die Kurven in Abbildung 4-6 angepasst wurden, extrapoliert auf den Zeitpunkt $t = 300$ s. Dieser Zeitpunkt entspricht exakt dem Zeitpunkt der Zugabe von Succinat. Fehlerbalken: Standardabweichung des Mittelwerts aus drei Messungen; Rot: Ausgleichsgerade. Die Standardabweichung der Kurvenanpassung beträgt hier $1,05 \mu V$

Generell wurden bei Leermessungen leicht exotherme Signale von ca. $-0,5$ bis $-1 \mu V$ gegenüber der Baseline vor der Messung erhalten. Dieses Verhalten wurde auch bei der Injektion von anderen Puffern beobachtet, nicht jedoch bei der Injektion von vollentsalztem Wasser. Zu Zeiten, in denen die Basislinie aufgenommen wird, ist die Messzelle mit dem Laufmedium (vollentsalztes Wasser) gefüllt. Denkbar ist ein konstanter Wärmefluss von der Umgebung über die Messzelle in die Wärmesenke, wobei Änderungen in der Wärmeleitfähigkeit des Puffers für einen veränderten Wärmefluss verantwortlich sind. Für einen solchen Wärmefluss spricht, dass die Signale beispielsweise bei Sonneneinfall in exotherme Richtung driften. Der Grund für den Effekt konnte allerdings nicht abschließend bestimmt werden. Da allerdings die Fluidik beim Einsatz von Puffern als Laufmedium eine erhöhte Tendenz zu verstopfen zeigte, wurde dieser Effekt in Kauf genommen.

Als Alternative zu den hier durchgeführten Leermessungen wäre es möglich, den Stoffwechsel der Mitochondrien durch Inhibitoren zu unterbinden und damit die Leermessungen durchzuführen. Allerdings ist es denkbar, dass sich beispielsweise bei der Inhibition von Komplex IV durch Cyanid die Elektronen aus der Reduktion der Substrate in der Atmungskette anstauen, da sie nicht mehr auf Sauerstoff übertragen werden können. Dadurch könnten an anderen Enzymen, an denen Substrate reduziert werden sollen, Rückreaktionen stattfinden. Auch für andere Inhibitoren sind ähnliche Reaktionen denkbar. Daher wurde hier auf diese Messungen verzichtet.

4.2.1.2 Bestimmung der einzusetzenden Mitochondrienkonzentration

Für aussagekräftige Ergebnisse ist es wichtig, die Mitochondrienkonzentration in einem gewissen Bereich zu wählen. Bei zu hohen Konzentrationen kann es passieren, dass der Sauerstoff bereits verbraucht ist, bevor die eigentliche Messung erfolgt. Vor dem Eintreten des Effekts, der auf den Verbrauch des Sauerstoffs zurückgeführt wird (vergl. den mit 5 markierten Abschnitt in Abbildung 3-5), sollte ein Bereich erkennbar sein, in dem das Enzymsystem in der Sättigung arbeitet, also konstante Werte oder, wie zuvor diskutiert, Werte mit einer geringen Steigung erhalten werden.

Außerdem müssen die Signalintensitäten groß genug sein, um sich ausreichend stark vom Hintergrund abzuheben. In der Analytik werden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (limit of detection, LOD und limit of quantification, LOQ) bestimmt, um die minimale Konzentration des zu detektierenden Stoffes anzugeben, die enthalten sein muss, um mit einer gewissen Sicherheit dessen Anwesenheit nachzuweisen bzw. diesen Stoff quantifizieren zu können [42, 43]. Eine häufig verwendete Definition besagt, dass dies der Fall ist, wenn das Signal um mindestens die dreifache (LOD) bzw. zehnfache (LOQ) Standardabweichung größer ist als das Signal einer Leermessung. Diese Definition soll genutzt werden, um die minimal einzusetzende Mitochondrienkonzentration zu bestimmen. Drei Möglichkeiten sollen hier kurz diskutiert werden:

1. Die Basislinie vor der Messung als Leermessung aufzufassen und die Standardabweichung des Mittelwerts dieser Werte zu verwenden. Dadurch erhält man Informationen darüber, welche Signale sich genügend von der Basislinie abheben, um als detektierbar bzw. quantifizierbar zu gelten.
2. Durch die Basislinien Ausgleichsgeraden zu legen und die Standardabweichung von deren Werten zu einem bestimmten Zeitpunkt zu betrachten. Bei einer perfekten Basislinienkorrektur würde man keine Abweichungen erhalten. Man erhält also eine Aussage über die Qualität der Basislinienkorrektur und deren Einfluss auf die Messwerte.
3. Tatsächliche Leermessungen durchzuführen, wie in den in Abbildung 4-6 dargestellten Messungen ohne Zugabe von Mitochondrien. Man erhält so die beste Aussage über die Konzentration, die benötigt wird, um deutlich von einer Leermessung abweichende Werte zu erhalten. Störende Einflüsse der Matrix werden dabei erfasst. Wie bereits diskutiert, können die Werte allerdings selbst innerhalb eines Messtages von stark schwankenden Störungen überlagert sein, sodass sehr viele Messungen nötig sind, um aussagekräftige Werte für die Standardabweichung zu erhalten.

Zur Anwendung des ersten Verfahrens wurde die Standardabweichung des Mittelwerts der Werte in den ersten 200 Sekunden der drei Leermessungen bestimmt, insgesamt wurden also 400 Werte pro Messung verwendet. Bei den Werten nach diesem Zeitpunkt wurde die Probenschleife befüllt, sodass das Rauschen stärker wurde. Daher wurden diese Werte nicht verwendet. Die Standardabweichungen und die zum Erreichen der LOD und LOQ benötigten Signale sind in Tabelle 4-2 aufgelistet, die Basislinien sind in Abbildung 4-9 gezeigt.

Tabelle 4-2: Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach dem ersten Verfahren. Anstelle von Mitochondrienkonzentrationen wurden benötigte Signalintensitäten angegeben. Die Mitochondrienkonzentration muss so gewählt werden, dass die Signale diese Werte überschreiten

	Standardabweichung [μV]	Benötigtes Signal, um LOD zu erreichen [μV]	Benötigtes Signal, um LOQ zu erreichen [μV]
Messung 1	0,11	-0,33	-1,1
Messung 2	0,12	-0,36	-1,2
Messung 3	0,13	-0,39	-1,3
Mittelwert	0,12	-0,36	-1,2

Gemäß der zweiten Methode wurde an die ersten 200 Sekunden der Basislinien aus denselben Messungen Ausgleichsgeraden angepasst. Danach wurde auf den Wert der Geraden bei 300 Sekunden extrapoliert, was dem Zeitpunkt entspricht, zu dem das Substrat zugegeben wurde. Die Standardabweichung des Mittelwerts dieser drei Werte beträgt $0,05 \mu\text{V}$, damit ist in diesem Fall die Nachweisgrenze erreicht, wenn die Signale Werte kleiner als $-0,15 \mu\text{V}$ annehmen. Die Bestimmungsgrenze wird bei Werten unterhalb von $-0,5 \mu\text{V}$ erreicht.

