Metabolic Modelling:
Vergleichende Regulationsanalyse der Sterolbiosynthese

vorgelegt von
Diplom-Ingenieurin
Judith Maczek

Von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Ingenieurwissenschaften
- Dr.-Ing.-

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:
Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. habil. Prof. h.c. Dr. h.c. Günter Wozny
Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Peter Neubauer
Gutachter: PD Dr.-Ing. habil. Peter Götz

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 4. Dezember 2008

Berlin 2009
D 83

Danksagung

Bei **Professor Dr. Peter Neubauer** möchte ich mich bedanken, dass er mir die Dissertation am Institut für Biotechnologie an der Technischen Universität ermöglichte.

Mein Dank gilt **Dr.-Ing. Peter Götz** für die Betreuung der Dissertation und die Möglichkeit die Arbeit am Fachgebiet Bioverfahrenstechnik durchführen zu können.

Herrn **Professor Dr.-Ing. Günter Wozny** danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Besonders bedanken möchte ich mich bei **Stefan Junne**. Die zahlreichen fachlichen Diskussionen gaben meiner Arbeit wertvolle Impulse.

Ein herzliches Dankeschön auch an **Dirk Itzeck** und **Margitta Seidenstücker** für die Unterstützung im Labor und Technikum.

Bei **Peter Nowak**, **Sigrid Krogager**, **Rainer Stahn**, **Thomas Witschel** und **Florian Neumann** möchte ich mich bedanken, die als Studenten am Projekt mitgearbeitet haben.

Von Herzen möchten ich **meinen Eltern** danken, die mich in jeder Lebens- und Ausbildungsphase unterstützt haben.

Diese Dissertation wurde an der Technischen Universität Berlin am Fachgebiet Bioverfahrenstechnik durchgeführt. Das Forschungsvorhaben wurde finanziell von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt.

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Peter Neubauer
Technische Univerität Berlin, Institut für Biotechnologie,
FG Bioverfahrenstechnik

Gutachter: PD Dr.-Ing. habil. Peter Götz
Universität Stuttgart, Institut für Bioverfahrenstechnik

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....IV

Zusammenfassung.....V

Abkürzungsverzeichnis..... VI

1 Einleitung..... 1

2 Stand des Wissens.....2

2.1 Sterole.....2
2.1.1 Einführung..... 2
2.1.2 Ökonomische Bedeutung und Herstellverfahren der Sterole.....3
2.1.3 Ergosterolbiosynthese in der Hefe *S.cerevisiae*..... 5
2.1.4 Regulation der Ergosterolbiosynthese in der Hefe *S.cerevisiae*.....13
2.1.5 Cholesterolbiosynthese in Säugerzellen.....16
2.1.6 Regulation der Cholesterolbiosynthese..... 19

2.2 Fettsäuren.....21
2.2.1 Einführung..... 21
2.2.2 Wechselwirkung der Fettsäuren mit Sterolen in eukaryotischen Zellen..... 21
2.2.3 Fettsäurenbiosynthese in eukaryotischen Zellen.....23
2.2.4 Regulation der Fettsäurenbiosynthese in der Hefe *S.cerevisiae*..... 24

2.3 Metabolic Modelling.....26
2.3.1 Stofffflussanalysen (Metabolic flux analysis, MFA)..... 26
2.3.2 Rapid Sampling Techniken für metabolische Stoffflussanalysen..... 30
2.3.3 Herleitung kinetischer Ansätze aus Stofffflussanalysen..... 31

3 Aufgabenstellung.....33

4 Material und Methoden.....35

4.1 Organismen.....35

4.2 Kultivierung der Hefe und Probennahme.....35
4.2.1 Kulturmedium.....35
4.2.2 Vorkulturführung für Versuche in Schüttelkolben und Schottflaschen..... 35
4.2.3 Schüttelkolbenkultivierung zur Untersuchung von Einflussfaktoren.....35
4.2.4 Kultivierung in Schottflaschen zur Bestimmung der Aufnahmeraten..... 36
4.2.5 Batch-Kultivierung im Bioreaktor.....36
4.2.6 Rapid Sampling (RS)..... 37
4.2.7 Kontinuierliche Kultivierung im Bioreaktor.....38

4.3 Zellkultur 40
4.3.1 Kultivierung der humanen Zellen 40
4.3.2 Passagieren und Ernten der humanen Zellen 40
4.3.3 Bestimmungen der Zellzahl und Zellaktivität 40
4.3.4 Kryokonservierung- und reaktivierung 41
4.3.5 Herstellung des Inkubationsmediums für ein Stimulus-Response-Experiment mit Lipid-Cyclodextrin-Komplexen 41
4.3.6 Stimulus-Response-Experiment zur Beeinflussung der Cholesterolbiosynthese 42

4.4 Analytik 44
4.4.1 Aufarbeitung der freien Sterole aus Hefezellen 44
4.4.2 Aufarbeitung der freien Sterole aus humanen Zellen 44
4.4.3 Aufarbeitung der gesamten Sterole aus Hefezellen 45
4.4.4 Aufarbeitung der gesamten Sterole aus humanen Zellen 45
4.4.5 Aufarbeitung der Sterole und des Squalens aus dem Hefemedium 45
4.4.6 Aufarbeitung der Sterole aus dem Zellkulturmedium 45
4.4.7 Aufarbeitung der Fettsäuren aus Hefezellen 46
4.4.8 Gaschromatographische Analyse der Lipide 46
4.4.9 Bestimmung der Glucosekonzentration im Hefemedium 48
4.4.10 Bestimmung der Ethanolkonzentration im Hefemedium 48

4.5 Berechnungen der intrazellulären Stoffflüsse 50
4.5.1 Die Software COMPFlux© 50
4.5.2 Programmanpassung 51
4.5.3 Gleichungen für die Ergosterolbiosynthese 52
4.5.4 Gleichungen für die Cholesterolbiosynthese 54

4.6 Kinetische Ansätze 55

5 Ergebnisse 57

5.1 Intrazelluläre Sterolkonzentrationen und -stoffflüsse der Hefe *S.cerevisiae* im Batch-Prozess 57
5.1.1 Anaerobe Kultivierung 58
5.1.2 Aerobe Kultivierung 61
5.1.3 Integrale Stoffflussberechnungen für die anaeroben und aeroben Kultivierungen 64

5.2 Anaerob-aerobe Kultivierung 66

5.3 Anaerob-aerobe Kultivierungen mit Zusätzen 80

5.4 Intrazelluläre Sterolkonzentrationen und -stoffflüsse der Hefe *S.cerevisiae* im kontinuierlichen Prozess.....91
5.4.1 Vorversuche im Schüttelkolben..... 91
5.4.2 Einstellung stationärer Zustände..... 94
5.4.3 Stoffflüsse im stationären Zustand..... 95
5.4.4 Einfluss der Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf die Ergosterolbiosynthese.....95

5.5 Modellierung..... 98
5.5.1 Erstellung einer Modellstruktur..... 98
5.5.2 Ableitung der kinetischen Ansätze.....99

5.6 Übertragung der Untersuchungsmethode auf die Cholesterolbiosynthese in humane Fibroblasten.....114
5.6.1 Entwicklung eines Standardprotokolls..... 114
5.6.2 Stimulus-Response-Experimente.....117
5.6.3 Stoffflussberechnungen für den Cholesterolbiosyntheseweg..... 120

6 Diskussion.....125

7 Literaturverzeichnis.....138

8 Anhang.. 144

Abstract

Ergosterol is the final product of the sterol biosynthesis in yeast and fungi. As membrane component, it is an essential compound of these organisms. Ergosterol is of economic interest because it is used as raw material for the vitamin D2 synthesis and as a precursor molecule in the pharmaceutical industry. Its synthesis is highly regulated and requires the availability of oxygen; it can be divided in the pre- and post-squalene pathway. While the synthesis of the precursor squalene occurs in the pre-squalene pathway, the first sterol lanosterol, several intermediates and the final product ergosterol are biochemically converted in the post-squalene pathway. The final product of the sterol biosynthesis in mammalian cells is cholesterol. Both reaction pathways are well known. Most enzymes of the sterol biosynthesis are identified and their functions have been evaluated (e.g. in gene expression studies). However, the detailed regulation of the sterol biosynthesis is not completely understood.

The aim of this work was to conduct a metabolic flux analysis within the post-squalene pathway to investigate the underlying control mechanisms of the sterol biosynthesis. Therefore stimulus-response-experiments were performed to influence the sterol biosynthesis by changing the environmental conditions. The dynamic changes of the intracellular sterol concentrations were measured and used for the calculation of the metabolic fluxes. For this purpose, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was cultivated in a batch process including a switch from anaerobic to aerobic growth conditions. In these experiments, high sterol fluxes were initiated, which could be even increased by sterol supplementation to the cultivation media. The analysis of the metabolic fluxes revealed a significant influence of the ester formation of the intermediate zymosterol on the flux to the final product ergosterol. The results of the metabolic flux analysis were used to design a concept of a structured model, which describes the ergosterol formation. The sterol reaction rates obtained from the flux analysis were used to describe the sterol formation with mathematical equations.

The application of a metabolic flux analysis for the investigation of the cholesterol biosynthesis in human fibroblasts was evaluated. It was determined, if the results from the investigations with the yeast could be transferred to the human sterol biosynthesis. When comparing both systems with each other, it was observed, that fibroblasts do neither synthesize esters nor accumulate sterol intermediates as the yeast does. Therefore it was discussed, if the yeast *S.cerevisiae* can serve as a general model organism for the investigation of the sterol biosynthesis.

Zusammenfassung

Ergosterol ist das Endprodukt der Sterolbiosynthese in Hefen und Pilzen. Als Membrankomponente ist es für diese Organismen essentiell. Wirtschaftlich ist Ergosterol als Ausgangstoff für die Vitamin D2 Synthese und als Precursormolekül in der pharmazeutischen Industrie interessant. Seine Synthese ist streng reguliert und an Sauerstoffverfügbarkeit gebunden; sie lässt sich in den sog. Prä- und Post-Squalensyntheseweg unterteilen. Während im Prä-Squalenweg die Synthese der Sterolvorstufe Squalen stattfindet, erfolgt im Post-Squalensyntheseweg die Bildung des Sterols Lanosterol aus Squalen und dessen Umwandlung über Sterolzwischenstufen in das Endprodukt Ergosterol. In Säugetierzellen ist das Endprodukt der Sterolbiosynthese Cholesterol. Beide Reaktionswege sind entschlüsselt. Die meisten der an der Sterolbiosynthese beteiligten Enzyme wurden in der Vergangenheit identifiziert und ihre Funktion (z.B. in Genexpressionsstudien) bestimmt. Dennoch ist bisher die Regulation der Sterolbiosynthese nicht vollständig aufgeklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, vergleichende Stoffflussanalysen innerhalb des Post-Squalensyntheseweges durchzuführen, um Kontrollmechanismen der Sterolbiosynthese zu untersuchen. Hierfür wurden Stimulus-Response-Experimente etabliert, in denen die Sterolsynthese durch veränderte Umgebungsbedingungen beeinflusst wurde. Die dynamischen Änderungen der intrazellulären Sterolkonzentrationen wurden gemessen und für die Stoffflussberechnung verwendet. So wurden Batch-Kultivierungen der Hefe *S.cerevisiae* mit einem Wechsel von anaeroben zu aeroben Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurden sehr hohe Bildungsraten der Sterole induziert, die sich durch eine Sterolsupplementierung des Kulturmediums noch verstärken ließen. Bei der Auswertung der Stoffflussanalyse konnte festgestellt werden, dass z.B. die Esterbildung des Intermediates Zymosterol den Stoffluss in Richtung des Endproduktes Ergosterol maßgeblich beeinflusst. Die Erkenntnisse der Stoffflussanalyse wurden für den Entwurf eines strukturierten Modells genutzt, das die Ergosterolbildung beschreibt. Die aus den Stoffflussberechnungen hervorgehenden Bildungsraten wurden verwendet, um die Sterolbildung in mathematischen Ansätze abzubilden.

Durch die Etablierung einer Stoffflussanalyse der Cholesterolbiosynthese in humanen Fibroblastenzellen wurde geprüft, inwieweit sich die Methode zur Untersuchung der Sterolbildung in humanen Zellen eignet und ob sich die Erkenntnisse aus dem Hefesystem auch auf die humane Sterolbiosynthese übertragen lassen. Beim Vergleich beider Systeme wurde festgestellt, dass bei den Fibroblasten - im Gegensatz zur Hefe - kaum eine Veresterung oder Zwischenspeicherung von Sterolintermediaten stattfand. Abschließend wird daher diskutiert, inwiefern sich die Hefe *S.cerevisiae* als Modellorganismus zur Untersuchung der Sterolbiosynthese eignet.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACAT	AcylCoA:Cholesteroltransferase
ASAT	Acyl-CoA-Sterolacyltransferasen
BSA	Rinderserumalbumin
bidest.	bidestilliert
bzgl.	bezüglich
C	Kohlenstoff
Chol	Cholesterol
C_i	Konzentration von i
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym-A
D	Durchflussrate
Dhcl	7-Dehydrocholesterol
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMEM/F12	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dzyml	4,4-Dimethylzymosterol
engl.	englisch
Epi	Episterol
ER	Endoplasmatisches Reticulum
Erdl	Ergosta-5,7,22,24,(28)-tetraenol
Erg	Ergosterol
Ertl	Ergosta-5,7,24,(28)-trienol
Est /-est	Sterolester
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FAME	Fettsäuremethylester (*Fatty acid methyl ester*)
FBS	Fötales bovines Serum
Fec	Fecosterol
$FeSO_4$	Eisensulfat
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie
h	Stunde
H_2O	Wasser
HCL	Salzsäure
HEPES	N(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-2-ethansulfonsäure
HFF	Humane Fibroblasten der Vorhaut (human foreskin fibroblasts)
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (*High Pressure Liquid Chromatography)*
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-CoenzymA
IPP	Isopentylpyrophosphat
K	Konstante
KH_2PO_4	Kaliumdihydogenphophat
l	Liter
LDL	Low density
Lnl	Lanosterol
LP	Lipidpartikel
Ltl	Lathosterol
M	Molar
µ	Wachstumsrate
mg	Milligramm

µg	Mikrogramm
min	Minute
Mio	Million(en)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mmol	Millimol
µmol	Mikromol
nmol	Nanomol
N	Normal
$NADP^+$	Nicotinamidadenindinucloetidphosphat
NADPH	Nicotinamidadenindinucloetidphosphat - hydriert
NEA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NH_4Cl	Ammoniumchlorid
O_2	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (*Phosphate buffered saline*)
PEG	Polyethylenglycol
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
r	Fluss
RPM	Umdrehungen pro Minute (*Rotations per minute*)
RS	Schnelle Probennahme (*Rapid Sampling*)
SCAP	*SREP cleavage activating protein*
SF	Stöchiometriefaktor
SREP	*Sterol regulatory element binding protein*
sek	Sekunde
sog.	so genannt
Squ	Squalen
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TS	Trockensubstanz
UV	Ultraviolett
VE	vollentsalzt
Vgl.	Vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
vvm	Volumen pro Volumen und Minute
YPD	Hefe-Pepton-Dextrose (*yeast peptone dextrose*)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
Zym	Zymosterol

1 Einleitung

Sterole sind essentielle Bestandteile aller eukaryotischen Zellen. Seit der Entdeckung des menschlichen Sterols Cholesterol im Jahre 1769 sind diese Lipide Gegenstand unzähliger Forschungsarbeiten [Dam, 1958, Espenshade und Hughes, 2007]. Die Biosynthese der Sterole ist aufgrund ihrer biologischen und pharmazeutischen Bedeutung von immer größer werdendem Interesse. Der Bildung dieser Moleküle liegt ein komplexer Stoffwechselweg mit ungefähr 30 biochemischen Umwandlungen zugrunde. Durch die rasante Entwicklung der Biowissenschaften und der damit verbundenen neuen Techniken konnten besonders in den letzten 20 Jahren große Fortschritte in der Aufklärung der Sterolbiosynthese erzielt werden. Dennoch sind Mechanismen, die die Regulation der Sterolbiosynthese in den Zellen abbilden, nicht im Detail verstanden [Davies et al., 2005].

Die Vielzahl der gewonnenen Erkenntnisse beruht auf biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen. Hierbei wird der Ansatz gewählt, den ursächlichen Grund für eine jeweilige Reaktion zu erörtern. Die intrazellulären Abläufe werden für jeden einzelnen Syntheseschritt detailliert untersucht. Bei dieser Vorgehensweise können die Auslöser biologischer und biochemischer Reaktionen in den Organismen gefunden werden, die wiederum auf vielfältigeren Zusammenhängen beruhen. Die Integration der einzelnen Ansätze ermöglicht es, den Gesamtprozess einer komplexen Biosynthese zu verstehen.

Insbesondere die Stoffflussanalyse (*Metabolic flux analysis)* ermöglicht eine Quantifizierung der Reaktionsraten [Stephanopoulos und Vallino, 1991]. Sie stellt ein wichtiges Werkzeug innerhalb der Systembiologie dar. Auch die Ableitung kinetischer Parameter der betrachteten enzymatischen Umsetzungen durch eine Stoffflussanalyse ist möglich. Die gewonnenen Erkenntnisse können in Modellgleichungen zusammengefasst werden, die in der Lage sind, das Verhalten eines Systems zu beschreiben. Um eine gute Vorhersagegüte zu besitzen, sollte ein Modell die wesentlichen regulatorischen Wechselwirkungen berücksichtigen. Eine hochauflösende Betrachtung eines Teilsystems kann einen wertvollen Beitrag zu bereits existierenden ganzheitlichen Modellen liefern, die vornehmlich das Verhalten des Hauptmetabolismus eines biologischen Systems hinreichend gut beschreiben können.

Es existiert bereits eine Vielzahl von wissenschaftlichen Untersuchungen, die die Auswirkungen einzelner und kombinierter Überexpressionen von Genen des Sterolmetabolismus beschreiben. Eine deutliche Veränderung der Syntheseleistung in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte bisher allerdings nicht erreicht werden. Durch das Anwenden der vorher beschriebenen Ansätze soll versucht werden, zur Entschlüsselung der offensichtlichen regulatorischen Wechselwirkungen innerhalb dieses Teilmetabolismus beizutragen.

2 Stand des Wissens

2.1 Sterole

2.1.1 Einführung

Sterole sind essentielle Bestandteile eukaryotischer Zellmembranen. Dort haben sie insbesondere Einfluss auf die Fluidität und Permeabilität von Membranen. Obwohl auch andere Lipide für die physikalischen Eigenschaften von Membranen verantwortlich sind, konnte vielfach experimentell gezeigt werden, dass die Anwesenheit maßgeblich für die Lebensfähigkeit der Zellen ist [Daum et al., 1998]. Auch die Einwirkung der Sterole auf physiologische Eigenschaften der Zellen wie Atmungsaktivität, Vervollständigung des Zellzyklus sowie Sterolaufnahme und -transport sind in der Literatur beschrieben [Smith und Parks, 1995; Daum et al., 1998; Heese-Peck et al., 2002].

Als Untergruppe der Steroide gehören die Sterole zur Stoffgruppe der strukturellen Lipide. Ihr Molekülaufbau weist ein charakteristisches tetrazyklisches Ringsystem auf. Drei dieser Ringe sind aus sechs Kohlenstoffatomen aufgebaut. Ein weiterer Ring besteht aus fünf Kohlenstoffatomen. Der typische Aufbau eines Sterols ist für die wohl bekanntesten Vertreter, Cholesterol und Ergosterol, zur Veranschaulichung in Abbildung 2.1 dargestellt.

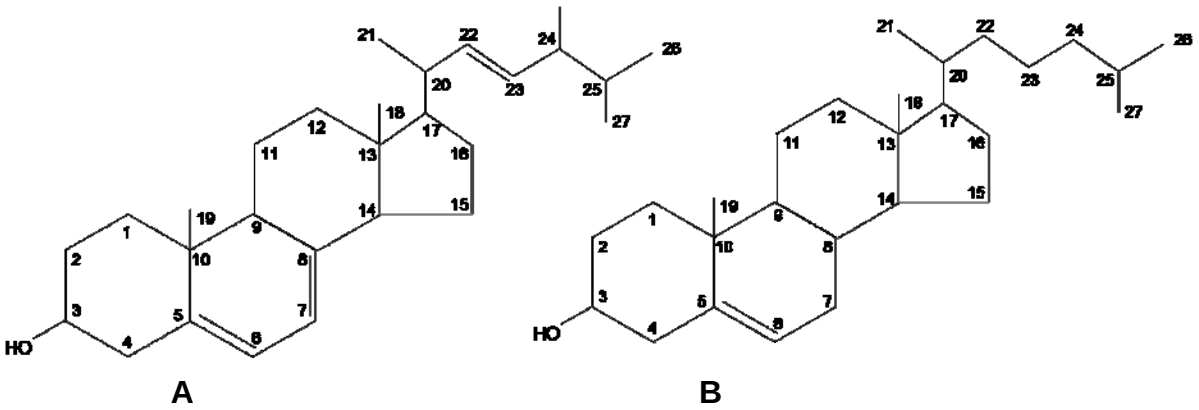


Abb. 2.1: Chemische Struktur des Ergosterols (A) und des Cholesterols (B) mit Nummerierung der C-Atome.

Die zyklischen Kohlenstoffverbindungen führen zu einer planaren Gerüststruktur, durch die eine Rotation um die Bindungsachse nicht möglich ist [Lehninger, 2004]. Die auftretenden Doppelbindungen in bzw. zusätzliche C-Atome an den Kohlenstoffringen und die Alkylkette am C17-Atom bestimmen die individuellen Eigenschaften der unterschiedlichen Sterole.

Für alle Sterole gilt, dass der überwiegende Teil des Moleküls unpolare Eigenschaften aufweist. Die stets am C3-Atom vorzufindende Hydroxylgruppe führt zu einer Polarität der Moleküle, die den Sterolen einen gerichteten Einbau in die Membranen erlaubt. Allerdings verleiht diese Polarität den Sterolen auch Tensideigenschaften, die die Lipidmembran schädigen können. Eine vermehrte Anreicherung von Sterolen in dieser ungebundenen Form

ist deshalb für die Zellen toxisch. Eine Veresterung der Sterole (z.B. mit Fettsäuren) an der Hydroxylgruppe bewirkt die Entstehung von Neutralfetten. Diese veresterten Lipide können im Gegensatz zu den freien Sterolen von den Zellen in größeren Mengen gespeichert werden [Müllner und Daum, 2004; Maczek et al., 2006].
Die Struktur der Sterole unterscheidet sich in den verschiedenen eukaryotischen Organismen. Bei allen Säugetierzellen ist das Endprodukt der Sterolbiosynthese Cholesterol. Das Hauptsterol aller Pilz- und Hefearten ist das Ergosterol, das sich strukturell vom Cholesterol unterscheidet. So verfügt das Ergosterol über zusätzliche Doppelbindungen zwischen dem C7- und C8-Atom sowie dem C22- und C23-Atom. Auch eine weitere Methylgruppe am C24-Atom ist im Unterschied zum Cholesterol festzustellen (Vgl. Abbildung 2.1). In Pflanzenzellen sind vorwiegend die Sterole Stigmasterol und Sitosterol zu finden. Diese pflanzlichen Sterole weisen im Vergleich zum Cholesterol modifizierte Seitenketten auf. Alle in der Natur vorkommenden Sterole haben neben der Hydroxylgrupppe am C3-Atom eine Doppelbindung zwischen dem C5 und C6-Atom [Daum et al., 1998].

Die Sterolbiosynthese in den unterschiedlichsten eukaryotischen Zellen ist komplex. Das Verständnis über die Reaktionen im Syntheseweg sowie die Identifizierung der beteiligten Enzyme war in der Vergangenheit Bestandteil zahlreicher Untersuchungen. Dennoch ist die Regulation dieser Biosynthese nicht im Detail verstanden [Veen et al., 2003; Maczek et al., 2006]. Die unterliegenden Regulationsmechanismen zu entschlüsseln, ist sowohl für medizinische Fragestellungen (z.B. Verständnis von Krankheiten und daraus resultierende Behandlungsmöglichkeiten) aber auch für die wirtschaftliche Nutzung von Sterolen (z.B. biologische Syntheseverfahren) wichtig.

2.1.2 Ökonomische Bedeutung und Herstellungsverfahren der Sterole

Die ökonomische Relevanz der Sterole ist durch etliche Anwendungen gegeben. So fungiert das mit Hefe herstellbare Ergosterol als Vorstufe des Vitamin D2 (Ergocalciferol). Die Vitaminsynthese erfolgt durch Bestrahlung von Ergosterol mit ultraviolettem Licht (UVB-Strahlung). Hierbei werden die konjugierten Doppelbindungen im Ringsystem des Moleküls aufgebrochen.
Auch das während der Cholesterolbiosynthese gebildete 7-Dehydrocholesterol dient als Vitaminvorstufe (Provitamin D3). Es ist dem Ergosterol strukturell sehr ähnlich, nur weist es keine C22-C23-Doppelbindung auf. Auch beim 7-Dehydrocholesterol findet die Auflösung der Doppelbindungen im zweiten Ring des Sterolmoleküls durch eine UVB-Bestrahlung statt. Auf diese Weise wird beim Menschen durch Sonnenlicht das Vitamin D3 aus dem 7-Dehydrocholesterol in der Haut gebildet. Anschließend wird in der Leber das Vitamin D3 und das durch Nahrung aufgenommene Vitamin D2 in das 25-Hydroxyvitamin D

umgewandelt. Vitaminmangelerscheinungen können beim Menschen daher bei unzureichender Einwirkung von Sonnenlicht sowie bei Stoffwechselstörungen auftreten. Um bei Säuglingen der durch Vitamin-D-Mangel ausgelösten Rachitis entgegenzuwirken, ist die Gabe von täglichen Vitamin Dosen empfohlen. Die Nutzung von Vitamin D wird aber auch für die Medikation bei Osteoporose diskutiert, die besonders bei älteren Menschen sinnvoll erscheint [Jansen et al., 1998; Everitt et al., 2006; Greer, 2004].

Einige Sterole, wie z.B. das Ergosterol und Cholesterol, werden als Precursor für die Synthese von Steroiden oder Steroidhormonen genutzt [Veen und Lang, 2005; Torgov, 1982]. Darüber hinaus werden Sterole für die Herstellung von Liposomen und Lipoplexen verwendet, die als Wirkstoffstoffträger in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie zum Einsatz kommen [Taubner, 2005]. Für die Herstellung von Cremes und Salben sind Sterole aufgrund ihrer emulgierenden Eigenschaften in Verbindung mit ihrer sehr guten physikalischen Stabilität unerlässlich. Auch die feuchtigkeitsspendende Wirkung der Sterole, die auf ihrer hohen Wasseraufnahmekapazität beruht, ist für die kosmetische Industrie besonders interessant [Neuwald und Fetting, 1964; Ohashi und Myoho, 2006; Veen und Lang, 2005]. Sterole und ihre Derivate sind daher in Cremes, Lippenstiften, Make ups etc. zu finden [Reiter-Reimer und Baltes, 1986].

Die Gewinnung des Ausgangsstoffes Ergosterol wird dabei hauptsächlich über zwei Verfahren realisiert: Die Herstellung kann über die Extraktion von Abfallmyzel, das aus Penecillin- oder Zitronensäurefermentationen stammt, erfolgen. Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit, das Ergosterol aus Hefekultivierungen zu gewinnen [Shang et al. 2006]. Die Rohmaterialen für diesen Herstellungsprozess sind jedoch teurer als die Aufarbeitung aus dem anfallenden Pilzmyzel. Der Vorteil des Hefeprozesses liegt aber im wesentlich höheren Ergosterolgehalt der Biomasse [Shang et al. 2006].

Das Cholesterol wird hauptsächlich aus tierischen Rohmaterialien isoliert. So erfolgt die Cholesterolgewinnung beispielsweise durch die Extraktion bestimmter Gewebe wie Hirn und Rückenmark. Mittlerweile gibt es auch synthetische Verfahren zur Herstellung von hochreinem Cholesterol (z.B. SyntheChol®, Sigma-Aldrich), das ohne die Verwendung von tierischen Ausgangstoffen produziert werden kann. Dieses synthetische Cholesterol ist besonders zum Einsatz bei Zellkultivierungen geeignet [Talley et al., 2006]. Das in der kosmetischen Industrie oft verwendete Lanosterol wird aus dem Wollwachs (Lanolin) der Schafwolle gewonnen [Reiter-Reimers und Baltes, 1986].

2.1.3 Ergosterolbiosynthese in der Hefe *S.cerevisiae*

Einführung

Wie bereits im einleitenden Kapitel erwähnt, ist Ergosterol das Endprodukt der Sterolbiosynthese in der Hefe *S.cerevisiae*. Als ungebundene, also nicht veresterte Komponente erhöht es die Viskosität der Membranen und bestimmt somit ihre Eigenschaften. Neben Ergosterol werden auch die freien Sterolintermediate Zymosterol, Fecosterol und Episterol in geringeren Mengen in die Lipiddoppelschichten eingebaut. Diese freien Sterole sind auch in Sekretionsvesikeln detektiert worden, die wahrscheinlich dem Lipidtransport dienen [Heese-Peck et al., 2002; Zinser et al., 1993]. Die Sterolintermediate und das Endprodukt Ergosterol liegen in den sog. Lipidpartikeln (engl. *lipid particles*, auch Lipiddroplets) überwiegend verestert vor. Sie dienen hier als Speicherlipide in der Hefe.

Die Ergosterolbiosynthese in Hefe ist ein komplexer Stoffwechselprozess, der durch eine Vielzahl von enzymatischen Umsetzungen bestimmt ist. Die Abfolge der biochemischen Reaktionen im Biosyntheseweg ist im Gegensatz zur Regulation weitgehend aufgeklärt und charakterisiert. Als Substrat für die jeweiligen Reaktionen dienen jeweils nur die freien Sterole. Veresterte Sterole können aufgrund ihrer Struktur von den Enzymen nicht umgesetzt werden. Bei der Beschreibung des Ergosterolbiosyntheseweges wird zwischen zwei Abschnitten unterschieden: Im sogenannten Prä-Squalensyntheseweg werden die Reaktionen bis zur Bildung des Squalens zusammengefasst. Die Reaktionsschritte vom Squalen bis zum Endprodukt Ergosterol hingegen finden im sog. Post-Squalensyntheseweg ihre Berücksichtigung.

Squalen ist eine kettenförmige Kohlenwasserstoffverbindung bestehend aus 30 C-Atomen. Es gehört zur Gruppe der Triterpene und ist die direkte Vorstufe der Sterole. Das erste Sterol wird durch den Ringschluss bei der Bildung des Lanosterol aus Squalen gebildet. Im weiteren Verlauf der Ergosterolbiosynthese führen Modifikationen der Sterolmoleküle zur Bildung des Ergosterols. Für die an der Ergosterolbiosynthese beteiligten Enzyme werden oft Abkürzungen anstelle der systematischen Namen verwendet. Hierbei setzt sich die Enzymbezeichnung aus der Silbe *Erg* und einer Zahl zwischen 1 und 26 zusammen. Der angefügte Buchstabe *p* kennzeichnet, dass sich um ein Protein und nicht um ein Gen handelt. Die korrespondierenden, kodierenden Gene diese Enzyme werden hingegen in Großbuchstaben geschrieben (z.B. *ERG1*).

Prä-Squalensyntheseweg

Die Synthese des Squalens findet in der Hefe *S.cerevisiae* sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Wachstumsbedingungen statt. Sie beginnt mit der Bildung von Acetoacetyl-CoA aus zwei Acetyl-CoA-Einheiten (Erg10p). In einem nächsten Schritt wird Hydroxymethylglutaryl-CoenzymA gebildet (Erg13p), das durch die entsprechend bezeichnete Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) zum Mevalonat umgesetzt wird. Die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität beruht in der Hefe auf zwei Isoenzymen, namentlich Hmg1p und Hmg2p. Diese Proteine besitzen jeweils eine Transmembran- sowie eine katalytische Domäne (Donald et al., 1997). Bei der Kondensation der insgesamt drei Acetyl-CoA-Einheiten zu Mevalonat werden zwei NADPH zu $NADP^+$ oxidiert. Im Anschluss werden Phosphatgruppen an das Mevalonat transferiert, die zur Bildung des 5-Pyro-phosphomevalonats führen (Erg12p, Erg8p). Durch die Abspaltung der 3'-Phosphatgruppe und unter Bildung von CO_2 kann nun eine Doppelbindung eingeführt werden. Das Produkt dieser Umsetzung wird als Isopentylpyrophosphat (IPP) bezeichnet. Der Abschnitt vom Acetoacetyl-CoA bis zum IPP ist auch als Mevalonatbiosyntheseweg bekannt (Vgl. Abbildung 2.2). Ausgehend vom IPP kann nicht nur die Bildung des Terpens Squalen, sondern auch die Biosynthese von Terpenoiden erfolgen.

Das IPP isomerisiert unter Beteiligung eines Enzyms (Idi1p, Isopentyldiphosphat-Isomerase Typ-I) zu Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) [Laupitz 2006]. Bei einer folgenden Kondensationsreaktion werden die Substanzen IPP und DMAPP „*head-to-tail*" miteinander verbunden. Diese Reaktion wird durch das Enzym Erg20p katalysiert und es entsteht Geranylpyrophosphat. Durch eine weitere Kondensation mit einer IPP-Einheit wird ein C15-Körper gebildet, der als Farnesylpyrophosphat bezeichnet wird. Das Enzym Erg9p katalysiert letztendlich die Verschmelzung von zwei Molekülen Farnesylpyrophosphat zum Squalen unter Abspaltung der Phosphatgruppen (Vgl. Abbildung 2.2).

Post-Squalensyntheseweg

In diesem Teil der Ergosterolbiosynthese findet die eigentliche Bildung der Sterole aus Squalen und deren Modifikation bis zum Ergosterol statt. Im Gegensatz zum Prä-Squalensyntheseweg sind einige Reaktionen an die Anwesenheit von Sauerstoff gebunden. Daher ist die Ergosterolbiosynthese in diesem Abschnitt für die Hefe nur unter aeroben Kultivierungsbedingungen möglich. Die biochemischen Reaktionen im Post-Squalensyntheseweg finden entweder an den ER-Membranen oder in den Lipidpartikeln statt.

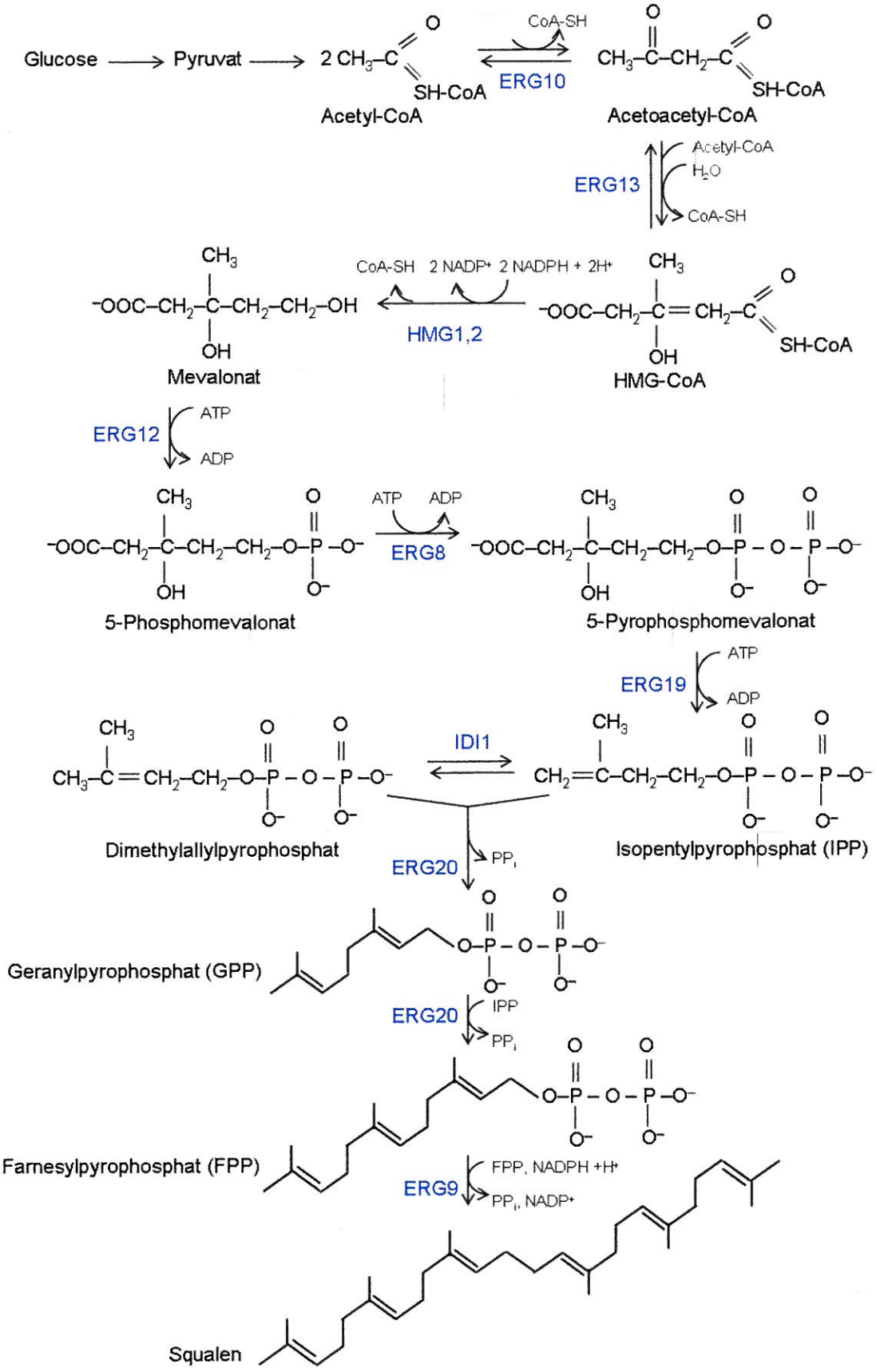


Abb. 2.2: Prä-Squalensyntheseweg der Ergosterolbiosynthese in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* [nach Jeong, 2004].

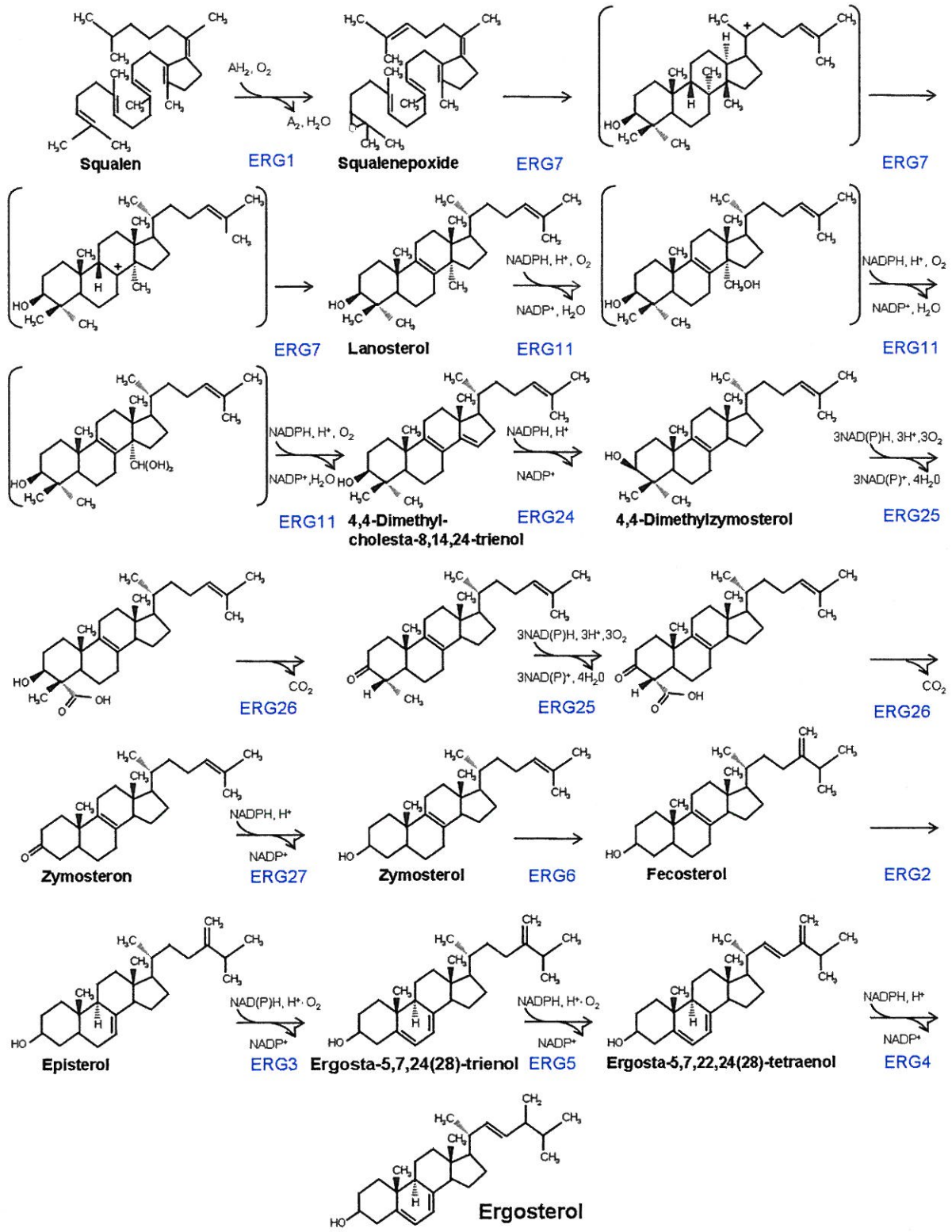


Abb. 2.3: Post-Squalensyntheseweg der Ergosterolbiosynthese in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* [nach Jeong, 2004; Corey und Matsuda, 1994; Gachotte et al., 1999; Veen, 2002;].

Diese Lipidpartikel sind Bestandteile fast aller eukaryotischer Zellen. Sie bestehen aus einem stark hydrophoben Kern aus Neutrallipiden (Sterolester und Triglyceriden), der von einer Phopholipidschicht umgeben ist und nur wenige Proteine enthält [Athenstaedt et. al., 1999].

Wie in Abbildung 2.3 dargestellt, beginnt der Post-Squalensyntheseweg mit der Epoxidierung des Squalens zwischen dem C2 und C3-Atom, die zum Produkt 2,3-Oxidosqualen führt. Die Reaktion wird von dem Enzym Erg1p (Squalenepoxidase, E.C.1.14.99.7) unter Verbrauch von Sauerstoff und einem Reduktionsäquivalent katalysiert. Obwohl sich das Erg1p sowohl an der ER- als auch an der Lipidpartikelmembran nachweisen lässt, konnte die aktive Form lediglich am ER aufgefunden werden [Leber et al., 1998, Müllner et al., 2004]. Für die Aktivität dieses Enzyms in den Zellen ist auch das Vorhandensein des Co-Faktors FAD notwendig. Das entstandene Intermediat Squalenepoxid, auch 2,3-Oxidosqualen genannt, ist in neutralem Medium chemisch stabil [Schulz-Gasch und Stahl, 2003]. In Wildtyp-Zellen der Hefe *S.cerevisiae* ist das Intermediat 2,3-Oxidosqualen allerdings kaum detektierbar. Es wird vermutet, dass die Anreicherung dieses Epoxids vermieden wird, da es aufgrund seiner hohen Reaktivität die Zellmembranen schädigen kann [Milla et al., 2002].

Das hauptsächlich in Lipidpartikeln lokalisierte Enzym Erg7p (Lanosterolsynthase, E.C.5.4.99.7) ermöglicht die Bildung von Lanosterol. Hierbei wird aus einer azyklischen Verbindung das für die Sterole typische tetrazyklische Ringsystem gebildet. Die Umwandlung in Lanosterol beginnt mit der Protonierung von Squalenepoxid. In über 20 weiteren Schritten werden Bindungen aufgebrochen und Ringschlüsse durchgeführt. Diese Umsetzung ist eine der komplexesten biochemischen Reaktionen, die bisher bekannt ist. [Daum et al., 1998, Mo et al., 2004]. Die komplizierten Mechanismen und den Aufbau des Enzyms zu verstehen, war Grundlage zahlreicher Untersuchungen. [Schulz-Gasch und Stahl, 2003].

Das 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol entsteht durch die Demethylierung von Lanosterol unter Einführung einer Doppelbindung zwischen dem C14 und C15-Atom. Die Umsetzung wird durch Erg11p (C14-Demethylase, E.C.1.14.13.70) katalysiert, das zur Gruppe der Cytochrome P450 gehört. Diese Reaktion ist für die Zelle energetisch sehr aufwendig. So werden drei NADPH reduziert. Weiterhin benötigt die Zelle drei Moleküle Sauerstoff für die Bildung dieses Sterols. Erwähnenswert ist an dieser Stelle auch, dass das Enzym Erg11p sich im Gegensatz zum Enzym Erg7p im ER befindet [Ott et al., 2005]. Das bedeutet, dass Lanosterol anscheinend in der Zelle erst an den Reaktionsort transportiert werden muss, bevor es für die Demethylierungsreaktion zur Verfügung steht. Die anschließende Reduktion dieser Doppelbindung durch das Erg24p (d14-Reduktase, E.C.1.3.1.70) erfolgt ebenfalls im ER. Unter Verbrauch von einem Mol NADPH entsteht dabei ein Mol 4,4-Dimethylzymosterol.

Um am C4-Atom des Sterolrings die zwei Methylgruppen zu entfernen, sind jeweils die Anwesenheit der C4-Methyloxidase (Erg25p, E.C.1.14.13.72) sowie der C4-Decarboxylase

(Erg26p, E.C.1.1.1.170) erforderlich (Vgl. Abbildung 2.3). Das Produkt der insgesamt vier Reaktionen mit Abspaltung von zwei CO_2-Gruppen ist das 3-Keto-4-Methylzymosterol [Gachotte et al., 1998, Gachotte et al., 1999]. Die anschließende Reduktion am C3-Atom zum Zymosterol geschieht durch das Enzym Erg27p (3-Ketoreduktase, E.C.1.1.1.270) [Gachotte et al., 1999, Daum et al., 1998]. Die Entfernung der beiden Methylgruppen vom 4,4-Dimethylzymosterol ist insgesamt energetisch sehr aufwendig. Pro Umsetzung werden sechs NADH benötigt. Auch die Anwesenheit von sechs Molekülen Sauerstoff ist für eine einzelne Reaktionsabfolge erforderlich. Wie in Abbildung 2.4 dargestellt, ist die 3-Ketoreduktase sowohl in den Lipidpartikeln als auch im ER nachweisbar. Ein Transmembranprotein (Erg28p) in der Membran des ER wurde mit der dortigen Aktivität der Reduktase assoziert. Dieses Protein scheint auch die Enzyme Erg25p und Erg26p an sich zu binden [Mo und Bard, 2005, Mo et al., 2002, Mo et al., 2004].

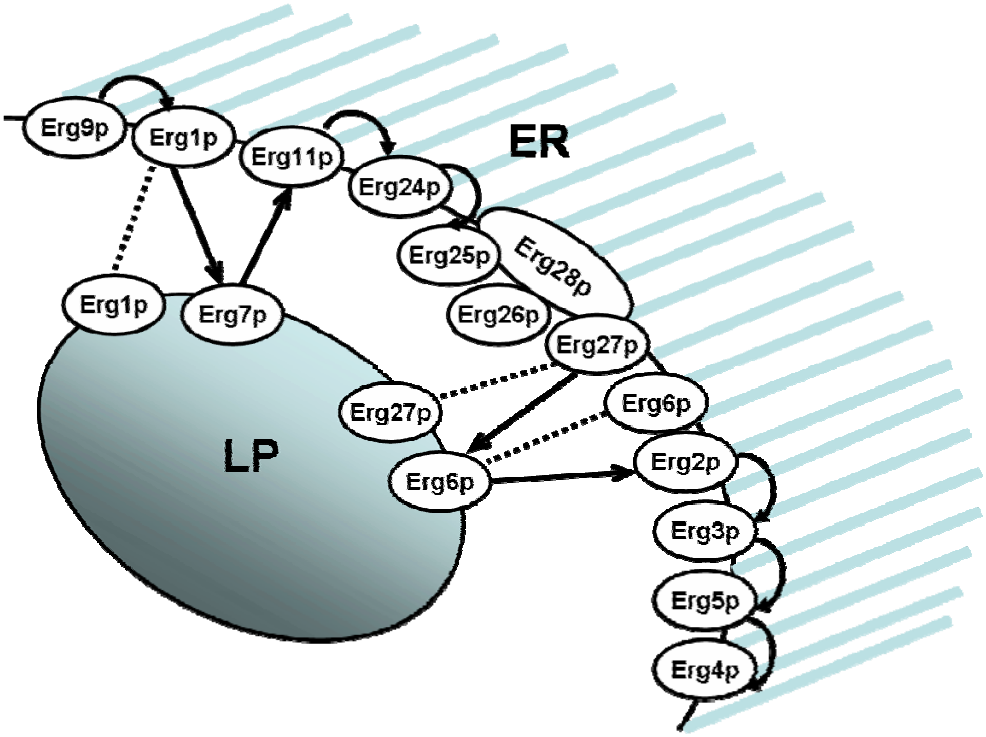


Abb. 2.4: Die Verteilung der Enzyme zur Ergosterolbildung zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und den Lipidpartikeln (LP). Die Pfeile signalisieren den Transportweg der Sterolintermediate. Die gestrichelten Linien deuten auf das Vorkommen der entsprechenden Proteine an einem weiteren Ort in der Zelle hin [Mo et al., 2004, Ott et al., 2005].

Wie auch im Kapitel 2.1.5 beschrieben, gleichen sich die Reaktionsschritte bei allen eukaryotischen Zellen bis zum Zymosterol. Beginnend mit dem Zymosterol ist die weitere Umwandlung der Sterole im Stoffwechselweg für Hefen und Pilze einzigartig. Eine Eigenschaft von Zymosterol hebt seine besondere Rolle in der Ergosterolbiosynthese hervor: Mehrfach konnte gezeigt werden, dass Hefezellen über einen signifikanten Zeitraum überlebensfähig sind, wenn die folgenden Reaktionen zum Endprodukt geblockt sind. Die

Mutation eines Genes im Ergosterolbiosyntheseweg vor der Zymosterolbildung hingegen führt zur Sterolauxothrophie. Handelt es sich dabei um ein Gen vor der Lanosterolbildung, sind die Zellen auch bei Sterolsupplementierung nicht überlebensfähig. Eine Veränderung der Gene bewirkt hier, dass die Sterolaufnahme nicht mehr funktioniert.
Die Deletion des Gens ERG6, das die C24-Methyltranserferase (E.C.2.1.1.41) zur Bildung Fecosterols aus Zymosterol codiert, führt jedoch zu erheblichen Defiziten in den Zellen. Die Permeabilität der Membranen ist gestört, die Kreuzungsfähigkeit reduziert, das Wachstum auf nicht-fermentierbaren C-Quellen beeinträchtigt sowie die Aufnahme von Tryptophan nicht mehr möglich [Lees, et al., 1997, Daum et al., 1998]. Das Erg6p wurde hauptsächlich in den Lipidpartikeln und nur in geringeren Mengen in den ER-Fraktionen nachgewiesen. Die katalytische Wirkung aller nachfolgenden Reaktionen im Ergosterolstoffwechselweg wird mit den ER-Membranen assoziiert [Ott et al., 2005] (Abbildung 2.4).

Die Umsetzung von Fecosterol zu Episterol wird durch eine C8-Isomerase (Erg2p, E.C. 5.3.3.5) katalysiert. Sie führt zur Umlagerung der Doppelbindung im zweiten Sterolring. Diese Reaktion ist die einzige bekannte reversible Umsetzung im Ergosterolstoffwechselweg. Das Gleichgewicht dieser Reaktion befindet sich stark auf der Seite des Episterols [Nagai et al., 1977, Yabusaki et al., 1978]. Im Anschluss wird durch die C5-Desaturase (Erg3p) erneut eine Doppelbindung am C5-Atom im zweiten Sterolring eingeführt. Hierbei entsteht als Produkt Ergosta-5,7-24(28)-trienol. Diese Reaktion benötigt für die Bildung von einem Mol Produkt ein Mol Sauerstoff sowie ein Mol NAD(P)H. Die Bildung von Ergosta-7,7,22,24-tetraenol erfolgt durch die Einführung einer Doppelbindung an der Seitenkette des Sterols durch die d22-Desaturase (Erg5p). Die Reaktion geschieht unter Einbindung eines Cytochromes P450. Wie für alle Cytochrome dieses Typs wird bei der Katalyse eine äquimolare Menge an Sauerstoff verbraucht. Weiterhin benötigt diese Umsetzung NADPH [Lees et al., 1997].
Die finale Ergosterolbildung wird durch die d24-Reduktase (Erg4p, E.C.1.3.1.71) eingeleitet. Auch diese Reaktion erfordert NADPH als Co-Faktor [Neal und Parks, 1977]. Das ERG4-Gen zeigt eine hohe Sequenzhomologie zum ERG24-Gen, welches die d14-Reduktase codiert. Wie auch die Gene ERG6, ERG2, ERG3 und ERG5 ist das Gen ERG4 nicht essentiell für das aerobe Wachstum der Hefe [Lees et al., 1997].
Insgesamt werden für die Bildung eines Mols Ergosterol im Post-Squalensyntheseweg 12 Mol Sauerstoff benötigt. Die ersten Reaktionsschritte bis zur Bildung des Zymosterols erfordern dabei mit 10 Mol den Großteil des Sauerstoffs. Auch werden auch mit 11 der insgesamt 14 Reduktionsäquivalente bis zum Zymosterol oxidiert. Bei dieser Bilanzierung ist zu berücksichtigen, dass es sich um z.T. abgeschätzte Werte handelt, da der genaue Verbrauch der Reduktionsäquivalente nicht vollständig aufgeklärt ist.

Veresterung und Hydrolyse

Im einleitenden Kapitel wurde bereits erwähnt, dass die Sterole in eukaryotischen Zellen sowohl frei als auch mit langkettigen Fettsäuren verestert vorliegen können. Die neutralen Sterolester dienen der Zelle hauptsächlich als Speicherlipide. Die Akkumulation dieser gebundenen Lipide erfolgt in besonderem Maße beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase und bei Beginn der Sporulation. Die Veresterung der Sterolintermediate findet dabei an der Hydroxylgruppe des C3-Atoms statt. Squalen, das kein Sterol ist, verfügt nicht über eine freie OH-Gruppe und steht somit auch nicht der Esterbildung zur Verfügung. Während die freien Sterole in die Membranen eingebaut werden können, sind die an Fettsäuren gebundenen Sterole in der Zelle fast ausschließlich in den Lipidpartikeln nachzuweisen [Zweytick et al., 2000].

Die Esterbildung wird durch zwei Acyl-CoA-Sterolacyltransferasen (ASATs) katalysiert, die als Are1p und Are2p bezeichnet werden [Sandager et al., 2001, Zweytick et al., 2000]. Die Isoenzyme befinden sich beide im ER und weisen eine Aminosäurenhomologie von 43% auf. Bei Untersuchungen wurde festgestellt, dass für die ASAT-Aktivität hauptsächlich das Are2p verantwortlich ist. So werden etwa 65-75% aller in der Zelle vorliegenden Sterolester durch die ASAT des Typs Are2p gebildet. Für das Are2p konnte eine Präferenz für das Endprodukt Ergosterol gezeigt werden, während das Enzym eine etwas geringere Affinität für die anderen Intermediate aufweist [Zweytick et al., 2000]. Das Enzym Are1p hingegen verestert bevorzugt Ergosterolvorstufen, insbesondere Lanosterol [Zweytick et al., 2000, Jensen-Pergakes et al., 2001]. Für die Esterbildung werden von beiden Enzymen hauptsächlich die C16:1 und C18:1-Fettsäuren verwendet [Zweytick et al., 2000]. Die gesättigten Verbindungen C14:0, C16:0 und C18:0 werden von der Hefe nur in geringen Mengen für die Sterolesterbildung genutzt [Müllner und Daum, 2004]. In Deletionsstämmen *are1are2* der Hefe *S.cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die Esterbildung unter aeroben Kultivierungsbedingungen nicht essentiell ist. Die Wachstumsraten in der logarithmischen Phase unterscheiden sich nur geringfügig vom Wildtypstamm. Die Empfindlichkeit gegenüber Terbinafin, einem Inhibitor der Squalenepoxidase, erhöhte sich jedoch signifikant. Ist nur eines der Gene dieser Transferasen deletiert, führt das zu Konzentrationsverschiebungen der freien und veresterten Sterole in den Zellen [Zweytick et al., 2000].

Die Hefezellen haben die Möglichkeit durch membranassoziierte Enzyme veresterte Sterole zu hydrolysieren. Diese Eigenschaft nutzen Hefen, um bereits gespeicherte Lipide wieder zu mobilisieren und für die Stoffwechselprozesse in der Zelle verfügbar zu machen. Die Sterolester können den Enzymen des Ergosterolbiosyntheseweges nicht als Substrat dienen. Bereits 1981 wurde von Taketani *et al.* die Verstärkung der Sterolester-

Hydrolaseaktivität unter anaeroben bzw. semi-anaeroben Bedingungen nachgewiesen. Die verantwortlichen Proteine mit den Bezeichnungen Yeh1p, Yeh2p und Tgl1p wurden erst kürzlich charakterisiert [Müllner et al., 2005, Köffel et al., 2005]. Diese Enzyme in Hefe entsprechen funktionell den sauren Lipasen bei Säugetieren. Während Yeh1p und Tgl1p in den Membranen der Lipidpartikel lokalisiert sind, ist das Protein Yeh2p an die Plasmamembran gebunden [Köffel et al., 2005]. Dabei scheint das Yeh1p unter anaeroben Bedingungen eine besondere Aktivität aufzuweisen, wenn exogene Sterole von der Hefe aufgenommen werden können [Köffel et al., 2006].

2.1.4 Regulation der Ergosterolbiosynthese in der Hefe *S.cerevisiae*

Die Sterolbiosynthese unterliegt hochkomplexen Regulationsmechanismen. Bisherige Untersuchungen konnten vorwiegend die Kontrolle der Ergosterolbiosynthese auf der Transkriptionsebene zeigen [Brandon et al., 2005, Germann et al., 2005, Vik und Rine, 2001]. Dabei handelt es sich oft um Feed-Back-Regulationen, durch die die Hefe auf veränderte Sterollevel reagiert [Davies et al., 2005]. Diese Mechanismen zu verstehen, ist nicht nur wissenschaftlich interessant, sondern aufgrund der ökonomischen Bedeutung der Sterolbiosynthese Gegenstand vieler Forschungsarbeiten (Vgl. Kapitel 2.1.2).

Als Hauptregulationspunkt der Ergosterolbiosynthese wurde oft die Umsetzung vom HMG-CoA zu Mevalonat durch die HMG-CoA-Reduktase im Prä-Squalenweg angesehen. Dieser Reaktionsschritt hängt von vielfältigen Bedingungen ab. So wirkt das Endprodukt Ergosterol nachweislich negativ regulierend auf die Transkription des Isoenzyms Hmg1p [Casey et al., 1992, Veen, 2002]. Aber auch Derivate, die nicht zu den Sterolen gehören, beeinflussen diesen Reaktionsschritt. So wird der Abbau der HMG-CoA-Reduktase durch Farnesyldiphosphat und deren Derivate reguliert [Grabinskaa und Palamarczyka, 2002]. Glukose und ungesättigte Fettsäuren wirken dagegen positiv regulierend auf die Transkription des korrespondierenden Gens [Veen, 2002]. Auch ist die Transkription des Gens HMG1 von Sauerstoff- und Hämkonzentrationen sowie von einigen Trankriptionsfaktoren abhängig [Leber et al., 2001]. Dabei wirken die Hämkonzentrationen sowohl positiv (HMG1) als auch negativ (HMG2) regulierend. Auch die Degradation des Hmg2p im ER wurde als Regulationsinstrument beschrieben [Hampton, 2002]. Bei Überexpressionsversuchen wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der Aktivität der HMG-CoA-Reduktase zu einer vermehrten Squalenproduktion, aber nicht zu einer signifikanten Erhöhung des Ergosterolspiegels in den Zellen führt [Donald et al., 1997, Polakowski et al., 1998]. Die Hefe besitzt demnach weitere Möglichkeiten, eine Sterolhomöeostase zu gewährleisten.

Im Prä-Squalensyntheseweg werden neben dem Gen HMG1 auch die Gene ERG9 und ERG10 in Abhängigkeit der Sterolverfügbarkeit reguliert [Daum et al. 1998]. Für den ERG10-Promotor konnte eine DNA-Sequenz identifiziert werden, die dem menschlichen Pendant SRE sehr ähnlich ist (SRE, Sterol response element) [Germann et al., 2005]. Allerdings wurde bei der Hefe *S.cerevisiae* - im Gegensatz zur Hefe *S.pombe* - keine Homologe der Transkriptionsfaktoren SREP (Sterol regulatory element binding protein) und SCAP (SREP cleavage activating protein) gefunden, mit denen in Säugetierzellen die Sterolsynthese reguliert wird (Vgl. Kapitel 2.1.6).
Die Reaktion des Enzyms Erg1p, das im Post-Squalensyntheseweg die Bildung des Squalenepoxids aus Squalen bewirkt, ist ebenfalls von der Sterolkonzentration abhängig. Dies konnte in Versuchen mit Inhibitoren der Ergosterolbiosynthese nachgewiesen werden, die einen Sterolmangel in den Hefezellen hervorriefen. Es wurde darüber hinaus eine regulatorische DNA-Sequenz in der Promotorregion des ERG1-Gens identifiziert, die bei Deletion zum Verlust der sterolabhängigen Regulation führt [Leber et al., 2001].