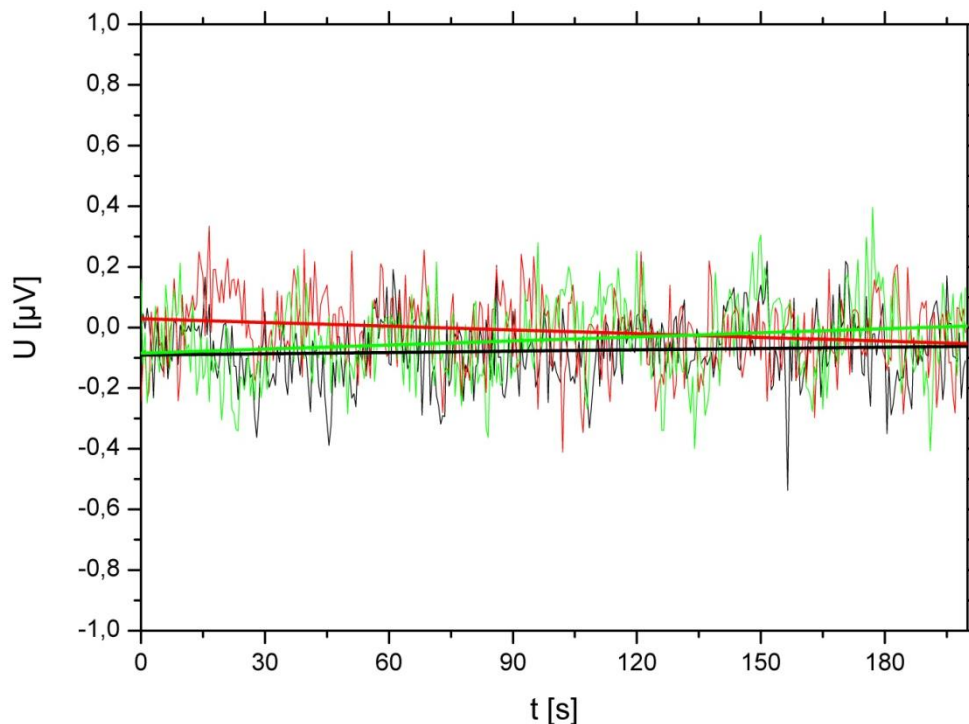


Abbildung 4-9: Basislinien von den in Abbildung 4-6 dargestellten Leermessungen mit Ausgleichsgeraden in entsprechender Farbe. Diese Werte wurden für die Bestimmung der minimal einzusetzenden Mitochondrienkonzentration nach den ersten beiden Verfahren genutzt

Die nach dem dritten Verfahren benötigte Standardabweichung des Mittelwerts aus den Leermessungen sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst. Die Auswertung wurde wie in den Abbildung 4-7 und Abbildung 4-8 vorgenommen. Hier sind nun die Werte bekannt, um die die Werte der Leermessungen von der Basislinie abweichen. Die benötigten Signalintensitäten zum Erreichen von Nachweis- und Bestimmungsgrenze ergeben sich aus der Differenz dieses Wertes und der dreifachen bzw. zehnfachen Standardabweichung des Mittelwerts.

Tabelle 4-3: Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach dem dritten Verfahren

	Mittelwert [μV]	Standard- abweichung [μV]	Benötigtes Signal, um LOD zu erreichen [μV]	Benötigtes Signal, um LOQ zu erreichen [μV]
Wert der Ausgleichgeraden bei $t = 540$ s	-0,79	0,13	-1,18	-2,09
Wert der Ausgleichsgeraden bei $t = 300$ s	-0,76	0,53	-2,35	-6,06

Bei der Auswertung über Extrapolation der Werte werden zwar deutlich höhere Signalintensitäten benötigt, allerdings ist die Steigung der Kalibriergeraden in diesem Fall auch größer. Desweiteren sind die systematischen Abweichungen bei der Auswertung ohne Extrapolation bei hohen Stoffwechselraten besonders groß, sodass die Auswertung über die Extrapolation vorgezogen wurde. Für die Bestimmung von LOD und LOQ wurden nur drei Messungen herangezogen. Bei einer größeren Anzahl wäre eine geringere Standardabweichung und damit bessere Werte für LOD und LOQ zu erwarten gewesen. Allerdings wurden aufgrund des hohen Aufwands bei den Messungen mit Mitochondrien auch dort nur Dreifachmessungen durchgeführt, weshalb auch hier auf eine größere Anzahl an Messungen verzichtet wurde.

Da jedes Substrat mit einer unterschiedlichen Rate metabolisiert wird, die Oxidation jedes Substrats einen unterschiedlichen Enthalpieanteil besitzt, die Aktivität der Atmungskette je nach Kulturbedingungen der Hefen unterschiedlich reguliert ist und Mutationen zu weiteren Veränderungen führen können, ist die minimal zu verwendende Konzentration für jeden Test unterschiedlich. Daher wurden hier benötigte Signalintensitäten angegeben, die durch Einstellen der Mitochondrienkonzentration zu erreichen sind. Aufgrund des aufwändig zu präparierenden Probenmaterials war es allerdings nicht immer möglich, ausreichend hohe Mitochondrienkonzentrationen zum Überschreiten der Bestimmungsgrenze einzusetzen.

4.2.2 Einfluss der Kulturbedingungen auf die Stoffwechselaktivität

Wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, passt *S. cerevisiae* je nach verfügbarer Energiequelle seinen Energiestoffwechsel an. In Anwesenheit einer vergärbaren Kohlenstoffquelle wie Glucose findet fast ausschließlich alkoholische Gärung statt, die im Cytosol abläuft, wohingegen die Atmung fast vollständig unterdrückt wird. Steht den Zellen allerdings nur eine nicht fermentierbare Kohlenstoffquelle wie beispielsweise Lactat zur Verfügung, so muss die Atmung aktiviert werden. Galactose ist zwar fermentierbar, allerdings nicht so effizient wie Glucose, sodass die Zellen trotzdem auf die Atmung angewiesen sind, um genügend ATP zu gewinnen.

Diese Regulation konnte anhand von Wildtyp Mitochondrien, die aus Kulturen mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen präpariert wurden, gezeigt werden. Die Mitochondrien aus Lactat-Kultur stammen aus einer anderen Präparation als die für die Konzentrationsmessungen verwendeten. In Tabelle 4-4 sind die Signale dargestellt, die mit derselben Mitochondrienkonzentration erhalten wurden. Dabei wurden die Mitochondrien aus Lactat-Kultur um den Faktor 100 verdünnt eingesetzt und die anderen Proben entsprechend der Ergebnisse des Bradfordtests so verdünnt, dass dieselbe Proteinkonzentration eingesetzt wurde.

Tabelle 4-4: Werte der Messungen des Stoffwechsels von Succinat durch Wildtyp Mitochondrien, die aus Kulturen mit unterschiedlichen Energiequellen präpariert wurden. Auswertung über Extrapolation der Ausgleichgeraden auf $t = 300 \text{ s}$

Kulturmedium	Signalintensitäten extrapoliert auf $t = 300 \text{ s}$ [μV]		
	Galactose	Lactat	Glucose
Messung 1	-4,63	-5,84	-0,56
Messung 2	-4,54	-5,91	-0,12
Messung 3	-4,35	-5,33	-1,01
Mittelwert	-4,51	-5,69	-0,56
Standardabweichung	0,14	0,80	0,45

Die für Mitochondrien aus glucosehaltigem Medium erhaltenen Signale sind erwartungsgemäß sehr klein und sind sogar im Mittel kleiner als die der Leermessung aus Abschnitt 4.2.1.2. Hier konnte also keinerlei Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden. Die Stoffwechselraten der Mitochondrien aus galactosehaltigem Medium sind im Mittel 21 % geringer als die aus lactathaltigem Medium.

Zu beachten ist allerdings, dass diese Werte allesamt unterhalb der in Tabelle 4-3 angegebenen Grenzen für die Quantifizierbarkeit liegen. Auch hier schwanken die Werte der Standardabweichung deutlich, wobei diesmal die größte Standardabweichung für hohe Signalintensitäten beobachtet wurde. Die Werte sind damit kritisch zu betrachten, auch wenn der Trend in die zu erwartende Richtung zeigt. Der Einsatz einer höheren Mitochondrienkonzentration hätte zwar zu Stoffwechselraten geführt, die ausreichend große Signale erwarten lassen. Bei deutlich höheren Konzentrationen ist der Verbrauch an Sauerstoff allerdings auch deutlich höher, sodass die Reaktion deutlich früher zum Erliegen gekommen und damit nicht mehr messbar gewesen wäre.

Eine größere Anzahl an Messungen wäre hilfreich, um bessere Ergebnisse zu erhalten. Der hohe Materialaufwand stand dem entgegen.

4.2.3 Einfluss des Substrats auf die Stoffwechselraten von Wildtyp Mitochondrien

Um zu untersuchen, ob die Mutationen einen Einfluss auf die Stoffwechselraten verschiedener Substrate haben, ist es nötig, unter denselben Reaktionsbedingungen Vergleichswerte mit Wildtyp Mitochondrien zu bestimmen. Dazu wurden die Mitochondrien, die aus einer Kultur mit Galactose als Energiequelle präpariert wurden, nach dem zuvor verwendeten Protokoll mit verschiedenen Substraten versetzt und die Stoffwechselaktivität für 30 min im gestoppten Fluss verfolgt.

Verwendet wurden NADH, sowie D- und L-Lactat als direkte Substrate der Atmungskette, Succinat und Citrat als Intermediate des Citratzyklus, wobei Succinat auch als direktes Substrat der Atmungskette aufgefasst werden kann, sowie Pyruvat, das über den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex und die Citratsynthase in den Citratzyklus eingespeist werden kann.

Die Mitochondrienkonzentration wurde dabei so angepasst, dass die Signalintensitäten im Mittel größer als $-4 \mu\text{V}$ waren. Auf höhere Mitochondrienkonzentrationen zum überschreiten der LOQ wurde verzichtet, da wie bereits erwähnt sonst die Reproduzierbarkeit aufgrund von Aggregation der Mitochondrien leidet. Über den in Abschnitt 4.2.1.1 gezeigten, linearen Zusammenhang wurden die Signalintensitäten korrigiert. In Tabelle 4-5 sind die Werte aufgelistet.

Tabelle 4-5: Werte der Messungen des Stoffwechsels verschiedener Substrate durch Wildtyp Mitochondrien, die aus einer Kultur mit Galactose als Energiequelle präpariert wurden. Es wurde dieselbe Mitochondrienprobe wie in Abschnitt 4.2.2 verwendet. Auswertung über Extrapolation der Ausgleichgeraden auf $t = 300$ s. Bei den korrigierten Signalintensitäten wurde durch den Faktor dividiert, um den sich die Mitochondrienkonzentration von der in den Succinatmessungen unterscheidet (Verdünnung in Klammern)

	Signalintensitäten extrapoliert auf $t = 300$ s [μ V]	Signalintensitäten korrigiert um Verdünnungsfaktor [μ V]
Succinat (1:100)		
Messung 1	-4,63	-4,63
Messung 2	-3,74	-3,74
Messung 3	-4,29	-4,29
Mittelwert	-4,22	-4,22
Standardabweichung	0,45	
NADH (1:400)		
Messung 1	-9,86	-39,46
Messung 2	-10,42	-41,68
Messung 3	-9,59	-38,34
Mittelwert	-9,96	-39,83
Standardabweichung	0,42	
Citrat (1:50)		
Messung 1	-4,29	-2,15
Messung 2	-4,45	-2,23
Messung 3	-4,02	-2,01
Mittelwert	-4,26	-2,13
Standardabweichung	0,22	
D-Lactat (1:25)		
Messung 1	-4,99	-1,25
Messung 2	-4,55	-1,13
Messung 3	-4,74	-1,19
Mittelwert	-4,75	-1,19
Standardabweichung	0,23	
L-Lactat (1:25)		
Messung 1	-4,35	-1,09
Messung 2	-4,24	-1,06
Messung 3	-4,44	-1,11
Mittelwert	-4,34	-1,09
Standardabweichung	0,10	
Pyruvat (1:25)		
Messung 1	-6,17	-1,54
Messung 2	-5,07	-1,27
Messung 3	-4,35	-1,09
Mittelwert	-5,20	-1,30
Standardabweichung	0,92	

Es ist zu erkennen, dass sich die Signalintensitäten bei unterschiedlichen Substraten sehr deutlich unterscheiden. Im Fall von Pyruvat nehmen die Signalintensitäten kontinuierlich ab. Die Proben der drei Messungen stammen aus demselben Aliquot, das zwischen den Messungen auf Eis gelagert wurde. Obwohl wie üblich die Probe für jede Messung frisch aus diesem Aliquot angesetzt wurde, trat dieses Verhalten nur bei Pyruvat auf und konnte auch mit anderen

Mitochondrienpräparationen beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung ist der Verbrauch von Oxalacetat, ohne welches das Pyruvat nicht in den Citratzyklus eingespeist werden kann. Denkbar ist auch die zunehmende Inaktivierung eines Enzyms im Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex oder der Citratsynthase.

Jede Reaktion besitzt eine unterschiedliche Reaktionsenthalpie, die Wärmeleistung ist dazu proportional. Die generierte Wärmemenge ist durch Integration der Signale über den Reaktionsverlauf zugänglich. Die Werte für die integrierten Signalintensitäten und die freigesetzten Wärmemengen sind in Tabelle 4-6 aufgelistet.