In neueren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Regulation auf Transkiptionsebene nicht nur für einzelne Gene typisch ist, wie für das HMG1 und ERG1 beschrieben. Vielmehr wurden regulatorische Proteine identifiziert, die an verschiedenen Stellen der Ergosterolbiosynthese gleichzeitig wirken. So wurden bei der Hefe *S.cerevisiae* die zwei Transkriptionsfaktoren Upc2p und Ecm22p nachgewiesen. Bei Sterolmangel bewirken diese Proteine eine verstärkte Expression der Ergosterolgene ERG2 und ERG3 [Vik und Rine, 2001]. Das Upc2p und das Ecm22p gehören zur Gruppe der binukleären Zinkfinger ($Zn(II)_2Cys_6$). Diese Zinkfinger-Proteine binden an regulatorische DNA-Sequenzen der Promotorbereiche entsprechender Gene, aktivieren ihre Transkription und im Falle der ERG-Gene somit die Sterolbiosynthese [Vik und Rine, 2001, Germann et al., 2005]. Das zentrale Zink-Ion spielt dabei eine wichtige Rolle für das Zusammenlegen der DNA-Stränge [Krauss et al., 2001]. Motive der spezifischen DNA-Sequenzen (SRE), die bei ERG2 und ERG3 gefunden wurden, sind auch bei anderen ERG-Genen nachweisbar. Diese Genabschnitte dienen möglicherweise auch als Bindungsstellen für die Faktoren Upc2p und Ecm22p. Auch eine gemeinsame Regulation der Gene ERG1, ERG7, ERG25, ERG26, ERG27 wurde in diesem Zusammenhang diskutiert [Davies et al., 2005, Davies et. al, 2006]. Valachovic *et al.* 2006 erwähnen hingegen, dass die Gene ERG1, ERG6, ERG8, ERG11, ERG12, ERG13, ERG25 der Transkriptionskontrolle von Upc2p/Ecm22p unterliegen.

Niedrige Sauerstoffverfügbarkeit aktiviert die Transkription der Ergosterolbiosynthesegene in einem sterolabhängigen Mechanismus, der durch das Protein Upc2p vermittelt wird. Die genauen Wechselwirkungen des Proteins Upc2p bei Vorliegen eines Sauerstoffmangels sind

bisher allerdings nicht bekannt. Weiterhin ist das Protein Upc2p für die Aktivierung zweier Gene unter anaeroben Wachstumsbedingen verantwortlich, die für einen ABC -Transporter (*ATP binding casette transporter*) kodieren. Diese ABC-Transporter gewährleisten die Aufnahme von exogenen Sterolen [Wilcox et al., 2002, Espenshade und Hughes, 2007].
Die Transkription der Ergosterolbiosynthesegene in *S.cerevisiae* ist weiterhin durch Sauerstoff über den häm-abhängigen Transkriptionsfaktor Hap1p (*heme activated protein*) sowie durch das Regulatorprotein Rox1p reguliert, das etwa ein Drittel der Gene unter anaeroben Bedingungen kontrolliert [Kwast et al., 1998, Kwast et al., 2002]. Das Hap1p ist ebenfalls ein $Zn(II)_2Cys_6$-Transkriptionsfaktor, der sich auf die Gene HMG1, ERG9 und ERG11 sowie auf das Gen ARE2 (Sterolveresterung) auswirkt. Wahrscheinlich beeinflusst das Hap1p diese Gene nur indirekt, da das Protein auch für die Repression durch Rox1p benötigt wird. Ein Zusammenhang der Regulation durch das Rox1p konnte im Bereich der Sterolbiosynthese in Hefe für das Enzym Erg11p, die NADH-Cytochromreduktase P450 und sowie für das Hmg2p gezeigt werden [Valachovic et al., 2006].

Da durch die Veresterung vormals polare Lipide in der Zelle neutralisiert bzw. gespeichert werden können, spielt sie für den Sterolhaushalt eine wichtige Rolle. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, dass auch die Veresterungsenzyme Are1p und Are2p Kontrollmechanismen unterliegen, die sich auf die gesamte Sterolzusammensetzung in der Hefezelle auswirken. Arthington-Skaggs *et al.* konnten 1996 erstmal zeigen, dass bei fehlender Veresterung die intrazelluläre Gesamtkonzentration der Sterole sinkt. Diese negative Regulation konnte am Erg3p demonstriert werden. Es wurde weiterhin festgestellt, dass Are1p, das vornehmlich für die Esterbildung von Ergosterolvorstufen verwendet wird, stärker exprimiert wird, wenn Sterolvorstufen in der Zelle akkumulieren. Eine erniedrigte Ergosterolkonzentration induziert ebenfalls eine vermehrte Expression der beiden Veresterungsenzyme. Auch wurde nachgewiesen, dass die Expression der Gene ARE1 und ARE2 keiner Endprodukthemmung unterliegt [Jensen-Pergakes et al., 2001].

Die beiden Isoenzyme Are1p und Are2p werden bezogen auf die Häm-Konzentrationen in der Zelle gegensätzlich reguliert (ähnlich HMG1 und HMG2). Für die vermehrte Expression des ARE2 bei hohen Häm-Konzentrationen ist das Hap1p verantwortlich, das an eine Consensus-Sequenz des ARE2 bindet. Diese DNA-Sequenz fehlt jedoch beim Gen ARE1. Eine verstärkte Are1p-Synthese wurde unter sauerstofflimitierten Bedingungen festgestellt. Dies lässt auf eine wichtige Funktion dieses Proteins während des anaeroben Wachstums schließen [Jensen-Pergakes et al., 2001].

2.1.5 Cholesterolbiosynthese in Säugerzellen

Einführung

Die Cholesterolbiosynthese findet im menschlichen Körper hauptsächlich in den Leberzellen statt. Aber auch in den Zellen anderer Organe und Gewebe, wie Darm und Haut kann das Cholesterol gebildet werden. Das Cholesterol ist für den menschlichen Organismus lebensnotwendig. Es wird nicht nur als essentielle Membrankomponente oder als Vorstufe des Vitamins D benötigt. Auch ist Cholesterol für das Wachstum der Zellen und als Vorstufe vieler Steroidhormone, wie z.B. Progesteron, Testosteron, Östradiol und Cortisol von essentieller Bedeutung. Die Salze der Gallensäuren Glykocholat und Taurocholat leiten sich ebenfalls aus Cholesterol ab. Defekte im Cholesterolstoffwechsel führen deshalb beim Menschen zu meist schweren Krankheitsbildern, wie dem Smith-Lemli-Opitz Syndrom [Yu und Patel, 2005, Maxfield und Tabas, 2005], Lathosterolosis [Herman, 2003] oder auch der Hypercholesterinämie [Palinski et al., 2007]. Daher ist die Synthese des Cholesterols seit seiner Entdeckung 1769 Bestandteil zahlreicher Forschungsarbeiten [Dam, 1958, Espenshade und Hughes, 2007]. In den letzten 15 Jahren wurden die biochemischen Reaktionen des Synthesewegs weitgehend aufgeklärt. Jedoch gibt es weiterhin ein ungebrochenes Interesse an der Aufklärung der Regulationsmechanismen und vielseitigen Interaktionen innerhalb des Lipidmetabolismus.

Prä-Squalensyntheseweg

Ähnlich der Ergosterolbiosynthese in Hefe lässt sich auch die Cholesterolbiosynthese in einen Prä- und einen Post-Squalensyntheseweg unterteilen. Dabei verlaufen die Reaktionen bis zum Squalen identisch. Die beteiligten Enzyme sind streng konserviert, weshalb eine Untersuchung der Synthese am Hefesystem von Nutzen für die Aufklärung der Synthese in Säugerzellen sein kann. Die dortigen Syntheseschritte können ebenfalls durch Abbildung 2.2 veranschaulicht werden. Allerdings wird den Enzymbezeichnungen nicht die Vorsilbe Erg angehängt.

Post-Squalensyntheseweg

Einige Umsetzungen in Säugerzellen innerhalb des Post-Squalensynthesewegs werden durch die gleichen Enzyme wie in Hefe katalysiert. So ist der erste Schritt, bei dem eine Squalenepoxidase sowie eine Lanosterolsynthase die Ausbildung des Sterolrings unter Verbrauch eines Moleküls Sauerstoff bewirken, stark konserviert. Das Lanosterol wird dann durch die entsprechende C14-Demethylase (E.C.1.14.13.70, auch Erg11p) sowie die C14-Reduktase (E.C.1.3.1.70, auch Erg24p) in das 4,4-Dimethylzymosterol (auch als 4,4-Dimethyl-5α-cholesta-8,24-trienol) umgewandelt [Marijanovic et al., 2003]. Für diese Reaktion sind drei Moleküle Sauerstoff notwendig. Eine Variante im

Cholesterolbiosyntheseweg sei an dieser Stelle erwähnt: Es konnte eine Reaktion der Desmosterolreduktase am Lanosterol nachgewiesen werden, die hier zum 24,25-Dihydrolanosterol führt [Gaylor, 2002]. Ähnlich dieser Umwandlung konnten auch noch weitere Nebenreaktionen in der Cholesterolbiosynthese identifiziert werden, da einige Enzyme unterschiedliche Substrate verstoffwechseln. Die Affinität zu den verschiedenen Substraten ist jedoch sehr unterschiedlich. So konnte Bae *et al.* (1997) eindeutig zeigen, dass die Demethylierung zu 4,4-Dimethylzymosterol die bevorzugte Reaktion darstellt. Diese Ansicht ist weitläufig akzeptiert [Waterham et al., 2001, Gaylor, 2002].

Die Bildung des Zymosterols aus dem 4,4-Dimethylzymosterol erfolgt zunächst analog zur Reaktion in der Hefe *S.cerevisiae* mittels einer C4-Methyloxidase (E.C.1.14.13.72) sowie einer C4-Decarboxylase (E.C.1.1.1.170). Das letzte beteiligte Enzym bei der Reaktion zum Zymosterol ist eine 3-Ketoreduktase (E.C.1.1.1.270). Beim Hefesystem werden diese drei Enzyme mit Erg25p, Erg26p und Erg27p abgekürzt [Marijanovic et al., 2003]. Die gesamte Umsetzung zu einem Mol Produkt erfordert in allen Organismen sechs Mol Sauerstoff.

Das Zymosterol stellt das letzte Sterol der Cholesterolbiosynthese dar, das auch als Zwischenprodukt in der Ergosterolbiosynthese der Hefe zu finden ist. In den letzten Syntheseschritten der Cholesterolbiosynthese werden zum Teil die gleichen Enzyme wie bei der Ergosterolbildung benötigt. Aufgrund der verschiedenen Edukte bilden sich jedoch unterschiedliche Sterolintermediate aus. Wie in Abbildung 2.5 dargestellt, wird im weiteren Verlauf der Cholesterolbildung das Zymosterol durch die C24-Reduktase (E.C.1.3.1.72) in Cholesta-8-enol umgewandelt. Ein Pendant dieses Enzyms existiert in der Hefe als Erg24p, das aber als C4-Reduktase nicht an den finalen Reaktionen im Ergosterolmetabolismus beteiligt ist. Die C8,7-Isomerase (E.C.5.3.3.5) katalysiert im Anschluss die Bildung von Lathosterol (Cholesta-7-enol). Diese Isomerase ist in der Hefe als Erg2p für die Umsetzung vom Fecosterol zum Episterol verantwortlich.
Durch eine C5-Desaturase (E.C.1.14.21.6, auch Lathosteroloxidase) wird bei der Cholesterolbiosynthese im zweiten Sterolring eine weitere Doppelbindung eingeführt, so dass 7-Dehydrocholesterol entsteht. Das gleiche Enzym (Erg3p) bewirkt in *S.cerevisiae* die die Bildung von Ergosta-5,7-trienol aus Episterol. Für die Bildung des Cholesterols wird durch die 7-Dehydrocholesterol-Reduktase (E.C.1.3.1.21) eine Doppelbindung im zweiten Sterolring entfernt (Vgl. Abbildung 2.5). Dieses Enzym ist bei Hefen und Pilzen nicht nachweisbar und stellt somit einen wichtigen Unterschied zwischen Ergosterol- und Cholesterolbiosynthese dar. Fehlt es beim Menschen, führt das zur Ausbildung des Smith-Lemli-Opitz-Syndroms.

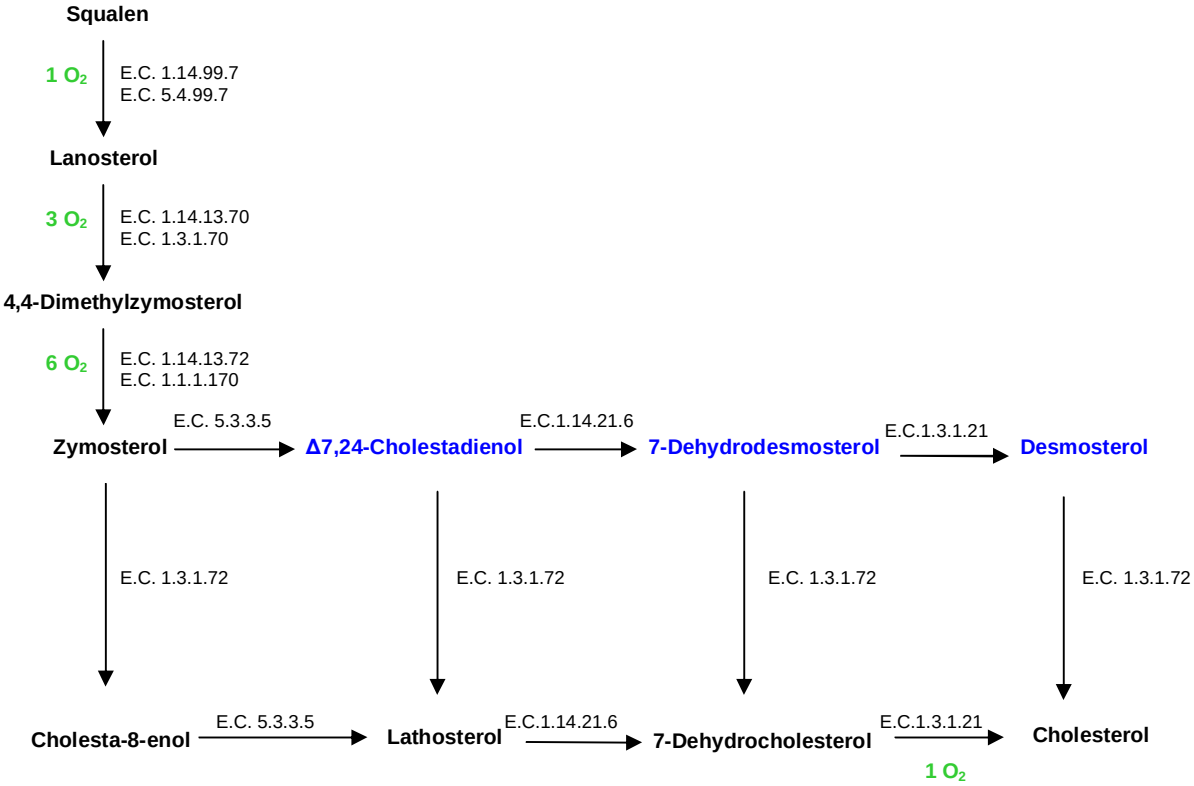


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Post-Squalensynthesewegs im Cholesterolstoffwechsel. Angegeben sind die beteiligten Enzyme sowie die Menge der Sauerstoffmoleküle, die für die Umsetzungen benötigt werden. Blau gekennzeichnet: Variante der Cholesterolbiosynthese über Desmosterol.

Für die Bildung von Cholesterol aus Zymosterol gibt es eine Variante, die zur Bildung von Desmosterol in Säugetierzellen führt. Die entsprechenden Reaktionen sind in Abbildung 2.5 gezeigt, da Desmosterol häufiger bei Untersuchungen der Cholesterolbiosynthese detektiert wird. Dennoch stellt diese Variante eine kaum genutzte Alternative dar. Es konnte definitiv bewiesen werden, dass die Reduktion an der C24,25-Doppelbindung der Seitenkette bevorzugt direkt nach der Zymosterolbildung erfolgt [Bae et al.,1997].

Bei der Variante über Desmosterol wird nach der Zymosterolsynthese zunächst die Doppelbindung im zweiten Sterolring umgelagert. Unter Einwirkung der C8,7-Isomerase entsteht das Intermediat Cholesta-7,24-dienol. In einer anschließenden Reaktion bewirkt die Lathosteroloxidase die Entstehung von 7-Dehydrodesmosterol, das wiederum auch Substrat für die 7-Dehydrocholesterolreduktase ist. Deshalb wird in einem weiteren Syntheseschritt das Desmosterol gebildet. Wie in Abbildung 2.5 dargestellt, sind die Intermediate Cholesta-7,24-dienol, 7-Dehydrodesmosterol und Desmosterol mögliche Substrate für die C14-Reduktase.

Die endogene Synthese stellt eine Möglichkeit der Zelle dar, Cholesterol in ausreichenden Mengen zur Verfügung zu stellen. Säugetierzellen können auch exogenes Cholesterol aufnehmen. Hauptsächlich stammt dieses Cholesterol von LDLs (*Low densitiy lipid protein*), die an den sog. LDL-Rezeptoren an der Plasmamembran andocken. Über einen Mechanismus, der als Clathrin-abhängige Endocytose bekannt ist, wird das Cholesterol in die Zelle transportiert.

Veresterung und Hydrolyse

Sterole in Säugerzellen können ebenfalls sowohl frei als auch verestert vorliegen. Besonders durch die Aufnahme von exogenem, freiem Cholesterol, das bei Überakkumulation toxisch wirkt, ist eine zügige Bildung von Neutralfetten für die Zellen essentiell. Es ist bekannt, dass die Veresterung von überschüssigem Cholesterol im ER stattfindet. Die eigentliche Veresterungsreaktion an langkettige Fettsäuren katalysiert das Enzym AcylCoA:Cholesteroltransferase, kurz ACAT. Die Aktivität der ACAT beruht auf zwei Iso-Enzymen, der ACAT1 und der ACAT2. Diese Proteine scheinen sich in Ihren Aufgaben zu ergänzen [Chang et al., 2001]. So ist in Hautzellen, Makrophagen und adrenalen Zellen ACAT1 an ca. 90% der Veresterungen beteiligt. Bei Zellen der intestinalen Schleimhäute hingegen wird vorwiegen ACAT2 für diese Reaktion benötigt. Die Bildung von Estern der Sterolintermediate ist hingegen kaum in der Literatur beschrieben. Sie können aber ebenfalls den beiden Iso-Enzymen als Substrat dienen [Chang et al., 2006].

Die genaue Regulierung der ACAT ist bisher nicht im Detail geklärt [Leppimäki et al., 2000]. Es wird aber vermutet, dass Cholesterol auf das Enzym positiv regulierend wirkt. Für Fibroblasten gilt diese Annahme bereits als gesichert [Chang et al., 2006].

Die Hydrolyse der Cholesterolester und die Funktionen verschiedener daran beteiligter Enzyme sind noch nicht genau verstanden. Es wurden einige Gene identifiziert, die möglicherweise Proteine codieren, die zur Freisetzung der gespeicherten Lipide führen. Fest steht bereits, dass die Veresterung wie die Hydrolyse kontinuierlich in den Zellen stattfindet. Das verantwortliche Enzym wird als Cholesterolesterhydrolase, kurz CEH, bezeichnet [Yeahman, 2004].

2.1.6 Regulation der Cholesterolbiosynthese

Während der Biosynthese des Cholesterols soll das physiologische Cholesterol-Fettsäurenverhältnis in der Zelle konstant bleiben [Thewke et al., 2000]. Deshalb muss die Aktivität aller an der Cholesterolbildung beteiligten Enzyme genau abgestimmt sein. Hierfür kontrolliert ein integraler, in der ER-Membran lokalisierte Proteinkomplex (SCAP/SREBP) die Expression etlicher Gene, die für den Cholesterolmetabolismus relevant sind. Dabei wirken die SREBPs (*Sterol regulatory element-binding proteins*) als Transkriptionsfaktoren. Das

Membranprotein SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*) bindet mit einer hohen Affinität and das SREBP.

Wenn die Cholesterolkonzentrationen in der Zelle sinken, kann sich der SCAP/SREBP-Komplex von der ER-Membran lösen und über den Sekretionsweg zum Golgi-Apparat transportiert werden. Dort spalten zwei Proteasen (S1P und S2P) den Komplex. Es entsteht ein lösliches SREBP, das aufgrund einer N-terminalen Domäne als Transkriptionsfaktor wirkt. Diese Domäne enthält ein Protein (*basic helix loop helix leucine zipper*), das zu der Familie der bHLH-Zip Transkriptionsfaktoren gehört [Chang et al., 2006, Goldstein et al., 2006]. Dieses Protein dringt in den Nucleus ein und bindet an viele Gene, die für die Lipidbiosynthese notwendig sind. Die DNA-Sequenzen enthalten daher sog. SRE-DNA-Regionen (SRE: *Sterol regulatory element*) als Bindungsstellen. Die für die Cholesterolbiosynthese notwendigen Proteine werden ausnahmslos vom bHLPH-Zip aktiviert - inklusive der HMG-CoA-Reduktase [Braun und Goldstein, 1997, Horton et al., 2002].

Das SREBP reguliert aber nicht nur direkt die *de novo* Synthese des Cholsterols, sondern veranlasst auch die Transkription von Genen der LDL-Rezeptoren. Auf diese Weise wird auch die exogene Sterolaufnahme bei Cholesterolmangel verstärkt [Espenshade und Hughes, 2007]. Ist das Cholesterol in hohen Mengen in der Zelle vorhanden, ist das SREBP inaktiv. Das SCAP erkennt durch eine spezifische, membrangebundene Domäne den erhöhten Cholesterolgehalt. Es ändert seine Konformation, so dass der SCAP/SREBP-Komplex nicht mehr zum Golgi-Apparat transportiert werden kann. Somit können die Proteasen S1P und S2P nicht länger die aktivierende Domäne abspalten. Die Synthese sowie die exogene Aufnahme des Cholesterols werden umgehend gestoppt.

Der wesentliche Unterschied im Vergleich zur Hefe besteht darin, dass es in *S.cerevisiae* kein Homolog zum SREBP gibt. Allerdings kontrollieren die Enzyme Upc2p und Ecm2p die Transkription als Reaktion auf einen intrazellulären Sterolmangel.

Ein weiterer Regulationsmechanismus der Cholesterolbiosynthese greift auf post-transkriptioneller Ebene. Hierbei wird die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase kontrolliert, die als Enzym des Prä-Squalensynthesewegs die Bildung von Mevalonat bewirkt. Als solches hat dieses Enzym eine besondere Bedeutung bei der Bereitstellung aller in der Zelle benötigten Isoprenoide. Neben der Steuerung der Transkription durch das SREBP wird die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase durch einen Sterol-abhängigen Abbau dieses Enzyms geregelt [Horton et al., 2002]. Interessanterweise ist nicht Cholesterol, sondern das Sterolintermediat Lanosterol ein starker Induktor dieses Abbaus. Cholesterol kann nur in geringem Maß die Degradation beeinflussen [Song et al., 2005]. Hierfür binden die ebenfalls in die ER-Membran eingebetteten Proteine Insig1 und Insig2 an die HMG-CoA-Reduktase und bauen es innerhalb von einer Stunde ab [Gil et al., 1985].

2.2 Fettsäuren

2.2.1 Einführung

Fettsäuren gehören wie die Sterole zur Stoffgruppe der Lipide. Sie setzen sich aus einer hydrophilen Carboxylgruppe sowie einer unverzweigten Kohlenwasserstoffkette zusammen, die in ihrer Länge variieren kann. Wenn diese Kette konjugierte C-C- Verbindungen enthält, spricht man von einer ungesättigten Fettsäure. Sind keine Doppelbindungen vorhanden, werden die Fettsäuren als gesättigt bezeichnet.

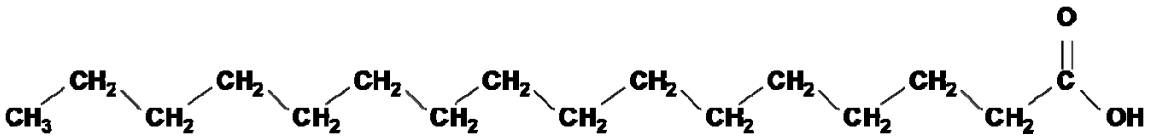


Abb. 2.6: Darstellung der chemischen Struktur der gesättigten C16:0 Fettsäure (Palmitinsäure).

Fettsäuren (*Fatty acids*, FA) sind trotz ihrer Einfachheit in ihrer chemischen Struktur eine Vielzahl biologischer Funktionen zuzuschreiben. Sie sind Bestandteil von neutralen und polaren Lipiden, fungieren als Seitenketten von Co-Enzymen oder sekundären Metaboliten. Weiterhin dienen Fettsäuren der Energiespeicherung der Zellen. In eukaryotischen Zellen sind Fettsäuren auch an bestimmte Proteine oder an Messenger-Moleküle gebunden [Schweizer, 2004]. Daher ist der multifunktionale Fettsäuren-Synthase-Komplex (FAS) ein Haushaltsenzym der eukaryotischen Zelle, das besonders an *S. cerevisiae* untersucht wurde.

2.2.2 Wechselwirkung der Fettsäuren mit Sterolen in eukaryotischen Zellen

In eukaryotischen Zellen ändern sich sowohl die Zusammensetzung als auch die Konzentrationen der Fettsäuren und Sterole je nach Bedarf zur Einstellung der Membranfluidität. Neben ihrem Einfluss auf die Membraneigenschaften sind beide Stoffklassen für die Funktion membrangebundener Enzyme verantwortlich. Auch ist es für die Vitalität der Organismen entscheidend, dass die intrazellulären Konzentrationen der Lipide (Sterole und Triglyceride) unterhalb der Toxizitätsgrenzen verbleiben. Das geschieht, wie bereits erwähnt, durch die Veresterung an Fettsäuren. Daher unterliegen Synthese, Transport, Neutralisation und Lagerung der Fettsäuren und Sterole Regulationen, die miteinander verknüpft sein müssen.

Es wurde berichtet, dass bei Untersuchungen der menschlichen Hep2g-Zellen Sterole direkten Einfluss auf die Fettsäurenbiosynthese haben. So führte eine Supplementierung des Kulturmediums mit Sterolen zu einer veränderten Expression von FAS-Genen, die für die Fettsäurenbiosynthese essentiell sind [Bennett et al., 1995]. Andererseits konnte bei

Experimenten mit *S.cerevisiae* bereits 1987 gezeigt werden, dass ungesättigte Fettsäuren die HMG-CoA-Reduktase aktivieren und somit wiederum die Sterolbiosynthese beeinflussen [Lorenz und Parks, 1987]. Auch führt eine Mutation des Ergosterolsynthesegens ERG25 zu markanten Veränderungen des gesamten Lipidmetabolismus. Dies äußert sich auch in der Akkumulation von Fettsäuren [Li und Kaplan, 1996]. Weiterhin ging aus Microarray-Analysen hervor, dass sich die Deletion der Gene HAP1 sowie ROX1, über indirekte Zusammenhänge auf die Fettsäurenbiosynthese auswirken [Linde und Steensma, 2002]. Wie im Abschnitt *Regulation der Ergosterolbiosynthese* beschrieben, spielen die Gene HAP1 und ROX1 eine bedeutende Rolle beim kontrollierten Ablauf der Sterolbiosynthese in Hefe.

Für die freien Fettsäuren und für die freien Sterole gilt gleichermaßen, dass sie aufgrund ihrer Grenzflächenaktivität von den Zellmembranen ferngehalten werden müssen. Die Fettsäuren können zur Neutralisation auch an Glyzerin anstelle der Sterole gebunden werden. In Lipidtröpfchen (*Cytosolic lipid droplets*, CLD bzw. *Lipid particles*, LP) werden die Neutrallipide in der Zelle gespeichert. Die CLDs in Säugetierzellen als auch die LPs in Hefe enthalten eine Reihe von Proteinen, die am Lipidmetabolismus, an der Zellsignalgebung und am Membrantransport beteiligt sind [Garbarino und Sturley, 2005]. Die regulatorische Wirkung dieser Proteine aus Lipidpartikeln in der Hefe *S.cerevisiae* konnte sowohl für die Fettsäuren-, die Triglyceridsynthese, den Triglyceridabbau als auch im Sterolmetabolismus nachgewiesen werden [Athenstaedt et al., 2006]. Die Bildung neutraler Lipide in den CLD bzw. LP ist dabei stark konserviert. So sind den beteiligten Enzymen der Hefe (Are1p, Are2p, Dag1p, Lro1p) entsprechende Homologe in menschlichen Zellen zuzuordnen (Acat1, Acat2p, Dgat1p, Lcat1p).

Sterole und Fettsäuren sind je nach geforderter Membranbeschaffenheit in bestimmten Verhältnissen vorzufinden. In Hefe zeigt sich ein gestörtes Sterol-Fettsäurenverhältnis durch geringeres Wachstum oder erniedrigte Toleranz gegenüber veränderten Umgebungsbedingungen, da die Anpassung oft mit einer Umgestaltung der Membran einhergeht. An Rattenhepatozyten konnte gezeigt werden, dass sich verfügbare Fettsäuremengen in den Zellen auch auf die Sterolbiosynthese auswirken [Dulpus et al., 2000]. In humanen Zellen ist eine gemeinsame Deregulation des Sterol– und Fettsäuregehaltes bei Fettleibigkeit, TypII Diabetes, Arteriosklerose oder auch Neurodegeneration feststellbar [Garbarino und Sturley, 2005].

Einen Einfluss auf Fettsäuren- und Sterolgehalte können auch Sphingolipidvorkommen haben. Sphingolipide sind ebenfalls Membranbestandteile höherer Eukaryonten. Sie enthalten Ceramide, welche in Hefe- und Säugerzellen im ER aus Sphingobasen synthetisiert werden. Sphingobasen werden wiederum aus Fettsäuren aufgebaut. D.h. die Fettsäurenverfügbarkeit in der Zelle muss durch Kontrollmechanismen sowohl für die Sphingolipidsynthese als auch für die Sterolesterbildung gewährleistet sein. Durch Untersuchungen der Sphingolipidsynthese am Hefesystem konnte ein Einfluss bei der Bildung der langkettigen Fettsäuren (VLCFA, v*ery long chain fatty acids*) durch Elongasen auf die Ergosterolbiosynthese gezeigt werden [Eisenkolb et al., 2002]. Vermutet wird, dass diese Fettsäuren aufgrund ihrer Funktionen in der intrazellulären Sortierung und dem Transport Auswirkungen auf andere Lipidsynthesen haben. Wird nicht nur das ELO1-Gen, sondern auch ein Gen der Ergosterolbiosynthese ERG6 verändert, wirkt diese Kombination letal. Daher gilt der enge Zusammenhang zwischen Fettsäuren- und Sterolbiosynthese als erwiesen [Tehlivets et al., 2007]. Das Motiv der DNA-Sequenz, an der die Transkriptionsfaktoren der Ergosterolbiosynthese ansetzen, konnte auch bei einem Gen der Sphingolipidsynthese gefunden werden (LCB1/2, eine Serin-Palmitoylransferase). Daher kann hier von einer gemeinsamen Regulation auf Transkriptionsebene ausgegangen werden [Germann et al., 2005].

2.2.3 Fettsäurenbiosynthese in eukaryotischen Zellen

Sowohl in Hefe als auch in Säugerzellen findet die Fettsäurebiosynthese im ER statt. Sie wird durch ähnliche Enzyme katalysiert [Dulpus et al., 2000]. Die grundlegenden Reaktionsmechanismen der Fettsäurensynthese sind seit vielen Jahren aufgeklärt und wurden mehrmals zusammenfassend beschrieben [Trotter et al., 2000, Schweizer et al., 2004]. Die FAS wird in die Typen FAS I, die im eukaryotischen Cytoplasma zu finden sind, und FAS II, die in Bakterien und eukaryotischen Organellen vorkommen, unterteilt [Hiltunen et al., 2005]. Die FAS setzt sich in der Hefe *S.cerevisiae* aus den Untereinheiten α (FAS1) und β (FAS2) zusammen. Die *de novo* Synthese ist schematisch in Abbildung 2.7 dargestellt. In *S.cerevisiae* wird für die Fettsäurenbiosynthese eine Acetyl-CoA-Carboxylase (*ACC1* bzw. *FAS3*) benötigt. Dabei beginnt die Bildung der Fettsäuren mit der Übertragung eines Acetylrestes vom Co-Enzym A (CoA) an eine spezielle Bindungsstelle der FAS, welches aus den Untereinheiten α (*FAS1*) und β (*FAS2*) zusammengesetzt ist.

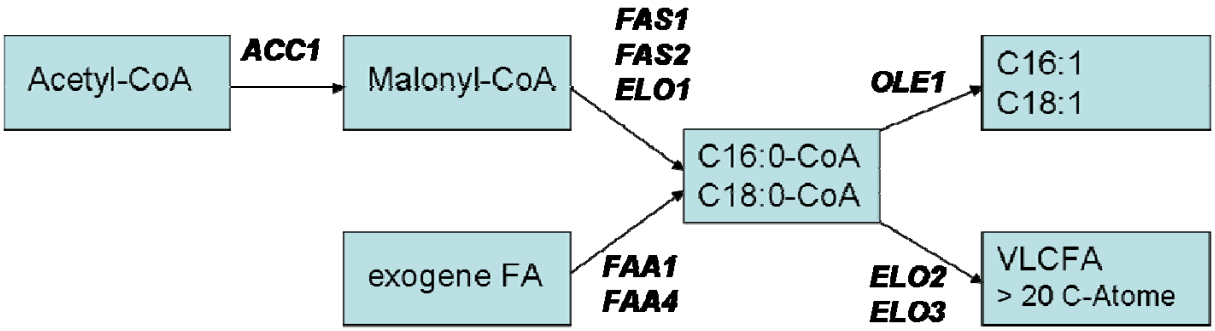


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der Sterolbiosynthese nach Trotter (2001). Abkürzungen: CoA Coenzym A, FA Fatty Acids (Fettsäuren), C16:0 Palmitinsäure, C18:0 Stearinsäure, C16:1 Palmitoleinsäure, C18:1 Ölsäure, VLCFA Very Long Chain Fatty Acids (sehr langkettige Fettsäuren).

Das Kettenwachstum der Fettsäure setzt sich durch mehrere Zyklen einer Malonyl-Transacylierung fort. In der Hefe wird das Endprodukt dieser Synthese, Palmitinsäure (C16:0), hydrolytisch vom Komplex gelöst. Die Verlängerung der Fettsäurenkette wird in der Zelle durch drei unterschiedliche Elongasen erreicht: Die Elongasen des Typ I verlängern C12-C16, des Typ II C16-C18 bis zu C22-Ketten und mit dem Typ 3 werden die VLCFA (sehr lange Fettsäurenketten, *very long chain fatty acid*s) synthetisiert. Die Hefe ist nur in der Lage, unter aeroben Kultivierungsbedingungen einfach ungesättigte Fettsäuren (C16:1 Palmitoleinsäure, C18:1 Ölsäure) durch die membrangebundene △9-Desaturase (OLE1 Genprodukt) zu bilden.

Im Kulturmedium enthaltene Fettsäuren können von der Zelle durch Diffusion oder durch Membranproteine aufgenommen werden. Exogene langkettige Fettsäuren werden schnell in komplexe Lipide, wie zum Beispiel Membranlipide eingebaut. Die Acyl-CoA-Synthetasen FAA1p oder FAA4p werden benötigt, um die exogenen Fettsäuren durch einen CoA-Rest zu aktivieren. Erst dann können die langkettigen Fettsäuren durch Membranen transportiert und abgebaut werden [Trotter, 2001].

2.2.4 Regulation der Fettsäurenbiosynthese in der Hefe *S.cerevisiae*

Durch Überexpressionsstudien konnte gezeigt werden, dass die Gene FAS1 und FAS2 sowie ACC1 einer gemeinsamen Regulation unterliegen [Trotter, 2001]. Dabei wird die Expression von FAS1 und FAS2 durch die Anwesenheit von Fettsäuren unterdrückt. Ein Rückgang der Transkription bei Zugabe exogener Fettsäuren ist sowohl bei FAS1 und FAS2 als auch bei ACC1 um 50-70% zu beobachten. [Trotter, 2001]. Für die Gene FAS1 und FAS2 gilt, dass sie teilweise konstitutiv exprimiert werden, wobei hier generelle Transkriptionsfaktoren der Hefe eine Rolle spielen. So binden die Faktoren Rap1, Abf1 und Reb1 im Falle von FAS1 sowie Reb1 im Falle von FAS2 jeweils im Upstream-Bereich der

Promotorregionen. Sie gewährleisten, dass ausreichende Mengen an Fettsäuren dem allgemeinen Zellmetabolismus zur Verfügung stehen (*house keeping functions*) [Schweizer und Hoffmann, 2004].

Darüber hinaus ist der Mechanismus bekannt, der die Transkription der Gene der FAS und auch der Phosholipidsynthese gleichermaßen steuert [Athenstedt et al., 2006, Schweizer und Hoffmann, 2004]. So reguliert ein Inositol/Cholin Response-Element (ICRE) die Expression der FAS-Gene neben weiteren Phospholipidsynthese-Genen [Schwank, 1997, Trotter, 2001]. Dieses Element wurde jeweils in den Promotorregionen gefunden. An die entsprechende Consensus-Sequenz kann dann ein regulatorisches Protein, ein sog. bHLH-Protein (*basis helix-loop-helix proteine*) binden. Dieses Protein besteht wiederum aus jeweils zwei Untereinheiten der Proteine Ino2p und Ino4p. Das bHLHp wirkt aktivierend auf die Transkription, wenn die intrazellulären Inositol/Cholinmengen sinken. Ein negativer Regulator mit der Bezeichnung Opil wirkt im Zusammenspiel mit den bHLH-Proteinen reprimierend, wenn die Phospholipidprecursor im Überschuss in der Zelle vorliegen. Ein weiterer Mechanismus regelt die gemeinsame Expression der Fettsäurensynthasen. Hierbei spielt ein sog. DRS-Element in der DNA-Sequenz der FAS2 eine Rolle, das bei FAS1-Deletion auch zur Abnahme der Transkription des FAS2-Gens führt [Schweizer und Hofmann, 2004].

Die Regulation des Gens OLE1, das die gesättigte Palmitin- und Stearinsäure (C16:0 und C18:0) in die einfach ungesättigte Palmitolein- bzw. Ölsäure überführt, erfolgt durch Transkriptionskontrolle. Werden exogene, gesättigte Fettsäuren durch die Zelle aufgenommen, ist eine Steigerung der Expression des OLE1 zu beobachten. Die Aufnahme von ungesättigten Fettsäuren führt jedoch zu einer starken Abschwächung der Transkription [Dulpus et al., 2000].

Auch eine post-translationale Kontrolle dieser Synthese ist bekannt. So konnte ein proteolytischer Abbau der FAS nachgewiesen werden, wenn diese Proteine in der Zelle im Überschuss vorliegen. Diese fein abgestimmte Degradation tritt vor allem bei unfertigen FAS auf, bei denen beispielsweise die Untereinheiten des Enzyms noch nicht vollständig zusammengesetzt sind [Schweizer und Hofmann, 2004].

2.3 Metabolic Modelling

2.3.1 Stoffflussanalyse (*Metabolic flux analysis, MFA*)

Durch Konzentrationsmessungen der Metabolite innerhalb eines Syntheseweges oder Reaktionsnetzwerkes lassen sich die dynamischen Abläufe der Umsetzungen alleine nicht feststellen. Um die Stoffumsätze beschreiben zu können, bietet sich eine Abschätzung der Stoffflüsse an. Grundlage hierfür ist die Kenntnis der Stöchiometrie der betrachteten Reaktionen. Auf Basis der Bilanzen dieser Stoffumwandlungen lassen sich stöchiometrische Matrizen erstellen. Die Lösung dieser gekoppelten Bilanzgleichungen erlaubt dann eine näherungsweise Wiedergabe der Stoffflüsse im bilanzierten System. GC-MS bzw. LC-MS Techniken werden dabei zur hinreichend genauen Quantifizierung der Metabolitkonzentrationen genutzt [Schaub et al., 2008]. Die Verfolgung markierter Isotope durch NMR-Analysen zur Bestimmung von Stoffflüssen stellt eine weitere Vorgehensweise dar [Sauer et al., 1999].

Für eine erfolgreiche Stoffflussanalyse auf Grundlage von Massenbilanzen müssen einige Randbedingungen erfüllt sein [Stephanopoulos, 1999]. Zunächst sollte die Anzahl der Messungen größer sein als die Anzahl unbekannter Metabolite des Stoffwechsels. Diese Messredundanz erlaubt eine Überprüfung des angenommen Stoffwechselweges und der durchgeführten Messungen. Sollten die Messdaten unvollständig sein, wird ein „*try and error*-Prozess“ notwendig. Bei diesem Verfahren werden die vorhandenen Messdaten iterativ verändert, um sich dem kleinsten Gesamtfehler zu nähern.
Unentbehrliche Grundlage ist die umfassende Kenntnis des zugrunde liegenden Stoffwechselweges. Dafür müssen die möglichen Stoffzu- und Stoffabflüsse der einzelnen Intermediate eindeutig definiert sein. Darauf aufbauend kann dann für jedes Intermediat i eine Massenbilanz aufgestellt werden, die die Stofftransportströme enthält. Der folgende allgemeingültige Bilanzansatz

$$Speicherung = Wandlung + Transport \qquad [2.1]$$

bildet die Grundlage für die Formulierung der Massenbilanzen. Für eine Komponente entspricht der Speicherterm einer Stoffmenge X_i, die in der Zeit t in den Zellen akkumuliert [Edwards et al., 1999]. Der Wandlungsterm kann als Summe aller auftretenden Synthese- sowie Degradationsstoffflüsse r beschrieben werden. Der Transport über die Systemgrenze wird durch den Stoffstrom b_i repräsentiert.

Bei einem Stoffwechselweg mit *n* Metaboliten und *m* Stoffflüssen können die Massenbilanzen für alle Metabolite in Vektorschreibweise formuliert werden.

$$d\vec{X}_i / dt = S * \vec{v} - \vec{b} \qquad [2.2]$$

In der Gleichung 2.2 ist $\vec{X}$ der Vektor der Metabolitkonzentrationen mit der Dimension *n*. $\vec{v}$ ist der m-dimensionale Vektor der Stoffströme. Die $n \times m$-Matrix wird durch S repräsentiert. Sie wird als stöchiometrische Matrix bezeichnet, wobei s_{ij} den stöchiometrischen Koeffizienten der *i*-ten Komponente an der *j*-ten Reaktion darstellt. Für die Berechnung der Stoffflüsse ist es notwendig, dass die entsprechende stöchiometrische Matrix keine Singularitäten enthält. Eine Singularität wäre gegeben, wenn zwei oder mehrere Reaktionen linear voneinander abhängen, so dass sich mehrere gleichwertige Lösungen ergäben. Durch das Aufstellen von Randbedingungen kann das Problem nicht eindeutiger Lösungen bei Singularitäten umgangen werden. Transportflüsse über die Systemgrenze können als Quellen und Senken in den Vektor $\vec{v}$ integriert werden, Gleichung 2.2 lautet dann:

$$d\vec{X}_i / dt = S * \vec{v} \qquad [2.3]$$

Durch numerische Verfahren kann eine Computer-gestützte Berechnung zur Lösungsfindung durchgeführt werden.

Die Stoffflussanalyse hat bereits in zahlreichen Zellsystemen ihre Anwendung gefunden. So wurde beispielsweise im *Corynebacterium glutamicum* die Verteilung der Stoffflüsse im Zentralmetabolismus untersucht. Ziel der Arbeiten war es, Bottlenecks im Pentose-Phosphat-Syntheseweg zu identifizieren. Diese Informationen werden für die Lysinproduktion mit *C.glutamicum* benötigt, um durch eine Methodenentwicklung Ausbeutesteigerungen zu bewirken. Hierfür wurden die Stoffflüsse während der Wachstumsphasen in Batch-Fermentationen über stöchiometrisch-basierte Massenbilanzen berechnet [Vallino und Stephanopoulos, 1993]. Auch wurden Stoffflussanalysen in Untersuchungen mit *Penicillum chrysogenum* durchgeführt, um die Produktivität der eingesetzten Stämme während der Antibiotikaherstellung zu erhöhen. Zur Identifizierung limitierender intrazellulärer Umsetzungen, wurden die Intermediatkonzentrationen des Penicillin-Synthesewegs, Aminosäuren-, Glucose und Lactatkonzentrationen sowie Biomassezusammensetzungen in Fed-Batch-Kultivierungen bestimmt. Das in die Berechnungen integrierte stöchiometrische Model berücksichtigte 61 Stoffflüsse. Mit Hilfe dieser Methode konnte die maximale Penicillinausbeute für den verwendeten Stamm aus Glucose berechnet werden [Jorgensen et al., 1995]. Auch der Zentralmetabolismus von *Escherichia coli* war Bestandteil metabolischer Stoffflussanalysen. Hierfür wurden nicht direkt die Intermediate gemessen,

sondern Aminosäuren und ihre Vorstufen mit Isotopen markiert. Die Verteilung der Isotope in der Zelle wurde dann bei genetischen Modifikationen sowie Veränderungen der Umgebungsbedingungen durch NMR-Messungen bestimmt [Sauer et al., 1999]. Auch Säugerzellen dienten bereits der Untersuchung des Kohlenstoffwechsels. An Hybridomazellen konnten in kontinuierlicher Kulturführung durch die Bestimmung der Metabolitkonzentrationen Stoffflussberechnungen auf Grundlage von Massenbilanzen durchgeführt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich gleiche spezifische Wachstumsraten für die Zellen einstellen lassen, die auf unterschiedlichen Stoffflussverläufen innerhalb des Kohlenstoffwechsels beruhen [Follstad et al., 1999].
Bei der Hefe *S.cerevisiae* wurden bereits mehrere Stoffflussanalysen durchgeführt [Frick und Wittmann, 2005]. Dabei wurde entweder durch direkte Messung der Metabolite, z.B. der Untersuchung des zentralen Kohlenstoffmetabolismus unter anaeroben Bedingungen [Nissen et al., 1997] oder auch die Methode der Isotopenmarkierung durchgeführt [Maaheimo et al., 2001, Fiaux et al., 2003, dos Santos et al., 2003, Blank et al., 2005]. Frick und Wittman (2005) nutzen ebenfalls die Spurenanalyse über ^{13}C-markierte Glucose, um in der Hefe *S.cerevisiae* die Stoffflüsse bei der Umstellung von einem oxidativen Stoffwechsel auf einen Gärungsstoffwechsel zu vergleichen. Die Konzentrationen markierter Metabolite wurden durch GC-MS-Messungen bestimmt. Durch die Festlegung eines stöchiometrischen Models konnten mit den Programmen Matlab® und Simulink® (Mathworks, USA) die Stoffflüsse berechnet werden.

Zur Berechnung der Stoffflüsse aus den Messwerten einer stationären, kontinuierlichen Kultur wurden bisher iterative [Schmitt et al., 1999] oder analytische Algorithmen [Wiechert et al., 1999, van Winden et al, 2005] genutzt. Für die Bestimmung der intrazellulären Stoffflüsse auf der Basis von bekannten Stöchiometrien können dabei evolutionäre Algorithmen, Optimierungsverfahren wie *simulated annealing* [Dauner et al., 2001] oder die sequentielle quadratische Optimierung (*sequential quadratic programming*) [Wittmann und Heinzle, 2002] angewendet werden [Schaub et al., 2007].
Aber auch die Berechnung von Stoffflüssen bei dynamischen Experimenten ist möglich. So wurden metabolische Stoffflussanalysen in Übergangsphasen zwischen stationären Zuständen etabliert. Ebenso wurden Stoffflussanalysen unter sich zeitlich verändernden Umgebungsbedingungen in Batch-Fermentationen durchgeführt [Desai et al., 1999]. Hierbei wurden die Änderungen der Metabolitkonzentrationen zwischen den gemessenen Zeitpunkten als Ausgangspunkt für die Stoffflussberechnung verwendet. Die Konzentrationsänderungen in Abhängigkeit der Zeit wurden anhand der stöchiometrischen Matrix abgeschätzt. Bei schwer detektierbaren Metaboliten wurde eine pseudo-stationäre Randbedingung eingeführt, die errechnete Konzentrationsänderungen dieser Stoffe bei der

Lösungsfindung abhängig von der Höhe der Reaktionsraten berücksichtigt. Als Optimallösung der Zielfunktion diente auch hier die Minimierung der Konzentrationsabweichungen von gemessenen und den aus der Stoffflussanalyse errechneten Daten sowie die Einhaltung der Randbedingungen (Minimum der quadratischen Fehlersumme). Die auf dieser Methode basierende Software COMPFlux© wurde insbesondere in Untersuchungen der Aceton-Butanol-Ethanol Fermentation mit *Clostridium acetobutylicum* eingesetzt. Die Auswirkungen genetischer Überexpression [Harris et al., 2000a] als auch der Einsatz von Deletionsstämmen [Harris et al, 2000b] auf die Stoffflüsse konnte quantifiziert werden. Der Vergleich mit Transkriptionsstudien ermöglichte Rückschlüsse auf regulatorische Wechselwirkungen [Tummala et al., 2003, Alsaker et al., 2004].

Stoffflussanalysen, die sich mit Modulen des Sekundärmetabolisus wie dem Post-Squalenbiosyntheseweg beschäftigen, sind hingegen selten. Ein Grund hierfür könnte sein, dass zum einen die Metaboliten chemisch instabil sind und somit eine genaue Messung der Konzentration schwierig ist. Ein weiterer Grund könnte die Tatsache sein, dass unter stationären Bedingungen nur äußerst geringe Stoffströme und Konzentrationen im Sekundärmetabolismus auftreten. Das Problem kann durch die Induktion von verstärkten Umsatzraten im betrachteten Syntheseweg umgangen werden. So kann mit einer pulsartigen oder stufenförmigen Veränderung der Kultivierungsbedingungen eine Verstärkung der Stoffströme erreicht werden. Die sich im Anschluss verändernden Metabolitkonzentrationen müssen durch eine entsprechend hohe Messfrequenz erfasst werden können.

Mit den Ergebnissen von Stoffflussanalysen lassen sich die Auswirkungen von veränderten Fermentationsparametern beschreiben. Auch die Folge genetischer Veränderungen auf die Reaktionen im Metabolom lassen sich vergleichend quantifizieren. Ziel ist es dabei oft, durch die Ableitung eines Modells prädiktive Aussagen über den Verlauf einer Biosynthese treffen zu können. Die Stoffflussanalyse stellt somit einen Schwerpunkt in der Entwicklung von Strategien zur Erhöhung von Syntheseleistungen in Mikroorgansimen dar [Stephanopoulos, 1999]. Auf diese Weise können erfolgversprechende Angriffspunkte einer genetischen Veränderung lokalisiert werden (*Metabolic Engineering*).

Eine weitere Strategie zur Entschlüsselung regulatorischer Prozesse, die auf der dynamischen Modellierung aufbaut, stellt die Kontrollanalyse dar (*Metabolic Control Analysis*) [Visser und Heijnen, 2002]. Die metabolische Kontrollanalyse basiert auf der Bestimmung von Kontrollkoeffizienten, die die Gewichtung der Systemantwort bei

Veränderungen der Stoffflüsse oder Konzentrationen mathematisch beschreiben können. Mit ermittelten Stoffflüssen bei veränderten Substratkonzentrationen können diese Koeffizienten indirekt bestimmt werden [Galazzo und Bailey, 1990, De Noronha Pissara et al., 1996, Schaefer und Boos, 1999]. Diese Methode findet seit kurzem auch bei der Targetsuche in humanen Zellsystemen ihre Anwendung [Hornberg et al., 2007].

2.3.2 Rapid Sampling Techniken für metabolische Stoffflussanalysen

Die Konzentrationsbestimmungen der Metabolite für eine Stoffflussanalyse unterliegen besonderen Anforderungen. Basiert die Berechnung der Stoffflüsse beispielsweise auf der Aufrechterhaltung einer Massenbilanz, können Messwertfehler dazu führen, dass die Stoffflüsse innerhalb eines betrachteten Syntheseweges falsch wiedergegeben werden (Vgl. Kapitel 2.3.1). Schlussfolgerungen hinsichtlich der Stoffflussverteilung werden dann unmöglich. Weiterhin sind für dynamische Modellierungen, wie sie in Abschnitt 2.3.1 erklärt werden, schnelle Änderungen einer oder mehrerer Umgebungsparameter erforderlich. Diese sollen eine starke Veränderung der Stoffflüsse im Metabolismus (Systemantwort) veranlassen. Um die entsprechenden Systemantworten festzuhalten und quantifizieren zu können, bedarf es einer schnellen Probennahme direkt nach dieser Änderung. Oft reichen dann herkömmliche Probenahmen z.B. durch Öffnen eines Probenahmeventils und anschießendem Einfrieren der Proben nicht aus. Auch ist die Benutzung von (langen) Bypässen ausgeschlossen, da die Verweilzeit im Schlauch bzw. Rohr zu viel Zeit beansprucht. Stoffliche Umsetzungen während der Probennahme würden hier zu falschen Ergebnissen führen [Theobald et al., 1993]. Das gleiche gilt für die Gebrauch spezieller Probenahmefiltermodule [Picque und Corrieu, 1992].

Für die schnelle Probennahme (*Rapid Sampling*) wurden in der Vergangenheit verschiedenste Techniken entwickelt und optimiert. Beim Gebrauch einer Rapid Sampling-Technik kommt es im Wesentlichen darauf an, die Probe schnell aus einem Reaktor zu nehmen und zu inaktivieren, um den Zustand der Zelle zu diesem Zeitpunkt unter *in vivo* Bedingungen detektieren zu können. Theobald et al. (1993) stellte in einer Publikation eine Rapid Sampling-Anlage vor, die durch ein angelegtes Vakuum die Probe schnell in einen auf -20°C gekühlten Bypass zog. Das ebenfalls tiefgekühlte Probegefäß enthielt dabei eine inaktivierende Perchlorlösung. Mit dieser Technik konnten im Abstand von 5s inaktivierte Proben mit einem Volumen von ca. 1ml genommen werden. Auch wurde eine Technik entwickelt, bei der die Anregung des metabolischen Systems erst außerhalb des Fermenters realisiert wurde. Der Probenahmezeitpunkt wurde durch die Verweilzeit der Probe in einem Schlauch zum Auffanggefäß bestimmt [Visser et al., 2002]. Durch eine voranschreitende Automatisierung der Probenentnahmen beim Rapid Sampling können mittlerweile

Probennahmeintervalle im Sekundenbereich realisiert werden. Vielfach wird dabei zur Inaktivierung der Organismen das sog. Quenching-Verfahren mit Methanol eingesetzt. Dabei wird 60%iges Methanol auf -40 bis -50°C gekühlt und in den Probegefäßen vorgelegt [de Koenig, 1992, Schaefer et al., 1998]. Es wurden aber auch tiefgekühlte Perchlorsäurelösungen verwendet, um den Metabolismus unmittelbar zu stoppen [Larsson und Tönkvist, 1996, Weuster-Botz, 1997]. Beim Umgang mit dieser Chemikalie ist jedoch zu beachten, dass sie für den Menschen hochtoxisch und nur für säurestabile Metabolite zu verwenden ist. Weitere Inaktivierungstechniken beruhen auf einer kurzen Erhitzung der Proben durch spezielle Probennahmevorrichtungen oder den Einsatz von heißem Wasser oder auch Ethanol [Hiller et al., 2007a, Hiller et al., 2007b]. Bei Villas- Bôas et al. (2007) sind verschiedene Techniken zusammenfassend beschrieben.

2.3.3 Herleitung kinetischer Ansätze aus Stoffflussanalysen

Die Stoffflussanalysen wurden in der Vergangenheit vorwiegend genutzt, um die Verteilung von Stoffströmen in Zellen aufzuzeigen und auch quantifizieren zu können [Nielsen, 2001, Stephanopoulos et al., 1991 und Stephanopoulos et al., 1998]. Aus den Stoffflussberechnungen lassen sich aber auch die Bildungsraten für die einzelnen Intermediate gewinnen [Wu et al., 2006, Xu et al., 1999]. Betrachtet man beispielsweise den Stoffluss zwischen einer Komponente A und B zwischen den Zeitpunkten *t=0, t=1* und *t=2*, dann wird der Stoffluss $\overrightarrow{AB}$ für den Zeitpunkt *t=0,5* und *t=1,5* aus den Konzentrationsmessungen kalkuliert. Die mittlere Bildungsrate für den Zeitpunkt *t=1* ergibt sich aus dem zeitlich gewichteten Mittelwert der Stoffflüsse zum Zeitpunkt *t=0,5* und *t=1,5*. D.h., sowohl die Bildungsrate (Reaktionsrate) als auch die Konzentrationen der Intermediate sind bekannt. Daher können nun mathematische Ansätze gefunden werden, die die Reaktionsraten in Abhängigkeit von bestimmten Intermediatkonzentrationen beschreiben. Über eine im Anschluss erfolgende mathematische Anpassung können die Werte der kinetische Parameter einer Reaktionsgleichung ermittelt werden. Diese Parameter sind z.B. Gleichgewichtskonstanten (K-Werte) bzw. maximale Reaktionsgeschwindigkeiten (v_{max}). Der bedeutende Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Bestimmung der kinetischen Parameter aus Stoffflussanalysen *in vivo* erfolgt. D.h. die Reaktion wird unter den in der Zelle gegebenen physiologischen Bedingungen betrachtet.

Wenn sich nun ein gekoppeltes Gleichungssystem für die aufeinander folgenden enzymatische Reaktionen in der Zelle aufstellen lässt, kann ein Biosyntheseweg modellhaft beschrieben werden. Durch diese Vorgehensweise wurde zunächst ein Modell für den sog. Overflow-Metabolismus [Xu et al., 1999] sowie des zentralen Kohlensstoffwechsels in *E.coli* etabliert [Chassagnole et al., 2002].

Die Kinetik des Primärmetabolismus der Hefe *S.cerevisiae* konnte auf diese Weise Modell-gestützt dargestellt werden [Wu et al., 2006]. Mittlerweile wurde diese Methode zur *in vivo* Bestimmung kinetischer Parameter in verschiedenen Mikroorganismen, wie z.B. im *Corynebacterium glutamicum* angewendet [Magnus et al., 2006]. Derzeitig werden Versuche unternommen, in Pflanzenzellen kinetische Modelle aus metabolischen Stoffflussanalysen abzuleiten. Die experimentelle Vorgehensweise wurde erst kürzlich erläutert [Rios-Estepa und Lange, 2007] und bereits für die Monoterpenoidsynthese bei der Pfefferminze angewandt [Rios-Estepa et al., 2007].

3 Aufgabenstellung

Die Synthese der Sterole in eukaryotischen Zellen wurde bisher auf biochemischer und molekulargenetischer Ebene untersucht. Hierbei wurden sowohl die einzelnen Schritte der Stoffwechselwege aufgeklärt als auch die daran beteiligten Enzyme identifiziert. Daneben wurden mehrere Überexpressionstudien durchgeführt, die offenbarten, dass der Sterolmetabolismus einer starken Regulation unterliegt. Bisher gibt es allerdings wenige Erkenntnisse darüber, wie die Regulation während der Sterolsynthese abläuft.

Die Herstellung von Ergosterol (Vitamin D2-Vorstufe) und anderen Sterolintermediaten ist industriell bedeutsam Eine verbesserte Ausbeute bei der biotechnologischen Herstellung kann nur erfolgen, wenn die regulatorischen Mechanismen der Sterolsynthese bekannt sind. Durch eine verbesserte Kenntnis wird ermöglicht, die Biosynthese zu steuern und zielgerichtet zu dem gewünschten Sterol zu lenken. Sowohl die Entwicklung rekombinanter Produktionsstämme als auch die Prozessführung können dahingehend optimiert werden. Eine Entschlüsselung der regulatorischen Wechselwirkungen innerhalb der Cholesterolbiosynthese in humanen Fibroblasten kann einen Beitrag zur Lösung medizinischer Fragestellungen im Lipidmetabolismus leisten.

Zur Aufklärung der Regulationsmechanismen soll eine vergleichende Stoffflussanalyse durchgeführt werden. Kulturen werden dazu in einen stationären Zustand überführt, in dem sich die Sterolkonzentrationen nicht ändern. Dann soll die Sterolsynthese auf verschiedene Weise stimuliert werden. Diese Stimulation führt zu Konzentrationsänderungen der Metabolite (Stimulus-Response-Experimente). Diese Änderung wird gemessen, d.h. die Antwort des biologischen Systems auf die Stimulation wird festgehalten. Durch die zeitbezogene Erfassung der durch die Stimulation hervorgerufenen Dynamik mit Hilfe der Stoffflussanalyse sollen Regulationsmuster im Syntheseweg lokalisiert und quantifiziert werden.

Der Vergleich der Ergebnisse bei unterschiedlichen Stimulationen soll klären, ob regulatorische Wechselwirkungen redundant sind. Zusätzlich soll geklärt werden, inwiefern die Regulationsmuster der Ergosterolbiosynthese innerhalb der ähnlich verlaufenden Cholesterolbiosynthese konserviert sind. Dabei wird zu klären sein, ob die Regulation innerhalb des Sterolmetabolismus in Hefe einen Modellcharakter besitzt oder trotz analoger Reaktionsschritte eine in der Evolution begründete Entkopplung stattgefunden hat.