Tabelle 4-6: Bestimmung der freigesetzten Wärmemengen. Bei den Messungen mit Pyruvat verlief die Reaktion allerdings innerhalb der Messdauer nicht vollständig

	Integrierte Signalintensitäten [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Freigesetzte Wärmemenge [μJ]
Succinat (1:100)		
Messung 1	-3594	-691
Messung 2	-3605	-693
Messung 3	-3590	-690
Mittelwert	-3597	-692
Standardabweichung	8	
NADH (1:400)		
Messung 1	-5665	-1089
Messung 2	-5273	-1014
Messung 3	-4894	-941
Mittelwert	-5277	-1015
Standardabweichung	385	
Citrat (1:50)		
Messung 1	-4036	-776
Messung 2	-3664	-705
Messung 3	-3705	-712
Mittelwert	-3802	-731
Standardabweichung	204	
D-Lactat (1:25)		
Messung 1	-5276	-1015
Messung 2	-4813	-926
Messung 3	-4985	-959
Mittelwert	-5025	-966
Standardabweichung	234	
L-Lactat (1:25)		
Messung 1	-4602	-885
Messung 2	-4624	-889
Messung 3	-4735	-911
Mittelwert	-4654	-895
Standardabweichung	71	
Pyruvat (1:25)		
Messung 1	-5971	-1148
Messung 2	-6376	-1226
Messung 3	-6143	-1181
Mittelwert	-6164	-1185
Standardabweichung	203	

Bei der Integration muss allerdings die Zeit ab der Zugabe des Substrats berücksichtigt werden. Bei den in Tabelle 4-6 angegebenen Werten wurden dazu die Integrale von $t = 600$ s bis zum Ende der Messung aus den Signalverläufen, sowie von $t = 300$ s bis $t = 600$ s aus den Ausgleichsgeraden bestimmt und addiert. Dividieren durch den Faktor 5,2 V/W ergibt die freigesetzten Wärmemengen (vergl. Abschnitt 3.2.1.1).

Wie zuvor gezeigt, ist die Menge an Sauerstoff limitierend. Bei der Bestimmung der Integrale muss also davon ausgegangen werden, dass zu Beginn der Reaktion dieselbe Menge an Sauerstoff in der Probe gelöst war. Durch leichtes Schütteln bei geöffnetem Reaktionsgefäß und konstanter Temperatur während der 30-minütigen Inkubation mit DNP sollten Konzentrationsunterschiede minimiert werden. Es wurde auf Messungen zurückgegriffen, in denen keine offensichtlichen Störungen über den gesamten Verlauf der Reaktion auftraten, es handelt sich daher nicht zwangsläufig um dieselben Messungen wie in Tabelle 4-5.

Welche Reaktionsschritte bei all diesen Substraten genau beobachtet werden, ist unklar. Daher ist auch eine Korrelation mit publizierten Enthalpiewerten nicht sinnvoll. So ist im Fall der Oxidation von Succinat zu Fumarat denkbar, dass weitere Reaktionsschritte des Citratzyklus durchlaufen werden. Allerdings könnte diese Reaktion auch so schnell den verfügbaren Sauerstoff verbrauchen, dass weitere Reaktionsschritte nur in geringem Umfang zum Tragen kommen. Gleiches gilt für Citrat und Pyruvat. Auch bei NADH ist nicht klar, ob weitere Reaktionen eine Rolle spielen. So könnten selbst nach Verbrauch des Sauerstoffs für eine gewisse Zeit Elektronen von NADH auf andere Substrate übertragen werden. Eine Möglichkeit stellt dabei die Reduktion von Fumarat zu Succinat dar, was die Rückreaktion dieses Schrittes im Citratzyklus darstellen würde. Die in Tabelle 2-1 aufgelisteten freien Enthalpien für die Oxidation verschiedener Substrate legen diese Vermutung nahe.

4.2.4 Einfluss der Mutationen auf die Stoffwechselraten

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die in Abschnitt 3.1.3 vorgestellten Mutationen auf die Stoffwechselaktivität der Mitochondrien haben, wurden die in Tabelle 4-5 gezeigten Messungen mit Mitochondrien aus den Mutanten M1 und M2 wiederholt. Die Messwerte sind in den Tabellen Tabelle 4-7 und Tabelle 4-8 dargestellt und in Tabelle 4-9 mit den Werten aus den Messungen mit Wildtyp Mitochondrien verglichen.

Besonders auffällig sind die sehr viel höheren Stoffwechselraten bei den Mutanten im Fall von Succinat, wohingegen Citrat durch diese langsamer verstoffwechselt wird. Auch bei L-Lactat sowie Pyruvat sind deutliche Unterschiede zu beobachten, wobei die Stoffwechselraten insgesamt recht gering sind. Dadurch mussten vergleichsweise hohe Konzentrationen an Mitochondrien eingesetzt werden, wodurch die Messwerte an Zuverlässigkeit einbüßen, da diese gerade dann eine erhöhte Tendenz zu aggregieren aufweisen. Daher sind auch die deutlich ähnlicheren Stoffwechselraten von D-Lactat kritisch zu betrachten. Im Fall von NADH fallen die Unterschiede in den Stoffwechselraten vergleichsweise gering aus.

Insgesamt ist kein Trend zu beobachten, der für alle Substrate in dieselbe Richtung zeigt. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich nicht um reine Verdünnungseffekte handelt, sondern dass die unterschiedlichen Präparationen tatsächlich ein unterschiedliches Profil hinsichtlich der Stoffwechselaktivitäten besitzen. Einschränkend muss allerdings gesagt werden, dass nicht abschließend geklärt werden konnte, ob die veränderten Aktivitäten auf die Mutationen zurückzuführen sind, oder mit Unterschieden in den Kulturbedingungen zusammenhängen. So ist es beispielsweise denkbar, dass bei zunehmendem Verbrauch der

Galactose die Zellen stärker auf Atmung angewiesen sind. Der Einfluss der Kulturbedingungen wurde in Abschnitt 4.2.2 an einem drastischen Beispiel verdeutlicht. Um die Ergebnisse zu untermauern, wären zusätzliche Messungen mit Mitochondrien nötig, die aus anderen Kulturen, aber unter vergleichbaren Bedingungen, gewonnen wurden. Trotzdem sollen im Folgenden mögliche Hypothesen diskutiert werden.

Tabelle 4-7: Werte der Messungen des Stoffwechsels verschiedener Substrate durch M1 Mitochondrien, die aus einer Kultur mit Galactose als Energiequelle präpariert wurden. Auswertung über Extrapolation der Ausgleichgeraden auf $t = 300$ s. Bei den korrigierten Signalintensitäten wurde durch den Faktor dividiert, um den sich die Mitochondrienkonzentration von der in den Succinatmessungen in Abschnitt 4.2.3 unterscheidet (Verdünnung in Klammern)

	Signalintensitäten extrapoliert auf $t = 300$ s [μ V]	Signalintensitäten korrigiert um Verdünnungsfaktor [μ V]
Succinat (1:400)		
Messung 1	-3,74	-14,96
Messung 2	-3,99	-15,96
Messung 3	-3,84	-15,35
Mittelwert	-3,86	-15,42
Standardabweichung	0,13	
NADH (1:400)		
Messung 1	-8,51	-34,04
Messung 2	-7,32	-29,28
Messung 3	-7,53	-30,12
Mittelwert	-7,79	-31,15
Standardabweichung	0,64	
Citrat (1:50)		
Messung 1	-3,50	-1,75
Messung 2	-2,06	-1,03
Messung 3	-1,64	-0,82
Mittelwert	-2,40	-1,20
Standardabweichung	0,98	
D-Lactat (1:25)		
Messung 1	-4,71	-1,18
Messung 2	-5,10	-1,27
Messung 3	-4,71	-1,18
Mittelwert	-4,84	-1,21
Standardabweichung	0,22	
L-Lactat (1:25)		
Messung 1	-2,67	-0,67
Messung 2	-2,35	-0,59
Messung 3	-2,38	-0,60
Mittelwert	-2,47	-0,62
Standardabweichung	0,18	
Pyruvat (1:25)		
Messung 1	-3,31	-0,83
Messung 2	-1,64	-0,41
Messung 3	-2,66	-0,66
Mittelwert	-2,54	-0,63
Standardabweichung	0,84	