Zur Durchführung von Experimenten, die die Dynamik mit hoher Auflösung darstellen können, ist die Etablierung einer Aufarbeitungsmethode und Analytik notwendig, die die Handhabung

große Probenmengen zulässt. Die Quantifizierung der zu messenden Sterole und Fettsäuren muss so verlässlich sein, dass auch geringe Konzentrationsunterschiede zwischen mit kurzen Zeitabständen genommenen Proben erfasst werden können. Anschließend sind geeignete Mittel zu finden, wie die Sterolsynthese durch eine plötzliche Veränderung der Kultivierungsbedingungen stimuliert werden kann. Ziel dieser Maßnahmen soll es sein, möglichst hohe Änderungen der Sterolsyntheseleistung in den Zellen zu bewirken. Diese Änderungen sollen dabei nicht durch einen Einsatz rekombinanter Stämme erfolgen, da die Auswirkungen genetischer Ansätze auf das Transkriptom und Proteom nur schwer zu erfassen sind. Die Vergleichbarkeit der Experimente beim Einsatz verschiedener rekombinanter Stämme wäre daher fraglich. Vielmehr soll eine intrazelluläre Akkumulation von Sterolen durch externe Zugabe erreicht werden. Die dadurch erzielten Auswirkungen auf den Metabolismus sollen ebenfalls detektiert und die Schlussfolgerungen in die Ergebnisse mit einbezogen werden. Durch die Betrachtung bisheriger Studien über Regulationsmechanismen innerhalb des Transkriptoms und Proteoms können ferner Bewertungen getroffen werden, in welchem Maße sich diese Mechanismen in der Entwicklung der Stoffflüsse abbilden.

Durch die in Batch- und Chemostatkultivierungen aufgefundenen regulatorischen Wechselwirkungen können Aktivatoren oder Inhibitoren im Stoffwechselweg identifiziert werden. Die Erkenntnisse sollen in die Erstellung eines strukturierten Modells einfließen, dass die Dynamik der Sterolsynthese auch unter veränderten Kultivierungsbedingungen abbilden kann. Durch die Ableitung kinetischer Ansätze können Parameter, wie z.B. inhibitorische Konstanten quantifiziert werden. Inwieweit der erhaltene Ansatz zur Beschreibung der Kinetik des Ergosterolmetabolismus in Hefe auf den Cholesterolbiosyntheseweg in humanen Fibroblasten übertragbar ist, soll diskutiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Organismen

Für die Untersuchungen der Ergosterolbiosynthese in Hefe wurde der Stamm *Saccharomyces cerevisiae* AH22 (MATa leu2-3 leu2-12 his4-519 can1) verwendet, der von Professor C. Lang (TU Berlin) zur Verfügung gestellt wurde.

Für die Untersuchungen der Cholesterolbiosynthese an menschlichen Zellen wurde die humane Fibroblastenzelllinie GM637 verwendet. Es handelt sich hierbei um eine mit dem SV40-Virus transformierte, permanente Zelllinie (Coriell Institute for Medical Research, New Jersey, USA).

Zur Optimierung der Methoden wurden auch primäre Zellen eingesetzt. Die aus Spendergewebe isolierten Zellen (HFF, Human Foreskin Fibroblast) wurde von Dr. Simone Frauenschuh (Technische Universität, Berlin) bezogen.

4.2 Kultivierung der Hefe und Probennahme

4.2.1 Kulturmedium

Für alle durchgeführten Versuche mit Hefe wurde ein gepuffertes Vollmedium benutzt (im Folgenden als YPD-Medium bezeichnet). Es enthielt als Bestandteile 20g/l Glucose (Sigma-Aldrich, Deutschland), 20g/l Pepton (Fluka,Schweiz), 10g/l Hefeextrakt (Deutsche Hefewerke, Deutschland), 1g/l NH_4Cl (Ferak Laborat, Deutschland) und 14g/l KH_2PO_4 (Fluka, Schweiz). Für die Kultivierung auf Agarplatten wurden zusätzlich 20g/l Agarose (Roth, Deutschland) eingewogen. Die Glucose und die restlichen Medienbestandteile wurden jeweils separat bei 120°C für 20min autoklaviert. Der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Autoklavieren auf pH = 5,5 eingestellt.

4.2.2 Vorkulturführung für Versuche in Schüttelkolben und Schottflaschen

Für die Vorkultivierung der Hefen wurden in einen 300 ml Schüttelkolben 75ml Medium überführt. Zum Animpfen wurde ein Impfösenabstrich der Hefekultur von einer Agarplatte in das Medium gegeben. Die Kultur wurde über Nacht bei 22°C bei 110rpm auf einem Längsschüttler inkubiert.

4.2.3 Schüttelkolbenkultivierung zur Untersuchung von Einflussfaktoren

Für die Identifizierung von Einflussfaktoren der Ergosterolbiosynthese wurde die Hefe *S.cerevisiae* im Schüttelkolben kultiviert. Es wurden veränderte Kultivierungsbedingungen oder chemische Substanzen untersucht. Wenn nicht anders beschrieben, wurden hierfür

75ml YPD-Medium im 300ml Schüttelkolben 1%ig aus der Vorkultur (Vgl. 4.2.2) angeimpft und bei 95rpm bei 27°C für 72h auf einem Längsschüttler kultiviert. Für die anaerob-aerobe Betriebsweise wurde zunächst mit Stickstoff begast. Nach 20h Kultivierungsdauer wurde dann die zu testende Substanz hinzugefügt bzw. der Umgebungsbedingung verändert. Nach weiteren 2h wurde im Falle der anaerob-aeroben Kultivierung auf die Versorgung mit Luftsauerstoff umgestellt.
Für die Zugabe der Substanzen (alle Fluka, Schweiz) wurden folgende Konzentrationen verwendet: Geraniol 0,25% (v/v), $FeSO_4$ 50mg/l, Ethanol 0,25% (v/v), Tween80 0,25% (v/v) und Palmitoleinsäure 1g/l (entspricht 0,12% (v/v)).

4.2.4 Kultivierung in Schottflaschen zur Bestimmung der Aufnahmeraten

Zur ersten Bestimmung der Aufnahmeraten der Sterole bzw. Sterol-Precursor in die Zellen wurden 300ml autoklaviertes YPD-Medium in sterile 1l Schottflaschen überführt und mit 1% einer Vorkultur angeimpft. Das Kulturmedium wurde über eine eingehängte Glasfritte begast. Innerhalb der ersten 22h wurde Stickstoff in das Medium geleitet, um anaerobe Verhältnisse zu gewährleisten, bevor auf eine Versorgung mit Luftsauerstoff umgestellt wurde. Die zu testenden Substanzen wurden jeweils 2h vor dem Switch zu aeroben Bedingungen in die Schottflaschen gegeben. Die Probenentnahme zur Bestimmung der Aufnahmeraten durch die Zellen erfolgte jeweils vor sowie 0, 1, 3, 5 und 24h nach dem Wechsel zu aeroben Bedingungen. Die Steroanalyse erfolgte aus dem zellfreien Kulturmedium, wie unter 4.4.6 beschrieben. In späteren Bioreaktorexperimenten wurden die Aufnahmeraten auch durch Messungen des zellfreien Überstandes überprüft, wobei eine zusätzliche Probe 0,5h nach dem Switch genommen wurde.

4.2.5 Batch-Kultivierung im Bioreaktor

Die Untersuchungen zur Sterolbiosynthese im Batch-Verfahren wurden in Biostat E Bioreaktoren (B.Braun Biotech, Melsungen) mit einem Arbeitsvolumen von 10 Litern und einer Kultivierungstemperatur von 27°C durchgeführt. Das verwendete YPD-Medium hatte eine Glucosekonzentration von 20g/l. Unter aeroben Bedingungen wurde bei einer Rührerdrehzahl von 500rpm mit 1vvm begast, soweit nichts anderes beschrieben. Die anaerobe Bedingung bei einer Rührerdrehzahl von 200rpm wurde durch die Zufuhr von Stickstoff (0,01vvm) gewährleistet. Der Gelöstsauerstoff wurde mit einer pO_2-Elektrode (Mettler-Toledo, Deutschland) und der pH-Wert mit einer pH-Elektrode (Mettler-Toledo 465-90VT, Deutschland) kontrolliert. Bei Bedarf wurde das Antischaummittel Polyethylenglycol (PEG) 2000 zudosiert.

Die Vorkultur wurde wie in 4.2.2 beschrieben hergestellt. Die 1%ig inokulierte Vorkultur wurde in vier 1000ml Erlenmeyerkolben mit jeweils 250ml Medium überführt. Die Inkubation erfolgte für 16h bei 110rpm auf einem Schüttler, bevor der Bioreaktor 10%ig (v/v) angeimpft wurde.

Für eine Fermentation mit Switch (Standardfermentation) von anaeroben zu aeroben Bedingungen wurde 22h nach Erreichen einer OD = 1 die Rührerdrehzahl zunächst auf 500rpm erhöht. Das Ventil der Gasversorgung wurde geschlossen und anstelle des Stickstoffs die Luftversorgung durch einen Schlauch angeschlossen. Dann wurde ein geeigneter Vordruck (1,5 bar) bei der Luftzufuhr an der Steuerungseinheit des Bioreaktors eingestellt. Ein dem Reaktor vorgeschaltetes, regelbares Rotameter wurde vollständig geöffnet. Durch das erneute Umstellen des Ventilhahnes wurde der Bioreaktor dann unmittelbar und ohne Verzögerung mit 10 vvm Luftsauerstoff begast.

Wurde zusätzlich die Kultur mit Lanosterol oder Ergosterol (beides Sigma-Aldrich, Deutschland) supplementiert (Fermentationen mit Zusätzen), wurden je 500mg in 25ml Ethanol gelöst. Für die Lösung des Lanosterol war dabei eine Erhitzung des Ethanols notwendig. Um das Ausfallen der Sterole im Bioreaktor zu verhindern, wurden die in Ethanol gelösten Substanzen mit je 25ml des Detergenz Tween80 vermischt. Für die Supplementierung mit 500mg Squalen wurden nur 5ml Ethanol benötigt. Auf die Zugabe des Tween80 konnte verzichtet werden. Die gelösten Lipide wurden je 2h vor dem Switch mit Hilfe einer sterilen Spritze in den Fermenter gegeben. Um eine ausreichende Vermischung zu gewährleisten wurde die Rührerdrehzahl nach der Zugabe der Substanzen auf 500rpm hochgesetzt.

Alle Kultivierungen wurden bis zum Ereichen einer gesamten Kultivierungszeit von 72h weitergeführt. Je nach Fermentationstyp wurden Proben in unterschiedlichen zeitlichen Abständen genommen. Hierbei betrug das Probevolumen 100 bis 200ml Kulturmedium. Die entsprechende Biomassekonzentration bestimmte dabei das benötigte Probevolumen, da die anschließenden Lipidaufreinigungen an Mindesttrockensubstanzmengen gebunden sind. Die Proben wurden sofort bei -20°C bis zur zeitnahen Aufarbeitung in 50ml Falconröhrchen bzw. Kupfereinsätzen (siehe 4.2.6) eingefroren.

4.2.6 Rapid Sampling (RS)

Um die Änderungen der Sterolkonzentrationen in den ersten Minuten nach dem Switch zu aeroben Kultivierungsbedingungen hinreichend genau detektieren zu können, war es notwendig, die Proben sehr schnell abzukühlen und damit den Metabolismus zu inhibieren. Der Gebrauch von kommerziell erhältlichen Rapid sampling - Anlagen war aufgrund der notwendigen Probevolumen von bis zu 200ml nicht möglich. Daher wurden doppelwandige Isoliergefäße mit Abdeckung verwendet. In diese Isoliergefäße wurden zylinderförmige

Kupfereinsätze mit einem Innendurchmesser von 3,2 cm angefertigt, die in die Becher gesetzt werden konnten. Das Hohlraumvolumen der Zylinder (112,59 ml) diente dabei als Probenreservoir. Die Kupfereinsätze wurden aus jeweils einem 14cm langen Kupferrohr gefertigt, das an der Bodenseite durch eine angelötete Kupferplatte verschlossen wurde. Die Kupfereinsätze wurden in die Becher gestellt. Eine Kühlflüssigkeit bestehend aus einem 1:1 Wasser-Ethanolgemisch umgab den Einsatz. Die Becher wurden bei -70°C gelagert und erst kurz vor dem Experiment aus dem Tiefkühlschrank in Styroporboxen zum Bioreaktor gebracht. Die Becher wurden nach der Probennahme sofort bei -20°C gelagert.

4.2.7 Kontinuierliche Kultivierung im Bioreaktor

Die Hefe *S.cerevisiae* wurde auch in kontinuierlicher Kulturführung untersucht, um ausgehend von einem stationären Zustand die Dynamik der Ergosterolbiosynthese nach pulsartigen Veränderungen zu untersuchen. Hierbei handelte es sich um ein sog. Stimulus-Response-Experiment, bei der die Antwort auf einen Reiz erforscht wird. Im Gegensatz zur Batch-Kultivierung im Bioreaktor sollte nach Abwarten der Systemantwort erneut ein stationärer Zustand der Kultur eingestellt werden, um anschließend weitere Experimente durchzuführen zu können.

Die Kultivierung wurde in einem Bioreaktor des Typs *KLF2000* (Bioengineering, Schweiz) mit einem Arbeitsvolumen von 2 Litern durchgeführt. Hierfür wurde die Vorkultur in zwei 500ml Erlenmeyerkolben mit jeweils 100ml Medium 1%ig aus einer Flüssigkultur, die analog zu 4.3 hergestellt wurde, angeimpft. Nach 16h aerober Kultivierung auf einem Schüttler bei 110rpm wurde der Reaktor mit 200ml Vorkultur (also 10% v/v) inokuliert.

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde aerob im Batchverfahren mit 20g/l Glucose im YPD-Medium bei einer Temperatur von 27°C kultiviert. Die Begasungsrate betrug 1vvm bei einer Rührerdrehzahl von 800rpm. Der Gelöstsauerstoff wurde mit einer pO_2-Elektrode (DN-pO_2 Mettler-Toledo, Deutschland) und der pH-Wert mit einer pH-Elektrode (DN-pH, Mettler-Toledo, Deutschland) kontrolliert und aufgezeichnet. Nach 18h wurde auf eine kontinuierliche Betriebsweise umgestellt. Hierfür enthielt das YPD-Medium 4g/l Glucose. Es wurde eine Wachstumsrate von $\mu = D = 0.05h^{-1}$ eingestellt. Der Medienzu- und -abfluss wurde über eine Waage mit zwei Pumpen (Flocon 1003) kontrolliert. Bei Bedarf wurde PEG 2000 (Fluka, Schweiz) als Antischaumittel eingesetzt. Die Einstellung des Gleichgewichts (steady state) erfolgte mindestens über einen Zeitraum von 24h. Das Gleichgewicht wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 600nm, der Substratkonzentration $c_S \approx 0$ und der Aufarbeitung von Proben hinsichtlich ihres Sterolgehaltes festgestellt. Für einen andauernden Betrieb der Kultur wurden die Antibiotika-Mix Penicillin V (Sigma-Aldrich, Deutschland), Clindamycin (Pharmacia GmbH Deutschland) sowie Cefamandol (Sigma-

Aldrich, Deutschland) ins Feedmedium gegeben. Die Antibiotika hatten keinen Einfluss auf die Sterolzusammensetzung, wie in Schüttelversuchen überprüft wurde.

War ein Gleichgewicht erreicht, wurde auf die Sterolsynthese durch Veränderung der Umgebungstemperatur bzw. durch Zugabe von Substanzen in den Reaktor und in das Feedmedium Einfluss auf die Sterolbiosynthese genommen. Die Veränderung der intrazellulären Sterolkonzentrationen wurde durch eine Probennahme (100 ml) über einen Zeitraum von jeweils mehreren Stunden verfolgt. Die Proben mit einem Volumen von ca. 100ml wurden sofort bei -20°C eingefroren. Die Zulaufpumpe wurde aufgrund der Volumenänderung entsprechend reguliert, um eine konstante Durchflussrate zu gewährleisten. Im Anschluss wurde wieder unter Standardbedingungen kultiviert und nach Erreichen des Steady states ein weiterer Versuch durchgeführt.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Kultivierung der humanen Zellen

Alle Zellen wurden unter sterilen Bedingungen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die verwendeten Medien und Lösungen wurden vor jedem Gebrauch auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Die Anzucht der adhärent wachsenden Zellen erfolgte in 150cm^2 Zellkulturflaschen (Biochrom, Deutschland) mit 25ml Kulturmedium. Für die Kultivierung der HFF Zellen war es notwendig, die Oberfläche der Zellkulturflasche mit Collagen zu beschichten. Dafür wurde eine 3%ige Collagen G Lösung (Biochrom, Deutschland) in PBS für 5-10min in den Flaschen inkubiert. Aufgrund einer vorangegangenen Medienoptimierung wurde für die Kultivierung beider Zelltypen DMEM (*Dulbecco's modified eagles's medium*, Biochrom, Deutschland) mit 15% inaktiviertem FBS (Gibco Invitrogen, Deutschland), 6mM L-Glutamin, 100U/l Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und einfach konzentrierte NEA (*nicht essentielle Aminosäuren*) (alle Chemikalien von Biochrom, Deutschland) verwendet. Pro Zellkulturflasche wurden zu Beginn der Kultivierung 2-3 Millionen Zellen ausgesät. Der Medienwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage.

4.3.2 Passagieren und Ernten der humanen Zellen

Bei 80-90% Konfluenz wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA Lösung von der Oberfläche der Kulturflache abgelöst und passagiert. Das Kulturmedium wurde hierfür aus der Zellkulturflasche entfernt und der Zellrasen mit 10ml PBS gewaschen. Zur Ablösung der Zellen wurden dann 10ml der Trypsin/EDTA-Lösung auf den Zellrasen pipettiert und die Zellkulturflasche bei 37°C für 5-10min im Brutschrank inkubiert. Der Verlauf der Trypsinierung wurde am Mikroskop verfolgt. Lagen die Zellen vereinzelt vor, wurde die Reaktion durch Zugabe von mindestens 10ml serumhaltigen Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Falconröhrchen überführt und bei 1100rpm für 10min abzentrifugiert. Die Zellen wurden in einem definierten Volumen aufgenommen und ihre Anzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen konnten nun in definierter Anzahl mit frischem Kulturmedium in neue Zellkulturflaschen überführt werden oder erneut abzentrifugiert und bis zur Aufarbeitung der Sterole bei -20°C eingefroren werden.

4.3.3 Bestimmungen der Zellzahl und Zellaktivität

Zur Quantifizierung der Zellen wurden 20µl einer Zellsuspension mit 20µl Trypanblau-Reagenz vermischt. Das Chromophor Trypan ermöglicht die Unterscheidung von farblosen, lebenden Zellen und blauen, toten Zellen unter dem Mikroskop. Zur Herstellung dieses Reagenz wurden 0,5g Trypanblau-Pulver (Sigma-Aldrich, Deutschland) in physiologischer Kochsalzlösung (0,9g/l NaCl) gelöst. Die Probe wurde mit Hilfe der Neubauerkammer unter

dem Mikroskop ausgezählt. Hierfür wurden die Zellen aus 4 der 16 Großquadrate ausgezählt und die Zellkonzentration c und die Vitalität der Zellen V wie folgt bestimmt:

$$c = N * F_{dil} * F_{corr}$$

$$V = N_V / N_{total}$$

c: Zellkonzentration [Zellen/ml]

N: mittlere Zellzahl pro Großquadrat

F_{dil}: Verdünnungsfaktor

F_{corr}: Volumenkorrekturfaktur (10^4)

V: Vitalität

N_v: Lebendzellzahl

N_{total}: Gesamtzellzahl

4.3.4 Kryokonservierung- und reaktivierung

Zunächst wurde frisches Kryomedium, das aus dem Kulturmedium DMEM (Vgl. 4.3.1), 20% FBS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, Deutschland) bestand, hergestellt. Der Einsatz der Substanz DMSO verhindert die Ausbildung von Eiskristallen in der gefrorenen Zellsuspension und dient somit dem Schutz vor Zellschädigungen. Der Umgang mit DSMO erfordert aber ein zügiges Arbeiten, da es bei Raumtemperatur cytotoxische Wirkungen entfaltet. Die nach dem Trypsinieren als Pellet vorliegenden Zellen wurden daher schnell in einer definierten Menge des Kryomediums aufgenommen. Je 1ml Zellsuspension wurde dann sofort in ein Kryoröhrchen überführt und im Isopropanolbad im Tiefkühlschrank auf -80°C abgekühlt und gelagert.

Die Gefrierkulturen wurden bei Raumtemperatur wieder aufgetaut und langsam mit Kulturmedium (Vgl. 4.3.1) vermengt, um die cytotoxische Wirkung des DSMO zu unterbinden aber gleichzeitig den Stress für die Zellen gering zu halten. Diese Zellsuspension wurde dann direkt zur Aussat in Zellkulturflaschen verwendet.

4.3.5 Herstellung des Inkubationsmediums für ein Stimulus-Response-Experiment mit Lipid-Cyclodextrin-Komplexen

In einem Stimulus-Response-Experiment wurde die Cholesterolbiosynthese der humanen Zellen bei Verfügbarkeit von externen Sterolen bzw. Squalen im Medium untersucht. Für die Inkubation der Fibroblasten in Medium mit je 0,4mM Squalen, Lanosterol oder Cholesterol war es notwendig, die Lipide mit Methyl-ß-Cyclodextrin (Fluka, Schweiz) zu komplexieren. Die Sterole mussten hierfür zunächst in einem Chloroform-Isopropanol-Gemisch (1:3) unter Rühren und vorsichtigem Erhitzen gelöst werden. 200mg des Methyl-ß-cyclodextrin wurden

in je 2,2ml VE-Wasser unter Rühren und kurzzeitiger Erwärmung auf 80°C in Lösung gebracht. Dann wurden entsprechend einer Menge von 6mg des jeweiligen Lipids in Einheiten von 20-100µl in die kontinuierlich gerührte Cyclodextrinlösung pipettiert. Um die Komplexe auszubilden ist ein kontinuierliches Rühren über mehrere Stunden notwendig. Die Komplexbildung war abgeschlossen, wenn die wässrige Cyclodextrinlösung klar erschien. Die Lösung wurde im Anschluss mit einer Spritze und einem Rotilabo®-Spritzenfilter (Karl Roth GmbH, Deutschland, Porendurchmesser 0,22µm) steril filtriert und bis zur Durchführung des Experiments bei 7°C im Kühlschrank gelagert. Das Inkubationsmedium wurde vor dem Experiment unter sterilen Bedingungen aus DMEM hergestellt, wobei es jeweils 6mM L-Glutamin, 25mM HEPES, 1mg/ml BSA, einfach konzentrierte NEA enthielt. Mit der Lipid-Cyclodextrin-Komplexlösung wurde anschließend die Endkonzentration von je 0,4mM Squalen, Lanosterol bzw. Cholesterol entsprechend eingestellt. Das frisch hergestellte Inkubationsmedium wurde bis zum Versuch auf 37°C temperiert.

4.3.6 Stimulus-Response-Experiment zur Beeinflussung der Cholesterolbiosynthese

Um reproduzierbare Zellzahlen mit einer 90-95% Konfluenz zu erhalten, wurden je 3Millionen der vorkultivierten Zellen in 14 Flaschen (a 150cm^2) ausgesät und für 96h wachsen gelassen. Der Medienwechsel erfolgte wie in 4.3.1 beschrieben.

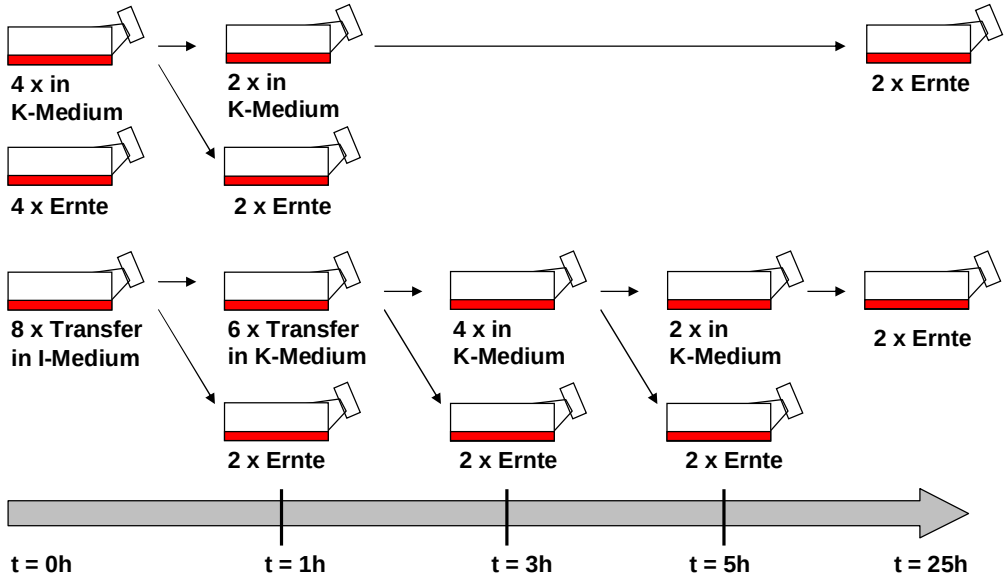


Abb. 4.1: Schema des Stimulus-Response-Experiments zur Beeinflussung der Cholesterol-biosynthese mit K-Medium = Kultivierungsmedium und I-Medium = Inkubationsmedium.

Zum Zeitpunkt t=0h wurden die Zellen von vier Flaschen geerntet (doppelte Nullprobe, Anfangspunkt), während vier weitere Flaschen unbehandelt blieben (einfache Nullprobe, nach einer Stunde und zum Endpunkt nach 25h).

Die Ernte der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben. Allen übrigen Zellkulturflaschen wurde zunächst das Medium vorsichtig entnommen. Der Zellrasen wurde dann mit 10ml des auf 37°C vortemperierten PBS-Puffers gewaschen. Anschließend wurden 20ml des Inkubationsmediums zu den Zellen gegeben und die Flaschen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2-Gehalt inkubiert. Danach wurde das Inkubationsmedium abgenommen, zum Entfernen evtl. abgelöster Zellen zentrifugiert und für die Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Die Zellen von zwei der inkubierten Flaschen wurden geerntet (Zeitpunkt t=1h), mit der Thomakammer gezählt und ebenfalls bis zur Aufarbeitung bei -20°C eingefroren. Zu den übrigen Flaschen wurde nach erneutem Waschen das normale Kulturmedium (4.3.1) pipettiert. Die Zellen wurden dann bis zur Probennahme bei t=3h, 5h und 25h, wie unter 4.3.1 beschrieben, kultiviert und anschließend zur Bestimmung der intrazellulären Sterolgehalte geerntet und eingefroren.

4.4 Analytik

4.4.1 Aufarbeitung der freien Sterole aus Hefezellen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode zur Gewinnung der intrazellulären Sterole beruht auf der Lipidaufarbeitung durch Extraktion mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch. Diese Technik wurde erstmalig von Folch et al. (1957) beschrieben. Dieses Verfahren wurde hinsichtlich unterschiedlicher Trennungsprobleme vielfach abgeändert [Vilos, 2001]. Die hier beschriebene Gewinnung freier Sterole wurde basierend auf einem Protokolls von Veen et al. (2002) durchgeführt.

Hierfür wurden die gefrorenen Proben unter Verwendung von Mikrowellen schnell aufgetaut und in Bechergläser überführt. Für die Proben aus den RS-Versuchen wurden dafür die Kupferinlets aus den Bechern genommen und kurz erwärmt. Um aus jeweils der gleichen Zellmasse aufzuarbeiten, wurde entsprechend einer OD = 12 (96mg Trockensubstanz) je 20ml Zellsuspension für eine einzelne Probe in ein 50ml Falconröhrchen gegeben und bei 2°C in einer Kühlzentrifuge *3K30* (Sigma Laborzentrifugen, Deutschland) bei 6000rpm für 6min zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde abgetrennt und das Zellpellet mit kaltem VE-Wasser kurz gewaschen und erneut zentrifugiert. Das gewaschene Zellpellet wurde zügig in 2ml VE-Wasser aufgenommen. Anschließend wurden 2ml eines Chloroform-Methanol-Gemisches (4:1, Sigma-Aldrich, Roth, beides Deutschland) und 4ml Glasperlen (0,5mm) sowie 100µl des internen Standards (1mg/ml Cholesterol in Chloroform, beides Sigma-Aldrich, Deutschland) dazugegeben und für 15min mit einem Vortexgerät durchmischt. Nach dem Abtrennen und Abspülen der Glasperlen wurde das Gemisch für 15min bei 9000rpm zur Phasentrennung zentrifugiert. Die untere Chloroformphase wurde in 50ml Rundkolben überführt und das Chloroform am Rotationsverdampfer (Büchi Labortechnik, Deutschland) bei 35°C unter Rückflusskühlung abgezogen. Zur Aufnahme der Lipide wurden zweimal 750µl 2-Isopropanol (Roth, Deutschland) in die Rundkolben gegeben und das Gefäß für 2min im Ultraschallbad inkubiert. Das jeweils abgezogene 2-Isopropanol wurde in einem braunen GC-Vial vereinigt und bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

4.4.2 Aufarbeitung der freien Sterole aus humanen Zellen

Die nach dem Trypsinieren im Falconröhrchen als Zellpellet vorliegenden Zellen wurden mit 5ml PBS-Puffer gewaschen und nach erneutem Abzentrifugieren bei 1100rpm in 2ml PBS aufgenommen. Die Zellen wurden nach Zugabe von 4 ml Glaskugeln, 5 ml Chloroform-Methanol (4:1) sowie 100µl des internen Standards 5α-Cholestan (0,2mg/ml in Chloroform, Sigma-Aldrich, Deutschland) für 15min mit einem Vortexgerät durchmischt. Die Glasperlen wurden mit Hilfe eines Siebes abgetrennt und mit der Chlorofrom-Methanol-Lösung gespült. Die Probe wurde nun wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben zentrifugiert, eingedampft und in 2-Isopropanol aufgenommen. Die Lagerung der Proben erfolgte ebenfalls bei -20 °C.

4.4.3 Aufarbeitung der gesamten Sterole aus Hefezellen

Um sowohl die freien als auch die in der Zelle veresterten Sterole aufzuarbeiten, wurden die Zellen analog zu 4.4.1 abzentrifugiert und gewaschen. Das verbleibende Zellpellet wurde in 2ml VE-Wasser aufgenommen und 2,5ml 1N Salzsäure (Sigma-Aldrich, Deutschland) sowie 100µl des Cholesterolstandards hinzugegeben. Die Probe wurde für 20min in kochendem Wasser inkubiert. Nachdem die Probe abgekühlt war, erfolgte die Zugabe von 3g Kaliumhydroxid und 12ml einer methanolischen Pyrogallollösung (0,25g/l, Sigma-Aldrich, Deutschland). Der Ansatz wurde bei 70°C für 1,75h im Wasserbad inkubiert. Nachdem die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde zweimal mit 15 ml Hexan extrahiert. Die in einem 100 ml Rundkolben vereinte Hexanphase wurde dann am Rotationsverdampfer abgezogen. Die Aufnahme und Lagerung der Lipide in 2-Isopropanol erfolgte analog zu Kapitel 4.4.1.

4.4.4 Aufarbeitung der gesamten Sterole aus humanen Zellen

Das Zellpellet wurde zunächst wie unter 4.4.2 beschrieben gewaschen und in 2ml VE-Wasser aufgenommen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2,5ml einer 1N HCl Lösung und 100µl des internen Standards 5α-Cholestan. Der Ansatz wurde für 20 min bei 100 °C im Wasserbad inkubiert. Die folgenden Arbeitschritte wurden analog zum Aufarbeitungsprotokoll für Hefezellen (Kapitel 4.4.3) durchgeführt.

4.4.5 Aufarbeitung der Sterole und des Squalens aus dem Hefemedium

Um die Aufnahmeraten der Sterole und des Squalens durch die Hefezellen zu bestimmen, wurde das Kulturmedium aufgearbeitet. Die Aufnahmerate berechnete sich dabei aus der Differenz von zugesetzten Sterol/Squalen und gemessener Konzentration im Kulturmeidum. Hierfür wurde zunächst das aufgetaute Kulturmedium durch Zentrifugation für 6min bei 600 rpm und 2°C von den Zellen abgetrennt. Nach der Zugabe von 100µl des Cholesterolstandards wurden 25ml des Kulturüberstandes zweimal mit 40ml Hexan extrahiert. Wenn nötig, wurden zur verbesserten Phasentrennung pro Extraktionsschritt 2ml reines Ethanol (*Puriss p.a*., Sigma-Aldrich, Deutschland) zum Probengemisch pipettiert oder das Gemisch bei 5000rpm zentrifugiert. Die Hexanphase wurde dann im Rundkolben vereint und, wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, eingedampft und vor der Lagerung in 2-Isopropanol aufgenommen.

4.4.6 Aufarbeitung der Sterole aus dem Zellkulturmedium

Zur Bestimmung der Sterolgehalte wurden je 20ml zellfreies Inkubations- bzw. 50 ml Kulturmedium in einen Scheidetrichter überführt und dreimal mit gleicher Menge Hexan extrahiert. Als interner Standard diente 100µl 5a-Cholestan in Chloroform (0,2 mg/ml). Wenn

sich keine Phasentrennung einstellte, wurden die Gemische zusätzlich bei 5000rpm für ca. 5min zentrifugiert. Die Hexanphasen wurden dann in einem 100 ml Rundkolben vereinigt. Der Abzug des Lösungsmittels, die Aufnahme in 2-Isopropanol und die Lagerung der Proben erfolgte wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben.

4.4.7 Aufarbeitung der Fettsäuren aus Hefezellen

Für die Bestimmung der Fettsäurekonzentrationen mittels gaschromatographischer Messungen war es notwendig, die Fettsäuren in ihre Methylester zu überführen. Zunächst wurden die Proben wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben aufgetaut. Für jeden Messpunkt wurde zweimal je 20ml Kulturmedium in ein Falconröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen für 6min bei 6000rpm und 2°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit kaltem Wasser (4°C) gewaschen, in 500µl wasserfreiem Methanol resuspendiert und in ein Glasröhrchen mit Schraubverschluss überführt. Nun wurden 100µl des internen Standards, (1mg/ml Nonadecansäure in Chloroform, Sigma-Aldrich, Deutschland) zur Probe pipettiert. Aus einer frisch hergestellten Lösung aus Methanol und Acetylchlorid (Sigma-Aldrich, Deutschland) im Verhältnis von 10:1 wurden 2ml zur Zellsuspension gegeben. Der Ansatz inkubierte bei 50°C für 16h im Wasserbad. Jede Probe wurde dann mit 2 x 5ml Hexan ausgeschüttelt. Die obere Hexanphase wurde in einem 50 ml Rundkolben vereint und am Rotationsverdampfer bei 45°C abgezogen. Die Proben wurden dann in 2 x 750µl Hexan aufgenommen, in GC-Vials überführt und bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

4.4.8 Gaschromatographische Analyse der Lipide

Zur Bestimmung der intrazellulären Fettsäuren-, Squalen- und Sterolkonzentrationen wurde ein Gaschromatograph (GC) *14-B* mit Flammenionisationsdetektor (FID) (Shimadzu, Japan) verwendet. Die Proben wurden mit einer Kapillarsäule (*WCOT FUSED SILICA 25m x 0,25mm ID, DF=0,12µm COATING CP-Sil 5CB*, Varian, Deutschland) analysiert. Die verwendete Trennsäule ist mit einem unpolaren Trägermaterial versehen, das für die Auftrennung von ebenfalls weitgehend unpolaren Substanzen wie Lipiden optimiert ist. Die Brenngase Wasserstoff (3.0) und synthetische Luft (5.0) sowie das Trägergas Stickstoff (5.0) wurden von AirLiquide, Deutschland, bezogen. Das Temperaturprogramm des GC wurde zunächst optimiert, um eine ausreichende Trennleistung in kürzester Zeit zu ermöglichen. Für eine Auftrennung der Lipide wurde folgendes Temperaturprogramm festgelegt:
Die Starttemperatur von 150°C wurde für zwei Minuten gehalten bevor mit einer Rate von 15°C/min auf ein Temperatur von 250°C geheizt wurde. Nach 37min wurde mit auf eine finale Temperatur von 290°C mit einer Rate von 5°C/min geheizt, die für weitere 7min gehalten wurde. Die Injektortemperatur betrug jeweils 290°C sowie die Detektortemperatur

300°C. Die Proben wurden im splitlosen Modus mit Hilfe eines Autosamplers *AOC-20i* aufgegeben. Das injizierte Probenvolumen betrug für alle Untersuchungen 0,3µl.

Zur Identifizierung der Lipide des Ergosterolbiosynthesewegs im GC-Chromatogramm und zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden Standards der Sterole Ergosterol, Lanosterol, Cholesterol, 7-Dehydrocholesterol, Desmosterol sowie von Squalen (alle Sigma-Aldrich, Deutschland) verwendet. Bei Sterolen, für die keine kommerziellen Standards erhältlich waren, erfolgte die Bestimmung über publizierte relative Retentionszeiten. Die Identität der einzelnen Komponenten wurde durch GC-MS Messungen am Fachgebiet Wasserreinhaltung der Technischen Universität Berlin durch Daniel Wicke durch Datenbankabgleich (NIST Scientific and Technical Database, USA) verifiziert.
Um für die Sterole ohne verfügbaren kommerziellen Standard Konzentrationen aus den Peakflächen berechnen zu können, wurde der Umrechnungsfaktor für Cholesterol angenommen. Diese Methode ist auch bei Lindenthal et al. (2001) beschrieben. Aufgrund der sehr ähnlichen Molekülstrukturen und ähnlicher Molekülmassen der analysierten Sterole sind vernachlässigbare Fehler zu erwarten. So wurden für die kommerziell erhältlichen Standards, mit Ausnahme des Ergosterols, nahezu identische Responsefaktoren ermittelt. Ergosterol weist in den GC-Chromatogrammen eine charakteristische Peakform auf (Vgl. Abbildung 5.1), die sich in einem erniedrigten Umrechnungsfaktor von Peakfläche zu Konzentration im Vergleich zu allen anderen analysierten Sterolen widerspiegelt.

Die Bestimmung der Fettsäurenkonzentration erfolgte über die gaschromatographische Messung der Fettsäurenmethylester (FAME), die analog zur Analyse der Sterole durchgeführt wurde. Die Zuordnung aller einzelnen FAME im GC-Chromatogramm konnte mit Hilfe der Standards GLC10, GLC20, GLC50 und GLC100 (alle Sigma-Aldrich, Deutschland) realisiert werden. Für die Ermittlung der Responsefaktoren der FAME wurde für jede Komponente eine Kalibriergerade erstellt. Nachdem die Konzentrationen der FAME bestimmt worden waren, konnte das Gewicht der Methylgruppe abgezogen werden, um die ursprünglich in der Zelle vorliegende Fettsäurenkonzentration zu ermitteln. Auf die beschriebene Weise wurden die gesättigten Fettsäuren mit geradzahliger Kohlenstoffkettenlänge von C12 bis C26 bestimmt. Des Weiteren wurden die Konzentrationen der ungesättigten Fettsäuren C16:1 (Palmitoleinsäure) und C18:1 (Ölsäure) gemessen.

Zur Aufzeichnung und automatisierten Auswertung diente die Software *GCSolution V2.2* (Shimadzu, Japan). Die Peaks einer Probe lagen zum Teil sehr eng zusammen (Vgl. Abbildung 5.1). Daher wurden sie ggf. manuell nachintegriert, wenn sie von der Software

nicht als unterschiedliche Komponenten erkannt wurden. Auch bei lokalen Verschiebungen der Basislinie im Chromatogramm, wie sie zum Beispiel bei sehr hohen Stoffkonzentrationen auftraten, wurden die Peaks einzeln bearbeitet.

4.4.9 Bestimmung der Glucosekonzentration im Hefemedium

Um den Verlauf der Kultivierungen im Bioreaktor zu charakterisieren, wurden die Substratkonzentrationen der aeroben und anaeroben Phasen bestimmt. Die Glucosekonzentration des Mediums wurde hierbei mit dem Test GLUKOSE liquiUVmono (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica, Deutschland) ermittelt. Das Prinzip der Messung beruht auf der enzymatischen Umsetzung von Glucose in Glucose-6-phopshat. Hierbei wird NADH gebildet, das eine messbare Extinktionsänderung am Photometer bewirkt. Zur Glucosebestimmung wurden 10µl des Medienüberstandes mit 1ml der fertigen Reagenzlösung vermischt und für 10min unter gelegentlichem Umrühren bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption der Probe wurde anschließend bei 340nm am Photometer gemessen. Die anschließende Berechnung der Glucosekonzentration erfolgte über eine Kalibriergerade, die mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von Glucose (Sigma-Aldrich, Deutschland) in bidest. H_2O erstellt wurde.

4.4.10 Bestimmung der Ethanolkonzentration im Hefemedium

Im Anschluss an die anaerobe Kultivierungsphase stand der Hefe Ethanol als Kohlenstoffquelle im Kulturmedium zu Verfügung. Um die Ethanolkonzentration im Medium ermitteln zu können, wurden 5µl einer 1%igen HCl-Lösung, 2490µl bidest. H_2O, 3110µl Methanol und 780µl Chloroform in 10ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und vermischt. Nach der Zugabe von 500µl des Kulturüberstands und 120µl des internen Standards (Isopropanol 1:40 in bidest. H_2O) wurde die Probe für 15s mit einem Vortexgerät durchmischt und dann für 2h auf einem Überkopfschüttler (Rotator Drive STR4, Stuart Scientific, UK) bei 35rpm fixiert. Die Proben wurden im Anschluss zur Phasentrennung bei 10000rpm für 10min zentrifugiert. Die untere Chloroformphase wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette in Eppendorfgefäße überführt. Um Wasser restlos aus der Probe zu entfernen, wurde in jedes Eppendorfgefäß eine Kugel Molekularsieb (Porenweite 5Å, Carl Roth, Deutschland) gegeben. Nach einer Inkubation von 1min konnte nun die Probe in das GC-Vial pipettiert werden. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Die gaschromatographische Analyse erfolgte ebenfalls am GC-FID 14B unter Verwendung derselben technischen Gase (siehe Kap. 3.9). Es wurde eine DB-WAX GC-Säule (Factor Four VF - 624 MS, Varian, Deutschland) verwendet. Das Trägermaterial dieser Kapillarsäule ist für die Auftrennung polarer Moleküle wie Alkohole entwickelt. Die Proben wurden bei einer Injektortemperatur von 150°C mit einem Split von ca. 1/20 aufgegeben und bei einer

Detektortemperatur von 280°C analysiert. Das injizierte Probevolumen betrug jeweils 1µl. Die Anfangstemperatur der GC-Säule von 50°C wurde für 5min gehalten, bevor mit 4°C/min auf eine Endtemperatur von 150°C geheizt wurde. Das Temperaturprogramm endete mit einer Haltezeit der maximalen Temperatur für 15min

4.5 Berechnungen der intrazellulären Stoffflüsse

4.5.1 Die Software COMPFlux©

Das Programm mit dem Namen COMPFlux© kann aus den Konzentrationen verschiedener Metabolite die Stoffflüsse eines zuvor definierten Biosyntheseweges berechnen. COMPFlux© wurde in der Programmiersprache C für Untersuchungen an dem Mikroorganismus *Clostridium acetobutylicum* entwickelt [Desai et al., 1997]. Dem Fachgebiet Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Berlin wurde die Software von Terry Papoutsakis zur Verfügung gestellt. Das Programm setzt sich aus siebzehn Quelldateien (Datei: **.c*) sowie drei Bibliotheksdateien (Datei: **.h*) zusammen. Diese Dateien enthalten die zur Berechnung und Datenausgabe notwendigen Informationen. Durch das Kompilieren der Quell- und Bibliotheksdateien entsteht die ausführende Datei **.exe*. Als Compiler wurde der CodeWarrior© verwendet. Zur Ausführung des Programms Compflux© werden die Datendatei (Datei: **.dat*) und die Parameterdatei (Datei: **.par*) eingelesen und verarbeitet. Sind die Stoffflüsse kalkuliert, werden drei weitere Dateien erzeugt, die die Resultate der Berechnungen beinhalten (Dateien: **.con, *.txt, *.rat*).

Die Datei **.dat* enthielt die aus den Konzentrationsmessungen bestimmten Werte, die zu Berechnung der Stoffflüsse in molare Konzentrationen umgerechnet wurden. Im Falle hoher Messwertschwankungen, wie sie bei kontinuierlicher Kultivierung auftraten, wurde eine Kurvenanpassung mit dem *Curve fitting tool* der Software Matlab® und Verwendung einer Spline-Funktion durchgeführt.

Die Datei vom Typ **.rat* beinhaltete die berechneten Stoffflüsse als jeweils zwei Datensätze in tabellarischer Form. Hierbei handelte es sich um die Stoffflüsse vor und nach der globalen Optimierung durch COMPFlux©. Aus den Stoffflüssen der globalen Optimierung wurden die dazugehörigen Metabolitkonzentrationen errechnet, die dann in die Datei vom Typ **.con* geschrieben wurden. Um den Fehler zu bestimmen, der bei der Abschätzung der Stoffflüsse durch COMPFlux© aufgetreten ist, konnten nach der Berechnung die prozentualen Abweichungen der eingegebenen und errechneten Konzentrationen verglichen werden. In der dritten Ausgabedatei vom Typ **.txt* wurde die gesamte Berechnung des Programms dokumentiert. Sowohl die Ausgabedateien als auch die eingelesenen Dateien konnten mit dem Windows Editor© geöffnet und verändert werden. Für alle Eingaben in Dateien von COMPFlux© ist die Verwendung festgelegter Formate erforderlich.

Die Namen der eingelesenen bzw. ausgegebenen Dateien wurden in einer weiteren Datei (*compflux.com*) festgelegt. Als Betriebssysteme der Computer, auf denen COMPFlux© ausgeführt wurde, waren Windows2000© bzw. WindowsXP© installiert.

4.5.2 Programmanpassung

Zur Berechnung der Stoffflüsse innerhalb des Ergosterol- bzw. Cholesterolbiosynthesweges mussten jeweils drei Programmdateien verändert werden: In die Benutzerdatei *user.c* wurden alle Gleichungen zur Berechnung der Bildungsraten der einzelnen Metabolite in Form einer stöchiometrischen Matrix (Koeffizientenmatrix) eingefügt. Weiterhin wurden in der Parameterdatei *.par festgeschrieben, wie viele Komponenten (*Num Components*) und welche Stoffflüsse (*Num Parameter*) berechnet werden. Weiterhin sind in dieser Datei die Größenordnungen aufgelistet, zwischen denen sich die errechneten Stoffflüsse für jede einzelne Reaktion bewegen dürfen (*Pathway Flux Ranges*). Die Namen der auftretenden Stoffflüsse sowie die Bezeichnung der Zeitpunkte sind ebenfalls in der Parameterdatei festzulegen (*Species Names*). Unter *Exchangeables* werden die gemessenen Komponenten aufgelistet, während unter *Intermediates* die Sterole eingetragen werden, für die eine Pseudo-Steady-State-Approximation angenommen wird (deren Konzentrationen also nicht bestimmt worden sind). Optional können auch durch die Zellen aufgenommene Sterolmengen gekennzeichnet werden (*Input Components, Flow Components*). Auch die Anzahl von Iterationsschritten mit der die Berechnungen durchgeführt werden sollen, kann variiert werden (*Sample Size*). Die Felder *Cutoff Fraction*, *Max Local Iteration* und *Max Global Iteratio*n definieren weiterhin die vom Programm durchgeführten Iterationsschritte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die voreingestellten Werte für die Sonderoptionen *User Parameter*, *Acceptable Factor* und *Specific Rates* nicht verändert.

In einer dritten Datei, der sog. Datendatei, wurden zu den jeweiligen Messzeitpunkten die ermittelten molaren Sterolkonzentrationen bezogen auf das Trockengewicht der Zellen [µmol/g_{Zelle}] eingegeben. In dieser Datei wurde auch ein abgeschätzter, durchschnittlicher Fehler der jeweiligen Konzentration eingegeben (z.B. aufgrund von Messwertschwankungen). Dieser zulässige Fehler ermöglicht die Berechnung von realistischen Werten innerhalb eines festgelegten Bereiches, in welchem die von der Software errechneten Konzentrationen von den Messwerten abweichen. Sowohl für die eingehende Komponente Squalen als auch für den Ester des Endprodukts Ergosterol wurden höhere Fehler zugelassen, um im Gegenzug die Stoffflüsse zwischen den einzelnen Syntheseschritten möglichst genau abzubilden. Exemplarisch ist ein Ausdruck einer Parameterdatei und Datendatei im Anhang B zu finden.

Für die Anpassung der Software COMPFlux© zur Berechnung der Sterolstoffflüsse war es notwendig, die Programmdateien in das Kompilierprogramm CodeWarrior© von Metroworks zu laden. Hierfür wurden die COMPFlux©-Dateien in ein neues Projekt von CodeWarrior© eingefügt und die Reihenfolge des Auslesens festgelegt. Die ursprünglich vorhandene Datei *MacOS8* für Apple Macintosh Betriebssysteme wurde nicht in das CodeWarrior-Projekt eingefügt.

4.5.3 Gleichungen für die Ergosterolbiosynthese

Die Gleichung 2.2 $S \cdot \vec{v} = d\vec{X}_i / dt$ beinhaltet die einzelnen Gleichungen der Reaktionen im Syntheseweg, wobei die Systemgrenze den Post-Squalensyntheseweg umfasst. Die 17 Gleichungen der Bildungsraten für die Sterolbiosynthese in Hefe setzen sich aus 13 Gleichgewichten für gemessene Intermediate sowie aus 4 Gleichgewichten unbestimmter Intermediate zusammen. Diese Gleichungen beruhen auf der Kenntnis des Stoffwechselweges. Hierbei wurde angenommen, dass die Reaktionen innerhalb des Syntheseweges, mit Ausnahme der Veresterungsreaktionen, irreversibel verlaufen. Nur für die Reaktion von Fecosterol zu Episterol wird in der Literatur eine Rückreaktion beschrieben. Das Gleichgewicht dieser Umsetzung ist jedoch stark zum Produkt Episterol verschoben [Yabusaki et al., 1997]. Instabile Intermediate wurden in den Betrachtungen vernachlässigt.

Um den Stoffffluss in die Ergosterolsynthese zu erfassen, wurde ein sog. Sourceflux (Quellfluss) über die Sytemgrenze eingefügt, der die Bildung von Squalen quantifiziert. Hierfür wurde eine imaginäre Quellkomponente eingefügt, die als Squalenvorstufe definiert wurde. Die Quellkomponente wurde in der Parameterdatei als „input component“ und „flow component“ geführt. Die Konzentration in der Datendatei wurde für jeden Zeitpunkt auf Null gesetzt, so dass eine scheinbare Akkumulation ausgeschlossen wurde.

$rSQU : Quellfluss = Squalen$

$rLNL : Squalen + NADH + H^+ + O_2 = Lanosterol + H_2O$

$rDTRL : Lanosterol + 3NADH + 3H^+ + 3O_2 = 4{,}4Dimethylcholesta - 8{,}14{,}24 - trienol + 3NAD^+ + 4H_2O + HCOO^-$

$rDZML : 4{,}4Dimethylcholesta - 8{,}14{,}24 - trienol + NADH + H^+ = 4{,}4Dimethyl - zymosterol + NAD^+$

$rZYMN : 4{,}4Dimethylzymosterol + 5NADH + 5H^+ + 6O_2 = 4Methylzymosterol + 5NAD^+ + 2CO_2 + 8H_2O$

$rZYM : 4Methylzymosterol + NADH + H^+ = Zymosterol + NAD^+$

$rFCI : Zymosterol + S - adenosyl - L - methionin = Fecosterol + S - adenosyl - L - homocystein$

$\pm rEPL : Fecosterol + H^+ = Episterol + H^+$

$rERDL : Episterol + O_2 = Ergosta - 5{,}7{,}24(28) - trienol + H_2O_2$

$$rERTL: Ergosta-5,7,24(28)-trienol + NAD^{+} = Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraenol + NADH + H^{+}$$

$$rERGL: Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraenol + NADH + H^{+} = Ergosterol + NAD^{+}$$

Die Veresterungsgleichungen für Lanosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, Zymosterol, Fecosterol, Episterol und Ergosterol lauten:

$$\pm rLNLEST: Lanosterol + acyl - CoA = Lanosterolester + CoA$$

$$\pm rZYMLEST: 4,4-Dimethylzymosterol + acyl - CoA = 4,4-Dimethylzymosterolester + CoA$$

$$\pm rZYMEST: Zymosterol + acyl - CoA = Zymosterolester + CoA$$

$$\pm rFECEST: Fecosterol + acyl - CoA = Fecosterolester + CoA$$

$$\pm rEPIEST: Episterol + acyl - CoA = Episterolester + CoA$$

$$\pm rERGLEST: Ergosterol + acyl - CoA = Ergosterolester + CoA$$

Aus der Gleichung 2.2 folgt beim Übergang von Stoffmengen zu intrazellulären Konzentrationen:

$$d\vec{c}_i/dt = S \cdot \vec{r}_i - \mu\vec{c}_i$$

Der Term $\mu\vec{c}_i$ berücksichtigt die Verringerung der intrazellulären Sterol(ester)konzentrationen durch Wachstum. Da dieser Verdünnungseffekt üblicherweise gering ist bzw. in dieser Arbeit die Stoffflüsse für Zeiträume berechnet werden, in denen kein Wachstum beobachtet wird ($\mu = 0$), ergibt sich:

$$d\vec{c}_i/dt = S \cdot \vec{r}_i$$

Aus den obigen stöchiometrischen Gleichungen konnte nun die stöchiometrische Matrix S (Koeffizientenmatrix) aufgestellt werden (Anhang A). In die Quelldatei *user.c* finden die Gleichungen und Stöchiometrien in folgender Form Eingang:

$$dc/dt = (SF_1 \cdot r_1) + (SF_2 \cdot r_2) + ... + (SF_n \cdot r_n)$$

mit	dc/dt	Konzentrationsänderung pro Zeit
	SF_n	Stöchiometriefaktor
	r_n	Fluss

In der Parameter- und Datendatei wurden im Laufe der Arbeiten die Fehlergrenzen für die Berechnung der Stoffflüsse optimiert und den jeweiligen Fermentationsbedingungen angepasst. So wurden beispielsweise in Fermentationsexperimenten, in denen besonders hohe Stoffflüsse auftraten, die maximal zulässigen Stoffflüsse und Fehlergrenzen erhöht. Bei einer Zugabe von Sterolintermediaten wurden die entsprechenden Input-Komponenten eingeführt und für den vermehrten Rechenaufwand die Zahl der lokalen und globalen Iterationen erhöht.

4.5.4 Gleichungen für die Cholesterolbiosynthese

Die aufgestellten Gleichungen basieren auf dem von Marijanovic et al. (2003) publizierten Post-Squalen-Syntheseweg des Cholesterols. Da es nicht möglich war, die Gesamtheit der Sterolintermediate der Cholesterolbiosynthese in den GC-Chromatogrammen zu identifizieren, wurden einzelne Reaktionen zusammengefasst. Analog zur Anpassung für die Sterolbiosynthese in Hefe wurde ein Quellfluss zum Squalen eingeführt. Der vereinfachte Syntheseweg, unter dessen Annahme die Stoffflüsse errechnet wurden, lässt sich durch folgende Gleichungen beschreiben:

$$rSQU : Quellfluss = Squalen$$

$$rLNL : Squalen + NADH + H^+ + O_2 = Lanosterol + H_2O$$

$$rDZML : Lanosterol + 4NADH + 4H^+ + 3O_2 = 4{,}4Dimethyl - zymosterol + 4NAD^+ + 4H_2O + HCOO^-$$

$$rZYM : 4{,}4 - Dimethylzymosterol + 6NADH + 6H^+ + 6O_2 = Zymosterol + 6NAD^+ + 2CO_2 + 8H_2O$$

$$rLTL : Zymosterol + NAD(P)^+ = Lathosterol + NAD(P)H + H^+$$

$$rDHCL : Lathosterol + O_2 = 7 - Dehydrocholesterol + H_2O_2$$

$$rCHOL : Lathosterol + NAD(P)^+ = Cholesterol + NAD(P)H + H^+$$

Für die jeweilige Esterbildung der Sterole gilt:

$$\pm rLNLEST : Lanosterol + acyl - CoA = Lanosterolester + CoA$$

$$\pm rZYMLEST : 4{,}4 - Dimethylzymosterol + acyl - CoA = 4{,}4 - Dimthylzymosterolester + CoA$$

$$\pm rZYMEST : Zymosterol + acyl - CoA = Zymosterolester + CoA$$

$$\pm rLNLEST : Lanosterol + acyl - CoA = Lanosterolester + CoA$$

$$\pm rLNLEST : Lanosterol + acyl - CoA = Lanosterolester + CoA$$

Auch für die Berechnungen der Stoffflüsse im Cholesterolbiosyntheseweg wurden Änderungen in der Parameter- und Datendatei vorgenommen. Entsprechend der auftretenden Sterolkonzentrationen wurden maximal zulässige Stoffflüsse, Fehlergrenzen und Zahl der Iterationen bei der Kalkulation optimiert.

4.6 Kinetische Ansätze

Um den Ablauf der Sterolbiosynthese in Hefe mit kinetischen Ansätzen beschreiben zu können, wurde zunächst versucht, Abhängigkeiten zwischen den intrazellulären Sterolkonzentrationen und Sterolbildungsraten aufzudecken. Die einzelnen Bildungsraten wurden hierfür aus den zeitlich gewichteten Mittelwerten der berechneten Stoffflüsse ermittelt (Vgl. Kapitel 2.3.3). Da für kinetische Konstanten die Einheit Millimolar [mM] gebräuchlich ist, wurden die Stoffflüsse von der Einheit [µmol/g_{Zelle}*h] in [µmol/l_{Zelle}*h] umgerechnet. Dadurch sind die Flüsse nicht auf das Zelltrockengewicht sondern auf Zellflüssigkeit bezogen. Für die Berechnung des durchschnittlichen Zellvolumens wurde eine sphärische Zellform angenommen. Hierfür wurde eine Vielzahl von Zellen mikroskopisch vermessen und eine durchschnittliche Größe ermittelt [Weuster-Botz und de Graaf, 1996].

In einem nächsten Schritt wurde eine berechnete Reaktionsrate über verschiedenen Sterolkonzentrationen bzw. Konzentrationsverhältnissen grafisch aufgetragen. War ein Trend zwischen Intermediatkonzentration (bzw. -verhältnis) und Bildungsrate erkenntlich, wurde versucht, mit Gleichungen der Enzymkinetik diese Abhängigkeit zu beschreiben.

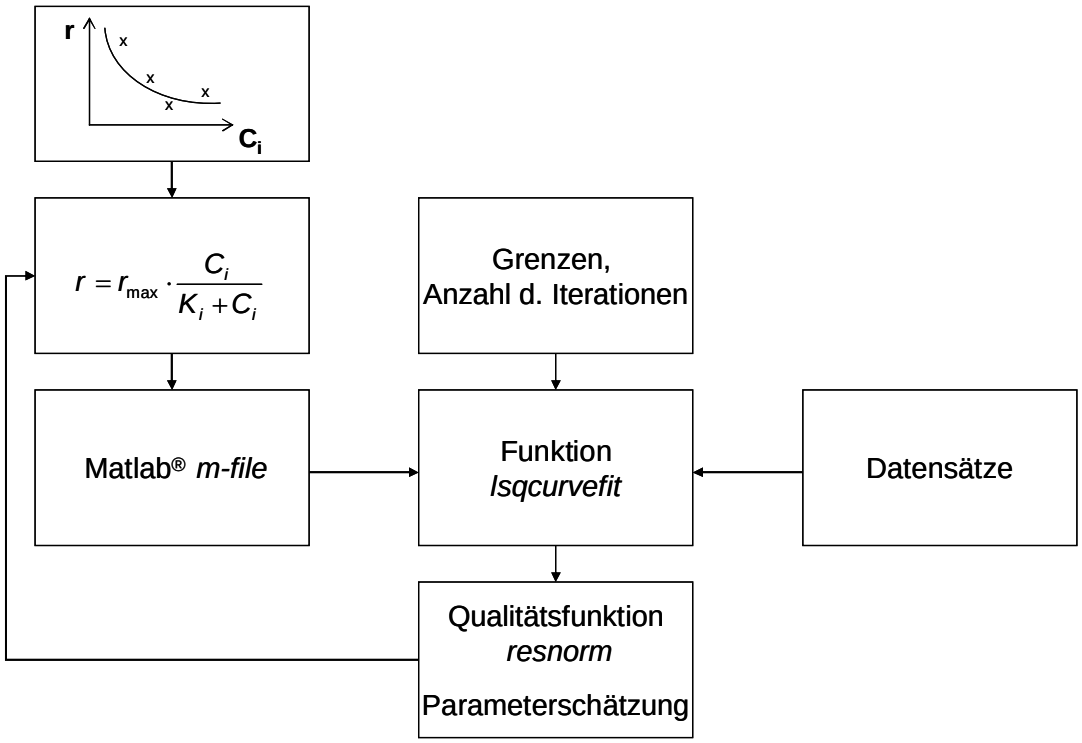


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Überprüfung der kinetischen Ansätze.

Um die in diesen Gleichungen enthaltenen Konstanten zu ermitteln, wurde die Funktion *lsqcurvefit* in der *Optimization Toolbox* der Software Matlab® verwendet. Mit dieser Funktion lassen sich durch nicht-lineare Regression bei gegebenen Inputdaten und erwarteten Outputwerten Koeffizienten bestimmen. Die Funktion verwendet den Matlab® *Large-Scale-Algorithmus* [Coleman und Li, 1994, Coleman und Li, 1996]. Die Lösung der Funktion *lsqcurvefit* wurde durch Eingabe von jeweiligen unteren und oberen Grenzen für die Parameter sowie durch die Anzahl der durchzuführenden Iterationen beschränkt. Bei Ausführung der Funktion *lsqcurvefit* wird dann auf eine benutzerdefinierte Datei *(m-file*) zurückgegriffen, in der die kinetische Gleichung festgeschrieben ist.

Die im *m-file* definierte Gleichung und die von Matlab® berechneten Parameter zur Beschreibung einer Kinetik wurden anhand der Summe der Fehlerquadrate (*resnorm*) optimiert. Wurde ein passender Parametersatz für einen kinetischen Ansatz gefunden, wurden diese Parameter erneut für die Beschreibung der Bildungsraten unter allen Fermentationsbedingungen optimiert. Konnte keine allgemeingültige Lösung gefunden werden, wurde der kinetische Ansatz modifiziert.

5 Ergebnisse

5.1 Intrazelluläre Sterolkonzentrationen und -stoffflüsse der Hefe *S.cerevisiae* im Batch-Prozess

Für die Herleitung eines Modells, das die Ergosterolbiosynthese beschreiben kann, wurden vergleichende Stoffflussanalysen durchgeführt. Hierfür war es zunächst notwendig, die intrazellulären Sterolkonzentrationen reproduzierbar über den gesamten Kultivierungszeitraum zu erfassen. Die Kenntnis über die typischen Sterolzusammensetzungen und Größenordnungen der auftretenden Stoffflüsse innerhalb des Post-Squalenwegs bildete die Grundlage für die Gestaltung aller weiteren Experimente, in denen die Ergosterolbiosynthese beeinflusst werden sollte.

Zunächst wurde die Hefe *S.cerevisiae* aerob auf dem Schüttelkolben kultiviert, um die Aufarbeitungsmethode für die Sterole zu optimieren und die GC-Analytik zu etablieren. Ein repräsentatives GC-Chromatogramm einer aeroben Schüttelkolbenkultur ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

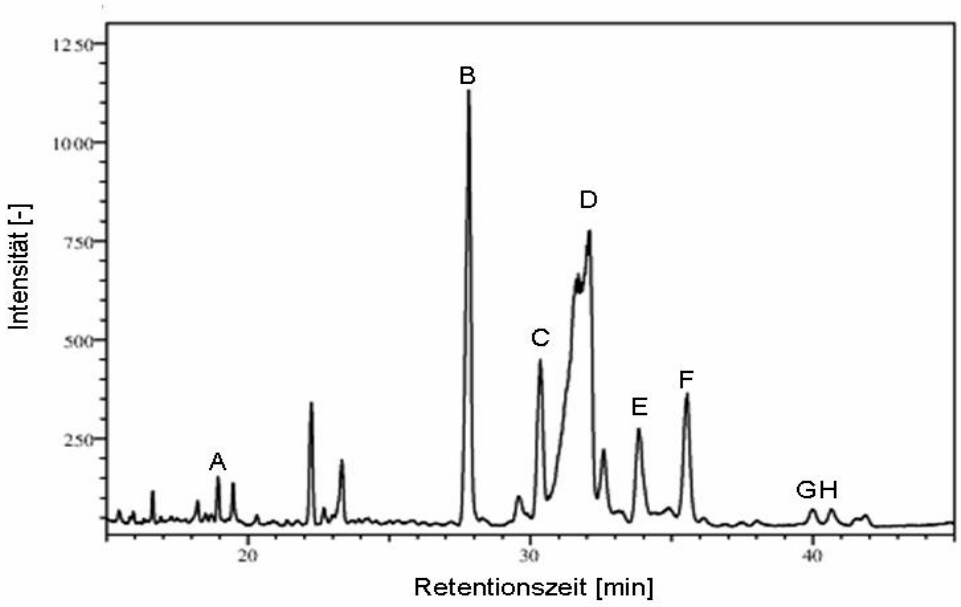


Abb. 5.1: Chromatogramm einer gaschromatografischen (GC) Analyse der Sterole aus der Aufarbeitung einer aeroben Schüttelkolbenkultur von *S.cerevisiae.* A: Squalen B: Cholesterol (interner Standard) C: Zymosterol D: Ergosterol E: Fecosterol F: Episterol G: Lanosterol H: 4,4-Dimethyl-zymosterol.

Um die für die Stoffflussanalyse erforderliche Genauigkeit der Quantifizierung gewährleisten zu können, wurden ausschließlich Metabolite quantifiziert, die zweifelsfrei durch kommerziell erhältliche Standards bzw. GC-MS Messungen identifiziert werden konnten. Darüber hinaus wurde die Probenmenge so gewählt, dass die analysierten Stoffe in dafür ausreichenden Konzentrationen in der Probe vorlagen. Somit konnten in den GC-Chromatogrammen gut integrierbare Peaks erhalten werden. Im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit wurden

die Konzentrationen von Squalen sowie der freien und veresterten Sterole Lanosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, Zymosterol, Fecosterol, Episterol und Ergosterol bestimmt. Die Entwicklung des Analytikprotokolls wurde auch unter dem Gesichtspunkt optimiert, dass eine Vielzahl von Proben aus den Hefekultivierungen im Bioreaktor zu erwarten waren. Daher wurde versucht, sowohl die Anzahl der Arbeitsschritte während einer Sterolaufarbeitung als auch den Verbrauch von Chemikalien, wie z.B. Lösungsmittel zu minimieren. Die endgültige Methode ist unter Kapitel 4.5.1 und 4.5.3 beschrieben.

Nach den Vorversuchen in Schüttelkulturen wurden Batch-Standardfermentationen im Bioreaktor mit 10l Arbeitsvolumen sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Der Verlauf der Konzentrationen der Metabolite im Sterolmetabolismus konnte dabei reproduzierbar gemessen werden.

5.1.1 Anaerobe Kultivierung

In den Abbildungen 5.2 und 5.3 ist der Verlauf der Biotrockenmasse sowie der intrazellulären Squalen- und Ergosterolkonzentration in anaeroben Batch-Fermentationen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* dargestellt. Das Wachstum der Hefezellen unter anaeroben Bedingungen war durch den Mangel an Sterolen und ungesättigten Fettsäuren limitiert, da deren Synthese ohne verfügbaren Sauerstoff unterbunden ist.

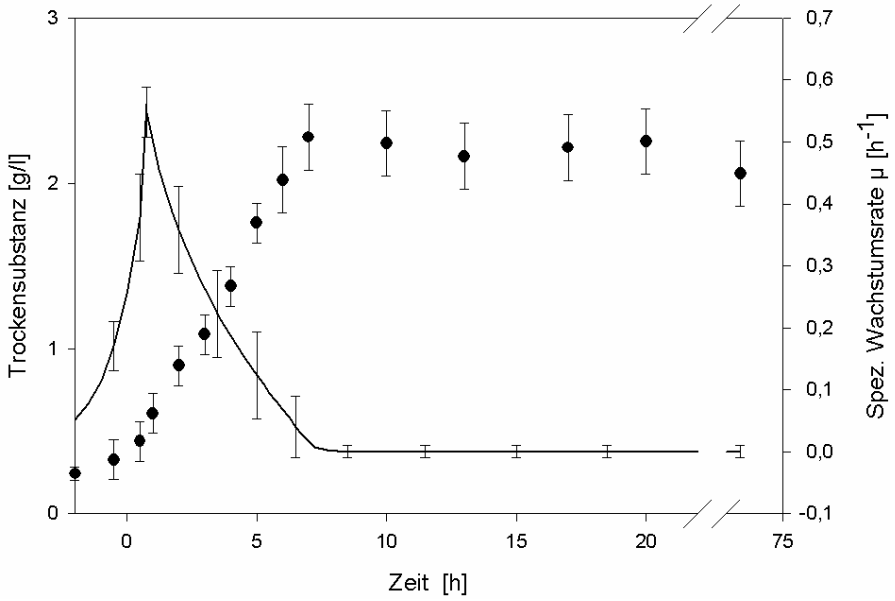


Abb. 5.2: Wachstum der Hefe *S.cerevisiae* während einer anaeroben Fermentation. Spezifische Wachstumsrate — und Trockensubstanz ● .

Während die Biomassekonzentration im Reaktor bei anaerober Kultivierung anstieg (Abbildung 5.2), sanken die intrazellulären Sterolkonzentrationen, wie in Abbildung 5.3 und 5.4 dargestellt. Der Sterolprecursor Squalen reicherte sich hingegen stark in den Hefezellen an (Abbildung 5.3).

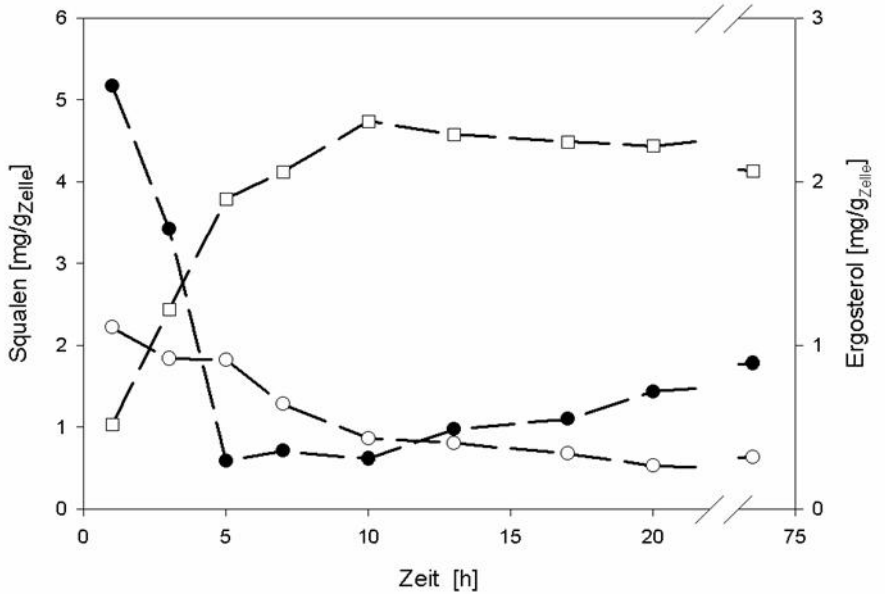


Abb. 5.3: Intrazellulärer Konzentrationsverlauf von Squalen —□—, freiem Ergosterol —○— und verestertem Ergosterol —●— bei anaerober Batch-Fermentation.

Die Hefezellen wiesen nach einigen Stunden anaeroben Wachstums ein intrazelluläres Ergosterollevel auf, das in der Literatur als essentiell für die Zellen beschrieben wird [Jollow et al., 1968, Deytieux et al. 2005]. Besonders die Konzentrationsabnahme des Ergosterolesters war in den ersten 5h der anaeroben Kultivierung zu beobachten. Verestertes Ergosterol kann in Lipidpartikeln (Vgl. Kapitel 2.1.3) in den Hefezellen gespeichert und bei Bedarf hydrolisiert werden. Das auf diese Weise freigesetzte Ergosterol kann dann z.B. für den Membranaufbau genutzt werden.

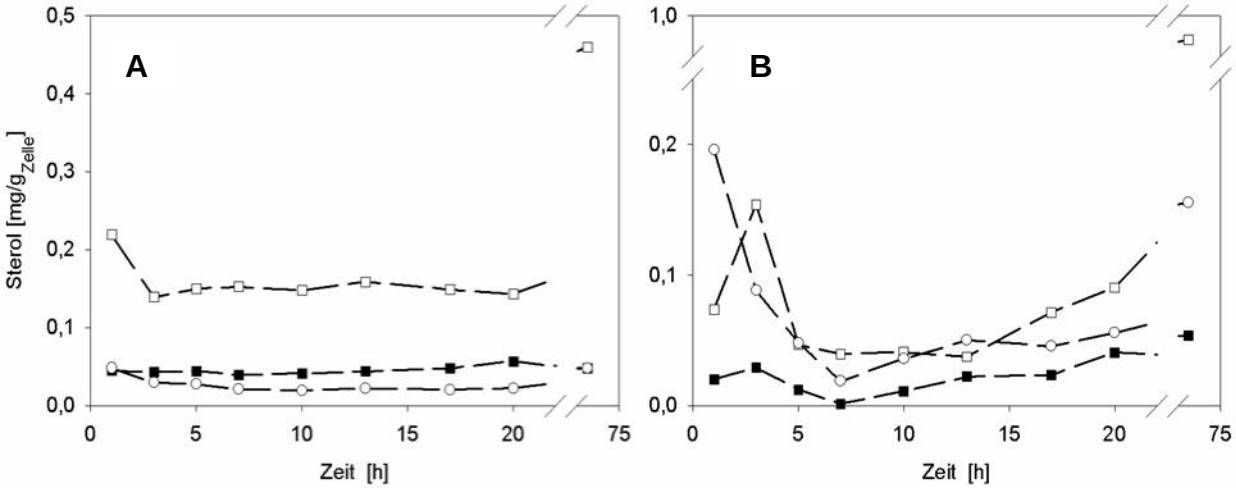


Abb. 5.4: Intrazellulärer Konzentrationsverlauf von freiem (A) und verestertem (B) Lanosterols —□—, 4,4-Dimethylzymosterol —■— und Zymosterol —○— bei anaerober Batch-Fermentation.

Auch die Konzentrationen der weiteren in dieser Arbeit quantifizierten Sterolintermediate waren bei der anaeroben Fermentation nur in sehr geringen Mengen nachweisbar (Abbildung 5.4). Lediglich das am Anfang des Post-Squalen-Synthesewegs stehende

Lanosterol zeigte im Vergleich zu den anderen freien Sterolen ein erhöhtes Niveau. Bei den Estern der in Abbildung 5.4 dargestellten Sterole war hingegen eine Abnahme der Konzentrationen bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase zu beobachten (Vgl. Abbildung 5.2). Im weiteren Verlauf der anaeroben Kultivierung stiegen die Konzentrationen der in Abbildung 5.4 dargestellten Sterole wieder leicht an. Der Anstieg kann dadurch erklärt werden, dass geringste Mengen des in den Zellen fixierten Sauerstoffs für die Sterolsynthese genutzt bzw. Sterole von toten Zellen aufgenommen werden können.

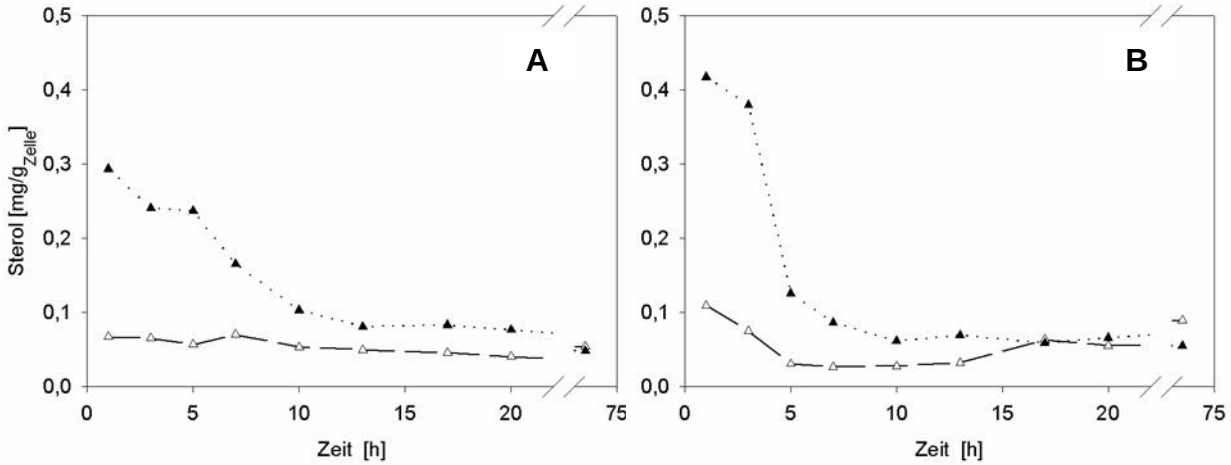


Abb. 5.5: Intrazellulärer Konzentrationsverlauf von freiem (A) und verestertem (B) Fecosterol —△— und Episterol ···▲··· bei anaerober Batch-Fermentation.

Die Mengen an freien Fecosterol blieben nahezu konstant, während die Konzentrationen des Episterol in den ersten Stunden der anaeroben Fermentation sanken. Für die Ester der beiden Intermediate Feco- und Episterol waren ebenfalls abnehmende Konzentrationen während der anaeroben Kultivierung zu verzeichnen (Abbildung 5.5).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Sterolsynthese aus der aerob wachsenden Vorkultur über die verfügbare Sterolmenge bei nachfolgender anaerober Kultivierung im Bioreaktor bestimmt. Die Anfangszelldichte hat daher sowohl einen Einfluss auf die finale Zellkonzentration im Fermenter als auch die Lipidzusammensetzung der Hefezellen. Deshalb wurde bei den experimentellen Ansätzen darauf geachtet, dass die anfängliche Optische Dichte immer jeweils 0,5 betrug um reproduzierte Ausgangsbedingungen bezüglich der Fettsäuren- und Sterolverfügbarkeit zu gewährleisten.
Unter anaeroben Kultivierungsbedingungen, wenn das Wachstum der Zellen durch den geringen Sterolgehalt inhibiert wird, ist der Hefeorganismus bestrebt, diese für ihn lebenswichtigen Lipide schnell zu synthetisieren (Vgl. Kapitel 2.1). Die starke Akkumulation des Sterolprecursors Squalen ist die Voraussetzung für das Erzielen hoher Sterolbildungsraten sobald Sauerstoff in ausreichender Menge zur Verfügung steht.

5.1.2 Aerobe Kultivierung

Bei aerober Kultivierung im Bioreaktor kann die Ergosterolbiosynthese durch die Anwesenheit von Sauerstoff ungehindert stattfinden. Das Wachstum der Hefezellen ist nicht durch die Verfügbarkeit von Sterolen und ungesättigten Fettsäuren limitiert. Unter den gewählten Bedingungen wurde eine Zellmasse von 12,2 g_{TS}/l nach 72h im Bioreaktor erreicht. Das entspricht einer Optischen Dichte von 29,7. Der Verlauf der Trockenmassekonzentration sowie der spezifischen Wachstumsrate für die aerobe Kultivierung ist in Abbildung 5.6 dargestellt.

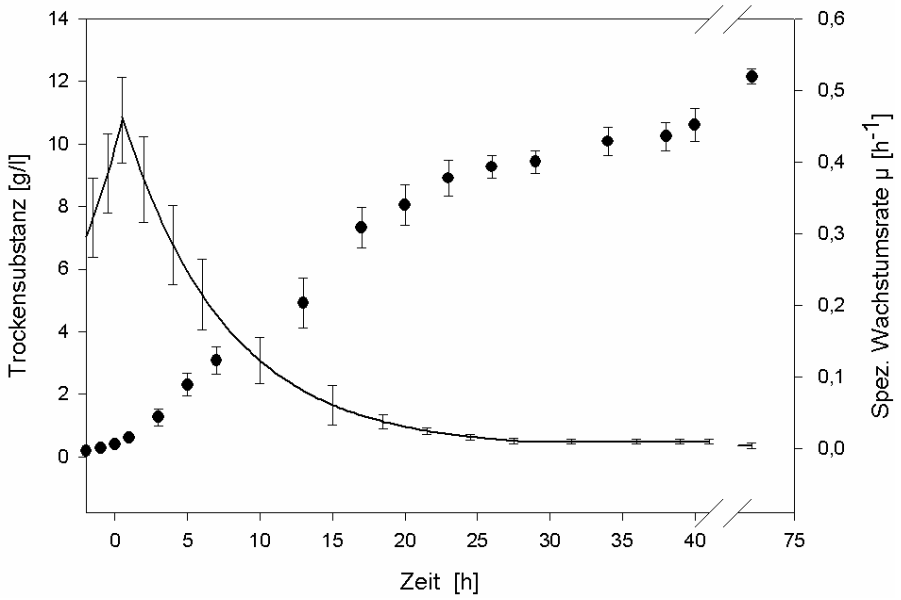


Abb. 5.6: Wachstum der Hefe *S.cerevisiae* während einer aeroben Fermentation. Spezifische Wachstumsrate — und Trockensubstanz ●.

In den folgenden Diagrammen sind die Sterolkonzentrationsverläufe der ersten 20h der aeroben Fermentation gezeigt, in denen die stärksten Änderungen auftraten, sowie die finale Lipidkonzentration bei 72h. Charakteristisch für die aerobe Kultivierung war, dass sich der Precursor Squalen nur in sehr geringen Mengen in den Zellen akkumulierte (Abbildung 5.7). Lediglich zu Zeitpunkten an denen die Hefezellen ein starkes Wachstum aufwies und in denen folglich vermehrt Sterole als Membrankomponenten benötigt wurden, stellten sich erhöhte Squalenkonzentrationen von 1,4 mg/g_{Zelle} ein.

Wie ebenfalls in Abbildung 5.7 dargestellt, stieg die Konzentration des freien Ergosterols in den Hefezellen zu Beginn auf ein Niveau von 2,5 mg/g_{Zelle} an, das sich über den gesamten Zeitraum der Kultivierung nahezu konstant blieb. Die Konzentration von freiem Ergosterol scheint einer Regulation zu unterliegen, da die unterschiedliche Bedingungen während einer Batch-Fermentation (verschiedene Wachstumsphasen, unterschiedliche C-Quellen Verfügbarkeit) stärkere Konzentrationsschwankungen vermuten ließen.

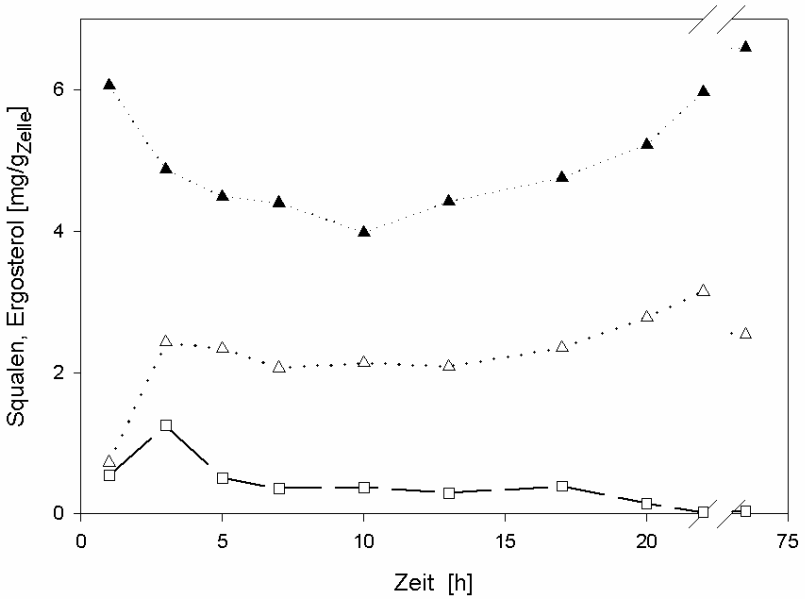


Abb. 5.7: Intrazellulärer Konzentrationsverlauf von Squalen —□— , freiem Ergosterol ···△··· und verestertem Ergosterols ···▲··· bei aerober Fermentation.

Beim Ergosterolester hingegen wurde festgestellt, dass zu Beginn der Kultivierung die intrazellulären Konzentrationen abnahmen. Weiterhin ist den Messpunkten zu entnehmen, dass die Konzentration des veresterten Ergosterols nach 10h Kultivierungszeit stark zunahm. D.h., die Sterolbiosynthese fand weiterhin statt, obwohl Ergosterol bereits in Mengen vorlag, die den essentiellen Bedarf überstiegen. Im Vergleich zur anaeroben Kultivierung wurden Konzentrationen erreicht, die dreimal (freies Ergosterol) bzw. sechsmal (Ergosterolester) so hoch waren.

Die verschiedenen Sterolintermediate ließen sich während der aeroben Kultivierung im Bioreaktor in unterschiedlichen Konzentrationen in den Hefezellen detektieren. So sanken die Konzentrationen der freien Sterole 4,4-Dimethylzymosterol, Zymosterol und Episterol am Beginn der Kultivierung innerhalb von 5h bzw. 7h auf ein Niveau, dass in den folgenden10h nahezu konstant blieb (Abbildung 5.8A und 5.9A). Die Zymosterolesterkonzentration aber erniedrigte sich fortlaufend bis zu diesem Zeitpunkt (17h). Mit Beginn der stationären Phase akkumulierten dann die Ester des Zymosterols, Episterols und Fecosterols in den Zellen (Abbildung 5.8B und 5.9B). Die Konzentration der freien Sterole aber veränderte sich kaum in dieser Wachstumsphase (Abbildung 5.8A und 5.9A).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die Konzentrationen der Sterolintermediate während der lag- und logarithmischen Wachstumsphase am stärksten änderten (bis t = 20h). In darauf folgenden Phasen konnten nur noch geringe Konzentrationsänderungen detektiert werden. Für alle freien Sterole (Abbildung 5.8 und 5.9) war eine Abnahme der intrazellulären Konzentrationen nach einer Kultivierungsdauer von 40h hin zu den Endkonzentrationen zu beobachten (nicht gezeigt).

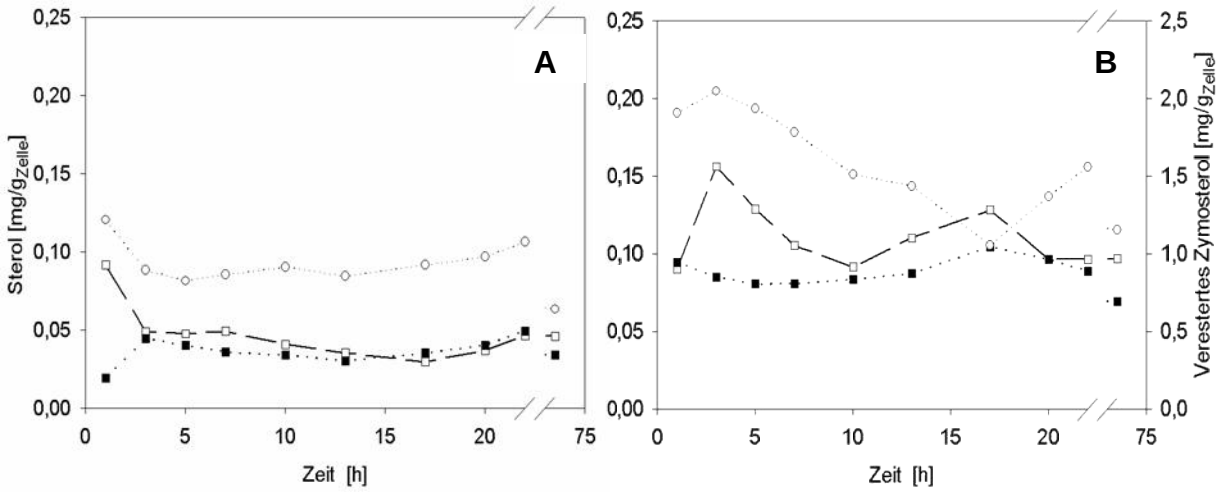


Abb. 5.8: Intrazellulärer Konznetrationsverlauf von freiem (A) und verestertem (B) Lanosterol —□—, 4,4-Dimethylzymosterol · ·■· · und Zymosterol ···○··· bei aerober Fermentation.

In Abbildung 5.8 fällt auf, dass sowohl die freien als und veresterten Zymosterolkonzentrationen deutlich in ihrem Verlauf von den anderen Intermediaten abweichen. Dabei akkumuliert der Zymosterolester in den Zellen in größeren Mengen, wenn die Ergosterolbiosynthese sich verstärkt (z.B. in Zeiten erhöhten Wachstums). Während der ersten 7h der Fermentation übersteigt dieser Sterolester die Mengen der anderen Ester um das Vielfache (Vgl. Abbildung 5.8B und 5.9B).

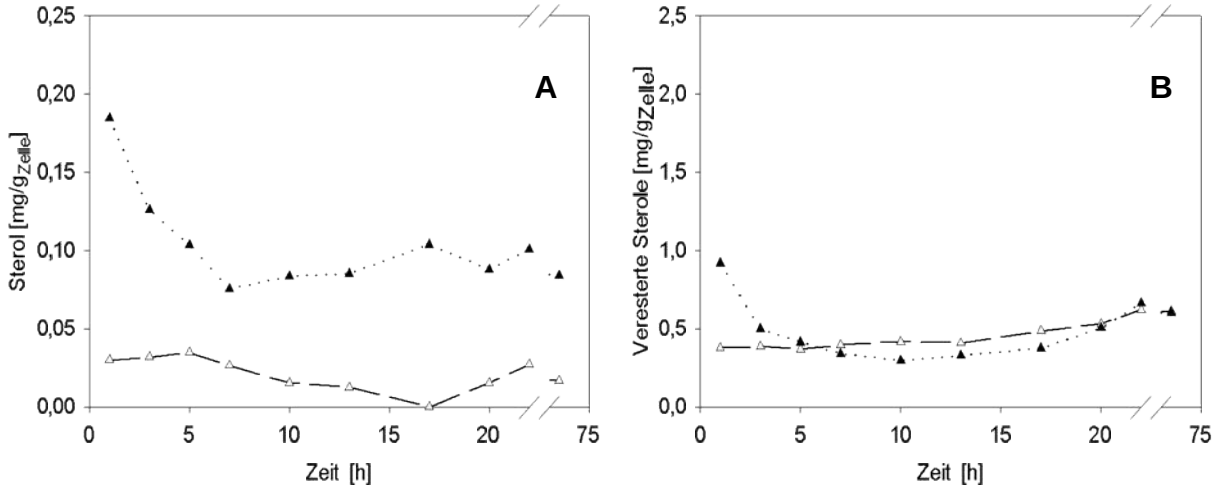


Abb. 5.9: Intrazellulärer Konznetrationsverlauf von freiem (A) und verestertem (B) Fecosterols —△— und Episterol ···▲··· bei aerober Fermentation.

Während das freie intrazelluläre Fecosterol über den gesamten Fermentationszeitraum auf einem niedrigen Niveau unter 0,05mg/g$_{Zelle}$ verbleibt, ist für das freie Episterol zunächst eine Konzentrationsabnahme zu beobachten. Für die Ester dieser beiden Sterole ergeben sich stark abweichende Verläufe im Vergleich zu den in Abbildung 5.8 dargestellten Sterolestern. Zudem kommen sie in bis zu sechsfach höheren Konzentrationen vor als bei anaeroben

Kultivierungsbedingungen. Bei diesen beiden Estern ist zudem ein Konzentrationsanstieg nach Abschluss der logarithmischen Wachstumsphase zu erkennen (Abbildung 5.9). Dieser Konzentrationsanstieg ist auch beim Endprodukt des Synthesewegs, Ergosterol, erkennbar. Aus den Daten ist an dieser Stelle ersichtlich, dass sich die in dieser Arbeit betrachteten Sterolester in zwei Intermediatgruppen im Post-Squalenweg einteilen lassen: Die Ester der frühen Sterolintermediate Lanosterol und 4,4-Dimethylzymosterol sowie die später synthetisierten Intermediate Fecosterol und Episterol.

5.1.3 Integrale Stoffflussberechnungen für die anaeroben und aeroben Kultivierungen

Für die gewonnen Konzentrationsdaten der anaeroben und aeroben Fermentationen konnte nun das Programm COMPFlux© zur Berechnung der Stoffflüsse im Ergosterolbiosyntheseweg angewandt werden. Die zulässigen Fehlergrenzen im Programm wurden den vorliegenden Konzentrationen bzw. Konzentrationsänderungen in der Parameter- und Datendatei angepasst. Insbesondere die Stoffflussanalyse bei der aeroben Fermentation wurde dazu genutzt, die Bildung der Sterole in den einzelnen Kultivierungsphasen zu beschreiben.

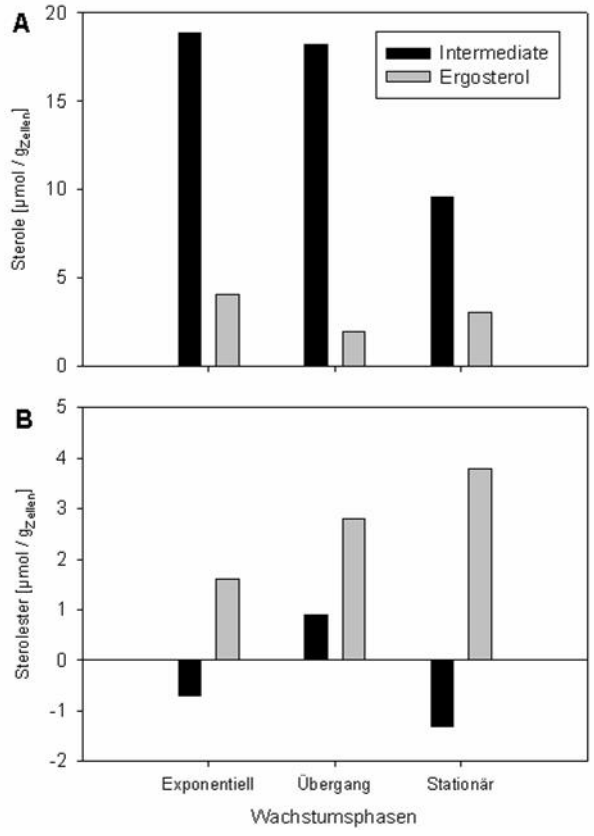


Abb. 5.10: Integrale Stoffflussanalyse der Sterolintermediate während der einzelnen Wachstumsphasen

In Abbildung 5.10 sind die aus der Stoffflussanalyse errechneten Sterolmengen dargestellt, die jeweils in der exponentiellen Wachstumsphase, der Übergangsphase sowie der stationären Phase synthetisiert wurden (*Integral flux analysis*). Dabei dem Endprodukt des Synthesewegs Ergosterol die Summe der Sterolintermediate gegenübergestellt. Negative Bildungsraten (d.h. eine Rückreaktion) trat nur bei den Sterolestern auf. Sie sind durch die Hydrolyse dieser Verbindungen zu erklären. Wie in Abbildung 5.10A zu sehen ist, wurden in der exponentiellen Wachstumsphase und in der Übergangsphase verstärkt die freien Ergosterolvorstufen gebildet. Nachdem anfänglich die Hydrolyse von Estern der Sterolintermediate in der exponentiellen

Wachstumsphase überwog, wurde in der Übergangsphase die Veresterung der Sterolzwischenstufen festgestellt (Abbildung 5.10B). Während der stationären Phase wurden die veresterten Intermediate hingegen wieder abgebaut. Eine Veresterung von Ergosterol konnte in allen Phasen gemessen werden. Die gebildete Menge an Ergosterolester war stets höher als die Menge aller anderen gebildeten Sterolester. Mit zunehmender Kultivierungsdauer der Batch-Fermentation nahm dann die Bildung des veresterten Endproduktes zu.

5.2 Anaerob-aerobe Kultivierung

In Kapitel 5.1 wurde beschrieben, wie die Sterolanalytik etabliert, die auftretenden Sterolkonzentrationen erfasst und die Berechnung der Stoffflüsse durchgeführt wurde. In einem nächsten Schritt war es notwendig, eine Standardfermentation festzulegen, bei der sehr hohe Sterolbildungsraten durch eine Induktion (Impuls) erzeugt wurden. Da die Ergosterolsynthese in der Hefe *S.cerevisiae* nur in Anwesenheit von Sauerstoff möglich ist, wurde eine Fahrweise festgelegt, bei dem ein Umschalten (*Switch*) von anaeroben auf aerobe Kultivierungsbedingungen erfolgte (Vgl. Kapitel 4.2.4). Hierfür wurde zunächst eine anaerobe Kultivierung durchgeführt. Nach einer Fermentationszeit von 22h (stationäre Phase) wurde auf aerobe Kultivierungsbedingungen umgestellt. Für die Durchführung war es wichtig, ohne Verzögerung Bedingungen zu schaffen, in denen Sauerstoff im Überschuss vorlag. Durch den Fermentationsaufbau genügte das Umstellen eines Ventils, um den Reaktorinhalt ohne Zeitverzug mit einer Rate von 10vvm Luft zu begasen. Nach wenigen Sekunden erreichte die Gelöstsauerstoffkonzentration Werte nahe der Sättigungskonzentration.

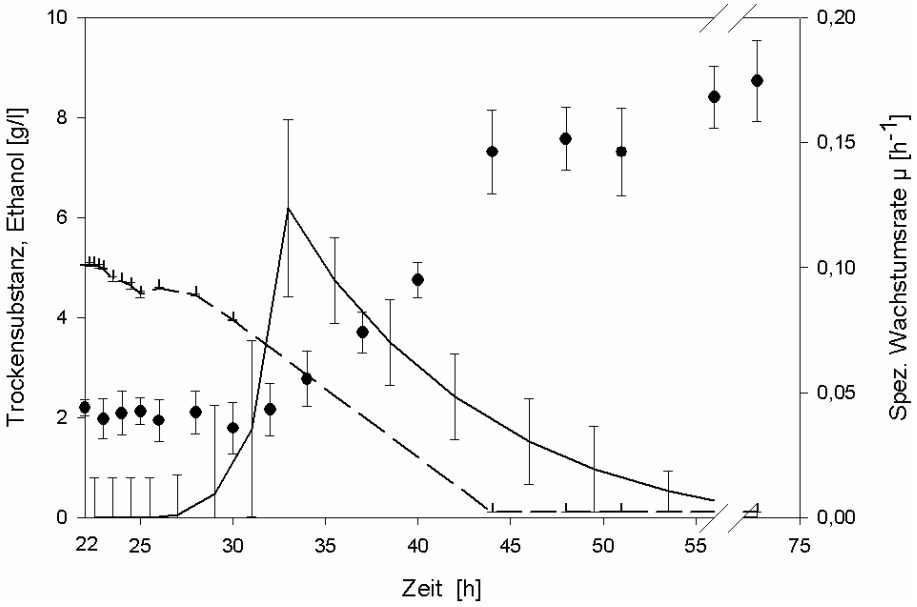


Abb. 5.11: Wachstum der Hefe *S.cerevsisae* nach dem Switch bei anaerob-aerober Kultivierung. Symbole: ● TS und ─ spezifischer Wachstumsrate und ┅ Ethanolkonzentration.

In der Abbildung 5.11 ist die Konzentration der Trockensubstanz (TS) für den Fermentationsverlauf ab dem Switch dargestellt. Für die nachfolgenden Betrachtungen ist es bedeutsam festzuhalten, dass ein Zellwachstum erst ca. 6h nach dem Switch zu aeroben Bedingungen stattfand. In diesen ersten Stunden nach dem Switch waren die höchsten Bildungsraten der Sterole festzustellen. Nachdem die Zellen ihr Wachstum wieder aufgenommen hatten, wurde im Reaktor eine Trockensubstanzkonzentration von über 8 g/l erreicht.

Unter anaeroben Bedingungen wurde durch die Hefe die Glucose im Bioreaktor vollständig verbraucht und Ethanol gebildet. Das Ethanol erreichte während der anaeroben Kultivierung Konzentrationen von 5g/l im Bioreaktor (Abbildung 5.11). Direkt nach dem Switch erfolgte die aerobe Verstoffwechselung des gebildeten Alkohols. Die in Abbildung 5.11 dargestellte Wachstumsphase endete bei 44h, da zu diesem Zeitpunkt die Kohlenstoffquelle Ethanol im Bioreaktor durch die Hefe verbraucht worden war.

In Abbildung 5.12 ist der Fermentationsabschnitt nach dem Switch bis zum Ende der Kultivierung dargestellt. Im Bild ist erkennbar, dass eine hohe Stoffumwandlung innerhalb des Post-Squalensynthesewegs innerhalb der ersten Stunden stattfand. Das unter Sauerstoffausschluss akkumulierende Squalen wurde nun abgebaut. Gleichzeitig fand die Bildung des Ergosterols statt.

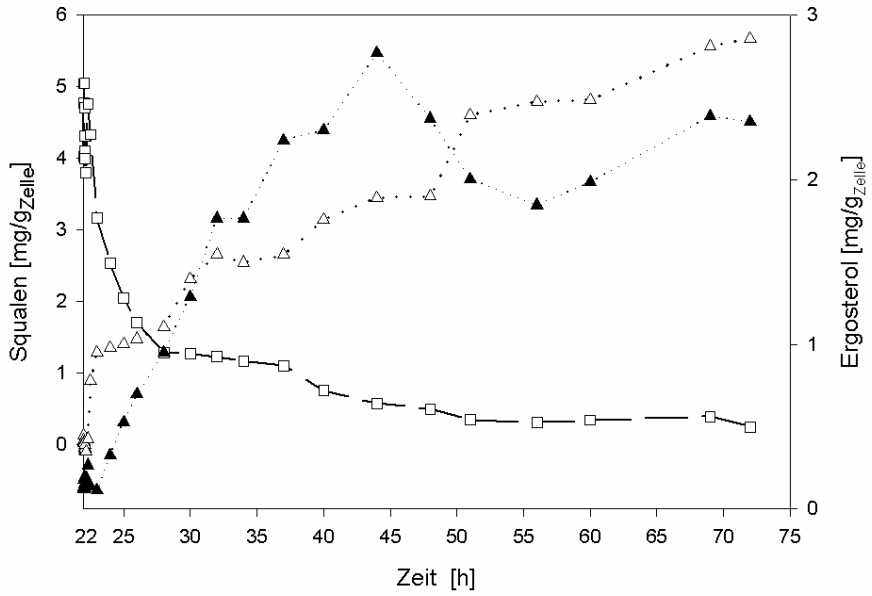


Abb. 5.12: Intrazellulärer Konzentrationsverlauf von Squalen —□—, freiem Ergosterols ···△··· und verestertem Ergosterols ···▲··· bei anaerob-aerober Fermentation nach dem Switch.

Um die Konzentrationsverläufe der einzelnen Sterolintermediate über den Kultivierungszeitraum zu verfolgen, sind in der folgenden Abbildung 5.13 die freien Sterolkonzentrationen vom Switch bis zum Ende der Kultivierung nach insgesamt 72h aufgetragen. Die Änderungen der Sterolkonzentrationen in den Hefezellen waren für einige Intermediate mit der in Abbildung 5.11 dargestellten Wachstumskurve bzw. der spezifischen Wachstumsrate korrelierbar.

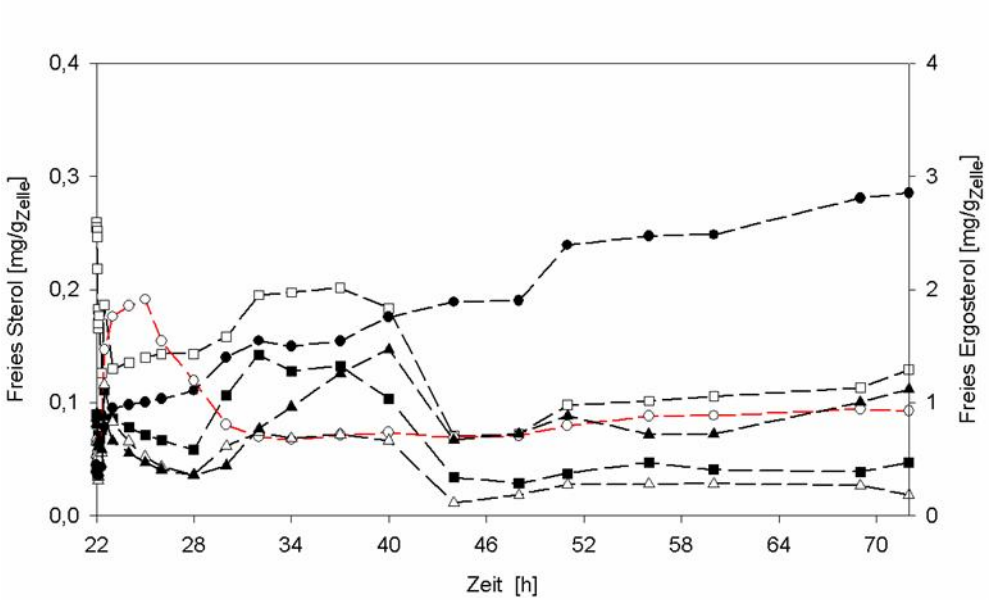


Abb. 5.13 Intrazellulärer Konzentrationsverlauf von freiem Lanosterol —□—, 4,4-Dimethylzymosterol —■—, Zymosterol —○—, Fecosterol —△—, Episterol ···▲··· und Ergosterol —●— nach dem Switch bei anaerob-aerober Fermentation. Die prozentuale Standardabweichung vom jeweiligen Mittelwert einer anaerob-aeroben Fermentation lag beim Squalen bei 15,4% und bei den Sterolen bei 9,4%.

So stiegen die intrazellulären Konzentrationen des Lano-, 4,4-Dimethylzymo-, Feco- und Episterol mit Beginn der Zellteilung (Vgl. Abbildung 5.11). Die Konzentrationen ereichten dabei zwischen 10h und 15h aerober Kultivierung (32h und 37h Fermentationszeit) maximale Werte. Erst nachdem die spezifische Wachstumsrate der Hefekultur sich wieder dem Wert Null näherte, sanken die Konzentrationen dieser vier Sterole auf ein Niveau, das vor dem Wachstum gemessen wurde. Die freie Zymosterolkonzentration erniedrigte sich nach 3h aerober Kultivierung und veränderte sich ab der Wachstumsphase kaum. Der Gehalt des freien Ergosterol stieg über den gesamten Fermentationsverlauf an (Abbildung 5.13).

In der Darstellung der korrespondierenden Esterkonzentrationen über den gesamten Fermentationsverlauf konnte kein signifikanter Anstieg der Konzentrationen für Lano-, 4,4-Dimethylzymo-, Feco- und Episterolester in der Wachstumsphase zwischen 28-46h festgestellt werden (Abbildung 5.14). Nur die Ergosterolesterkonzentration stieg bis zum Ende der Wachstumsphase. Für die letzten 20h der Kultivierung, in der nur noch ein sehr geringes Wachstum der Hefekultur auftrat, veränderten sich die Esterkonzentrationen aller Sterole kaum.

Eine Abnahme der Esterkonzentrationen kann sowohl durch Hydrolyse, aber auch durch eine „Verdünnung“ des Sterolpools durch die Zellteilung ohne Sterolneusynthese hervorgerufen worden sein. Zwischen diesen beiden Fällen kann nicht unterschieden werden.

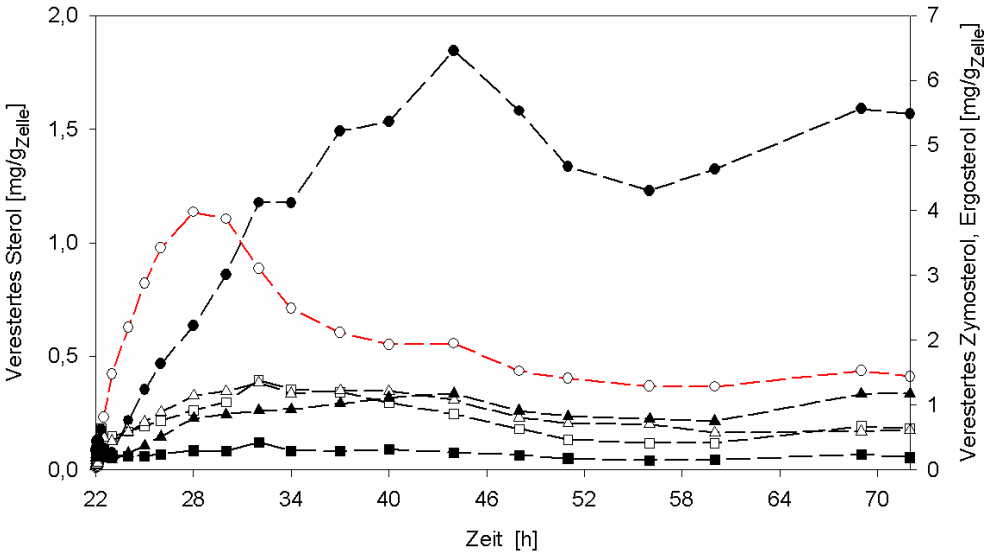


Abb. 5.14: Intrazelluläre Konzentrationsverlauf von verestertem Lanosterol —□— , 4,4-Dimethylzymosterol —■—, Zymosterol —○— , Fecosterol —△—, Episterol ···▲··· und Ergosterol —●— nach dem Switch bei anaerob-aerober Fermentation. Die prozentuale Standardabweichung vom jeweiligen Mittelwert einer anaerob-aeroben Fermentation lag bei den Sterolen bei 9,1%.

Da in den ersten Stunden nach dem Switch zu aeroben Bedingungen eine starke Sterolsynthese, jedoch noch kein Wachstum stattfand, soll der Zeitraum bis zur einsetzenden Zellvermehrung (ca. 6h nach Umstellung) Bestandteil der fortführenden Betrachtungen sein. In dieser Zeitspanne tritt die aus dem Wachstum resultierende Verdünnung der Metabolite nicht auf.

Um die hohe Syntheseleistung der Zellen im Bioreaktor nach dem Switch zu untersuchen, wurde ein Probenahmeverfahren entwickelt, das unter Kapitel 4.2.6 beschrieben ist. Diese Rapid-Sampling-Methode ermöglichte es, die sich schnell ändernden Intermediatkonzentrationen mit der notwendigen zeitlichen Auflösung zu detektieren. Um auch geringe Konzentrationen von Intermediaten nachweisen zu können, waren bei anaerob wachsenden Kulturen aufgrund der geringen Zelldichte bis zu 200ml Probe für eine Doppelbestimmung nötig. Das Verfahren musste dabei eine schnelle Abkühlung auch großer Probemengen innerhalb weniger Sekunden gewährleisten, um den Zellstoffwechsel zu stoppen. Hierfür wurden Kühlbehälter konstruiert, die aus verschließbaren Isolierbehältern mit einem Kupfereinsatz bestanden. Dieser Einsatz war im Isolierbehälter von Kühlflüssigkeit (ca. -50°C) umgeben und mit etwa 100ml Probevolumen befüllbar. Die Probennahme konnte auf diesem Wege im Minutentakt nach dem Switch realisiert werden.

Die Sterolkonzentrationen sind für die Standardfermentation mit Switch von anaeroben zu aeroben Kultivierungsbedingungen in der Abbildung 5.15 dargestellt.

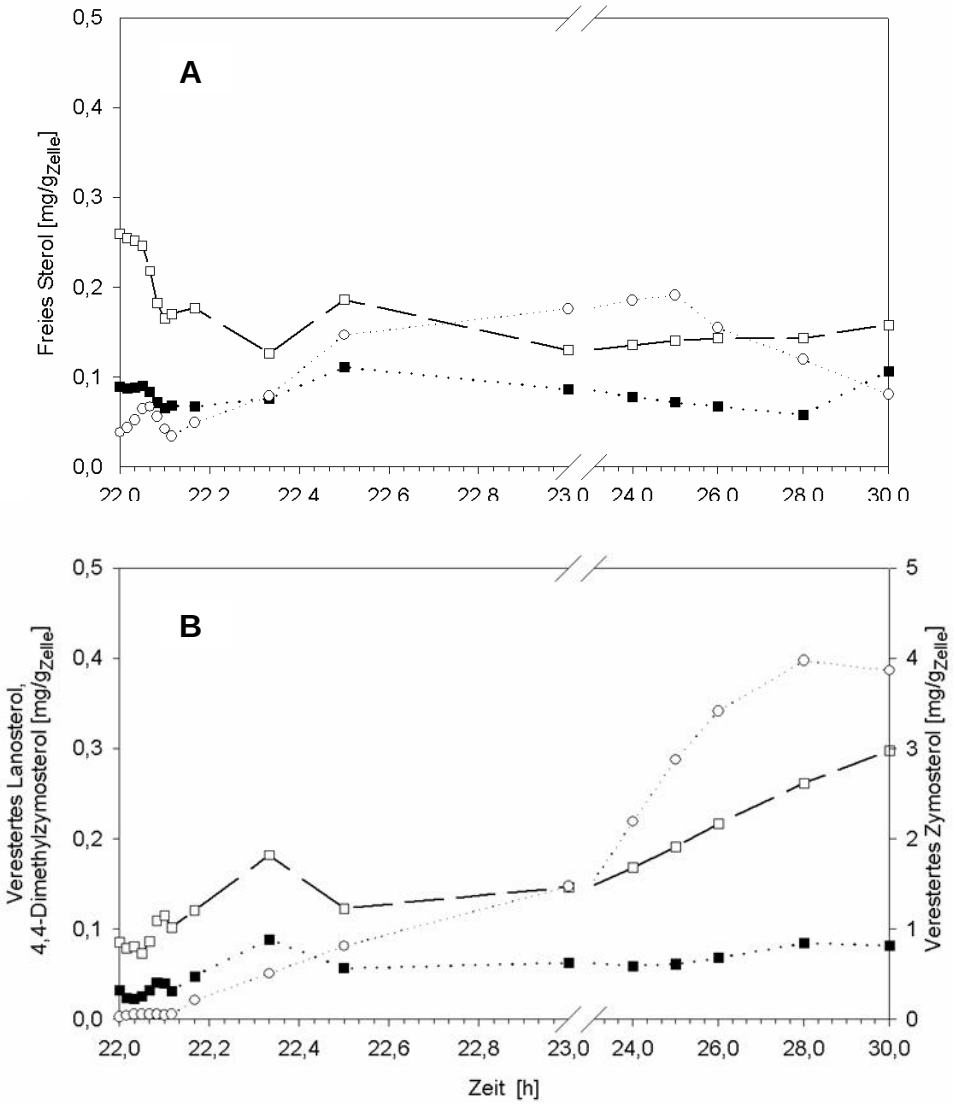


Abb. 5.15: Intrazellulärer Konzentrationsverlauf von freiem (A) und verestertem (B) Lanosterol —□—, 4,4-Dimethylzymosterol · ·■· · und Zymosterol ···○··· innerhalb der ersten 8h nach dem Switch bei anaerob-aerober Fermentation.

Während in den ersten 10min nach der Umstellung die freie Lanosterolkonzentration zunächst sank, stabilisierte sich die Konzentration im Folgenden (Abbildung 5.15A). Die 4,4-Dimethylzymosterolkonzentration blieb innerhalb der ersten 10min nahezu konstant, während die Zymosterolkonzentration bereits in den ersten 10min einer hohen Dynamik unterlag. Im Folgenden war dann ein starker Anstieg zu verzeichnen. Die Konzentration überstieg zunächst die Endkonzentration in aeroben Batch-Fermentationen um 50%. Nach 6h wurden schließlich identische Konzentrationen zur aeroben Batch-Fermentation gemessen (Vgl. Abbildung 5.8A).

Die Abbildung 5.15B zeigt, dass in Folge der Sauerstoffzufuhr zunächst die Konzentrationen des Lanosterolesters und 4,4-Dimethylzymosterolesters abnahmen. Anschließend war bei allen abgebildeten Sterolestern eine Zunahme zu messen. Dabei waren für das Lano- und 4,4-Dimethylzymosterol nahezu synchrone Konzentrationsverläufe sowohl in der kurz- als auch langfristige Betrachtung festzustellen.
Besonders auffällig ist in Abbildung 5.15B die Konzentrationszunahme des Zymosterolesters. Während unmittelbar nach der Zufuhr von Sauerstoff kaum eine Veränderung der Konzentration ersichtlich war, stieg diese ca. 7min nach dem Umschalten auf aerobe Bedingungen stark an. In der ersten Stunde vervielfachte sich die Konzentration des Zymosterolesters um ungefähr das 30fache. Im folgenden Fermentationsverlauf (ab 28h) sank dann die Konzentration des Esters in der Zelle. Da Zymosterol zunächst aus den Vorstufen Squalen, Lanosterol und 4,4-Dimethylzymosterol gebildet werden muss, war eine hohe Syntheserate innerhalb des Post-Squalensynthesewegs nach dem Switch bereits qualitativ ersichtlich. Durch die späteren Stoffflussberechnungen konnten die hohen Bildungsraten der Sterole genau quantifiziert und zur Herleitung erster kinetischer Ansätze genutzt werden.

In Abbildung 5.16 sind die im weiteren Verlauf der Sterolbiosynthese in Hefe gebildeten Sterole Fecosterol, Episterol und Ergosterol gezeigt. Als Gemeinsamkeit im Vergleich zu den in Abbildung 5.16 dargestellten frühen Sterolintermediaten lässt sich die geringe Anfangskonzentration aller freien Sterole feststellen. Die bereits beobachteten Konzentrationsschwankungen in den ersten 10min nach dem Switch konnten auch für das freie Feco- und Episterol gezeigt werden. Auch der kontinuierliche Konzentrationsanstieg zwischen der 7ten und 30ten Minute nach dem Switch ist für diese Intermediate zu sehen.
Für das Endprodukt der Sterolbiosynthese Ergosterol setzte eine schnelle Zunahme der intrazellulären Konzentration ebenfalls nach 7min aerober Kultivierung ein (Abbildung 5.16A). Der Anstieg der freien Ergosterolkonzentration verstärkte sich erneut mit Beginn des Wachstums der Hefekultur im Bioreaktor (nach 6h aerober Kultivierung).

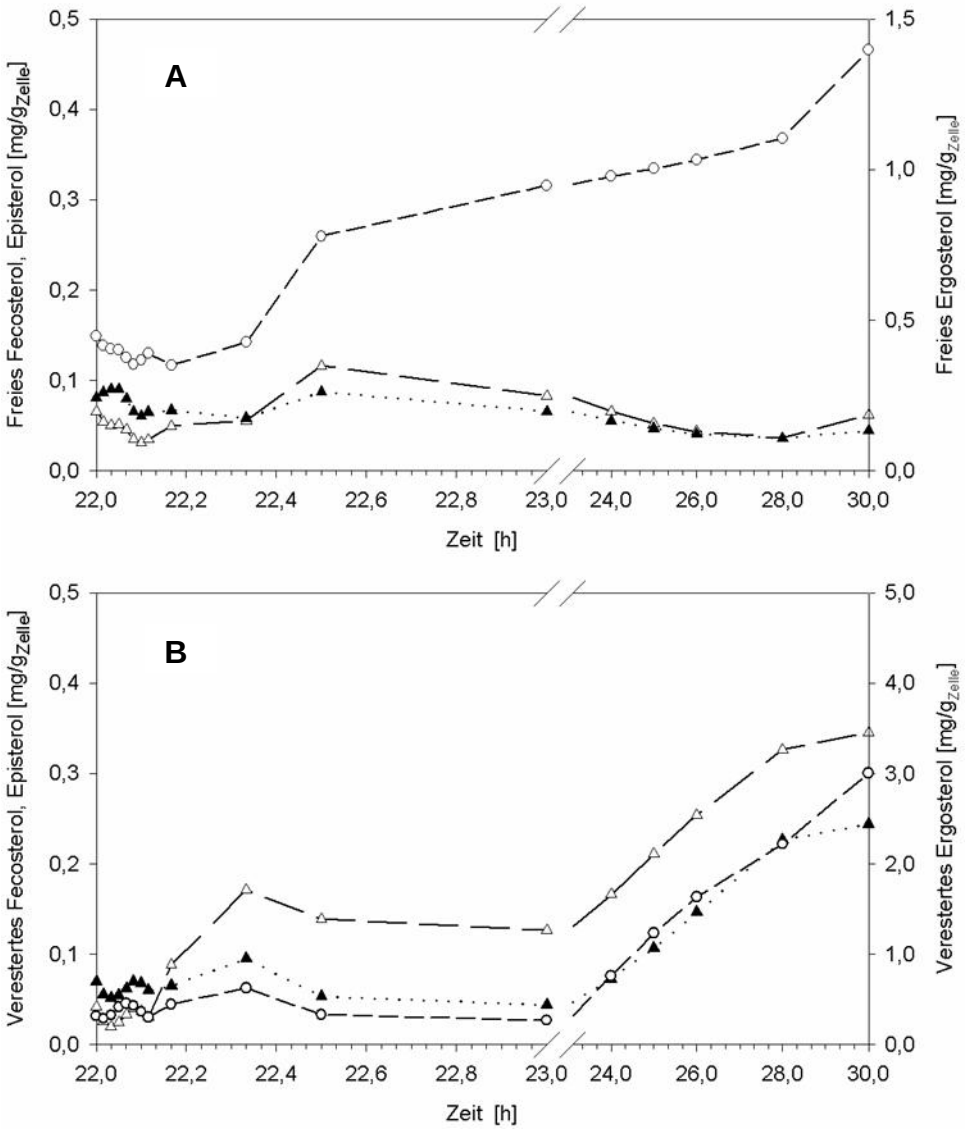


Abb. 5.16: Intrazellulärer Konzentrationsverlauf von freiem (A) und verestertem (B) Fecosterol —△— , Episterol ···▲··· und Ergosterol —○— innerhalb der ersten 8h nach dem Switch bei anaerob-aerober Fermentation.

Die Diagramme 5.15 und 5.16 zeigen, dass die starke Sterolsynthese nach dem Switch zu Konzentrationsmustern führt, die sich für viele Sterolintermediate ähneln. Aufgrund dieser Ähnlichkeit kann eine gemeinsame Regulation für Syntheseabschnitte im Post-Squalen-Syntheseweg vermutet werden. Es ist aber schwierig durch die Vielzahl der Intermediate und nur durch vergleichende Betrachtungen, Hinweise auf Regulationspunkte im Syntheseweg zu finden. Im folgenden Abschnitt soll nun mit Hilfe der Stoffflussberechnungen versucht werden, einen genaueren Einblick in die Dynamik der Synthese zu erhalten.

Aus der Berechnung der Stoffflüsse können die einzelnen Sterolbildungsraten ermittelt werden. Die Kenntnis der Bildungsraten ermöglicht dann, Veränderungen und Unterschiede in der Syntheseleistung zu quantifizieren und zu vergleichen. Darüber hinaus lassen sich anhand der Sterolbildungsraten (=Reaktionsraten) kinetische Ansätze erstellen und überprüfen.