Tabelle 4-8: Werte der Messungen des Stoffwechsels verschiedener Substrate durch M2 Mitochondrien, die aus einer Kultur mit Galactose als Energiequelle präpariert wurden. Auswertung über Extrapolation der Ausgleichgeraden auf $t = 300$ s. Bei den korrigierten Signalintensitäten wurde durch den Faktor dividiert, um den sich die Mitochondrienkonzentration von der in den Succinatmessungen in Abschnitt 4.2.3 unterscheidet (Verdünnung in Klammern)

	Signalintensitäten extrapoliert auf $t = 300$ s [μ V]	Signalintensitäten korrigiert um Verdünnungsfaktor [μ V]
Succinat (1:200)		
Messung 1	-4,83	-9,65
Messung 2	-5,40	-10,79
Messung 3	-5,32	-10,63
Mittelwert	-5,11	-10,22
Standardabweichung	0,40	
NADH (1:400)		
Messung 1	-8,51	-34,05
Messung 2	-9,01	-36,03
Messung 3	-9,38	-37,54
Mittelwert	-8,97	-35,87
Standardabweichung	0,44	
Citrat (1:50)		
Messung 1	-1,32	-0,66
Messung 2	-0,98	-0,49
Messung 3	-1,31	-0,66
Mittelwert	-1,21	-0,60
Standardabweichung	0,19	
D-Lactat (1:25)		
Messung 1	-3,70	-0,92
Messung 2	-3,44	-0,86
Messung 3	-3,45	-0,86
Mittelwert	-3,53	-0,88
Standardabweichung	0,15	
L-Lactat (1:25)		
Messung 1	-3,66	-0,92
Messung 2	-3,26	-0,81
Messung 3	-3,10	-0,78
Mittelwert	-3,34	-0,84
Standardabweichung	0,29	
Pyruvat (1:25)		
Messung 1	-3,82	-0,96
Messung 2	-3,90	-0,97
Messung 3	-3,49	-0,87
Mittelwert	-3,74	-0,93
Standardabweichung	0,21	

Tabelle 4-9: Übersicht über die in den Tabellen Tabelle 4 5, Tabelle 4 7 und Tabelle 4 8 dargestellten, mittleren Signale

Substrat	Mittlere Signalintensitäten extrapoliert auf t = 300 s und korrigiert um Verdünnungsfaktor [μV]		
	Wildtyp	M1	M2
Succinat	-4,22	-15,42	-10,22
NADH	-39,83	-31,15	-35,87
Citrat	-2,13	-1,20	-0,60
D-Lactat	-1,19	-1,21	-0,88
L-Lactat	-1,09	-0,62	-0,84
Pyruvat	-1,30	-0,63	-0,93

Sowohl Citrat als auch Succinat sind Intermediate im Citratzyklus, allerdings speist Citrat die Elektronen über die matrixständige NADH-Dehydrogenase in die Atmungskette ein, wohingegen Succinat direkt am Komplex II oxidiert wird (vergl. Abschnitt 2.2.2.3). Eine Veränderung der Lipidzusammensetzung in der Membran könnte beispielsweise zu veränderten Enzymaktivitäten führen. Ebenso ist es möglich, dass der Import von Substraten durch die Mutationen verändert wird. Dies könnte wiederum verschiedene Ursachen haben, wie zum Beispiel Veränderungen beim Proteinimport, oder die zuvor diskutierten Veränderungen in der Lipidzusammensetzung. Eine Störung des Proteinimports könnte natürlich auch direkt die Konzentration der Enzyme beeinflussen. Auch direkte Regulierung der Enzyme oder Transportsysteme für Substrate durch die Produkte der mutierten Gene ist denkbar.

Desweiteren sind auch präparative Artefakte nicht auszuschließen. So kann beispielsweise wie zuvor erwähnt durch Scherkräfte die Membran geschädigt werden, wodurch eine erhöhte Permeabilität für die Substrate erreicht würde. Gegen diesen Effekts spricht allerdings, dass Succinat und Citrat einen unterschiedlichen Trend aufweisen, obwohl beide bei erhöhter Permeabilität schneller verstoffwechselt werden müssten.

5 Zusammenfassung

Ziel der hier vorgestellten Arbeiten war die Etablierung eines kalorimetrischen Verfahrens zur zeitaufgelösten Untersuchung von mikrobiellen Stoffwechselaktivitäten. Als Modellsystem wurde auf Mitochondrien aus Hefezellen zurückgegriffen und der Einfluss von Kulturbedingungen, der Art des zu verstoffwechselnden Substrats, sowie zweier Mutationen auf die Stoffwechselaktivitäten untersucht. Es wurden starke Einflüsse aller dieser Parameter gefunden, wobei Messungen mit Mitochondrien aus anderen Chargen nötig wären, um die Daten zu validieren und störende Einflüsse der Präparation auszuschließen.

Die Signaländerungen wurden dabei als proportional zur Wärmeleistung angenommen. Allerdings wurde gefunden, dass dies erst im Gleichgewicht gilt und dass die Signale erst mit einer gewissen Verzögerung auf die veränderten Wärmeleistungen reagieren. Der Grund dafür ist, dass die an der Thermosäule generierte Spannung proportional zur Temperaturdifferenz zwischen der Messzelle und der Wärmesenke ist. Erst wenn der Wärmefluss zwischen Wärmesenke und Messzelle dem Betrag nach gleich der Wärmeleistung in der Messzelle ist, kann man auch die Wärmeleistung und die Spannung als proportional ansehen. Um Messwerte zu erhalten, die nicht von der Kinetik des Wärmeflusses überlagert sind, wurde ein Modell zur Separation der Kinetiken etabliert und an die Daten angepasst. Mit Hilfe der separierten Zeitkonstanten konnte ein Korrekturverfahren etabliert werden, das es erlaubt, thermische Prozesse mit einer deutlich höheren, zeitlichen Auflösung zu beobachten.