Da die einzelnen Intermediate unterschiedliche Molekulargewichte aufwiesen, wurden für die Stoffflussberechnung die Sterolmassen pro Zelltrockengewicht in molare Konzentrationen umgerechnet. Zur Bezeichnung der Stoffflüsse wird auch die im Programm COMPFlux© eingeführte Nomenklatur verwendet. Die Kurzformen lauten dann: Stofffluss zum Squalen = rSQU, zum Lanosterol(ester) = rLNL (rLNLEST), zum 4,4-Dimethylzymosterol(ester) = rDZYML (rZYMLEST), zum Zymosterol(ester) = rZYM (rZYMEST), zum Fecosterol(ester) = rFEC (rFECEST), zum Episterol(ester) = rEPI (rEPIEST) und zum Ergosterol(ester) = rERGL (rERGLEST).

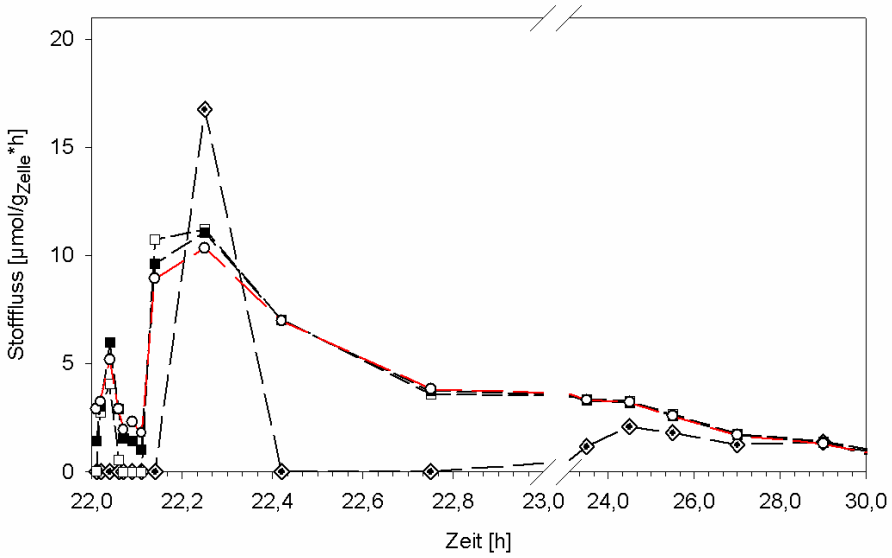


Abb. 5.17: Stoffflüsse zum Squalen (rSQU) —◇— , freien Lanosterol (rLNL) —□— , 4,4-Dimethylzymosterol (rDZYML) —■— und Zymosterol (rZYM) —○— innerhalb der ersten 8h nach dem Switch bei anaerob-aerober Fermentation.

Der sog. Quellfluss (*Sourceflux*) wird in der Abbildung 5.17 als der Fluss zum Squalen (rSQU) dargestellt. Dieser Fluss steht für die Stoffmenge, die in den Sterolbiosyntheseweg einfließt. D.h., da der Squalenstofffluss positive Werte annimmt, fand nicht nur ein Abbau des unter anaeroben Bedingungen gebildeten Squalens statt. Vielmehr ist dem Diagramm zu entnehmen, dass zu Zeiten einer starken Sterolsynthese (zwischen 10-20min nach dem Switch) auch eine Bildung des Squalens stattgefunden haben muss. Nach 2h aerober Kultivierung stellte sich eine kontinuierliche Synthese des Squalens 2h ein (Abbildung 5.17).

Abbildung 5.17 zeigt, dass sich die Verläufe der berechneten Stoffflüsse zum freien Lanosterol, 4,4-Dimethylzymosterol und Zymosterol stark ähneln. Der Graph des Zymosterolstoffflusses ist dabei rot hervorgehoben. Die nahezu identischen Verläufe verdeutlichen, dass ausgehend vom Sterolprecursor Squalen sich der Stoffluss zwischen den Intermediaten Lanosterol, 4,4-Dimethylzymosterol und Zymosterol nicht veränderte. Das aus dem Squalen gebildete Lanosterol wurde unmittelbar und ohne in größeren Mengen als freies oder verestertes Lanosterol zu akkumulieren, in das 4,4-Dimethylzymosterol umgewandelt. Analog gilt dies für die Metabolisierung von 4,4-Dimethylzymosterol zu Zymosterol. Hätte sich ein Intermediat während der Synthese in der Zelle angereichert, wäre der Stoffluss zum nachfolgenden Intermediat erniedrigt gewesen. Im Falle des Abbaus eines Intermediats hätte aufgrund der Geradlinigkeit des Ergosterolbiosynthesewegs (Vgl. Kapitel 2.1.3) der Stoffluss zu einem nachfolgend gebildeten Sterol erhöht sein müssen.

Eine weitere Auffälligkeit in der Abbildung 5.17 ist die zeitliche Abfolge der auftretenden Stoffflüsse. Eine anhaltend erhöhte Synthese der untersuchten Sterole stellte sich erst zwischen der 7ten und 10ten Minute ein. So trat unmittelbar nach dem Switch eine Bildung der untersuchten Sterole auf, die ihren Höhepunkt 3min nach der Umstellung hatte. Im weiteren Verlauf verringerten sich dann die Stoffflüsse. Die Ursache dieser kurzzeitigen Stagnation der Sterolbiosynthese könnte in der Verfügbarkeit beteiligter Enzyme begründet sein.

Die Stoffflüsse zu den am Ende des Syntheseweges gebildeten Metaboliten Feco-, Epi- und Ergosterol sind in Abbildung 5.18 dargestellt. Zum besseren Vergleich der Flüsse in Abbildung 5.17 ist der bereits beschriebene Stoffluss zum Zymosterol ebenfalls eingezeichnet (rot).

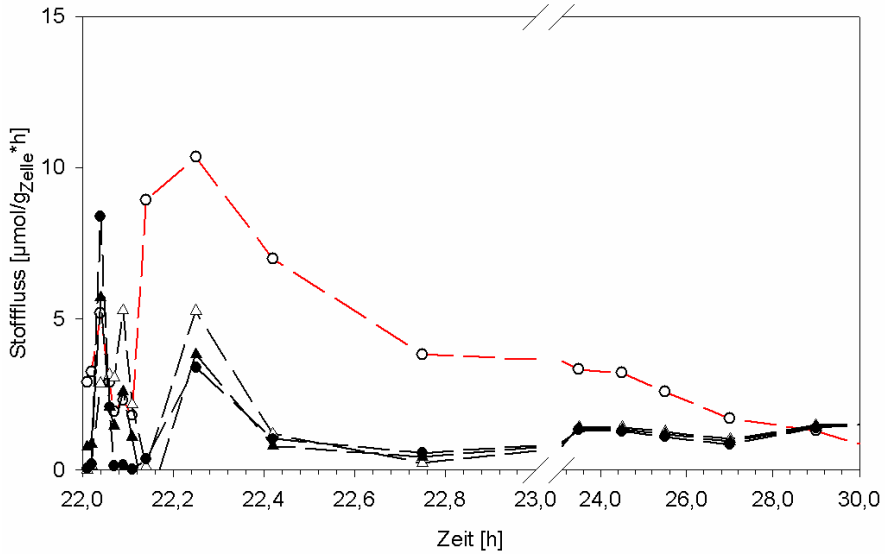


Abb. 5.18: Stoffflüsse zum freien Zymosterol (rZYM) —○—, Fecosterol (rFEC) —△—, Episterol (rEPI) ···▲··· und Ergosterol —●— innerhalb der ersten 8h nach dem Switch bei anaerob-aerober Fermentation.

In Diagramm 5.18 fällt auf, dass die Biosynthese der späten Intermediate in einer abweichenden zeitlichen Abfolge und mit unterschiedlicher Intensität im Vergleich zum Zymosterol erfolgte. Während der Stoffffluss zum Zymosterol von 214µmol/l*h sprunghaft auf über 1000 µmol/l*h 7min nach dem Switch anstieg, waren die Stoffflüsse zu den nachfolgenden Sterolen zu diesem Zeitpunkt erniedrigt (Abbildung 5.18). Die Bildung der Sterole Feco- und Episterol wurde sogar mit Beginn der starken Zymosterolbildung komplett eingestellt. Lediglich ein sehr geringer Fluss zum freien Ergosterol, der aber durch Hydrolyse von verestertem Episterol hervorgerufen sein könnte (Vgl. Abbildung 5.20), war für den Zeitraum zwischen 7-10min nach dem Switch zu beobachten. Erst 15min nach der Umstellung, als die Zymosterolbildung ihren Höhepunkt erreicht hatte, wurde die Synthese des Ergosterols über seine Zwischenstufen Feco- und Episterol fortgesetzt (Abbildung 5.18). Nach einer Stunde aerober Kultivierung verringerten sich die Stoffflüsse der Zymosterol deutlich (Abbildung 5.18). Gleichzeitig aber stiegen die Stoffflüsse des Feco-, Epi- und Ergosterols wieder an. Ein gegensätzliches Verhalten hinsichtlich der Bildung von Sterolintermediaten die vor bzw. hinter Zymosterol im Syntheseweg stehen, lässt sich also anhand der Diagramme 5.17 und 5.18 ableiten.

In der nachfolgenden Abbildung 5.19 sind nun die Stoffflüsse der korrespondierenden Sterolester dargestellt. Sterolester können aufgrund ihrer Molekülstruktur den Enzymen der Ergosterolbiosynthese nicht als Substrat dienen (Vgl. Kapitel 2.1.3).

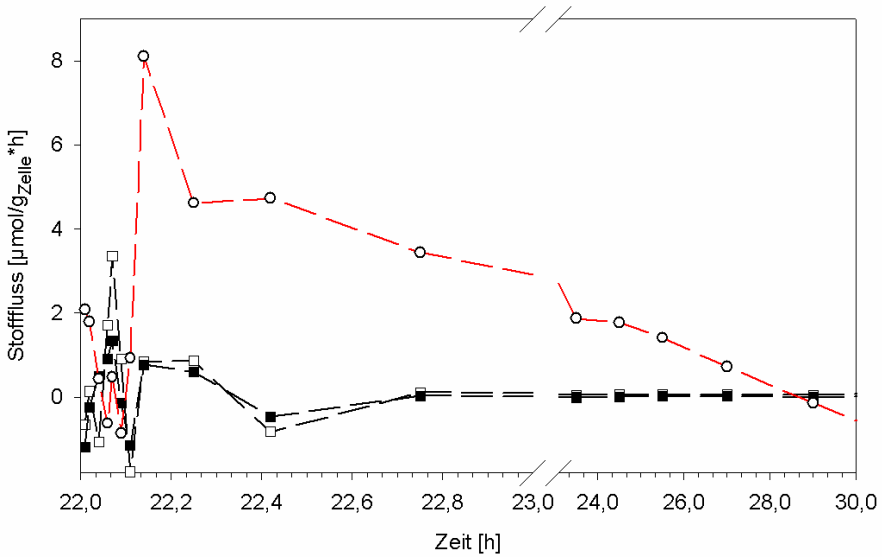


Abb. 5.19: Stoffflüsse zum Lanosterol- (rLNLEST) —□—, 4,4-Dimethylzymosterol- (rZYMLEST) —■— und Zymosterolester (rZYMEST) —○— innerhalb der ersten 8h nach dem Switch bei anaerob-aerober Fermentation.

.

Im Diagramm 5.19 sind die Stoffflüsse zu den Estern des Lanosterols, 4,4-Dimethylzymosterols und Zymosterols dargestellt. Auch hier trat in den ersten Minuten nach dem Switch eine Dynamik auf, wie sie auch schon bei den freien Sterolen zu beobachten war. Aufgrund der auftretenden Veresterung und Hydrolyse nahmen die Werte in der Abbildung 5.19 positive bzw. negative Vorzeichen an. Diese Dynamik nahm nach 7min ab.

Die Zymosterolesterbildung unterschied sich dabei von der Veresterung der anderen Sterolintermediate. So überstieg die Synthese des Zymosterolesters die Bildung aller anderen gemessenen Sterolester zwischen der 7ten Minute und 1h deutlich. Nach der Verringerung der Dynamik nach 7min waren zunächst erhöhte Stoffflüsse zu Lanosterol-, 4,4-Dimethylzymosterol- und Zymosterolester errechnet worden. Ein wesentlicher Unterschied bestand aber hinsichtlich der Esterhydrolyse. Während nach 6h aerober Kultivierung überwiegend sehr kleine positive Stoffflüsse zum Lanosterol und 4,4-Dimethylzymosterolester berechnet wurden, ergab die Stoffflussanalyse, dass die Hydrolyse des Zymosterolesters ab diesem Zeitpunkt überwog. D.h. es wurden negative Stoffflüsse berechnet (nicht abgebildet) Der Abbau des Zymosterolesters fiel dabei zeitlich mit den Beginn des erneuten Wachstums der Hefekultur zusammen (Vgl. Abbildung 5.11).

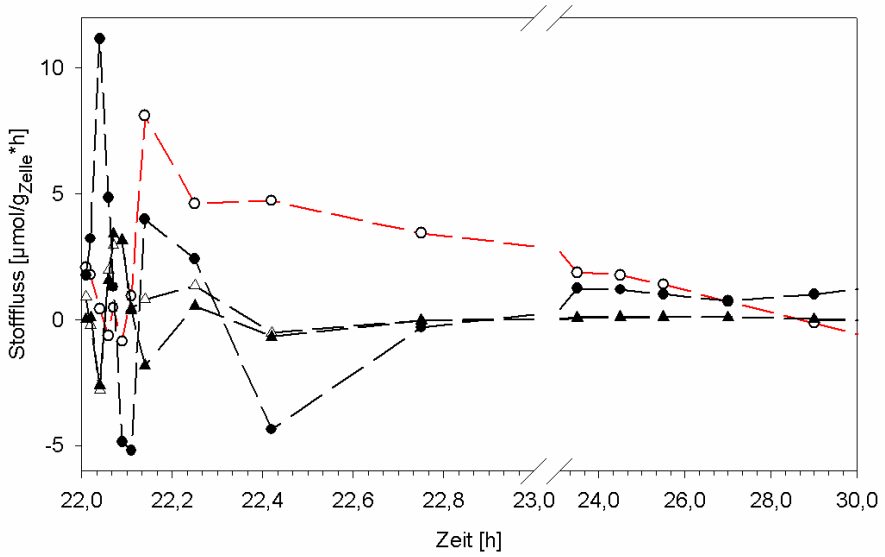


Abb. 5.20: Stoffflüsse zum Zymosterol- (rZYMEST) —○—, Fecosterol- (rFECEST) —△—, Episterol- (rEPIEST) ···▲··· und Ergosterolester (rERGLEST) —●— innerhalb der ersten 8h nach dem Switch bei anaerob-aerober Fermentation.

In der Abbildung 5.20 sind die Esterstoffflüsse der Sterole vom Zymosterol bis Ergosterol dargestellt. Zunächst waren starke Schwankungen der Flüsse besonders für den Ester des Ergosterols in den ersten Minuten nach dem Switch feststellbar. Diese Fluktuationen könnten darin begründet sein, dass die Sterole für die spezifischen Anforderungen der Zelle nach

Veränderung der Umgebungsbedingung mobilisiert und dann verstoffwechselt wurden. So werden Sterole beispielsweise für den Aufbau von Mitochondrienmembranen benötig. D.h. die Sterole wurden zunächst als Ester, in Lipidroplets vorliegend, in der Zelle transportiert. Für eine Umwandlung der Intermediate bzw. Einlagerung in Membranen, wurden die Ester anschließend wiederum hydrolysiert. Bei der Bewertung der anfänglichen Schwankungen in Abbildung 5.20 ist aber auch zu beachten, dass bei der Stoffflussberechnung ein im Vergleich zu anderen Intermediaten relativ großer Fehler beim Ergosterolester auftritt (Vgl. Kapitel 4.6.3)
Wie bereits erwähnt, fand innerhalb der ersten Stunde nach der Umstellung größtenteils eine Veresterung des Zymosterols statt. Während die Bildung dieses Esters auf einem hohen Niveau von über 400 µmol/l*h in dieser ersten Stunde verblieb, schien hingegen die Feco-, Epi- und Ergosterolestersynthese reprimiert zu sein. Beim Ergosterolester wurde sogar mehrmals eine Hydrolyse im Zeitraum um 7min und 25min nach dem Switch berechnet (Abbildung 5.20).

In Abbildung 5.20 ist weiterhin zu erkennen, dass über die Länge des Betrachtungszeitraums nahezu kein Feco- und Episterolester gebildet oder abgebaut wurde. Die Veresterungsraten waren mit durchschnittlich 10-12µmol/l*h zwar doppelt so hoch wie die des Lano- oder 4,4-Dimethylzymosterols, aber im Vergleich zu den Syntheseraten des Zymo- und Ergosterolesters vernachlässigbar.
Darüber hinaus ist in Abbildung 5.20 ein gegenläufiges Verhalten der Zymosterol- und Ergosterolestersynthese zu erkennen. Während sich nach einstündiger aerober Kultivierung die Zymosterolesterbildung verlangsamte, verstärkte sich im Folgenden die des Ergosterolesters. Nachdem die Sterolbiosynthese in der Hefe unmittelbar nach dem Start der Begasung mit Luftsauerstoff anstieg, setzte die stetige Veresterung des Endprodukts Ergosterol erst 2h später ein. Zwischen 24 und 28h der Fermentationen (2 bis 6h nach dem Switch) lagen die Bildungsraten des Ergosterol- und Zymosterolesters dann auf einem vergleichbaren Niveau bei über 100µmol/l*h. 8h nach dem Switch stieg jedoch die Esterbildung des Ergosterols an, die des Zymosterolesters erniedrigte sich weiter (Nicht abgebildet).

Zusammenfassend lassen sich aus der Kultivierung mit Switch ohne Zusätze und anschließender Durchführung einer Stoffflussanalyse erste Anhaltspunkte für bestimmte Regulationspunkte finden. So kann aufgrund der präsentierten Daten bereits eine besondere Bedeutung des Zymosterols vermutet werden, da besonders die Bildung seines Esters sich von denen anderer Intermediate unterscheidet. Der Stofffluss zum Zymosterolester bestimmt dabei maßgeblich über die Intensität der Stoffflüsse zu den im Syntheseweg nachfolgenden

Metaboliten Feco-, Epi- und Ergosterol. Des Weiteren kann festgehalten werden, dass sich Bildungsraten unterschiedlicher Sterolintermediate unter den gewählten Bedingungen ähnlich verhalten (z.B. Lanosterol und 4,4.-Dimethyzymosterol). Auch scheint die Veresterung bzw. Hydrolyse der Sterole in der Hefe für den regulierten Ablauf der Ergosterolbiosynthese wichtig zu sein. Auswirkungen von Veränderungen im Transkriptom, Proteom und Metabolom auf Grund des Wechsels zu aeroben Bedingungen scheinen sich nach 7min auszuwirken. Ab diesem Zeitpunkt verändert sich die Dynamik und die Stoffflüsse zeigen teilweise deutlich veränderte Verläufe.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Fettsäurebildung während der Sterolbiosynthese untersucht. Diese Experimente wurde durchgeführt, da sich bereits aus den intrazellulären Sterolkonzentrationen und -stoffflüssen der anaerob-aeroben Kultivierung ergab, dass die Veresterung der Sterole eine wichtige (evtl. regulatorische) Rolle innerhalb der Sterolbiosynthese spielt. Für die Veresterung eines Sterols werden hauptsächlich ungesättigte C16:1 und C18:1 Fettsäuren von der Hefezelle verwendet (Vgl. Kapitel 2.1.3). Diese ungesättigten Fettsäuren können nicht unter anaeroben Bedingungen gebildet werden. Daher wurde versucht die Fettsäuren in der Zelle zu quantifizieren, um herauszufinden, ob die Fettsäurenverfügbarkeit in der Zelle limitierend für die Sterolesterbildung sein kann.

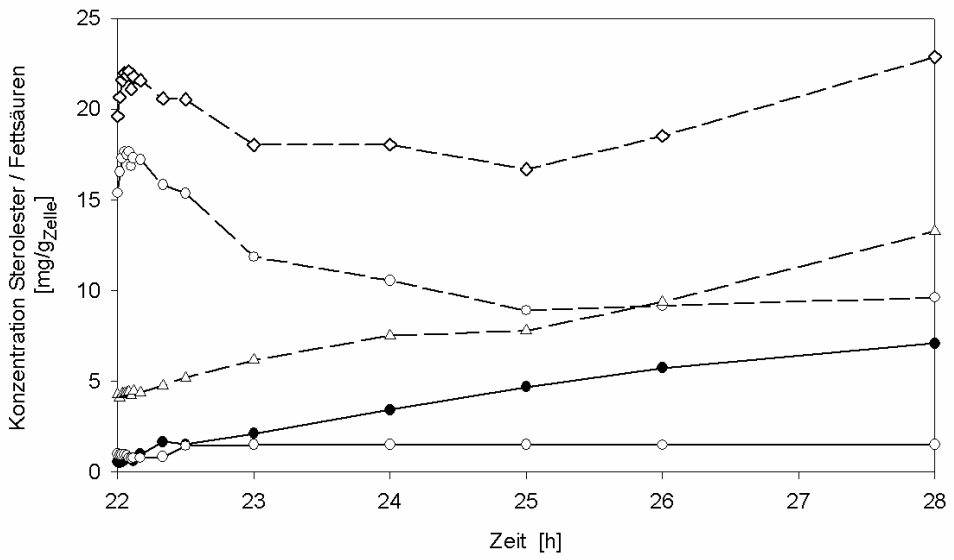


Abb. 5.21: Summe der Konzentrationen aller veresterten Sterole —●— und freien Sterole —○— sowie der ungesättigten Fettsäuren C16:1 und C18:1 —△—, der gesättigten Fettsäuren C16:0 und C18:0 —○— sowie aller C16 und C18-Fettsäuren (gesättigt und ungesättigt) —◇— bei anaerob-aerober Kultivierung nach dem Switch.

Die Aufreinigung und Methylesterbildung der intrazellulären Fettsäuren aus den Hefezellen wurde dafür zunächst erprobt und optimiert. Mit dem in Kapitel 4.5.7 beschriebenen Aufarbeitung- und Methylierungsprotokoll wurde die höchste Messgenauigkeit ereicht. Für

die gaschromatische Analyse der Fettsäurenmethylester (FAME) konnten sowohl die Kapillarsäule als auch das Temperaturprogramm für die Sterolanalyse verwendet werden.

Es werden zur Sterolveresterung bevorzugt die Palmitolein- und Ölsäure (C16:1 und C18:1) umgesetzt. Auch die korrespondierenden gesättigten Fettsäuren (C16:0 und C18:0) können als Substrat für die Steroelsterbildung dienen [Müllner und Daum, 2004]. Daher wurden in der Abbildung 5.21 die jeweiligen Summen dieser Fettsäurekonzentrationen im Vergleich zur Summe der Sterolesterkonzentrationen aufgetragen. Aufgrund der Verhältnisse der molaren Massen der Sterole und Fettsäuren kann abgeschätzt werden, dass für die Bildung der Sterolester etwa 1/3 ihrer Masse an Fettsäuren benötigt wird. In der Abbildung 5.21 ist zu erkennen, dass Fettsäuren in Konzentrationen in den Zellen vorlagen, welche die der Sterole stets um ein Vielfaches überstiegen. Auch wenn die Fettsäuren eine Vielzahl biologischer Funktionen in den Zellen zu erfüllen haben, ist aufgrund dieser Ergebnisse nicht zu vermuten, dass die Fettsäuren ein limitierender Faktor bei der starken Ergosterolbiosynthese nach dem Switch sein könnten.
Um eventuelle gemeinsame Regulationen der Fett- und Sterolbiosynthese durch den Vergleich der Stoffflussintensitäten an bestimmten Zeitpunkten zu erkennen, sollte zunächst auch eine Stoffflussanalyse der Fettsäurenbiosynthese etabliert werden. So kann auch ein metabolisches Netzwerk aufgestellt werden, dass die Bildung und der Abbau der Fettsäuren beinhaltet. Allerdings finden in der Zelle eine permanente Fettsäurensynthese sowie ein Fettsäurenabbau statt, da sie Bestandteile vieler Moleküle sind (z.B. Sphingolipide, Phospholipide etc.). Diese Moleküle unterliegen aber auch einem stetigen Um- oder Abbau. Um eine Stoffflussanalyse der Fettsäurensynthese durchführen zu können, müssten deshalb all diese Komponenten quantifiziert werden, was im Rahmen dieser Arbeit unmöglich gewesen wäre.

5.3 Anaerob-aerobe Kultivierung mit Zusätzen

Um Veränderungen im Ablauf der Ergosterolbiosynthese zu bewirken, sollte nun die fortan als *Standardfermentation mit Switch* bezeichnete anaerob-aerobe Kultivierung abgewandelt werden. Die Beeinflussung der Sterolsynthese sollte sich dann in den mit COMPFlux© berechneten Stoffflüssen widerspiegeln. Anhand der veränderten Bildungsraten können dann regulatorische Effekte, die auf unterschiedlichen Intermediatkonzentrationen beruhen und wie sie auch in rekombinanten Stämmen vorkommen, quantitativ beschrieben werden.

Die Möglichkeiten der Sterol- bzw. Precursorzugabe waren durch die Verfügbarkeit von kommerziell erhältlichen Substanzen beschränkt. Für die Versuche wurden je 500mg Squalen, Lanosterol und Ergosterol 2h vor dem Switch in den Bioreaktor gegeben. Dafür wurden die Substanzen, wie unter 4.2.5 beschrieben in Ethanol bzw. Ethanol und Tween gelöst. Um die Vergleichbarkeit der Untersuchungen zu gewährleisten, wurde eine Standardfermentation mit Switch durchgeführt, bei der 2h vor dem Umschalten auf aerobe Verhältnisse das Ethanol-Tween-Gemisch in den Bioreaktor gegeben wurde. Da beim Vergleich der Standardfermentation mit der neuen Fermentation (mit Ethanol-Tweenzugabe) keine signifikanten Veränderungen der Ergosterolbiosynthese ersichtlich waren, wurde zum Vergleich aller Fermentationen alleinig die Standardfermentation mit Switch herangezogen.

In Tabelle 5.1 sind die Konzentrationen der zugegebenen Substanzen in der Zelle nach zweistündiger Verfügbarkeit im Fermenter (anaerob) im Vergleich zur Standardfermentation angegeben. Es ist zu erkennen, dass die einzelnen Substanzen in unterschiedlichen Mengen von den Zellen aufgenommen wurden.

	Intrazelluläre Konzentration in mg/g_{Zelle}		
bei Fermentation	Squalen	Lanosterol	Ergosterol
- ohne Zusatz (Standard)	4,02	0,26	0,45
- mit Zusatz	6,72	0,65	0,80

Tab. 5.1: Intrazelluläre Konzentration des Squalens und der gesamten Sterole Lanosterol und Ergosterol 2h nach Zugabe im Vergleich zur Standardfermentation.

Während 2,7mg mehr Squalen pro Gramm Zelle im Vergleich zur Standardfermentation wieder zu finden waren, wurden die Konzentration der Sterole durch die Supplementierung um ungefähr 0,4 mg erhöht. Das entspricht einer Zunahme von 67% hinsichtlich der intrazellulären Squalenkonzentration und einer 150%igen (Lanosterol) bzw. 78%igen (Ergosterol) Zunahme der Sterolkonzentration.

Der Mechanismus der Sterolaufnahme und des Transportes in der Zelle ist noch nicht im Detail aufgeklärt (Vgl. Kapitel 2.1.3). In zahlreichen Publikationen ist beschrieben, dass ein Regulationsmechanismus die Sterolaufnahme unter aeroben Verhältnissen verhindern soll. Die Abbildung 5.22 zeigt, dass innerhalb der ersten Stunde nach dem Switch zu aeroben Verhältnissen die Aufnahme der Sterole aus dem Kulturmedium besonders stark ausgeprägt war. Erst im weiteren Verlauf der aeroben Kultivierung wurde die Sterolaufnahme von der Zelle eingestellt. Beim Squalen war diese signifikante Konzentrationszunahme nach dem Switch nicht zu beobachten (Vgl. Abbildung 5.23).

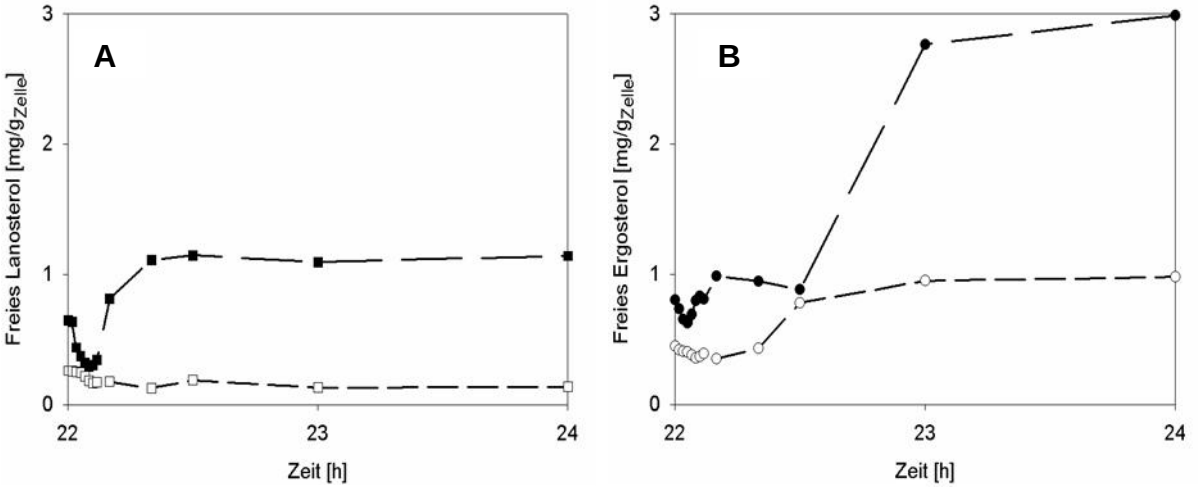


Abb. 5.22: Intrazellulärer Konzentrationsverlauf im Vergleich zur Standardfermentation in den ersten beiden Stunden nach dem Switch. Freies Lanosterol (A) bei Standardfermentation —□— bei Fermentation mit Lanosterolzugabe —■—. Freies Ergosterol (B) bei Standardfermentation —○— und bei Fermentation mit Ergosterolzugabe —●—.

Die Aufnahme der Sterole unterschied sich sowohl hinsichtlich des Aufnahmezeitraums als auch in der Menge des in den Zellen wieder gefundenen Supplements. Da die resorbierten Squalen-, Lanosterol- oder Ergosterolmengen für die Berechnung der Stoffflüsse im Post-Squalenweg relevant waren, wurden die Aufnahmeraten der einzelnen Sterole über die Zeit ermittelt (Vgl. Kapitel 4.2.4 und 4.6.4). Für die im Anschluss an die Konzentrationsbestimmungen durchgeführten Stoffflussanalysen wurden die Stoffmengen der aufgenommenen Lipide als zusätzliche Input-Komponenten berücksichtigt.

Beim Lanosterol wurde eine Aufnahmerate von ca. 0,7 mg/g_{Zelle}*h in der ersten halbe Stunde der aeroben Kultivierung ermittelt. Im Zeitraum zwischen 30min und 3h nach dem Switch konnte keine Lanosterolsaufnahme festgestellt werden. Zwischen 25-28h wurde eine Aufnahmerate für das Lanosterol von ca. 0,2mg/g_{Zelle}*h ermittelt. Für das Ergosterol wurde eine anfängliche Aufnahmerate von ca. 0,8mg/g_{Zelle}*h gemessen. Zwischen 0,5h und 1h nach dem Switch steigerte sich diese Rate auf ca. 1,3 mg/g_{Zelle}*h.

Bei Squalen wurden geringe Aufnahmeraten bestimmt, die im Bereich der Messwertschwankungen lagen und nicht relevant für die Stoffflussberechnung waren.

Für die Erstellung erster kinetischer Ansätze zur Beschreibung der Sterolbiosynthese in Hefe, stellte sich nun die Frage, wie durch die Aufnahme des Squalens, Lanosterols bzw. Ergosterols die Bildungsraten der einzelnen Intermediate und des Endprodukts Ergosterol verändert wurden. Als erstes dienten die intrazellulären Konzentrationen aus der Kultivierung mit Squalensupplementierung der Auswertung und anschließenden Stoffflussberechnung.

Trotz der erheblichen Ansammlung des Precursors in der Zelle (Vgl. Tabelle 5.1), waren die Konzentrationen der einzelnen Intermediate in der Zelle durch die Squalenaufnahme kaum beeinflusst worden. Die Unterschiede bzgl. der Sterolkonzentrationen zwischen der Standardfermentation und Fermentation mit Squalenzugabe lagen im Bereich der errechneten Standardabweichung. Besonders interessant für die Beurteilung der Regulation war, dass selbst die Konzentration des freien Lanosterols in der Zelle nicht verändert wurde. Demnach scheint schon die Umsetzung vom Squalen zum Lanosterol durch die Enzyme Erg1p oder Erg7p reguliert zu sein, da die vermehrte Verfügbarkeit des Substrats Squalen nicht zu einer erhöhten Syntheseaktivität führte. Diese Beobachtung ließ sich auch durch den Abbau des Squalens beobachten: Die Rate, mit der die Squalenmenge in der Zelle nach dem Switch sank, war für die beiden Kultivierungen vergleichbar (Vgl. Abbildung 5.23)

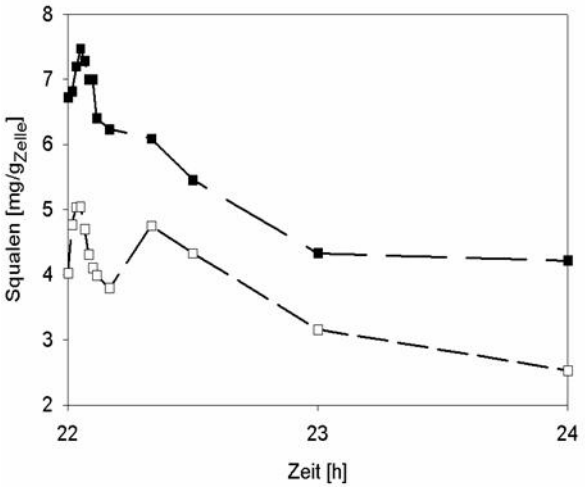


Abb. 5.23: Konzentrationsabnahme des Squalens in den ersten 2h nach dem Switch bei der Standardfermentation —□— und bei Fermentation mit Squalenzugabe —■—.

Das Ergebnis der anschließenden Stoffflussberechnungen mit COMPFlux© zeigte, dass die Bildung der Sterole im Post-Squalensyntheseweg durch die Squalenzugabe nicht verändert wurde. Lediglich die anfänglichen Schwankungen der Stoffflüsse bis 7min nach dem Switch wiesen Differenzen auf. Die berechneten Stoffflüsse für die Kultivierung mit Squalenzugabe sind zum Vergleich mit den anderen Kultivierungen in den folgenden Abbildungen 5.24 bis 5.28 dargestellt.

Die Supplementierung mit Lanosterol hingegen bewirkte Veränderungen im Ablauf der Ergosterolbiosynthese. Das in die Zelle transportierte freie Lanosterol führte zunächst zu einem leichten Anstieg der Veresterung von Lanosterol. Die ermittelten Konzentrationen für das 4,4-Dimethylzymosterol zeigten leicht erniedrigte Werte im Vergleich zur Standardfermentation, wie sie auch bei der Squalenzugabe festgestellt wurden. Auffällig war die Hydrolyse des 4,4-Dimethylzymosterolesters zwischen Stunde 25 und 28h der Kultivierung, die zu Werten nahe des Detektionslimits von 0,02mg/g_{Zelle} führte (Abbildung 5.24B).

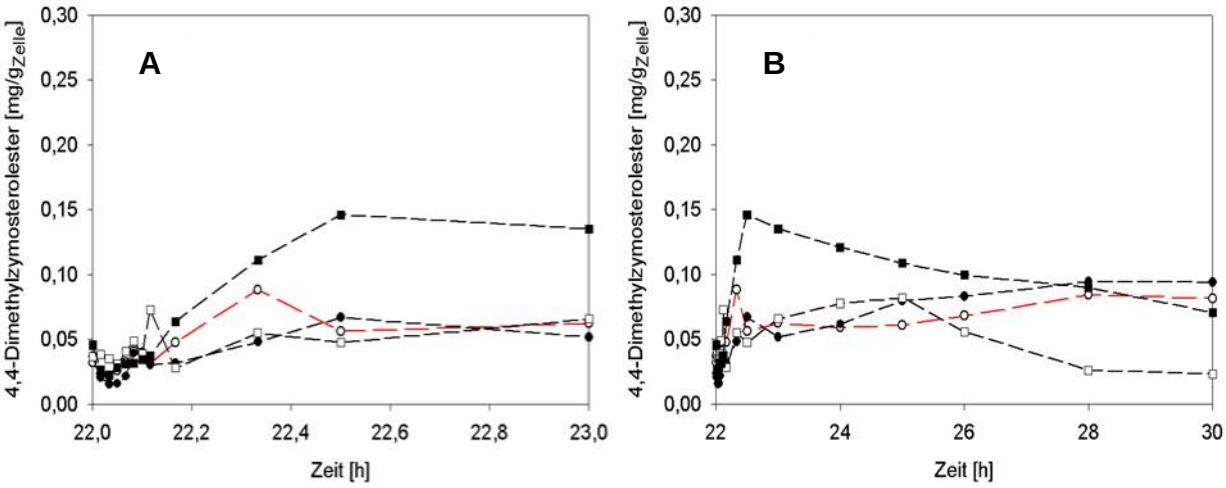


Abb. 5.24: Vergleich der intrazellulären 4,4-Dimethylzymosterolesterkonzentrationen innerhalb der ersten Stunde (A) und der ersten 8h (B) nach dem Switch. Standardkultivierung —○—, Kultivierung mit Squalenzugabe —●—, Kultivierung mit Lanosterolzugabe —□—, Kultivierung mit Ergosterolzugabe —■—.

Die Konzentration von Feco-, Epi- und Ergosterol verliefen parallel zu denen der Standardfermentation (Vgl. Abbildung 5.16), wobei die Konzentrationen des freien Feco- und Episterols um ungefähr 30% erniedrigt waren. Weiterhin wurde bei der Kultivierung mit Lanosterolsupplementierung nach einer Stunden aerober Kultivierung eine um 0,6mg/g_{Zelle} erhöhte Ergosterolesterkonzentration festgestellt (nicht gezeigt). All diese Konzentrationsänderungen, inklusive die des 4,4-Dimethylzymosterolesters, bewirkten jedoch keine signifikanten Änderungen der Stoffflüsse.

Eine deutliche Abweichung der Konzentrationen im Vergleich zur Standardfermentation war für den Zymosterolester zu beobachten. Die Bildung dieses Esters war deutlich höher als bei der Standardfermentation bzw. Fermentation mit Squalenzugabe (Abbildung 5.25). Besonders hervorzuheben ist dabei, dass die Konzentrationsverläufe des Zymosterolesters für die Standardfermentation und die Fermentation mit Squalenzugabe sehr geringe Abweichungen aufwiesen, so dass die Verläufe im Diagramm fast deckungsgleich sind (Vgl. Abbildung 5.25).

Diese verstärkte Synthese des Zymosterolesters bewirkte aber nicht nur einen erhöhten Stoffffluss vom Zymosterol zum korrespondierenden Ester, sondern auch einen Anstieg der der Stoffflüsse im Post-Squalenbiosyntheseweg bis zum Zymosterol (Abbildung 5.26). Besonders stark war diese vermehrte Synthese unmittelbar nach dem Switch zu beobachten. Im weiteren Verlauf der Kultivierung (3h nach dem Switch) lagen die Bildungsraten des freien Lano,- 4,4-Dimethylzymo- und Zymosterols unten denen der Standardfermentation (Vgl. Abbildung 5.26).
Die Abbildung 5.26 zeigt nur die Stoffflüsse zum freien Zymosterol (rZYM) für die durchgeführten Fermentationen, um den Vergleich zwischen den Kultivierungen zu vereinfachen. Da bereits festgestellt wurde, dass die freien und veresterten Intermediate Lanosterol und 4,4-Dimethylzymosterol nur in verhältnismäßig geringen Mengen in den Zellen akkumulierten, repräsentiert rZYM den gesamten Stoffffluss, der in den Syntheseweg eingeht. Die Stoffflüsse zum freien Lanosterol und 4,4-Dimethylzymosterol sind mit dem rZYM nahezu identisch, wie auch schon für die Standardkultivierung gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 5.16). In Abbildung 5.27 sind die Stoffflüsse während der Fermentationen zum freien Ergosterol (rERGL) dargestellt. Auch hier gilt, dass durch die geringe Akkumulation des Feco- und Episterols in den Zellen, der Fluss rERGL nahezu identisch mit den Flüssen zum Fecosterol und Episterol war (Vgl. Abbildung 5.17). Daher genügt die Darstellung des freien Ergosterols, um die Syntheseleistung in den letzten Schritten des Post-Squalenwegs zu zeigen und zu vergleichen.

Die Bildungsrate des freien Ergosterols unterschied sich aber nach 30min aerober Kultivierung nur geringfügig im Vergleich zur Standradfermentation (Abbildung 5.27). Daher dient der erhöhte Stoffffluss in den Post-Squalenpathway fast ausschließlich der Zymosterolesterbildung.

Die Zugabe von Ergosterol zu der Standardfermentation mit Switch hatte eine größere Veränderung der Sterolkonzentrationen und -bildungsraten zur Folge als der Zusatz des Lanosterols. Die zweistündige Verfügbarkeit dieses Sterols im Kulturmedium führte zu einem Anstieg des freien Ergosterols in Zelle um 50% (Vgl. Abbildung 5.22). Eine vermehrte Veresterung des Ergosterols konnte unter anaeroben Bedingungen nicht festgestellt werden. Die starke Aufnahme des Ergosterols 30min nach dem Switch führte zu einem Konzentrationsniveau das das der Vergleichsfermentationen um das 2-3fache überstieg. Der Gehalt des freien intrazellulären Ergosterols verringerte sich langsam zwischen Stunde 24-28 der Fermentation von 3,0mg/g_{Zelle} auf 2,4mg/g_{Zelle}. Diese starke Ansammlung des freien Ergosterols resultierte aber lediglich in einer Zunahme des veresterten Ergosterols um 0,6mg/g_{Zelle} nach 6h.

Durch die Ergosterolzugabe ausgelöste Verschiebungen der Konzentrationsmuster sind für das freie Lanosterol, 4,4-Dimethylzymosterol und Zymosterol zu beobachten. Ihre Konzentrationen lagen zunächst unter denen der Vergleichsfermentation. Innerhalb der ersten Stunde nach dem Switch wurden diese Sterole aber in der Zelle in Mengen akkumuliert, die die Konzentrationen in der Standardfermentation überstiegen.
Besonders ausgeprägte Veränderungen der Konzentrationen nach dem Switch sind für die Ester dieser drei Intermediate festgestellt worden. Beim Vergleich der Konzentrationen mit denen der Standardkultivierung waren beim 4,4-Dimethylzymosterol- und Zymosterolester starke Anstiege 7min nach dem Switch zu verzeichnen (Abbildung 5.24 und 5.25). Die gesteigerte Bildung des 4,4-Dimethylzymosterolesters hielt bis etwa 30min nach dem Switch an (Abbildung 5.24). Zu diesem Zeitpunkt überstieg die Menge des akkumulierten Zymosterolesters die des 4,4-Dimethylzymosterol um mehr als das 22fache. Insgesamt wurde der Stofffluss im Syntheseweg kaum durch die Bildung des Esters von 4,4-Dimethylzymosterol beeinflusst, sondern ist von der Zymosterolesterbildung dominiert worden.

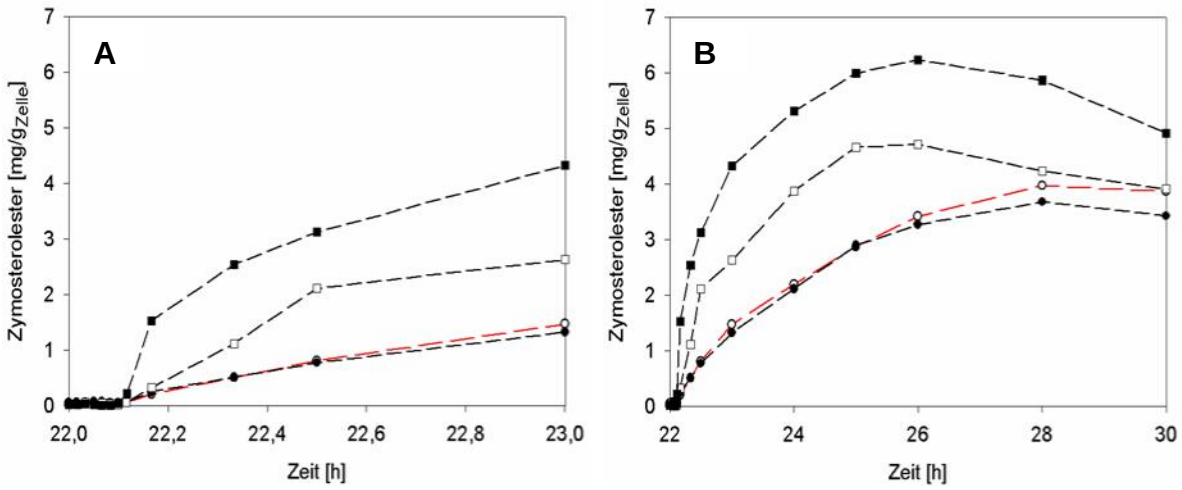


Abb. 5.25: Vergleich der intrazellulären Zymosterolesterkonzentrationen innerhalb der ersten Stunde (A) und der ersten 8h (B) nach dem Switch. Standardkultivierung —○—, Kultivierung mit Squalenzugabe —●—, Kultivierung mit Lanosterolzugabe —□—, Kultivierung mit Ergosterolzugabe —■—.

Die vermehrte Anreicherung des Zymosterolesters setzte sich in den ersten Stunden nach dem Switch fort (Abbildung 5.25), nach 4h aerober Kultivierung erreichte ihren Höhepunkt. Die durchschnittlich 6,2mg Zymosterolester pro Gramm Zelltrockengewicht entsprachen fast der doppelten Menge des zu diesem Zeitpunkt während der Standardkultivierung akkumulierten Esters. Da bei der Standardfermentation der höchste Zymosterolgehalt erst nach 6h aerober Kultivierung gemessen wurde, hatte sich also in Folge der Ergosterolzugabe auch der zeitliche Ablauf der Sterolesterzwischenspeicherung verändert.

Diese zeitliche Verschiebung konnte auch bei der Lanosterolsupplementierung festgestellt werden (Vgl. Abbildung 5.25).

Für den Ester des Lanosterol hingegen stellten sich im Betrachtungszeitraum bis 6h nach dem Switch um ca. 0,1mg/g_{Zelle} verringerte Konzentrationen als in der Standardfermentation ein. Es kann nur vermutet werden, dass Lanosterol aufgrund seiner Lokalisierung in der Zelle den Veresterungsenzyme Are1p und Are2p nicht zur Verfügung stand. Auch kann es sein, dass nicht ausreichende Enzymkonzentrationen für die Veresterung des Lanosterols vorlagen oder die Veresterungsreaktion durch einen unbekannten Mechanismus unterbunden wurde. Diese Vermutungen können insbesondere für Are1p getroffen werden, da es eine erhöhte Substrataffinität für das Lanosterol aufweist (Vgl. 2.1.3).

Auch der Konzentrationsvergleich der spät im Post-Squalenpathway gebildeten Sterolintermediate Feco- und Episterol mit der Standardfermentation wies auf Veränderungen der Syntheseabläufe hin: So war das freie Fecosterol ab der ersten Stunde nach der Umstellung um ca. 0,02mg/g_{Zelle} im Vergleich zu 0,1 mg/g_{Zelle} bei der Standardfermentation erhöht; für die korrespondierende Esterkonzentration war ein sprunghafter Anstieg um 0,15mg/g_{Zelle} zwischen 7-10min nach dem Switch zu beobachten. Der Ester des Episterols hingegen konnte nach 1h aerober Kulturführung nur in geringeren Mengen nachgewiesen werden. Dabei entsprachen die gefundenen Episterolesterwerte etwa der Hälfte der Konzentrationen bei der Fermentation ohne Zusätze (nicht gezeigt).
Die detektierten Abweichungen beim Feco- und Episterol waren zwar signifikant, aufgrund der insgesamt geringen Mengen dieser Intermediate in den Zellen aber für den Verlauf der Stoffflüsse nicht ausschlaggebend. Die wichtigsten Stoffflüsse aller Kultivierungen sind zum Vergleich in der Diagrammen 5.25 und 5.26 dargestellt.

Die Stoffflussanalyse zeigt, dass die Intensität der Ergosterolbiosynthese durch die Zugabe der Sterole wesentlich beeinflusst wurde. So wurde die Bildung von Sterolen durch die Lanosterolsupplementierung gesteigert, wie durch den erhöhten Fluss zum Zymosterol ab Berechnungspunkt bei 22,14h belegt werden kann (rZYM, Abbildung 5.26). Eine weitere Steigerung dieses Flusses in der Sterolbiosynthese wurde durch die Supplementierung mit Ergosterol erzielt. Die Ergosterolzugabe erhöhte dabei den Stoffluss in den Pathway um ein Vielfaches. Interessant ist, dass sich die Stoffflüsse für den Zeitraum zwischen 7-60min nach dem Switch stark unterschieden, sich aber im weiteren Verlauf der Fermentation anglichen.

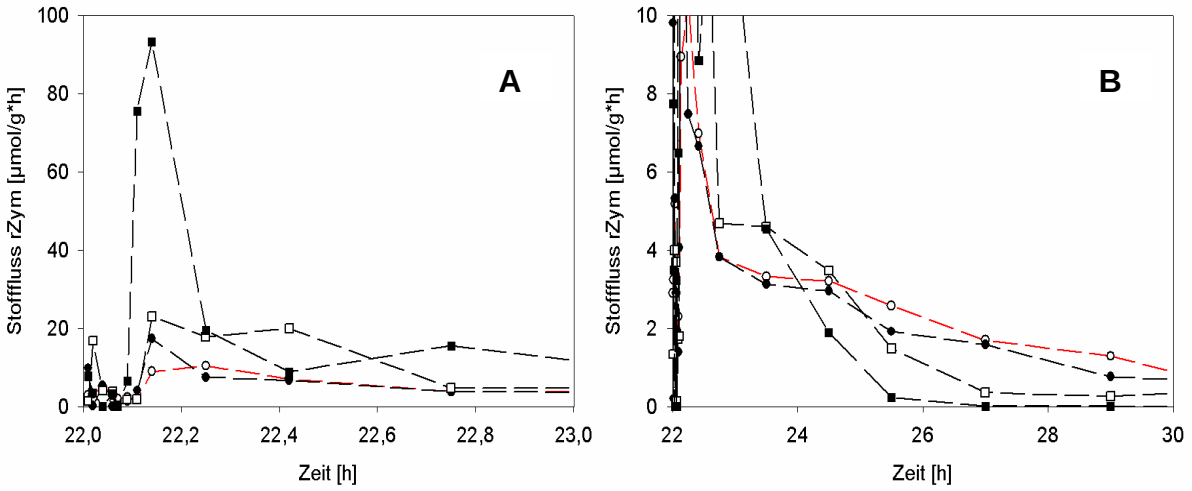


Abb. 5.26: Stoffffluss zum freien Zymosterol (rZYM) bei der Standardkultivierung —o—, bei Kultivierung mit Zugabe von Squalen —●—, von Lanosterol —□— und Ergosterol —■— innerhalb der 1h (A) und der ersten 8h (B) nach dem Switch.

Wie bereits erläutert, lässt sich der gesamte Stoffffluss in den Stoffwechselweg durch den Fluss zum Zymosterol (rZYM) darstellen. Daher kann der durch die Supplementierung bewirkte Anstieg der Sterolbiosynthese zu Beginn der aeroben anhand der Zymosterolbildung verglichen werden. Hierfür wurde rZYM über die erste Stunde integriert (*Integral flux analysis*, Vgl. Kapitel 5.1.3). In der Tabelle 5.2 sind die auf diese Weise berechneten Mengen des Zymosterols (in mg/g_{Zelle}) gegenübergestellt. D.h., die angegebenen Werte entsprechen auch den durchschnittlichen Zymosterolbildungsraten innerhalb der ersten aeroben Kultivierungsstunde. (*Integral flux analysis*, Vgl. Kapitel 5.1.3).

Tab. 5.2: Aus den Stoffflussberechnungen kalkulierte Menge des gebildeten freien Zymosterols innerhalb der ersten Stunde nach Switch für (*Integral flux analysis*).

		mit Zugabe von		
Kultivierung	Standard	Squalen	Lanosterol	Ergosterol
Zymosterol in mg/g_{Zelle}	2,15	2,21	3,95	7,20

Die Lanosterolzugabe bewirkt fast eine Verdopplung und die Ergosterolzugabe mehr als eine Verdreifachung des in den Stoffwechselweg eingehenden Stoffflusses nach dem Switch, wie anhand des gebildeten Zymosterols gesehen werden kann (Tabelle 5.2). Squalen, das keine Sterolstruktur aufweist und sich hinsichtlich seiner chemischen Eigenschaften von den Sterolen stark unterscheidet, bewirkte hingegen keine signifikante Steigerung der Synthese.

Weshalb eine vermehrte Sterolsynthese der Hefe *S.cerevisiae* bei einer vermehrten Verfügbarkeit von Sterolen auftreten könnte, wird im Kapitel 6 diskutiert.

Der erhöhte Stofffluss (Vgl. Tabelle 5.2) in den Post-Squalensyntheseweg diente zu einem großen Teil der Zymosterolesterbildung. Dies resultierte in den erhöhten Zymosterolesterkonzentrationen, wie sie in Abbildung 5.25 dargestellt sind.
Die in der nachstehenden Tabelle (Tab.5.3) präsentierten *Flux split ratios* ergeben sich durch die Teilung des durchschnittlichen Stoffflusses zum Zymosterolester (rZYMEST) durch den durchschnittlichen Stofffluss zum Zymosterol (rZYM) in der ersten Stunde nach dem Switch [Stephanopoulos und Vallino, 1991]. Der Vergleich zeigt, dass sich das Verhältnis, mit dem der eingehende Fluss zur Estersynthese verwendet wurde, nur geringfügig unterschied, obwohl er stark variierte.

Tab. 5.3: Flux split ratio aus dem durchschnittlichen Zymosterolester- (rZYMEST) und Zymosterolstofffluss (rZYM) innerhalb der ersten nach Switch.

		mit Zugabe von		
Kultivierung	Standard	Squalen	Lanosterol	Ergosterol
Stoffflussanteil zur Zymosterolesterbildung	0,60	0,63	0,60	0,63

In Abbildung 5.26 fällt weiterhin auf, dass der Fluss zum Zymosterol erst nach 7min beschrieben werden kann. In den ersten Minuten der aeroben Kultivierung waren zum Teil hohe Syntheseraten festzustellen, die aber zwischen den einzelnen Fermentationen nicht reproduzierbar erschienen. Trotz mehrmaliger Wiederholung der Fermentationen konnte kein reproduzierbarer Ablauf der Ergosterolbiosynthese für diesen Zeitabschnitt festgestellt werden.
Anhand der Skalierungen der Abbildungen 5.26A und 5.27A wird deutlich, dass in der ersten Stunde nach dem Switch die Stoffflüsse am Ende des Synthesewegs (rFEC, rEPI, rERGL, alle repräsentiert durch rERGL) niedriger ausfielen als die Stoffflüsse bis zum Zymosterol (rLNL, rDZYM, rZYM, alle repräsentiert durch rZYM). Mit dem Beginn der starken Zymosterolestersynthese nach 7min wurde der Fluss zum Endprodukt der Sterolbiosynthese anscheinend so reguliert, dass die Bildungsraten des Ergosterols bei allen Fermentationen vergleichbare Größenordnungen annahmen (Abbildung 5.27). Zu beachten ist, dass der Fluss rERGL die Konzentrationsänderung pro Zeit zwischen zwei Messpunkten beschreibt. Bei der Ergosterolzugabe ist dieser Fluss die um die Aufnahmerate bereinigt ist. D.h. rERGL beinhaltet ausschließlich die Bildung des Ergosterols.

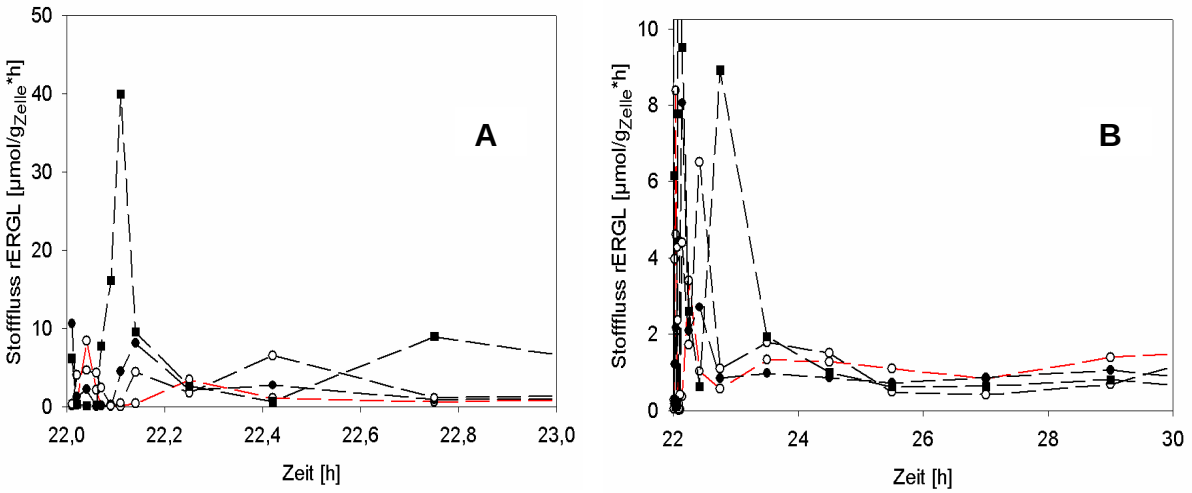


Abb. 5.27: Stofffluss zum freien Ergosterol (rERGL) bei der Standardkultivierung —o— , bei Kultivierung mit Zugabe von Squalen —●—, von Lanosterol —□— und Ergosterol —■— innerhalb der ersten Stunde (A) und der ersten 8 Stunden (B) nach dem Switch.

Besonders deutlich wurde die Abschwächung der Synthese der späten Intermediate bei der Kultivierung mit Ergosterolzugabe. Hier war erst eine ausgeprägte Bildung von bis zu ca. 40µmol/g$_{Zelle}$*h zu beobachten (Abbildung 5.27). Nach 7min sank dann der Stofffluss deutlich.

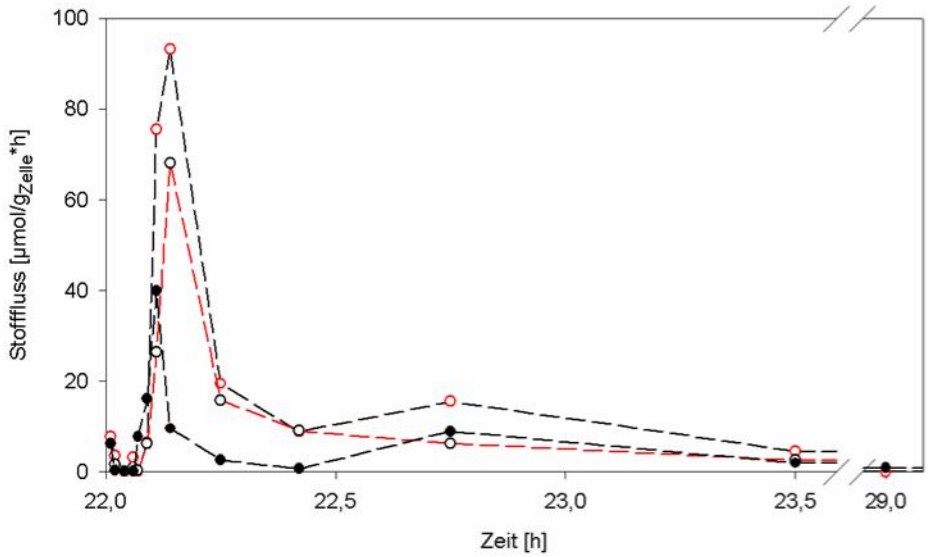


Abb. 5.28: Vergleich der Stoffflüsse zu freien Zymosterol (rZYM) —o—, zum veresterten Zymosterol (rZYMEST) —o— und zum freien Ergosterol (rERGL) —●— bei der Kultivierung mit Ergosterolzugabe.

Wie sich die Esterbildung des Zymosterols auf den Verlauf der Ergosterolbiosynthese bei der Kultivierung mit Ergosterolzugabe auswirkte, verdeutlicht die Abbildung 5.28. Zunächst zeigte sich ein Anstieg der Syntheserate für alle betrachteten Sterole. Bei 22,14h, als sich die Zymosterolesterbildung verstärkte, kam die Synthese der späten Intermediate im Stoffwechselweg (Fecosterol, Episterol und Ergosterol) fast zum Erliegen. Erst nach 30min, als die Esterbildung sich verlangsamte, stieg die Bildungsrate der späten Sterolintermediate und des Endprodukts erneut an (repräsentiert durch rERGL).

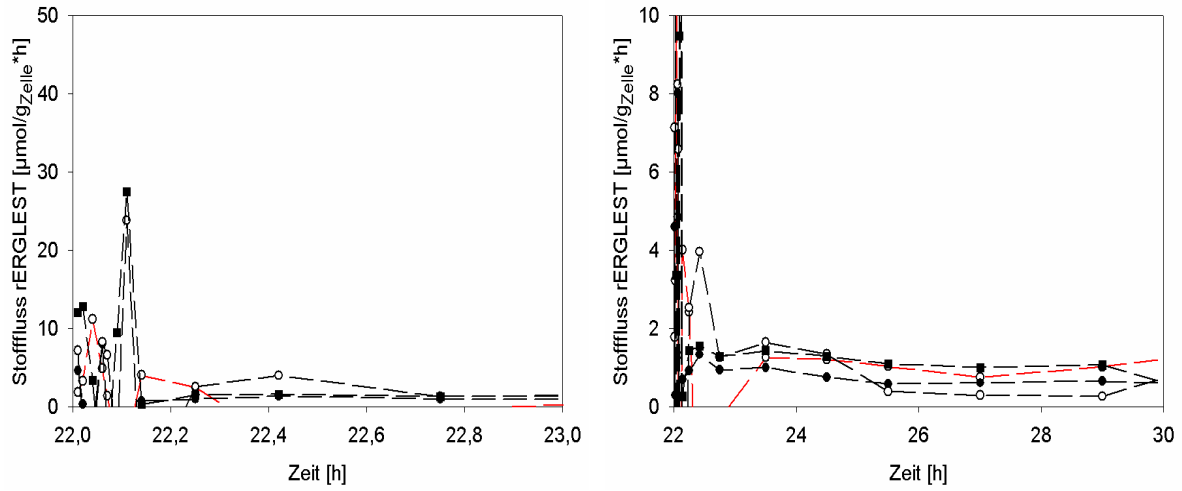


Abb. 5.29: Stoffffluss zum veresterten Ergosterol (rERGLEST) bei der Standardkultivierung —○—, bei Kultivierung mit Zugabe von Squalen —●—, von Lanosterol —□— und Ergosterol —■— innerhalb der ersten Stunde (A) und der ersten 8 Stunden (B) nach dem Switch.

Die Verläufe der Veresterungsraten des Endprodukts Ergosterol verliefen ab 22,14h bei allen Fermentationen fast parallel auf einem niedrigen Niveau von unter 2µmol/g_{Zelle}*h. Für den Zeitraum zwischen 23-28h betrug, trotz der zum Teil stark voneinander abweichenden Syntheseverläufe anderer Metabolite, die mittlere Standardabweichung für die Ergosterolveresterungsrate nur 0,31µmol/g_{Zelle}*h zwischen den unterschiedlichen Kultivierungen.

5.4 Intrazelluläre Sterolkonzentrationen und -stoffflüsse der Hefe *S.cerevisiae* im kontinuierlichen Prozess

5.4.1 Vorversuche im Schüttelkolben

Mit Batchkultivierungen konnten Versuche zur Untersuchung der Ergosterolbiosynthese realisiert werden, die eine anaerobe Kultivierungsphase beinhalteten. Da die Ergosterolbiosynthese Sauerstoff benötigt, würde eine anaerobe, kontinuierliche Kultivierung ohne Sterolsupplementierung zum Auswaschen der Zellen aus dem Bioreaktor führen. In kontinuierlicher Prozessführung ist es aber möglich, einen stationären Zustand (steady-state) einzustellen und die Reaktion auf einen neuen Stimulus zu untersuchen. Die Reaktion des Systems wird dann ermittelt bis sich wieder ein stationärer Zustand einstellt.
Um ein Stimulus-Response-Experiment zur Untersuchung der Ergosterolbiosynthese in kontinuierlicher Kultur durchzuführen, mussten Einflussfaktoren (Stimuli) identifiziert werden, die eine quantifizierbare Änderung der intrazellulären Sterolkonzentrationen bewirkten. Die durch den Stimulus veränderten Sterolstoffflüsse sollten anschließend berechnet und hinsichtlich der Untersuchung von Regulationsmechanismen ausgewertet werden. Hierfür wurden zunächst Vorversuche in Schüttelkolben vorgenommen. Dabei wurde durch Endpunktbestimmungen der Einfluss von Temperatur sowie der Substanzen Geraniol, Ethanol, Eisensulfat ($FeSO_4$), Tween80 und der Palmitoleinsäure getestet.

Da die Zellen bei Temperaturänderungen ihre Membranfluidität anpassen, war eine Veränderung der Sterolzusammensetzung zu erwarten. Allerdings war nicht bekannt, ob die Größe der induzierten Änderungen ausreichend für eine Stoffflussanalyse ist. Mit der Geraniolsupplementierung wurde getestet, inwieweit die Verfügbarkeit von Vorstufen des Mevalonatwegs die Sterolbiosynthese beeinflussen [Vaudano et al., 2004]. Die Zugabe von Ethanol wurde durchgeführt, weil bekannt ist, dass Ethanol im Kulturmedium eine Veränderung der Lipidzusammensetzung in den Membranen der Hefe zur Folge hat [Walker-Caprioglio et al., 1990]. Die Eisensulfatzugabe war damit zu begründen, dass an der Ergosterolbiosynthese beteiligte Enzyme Häm-abhängig sind und somit verstärkt Eisenionen benötigen könnten [Lorenz et al., 1987]. Die Fettsäuren C16:1 (Palmitoleinsäure) und C18:1 (Ölsäure in Form von Tween 80) werden als Reaktionspartner für die Veresterung der Sterole benötigt (Vgl. Kap. 2.1.3).

In der Abbildung 5.30 sind die intrazellulären Konzentrationen der freien Sterole für die Versuche nach einer aeroben Kultivierungszeit von 72h gezeigt. Eine Nullprobe bestand aus einer parallel geführten Kultivierung im Schüttelkolben ohne Supplementierung. Bei der Auswertung der Versuche in Schüttelkolben ist zu beachten, dass die Abweichung der Sterolgehalte zwischen gleichen Proben besonders hoch war. Das ist damit zu erklären,

dass die Sterolbiosynthese von der Sauerstoffverfügbarkeit abhängig ist. Die Schüttlerrotation genügt aber nicht, um eine Gelöstsauerstoffkonzentration von über 80%, wie z.B. im Bioreaktor, zu gewährleisten. Besonders erhöhte Squalenwerte (hier nicht gezeigt) und Lanosterolwerte weisen auf Sauerstofflimitation hin.

Die Geraniolzugabe führte zu einem stark verlangsamten Wachstum der Zellen, so dass Schüttelkolben nicht über eine ausreichende Zellzahl verfügten, um die Sterole aufzuarbeiten. Die Veränderungen der freien Sterolintermediate waren durch die Zusätze Eisensulfat, Ethanol und Tween80 unter Berücksichtigung der hohen Messwertschwankungen nicht signifikant.

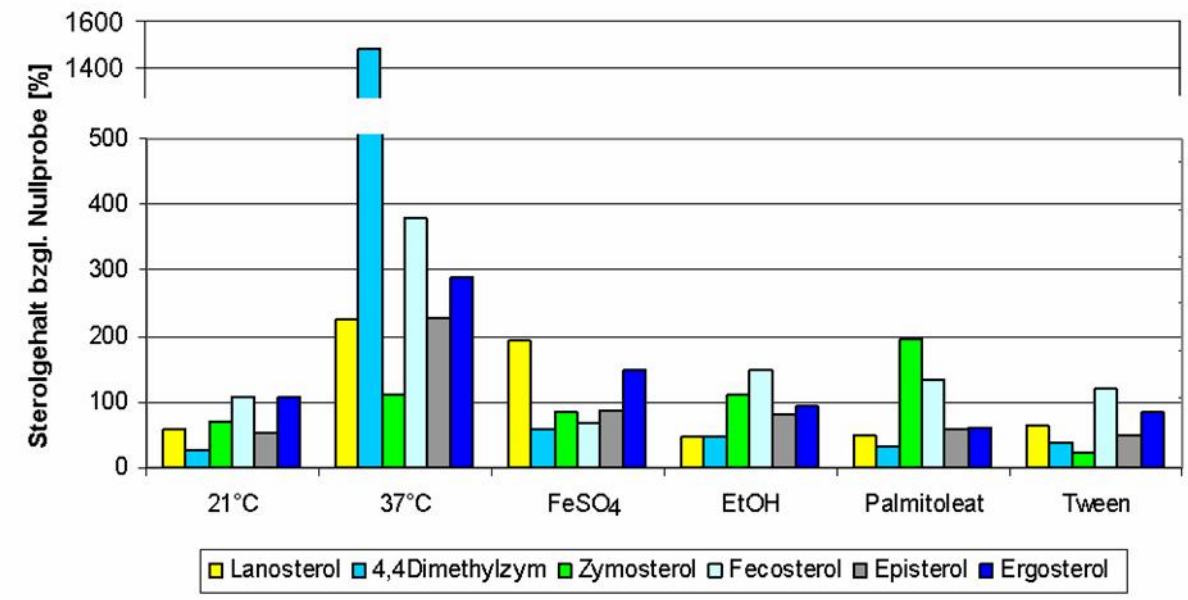


Abb. 5.30: Freie Sterole in Hefe, Schüttelkolben nach 72h. Die durchschnittliche prozentuale Standardabweichung der Mehrfachbestimmungen bezogen auf den Mittelwert lag bei 50,7%.

Die Kultivierungstemperatur hat einen signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung der freien Sterole (Abbildung 5.30). Das freie 4,4-Dimethylzymosterol wurde in Konzentrationen vorgefunden, die die der Nullprobe um das 15fache überstiegen. Auch Feco, Epi- und Ergosterol waren in höheren Konzentrationen nachweisbar. Lediglich die Konzentration des freien Zymosterols wurde durch die Temperaturerhöhung kaum beeinflusst.

In Abbildung 5.31 zeigt sich der Einfluss der Temperatur auf die Sterolester-zusammensetzung der Hefezellen. Besonders die Ester der frühen Sterolintermediate 4,4-Dimethylzymosterol sowie Lanosterol waren in erhöhten Konzentrationen gemessen worden. Alle übrigen Sterolester der Hefe lagen jedoch in Konzentrationen vor, die unter denen der Nullprobe lagen. Diese Aufsplittung der Veresterung wurde in den bisherigen

Experimenten noch nicht beobachtet und erschien deshalb besonders interessant für weitere Untersuchungen.

Die Modifikation der Sterolesterkonzentrationen bei Temperaturerniedrigung auf 21°C ist ebenfalls signifikant. Dieser Einflussfaktor sollte daher ebenfalls in kontinuierlicher Kultur analysiert werden. Berücksichtigt man die aufgetretenen Messwertschwankungen im Schüttelkolben, war kein Einfluss des Eisensulfats sowie des Ethanols auf die Sterolesterzusammensetzung in den Hefezellen nachweisbar. Bei der Fettsäurensupplementierung zeichnete sich hingegen im Experiment ein stärkerer Einfluss der Palmitoleinsäure im Vergleich zur Ölsäure ab (Abbildung 5.31).

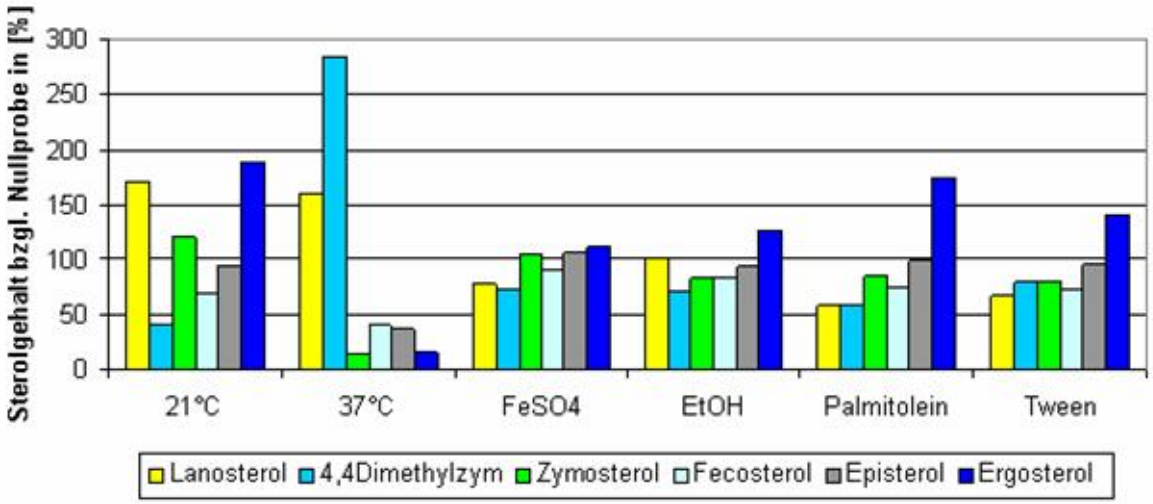


Abb. 5.31: Veresterte Sterole in Hefe, Schüttelkolben nach 72h. Die durchschnittliche prozentuale Standardabweichung der Mehrfachbestimmungen bezogen auf den Mittelwert lag bei 48,3%.

In einem weiteren Experiment wurde die Hefe zunächst anaerob im Schüttelkolben für 22h angezogen und anschließend unter aeroben Bedingungen kultiviert. Der zu testende Parameter wurde 2h vor dem Switch verändert (Vgl. Kapitel 4.2.3). Hierbei wurden ebenfalls ausgeprägte Verschiebungen der intrazellulären Sterolzusammensetzung bei einer Temperaturänderung auf 37°C festgestellt, während die anderen Einflussfaktoren kaum Auswirkungen zeigten. Eine Ausnahme stellte die Zugabe von Palmitoleinsäure dar. Hier lagen die Sterolintermediate in den Zellen mehrheitlich frei und kaum verestert vor (nicht gezeigt).

Für die Durchführung einer aeroben, kontinuierlichen Kultivierung im 2l-Maßstab wurde aufgrund der Ergebnisse im Schüttelkolben zunächst für eine Fermentation mit Veränderung der Kultivierungstemperatur von 27°C auf 37°C ausgewählt. Weiterhin war eine anaerobe, kontinuierliche Kultivierung mit Palmitoleinsäurezugabe sowie eine Kultivierung mit gesenkter Fermentationstemperatur geplant.

5.4.2 Einstellung stationärer Zustände

Alle kontinuierlichen Kultivierungen wurden, wie unter Kapitel 4.2.7 beschrieben, mit einer Durchflussrate von D = 0,05h^{-1} mit einer Begasung von 1vvm durchgeführt. Zunächst wurde ein stationärer Zustand hinsichtlich der Parameter Optischer Dichte, Substratkonzentration, Gelöstsauerstoffkonzentration und pH-Wert abgewartet. Besonders wichtig war auch die Gewährleistung konstanter intrazellulärer Sterolkonzentrationen. Hierbei zeigte sich bei der kontinuierlichen Kultivierung die Schwierigkeit, stationäre und reproduzierbare Sterolkonzentrationen zu erreichen. Um Sterolkonzentrationen innerhalb des in Abbildung 5.32 dargestellten Fehlerbreichs zu bestimmen, musste die Fermentation wenigstens über einen Zeitraum von drei Tagen in Betrieb sein. Die Abweichungen zwischen den Sterolkonzentrationen wurden mit einem zeitlichen Abstand von mindestens 2h untersucht. Der stationäre Zustand wurde aus insgesamt 20 Proben unterschiedlicher Zeitpunkte und Fermentationen ermittelt. Wie anhand der eingezeichneten Standardabweichungen in Abbildung 5.32 ersichtlich, schwankten die Konzentrationen der Intermediate, die nur in geringeren Mengen zu detektieren waren, besonders stark.

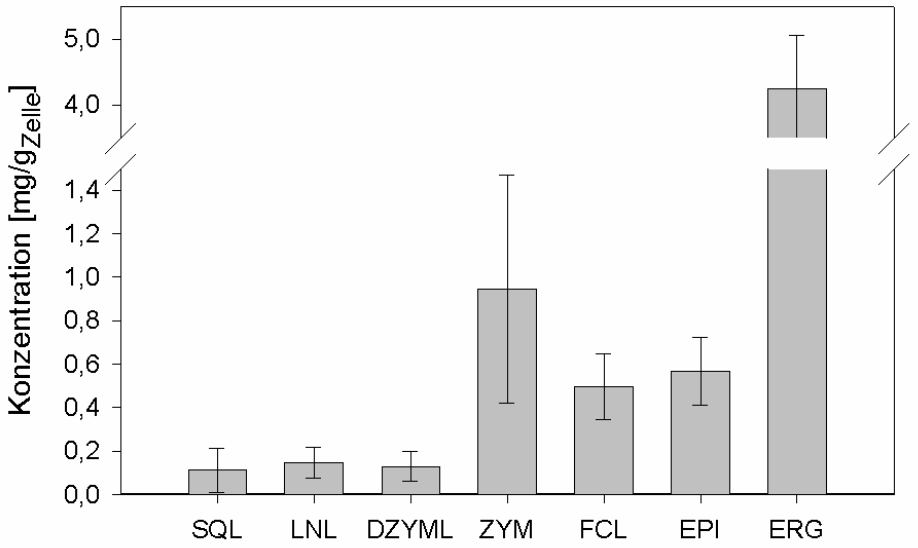


Abb. 5.32: Konzentration des Squalens und der Sterole (frei + verestert) im stationären Zustand bei kontinuierlicher, aerober Kultivierung mit Standardabweichungen. Verwendete Abkürzungen für Squalen SQL, Lanosterol LNL, 4,4-Dimethylzymosterol DZYML, Zymosterol ZYM, Fecosterol FCL, Episterol EPI und Ergosterol ERGL.

Die Messwertschwankungen der Proben im angenommenen stationären Zustand erschwerten die Auswertungen der nachfolgenden Experimente erheblich, da sie im Bereich der induzierten Änderungen lagen. Auch eine Verlängerung der stationären Kultivierungsphase führte zu keiner Verringerung der Messwertschwankungen. Dennoch wurde der Versuch unternommen, die Effekte der Einflussfaktoren auch in der kontinuierlichen Kultur mittels einer Stoffflussanalyse aufzuzeigen.

5.4.3 Stoffflüsse im stationären Zustand

Wie im Kapitel 4.5 beschrieben, lassen sich mit der Software COMPFlux© Stoffflussberechnungen aufgrund gemessener Konzentrationen berechnen. Hierbei wird das Wachstum nicht berücksichtigt. Im Falle einer kontinuierlichen Fermentation wachsen die Hefezellen mit einer konstanten Wachstumsrate von $\mu = 0{,}05h^{-1}$. Eine konstante Sterolkonzentration stellt sich bei einem Gleichgewicht von Ergosterolbiosynthese und Wachstum der Zellen ein. Dieser Sterolfluss lässt sich aber abschätzen. Bei einer Menge Ergosterol von $4mg/g_{Zelle}$, einer Wachstumsrate von $\mu = 0{,}05h^{-1}$ lässt sich der Stoffffluss zum Ergosterol wie folgt berechnen:

$$rERG = c_{ERG} * \mu = 0{,}2 \frac{mg}{g_{Zelle} * h} \qquad [5.1]$$

Da die molare Masse des Ergosterol 396,65g/mol beträgt, ergibt sich dann eine molare Bildungsrate:

$$rERG = \frac{0{,}2\, mg/g_{Zelle} * h}{396{,}65\, mg/mmol} \approx 0{,}5 \frac{\mu mol}{g_{Zelle} * h} \qquad [5.2]$$

Im Falle der vergleichenden Stoffflussanalyse zwischen unterschiedlichen Kultivierungen ist aber eine Vernachlässigung dieses konstanten Sterolflusses möglich.

5.4.4 Einfluss der Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf die Ergosterolbiosynthese

Der bereits im Schüttelkolben nachgewiesene Einfluss einer Temperaturerhöhung von 10K auf die Ergosterolbiosynthese wurde nur in einer kontinuierlichen Kultur bestimmt. Hierfür wurde die Standardkultivierungstemperatur von 27°C auf 37°C umgestellt. Die Proben wurden nach der Temperaturerhöhung über einen Zeitraum von 8h Stunden genommen, um die Sterolstoffflüsse während der Anpassung der Zelle an die veränderte Umgebungsbedingung verfolgen zu können.

Die Daten aus drei Fermentationen wiesen die erwarteten Messwertschwankungen auf. Außerdem waren die induzierten Konzentrationsänderungen der intrazellulären Sterole sehr gering im Vergleich zu denen der Batch-Fermentationen ausgefallen. Die Bildung der einfachen Mittelwerte der Konzentrationen führte zu keinen aussagekräftigen Ergebnissen bei der Stoffflussberechnung mit COMPFlux©. Erst die mit Matlab® gefitteten Ergebnisdaten (Vgl. Kapitel 4.5.1) führten zur Berechnung von Stoffflüssen, die mit den Beobachtungen aus den Schüttelkolben übereinstimmten. Wie in Kapitel 5.4.1 beschrieben, waren erhöhte

Estermengen für Lanosterol und 4,4-Dimethylzymosterol gefunden worden. Die übrigen Ester waren in geringeren Mengen detektierbar. Um diesen Trend durch die Stoffflüsse aufzuzeigen, sind in der nachstehenden Tabelle die Esterbildung (positiven Stofffluss) grün und die Esterhydrolyse (negativer Stofffluss) rot gekennzeichnet.

Tab. 5.4: Stoffflüsse zum Lanosterol-, 4,4-Dimethylzymosterol- und Zymosterolester nach der Umstellung auf eine Kultivierungstemperatur auf 37°C. Esterbildung: grün, Esterhydrolyse: rot.

Zeit [h]	Esterstofffluss [µmol/g_{Zelle}*h]		
	Lanosterol	4,4-Dimethyl-zymosterol	Zymosterol
0,25	0,051	0,134	-0,095
0,75	0,038	0,068	0,026
1,25	0,026	0,020	0,197
1,75	0,023	0,000	0,308
2,25	0,048	0,046	0,183
2,75	0,024	-0,011	-0,161
3,25	0,003	-0,061	-0,434
3,75	0,041	0,011	-0,273
4,25	0,046	0,040	-0,173
4,75	0,041	0,056	-0,093
5,25	0,027	0,056	-0,061
5,75	0,005	0,040	-0,076
6,25	-0,018	0,025	-0,092

So ergibt sich aus den Daten der Tabelle 5.4, dass sowohl der Lanosterol- als auch der 4,4-Dimethylzymosterolester überwiegend gebildet wurden. Da die errechneten Stoffflüsse jedoch sehr gering ausfielen und sich änderten, sind diese Werte für die Ableitung kinetischer Parameter für die angestrebte Modellierung ungeeignet.
Eine stärker oder schwächer werdende Synthese war weder für den Lanosterol- noch für den 4,4-Dimethylzymosterolester erkennbar. Lediglich eine verstärkte Hydrolyse des Zymosterolesters ist zwischen 2,5h bis 4,5h nach der Umstellung ersichtlich (Tabelle 5.4).

Für die im Anschluss dreimal durchgeführten Kultivierungen mit abgesenkter Kultivierungstemperatur waren die induzierten Stoffflüsse auch zu gering und darüber hinaus schlecht reproduzierbar (nicht gezeigt). Ein weiterer Versuch, die Ergosterolbiosynthese in kontinuierlichen Prozess zu beeinflussen, wurde noch mit der Zugabe der Palmitoleinsäure unternommen. Auch hier wurden über einen Zeitraum von 8h Proben zur Bestimmung der Sterolkonzentrationen genommen. Die berechneten Stoffflüsse tendierten über weite Bereiche gegen Null. Lediglich eine niedrige Ergosterolbildung, wie sie auch im

Schüttelkolben gezeigt wurde, war erkennbar. Daher waren die generierten Daten für vergleichende Stoffflussanalysen nicht verwendbar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich während der kontinuierlichen Kultivierung signifikante Änderungen in der Ergosterolbiosynthese kaum erzielen ließen. Die als Antwort auf die veränderten Umgebungsbedingungen erzeugten Stoffflüsse waren zu gering.

5.5 Modellierung

5.5.1 Erstellung einer Modellstruktur

Auf der Grundlage der experimentellen Beobachtungen in den Batch-Fermentationen mit Switch von anaeroben zu aeroben Kultivierungsbedingungen sollte ein Modell entwickelt werden, das die Dynamik der Sterolsynthese abbilden kann. Das Aufstellen eines kinetischen Ansatzes, der die durch die Stoffflussanalyse ermittelten Bildungsraten mit hinreichender Genauigkeit wiedergibt, ermöglicht die Identifizierung entscheidender Einflussparameter. Durch das resultierende Modell können die bisher qualitativen Rückschlüsse quantitativ beschrieben werden.

Für die Modellentwicklung wurden die wesentlichen Resultate zusammengefasst. Folgende Aussagen lassen sich als abstrahiertes Ergebnis der experimentellen Untersuchungen nach der Umstellung von anaeroben zu aeroben Kultivierungsbedingungen festhalten:

1. Der in den Sterolsyntheseweg eingehende Stoffffluss ist variabel und hängt nicht allein von der angestauten Menge Squalen in den Zellen ab.

2. Die Stoffflüsse ausgehend vom Squalen bis zum freien Zymosterol sind in etwa gleich groß, da die Intermediate 4,4-Dimethylzymosterol und Lanosterol bei ausreichendem Sauerstoff in den Zellen kaum akkumuliert werden.

3. Die Stoffflüsse vom Zymosterol ausgehend bis zum freien Ergosterol sind in etwa gleich groß, da die Intermediate Fecosterol und Episterol nur in geringen Mengen in den Zellen akkumuliert werden.

4. Die Veresterung der Sterole ermöglicht der Zelle den Stoffffluss in Richtung Endprodukt zu regulieren.

5. Die Dynamik der Akkumulation des Zymosterolesters unterscheidet sich signifikant vom Verhalten der anderen Intermediate. Es gibt Anlass zu der Hypothese, dass dieses Intermediat an der Regulation der Sterolsynthese beteiligt ist.

6. Die Bildungsrate des Ergosterolesters ist niedrig und nimmt langsam über den Batch-Fermentationsverlauf hinweg ab.

7. Die Ergosterolveresterung ist von dem in den Stoffwechselweg eingehenden Stoffffluss unabhängig.

Im betrachteten Zeitraum, d.h. in den ersten 6h nach der Umstellung, war kein Biomassewachstum zu messen. Der Verdünnungseffekt durch Wachstum tritt daher nicht auf. Da die Entwicklung der Stoffflüsse innerhalb der ersten 6min nach dem Switch eine große Dynamik aufzeigte, die in unterschiedlichen Experimenten stark voneinander abweichte, wird dieser Zeitraum bei der Modellentwicklung nicht berücksichtigt.

Das in Abbildung 5.33 vorgestellte Schema zeigt eine Zusammenfassung der aufgestellten Hypothesen. Sie beschreiben die Beeinflussung der enzymatischen Umsetzungen im Post-Squalenbiosyntheseweg, hervorgerufen durch Änderungen von Metabolitkonzentrationen im Sterolstoffwechsel. Hierbei symbolisiert ein Plus eine auf die Umsetzung verstärkende Wirkung; ein Minus steht für eine Inhibierung der betreffenden Reaktion.

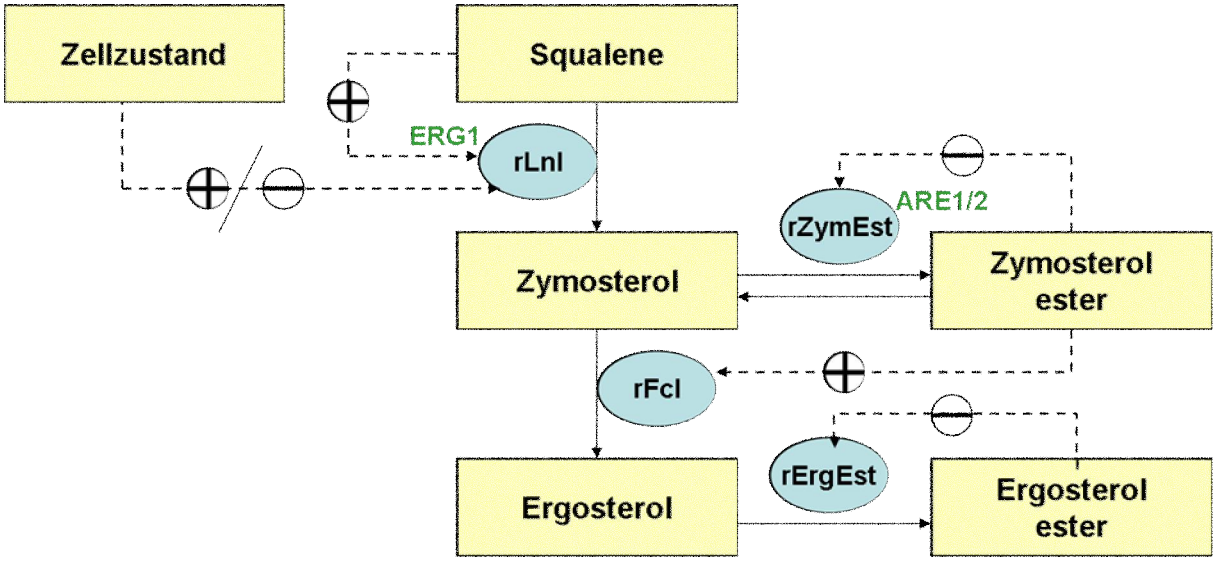


Abb. 5.33: Schematische Darstellung der aufgestellten Hypothesen zu Wechselwirkungen, wie sie nach dem Wechsel von anaeroben zu aeroben Kultivierungsbedingungen beobachtet wurden.

Für die Angabe kinetischer Konstanten sind volumenbezogene Größen gebräuchlich. Daher wurde das Zelltrockengewicht, auf das sich die Sterolmengen beziehen, in Volumen „Zellflüssigkeit“ umgerechnet (Vgl. Kapitel 4.6).

5.5.2 Ableitung der kinetischen Ansätze

Durch die Erstellung des in Abbildung 5.33 gezeigten Modells wurden die entscheidenden Wechselwirkungen im Ergosterolbiosyntheseweg identifiziert. Auf der Basis der in den Experimenten quantifizierten Metabolite und der in Abbildung 5.33 dargestellten Wechselwirkungen können Ableitungen mathematischer Ansätze erfolgen. Sie sollten die die

Dynamik nach dem Switch von anaeroben zu aeroben Kultivierungsbedingungen abbilden. Zu dem Zweck der Modellbildung lassen sich zunächst die folgenden grundlegenden Zusammenhänge mathematisch formulieren.

Da Lanosterol weder in freier noch in veresterter Form in signifikanten Mengen in den Zellen akkumuliert, kann die Bildung von 4,4-Dimethylzymosterol durch Gleichung 5.3 beschrieben werden.

$$rLNL = rDZYM \qquad [5.3]$$

Auch 4,4-Dimethylzymosterol bzw. die veresterte Form konnte in den Zellen nur in geringen Konzentrationen gemessen werden. Daher kann die Aussage getroffen werden, dass 4,4-Dimethylzymosterol weitestgehend sofort zum Zymosterol verstoffwechselt wird und Gleichung 5.4 gilt:

$$rDZYM = rZYM \qquad [5.4]$$

Zur Modellierung der Stoffflüsse der Ergosterolbiosynthese sind weiterhin die Bildungsraten der Intermediate Fecosterol und Episterol zu beschreiben.
Die Fecosterolbildungsrate ergibt sich aus der Differenz der Bildungsrate von Lanosterol und der Bildungsrate von Zymosterolester. Diese Annahme kann getroffen werden, da sich das Intermediat Zymosterol im Vergleich zu Zymosterolester und Lanosterol kaum anreichert. Zudem gelten die beiden oben getroffenen Annahmen, die in den Gleichungen 5.3 und 5.4 resultierten. Es ergibt sich also:

$$rFCL = rLNL - rZYMEST \qquad [5.5]$$

Da sich die Konzentration des Sterolintermediats Fecosterol ebenfalls kaum erhöht und auch eine Akkumulation von Fecosterolester nicht zu beobachten war, kann die Bildungsrate von Episterol der Bildungsrate von Fecosterol gleichgesetzt werden:

$$rEPL = rFCL = rERG \qquad [5.6]$$

Die Bildung von Lanosterol sowie die der Zymosterol- und Ergosterolester sollten nun durch kinetische Ansätze erfasst werden.

Zunächst wurde die Lanosterolbildungsrate untersucht, die den Gesamtstoffffluss in den Ergosterolbiosyntheseweg abbildet. Zu diesem Zweck wurde überprüft, ob die Bildungsrate eine alleinige Abhängigkeit von dem Edukt Squalen aufwies. Dafür wurden die Bildungsraten von Lanosterol für die durchgeführten Batch-Fermentationen mit Switch über den jeweiligen Squalenkonzentrationen aufgetragen. Die Lanosterolsyntheseraten variierten in den unterschiedlichen Experimenten jedoch stark, während die Squalenkonzentrationen vergleichbar waren. Besonders die Fermentation mit Ergosterolzugabe wies anfängliche Lanosterolbildungsraten auf, die im Vergleich zur Standardfermentation (ohne Sterolzugaben) mehr als 10fach erhöht waren (Vgl. Abbildung 5.34). Die Formulierung einer mathematischen Abhängigkeit, die die Lanosterolbildung gut beschreiben kann, konnte daher nicht allein auf der Basis der Substratkonzentration erfolgen.

Die Überprüfung der Lanosterolsynthese in Abhängigkeit von verschiedenen Sterolkonzentrationen, die möglicherweise als Inhibitor oder Aktivator der Synthese fungieren, führte zu einer Modellerweiterung. Da sich die Lanosterolbildung mit steigender Zymosterolesterkonzentration verlangsamt, wurden verschiedene kinetische Ansätze erstellt, die einen zusätzlichen Term enthielten, der Inhibitorwirkungen berücksichtigte. Es war jedoch nicht möglich, die unterschiedliche Größe der Stoffflüsse (Vgl. Abbildung 5.34) mit einer kinetischen Gleichung zu beschreiben.

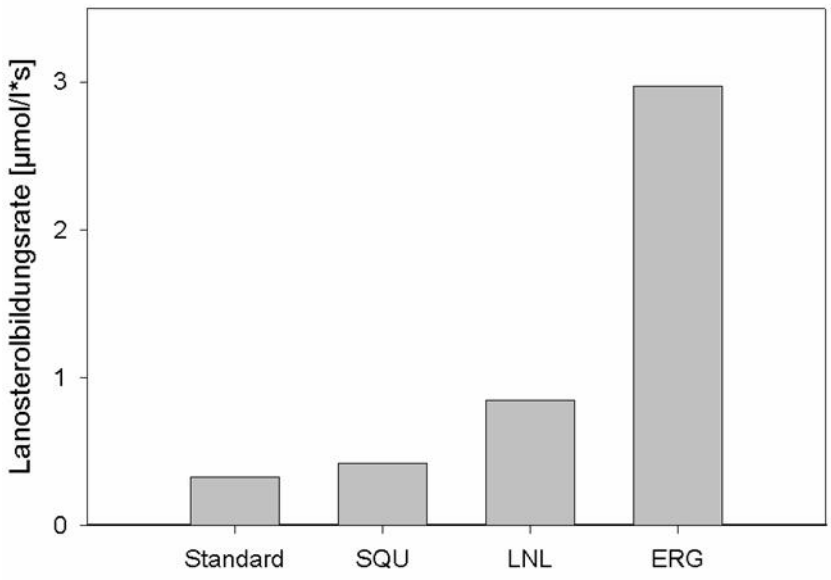


Abb. 5.34: Berechnete Lanosterolbildungsraten zum Zeitpunkt 10min nach dem Switch von anaeroben zu aeroben Kultivierungsbedingungen in Standardfermentationen (Standard) sowie in Fermentationen mit Squalenzugabe (SQU), mit Lanosterolzugabe (LNL) und Ergosterolzugabe (ERG).

Im Anschluss wurde der Einfluss weiterer Intermediatkonzentrationen auf die Lanosterolbildungsrate untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass insbesondere die Zugabe der Sterole Lanosterol sowie Ergosterol die Lanosterolsynthese stark stimulierte. Eine Zugabe einer gleichen Menge an Squalen wirkte sich hingegen kaum auf den initialen Stoffffluss zum Lanosterol aus. Dieser Effekt ist in Abbildung 5.34 veranschaulicht.
Auch wurde überprüft, ob die Zunahmen in Abbildung 5.34 möglicherweise durch einen veränderten Gesamtsterolgehalt in der Zelle zu begründen war. Aber auch dieser Ansatz konnte den erhöhten Fluss in den Ergosterolsyntheseweg nicht erklären. Bei weiterer Analyse der Daten fiel auf, dass sich durch die Aufnahme der Sterole aus dem Kulturmedium das Verhältnis von freien zu veresterten Sterolen in der Zelle verändert hatte. Die Quantifizierung ergab, dass bei der Ergosterolzugabe die Verschiebung dieses Verhältnisses besonders ausgeprägt war. Während bis zum Zeitpunkt des Umschaltens auf anaerobe Bedingungen bei der Standardfermentation ca. 60% der Sterole in der Zelle frei vorlagen, betrug der Anteil der freien Sterole bei der Kultivierung mit Lanosterolzugabe mehr als 66%. Die Ergosterolzugabe bewirkte, dass über 70% der Sterole in der Zelle nicht verestert waren. Zum Vergleich sind in Tabelle 5.5 die Verhältnisse von freien zu veresterten Sterolen gegenübergestellt.

Tab. 5.5: Veränderung der Verhältnisse von freien zu veresterten Sterolen

Kultivierungen mit Switch	Standard	mit Zugabe von Squalen	Lanosterol	Ergosterol
Verhältnis von freien zu veresterten Sterole	1,71	1,68	1,97	2,75

Nun wurde versucht, einen kinetischen Ansatz zu formulieren, der für alle Kultivierungsexperimente Gültigkeit besitzt und die Abhängigkeit der Lanosterolbildung von der Substratkonzentration Squalen, der Inhibitorkonzentration Zymosterolester sowie vom Veresterungsverhältnis einschließt. Aus der zunächst durchgeführten Anpassung für die Standardkultivierung ergab sich, dass sich die Synthese am besten durch einen Ansatz erfassen lässt, der oft für Produkt- und Wachstumsinhibierungen verwendet wird. Hierbei geht in Anlehnung an die Michaelis-Menten-Kinetik ein Inhibitor als zusätzlicher Term in die Gleichung einer Reaktionsgeschwindigkeit ein [Dunn et al., 2003] (siehe Gleichung 5.7).

$$r_S = \frac{r_{S,\max} \bullet C_S}{K_{C_S} + C_S + \frac{C_I^{\,x}}{K_{C_I}^{\,x-1}}} \qquad [5.7]$$

mit

r_S	Reaktionsgeschwindigkeit (Bildungsrate)	[µmol/ls]
$r_{S,\max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit	[1/s]
C_S	Substratkonzentration	[µmol/l]
K_{C_S}	Sättigungskonstante des Substrats	[µmol/l]
C_I	Inhibitorkonzentration	[µmol/l]
K_{C_I}	Inhibitorische Konstante	[µmol/l]
x	Exponent	[-]

Um den Einfluss des Verhältnisses von freien und veresterten Sterolen in den Zellen zu berücksichtigen, wurde ein zusätzlicher Term eingeführt. Hierbei wird die Konzentration von freien und veresterten Sterolen einer Kultivierung auf das Veresterungsverhältnis der Standardfermentation zum Zeitpunkt des Switches von anaeroben zu aeroben Bedingungen bezogen. Dabei basiert der Ansatz auf dem Gedanken, dass die Verschiebung dieser Konzentrationsverhältnisse den Zustand der Zelle vor dem Switch – auch hinsichtlich des Transkriptoms und Proteoms - verändert. Die Verschiebung wirkt sich über den gesamten Betrachtungszeitraum aus.

Aus den Überlegungen und durchgeführten Berechnungen erwies sich der in Gleichung 5.8 dargestellte Ansatz als geeignet, die Lanosterolbildung in der Hefe für alle in den Kapiteln 5.2 und 5.3 beschriebenen Experimente abzubilden:

Durch eine nicht-lineare Regression wurden mit der Software Matlab® die kinetischen Konstanten für die Reaktion zum Lanosterol bestimmt (vgl. Kap. 4.7). Für die Anpassung der Parameter wurden die Konzentrations- und Stoffflussdaten aus allen Fermentationen mit Switch zur Optimierung genutzt. Für die in Tabelle 5.6. dargestellten Werte ergab sich insgesamt die geringste Abweichung der berechneten Lanosterolbildungsrate (rLNL) im Vergleich zur aus den Stoffflussanalysen ermittelten Bildungsrate.

$$rLNL = \frac{r_{\max,LNL} \bullet C_{S,Squ}}{K_{C_{S,Sq}} + C_{S,Squ} + \frac{C_{I,ZymE}{}^{X}}{K_{I1,ZymE}{}^{X-1}}} \bullet \left(\frac{\left(\frac{\sum C_{St_j,frei}}{\sum C_{St_j,est}} \right)}{\left(\frac{\sum C_{St_{Std},frei}}{\sum C_{St_{Std},est}} \right)} \right)^{K} \qquad [5.8]$$

mit

	$rLNL$	Reaktionsgeschwindigkeit (Bildungsrate) [µmol/ls]
	$r_{\max,LNL}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit [µmol/ls]
	$C_{S,Squ}$	Squalen- bzw. Substratkonzentration [µmol/l]
	$K_{C_S,Squ}$	Sättigungskonstante des Substrats Squalen [µmol/l]
	$C_{I,ZymE}$	Zymosterolester- bzw. Inhibitorkonzentration [µmol/l]
	$K_{I1_i,ZymE}$	Inhibitorische Konstante [µmol/l]
	$C_{St,frei}$	Konzentration des freien Sterols einer i-ten Kultivierung [µmol/l]
	$C_{St,est}$	Konzentration des veresterten Sterols einer i-ten Kultivierung [µmol/l]
	$C_{St_{Std},frei}$	Konzentration des freien Sterols der Standardkultivierung [µmol/l]
	$C_{St_{Std},est}$	Konzentration des veresterten Sterols der Standardkultivierung [µmol/l]
	X, K	Exponenten [-]
	j	Index: Kultivierung (Std = Standardkultivierung) [-]

Tab. 5.6: Kinetische Parameter zur Berechnung der Lanosterolbildungsrate im Ergosterolbiosyntheseweg bei Batch-Fermentationen mit Switch von anaerober zu aerober Kultivierung und Zugabe von Sterolen.

Kinetische Parameter [Einheit]	$r_{max,LNL}$ [1/s]	$K_{C_S,Squ}$ [µM]	$K_{I1,ZymE}$ [µM]	X [-]	K [-]
Werte der Konstanten	0,35	7,94	465	3	5

Mit Gleichung 5.4 war es möglich, die um Faktor 10 voneinander abweichenden Lanosterolbildungsraten zu Beginn der aeroben Kultivierungsphase abzubilden. Die Qualität mit der die Lanosterolbildung modelliert werden kann, variiert für die unterschiedlichen Kultivierungen. In Abbildung 5.35 ist zunächst die durch COMPFlux© berechnete sowie durch das Modell erzeugte Bildungsrate zum Lanosterol in den Standardfermentationen mit Switch ohne Sterolzugabe in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration Zymosterolester dargestellt.

Da $K_{Cs,Squ}$ << $c_{S,Squ}$ gilt, hängt der Verlauf in dem gezeigten Bereich vorwiegend von der Zymosterolesterkonzentration ab und nicht von der Squalenkonzentration. Auf die Darstellung der Abhängigkeit der Lanosterolbildungsrate von der Squalenkonzentration wird daher verzichtet.

Das Modell scheint bei erster Betrachtung die Bildung des Lanosterols in den Zellen während der Standardfermentationen im Bereich mittlerer Zymosterolesterkonzentrationen nicht sehr genau wiederzuspiegeln. Werden jedoch auch die Bildungsraten in den Fermentationen mit Lanosterol- und Ergosterolzugabe ausgewertet (Abbildung 5.36 und 5.37), zeigt sich insgesamt eine befriedigende Übereinstimmung.

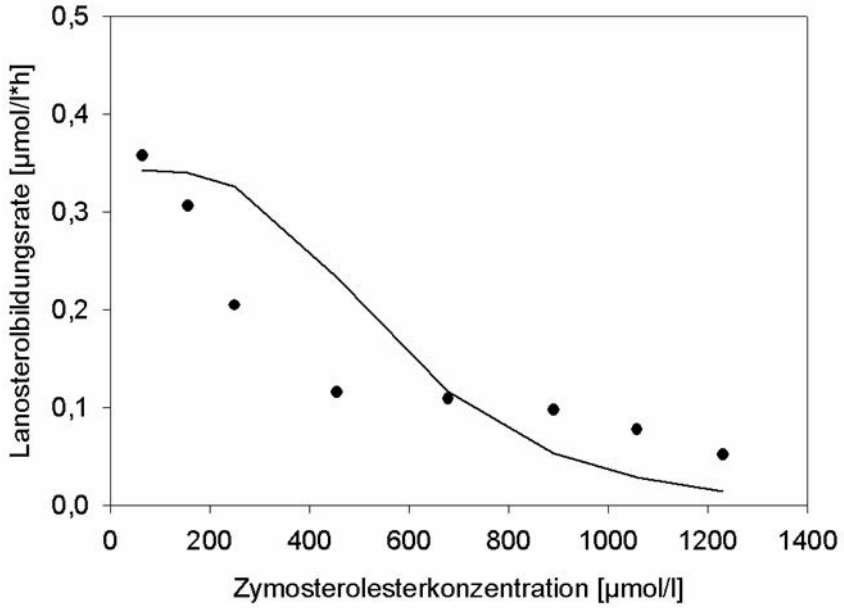


Abb. 5.35: Modellierung der Bildung von Lanosterol in Fermentationen mit Switch von anaeroben zu aeroben Kultivierungsbedingungen gemäß Gleichung 5.8 ● mit COMPFlux© berechnete Stoffflüsse, —— mit Modell bestimmte Bildungsrate. Die mittlere Standardabweichung zwischen den Bildungsraten beträgt 0,038µmol/l*h.

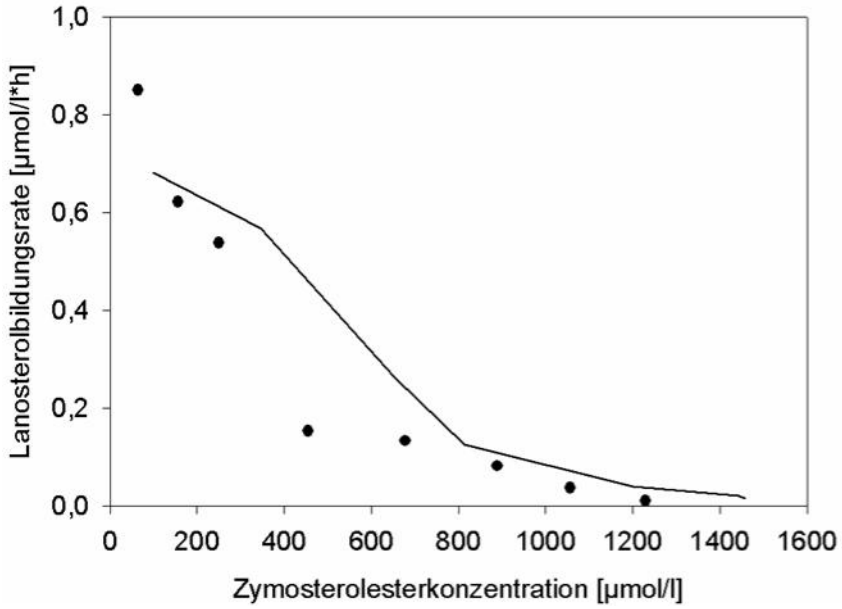


Abb. 5.36: Modellierung der Bildung von Lanosterol in Fermentationen mit Switch von anaeroben zu aeroben Kultivierungsbedingungen und Lanosterolzugabe. ● mit COMPFlux© berechnete Stoffflüsse, —— mit Modell bestimmte Bildungsrate. Die mittlere Standardabweichung zwischen den Bildungsraten beträgt 0,063µmol/l*h.

Am genausten konnte die Bildung des Lanosterols während der Kultivierung mit Ergosterolzusatz durch das Modell erfasst werden. Die extrem niedrige Lanosterolbildung wie in Abbildung 5.37 gezeigt, wurde detektiert, als der Inhibitor Zymosterolester eine maximale Konzentration von 6mg/g_{Zelle} erreichte. Dies bestätigt die Annahme einer inhibitorischen Wechselwirkung von Zymosterolester auf den Stofffluss in den Ergosterolbiosyntheseweg.

.

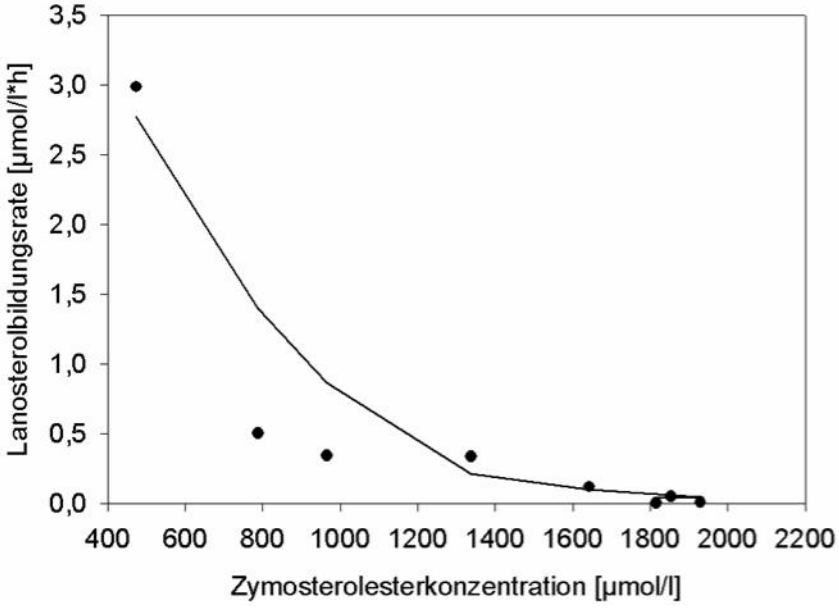


Abb. 5.37: Modellierung der Bildung von Lanosterol in Fermentationen mit Switch von anaeroben zu aeroben Kultivierungsbedingungen und Ergosterolzugabe. ● mit COMPFlux© berechnete Stoffflüsse, ——mit Modell bestimmte Bildungsrate. Die mittlere Standardabweichung zwischen den Bildungsraten beträgt 0,164µmol/l*h.

Nächster Schritt bei der Modellerstellung war die Formulierung eines mathematischen Ansatzes zur Beschreibung der Zymosterolesterbildung. Hierbei war zu beachten, dass nicht nur das in messbaren Konzentrationen vorliegende Zymosterol als Substratpool für diese Reaktion dient, sondern der Stoffffluss zum Zymosterol, r_{Zym} die verfügbare Menge an Zymosterol mitbestimmt. Die gemessene Konzentration ist damit zu niedrig. Wahrscheinlich auf Grund einer sofort eintretenden Weiterreaktion zum Zymosterolester kann die tatsächliche Menge an zur Veresterung vorliegendem Zymosterol nicht genau bestimmt werden. Im kinetischen Ansatz wird also sowohl das Substrat Zymosterol als auch der Stoffffluss zum Zymosterol berücksichtigt. Das bedeutet aber, dass Fehler in der Modellierung des eingehenden Lanosterolstoffflusses sich auch auf die Modellierungen aller weiteren Bildungsraten auswirken.

Um eine Gleichung für die Zymosterolesterbildung aufzustellen, wurde nach relevanten Einflussgrößen gesucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Reaktion zum Zymosterolester einer Produktinhibierung zu unterliegen scheint. Als am besten geeignet für die Modellierung dieser Esterbildung erwies sich der folgende Ansatz:

$$rZYMEST = \frac{r_{\max,Zymest} \bullet C_{S,Zym} \bullet \left(\frac{r_{Zym}}{r_{\max,Zym}} \right)^2}{K'_{C_{S,Zym}} \bullet \left(1 + \frac{C_{I,ZymE}}{K_{I2,ZymE}} \right) + C_{S,Zym} \bullet \left(\frac{r_{Zym}}{r_{\max,Zym}} \right)^2} \qquad [5.9]$$

Dabei gilt:

$$K'_{C_{S,Zym}} = \frac{K_{C_{S,Zym}}}{r^2_{\max,Zym}} \qquad [5.10]$$

mit

$rZYMEST$	Reaktionsgeschwindigkeit (Bildungsrate) [µmol/ls]
r_{ZYM}	Zymosterolbildungsrate [µmol/ls]
$r_{\max,Zymest}$	maximale Zymosterolesterbildungsrate [µmol/ls]
$r_{\max,Zym}$	maximale Zymosterolbildungsrate (Substratstoffffluss) [µmol/ls]
$C_{S,Zym}$	Zymosterol- bzw. Substratkonzentration [µmol/l]
$K_{C_S,Zym}$	Sättigungskonstante des Substrats Zymosterol [µmol/l]
$C_{I,ZymE}$	Zymosterolester- bzw. Inhibitorkonzentration [µmol/l]
$K_{I2_I,ZymE}$	Inhibitorische Konstante [µmol/l]
$K'_{C_S,Zym}$	Konstante [-]

Mit diesem Ansatz konnte die Bildung des Zymosterolesterpools für die unterschiedlichen Fermentationen gut abgebildet werden, wenn für den eingehenden Zymosterolstoffffluss die durch COMPFlux© berechneten Werte verwendet wurden. Werden die aus der vorhergehenden Modellierung des Lanosterolstofflusses errechneten Werte verwendet, ergibt sich durch Fehlerfortpflanzung eine höhere Abweichung.

Tab. 5.7: Kinetische Parameter zur Berechnung der Zymosterolesterbildungsrate im Ergosterol-biosyntheseweg bei Batch-Fermentationen mit Switch von anaerober zu aerober Kultivierung und Zugabe von Sterolen.

Kinetische Parameter [Einheit]	$r_{max,Zymest}$ [1/s]	$K_{C_S,Zym}$ [mM]	$K_{I2,ZymE}$ [mM]
Werte der Konstanten	2,26	175	537,8

Zur Veranschaulichung der Güte der Modellierung sind daher sowohl Ergebnisse unter Einbezug der berechneten als auch der vorher modellierten Zymosterolstoffflüsse dargestellt.

In den folgenden Abbildungen 5.38 bis 5.40 sind die Modellierungen der Zymosterolesterbildung für die verschiedenen Experimente gezeigt.

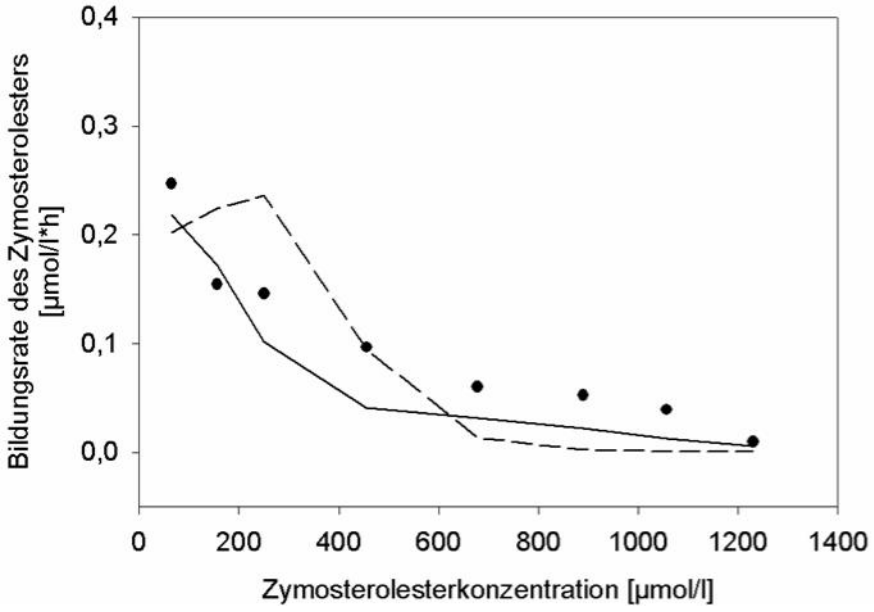


Abb. 5.38: Modellierung der Bildung des Zymosterolesters in Fermentationen mit Switch von anaeroben zu aeroben Kultivierungsbedingungen ohne Zusätze. ● mit COMPFlux© berechnete Stoffflüsse, ─ mit Modell bestimmte Bildungsrate unter Verwendung des mit COMPFlux© berechneten Substratflusses rZYM (mittlere Standardabweichung von berechneten Werten beträgt 0,021µmol/l*h), - - - mit Modell bestimmte Bildungsrate unter Verwendung des modellierten Substratflusses rZYM (mittlere Standardabweichung von berechneten Werten beträgt 0,031µmol/l*h).

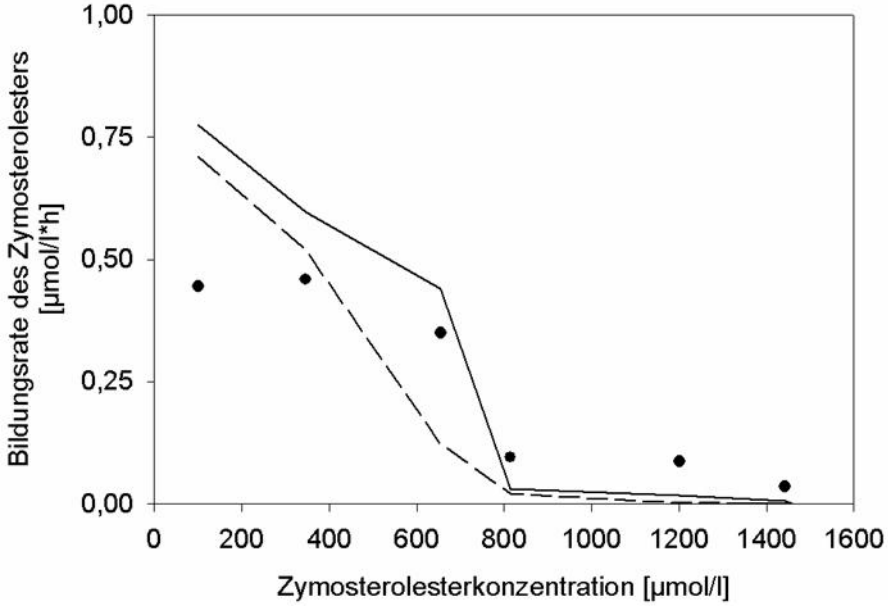


Abb. 5.39: Modellierung der Bildung des Zymosterolesters in den Fermentationen mit Switch von anaeroben zu aeroben Kultivierungsbedingungen und Lanosterolzugabe. ● mit COMPFlux© berechnete Stoffflüsse, ▬ mit Modell bestimmte Bildungsrate unter Verwendung des mit COMPFlux© berechneten Substratflusses rZYM (mittlere Standardabweichung von berechneten Werten beträgt 0,065µmol/l*h), - - - mit Modell bestimmte Bildungsrate unter Verwendung des modellierten Substratflusses rZYM (mittlere Standardabweichung von berechneten Werten beträgt 0,073µmol/l*h).

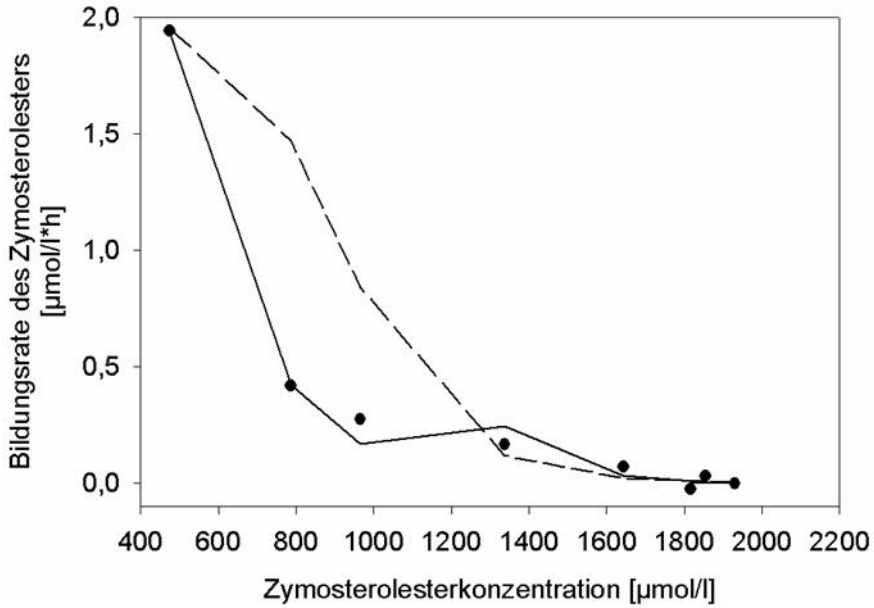


Abb. 5.40: Modellierung der Bildung des Zymosterolesters in den Fermentationen mit Switch von anaeroben zu aeroben Kultivierungsbedingungen und Ergosterolzugabe. ● mit COMPFlux© berechnete Stoffflüsse, ▬ mit Modell bestimmte Bildungsrate unter Verwendung des mit COMPFlux© berechneten Substratflusses rZYM (mittlere Standardabweichung von berechneten Werten beträgt 0,024µmol/l*h), - - - mit Modell bestimmte Bildungsrate unter Verwendung des modellierten Substratflusses rZYM (mittlere Standardabweichung von berechneten Werten beträgt 0,157µmol/l*h).

Für die in Abbildung 5.39 gezeigte Modellierung der Zymosterolesterbildung fällt die Standardabweichung der berechneten von den modellierten Werten im Vergleich zu den anderen beiden Versuchsreihen am höchsten aus. Die Abweichung der unter Einbezug des Modells zur Lanosterolbildung berechneten Zymosterolesterbildungsrate ist bei für den jeweiligen Versuch niedrigen Produktkonzentrationen am größten. Die inhibitorische Wirkung des Zymosterolesters auf die Bildungsraten wird in beiden Modellen eher unterschätzt als überschätzt. Bei höheren Zymosterolesterkonzentrationen wiederum sind die Schätzung aus dem Modell etwas zu niedrig.