Bei den Messungen mit Mitochondrien stellte das schwierig zu handhabende Probenmaterial, sowie die Störanfälligkeit des Geräts bezüglich äußerer Einflüsse eine große Herausforderung dar. So zeigten die Mitochondriensuspensionen je nach Präparation eine unterschiedlich starke Tendenz zu Aggregation. Gerade bei schwachen Verdünnungen kam es so zu schlecht reproduzierbaren Ergebnissen. Aufgrund der Empfindlichkeit der Mitochondrienmembranen gegenüber Scherkräften mussten die Enden der Pipettenspitzen stets abgeschnitten werden, um eine größere Öffnung zu erhalten, sowie die Flussraten bei der Injektionen der Proben gering gehalten werden. Beides ist jedoch nicht optimal hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Außerdem führten Temperaturänderungen in der Umgebung zu deutlichen Schwankungen in der Basislinie. Beispielsweise arbeitete die Klimaanlage oft nicht konstant genug. Vor allem wenn Türen in den Nachbarräumen geöffnet oder geschlossen wurden, veränderte sich die Leistung der Klimaanlage. Allerdings wurden auch Schwankungen beobachtet, für die bisher kein Grund gefunden werden konnte. Eine Möglichkeit zur Lösung dieses Problems wäre die Platzierung des Kalorimeters in einer Klimakammer. Allerdings wurde darauf verzichtet, da für das manuelle Befüllen der Probenschleife die Tür geöffnet werden müsste. Dies hätte sicher noch größere Schwankungen zur Folge gehabt. Eine Anordnung, bei der das Gerät in einer Klimakammer steht, die Probenschleife sich allerdings außerhalb befindet, könnte in Zukunft zu einer Verbesserung der Reproduzierbarkeit führen. Allerdings können auch hier Probleme durch das Ein- und Ausschalten der Heiz- oder Kühlelemente auftreten.

Auch wenn es nicht immer möglich war, die Vorgaben hinsichtlich der LOQ zu erreichen, so hat das Gerät doch das Potential, wertvolle Informationen über Stoffwechselreaktion von Mikroorganismen zu liefern. Einerseits sind für die Messung weder eine Markierung, noch die Kopplung an eine Oberfläche nötig, sodass die Reaktion in homogener Phase beobachtet werden

kann. Andererseits wurde durch die dynamische Korrektur ermöglicht, dass auch deutlich schnellere Prozesse zeitaufgelöst verfolgt werden können. Insbesondere bei der Untersuchung von Enzymreaktionen und Stoffwechselfvorgängen von Mikroorganismen kann das Gerät einen interessanten Beitrag leisten. So kann es bei der Suche nach Enzyminhibitoren oder in Entwicklung neuer Antibiotika hilfreich sein.

6 Abkürzungen

A	Freie Energie / Fläche
a	Transportkoeffizient
a_i	Aktivität
C	Wärmekapazität
c	Molare Wärmekapazität
C_V	Wärmekapazität im isochoren Fall
c_V	Molare Wärmekapazität im isochoren Fall
C_p	Wärmekapazität im isobaren Fall
c_p	Molare Wärmekapazität im isobaren Fall
DNP	2,4-Dinitrophenol
Δ	Operator zur Differentiation nach der Reaktionslaufzahl
E	Elektrodenpotential
E^0	Standard Elektrodenpotential
e	Elementarladung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
$[E]$	Konzentration des freien Enzyms
$[E_0]$	Gesamt-Enzymkonzentration
$[ES]$	Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ε	Energieniveau
ε_F	Fermienergie
$\bar{\varepsilon}$	Mittlere, kinetische Energie der Elektronen
F	Faraday-Konstante
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid, oxidiert
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduziert
f_i	Aktivitätskoeffizient
$f(\varepsilon)$	Fermi-Diracsche Verteilungsfunktion
G	Freie Enthalpie
$\Delta G^{0\ddagger}$	Freie Standard-Aktivierungsenthalpie
Γ	Zu transportierende Größe
$\bar{\Gamma}$	Transportgröße pro Teilchen
H	Enthalpie
$\Delta_B H$	Bildungsenthalpie

$\Delta_B H^\ominus$	Standardbildungsenthalpie
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
J_T	Fluss der Transportgröße
K	Gleichgewichtskonstante
k	Ratenkonstante der Reaktion
KOH	Kaliumhydroxid
k_{cat}	Wechselzahl
K_M	Michaelis-Konstante
LOD	Nachweisgrenze (engl. limit of detection)
LOQ	Bestimmungsgrenze (engl. limit of quantification)
λ	Wärmeleitkoeffizient
λ_M	Mittlere, freie Weglänge
M1, M2	Bezeichnung für untersuchte Mutationen
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
μ	Chemische Potential
μ_i^0	Chemisches Potential eines beliebigen Standardzustands
μ_i^*	Chemisches Potential in der reinen Phase
μ_i^{id}	Chemisches Potential idealer Mischungen
$\tilde{\mu}_i$	Elektrochemisches Potential
n	Stoffmenge
NADH	β -Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert
NAD ⁺	β -Nicotinamidadenindinukleotid, oxidiert
N_A	Avogadrosche Konstante
1N	Teilchenzahldichte
ν_i	Stöchiometrischer Faktor
p	Druck
[P]	Produktkonzentration
PEEK	Polyetheretherketon
PTFE	Polytetrafluorethylen
Q	Wärmemenge
q	Molare Wärmemenge
Q_S	Seebeck-Koeffizient
\dot{Q}	Wärmeleistung
\dot{Q}_R	Wärmeleistung einer Reaktion
$\dot{Q}_{R,0}$	Wärmeleistung zu Beginn einer Reaktion

$\dot{Q}_{R,\infty}$	Wärmeleistung am Ende einer Reaktion
\dot{Q}_{ZS}	Wärmefluss zwischen Messzelle und Wärmesenke
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
[S]	Substratkonzentration
SEM-Puffer	Puffer mit Saccharose, EDTA und MOPS
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>t</i>	Zeit
<i>T</i>	Temperatur
T_Z	Temperatur der Messzelle
T_S	Temperatur Wärmesenke
T_Z^0	Temperatur in der Messzelle zu Beginn der Reaktion
T_Z^{GGW}	Gleichgewichtstemperatur in der Messzelle, auf die T_Z zustrebt
$T_{Z,0}^{GGW}$	Gleichgewichtstemperatur in der Messzelle zu Beginn der Reaktion, auf die T_Z zustrebt
$T_{Z,\infty}^{GGW}$	Gleichgewichtstemperatur in der Messzelle am Ende der Reaktion
τ_i	Zeitkonstanten
τ_1	Zeitkonstante der Reaktion
τ_2	Zeitkonstante des Wärmeflusses
<i>U</i>	Spannung / innere Energie
U_T	Thermospannung
U^{korr}	Dynamisch korrigiertes Signal
U^{roh}	Gemessenes Signal ohne dynamische Korrektur
<i>V</i>	Volumen
<i>v</i>	Geschwindigkeit der Konzentrationsänderung
v_n	Geschwindigkeit einer Reaktion bezogen auf die Stoffmengen
v_{max}	Maximale Geschwindigkeit bei Enzymreaktionen
\bar{v}	Mittlere Geschwindigkeit der Teilchen
<i>W</i>	Arbeit
W_{vol}	Volumenarbeit
<i>x</i>	Reaktionsvariable
x_i	Molenbruch
ξ	Reaktionslaufzahl
z_i	Anzahl der an einer Reaktion beteiligten Elektronen