Als letzte Gleichung verbleibt die Modellierung der Ergosterolesterbildung. Auch für diese Esterbildung wurde versucht, Abhängigkeiten zu intrazellulären Sterolkonzentrationen zu finden. Es wurde festgestellt, dass diese Esterbildung einer Produktinhibierung zu unterliegen scheint. Dies resultierte in der Formulierung von Gleichung 5.11. Dieser Ansatz kann die Ergosterolesterbildung bei den Fermentationen mit Switch mit und ohne Zusätze beschreiben:

$$rERGEST = \frac{r_{\max,Ergest} \bullet C_{S,Erg}}{K_{C_S,Erg} + C_{S,Erg} + \frac{C_{I,Ergest}^{\ 2}}{K_{I,Ergest}}} \qquad [5.11]$$

mit

$rERGEST$	Reaktionsgeschwindigkeit (Bildungsrate) [µmol/ls]
$r_{\max,Ergest}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit [µmol/ls]
$C_{S,Erg}$	Ergosterol- bzw. Substratkonzentration [µmol/l]
$K_{C_S,Erg}$	Sättigungskonstante des Substrats Ergosterol [µmol/l]
$C_{I,Ergest}$	Ergosterolester- bzw. Inhibitorkonzentration [µmol/l]
$K_{I,Ergest}$	Inhibitorische Konstante [µmol/l]

Als Edukt in Gleichung 5.11 dient nur Ergosterol. Dabei war zu beachten, dass prinzipiell ein Teil des Ergosterols in den Zellen unverestert als Membranbestandteil vorliegt. Dieser Teil des freien Ergosterols steht der Veresterungsreaktion nicht als Substrat zur Verfügung.
Aus Versuchen ging hervor, dass ca. 0,45 mg/g_{Zelle} des Ergosterols in der Hefe als gebunden und nicht veresterbar vorzufinden ist. Um die jeweilige Substratkonzentration für die Modellierung der Ergosterolesterbildung zu erhalten, wurde daher dieser Anteil von der detektierten, freien Ergosterolkonzentration subtrahiert. Aus der anschließenden Parameterbestimmung durch nicht-lineare Regression unter Einbeziehung der Daten aller Fermentationstypen ergaben sich folgende Konstanten:

Tab. 5.8: Kinetische Parameter zur Berechnung der Ergosterolesterbildungsrate im Ergosterolbiosyntheseweg bei Batch-Fermentation mit Switch von anaerober zu aerober Kultivierung und Zugabe von Sterolen.

Kinetische Parameter [Einheit]	$r_{S,max}$ [1/s]	$K_{C_S,Erg}$ [µM]	$K_{I,Ergest}$ [µM]
Werte der Konstanten	0,21	675	24,9

Für die Erstellung des kinetischen Ansatzes zur Beschreibung der Ergosterolesterbildung wurden die Bildungsraten zunächst direkt aus den Ergosterolesterkonzentrationen zwischen zwei Zeitpunkten berechnet.

Da die Ergosterolesterkonzentrationen zu Beginn der aeroben Phase bei der Standardkultivierung Schwankungen aufwiesen (Vgl. Abbildung 5.16), wurde der Konzentrationsverlauf zunächst durch einen Kurvenfit geglättet, um eine Anpassung zu ermöglichen. In der nachstehenden Grafik sind die daraus berechneten Bildungsraten des Ergosterolesters gezeigt.

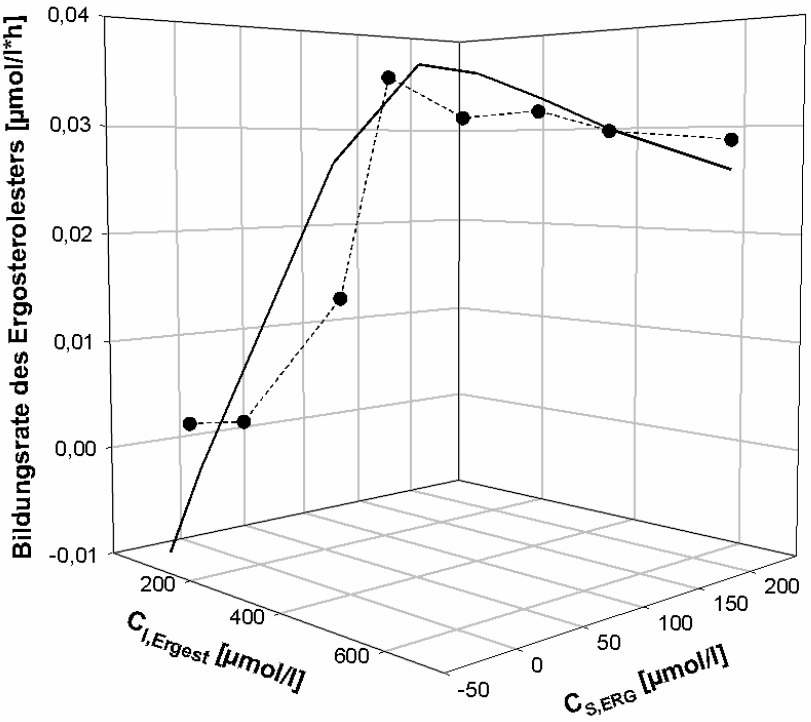


Abb. 5.41: Modellierung der Bildung des Ergosterolesters in Fermentationen mit Switch von anaeroben zu aeroben Kultivierungsbedingungen ohne Zusätze. ● berechnete Stoffflüsse aus Messwerten, ▬ mit Modell bestimmte Bildungsrate (mittlere Standardabweichung beträgt 0,011µmol/l*h).

Im Unterschied zu der Zymosterolesterbildung nimmt die Bildungsrate beim Ergosterolester anfänglich zu. Der gewählte Modellansatz kann diese Zunahme gut beschreiben. Die in Abbildung 5.41 dargestellte Bildungsrate bei einer Ergosterolesterkonzentration von 180 µmol/l wird als Ausreißer betrachtet.
Auch für die Kultivierungen mit Lanosterolzugabe war es mit dem erstellten Modellansatz (Gleichung 5.11) möglich, die anfänglich ansteigende Bildung des Ergosterolesters abzubilden.

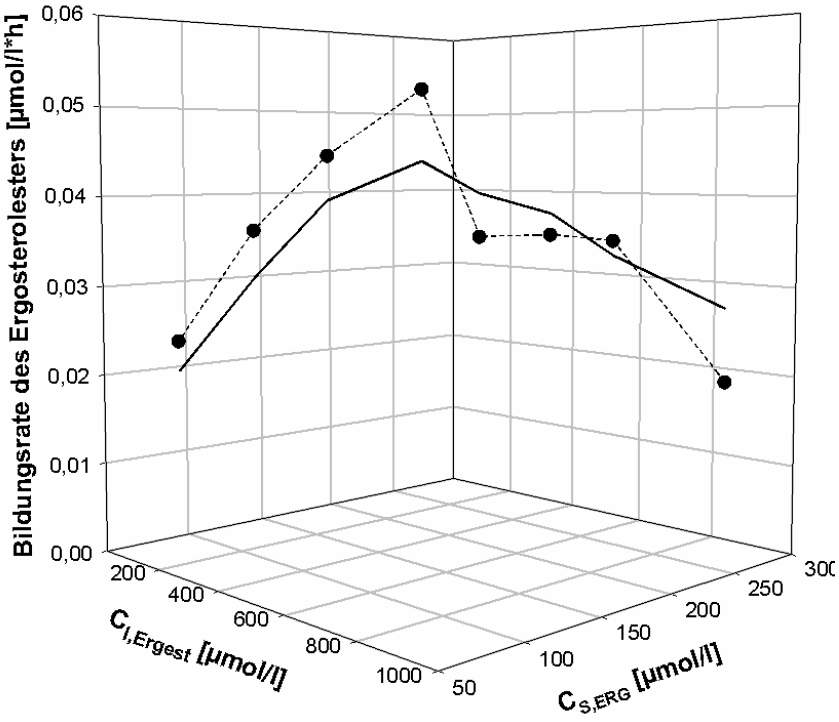


Abb. 5.42: Modellierung der Bildung des Ergosterolesters in Fermentationen mit Switch von anaeroben zu aeroben Kultivierungsbedingungen und Lanosterolzugabe. ● berechnete Stoffflüsse aus Konzentrationen, ▬ mit Modell bestimmte Bildungsrate (mittlere Standardabweichung der Bildungsraten beträgt 0,0036µmol/l*h).

Die Überlegung, dass nicht das gesamte freie Ergosterol in den Zellen als Substrat für die Veresterung genutzt werden kann, war auch für die Modellierung der Ergosterolesterbildung bei der Kultivierung mit Ergosterolzugabe entscheidend. So wurde während der anaeroben Kultivierungsphase zwar exogenes Ergosterol aufgenommen, gerade aber nach Umschalten auf aerobe Bedingungen war eine besonders starke Aufnahme des Ergosterols zu verzeichnen. In den nachfolgenden Stunden wurden große Mengen von ca. 2,3- 3 mg/g_{Zelle} des freien Ergosterols in den Zellen festgestellt, die nicht verestert wurden. Daher wurde auch hier die Annahme getroffen, dass ein Großteil dieses Sterols nicht als Substrat der Veresterung dient. Evtl. war das Ergosterol den Enzymen Are1 und Are2 durch seine Lokalisierung in den Zellen oder durch eine Clusterbildung nicht zugänglich gewesen. Um den Sterolanteil abzuschätzen, der der Veresterung als Substrat dient, wurde sich an den

Mengen des freien Ergosterols orientiert, die bei den anderen Kultivierungen für diese Reaktion genutzt wurden. Dabei ergab sich, dass neben den 0,45mg/g_{Zelle} Ergosterol in den Membranen das grundsätzlich nicht verestert wird, zusätzlich ca. 1,25 mg/g_{Zelle} des freien Ergosterols in den Zellen unverestert blieb. Deshalb diente eine um 1,7mg/g_{Zelle} erniedrigte intrazelluläre Ergosterolmenge als Substratkonzentration in der Gleichung 5.11 für die Modellierung der Esterbildung.

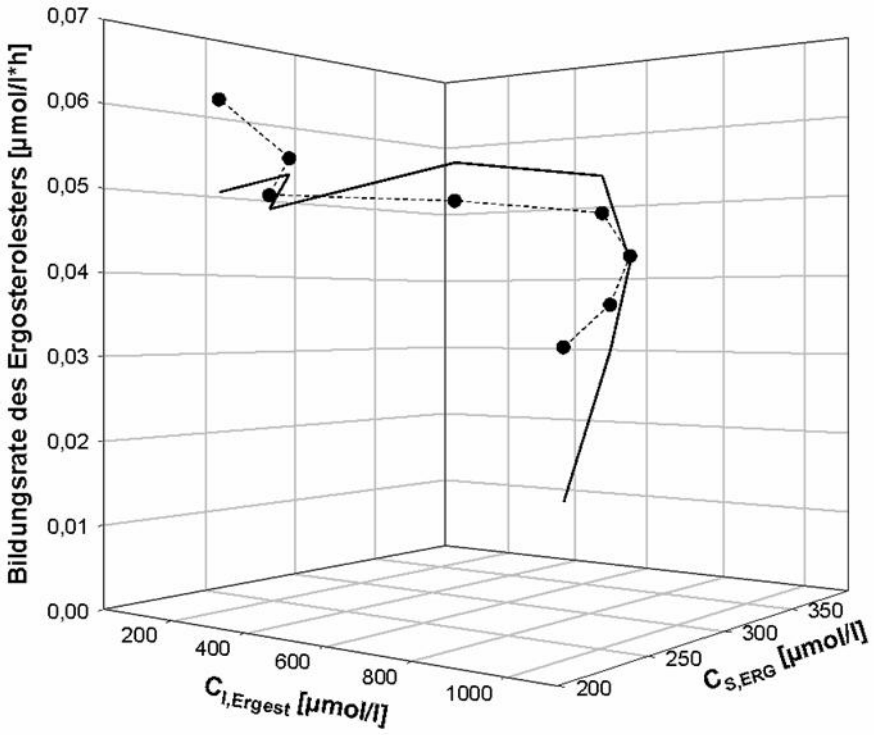


Abb. 5.43: Modellierung der Bildung des Ergosterolesters in den Fermentationen mit Switch von anaeroben zu aeroben Kultivierungsbedingungen und Ergosterolzugabe. ● berechnete Stoffflüsse aus Konzentrationen, ▬ mit Modell bestimmte Bildungsrate (mittlere Standardabweichung der Bildungsraten beträgt 0,004µmol/l*h).

Die Esterbildung des Ergosterols erfolgte bei dieser Kultivierung bereits ab Beginn des modellierten Zeitraumes auf einem erhöhten Niveau und steigerte sich nicht erst im Verlauf der aeroben Wachstumsphase. Diese Beobachtung wird von dem kinetischen Ansatz beschrieben. Auch lässt sich mit der getroffenen Annahme, dass nicht das gesamte freie Ergosterol für die Veresterungsreaktion verfügbar ist, die Bildung dieses Esters in guter Näherung beschreiben.

5.6 Übertragung der Untersuchungsmethode auf die Cholesterolbiosynthese in humanen Fibroblasten

5.6.1 Entwicklung eines Standardprotokolls

In den nun beschriebenen Arbeiten wurde überprüft, ob sich eine Stoffflussanalyse zur vergleichenden Untersuchung der Sterolbiosynthese an menschlichen Zellen durchführen lässt. Die Versuche sollten mit menschlichen Hautzellen (Fibroblasten) durchgeführt werden, da diese Zellen Cholesterol synthetisieren und es bereits Erfahrungen am Fachgebiet mit der Kultivierung dieser adhärent wachsenden Zellen gab. Um die intrazellulären Sterole gut quantifizieren zu können, war es entscheidend, ausreichend Zellmaterial für die Untersuchungsreihen bereitstellen zu können. Die Zellen mussten demnach ein gutes und reproduzierbares Wachstum aufweisen können. Für die Kultivierung wurden zunächst verschiedene Zelltypen in unterschiedlichen Kulturmedien getestet (siehe Kapitel 4.1).

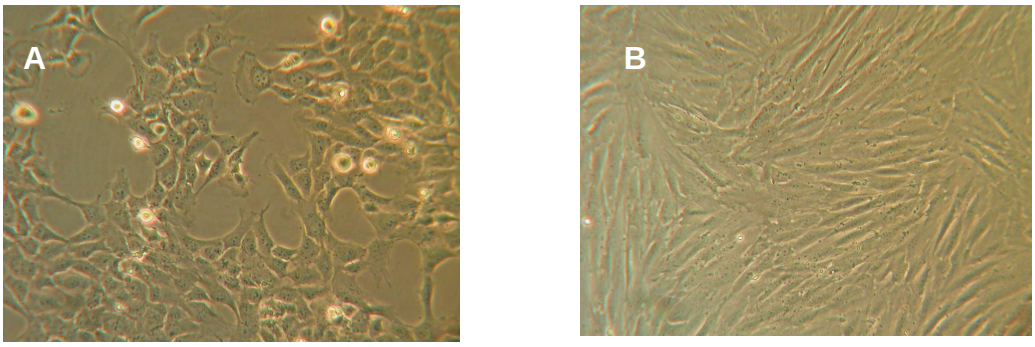


Abb. 5.44: Mikroskopische Aufnahme der Fibroblastenzellen. A: GM637-Zellen B: HFF-Zellen.

Die GM637-Zellen wiesen ein geringes Wachstum und ein lange lag-Phase auf. Auch war die Bildung von Zellhaufen durch vertikales Wachstum der Zellen zu beobachten (Vgl. Abbildung 5.44, hell vortretende Zellen). Deshalb wurden primäre Zellen aus der der Vorhaut eines Säuglings (HFF, *Human Foreskin Fibroblasts*) für die Durchführung der Experimente kultiviert. Bei den HFF-Zellen war eine typische Kontaktinhibierung des Wachstums bei hohen Zellzahlen in den Zellkulturflaschen zu verzeichnen. Durch die Optimierung der Kulturmedien konnte schließlich erreicht werden, dass mit der Anzucht der permanenten Zelllinie höhere Ausbeuten erzielt wurden als bei den primären HFF-Zellen. Hierfür erwies sich die Verwendung des sog. DMEM-Mediums mit entsprechenden Zusätzen (Vgl. Kapitel 4.3.1) und einem 15%igen Gehalt an fötalen Rinderserum am geeignetsten. Die Verwendung der permanenten Zellen hatte den Vorteil, dass sich der Zustand der Zellen zwischen den einzelnen Passagen nicht ändert, wie das beispielsweise für primäre Zellen typisch ist (Zellalterung). Außerdem handelt es sich bei der Zelllinie GM637 um eine sehr gut charakterisierte Zelllinie, die in der Literatur hinlänglich beschrieben ist. Eine Wachstumsbegrenzung bei Kontaktinhibierung tritt nicht auf. Die Zellhaufenbildung konnte

durch vorsichtiges Homogenisieren der Aussaatzellen in Kulturmedium und die Auswahl geeigneter Passagierzeitpunkte weitgehend unterbunden werden. Durch das Festlegen der Aussaatzellenanzahl von 3Millionen pro 150cm^2-Zellkulturflaschen und der Kultivierungszeit von 96h konnten zu den Versuchs- und Probenahmezeitpunkten definierte Zellzahlen sowie vergleichbare Ausgangszustände der Zellen erreicht werden.

Für die Gewinnung der Sterole aus den geernteten Zellen und die gaschromatografische Bestimmung wurde das Protokoll für die Sterolaufarbeitung- und -analyse für Hefezellen als Grundlage verwendet (Vgl. Kapitel 4.4). Die durch die GC-Analyse erhaltenen Konzentrationen der Sterole und des Squalens wurden jeweils auf 1Million Zellen bezogen.

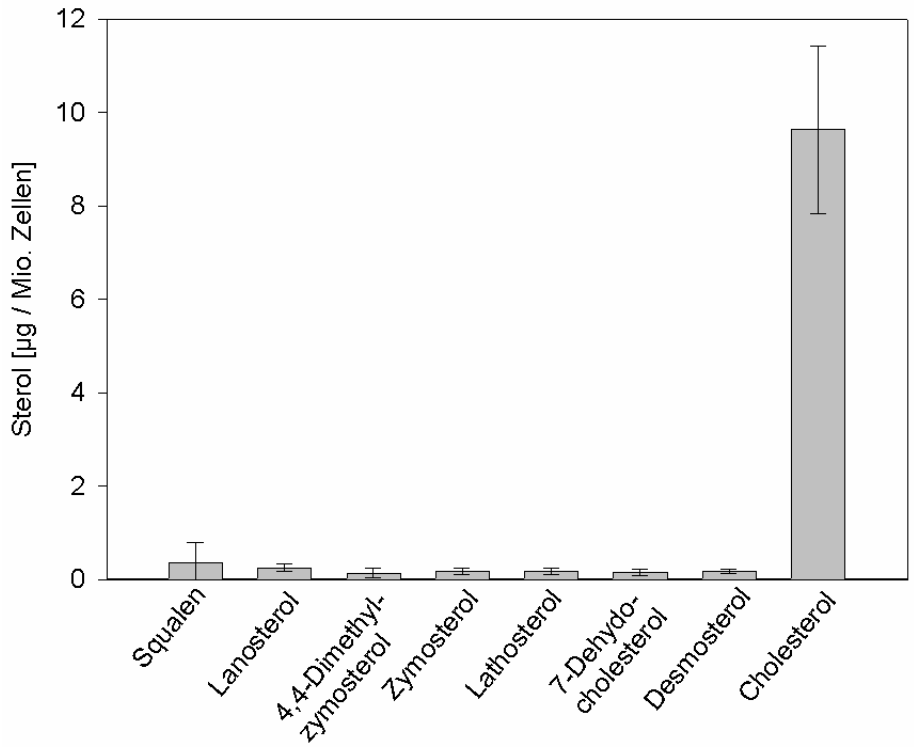


Abb. 5.45: Intrazelluläre Squalen- und freie Sterolkonzentrationen mit Standardabweichung der GM637-Zellen nach 96h Kultivierung. Entspricht der Nullprobe vor Durchführung der dynamischen Experimente.

Es stellte sich heraus, dass für jede einzelne Aufarbeitung (mit und ohne Verseifung) mindestens 10Millionen Zellen benötigt wurden, um auch die Konzentrationen der Sterolintermediate in der GC-Chromatogrammen ermitteln zu können. Daher wurden die Zellen in mehreren Zellkulturflaschen mit einer Fläche von je 150cm^2 herangezogen, um genügend Zellmaterial zu erhalten. Durch GC-MS Messungen und die Verwendung kommerzieller Sterolstandards gelang die Zuordnung von Squalen, Lanosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, Zymosterol, 7-Dehydrocholesterol, Lathosterol, Desmosterol und Cholesterol.

Ein grundlegender Unterschied im Vergleich zur Analytik der Sterole in Hefe war, dass die Sterolintermediate der Cholesterolbiosynthese in weitaus geringeren Konzentrationen in den menschlichen Zellen zu detektieren sind als die Intermediate der Ergosterolbiosynthese in Hefe. Die Standardabweichungen in Abbildung 5.45 verdeutlichen, dass sich durch die geringen Konzentrationen nahe dem Detektionslimit ein signifikanter Fehler bei der Bestimmung der Intermediate einstellen kann. Besonders ausgeprägt waren die Standardabweichungen für das Squalen mit bis zu 100%. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Sterolintermediate während eine normalen Kultivierung in DMEM-Medium kaum verestert wurden. Lediglich geringere Esterkonzentrationen für das Endprodukt Cholesterol wurden nachgewiesen.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Durchführung einer Stoffflussanalyse bei humanen Zellen ist dadurch zu begründen, dass es kaum möglich ist, die Cholesterolbiosynthese zu beeinflussen. Die Veränderung von Umgebungsbedingungen ist aufgrund der Empfindlichkeit der Zellen praktisch ausgeschlossen. So würden signifikante Änderungen der Kultivierungstemperatur bzw. der Sauerstoffverfügbarkeit, wie sie am Hefesystem durchgeführt wurden, zur Schädigung bzw. zum Tod der Zellen führen. Daher wurde versucht, besonders durch die Zugabe von Squalen und Sterolen, die Cholesterolbiosynthese zu beeinflussen. Auch hier war zu beachten, dass die Zugabe eines einfachen Detergenz wie Tween80 nicht ausreichte, um Lipide im wässrigen Kulturmedium in den Zellkulturflaschen zu lösen, da eine Vermischung durch einen Rührer entfällt.
Ein Ansatz zur Beeinflussung der Lipidsynthese wurde einer Arbeit entnommen, die sich mit der Phophatidylcholinbildung in Fibroblasten beschäftigte [Leppimäki et al., 2000]. Hierbei wurden durch den Komplexbildner Cyclodextrin Sterole in das innere der Fibroblasten geschleust. Aufgrund der hydrophoben Kavität bei gleichzeitig hydrophiler Außenschicht können diese aus Glucoseeinheiten aufgebauten Moleküle genutzt werden, um Lipide in wässrigen Phasen zu lösen. Daher wurde ein Protokoll entwickelt, mit dem sich Squalen und Sterole mit Methyl-β-Cyclodextrin komplexieren lassen. Durch eine einstündige Inkubation der Fibroblasten in einem serumfreien Medium mit dem entsprechenden Lipid-Cyclodextrin-Komplex konnte die jeweilige Substanz von den Zellen aufgenommen werden (Vgl. 4.3.5). Im weiteren Verlauf des Experimentes sollten dann Zellen in definierten Zeitabständen hinsichtlich ihrer Sterolgehalte analysiert und diese anschließend für eine Berechnung der Stoffflüsse im Cholesterolstoffwechselweg genutzt werden. Trotz des hohen Aufwandes wegen der erforderlichen hohen Zellzahlen für die Sterolanalytik eines einzelnen Messpunktes wurde zu mindestens fünf Zeitpunkten während einer Versuchsreihe die

intrazelluläre Sterolkonzentrationen ermittelt, um eine Stoffflussanalyse für die Cholesterolbiosynthese durchzuführen zu können. Jede Versuchsreihe wurde wiederholt.

5.6.2 Stimulus-Response-Experimente

Zunächst wurde untersucht, wie sich die einstündige Inkubation der Zellen mit je 0,4mM komplexierten Squalen, Lanosterol und Cholesterol auf den Gehalt dieser Intermediate in den Zellen auswirkte. Da für die Komplexierung des Squalens geringere Mengen des Cyclodextrins notwendig waren, betrug die hier die Cyclodextrinkonzentration im Inkubationsmedium 4,3mM, bei den Sterolen jeweils 14mM. Zum Vergleich wurden auch Zellen nur im Inkubationsmedium mit reinem Cyclodextrin (ebenfalls 14mM) für eine Stunde kultiviert. Die ermittelten Lipidkonzentrationen sind in Tabelle 5.9 dargestellt.

Tab. 5.9: Intrazelluläre Konzentration des Squalen, Lanosterol und Cholesterol in den Fibroblastenzellen GM637 nach Kultivierung in Inkubationsmedium mit Cyclodextrin (Cyd) bzw. Squalen-Cyclodextrin, Lanosterol-Cyclodextrin oder Cholesterol-Cyclodextrin (Lipid-Cyd).

	Intrazelluläre Konzentrationen [µg / Mio.Zelle]		
Inkubation	Squalen	Lanosterol	Cholesterol
1h Cyd	1,007	0,285	2,69
1h Lipid-Cyd	1,027	0,743	5,85

Die Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen ergab, dass die Inkubation im Squalen-Cyclodextrin-haltigen Medium keine Auswirkung auf den Squalengehalt in den Zellen hatte (Tabelle 5.9). Lediglich ein Anstieg der Squalenkonzentration aufgrund der Inkubation (hier von 0,026 auf 1,027µg/Mio. Zellen), der sich bei allen Versuchen einstellte, konnte nachgewiesen werden. Die Aufarbeitung des Inkubationsmediums zeigte, dass es Squalen in den komplexierten Mengen enthielt. Die durch das Cyclodextrin vermittelte Löslichkeit des Squalens in wässrigen Medien wurde bei Hilgers et al.1998 beschrieben. Die intrazelluläre Lanosterolkonzentration konnte durch die Inkubation mit dem Lanosterol-Cyclodextrin-Komplex mehr als verdoppelt werden (Tabelle 5.9).

Die Auswertung der Sterolgehalte ergab weiterhin, dass die intrazellulären Cholesterolkonzentrationen nach der Inkubation in den Versuchsreihen mit Cyclodextrin-haltigen, Squalen-Cyclodextrin-haltigen und Lanosterol-Cyclodextrin-haltigen Medium drastisch abgenommen hatten. Hierbei fungierte das Cyclodextrin-Molekül nicht nur als Komplexbildner, der die Aufnahme von in wässrigen Medien gelösten Lipiden erlaubt, sondern es löste auch das membrangebundene Cholesterol aus den inkubierten Zellen. Bei der Komplexierung mit Squalen mit 4,2mM Cyclodextrin wurden noch 6mg Cholesterol, bei

Inkubation mit 14mM Cyclodextrin bzw. Lanosterol-Cycodextrin wurden noch ca. 2mg Cholesterol pro einer Million Zellen nachgewiesen.

Die Inkubation mit dem Cholesterol-Cyclodextrin-Komplex führte bei gleicher Cyclodextrinkonzentration wie beim Versuch mit reinem Cyclodextrin bzw. mit Squalen-/Lanosterol-Cyclodextrin-Komplex zu einer geringeren Abreicherung des intrazellulären Cholesterols. Hierbei ist es nicht möglich zu unterscheiden, welcher Anteil des detektierten Cholesterol aus der aufgenommenen Sterolmenge stammt (Tabelle 5.9 und Abbildung 5.46).

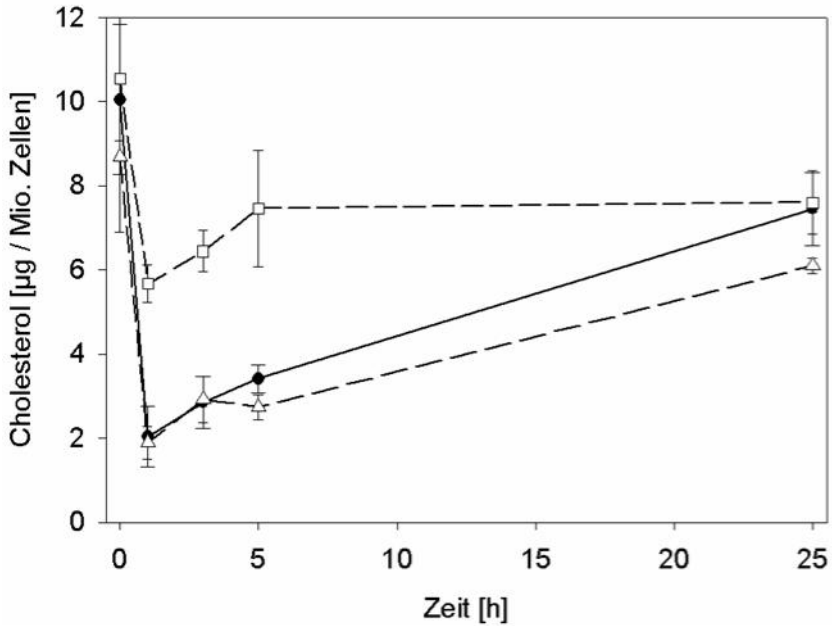


Abb. 5.46: Intrazelluläre Konzentration des gesamten Cholesterols vor (0h) und nach (1h bis 25h) Inkubation mit reinem Cyclodextrin —●—, mit Lanosterol-Cyclodextrin —△— und mit Cholesterol-Cyclodextrin —□—. Cyclodextrinkonzentration im Medium betrug jeweils 14mmol.

Der Effekt der Cholesterolabreichung durch Cyclodextrin wurde bereits von Pike et al. 1998 beschrieben und für Forschungsarbeiten an Membrandomänen genutzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit bewirkte die Abnahme des Cholesterols in den Fibroblasten eine verstärkte Neusynthese in den Zellen (Abbildung 5.46) und ermöglichte die Verfolgung dieser Abläufe mittels einer Stoffflussanalyse. So wurde innerhalb der ersten vier Stunden nach der Inkubation mit reinem Cyclodextrin eine Zunahme des Cholesterols von ca. 1µg pro einer Millionen Zellen beobachtet.

Die verstärkte Neusynthese des Cholesterols erklärt auch den beobachteten Anstieg der intrazellulären Squalenkonzentration nach der einstündigen Inkubation (Abbildung 5.47). Hier scheinen die Zellen auf den Cholesterolentzug mit einer verstärkten Squalensynthese zu reagieren. Auch konnten durch die Inkubation mit dem Komplexbildner Cyclodextrin Konzentrationsänderungen bei den Sterolintermediaten detektiert werden (Abbildung 5.47).

In den folgenden Abbildungen sind die Intermediatkonzentrationen nach der Inkubation in Cyclodextrin-haltigem Medium (ohne komplexiertes Sterol) zur besseren Übersichtlichkeit in zwei Diagrammen aufgetragen. Eine anfängliche Zunahme nach der Behandlung mit Cyclodextrin war für alle Intermediate festzustellen.

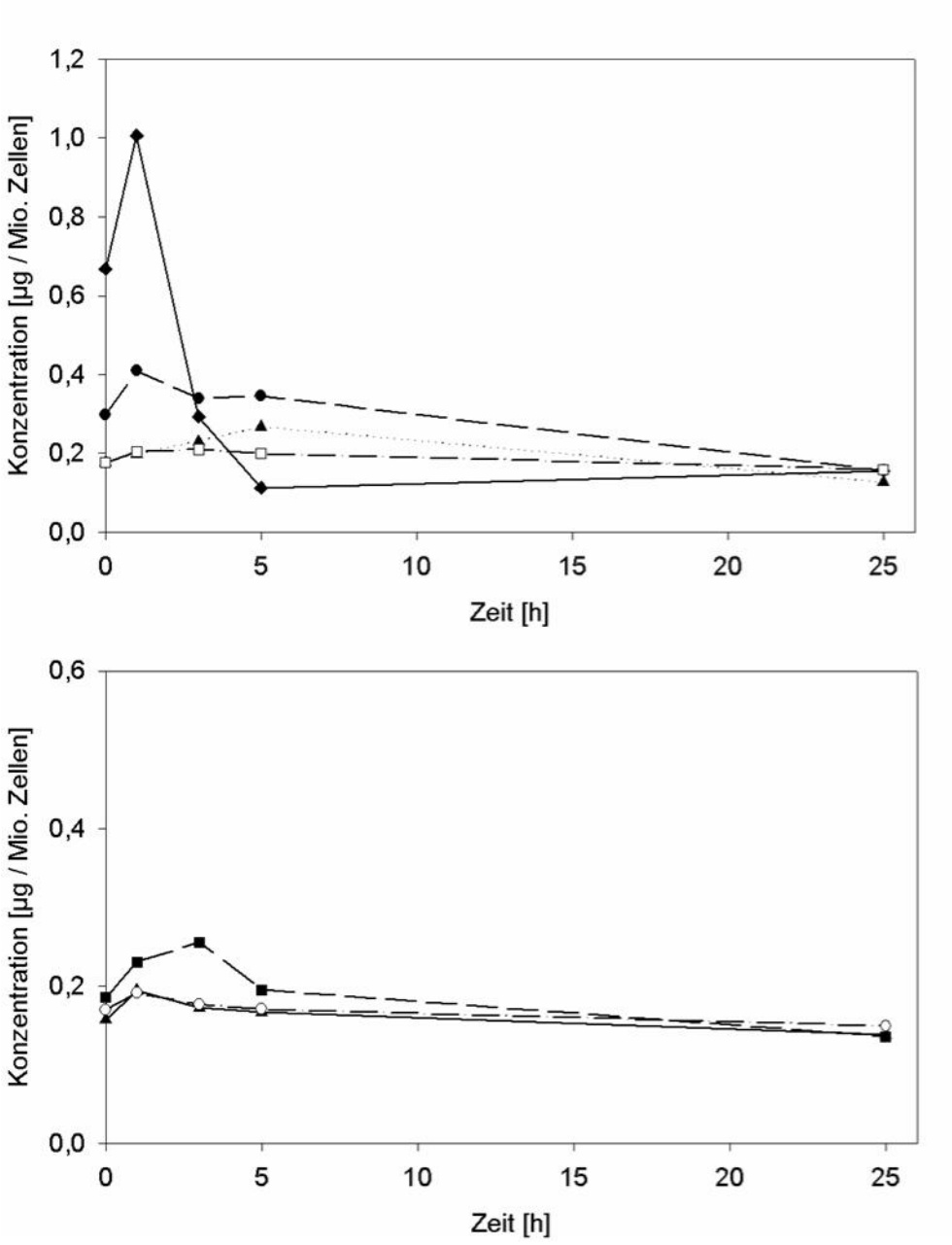


Abb. 5.47: Intrazelluläre Intermediatkonzentrationen (0h) und nach (1h bis 25h) Inkubation mit Cyclodextrin (14mmol). Oben: Squalen, Lanosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, Zymosterol. Unten: Cholesta-8-enol, Lathosterol, 7-Dehydrocholesterol, Desmosterol. Die mittlere prozentuale Standardabweichung betrug bei Squalen 27,4% und bei den übrigen Intermediaten 22,3%

Die Cholesterolabreicherung bewirkte also eine verstärkte Synthese aller der im Cholesterolstoffwechselweg befindlichen Intermediate wobei diese aber weiterhin nur sehr geringen Mengen in den Zellen zu detektieren waren. Auch wurden im Verlauf des

Experimentes nur geringe Sterolestermengen gemessen. Eine ausgeprägte Zwischenspeicherung der Sterolesterintermediate, wie sie bei der Hefe beobachtet wurde, konnte bei den Fibroblasten nicht festgestellt werden. Lediglich direkt nach der Inkubation konnten 0,146 µg/Mio. Zellen des veresterten Endprodukts Cholesterol detektiert werden. Das entsprach ca. 5% des Cholesterolgehalts. Spuren von Estern wurden auch für Lanosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, Zymosterol und Lathosterol gefunden.

Der Einsatz von Cyclodextrin ermöglichte zwar, für die Cholesterolbiosynthese bei humanen Zellen einen Stimulus für die Beobachtung dynamischer Bedingungen zu erzeugen, allerdings war eine gesunkene Zellvitalität nach der Inkubation zu beobachten. So war nach der Inkubation in Cyclodextrin-haltigem Medium (14mmol) eine Abnahme der Zellvitalität auf durchschnittlich 64% festzustellen. Die gesunkene Zellvitalität ist mit dem Entzug des Membransterols zu begründen, die auch partiell zum Ablösen des Zellrasens in den Kulturflaschen führte. Daher waren nach Abwaschen des Zellrasens mit PBS-Puffer im Anschluss an die Cyclodextrininkubation bis zu 50% weniger Zellen in den Zellkulturflaschen vorhanden. Die Abnahme der Zellzahlen erschwerte die Detektion der Intermediate.

5.6.3 Stoffflussberechnungen für den Cholesterolbiosyntheseweg

Für Berechnungen wurde das Programm COMPFlux© wegen der von Hefe abweichenden Komponenten im Stoffwechselweg entsprechend angepasst. Da die Intermediate Cholesta-7,24-dienol und 7-Dehydrodesmosterol (Vgl. Abbildung 2.5) nicht im GC- bzw. GC-MS-Chromatogramm detektiert wurden und auch das Desmosterol zu keinem Zeitpunkt signifikant akkumulierte, wurde für die Berechnung der Stoffflüsse der Syntheseweg zusammengefasst. Hierbei wurde die Bildung des Cholesterols über die Intermediate Lanosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, Lathosterol, 7-Dehydrocholesterol angenommen. Die mögliche Esterbildung der Sterole Lanosterol, Lathosterol und Cholesterol wurde in dem Programm COMPFlux© in der Quelldatei *user.c* berücksichtigt. Die Fehlergrenzen wurden entsprechend den vorliegenden Konzentrationen berücksichtigt (Vgl. Kapitel 4.5).
In der nachstehenden Abbildung sind die berechneten Stoffflüsse im Cholesterolbiosyntheseweg nach der einstündigen Inkubation (1h) mit Cyclodextrin dargestellt. Für die Kalkulationen wurden die Sterolkonzentrationen in molare Mengen umgerechnet, wobei die Einheit nmol/ 10 Mio. Zellen verwendet wurde.

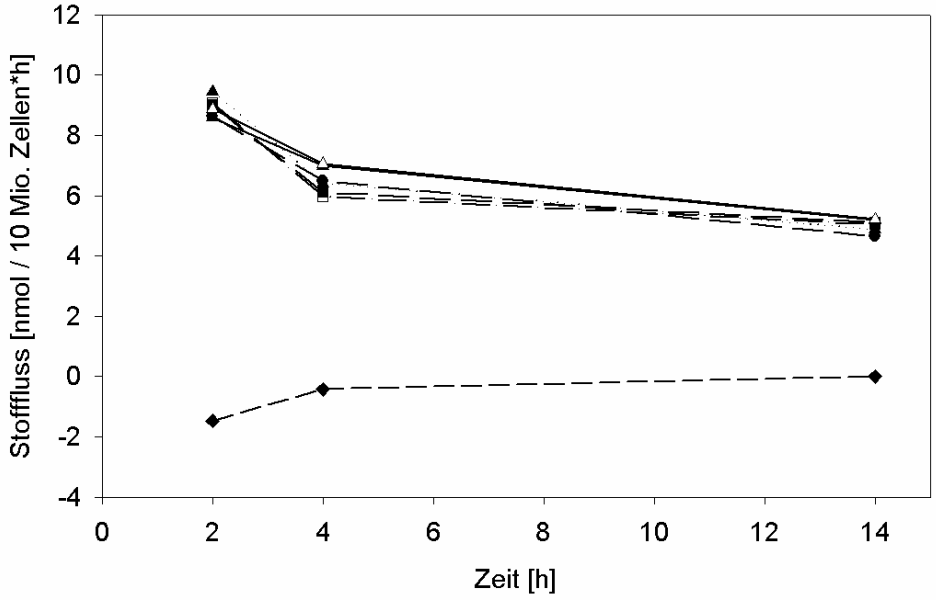


Abb. 5.48: Intrazelluläre Stoffflüsse nach 1h Inkubation mit Cyclodextrin . Lanosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, Zymosterol, Lathosterol, 7-Dehydrocholesterol, Cholesterol und Cholesterolester.

Auch wenn diese erste Analyse auf drei berechneten Punkten beruhte, ist trotzdem zu erkennen, dass die Sterolbiosynthese zu Beginn am größten war. Da nach der Inkubation mit Cyclodextrin geringe Mengen (0,146mg/Mio. Zellen) des Cholesterolesters detektiert wurden, die sich im weiteren Verlauf des Experiments verringerten, war der Stoffffluss des Cholesterolesters negativ (Abbildung 5.48).

Weiterhin fällt der beinahe identische Verlauf der Stoffflüsse zu den freien Sterolen auf. So wie ein Intermediat synthetisiert war, wurde es für die Bildung des nachfolgenden Sterols verwendet. Eine Zwischenspeicherung der Intermediate, die im linearen Pathway zu unterschiedlich starken Bildungsraten führen könnte, wurde kaum festgestellt. Die geringe Akkumulation des Lathosterols und die geringfügig veränderten Bildungsraten zu den nachfolgenden Intermediaten 7-Dehydrocholesterol und Cholesterol bewegten sich im Bereich der Standardabweichungen und waren daher nicht signifikant.

In Abbildung 5.49 sind die Stoffflüsse nach der einstündigen Inkubation im Lanosterol-haltigem Medium dargestellt, die zur Verdopplung des freien Lanosterols in den Zellen führte. Hierbei war die Abreicherung des Cholesterols mit 1,89µg/Mio. Zellen vergleichbar mit der durch das reine Cyclodextrin (2,03µg/Mio. Zellen). Obwohl ein Teil des Cyclodextrins bereits mit dem Lanosterol Komplexe gebildet hatte, wurde den Zellen eine vergleichbare Menge des Cholesterols entzogen.

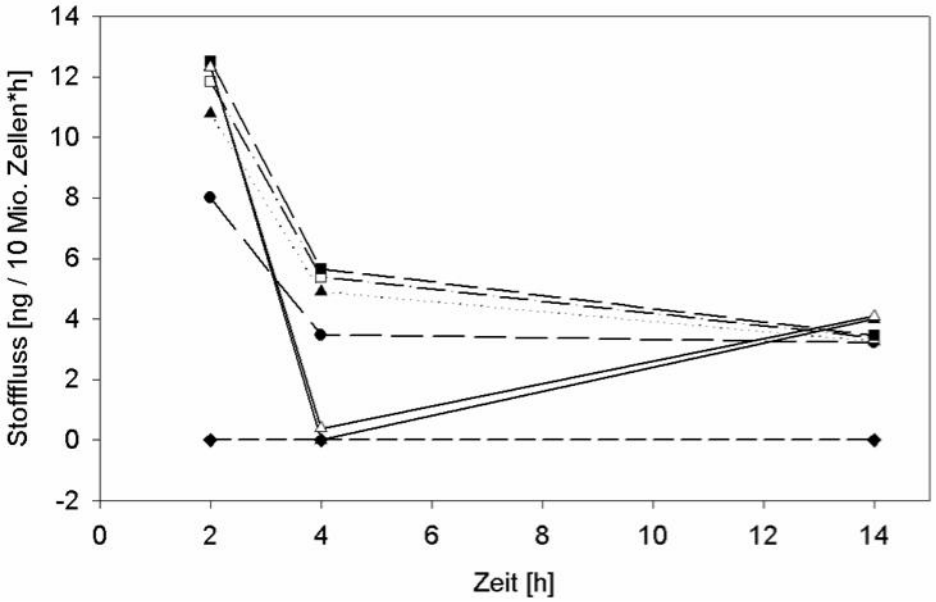


Abb. 5.49: Intrazelluläre Stoffflüsse nach 1h Inkubation mit Lanosterol-Cyclodextrin. Lanosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, Zymosterol, Lathosterol, 7-Dehydrocholesterol, Cholesterol und Cholesterolester.

Abbildung 5.49 zeigt, dass die Syntheseraten zwischen den ersten Messpunkten dieses Experiments höher ausfallen als beim Versuch mit reinem Cyclodextrin. Die stärkere Sterolbildung war bereits in den Konzentrationsverläufen ersichtlich, da trotz stärkerer Cholesterolabreicherung das gleiche Cholesterollevel in den Zellen nach einer Stunde erzielt wurde wie beim Experiment mit reinem Cyclodextrin. Weiterhin sind drei Gruppen von Stoffflussverläufen zu den freien Sterolen erkennen. Die Bildung der Intermediate 4,4-Dimethylzymosterol, Zymosterol und Lathosterol verhält sich ähnlich. Die Synthese der Intermediate 7-Dehydocholesterol und Cholesterol weicht davon geringfügig ab, da zunächst das Intermediat Lathosterol in geringen Umfang akkumulierte (0,21 µg/Mio. Zellen). Aufgrund der Aufnahme des Lanosterols aus dem Inkubationsmedium ist der Stofffluss zum Lanosterol im Vergleich zu den anderen Raten erniedrigt. Eine Cholesterolesterbildung bzw. -hydrolyse war nicht zu beobachten, der Stofffluss liegt um den Wert Null in Abbildung 5.49.

Weiterhin wurden auch die Stoffflüsse im Cholesterolbiosyntheseweg nach der Inkubation in einem Medium mit Cholesterol-Cyclodextrinkomplexen berechnet. Wie in Abbildung 5.46 gezeigt, war nach der Inkubation etwa dreimal soviel Cholesterol in den Zellen, wie in den Vergleichsexperimenten mit reinem Cyclodextrin bzw. mit Lanosterol-Cyclodextrinkomplexen zu finden.

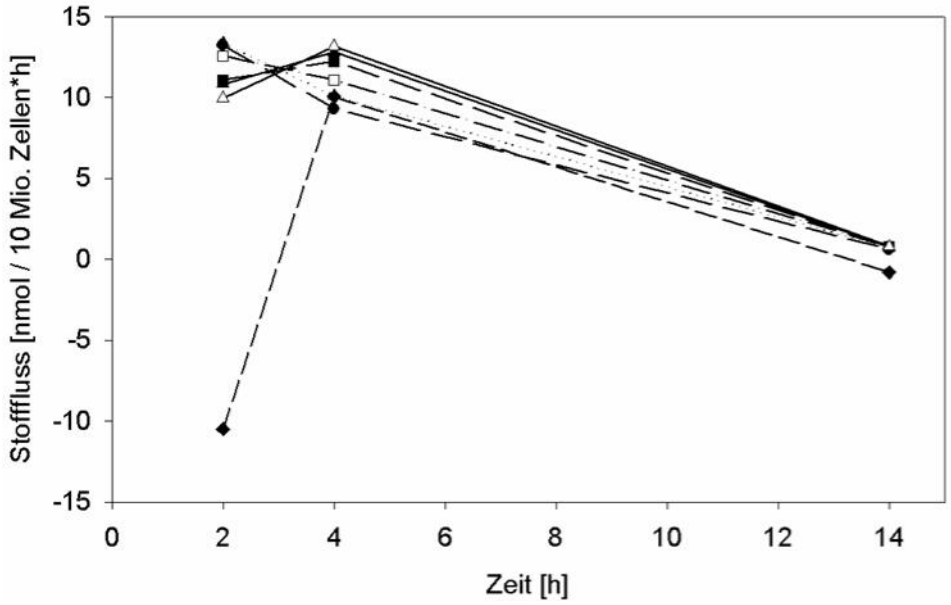


Abb. 5.50: Intrazelluläre Stoffflüsse nach 1h Inkubation mit Cholesterol-Cyclodextrin. Lanosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, Zymosterol, Lathosterol, 7-Dehydrocholesterol, Cholesterol und Cholesterolester.

In Abbildung 5.50 ist zu sehen, dass die Sterolstoffflüsse in vergleichbaren Größenordnungen auftraten, wie in den Vergleichsexperimenten mit reinem Cyclodextrin bzw. Lanosterol-Cyclodextrin. Es hätte eine geringere Syntheserate vermutet werden können, da sich nach der Inkubation mit Cholesterol bereits deutlich mehr Sterol in den Zellen befand als bei der Inkubation mit reinem Cyclodextrin bzw. mit dem Lanosterol-Cyclodextrinkomplex. Auch bei diesem dritten Versuch unterschieden sich die Bildungsraten der unterschiedlichen Sterolintermediate kaum voneinander. Es fand eine sofortige Umsetzung der gebildeten Sterole statt.

Eine Besonderheit ist im Vergleich zu den anderen Versuchen, die über den Zeitraum von 4h nach der Inkubation anhaltend erhöhte Syntheseleistung. In den Experimenten mit reinem Cyclodextrin bzw. mit Lanosterol-Cyclodextrin nahm zu diesem Zeitpunkt die Sterolbiosynthese bereits ab. Auffällig war auch die Cholesterolesterhydrolyse und -bildung, die in den anderen beiden Vergleichsexperimenten nicht beobachtet werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es möglich ist, die Bildung von intrazellulären Sterolen in Fibroblasten durch eine Stoffflussanalyse zu untersuchen. In den beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Analyse der Sterole als auch die Beeinflussung der Cholesterolbiosynthese in diesen adhärent wachsenden Zellen durch den Einsatz von Cyclodextrin erzielt werden kann. Veränderte Abläufe innerhalb des Biosynthesewegs ließen sich durch die Stoffflussanalyse zeigen und durch die Quantifizierung der Bildungsraten miteinander vergleichen. Durch die Experimente konnte

festgestellt werden, dass die veränderten Bedingungen zu einer verstärkten Neusynthese führen. Die einzelnen Sterolstoffflüsse in den Fibroblasten waren dabei im Unterschied zur Hefe weitgehend identisch. Ein besonderes dynamisches Verhalten eines Sterol(ester)intermediats innerhalb der Cholesterolbiosynthese konnte nicht festgestellt werden.

6 Diskussion

Die Aufklärung der Regulationsmechanismen der eukaryotischen Sterolbiosynthese ist sowohl für die industrielle Produktion von Sterolen als auch für medizinische Fragestellungen von besonderem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dynamik der Sterolbiosynthese in der Hefe *S.cerevisiae* in Batch Kultivierungen beim Umschalten von aeroben zu anaeroben Bedingungen untersucht. Bei anaerober Kultivierung konnte nur der in den Zellen gebundene Sauerstoff für die Sterolsynthese genutzt werden. Nach dem Umstellen auf aerobe Kultivierungsbedingungen wurde die Sterolbildung stimuliert. Sterolzusätze vor dem Switch führten zu ihrer Akkumulation in den Zellen. Nach dem Switch konnten – hervorgerufen durch die Sterolzusätze – teilweise deutlich veränderte Stoffflüsse gemessen werden.

Die in diesen Versuchen beobachteten Effekte führten zur Identifikation regulatorisch wirksamer Metabolite. Ein Schema der regulatorischen Wechselwirkungen im Metabolom konnte erstellt werden. Anhand dieses Schemas wurden Ansätze formuliert, die die Dynamik nach dem Switch ohne und mit Sterolzusätzen deskriptiv abbilden konnten.

Die Dynamik der Cholesterolbiosynthese in humanen Fibroblasten wurde ebenfalls betrachtet. Dazu wurden durch extrazelluläre Additionen von Sterolmetaboliten Änderungen der intrazellulären Konzentrationen in den Zellen hervorgerufen. Die Auswirkungen dieser Permutationen auf die Stoffflüsse wurde untersucht. Die Ergebnisse konnten mit denen der Experimente mit Hefe verglichen werden. Eine Bewertung, inwieweit *S.cerevisiae* als Modellorganismus zur Untersuchung der allgemeinen Sterolsynthese dienen kann, wurde anhand der Versuchsergebnisse getroffen.

Sterolaufarbeitung, -analyse und Stoffflussberechnung am System Hefe

Die Stoffflussanalyse ermöglichte sowohl die Beobachtung als auch den ersten direkten Vergleich der Biosynthese unterschiedlicher Sterolintermediate in der Hefezelle. Gemeinsamkeiten und Unterschiede während der Sterolbildung konnten quantifiziert und beschrieben werden. Um reproduzierbare Messwerte zu erhalten, musste aus einem größeren Probenvolumen aufgearbeitet werden (bis 100ml). Daher war die Probenahmeanzahl am Bioreaktor begrenzt. Weit verbreitete Quenchingverfahren, wie z.B. mit tiefgekühltem Methanol, konnten für diese Mengen an Kulturflüssigkeit nicht angewendet werden. Eine zeitlich höhere Auflösung der Probennahme war dadurch nicht realisierbar.

Eine höhere Probennahmefrequenz wäre wünschenswert, um die Dynamik der Sterolstoffflüsse direkt nach dem Switch von anaeroben zu aeroben Kultivierungsbedingungen mit einer höheren Auflösung zu erfassen. Fraglich ist allerdings, ob durch die Tatsache, dass Sterole und vor allem Sterolester an unterschiedlichen Orten

der Zelle lokalisiert sind, überhaupt Rückschlüsse mit der angewandten Methodik kurz nach dem Switch gezogen werden können.

Untersuchung der Sterolbiosynthese am Hefesystem in Batch-Kultivierungen

Die zeitliche Verfolgung des Konzentrationsverlaufes der Sterole in den Hefekultivierungen zeigte, dass die Sterolintermediate Lanosterol, 4,4-Dimethylzymosterol und Zymosterol kaum akkumulierten. Die Synthese von Squalen ist an der ER-Membran lokalisiert [Kalinovski und Mookhtiar, 1999]. Lanosterol wird aus Squalen in Lipidpartikeln (LP) synthetisiert. Für die Weiterreaktion zum 4,4-Dimethylzymosterol (über das 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol) muss das Lanosterol erst wieder zur ER-Membran transportiert werden. Daher wäre an dieser Stelle bei stärkeren Flüssen in den Post-Squalensyntheseweg eine Akkumulation vor und damit ein erniedrigter Fluss zum 4,4-Dimethylzymosterol zu vermuten gewesen. Aus der oben geschilderten Beobachtung ergibt sich aber, dass die gemessenen Bildungsraten der Sterole Lanosterol, 4,4-Dimethylzymosterol und Zymosterol identisch waren. Eine Zeitverzögerung konnte nicht beobachtet werden. Es muss sich daher bei diesen Umsetzungen um schnelle Folgereaktionen handeln.

Die schnelle Umwandlung in das 4,4-Dimethylzymosterol setzt einen engen Kontakt zwischen den Lipidpartikeln und dem ER-Membransystem voraus. Hierbei wird in der Literatur diskutiert, ob sich die beiden Organellen zeitweise sogar berühren, um den Steroltransport zu ermöglichen. 3D-Visualisierungen von Hefezellen untermauerten diese Vermutung [Perktold et al, 2007]. Zurzeit gibt es keine Anhaltspunkte für spezifische Shuttleproteine, die für die Translokation der Sterolintermediate verantwortlich sind [Ott et al., 2005]. Bisher ist in der Literatur auch keine Erklärung dafür zu finden, wieso die Biosynthese der Sterole über den Umweg der Lipidpartikel stattfindet. Allerdings wird die Meinung akzeptiert, dass die Lipidpartikel nicht nur als reine Fettspeicher in den Hefezellen fungieren, sondern vielmehr als Organellen der Lipidsynthese betrachtet werden müssen [Athenstaedt et al., 2006].

Die Gleichheit der Stoffflüsse zu Lanosterol, 4,4-Dimethylzymosterol und Zymosterol lässt eine gemeinsame Regulation der Enzyme Erg7p bis Erg27p vermuten. Germann et al. (2005) konnte durch den Einsatz von temperatursensitiven erg26-Mutanten zeigen, dass die Expression der Gene ERG1, ERG7 sowie ERG25/26/27 gemeinsam reguliert sein muss. Dabei führten die Gendefekte zu einer veränderten Ergosterolbiosynthese zwischen den Reaktionen vom Squalen zum Zymosterol. Die isolierten Stämme akkumulierten Sterolintermediate in unterschiedlichen Mengen bzw. wiesen geringere Konzentrationen des Endprodukts Ergosterols auf. Eine folgende Northern-Blot-Analyse zur Untersuchung der Expression zeigte, dass sich in jedem einzelnen Stamm die mRNA-Konzentrationen der

Gene ERG1, ERG7 sowie ERG25/26/27 auf einem vergleichbaren Niveau befanden. Zwischen den Stämmen variierten jedoch die mRNA-Konzentrationen. Das zeigt, dass die Hefe auf den Sterolgehalts in den Zellen mit einer einheitlichen Expression der Gene ERG1, ERG7 sowie ERG25/26/27 reagiert.

Andere Untersuchungen belegen, dass das Protein Erg27p zur Bildung des Zymosterols mit dem Enzym der Lanosterolsynthase Erg7p interagiert. So führt die Deletion des Gens ERG27 zum Verlust der Lanosterolsynthaseaktivität [Gachotte et al., 1999, Mo et al., 2003]. In einer aktuellen Arbeit [Teske et al., 2008] konnte ein Stamm entwickelt werden, der durch genetische Veränderungen trotz eines inaktiven Erg27p ein aktives Erg7p aufwies. Dennoch war es nicht möglich, eine Hefe genetisch so zu verändern, dass ohne ein funktionierendes Enzym Erg7p die Bildung des Zymosterols durch das Erg27p in der Zelle stattfand. Deshalb ist an dieser Stelle nicht nur von einer gemeinsamen Regulation dieser beiden Gene, sondern vielmehr von strukturellen Abhängigkeiten auszugehen. So wurde beispielsweise vermutet, dass die Proteine Erg7p und Erg27p Teil eines Multienzymkomplexes sind [Teske et al., 2008]. Würde diese Vermutung stimmen, ist es nur wahrscheinlich, dass auch die Synthese der Sterolintermediate zwischen dem Lanosterol und Zymosterol, wie das in dieser Arbeit bestimmte 4,4-Dimethylzymosterol, an die Funktion eines solchen Komplexes gebunden sind. Dies würde die Beobachtungen der schnellen Folgereaktionen von Squalen zu Zymosterol erklären.

Eines der zentralen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit war die Erkenntnis, dass dem Zymosterolesterpool eine besondere Bedeutung bei der Regulation zukommt. Wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, katalysieren die Enzyme Are1p und Are2p als Acyl-CoA-Sterolacyltransferasen (kurz: ASAT) die Esterbildung der Sterole mit Fettsäuren. Die Sterolester sind neben den Triacylglyceriden (kurz: TAG) die zweite wichtige Gruppe von Neutralfetten in den Zellen. In der Hefe *S.cerevisiae* kommen Sterolester in etwa gleich großen Anteilen wie die TAGs in den Lipidpartikeln vor und gelten als Speicherlipide.
Nach dem Switch zu aeroben Wachstumsbedingungen konnte eine starke Akkumulation von Zymosterolester beobachtet werden. Die Bildung der späteren Intermediate Fecosterol und Episterol sowie des Endprodukts Ergosterol war zeitlich verzögert. Erst nachdem die Zymosterolesterkonzentration in den Zellen nach ca. 4h ihr Maximum zwischen 4-6mg/g_{Zelle} erreichte, begann eine verstärkte Synthese des Feco-, Epi- und Ergosterols.

Es lässt sich nun die Frage stellen, warum die Hefe Zymosterolester nach dem Switch speichert. Zur Veresterung werden Fettsäuren benötigt, die in energetisch aufwendigen Synthesen erzeugt werden müssen. Der Vorteil der Zellen durch die Zymosterolesterbildung

sollte also erheblich sein, um den mit der Veresterung verbundenen Aufwand ausgleichen zu können. Der synthetisierte Zymosterolester muss zunächst vom Ort seiner Synthese im ER (Lokalisierung von Are1p und Are2p, Vgl. Kapitel 2.1.3) in die Lipidpartikel transportiert werden, da nicht davon auszugehen ist, dass der Zymosterolester in den ER-Membranen in diesen Größenordnungen akkumuliert. Eventuell schnüren sich durch die Bildung des Zymosterolesters direkt Lipidpartikel aus dem ER ab. Dies wird bisher bei der Bildung der Organellen vermutet [Czabany et al., 2006, Daum et al., 2006]. Wenn sich ein Sterolzwischenprodukt als Ester im Lipidpartikel befindet, ist für die Bildung des Ergosterols wiederum eine Translokation zum ER erforderlich.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit über die Akkumulation des Zymosterolesters geben auch eine erste mögliche Antwort auf die viel diskutierte Fragestellung [Müllner et al, 2004, Ott et al., 2005], warum einige Enzyme der Ergosterolbiosynthese nicht im ER, sondern nur in den Lipidpartikeln vorkommen. Im Falle des Erg6p bedeutet die Lokalisierung in den Lipidpartikeln, dass sich das Enzym in der Nähe seines Substrats Zymosterol befindet. Auch wenn Zymosterol an der ER-Membran gebildet wird (Lokalisierung von Erg27p im ER und in LP), wird es, wie im Ergebnisteil beschrieben, im Verlauf der Ergosterolbiosynthese als Zymosterolester zwischengespeichert. Da die Sterolester in die LP einlagert werden, befindet sich hier ein großer Teil des Zymosterols (als Ester vorliegend), dass dem Erg6p als Substrat dienen kann. Für die Reaktion zum Fecosterol muss zunächst der Zymosterolester hydrolisiert werden. Nach neueren Erkenntnissen befindet sich die entsprechende Hydrolase Yeh2p an der Plasmamembran [Müllner et al., 2005]. Wie hier der Kontakt der Sterolester zur Plasmamembran zustande kommt, ist bisher nicht verstanden [Czabany et al, 2007]. Allerdings scheinen sich nach den 3D-Visualisierungen von Perktold et al. (2007) die Lipidpartikel eher am Rand der Zellen zu befinden. D.h. die Lage des Erg6p würde eine schnelle Umsetzung der Zymosterols nach seiner Hydrolysierung begünstigen. Weiterhin ist es möglich, dass das gebildete Fecosterol bereits so vom Lipidpartikel transportiert wird, dass das Endprodukt Ergosterol an oder zumindest in die Nähe seines Bestimmungsortes gelangt.