7 Literaturverzeichnis

1. F. Perocchi, E. Mancera, and L.M. Steinmetz, *Systematic screens for human disease genes, from yeast to human and back*. Mol. BioSyst., 2008. **4** p. 18-29.
2. F. Foury and M. Kucej, *Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans?* Curr. Opin. Chem. Biol., 2002. **6** p. 106-111.
3. A. Barrientos, *Yeast Models of Human Mitochondrial Diseases*. IUBMB Life, 2003. **55** p. 83-95.
4. G. Wedler, *Lehrbuch der physikalischen Chemie*. Vol. 5. 2004: Wiley-VCH.
5. D. Meschede, *Gerthsen Physik*. Vol. 21. 2002: Springer-Verlag.
6. R. Pelster, R. Pieper, and I. Hüttl, *Thermospannungen – viel genutzt und fast immer falsch erklärt!* Physik und Didaktik in Schule und Hochschule, 2005. **1**(4): p. 10-22.
7. H. Feldmann, *Yeast molecular biology - a short compendium on basic features and novel aspects*. 2007 [Zitiert am 01.04.2012]:
http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biology_2007/
8. A.J.S. Klar, *The yeast mating-type switching mechanism: A memoir*. Genetics, 2010. **186** p. 443-449.
9. A.M. Distler, J. Kerner, and C.L. Hoppel, *Proteomics of mitochondrial inner and outer membranes*. Proteomics, 2008. **8** p. 4066-4082.
10. W. Visser, et al., *Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in Saccharomyces cerevisiae*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1995. **67** p. 243-53.
11. J.C. Thrash, et al., *Phylogenomic evidence for a common ancestor of mitochondria and the SAR11 clade*. Sci. Rep., 2011. **1** p. 13, 9 pp.
12. J.D. Palmer, *Genome evolution: The mitochondrion that time forgot*. Nature (London), 1997. **387** p. 454-455.
13. R. Lill, et al., *The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins*. Biol. Chem., 1999. **380** p. 1157-1166.
14. M. van der Laan, M. Rissler, P. Rehling, *Mitochondrial preprotein translocases as dynamic molecular machines*. FEMS Yeast Res., 2006. **6** p. 849-861.
15. D. Rapaport, *Special section on "Protein translocation across or insertion into membranes"*. Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes, 2011. **1808**(3): p. 840.
16. V. Hewitt, F. Alcock, and T. Lithgow, *Minor modifications and major adaptations: The evolution of molecular machines driving mitochondrial protein import*. Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes, 2011. **1808**(3): p. 947-954.
17. T. Endo, K. Yamano, and S. Kawano, *Structural insight into the mitochondrial protein import system*. Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes, 2011. **1808**(3): p. 955-970.
18. J. Dukanovic, D. Rapaport, *Multiple pathways in the integration of proteins into the mitochondrial outer membrane*. Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes, 2011. **1808**(3): p. 971-980.
19. J. Riemer, M. Fischer, and J.M. Herrmann, *Oxidation-driven protein import into mitochondria: Insights and blind spots*. Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes, 2011. **1808**(3): p. 981-989.
20. M. Marom, A. Azem, and D. Mokranjac, *Understanding the molecular mechanism of protein translocation across the mitochondrial inner membrane: Still a long way to go*. Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes, 2011. **1808**(3): p. 990-1001.
21. N. Gebert, et al., *Mitochondrial protein import machineries and lipids: A functional connection*. Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes, 2011. **1808**(3): p. 1002-1011.
22. O. Yogev, O. Pines, *Dual targeting of mitochondrial proteins: Mechanism, regulation and function*. Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes, 2011. **1808**(3): p. 1012-1020.
23. C. Meisinger, et al., *The morphology proteins Mdm12/Mmm1 function in the major β -barrel assembly pathway of mitochondria*. EMBO J., 2007. **26** p. 2229-2239.

24. J.G. Wideman, et al., *Roles of the Mdm10, Tom7, Mdm12, and Mmm1 proteins in the assembly of mitochondrial outer membrane proteins in Neurospora crassa*. Mol. Biol. Cell, 2010. **21** p. 1725-1736.
25. S. Kutik, et al., *Dissecting membrane insertion of mitochondrial β -barrel proteins*. Cell (Cambridge, MA, U. S.), 2008. **132** p. 1011-1024.
26. R.J. Trumbly, *Glucose repression in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol, 1992. **6** p. 15-21.
27. G. Michal (Editor), *Biochemical Pathways*. 1999: Spektrum.
28. F. Vedel, et al., *The mitochondrial respiratory chain and ATP synthase complexes: composition, structure and mutational studies*. Plant Physiol. Biochem. (Paris), 1999. **37** p. 629-643.
29. Y. Yang, et al., *Reaction Mechanism of Single Subunit NADH-Ubiquinone Oxidoreductase (Ndi1) from Saccharomyces cerevisiae: Evidence for a ternary complex mechanism*. J. Biol. Chem., 2011. **286** p. 9287-9297.
30. D. Metzler, *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells, Second Edition*. 2003: Academic Press. 1056 pp.
31. D.F. Wilson, M. Erecinska, and P.L. Dutton, *Thermodynamic relationships in mitochondrial oxidative phosphorylation*. Annu Rev Biophys Bioeng, 1974. **3** p. 203-30.
32. G. Daum, P.C. Boehni, and G. Schatz, *Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria*. J. Biol. Chem., 1982. **257** p. 13028-33.
33. J. Lerchner, T. Maskow, and G. Wolf, *Chip calorimetry and its use for biochemical and cell biological investigations*. Chem.Eng.Process., 2008. **47**(6): p. 991-999.
34. J. Lerchner, et al., *Miniaturized calorimetry - A new method for real-time biofilm activity analysis*. J.Microbiol.Methods, 2008. **74**(2-3): p. 74-81.
35. J. Lerchner, et al., *Direct monitoring of biochemical processes using micro-structured heat power detectors*. Chem.Eng.J.(Amsterdam, Neth.), 2004. **101**(1-3): p. 187-194.
36. J. Lerchner, et al., *Nano-calorimetry of small-sized biological samples*. Thermochem.Acta, 2008. **477**(1-2): p. 48-53.
37. J. Lerchner, et al., *A new micro-fluid chip calorimeter for biochemical applications*. Thermochem.Acta, 2006. **445**(2): p. 144-150.
38. J. Lerchner, et al., *Chip calorimeters for the investigation of liquid phase reactions: Design rules*. Thermochem.Acta, 2006. **446**(1-2): p. 168-175.
39. A. Savitzky, M.J.E. Golay, *Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures*. Anal.Chem.36(8), 1627 (1964), 1964.
40. C.H. Reinsch, *Glaettung von Messungen mit kubischen Splinefunktionen*. Num.Math.10, 177 (1967), 1967.
41. G. Horlick, *Digital data handling of spectra utilizing fourier transformations*. Analytical Chemistry, 44 (6), 943 (1972), 1972.
42. DIN 32645:2008-11 *Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung*. DIN Deutsches Institut für Normung e. V.
43. M. Ehni, *Validierung und Assayimplementierung im Rahmen der Entwicklung eines neuen optischen Biosensorsystems für die medizinische Diagnostik*. Dissertation, 2012, Universität Tübingen.

8 Anhang

8.1 Publikationsliste

A. Le Blanc, C. Albrecht, T. Bonn, P. Fechner, G. Proll, F. Proell, M. Carlquist, G. Gauglitz. A novel analytical tool for quantification of estrogenicity in river water based on fluorescence labelled estrogen receptor α . *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2009), 395(6), 1769-1776

A. Le Blanc, M. Ewald, G. Proll, J. Sindlinger, G. Gauglitz. Reflektometrische Interferenzspektroskopie – Antikörperimmobilisierung als Voraussetzung für schnelle und kostengünstige Tierdiagnostik. *GIT Labor-Fachzeitschrift* (2010), 2, 90-93

A. Le Blanc, P. Fechner, G. Gauglitz, Biomimetische Sensoren – Anwendungen von Kernrezeptoren im Pharma-Screening. *GIT Labor-Fachzeitschrift*, (2011), 12, 842-843

M. Ewald, A. Le Blanc, G. Gauglitz. Sensoren in der Veterinärmedizin – Kostendruck als treibende Kraft für Innovation, *GIT Labor-Fachzeitschrift* (2012), 8, 596-597

U. Hilbig, O. Bleher, A. Le Blanc, G. Gauglitz, A biomimetic sensor surface to detect anti- β 2-glycoprotein-I antibodies as a marker for antiphospholipid syndrome, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2012), 403(3), 713-717

M. Ewald, A. Le Blanc, G. Gauglitz, G. Proll, A robust sensor platform for label-free detection of anti-*Salmonella* antibodies using undiluted animal sera, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2013), in Druck

8.2 Vorträge

Februar 2005	Vortrag bei der „2nd International conference on advanced materials and nanotechnology“ in Queenstown, Neuseeland
August 2007	Vortrag bei der “Spetses summer school on nuclear receptor signalling“ in Spetses, Griechenland
Oktober 2009	Vortrag beim „Fourth international workshop on biosensors for food safety and environmental monitoring“, Tanger, Marokko
Mai 2010	Vortrag bei der „Biosensors 2010, 20th Anniversary World Congress on Biosensors“, in Glasgow, UK
März 2011	Vortrag bei der „ANAKON 2011“, in Zürich, Schweiz
September 2011	Vortrag beim „GDCh-Wissenschaftsforum Chemie 2011“, in Bremen

8.3 Akademische Lehrer

Prof. Dr.	Klaus	Albert
Prof. Dr.	Christian	Bardele
Dr.	Ernst Oskar	Bayer
Prof. Dr.	Hans	Bisswanger
Prof. Dr.	Peter	Bohley
Prof. Dr.	Dines	Christen
Prof. Dr.	Ralf	Dringen
Prof. Dr.	Michael	Duszenko
Prof. Dr.	Karl	Eisele
Prof. Dr.	Günter	Gauglitz
Prof. Dr.	Günter	Häfelinger
Prof. Dr.	Bernd	Hamprecht
Prof. Dr.	Johannes	Herrmann
Prof. Dr.	Walter	Jäger
Dr.	Josef	Kellermann
Prof. Dr.	Rüdiger	Klein
Prof. Dr.	Ekkehard	Lindner
Dr.	Friedrich	Lottspeich
Prof. Dr.	Wolfgang	Neubert
Prof. Dr.	Walter	Neupert
Prof. Dr.	Erich	Nigg
Prof. Dr.	Helga	Ninnemann
Prof. Dr.	Heinz	Oberhammer
PD Dr.	Helmut	Pommer
Prof. Dr.	Hans	Probst
Prof. Dr.	Doron	Rapaport
Prof. Dr.	Klaus	Reutter
Dr.	Wolfram	Sarrazin
Prof. Dr.	Herbert	Schott
Prof. Dr.	Michael	Schwarz
Dr.	Herman	Silljé
Dr.	Günther	Steinbrück
Prof. Dr.	Thilo	Stehle
Prof. Dr. Dr. hc.	Joachim	Strähle
Dr.	Takashi	Suzuki
Prof. Dr.	Axel	Ullrich
Prof. Dr. Dr. hc. mult.	Wolfgang	Voelter
Prof. Dr.	Gerhard	Wagner
Prof. Dr.	Ulrich	Weser
Prof. Dr.	Wolfgang	Wohlleben
Prof. Dr.	Klaus-Peter	Zeller
Prof. Dr.	Thomas	Ziegler

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Alexander Fabian Le Blanc
Geburtsdatum: 17.06.1981
Geburtsort: Hannover
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig, keine Kinder

Beruflicher Werdegang

Seit November 2012	Leiter des Biosensorlabors, AG Prof. Lupp, Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München. Arbeiten zur Anwendung markierungsfreier, optischer Sensoren in der Humandiagnostik
Juli 2007 – Oktober 2012	<p>Promotion im Arbeitskreis Prof. Gauglitz, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Eberhard Karls Universität Tübingen, über Anwendungen der Chip-Kalorimetrie in der Untersuchung mikrobiellen Stoffwechsels. Außerdem Arbeiten zur Detektion von endokrinen Disruptoren in Umweltproben mit Hilfe fluoreszenzbasierter Biosensoren</p> <p>Involviert im Projekt „Optische Tierdiagnostik“ (Allianz Industrie Forschung, Projekt Nr. 13130 N/1), überwiegend administrative Aufgaben</p> <p>Nachwuchswissenschaftler im „CASCADE Network of Excellence“ (EU, FP6, FOOD-CT-2004-506319), wissenschaftliche und administrative Aufgaben</p> <p>Einmonatiger Besuch der Firma KaroBio AB in Huddinge, Schweden, als Stipendiat der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Fachgruppe Analytik, sowie des Journals „Analytical and Bioanalytical Chemistry“</p> <p>Stipendiat des Minigradiertenkollegs „Von der molekularen Interaktion zum biologischen Signal“</p>
2003 – 2006	Wissenschaftliche Hilfskraft mit Tätigkeiten in verschiedenen Laboratorien sowie als Versuchsbetreuer in einem Kurspraktikum

Studium

April 2001 – Juni 2007	Studium der Biochemie an der Eberhard Karls Universität Tübingen Hauptfächer: Biochemie und Physikalische Chemie Nebenfach: Zellbiologie Abschluss: Diplom
Januar 2007 – Juni 2007	Diplomarbeit im Arbeitskreis Prof. Gauglitz, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Eberhard Karls Universität Tübingen. Arbeiten zur Anwendung biologischer Modellmembranen in markierungsfreien, optischen Sensorsystemen
April 2005 – März 2006	Praktisches Jahr an den Max Planck Instituten für Biochemie und Neurobiologie, sowie an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Martinsried bei München Sechs Praktika zu je sechs Wochen als optionaler Teil des Hauptstudiums in Tübingen
März 2004 – März 2005	Praktisches Jahr am Nanomaterials Research Centre, Massey University, Palmerston North, Neuseeland

Schulbildung und Wehrdienst

Juli 2000 – April 2001	Wehrdienst im Sanitätsregiment 1, Hildesheim Einsatz als Hilfsausbilder
1993 – 2000	Gymnasium Sophienschule, Hannover Abschluss: Abitur
1991 – 1993	Orientierungsstufe Luerstraße, Hannover
1987 – 1991	Grundschule Großbuchholzer Kirchweg, Hannover