Ein Ansatz zur Erklärung des beobachteten Phänomens der Zymosterolesteranreicherung liegt in der physiologischen Bedeutung des Zymosterols. Es ist das erste Sterol im Ergosterolstoffwechselweg, durch dessen Synthese die Hefezellen das Fehlen von Ergosterol ausgleichen können. Ist die Synthese von Zymosterol durch eine Mutation oder Deletion eines entsprechenden Gens unterbrochen, können sich die Zellen nicht mehr vermehren.

Bei der Deletion des ERG6 ist die Permeabilität der Membranen, die Verwertung fermentativer C-Quellen und der intrazelluläre Tryptophantransport beeinträchtigt [Gaber et al., 1998]. Die Deletionen der Gene ERG2 bzw. ERG3 führen zu verlangsamtem Wachstum [Ashman et al., 1991, Lees et al., 1999]. Sind die Gene der letzten beiden Enzyme Erg5p und Erg4p deletiert, sind die Eigenschaften der resultierenden Stämme kaum von denen eines Wildtyps zu unterscheiden [Lees et al., 1999]. Hingegen haben Veränderungen der Expression von Genen des dem Zymosterol nachgeschalteten Synthesewegs ERG6, ERG2, ERG3, ERG5 und ERG4 keine Auswirkung auf die Vitalität der Zellen [Lees et al., 1997]. Das bedeutet, dass die Zelle durch die Synthese des Zymosterols nicht länger Ergosterol-Mangelerscheinungen zeigt. Die Reaktionen nach der Zymosterolbildung, die ebenfalls molekularen Sauerstoff benötigen, sind für die Zellen nicht essentiell. Bei erneutem Einsetzen anaerober Bedingungen, welche die Sterolsynthese unterbinden würde, wäre das Hefewachstum nicht durch die Sterolverfügbarkeit in der Zelle limitiert. Zellen können in der Natur häufig einem Wechsel von aeroben zu mikroaeroben oder anaeroben Zuständen ausgesetzt sein. Die beobachtbare Dynamik kann sich durch in der Evolution aufgetretenen Selektionsdruck verfestigt haben.
Die Beobachtung einer temporär hohen Zymosterolveresterung ist zunächst spezifisch für die Hefe *S.cerevisiae*. So weisen andere Hefen ein geringeres Vorkommen der Sterolester auf, wie von Athenstaedt et al. (2006) am Beispiel der Hefe *Y.lipolytica* gezeigt wurde.

Die Veresterung der Sterole in den Zellen der Hefe *S.cerevisiae* ist trotz der geschilderten Bedeutung des Zymosterolesters nicht essentiell. Studien zeigten, dass Stämme, in denen durch die gemeinsame Deletion von ARE1 und ARE2 keine Sterolester mehr gebildet wurden, vital waren. Allerdings zeigte sich, dass sich die Wachstumsrate im beschriebenen Deletionsstamm nach einiger Zeit um bis zu 70% erniedrigte. Der Sterolgehalt in den Zellen reduzierte sich um 20% [Zweytick et al., 2000]. Aufgrund dessen, dass in der Studie Hefeextrakt im verwendeten YPD Medium vorhanden war, ist davon auszugehen, dass darin enthaltene Sterole durch die Hefezellen aufgenommen wurden [Starr and Parks, 1965]. Auf diese Weise konnten die *are1are2*-Deletionsmutanten Steroldefizite ausgleichen Dies wurde bei der Betrachtung des Sterolgehaltes nicht berücksichtigt. Auch zeigt die hohe Terbinafinsensibilität (Inhibitor der Squalenepoxidase) der are1are2-Mutanten im Vergleich zum Wildtypstamm, dass die Zellen einen physiologischen Nachteil aufgrund der fehlenden Veresterungsreaktionen aufweisen [Zweytick et al., 2000].

Die Verläufe der Stoffflüsse nach dem Switch zum Feco-, Epi- und Ergosterol ähneln sich stark und verdeutlichen, dass die Bildung dieser Sterole als schnelle Folgereaktion abläuft. Deshalb sind zwischen der Verstoffwechselung des Zymosterols und der Ergosterolsynthese

keine regulatorischen Wechselwirkungen erkennbar. Dafür spricht auch, dass die Gene ERG2 und ERG3 gemeinsam durch die Transkriptionsfaktoren Ucm2p und Emc22p reguliert werden [Vik und Rine, 2001]. Kwast et al. (2001) konnte in Genomanalysen zeigen, dass Ucm2p auch regulierend auf das Gen ERG4 wirkt. Bisher sind keine Regulationen von ERG5 bekannt. Die identischen Stoffflüsse von Zymosterol bis Ergosterol sprechen dafür, dass die Expression der drei Gene im Post-Zymosterol Syntheseweg gemeinsam reguliert ist.

Untersuchung der Sterolbiosynthese am Hefesystem in kontinuierlichen Kultivierungen

Durch den Einsatz von Perturbationen sollte die Dynamik der Ergosterolbiosynthese in kontinuierlicher Kulturführung untersucht werden. Obwohl durch Temperaturveränderungen und die Zugabe von Palmitoleinsäure im Schüttelkolben signifikante Unterschiede in der Sterolzusammensetzung erzielt wurden, wirkten sich diese Stimuli kaum auf die Ergosterolbiosynthese in kontinuierlicher Kultur aus. Es ist bemerkenswert, dass sich die Sterolzusammensetzung der Hefezellen derart träge änderte. So wäre beispielsweise eine schnelle Anpassung der Membranen an Temperaturveränderungen zu vermuten gewesen.

Die größten Sterolsyntheseraten und die größte Dynamik im Sterolstoffwechsel werden während aeroben Batch Kultivierungen in der exponentiellen Wachstumsphase beobachtet [Maczek et al., 2006]. Die Zellen befinden sich in der kontinuierlichen Kultivierung in einer Phase mit einer Wachstumsrate von μ = 0,05 h^{-1}. Hier ist mit einer vergleichsweise geringeren Dynamik zu rechnen. Andere Faktoren bestimmten stattdessen den Verlauf der Sterolbildung in den Zellen. Die Zellen sind unterschiedlich alt und unterscheiden sich wahrscheinlich in ihrem Sterolgehalt stark voneinander. Verdünnungseffekte durch Zellteilung sind sehr inhomogen über die Population verteilt. Da nur der durchschnittliche Sterolgehalt aller Zellen in der Probenmenge gemessen werden kann, sind die messbaren Unterschiede beim Vergleich verschiedener Perturbationen geringer.

Modellierung der Ergosterolbiosynthese

Die beobachteten Zusammenhänge zwischen Stoffflüssen und Intermediatkonzentrationen mündeten in der Erstellung von kinetischen Ansätzen zur Beschreibung der Ergosterolbiosynthese. Hierbei dienten die Erkenntnisse aus den Batch-Kultivierungen im Bioreaktor als Grundlage. Ausgehend von 13 Komponenten und 12 Reaktionsschritten im Post-Squalensyntheseweg erschienen 5 Komponenten zur Beschreibung von 3 Reaktionsschritten von besonderer Bedeutung. Sie stellten keine schnellen Folgereaktionen dar bzw. führten zeitweise zur Akkumulation von Intermediaten und Endprodukten des Sterolstoffwechselweges.

Modell der Lanosterolbildung

Im Vorfeld der durchgeführten Experimente in Batch Fahrweise mit Switch von anaeroben zu aeroben Kultivierungsbedingungen wurde angenommen, dass die Konzentration des zur Verfügung stehenden Substrats Squalen über die Intensität dieses Stoffstromes bestimmt. Allerdings wurde festgestellt, dass die in den Sterolmetabolismus eintretenden Stoffströme nicht ausschließlich von der Menge des akkumulierten Squalens abhängen. Die Ergebnisse der Arbeit zeigten, dass der eingehende Stoffffluss in den Ergosterolstoffwechselweg vielmehr als unabhängig von der Squalenkonzentration betrachtet werden muss.

Der Ansatz zur Beschreibung der Lanosterolbildung (Gleichung 5.8) auf einer Michaelis-Menten Formulierung, die erweitert wird, um den Einfluss 1) von Sterolzugaben und 2) von regulatorisch wirksamen Intermediaten zu beschreiben.

Zu Punkt 1)

Modifikationen in den Zellen im Vergleich zur Standardfermentation werden als anhaltend und nicht als kurzfristiger bzw. zeitlich abnehmender Effekt angenommen. Hierbei wird die Beobachtung berücksichtigt, dass sich die Syntheseraten zwischen den unterschiedlichen Kultivierungen auch über den Zeitraum von mehreren Stunden unterschieden. Ursache dieser veränderten Syntheseraten ist das Verhältnis aus freien zu veresterten Sterolen. Je höher dieses Verhältnis ist, desto stärker ist der Substratfluss zur Sterolbildung. Das Verhältnis hat vermutlich Auswirkungen auf das Transkriptions- und Expressionsprofil der Gene bzw. Proteine im Sterolstoffwechselweg. Es konnte beobachtet werden, dass das Verhältnis aus freien und veresterten Sterolen die Sterolsynthese während aerober Batch Kultivierung ebenfalls stark beeinflusst.

Ein hoher Veresterungsgrad liegt in der Zelle vor, wenn überschüssiges Sterol gespeichert wird. D.h. ein hoher Veresterungsgrad in der Zelle kann als Zeichen dafür angesehen werden, dass nur noch wenig oder gar kein Substrat von der Zelle für die Sterolbildung zur Verfügung gestellt werden muss. Inwiefern regulatorische Mechanismen zur Untermauerung dieser Vermutung existieren, muss untersucht werden.

Zu Punkt 2)

Die schnelle Abnahme der Lanosterolbildungsrate korrelierte mit der steigenden Konzentration des Zymosterolesters in der Zelle. Daher wurde der Zymosterolester als Inhibitor der Lanosterolbildung in Gleichung 5.8 berücksichtigt.

Modell der Zymosterolesterbildung

Da die Lanosterol- und die Zymosterolbildungsrate als identisch betrachtet werden (Gleichungen 5.3 und 5.4) definiert der nächste notwendige kinetische Ansatz ausgehend vom Zymosterolpool die Abzweigung des Stoffflusses in Richtung Zymosterolester. Diese Zymosterolesterbildung korreliert überproportional mit dem eintreffenden Stofffluss zum Zymosterol, In Gleichung 5.9 wird dies durch einen Exponenten berücksichtigt. Der Ansatz geht davon aus, dass nicht alles der Veresterungsreaktion zur Verfügung stehende Zymosterol auch tatsächlich gemessen werden kann. Dies kann an einer schnellen Folgereaktion liegen. Die Inhibierung der großen Probenmengen erfolgte zu langsam und die gemessene Zymosterolkonzentration wäre zu niedrig. Mit dieser Vermutung sind die Erkenntnisse über das Vorliegen eines Multienzymkomplexes in der Hefezelle vereinbar. So wäre es vorstellbar, dass die einzelnen Reaktionen ineinander greifen. Eine Akkumulation der Intermediate würde weitgehend unterbunden werden. Liegt ein Gleichgewicht zwischen der Zymosterol- und Zymosterolesterbildung vor, dann würde gemäß dieses Gleichgewichtes ein Teil des ankommenden Stofffflusses direkt zum Ester verstoffwechselt. Der ankommende Zymosterolstofffluss wäre dann ausschlaggebend für die Intensität der Esterbildung.

Es wurde eine Produktinhibierung von Zymosterolester in den Ansatz aufgenommen. Der Term wurde als kompetitive Inhibierung formuliert, da sich mit diesem Ansatz die beste Korrelation ergeben hatte.

Nes et al. (2002) exprimierten die menschliche Sterol-8-isomerase in einem erg2-Mutanten der Hefe *S.cerevisiae*, was die Bildung von Cholesta-8(14)-enol aus Zymosterol in den Zellen zur Folge hatte. In anschließenden Untersuchungen wurde dann eine inhibitorische Konstante der Isomerase für Cholesterol in Höhe von 620µM bestimmt. Der Vergleich mit der in dieser Arbeit ermittelten Konstanten zeigt, dass eine Inhibierungskonstante in der erwähnten Größenordung nicht ungewöhnlich ist.

Modell der Ergosterolesterbildung

Die Bildungsraten der übrigen Intermediate bis zum Endprodukt Ergosterol ließen sich durch den eingehenden Stofffluss und die Zymosterolesterbildung beschreiben, da die Sterole Fecosterol und Episterol nur in verhältnismäßig geringen Mengen in den Zellen akkumulierten (Gleichung 5.6). Die Ergosterolesterbildung wurde in einem mathematischen Ansatz (Gleichung 5.11) berücksichtigt, bei dem die Annahme getroffen wurde, dass nur ein definierter Anteil des gesamten intrazellulären Ergosterols als Substrat für die Veresterungsreaktion genutzt wird. Diese Annahme musste getroffen werden, da Ergosterol als Membrankomponente der Hefezelle einer Veresterung nicht zugänglich ist und daher nur ein veresterbarer Anteil in die Gleichung 5.11 eingesetzt werden kann. Anhand der

Beobachtungen der Sterolkonzentrationen in den Versuchen konnte abgeschätzt werden, in welchem Umfang das Endprodukt stets unverestert in den Zellen vorliegt. Die beobachtete Produktinhibierung wurde in den kinetischen Ansatz aufgenommen, wobei die Ergosterolesterkonzentration quadratisch in die Berechnung der Bildungsrate einging.

Für die Herleitung der Modell-Ansätze in dieser Arbeit wurden evtl. auftretende Änderungen der Enzymkonzentrationen nicht berücksichtigt. Sie sind allerdings Bestandteil der Ansätze, da zwischen Enzymkonzentration und Enzymkinetik nicht getrennt wird. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Mengen der Enzyme in den Zellen über die betrachteten Zeiträume nicht konstant bleiben. Es ist allerdings fraglich, ob es überhaupt gelingen könnte, die einzelnen Enzyme zu isolieren. Bisher sind zwar die Gene identifiziert, die für die an den Reaktionen beteiligten Enzyme kodieren, die Proteine wurden aber nicht vollständig isoliert und charakterisiert. Deshalb gibt es auch kaum Daten von *in vitro* bestimmten Enzymaktivitäten. Einige Enzyme des Ergosterolbiosynthesewegs agieren wahrscheinlich in einem Art Multienzymkomplex [Teske et al., 2008]. Es ist bisher nicht bekannt, wie dieser Komplex strukturiert sein könnte und welche konkrete Interaktion der Untereinheiten die Funktionsfähigkeit der Enzyme garantiert. Daher ist sicherlich auch die Bestimmung der einzelnen Enzymkonzentrationen innerhalb des Ergosterolstoffwechselwegs eine Aufgabe intensiver biochemischer Forschungsarbeiten, die in naher Zukunft kaum als verfügbare Methode zu erwarten ist. Die Ableitung kinetischer Ansätze ist deshalb momentan nur durch die Betrachtung der Sterolbildung auf Metabolitebene möglich, die durch Transkriptomstudien ergänzt werden kann.

Bewertung und Ergebnisse der Stoffflussanalyse für humane Zellen

Für biochemische Untersuchungen und Überexperssionsstudien dieses Sterolstoffwechselweges wurde oft die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus genutzt. Gewonnenen Erkenntnisse der Ergosterolbiosynthese, wie sie nur bei Hefen und Pilzen vorzufinden ist, wurden oft für die Betrachtung der Cholesterolbiosynthese von Säugetier- bzw. Menschenzellen genutzt [Espenshade und Hughes, 2007]. In der vorliegenden Arbeit sollte an der Hefe eine Stoffflussanalyse als Untersuchungsmethode etabliert werden, die im Anschluss auch zur Untersuchung an menschlichen Zellen genutzt werden kann.

Stoffflussanalysen in humanen Zellen beschäftigen sich fast ausschließlich mit Untersuchungen des Zentralmetabolismus [Bonarius et al., 1996, Follstad et al., 1999]. Hierbei wurden überwiegend permanente Zelllinien untersucht, die sich für eine Kultivierung im Bioreaktor eigneten. Erst kürzlich sind Stoffflussanalysen bei adhärent wachsenden bzw.

primären Zellen beschrieben worden [Sidorenko et. al, 2007, Jin und Brennan, 2008]. Auch bei der Untersuchung sekundärer Stoffwechselprodukte in Pflanzen werden neuerdings Stoffflussanalysen eingesetzt [Heinzle et al., 2007, Zulak et al., 2008].
Stoffflussanalysen in Seitenmetabolismen sind bisher selten durchgeführt worden. Oft reicht die Kenntnis der biochemischen Reaktionsschritte und der Stöchiometrie nicht aus, um die Umsatzraten abschätzen zu können. Gleichzeitig ist eine hinreichend genaue Quantifizierung von oftmals sehr instabilen Metaboliten schwierig.
Um Regulationsmechanismen detailliert durch eine Stoffflussanalyse zu untersuchen oder gar mathematische Ansätze zur Beschreibung der biochemische Reaktionen abzuleiten, muss eine ausreichende Menge an Messpunkten vorhanden sein. Auf Grund der langen und Dauer und arbeitsintensiven Kultivierung liegt hier oft eine Limitation an verfügbarer Probenmenge und –anzahl vor. So wurden die Sterolstoffflüsse in dieser Arbeit für drei Zeitpunkte bestimmt. Anhand dieser berechneten Flüsse konnte bereits der unterschiedliche Einfluss der Stimuli auf die Sterolbiosynthese gezeigt werden. Es war möglich, zwischen einer starken (nach der Inkubation mit den Cyclodextrinkomplexen) und einer erniedrigten Cholesterolbiosynthese (am Ende des Versuchszeitraums) zu unterscheiden. Hierbei wurden Stoffflüsse in Höhe von 10-15nmol/10Mio.Zellen bzw. 0-5nmol/10Mio.Zellen bestimmt. Ein weiteres Ergebnis der durchgeführten Stoffflussanalyse sind die geringen Bildungsraten der Cholesterolesters. Eine Esterbildung der Sterolintermediate in den Fibroblasten konnte im Gegensatz zu den Hefezellen nicht festgestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten aufgrund der geringen Mengen der Sterolintermediate in den Zellen gerade kleine Änderungen schwer detektiert werden. So lagen einige Sterolintermediate in Konzentrationen von 0,2-0,3µg/Mio.Zellen vor. Die Konzentrationsänderungen der Intermediate bewegten sich oft innerhalb der Fehlertoleranz von bis zu 0,1µg/Mio.Zellen. Etliche Protokolle sind publiziert, die sich mit der Aufarbeitung intrazelluläre Sterole beschäftigen, allerdings dienen sie bei humanen Zellen in der Regel der Gewinnung des Cholesterols. So sind die Zwischenprodukte des Cholesterolbiosynthesewegs bekannt, aber erst wenige Forschungsarbeiten befassten sich mit der Quantifizierung der Sterolintermediate in Zellkulturen. Lusa et al. (2003) gelang es, die Intermediate Zymosterol, Lathosterol und Desmosterol in Experimenten mit radioaktiv markiertem Acetat nachzuweisen. Die Forschungsruppe um Megha et al. (2006) konnte darüber hinaus auch noch das 7-Dehydrocholesterol in Lipidrafts detektieren.
Die Bestimmung von intrazellulären Sterolkonzentrationen im µg Bereich war in der Literatur nicht beschrieben. Die Bestimmung von derartigen Sterolkonzentrationen ist nur durch die Aufarbeitung hoher Zellmassen möglich, wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde. Eine weitere Möglichkeit, Fibroblasten zukünftig mit einer Stoffflussanalyse zu

untersuchen, wäre evtl. der Einsatz von Markierungsexperimenten (Vgl. Kapitel 2.3.1), da hier weniger Zellmaterial benötigt wird. Auch die Erprobung von Zellen, die sich in Suspension vermehren lassen, könnten neue Perspektiven für die Untersuchung der Cholesterolbiosynthese mittels einer Stoffflussanalyse ermöglichen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es möglich ist, an adhärent wachsenden Zellen eine Stoffflussanalyse durchzuführen. Im Vergleich zur Hefe fand keine temporäre Speicherung von Zwischenprodukten in den Zellen statt. Es war allerdings möglich, unterschiedliche Intensitäten der Stoffströme durch externe Zugaben bzw. durch die Änderung von Kultivierungsbedingungen hervorzurufen. Diese Eigenschaft kann bei einer Vielzahl von Untersuchungen angewendet werden, die sich mit der Suche nach Faktoren zur Beeinflussung der Cholesterolbiosynthese beschäftigen.

Hefe als Modellorganismus zur Untersuchung der Sterolbiosynthese

Die Frage ist, inwieweit sich die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* überhaupt als allgemeiner Modellorganismus der Sterolbiosynthese eignet, da es Unterschiede sowohl im Syntheseweg als auch bei bisher bekannten Regulationsmechanismen gibt (Vgl. Kapitel 2.1.5). Die Umsetzungen bis zum Zymosterol im Post-Squalenbiosyntheseweg sind konserviert, die biochemischen Reaktionen weichen aber voneinander ab. Ein weiterer Unterschied zwischen der Ergosterol- und Cholesterolbiosynthese zeigt sich in der Esterbildung. Während in der Hefe durch die Konzentrationsmessungen und Stoffflussanalysen gezeigt werden konnte, dass die Veresterung der Sterole Bestandteil der Sterolsynthese ist, wurden in den Fibroblasten kaum veresterte Sterole detektiert. Die Veresterungsenzyme in der Hefe (Are1p, Are2p) und (Acat1p, Acat2p) in menschlichen Zellen gleichen sich trotzdem stark. Eine 23%ige Homologie dieser Enzyme [Yang et al., 1996] lässt ähnliche Funktionen in den Zellen vermuten. Auch in den menschlichen Zellen haben die im ER lokalisierten Acyl-CoA-Cholesterolacyltransferasen (ACAT - aber auch die DGAT) die Aufgabe, Cholesterol in hydrophobe Neutralfette umzuwandeln. Die ACAT werden auf Transkriptionsebene und allosterisch auf Post-Translationsebene aktiviert, wenn die Sterolmengen in den Zellen ansteigen. Darüber hinaus akzeptieren die ACATs ein weites Substratspektrum sowohl an Sterolen als auch Fettsäuren [Buhman et al, 2001], so dass auch eine Veresterung von Sterolintermediaten in den Fibroblasten möglich ist. Da aber in den humanen Zellen kaum veresterte Sterolintermediate nachweisbar waren, ist hier nicht von einer gleichen Bedeutung der Veresterung für die Sterolbiosynthese auszugehen, wie in der Hefen beobachtet wurde. Des Weiteren haben die ASATs in Hefe die gleichen Funktionen, während sich sowohl der Typ (1 oder 2) als auch die Wirkungskreise der menschlichen ACATs je nach Gewebe unterscheiden. Deshalb können auch hier die

Beobachtungen aus den verwendeten Fibroblastenzellen nicht allgemein auf das Verhalten bzgl. der Veresterung auf alle menschlichen Zellen übertragen werden.
Es ist zu diskutieren, inwieweit die Zellen der Linie GM00637 repräsentativ den Ablauf der Cholesterolbiosynthese primärer Zellen widerspiegeln. Die Transformation mit dem Virus SV40, die ein uneingeschränktes Wachstum dieser Zellen garantiert, bewirkt Veränderungen innerhalb des Zellmetabolismus [Reisner et al., 1997]. Für eine Stoffflussanalyse an menschlichen Zellen war der Einsatz einer permanent wachsenden Zelllinie erforderlich. Darüber hinaus war es für die Bereitstellung großer Zellmengen notwendig, die Zellen oft zu passagieren. Durch die Verwendung der Zelllinie konnte dennoch davon ausgegangen werden, dass sich hierbei der Zustand der Fibroblasten zwischen den einzelnen Passagen nicht veränderte. Bei primären Zellen würde sich der physiologische Zustand aufgrund des Alterungsprozesses hingegen verändern.

Ausblick

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es mit den aufgestellten Gleichungen möglich war, die Bildung der Sterole in der Hefe unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen bei einer Batch-Fermentation mit Switch zu beschreiben. Das deskriptive Modell kann als Anfang einer Modellierung der Ergosterolbiosynthese verstanden werden. So wurden zwar Umsetzungen innerhalb des Synthesewegs identifiziert, die entscheidend für die Bildung der Sterole in der Hefe insgesamt sind. Dennoch konnten aber viele Einflussfaktoren im Rahmen dieser Arbeit nicht erfasst werden, insbesondere die auf Proteom- und Transkriptomebene.
So könnte die Bestimmung des Transkriptoms bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen helfen (*Micro array analysis*), die Auswirkungen verschiedener Faktoren auf die Genexpression festzustellen. Durch die Integration der Daten in das Modell könnten die Zeitkonstanten ihrer Wirkung bei der Beschreibung der Bildungsraten integriert werden. So wirkt sich die Umstellung der Kultivierungsbedingungen unmittelbar auf die Stoffflüsse aus, dann auf das Transkriptom und schließlich nach ca. 10min auf das Proteom. Die Berücksichtigung dieser unterschiedlichen Zeitkonstanten würde ein verbessertes Verständnis und eine modellhafte Beschreibung der Dynamik in diesem kurzen Zeitraum ermöglichen.
Die Dynamik der Speicherung von Sterolen in der Zelle kann durch eine Isolierung und getrennte Aufarbeitung der Zellbestandteile erfolgen. Die geringen Sterolkonzentrationen bzw. die Änderungen dieser können durch Markierungsexperimente quantifiziert werden. Eine Zuordnung, welche Sterole bzw. Sterolester sich an welchem Ort in welcher Kultivierungsphase anlagern, wäre dann durch Pulsversuche möglich, in denen radioaktiv markiertes Substrat zur Verfügung steht.

Eine detaillierte Beschreibung der Zusammenhänge könnte dann eine Entkopplung der gezeigten Ansätze von Effekten erlauben, die nicht direkt die Enzymkinetik beeinflussen. Eine Entwicklung weg von einem deskriptiven hin zu einem prädiktiven Modell wäre dann möglich.

7 Literaturverzeichnis

Alsaker K.V., Spitzer T.R., Papoutsakis E.T.: Transcriptional analysis of spo0A overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the cell's response to butanol stress. *J Bacteriol* 186(7), 1959-1971, **(2004)**.

Arthington-Skaggs B.A., Crowell D.N., Wang H., Billheimer J.T., Sturley S.L., Bard M.: Positive and negative regulation of a sterol biosynthetic gene (ERG3) in the post-squalene portion of the yeast ergosterol pathway. *FEBS Lett* 392(2), 161-165, **(1996)**.

Ashman W.H., Barbuch R.J., Ulbright C.E., Jarrett H.W., Bard M.: Cloning and disruption of the yeast C-8 sterol isomerase gene. Lipids 26(8), 628-632, **(1991)**.

Athenstaedt K., Zweytick D., Jandrositz A., Kohlwein S.D., Daum G.: Identification and Characterization of Major Lipid Particle Proteins of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 181(20), 6441-6448, **(1999)**.

Athenstaedt K., Jolivet A., Boulard C., Zivy M., Negroni L., Nicaud J.-M., Chardot T.: Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source. *Proteomics* 6, 1450-1459, **(2006)**.

Bach T.J., Benveniste P.: Cloning of cDNAs or genes encoding enzymes of sterol biosynthesis from plants and other eukaryotes: heterologous expression and complementation analysis of mutations for functional characterization. *Prog Lipid Res.* 36(2-3), 197-226, **(1997)**.

Bennet M.K., Lopez J.M., Sanchez H.B. Osborne T.F.: Sterol Regulation of Fatty Acid Synthase Promoter coordinate feedback regulation of two major lipid pathways**.** J Biol Chem. 270 (43), 25578-25583**, (1995)**.

Blank L.M., Kuepfer L., Sauer U.: Large-scale ^{13}C flux analysis reveals mechanistic principles of metabolic network robustness to null mutations in yeast. *Genome Biol.* 6(6), R49, **(2005)**.

Bonarius H.P.J., Hatzimanikatis V., Meesters K.P.H., de Gooijer C., Schmid G., Tramper J.: Metabolic flux analysis of hybridoma cells in different culture media using mass balances. *Biotechnol Bioeng.* 50(3), 299-318, **(1996)**.

Brown M.S., Goldstein J.L.: The SREP pathway: Regulation of the cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-340, **(1997)**.

Buhman K.K., Chen H.C., Farese V.R.: The enzymes of neutral lipid synthesis. *J Biol Chem.* 276(44), 40369-40373, **(2001)**.

Chang T.Y., Chang C.C., Lin S., Yu C., Li B.L., Miyazaki A.: Roles of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 and -2. *Curr Oppin Lipidol.* 12(3):289-96, **(2001)**.

Chang T.Y., Chang C.Y., Ohgami N., Yamauchi Y.: Cholesterol sensing, trafficking, and esterification, *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22, 129-57, **(2006)**.

Chassagnole C., Noisommit-Rizzi N., Schmid J.W., Mauch K., Reuss M.: Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 79(1), 53-73, **(2002)**.

Coleman T.F., Li Y.: On the convergence of reflective Newton methods for large-scale nonlinear minimization subject to bounds. *Math Program* 67(2), 189-224, **(1994)**.

Coleman T.F., Li Y.: An interior, trust region approach for nonlinear minimization subject to bounds. *SIAM J Optim* 6, 418-445, **(1996)**.

Corey E. J., Matsuda S.P.: Molecular cloning, characterization, and overexpression of ERG7, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding lanosterol synthase. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 19(6), 2211-2215, **(1994)**.

Dam H.: Historical introduction to cholesterol. Chemistry, Biochemistry and Pathology, 1-14, Academic Press, New York, NY, **(1958)**.

Daum G., Lees N.D., Bard M., Dickson R.: Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae. Yeast* 14, 1471-1510, **(1998)**.

Dauner M., Bailey J.E., Sauer U.: Metabolic flux analysis with a comprehensive isotopomer model in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng.* 76(2), 144-156, **(2001)**.

Davies B.S., Rine J.: A role for sterol levels in oxygen sensing *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics 174*, 191-2001, **(2006)**.

Davies B.S., Wang H.S., Rine J.: Dual activators of the sterol biosynthesis pathway of *Saccharomyces cerevisiae*: Similar activation/regulatory domains but different response mechanisms. *Mol Cell Biol* 25(16), 7375-7385, **(2005)**.

de Koning W., van Dam K.: A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. Anal Biochem. 204, 118-123, **(1992)**.

De Noronha Pissara P., Nielsen J.: Pathway kinetics and metabolic control analysis of a high-yielding strain of *Penicillium chrysogenum* during fed batch cultivations. *Biotechnol Bioeng.*51, 168-176, **(1996)**.

Desai R.P., Nielsen L.K., Papoutsakis E.T.: Stoichiometric modeling of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constrains. *J Biotechnol* 71(1-3), 191-205, **(1997)**.

Deytieux C., Mussard L., Biron M.-J., Salmon J.-M.: Fine measurement of ergosterol requirements for growth of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 68(2), 266-271**, (2005)**.

Donald K.A., Hampton R.Y., Fritz I.B.: Effects of overproduction of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on squalene synthesis in *Saccharomyces cerevisiae. Appl Environ Microbiol.* 63(9): 3341–3344, **(1997)**.

dos Santos M.M., Gombert A.K., Christensen B., Olsson L., Nielsen J.: Identification of in vivo enzyme activities in the cometabolism of glucose and acetate by *Saccharomyces cerevisiae* by using ^{13}C-labeled substrates. *Eukaryot Cell* 2(3), 599-608, **(2003)**.

Dunn I.J., Heinzle E., Ingham J., Prenosil J.E.: Biological reaction engineering. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Deutschland **(2003)**.

Dulpus E., Glorian M., Forest C.: Fatty acid regulation of gene transcription. *J Biol Chem.* 275(40), 30749-30752, **(2005)**.

Edwards J.S., Ramakrishna R., Schilling C.H., Palsson B.O.: Metabolic flux balance analysis. Metabolic engineering. Lee K.H., Papoutsakis E.T., **(1999)**.

Espenshade P.J., Hughes A.L.: Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Genet.* 41, 401- 427, **(2007)**.

Everitt A.V.**,** Hilmer S.N., Brand-Miller J.C.**,** Jamieson H.A.**,** Truswell A.S.**,** Sharma A.P.**,** Mason R.S.**,** Morris B.J.**,** Le Couteur D.G.: Dietary approaches that delay age-related diseases. C*lin Interv Aging* 1(1), 11-31, **(2006)**.

Fiaux J., Cakar Z.P., Sonderegger M., Wuthrich K., Szyperski T., Sauer U.: Metabolic flux profiling of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Eukaryot Cell* 2(1), 170-180, **(2003)**.

Folch J., Lees M., Stanley G.H.S.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biolog Chem***.** 226(1)**,** 497–509, **(1957).**

Follstad B., Balcarcel R., Wang D.I., Stephanopoulos G.: Metabolic flux analysis of hybridoma continuous culture steady state multiplicity. *Biotechnol Bioeng.* 63, 675-683, **(1999)**.

Frick O., Wittmann C.: Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ^{13}C flux analysis. *Microb Cell Fact*. 4(30), **(2005)**.

Garbarino J., Sturley S.L.: Homeostatic systems for sterol and other lipids. *Biochem Soc Trans.* 33(5), 1182-1185, **(2005)**.

Gachotte D., Barbuch R., Gaylor J., Nickel E., Bard M.: Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ERG26 gene encoding the C-3 sterol dehydrogenase (C-4 decarboxylase) involved in sterol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(23), 13794-13799, **(1998)**.

Gachotte D., Sen S.E., Eckstein J., Barbuch R., Krieger M., Ray B.D., Bard M.: Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ERG27 gene encoding the 3-keto reductase involved in C-4 sterol demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(22), 12655-12660, **(1999)**.

Galazzo J. L., Bailey J.E.: Fermentation pathway kinetics and metabolic flux control in suspended and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol.* 12: 162-172, **(1990)**.

Gaylor J.L.: Membrane-bound enzymes of cholesterol synthesis from lanosterol.*Biochem Biophys Res Commun.* 292(5), 1139-1146, **(2002)**.

Germann M., Gallo C., Donahue T., Shirzadi R., Stukey J., Lang S., Ruckenstuhl C., Oliaro-Bosso S., McDonough V., Turnowsky F., Balliano G., Nickels J.T.: Characterizing sterol defect supressors uncovers a novel transcriptional signaling pathway regulating zymosterol biosynthesis. *J Biol Chem.* 280(43), 35904-35913, **(2005).**

Gil G., Faust J.R., Chin D.J., Goldstein J.L., Brown M.S.: Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell* 41, 249-258, **(1985)**.

Goldstein J.L., De-Bose-Boyd R.A., Brown M.S.: Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124, 35-46, **(2006)**.

Grabinskaa K., Palamarczyka G.: Dolichol biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: an insight into the regulatory role of farnesyl diphosphate synthase. *FEMS Yeast Res* 2(3), 259–265, **(2002)**.

Greer F.: Issues in establishing vitamin D recommendations for infants and children. *Am J Clin Nutr.* 80(6 Suppl), 1759-62, **(2004)**.

Hampton R.Y: Proteolysis and sterol regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 8, 345-378, **(2002)**.

Harris L.M., Blank L., Desai R.P., Welker N.E., Papoutsakis E.T.: Fermentation characterization and flux analysis of recombinant strains of *Clostridium acetobutylicum* with an inactivated solR gene. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 27(5), 322-328, **(2000a)**.

Harris L.M., Desai R.P., Welker N.E., Papoutsakis E.T.: Characterization of recombinant strains of the *Clostridium acetobutylicum* butyrate kinase inactivation mutant: need for new phenomenological models for solventogenesis and butanol inhibition? *Biotechnol Bioeng.* 67(1), 1-11, **(2000b)**.

Heese-Peck A., Pichler H., Zanolari P., Watanabe R., Daum G., Riezmann H.: Multiple function of sterols during endocytosis. *Mol Biol Cell.* 13(8), 2664-2680, **(2002)**.

Heinzle E., Matsuda F., Miyagawa H., Wakasa K., Nishioka T.: Estimation of metabolic fluxes, expression levels and metabolite dynamics of a secondary metabolic pathway in potato using label pulse-feeding experiments combined with kinetic network modelling and simulation. *Plant J.* 50(1), 176-187, **(2007)**.

Herman G.E: Disorders of cholesterol biosynthesis: prototypic metabolic malformation syndromes. *Hum Mol Gen.* 12(1), 75-88, **(2003)**.

Hilgers L.A.T., Nicolas I., Lejeune G., Deweil E., Boo B.: Effect of various adjuvants on secondary immune response in chickens. *Vet Immunol Immunopathol.* 66(2), 159-171, **(1998).**

Hiltunen J.K., Okubo F., Kursu V.A.S., Autio K.J., Kastaniotis A.J.: Mitochondrial fatty acid synthesis and maintenance of respiratory competent mitochondria in yeast. *Biochem Soc Trans.* 33(5), 1162-1165, **(2005)**.

Hiller J., Franco-Lara E., Papaioannou V., Weuster-Botz D.: Fast sampling and quenching procedures for microbial metabolic profiling. *Biotechnol Let.* 19, 1161-1167, **(2007a)**.

Hiller J., Franco-Lara E., Weuster-Botz D.: Metabolic profiling of *Escherichia coli* cultivations: evaluation of extraction and metabolite analysis procedures. *Biotechnol Let.*29(8), 1169-1178, **(2007b)**.

Hornberg J.J., Bruggeman F.J., Bakker B.M., Westerhoff H.V.: Metabolic control analysis to identify optimal drug target. *Prog Drug Res.* 64(171), 173-89, **(2007)**.

Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S.: SREBPs activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.*109, 1125-1131, **(2002)**.

Jansen J.P., Gaugris S., Bergman G., Sen S.S.: Cost-effectiveness of a fixed dose combination of alendronate and cholecalciferol in the treatment and prevention of osteoporosis in the United Kingdom and The Netherlands. *Curr Med Res Opin*. 2008 Jan 24 [Epub ahead of print], **(2008)**.

Jensen-Pergakes K., Zhongmin G., Giattina M., Sturley S.L., Bard M.: Transcriptional regulation of the two sterol esterification genes in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *J Bacteriol.*183(17), 4950-4957, **(2001)**.

Jeong, E.S.: Metabolic modelling: Stoichiometry of the ergosterol biosynthesis in yeast and the cholesterol biosynthesis in human fibroblasts. Studienarbeit, Technische Universität Berlin, **(2004)**.

Jin Y., Brennan L.: Effects of homocysteine on metabolic pathways in cultured astrocytes. *Neurochem Int*, 52(8), 1410-1415, (2008).

Jollow D., Kellerman G.M., Linnane A.W.: The biogenesis of mitochondria: III. The lipid composition of aerobically and anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae* as related to the membrane systems of the cells. *J Cell Biol*. 37(2), 221-230, **(1968)**.

Jorgensen H., Nielsen J., John Villadsen J., Mollgaard H.: Metabolic flux distributions in *Penicillium chrysogenum* during fed-batch cultivations. *Biotechnol Bioeng.* 46(2), 171-131, **(1995)**.

Kalinovski S.S., Mookhtiar K. A.: Mechanism of inhibition of yeast squalene synthase by substrate analog inhibitors. *Arch Biochem Biophys*. 368(2), 338-346, **(1999)**.

Köffel R., Tiwari R., Falquet L., Schneiter R.: The *Saccharomyces cerevisiae* YLL012/YEH1, YLR020/YEH2, and TGL1 encodes a novel family of membrane-anchored lipases that are required for steryl ester hydrolysis. *Mol Cell Biol.* 25(5), 1655-1668, **(2005)**.

Köffel R. und Schneiter R.: YEH1 constitutes the major sterol ester hydrolase under heme-defficient conditions in Saccharomyces cerevisiae, *Eukaryot Cell.* 5, 1018-1025, **(2006)**.

Leppimäki P., Mattinen J., Slotte P.: Sterol-induced upregulation of phosphatidylcholine synthesis in cultured fibroblasts is affected by the double-bond position in the sterol tetracyclic ring structure. *Eur J Biochem.* 267, 6385-6394, **(2000)**.

Laupitz, R.*:* Isotopologperturbationsmethoden zur Untersuchung von Stoffwechselnetzwerken. Dissertation, Technische Universität München, **(2006)**.

Leber R., Landl K., Zinser E., Ahorn H., Spok S.D., Kohlwein S.D., Turnowsky F., Daum G.: Dual localization of squalene epoxidase, Erg1p, in yeast reflects a relationship between the endoplasmic reticulum and lipid particles. *Mol Biol Cell.* 9, 375-386, **(1998)**.

Leber R., Zenz R., Schröttner K., Fuchsbichler S., Pühringer B., Turnowsky F.: A novel sequence element is involved in the transcriptional regulation of expression of the ERG1 (squalene epoxidase) gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.* 268(4), 914-924, **(2001)**.

Leaf A.A., RCPCH Standing Committee on Nutrition: Vitamins for babies and young children. Arch Dis Child. 92(2), 160-4, **(2007)**

Lees N.D., Bard M., Kirsch, D.R.: Biochemistry and molecular biology of sterol synthesis inn *Saccharomyces cerevisiae*. In: Parish E.J., Nes W.D.: Biochemistry and functions of sterol. **(1997)**.

Li L., Kaplan J.: Characterization of yeast methyl sterol oxidase (Erg25) and identification of a human homologue. J Biol Chem. 271 (28), 16927-16933, **(1996)**.

Lindenthal B., Aldaghlas T.A., Kelleher J.K., Henkel S.M., Tolba R., Haidl G., von Bergmann K.: Neutral sterols of rat epididymis: high concentrations of dehydrocholesterols in rat caput epididymis. *J Lipid Res.* 42(7), 1089-1095, **(2001)**.

Lorenz R.T., Parks L.W.: Regulation of ergosterol biosynthesis and sterol uptake in a sterol-auxotrophic yeast. *J Bacteriol.* 169(8), 3707–3711, **(1987)**.

Maczek J., Junne S., Nowak P., Goetz P.: Metabolic flux analysis of the sterol pathway in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Bioproc Biosystems Eng.* 29, 241-252, **(2006).**

Magnus J.B., Hollwedel D., Oldiges M., Takors R.: Monitoring and modeling of the reaction dynamics in the valine/leucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Prog.* 22(4), 1071-1083, **(2006)**.

Maaheimo H., Fiaux J., Cakar Z.P., Bailey J.E., Sauer U., Szyperski T.: Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional (13)C labeling of common amino acids. *Eur J Biochem.* 268(8), 2464-2479, **(2001)**.

Marijanovic Z., Laubner D., Möller G., Gege, C., Husen B., Adamski J., Breitling R.: Closing the gap: identification of human 3-ketosteroid reductase, the last unknown enzyme of mammalian cholesterol biosynthesis. *Mol Endocrinol.* 17(9), 1715-1725, **(2006)**.

Maxfield F.R., Tabas I.: Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438, 612-621, **(2005)**.

Milla P., Athenstaedt K., Viola F., Oliaro-Bosso S., Kohlwein S.D., Daum G., Balliano G.: Yeast oxidosqualene cyclase (Erg7p) is major component of lipid particles. *J Biol Chem.* 277(4), 2406-2412, **(2002)**.

Mo C., Bard M.: Erg28p is a key protein in the yeast sterol biosynthetic enzyme complex. *J Lip Res.* 46, 1991-1998, **(2005)**.

Mo C., Valachovic M., Randall S. K., Nickels J.T., Bard M.: Protein-protein interactions among C-4 demethylation enzymes involved in yeast sterol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(15), 9739-9744, **(2002)**.

Mo C., Valachovic M., Bard M.: The ERG28-encoded protein, Erg28p, interacts with both the sterol C-4 demethylation enzyme complex as well as the late biosynthetic protein, the C-24 sterol methyltransferase (Erg6p). *Biochim Biophys Acta.* 1686(1-2), 30-36, **(2004)**.

Müllner H., Daum, G.: Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochim Pol.* 51(2), 323-347, **(2004)**.

Müllner H, Zweytick D., Leber R., Turowsky F., Daum G.: Targeting of proteins involved in sterol biosynthesis to lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1663, 9-13, **(2004)**.

Müllner H. Deutsch G., Leitner E., Ingolic E., Daum G.:*YEH2/YLR20c* encodes a novel steryl ester hydrolase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem.* 280(14), 13321-13328, **(2005)**.

Nagai J., Kawamura S., Katsuki H.: Occurrence of fatty acid esters of sterol intermediates in ergosterol synthesis by yeast during respiratory adaptation. *J Biochem.* 81(6), 1665-1673, **(1977)**.

Neal W.D., Parks L.D.: Sterol 24(28) methylene reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 129(3), 1375-1378, **(1977)**.

Neuwald F., Fetting K.-E.: Cholestanol als W/O-Emulgator in hydrophilen Salben. *Fette, Salben, Anstrichmittel* 66(5), 378-379, **(1964)**.

Nielsen J.: Metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol.* 55(3), 263-283, **(2001)**.

Ohashi Y., Myoho K.: Development of the novel plant-derived lanolin substitute and its cosmetic applications. *J Cosmet Sci.* 57(2), 193-194, **(2006)**.

Ostergaard S., Olsson L., Nielsen J.: *In vivo* dynamics of galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: Metabolic fluxes and metabolite levels. *Biotechnol Bioeng.* 73(5) 412-425, **(2001)**.

Ott R.G., Athenstaedt K., Hrastnik C., Leitner E., Bergler H., Daum G.: Flux of sterol intermediates in a yeast strain deleted of the lanosterol C-14 demethylase Erg11p. *Biochim Biophys Acta* 1735(2), 111-118, **(2005)**.

Palinski W., Yamashita T., Freigang S., Napoli C.: Developmental programming: maternal hypercholesterolemia and immunity influence susceptibility to atherosclerosis. *Nutr Rev.* 65(12Pt2), 182-187, **(2007)**.

Parks L.W., Smith S.J., Crowley J.H.: Biochemical and physiological effects of sterol alterations in yeast - a review. *Lipids* 30(3), 227-230, **(1995)**.

Picque D., Corrieu G.: Performances of aseptic sampling devices for on-line monitoring of fermentation processes. *Biotechnol Bioeng.* 40(8), 919-924, **(1992)**.

Polakowski T.: Molekularbiologische Beeinflussung des Ergosterolstoffwechsels der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Technische Universität Berlin, **(1999)**.

Polakowski T., Stahl U., Lang C.: Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 49(1), 66-71, **(1998)**.

Polakowski T., Bastl R., Stahl U., Lang C.: Enhanced sterol-acyl transferase activity promotes sterol accumulation in Sac*charomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 53(1), 30-35, (1999).

Reisner P.D., Brandt P.C., Vanamann T.C.: Analysis of plasma membrane Ca(2+)-ATPase expression in control and SV40-transformed human fibroblasts. *Cell Calcium.* 21(1), 53-62, **(1997)**.

Reiter-Reimers M., Baltes W.: Über die Analytik von Wollwachs in kosmetischen Erzeugnissen. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung- und Forschung* 183(3), 186-190, **(1986)**.

Rios-Estepa R., Lange B.M.: Experimental and mathematical approaches to modeling plant metabolic networks. *Phytochemistry* 68, 16-18, **(2007)**.

Rios-Estepa R., Turner G.W., Lee J.M., Croteau R.B., Lange B.M.: A systems biology approach identifies the biochemical mechanisms regulating monoterpenoid essential oil composition in peppermint. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(8), 2818-2823, **(2008)**.

Rizzi M., Theobald U., Querfurth E., Rohrhirsch T., Baltes M., Reuss M.: *In vivo* investigations of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng.* 49(3), 316-327, **(1996)**.

Rizzi M., Baltes M., Theobald U., Reuss M.: *In vivo* analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II. Mathematical model. *Biotechnol Bioeng*. 55(4), 592-608, **(1997)**.

Sanager L., Gustavsson M.H., Stahl U., Dahlquist A., Wiberg E., Banas A., Lenman M., Ronne H., Stymne S.: Storage lipid synthesis is not-essential in yeast. *J Biol Chem.* 277(8), 6478-6482, **(2002)**.

Sauer U., Lasko D.R., Fiaux J., Hochuli M., Glaser R., Szyperski T., Wüthrich K., Bailey J.E.: Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of *Escherichia coli* central carbon metabolism. *J Bacteriol.* 181 (21), 6679-6688, **(1999)**.

Schaefer U., Boos W.: Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics. *Anal Biochem.* 270(1), 88-96, **(1999)**.

Schaub J., Mauch K., Reuss M.: Metabolic flux analysis in *Escherichia coli* by integrating isotopic dynamic and isotopic stationary ^{13}C labeling data. *Biotechnol Bioeng* 99(5),1170-1185, **(2008)**.

Schulz-Gasch T., Stahl M.:Mechanistic insights into oxidosqualene cyclizations through homology modelling *J Comput Chem.* 24(6), 741-753, **(2003)**.

Schweizer E., Hofmann J.: Microbial type I fatty acid synthases (FAS): Major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiol Mol Biol Rev*. 68(3), 501-517, **(2004)**.

Shang F., Wang Z., Tan T.: High-cell-density fermentation for ergosterol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng.* 101(1), 38-41, **(2006)**.

Sidorenko Y., Wahl A., Dauner M., Reichl U.: Comparison of metabolic flux distributions for MDCK cell growth in glutamine- and pyruvate-containing media. *Biotechnol Prog.* 24(2), 311-320, **(2008)**.

Smith S.J., Crowley J.H., Parks L.W.: Transcriptional regulation by ergosterol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Bio.* 16(10), 5427-5432, **(1996)**.

Song B.L., Javitt N.B., DeBose-Boyd R.A.: Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab.* 1, 179-189, **(2005)**.

Starr P.R., Parks L.W.: Effect of temperature on sterol metabolism in yeast. *J Cell Physiol.* 59(2), 107-110, **(1965)**.

Stephanopoulos G.: Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metab Eng.* 1(1), 1-11, **(1999)**.

Stephanopoulos G., Aristidou A.A., Nielsen J.: Metabolic engineering. San Diego, Academic Press, **(1998)**.

Stephanopolous G., Vallino J.J.: Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science* 252 (5013), 1675 - 1681, **(1991)**.

Tauber P.: Liposomen als Modelle zur Messung von Wirkstoff/Membranwechselwirkungen. Dissertation, Universität Freiburg, **(2005)**.

Talley D., Cutak B., Rathbone E., Kolla T. Al, Allison D., Blasberg J., Kao K., Caple M.: Synthechol™ synthetic cholesterol for cholesterol dependent cell culture — development of non-animal derived chemically defined NS0 medium. ESACT Proceedings (2), Animal Cell Technology Meets Genomics **(2006)**.

Taylor F.R., Parks L.W.: Metabolic interconversion of free sterols and steryl esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 136, 531-537, **(1978)**.

Ter Linde J.J., Steensma H.Y.: A micro-array assisted screen for potential Hap1 and Rox1 target genes in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* 19(10), 825-840, **(2002)**.

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

Theobald U., Mailinger W.; Baltes W., Rizzi M., Reuss M.: In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: I. Experimental observations. *Biotechnol Bioeng.* 55(2), 305-316, **(1997)**.

Thewke D., Kramer M., Sinensky M.S.: Transcriptional homeostatic control of membrane lipid composition. *Biochem Biophys Res Commun.* 243(19), 1-4, **(2000)**.

Torgov, I.V.: Synthesis of steroids. *Russian Chemical Bulletin* 31(2), 1066-5285, **(1982)**.

Trotter P.J.: The genetics of fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann Rev Nutr.* 21, 97-119, **(2001)**.

Tummala S.B., Junne S.G., Paredes C.J., Papoutsakis E.T.: Transcriptional analysis of product-concentration driven changes in cellular programs of recombinant *Clostridium acetobutylicum* strains. *Biotechnol Bioeng.* 30;84(7):842-854, **(2003b)**.

Vallino J. J., Stephanopoulos G.: Metabolic Flux Distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnol Bioeng.* 41(6), 633-646, **(1993)**.

Vaudano E., Moruno E.G., di Stefano R.: Modulation of geraniol metabolism during alcohol fermentation. *J Inst Brew.* 110(3), 213-219, **(2004)**.

Veen M.: Identifizierung von Regulationsmechanismen des Ergosterolbiosyntheseweges und Etablierung des 7-Dehydrocholesterolbiosyntheseweges in der Hefe *Saccharomyces cerevsiae*. Dissertation, Technische Universität Berlin, **(2002)**.

Veen M., Lang C.: Interactions of the ergosterol biosynthetic pathway with other lipid pathways. *Biochem Soc Trans.* 33, 1178–1181, **(2005).**

Vik A., Rine J.:Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 21 (19), 6395–6405, **(2001)**.

Villas-Bôas S.G., Roessner U., Hansen M.A.E., Smedsgaard J., Nielsen J.: Microbial metabolomics: Rapid sampling techniques to investigate intracellular metabolite dynamics - an overview. Metabol Anal, **(2007)**.

Visser D., Heijnen J.J.: The mathematics of metabolic control analysis revisited. *Metab Eng.* 4(2), 114-123, **(2002)**.

Walker-Caprioglio H.M., Casey W.M., Parks L.W.: *Saccharomyces cerevisiae* membrane sterol modifications in response to growth in the presence of ergosterol. *Appl Environ Microbiol.* 56(9), 2853-2857, **(1990)**.

Weuster-Botz D., de Graaf A.A.: Reaction engineering methods to study intracellular metabolite concentrations. *Adv Biochem Eng Biotech*. 54, 75-108, **(1996)**.

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

Wilcox L.J., Balderes D.A., Wharton B., Tinkelenberg A.H., Rao G.: Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter super-family required for sterol uptake in yeast. *J Biol Chem.* 277 (36), 32466-32472 **(2002)**.

Wittmann C., Heinzle E.: Genealogy profiling through strain improvement by using metabolic network analysis: Metabolic flux genealogy of several generations of lysine-producing corynebacteria. *Appl Environ Microbiol.* 68(12), 5843-5859, **(2002)**.

Wu L., Mashego M.R., Proell A.M., Vinke J.L., Ras C., van Dam J., van Winden W.A., van Gulik W.M., Heijnen J.J.: *In vivo* kinetics of primary metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* studied through prolonged chemostat cultivation. *Metab Eng.* 8(2), 160-171, **(2006)**.

Xu B., Jahic M., Enfors S.-O.: Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 15(1), 81-90, **(1999)**.

Yabusaki Y., Nishino T., Ariga N., Katsuki H.: Studies on delta8-delta7 isomerization and methyl transfer of sterols in ergosterol biosynthesis of yeast. *J Biochem.* 85(6), 1531-1537 **(1979)**.

Yeaman S.J.: Hormone-sensitive lipase - new roles for an old enzyme. *Biochem J.* 379(1), 11-22, **(2004)**.

Yu H., Patel S.B.: Recent insights into the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Clin Genet.* 68(5), 383-391, **(2005)**.

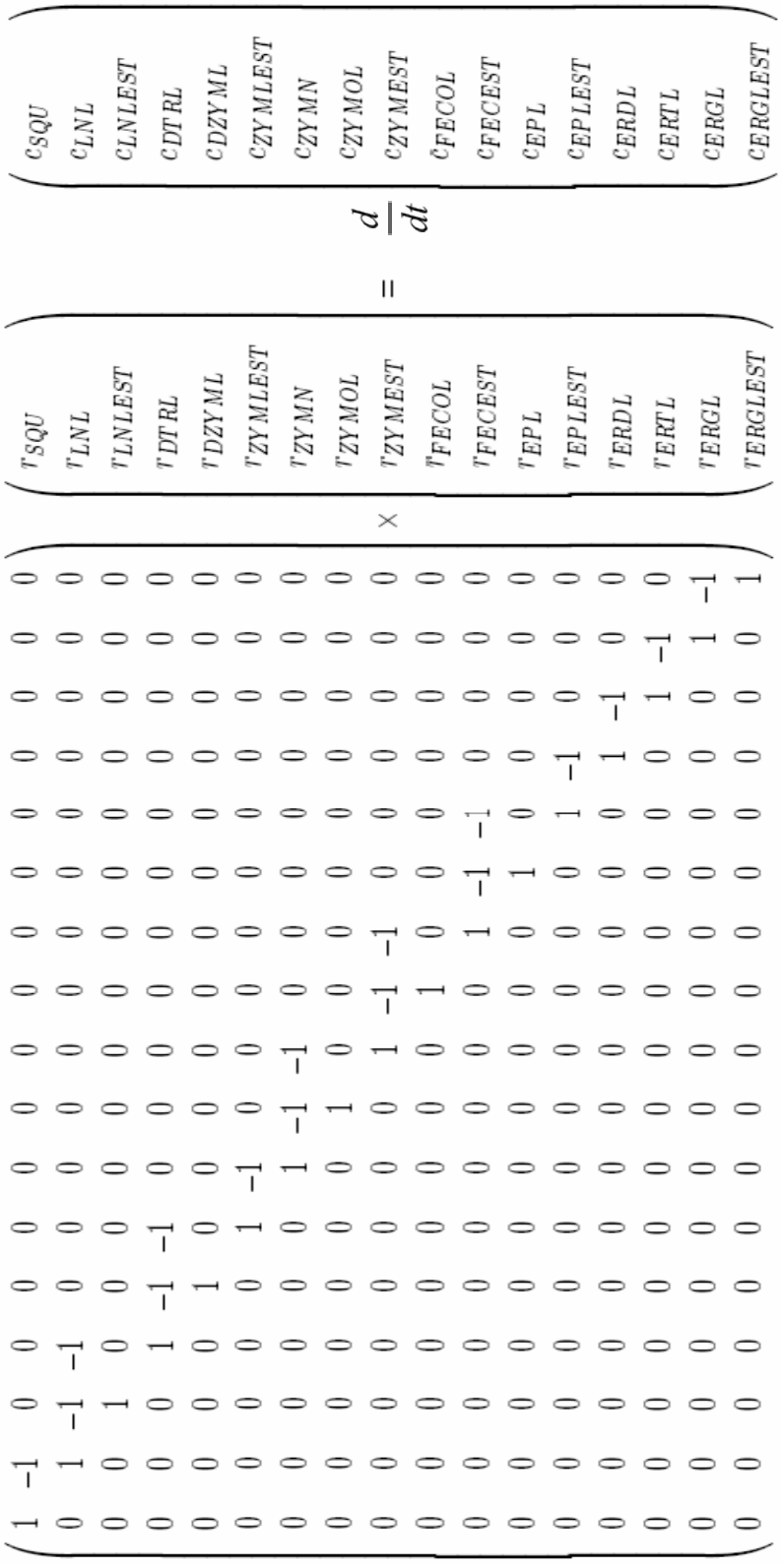
Zinser E., Paltauf F., Daum G.: Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *J Bacteriol.* 175(10), 2853-2958, **(1993)**.

Zulak K.G., Weljie A.M., Vogel H.J., Facchini P.J.: Quantitative 1H NMR metabolomics reveals extensive metabolic reprogramming of primary and secondary metabolism in elicitor-treated opium poppy cell cultures. *BMC Plant Bio.* 8(5), **(2008)**.

Zweytick D., Leitner E., Kohlwein S.D., Yu C., Rothblatt J., Daum G.: Contribution of Are1 and Are2 to steryl ester synthesis in yeast *S.cerevisiae*. *Eur J Biochem.* 267, 1075-1082, **(2000)**.

Anhang A

Stöchiometrische Matrix der Ergosterolbiosynthese



Anhang B-1

Parameterdatei .par (exemplarisch)
zur Berechnung der Stoffflüsse mit COMPFlux©

```
_Num_Components_ = 21
_Num_Parameters_ = 17
rSQU 0.0     10000.0
rLNL  0.0     10000.0
rDTRL0.0     10000.0
rDZYML       0.0     10000.0
rZYMN        0.0     10000.0
rZYM 0.0     10000.0
rFCL  0.0     10000.0
rZYMEST     -10000.0      10000.0
rEPL  -10000.0      10000.0
rFCLEST     -10000.0      10000.0
rEPLEST     -10000.0      10000.0
rERDL        0.0     10000.0
rERTL0.0     10000.0
rERGL        0.0     100000.0
rERGLEST   -100000.0     100000.0
rLNLEST     -1000.0       100.0
rZYMLEST   -100.0100.0
_Species_Names_ = zeit(hr) source squ lanol lnlest dzyml zymlest zymol zymest
fecol fecest epl eplest ergl erglest dtrl zymn erdl ertl Fsqu Flanol Fergl
_Exchangeables_ = 13 squ lanol lnlest dzyml zymlest zymol zymest fecol fecest epl
eplest ergl erglest
_Intermediates_ = 4 dtrl zymn erdl ertl
_Input_Components_ = 4 source Fsqu Flanol Fergl
_Flow_Components_ =  4 source Fsqu Flanol Fergl
_Sample_Size_ = 100000
_Cutoff_Fraction_ = 0.005
_Max_Local_Iterations_ = 300
_Max_Global_Iterations_ = 20
_User_Parameters_ = 0
_Acceptable_Error_ = 2.0
_Specific_Rates_ =
```

Anhang B-2

Datendatei .dat (exemplarisch)
zur Berechnung der Stoffflüsse mit COMPFlux©
Felder zur Eingabe der molaren Konzentrationen sind farblich markiert.

_Measured_Comp_ = 17

_Num_Points_ = 28

zeit(hr)	source		squ	lanol	lnlest	dzyml	zymlest	zymol	zymest
	fecol		fecest	epl	eplest	ergl	erglest	Fsqu	Flanol
					Fergl				
%Error	0.0		0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	0.1		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
					0.1				
MinError	20		0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4
	2		0.25	2	1.5	2	5	5	5
22	0.00		12.49	0.46	0.0120	0.165	0.0265	0.0053	0.070
	0.0815		0.0955	0.28	0.055	0.797	0.73	0	0