

**Charakterisierung der enzymatischen Umsetzung von  
*cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester in  
*Saccharomyces* Stämmen**

vorgelegt von  
Staatl. gepr. Lebensmittelchemikerin  
**Sarah Thörner**  
geb. in Osnabrück

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

|               |                                |
|---------------|--------------------------------|
| Vorsitzender: | Prof. Dr. Juri Rappsilber      |
| Gutachter:    | Prof. Dr. Leif-Alexander Garbe |
| Gutachter:    | Prof. Dr. Harald Lange         |

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 09. Juli 2015

Berlin 2015

**Vielen Dank für...**

...die Betreuung meiner Arbeit: Hr. Prof. Dr. L.-A. Garbe

...die Unterstützung bei der Durchführung

- der Synthese des Substrats/PCR: Hr. A. Bergmann (Studienarbeit 2011  
und Diplomarbeit 2012)

- der Zellkultur: Hr. A. Bergmann (Diplomarbeit 2012)  
Fr. C. Hardtfeldt (Bachelorarbeit 2013)

- der isoelektrischen Fokussierung/SDS PAGE: Fr. Dr. rer. nat. R. Burkhardt  
Fr. L. Knoke (Studienarbeit 2014)

- der Säulenchromatographie: Fr. Dr. rer. nat. E. Martinez Rojas

...den wissenschaftlichen Austausch: Hr. Dr.-Ing. Nils Rettberg

Allen anderen Kollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit im Labor!!!

## Inhaltsverzeichnis

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>1.</b> | <b>Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2.</b> | <b>Theoretische Grundlagen</b>   | <b>3</b>  |
| 2.1       | Grundlagen   | 3         |
| 2.2       | Epoxide und epoxidierte Fettsäuren   | 4         |
| 2.2.1     | Epoxide  | 4         |
| 2.2.2     | Epoxidierte Fettsäuren   | 4         |
| 2.3       | Epoxidhydrolasen   | 5         |
| 2.3.1     | Vorkommen und Funktion   | 5         |
| 2.3.2     | Mechanismus der enzymatische Umwandlung von epoxidierten Fettsäuren                                  | 5         |
| 2.3.3     | Mechanismus der katalytischen Wirkungsweise von Epoxidhydrolasen                                     | 6         |
| 2.3.4     | Epoxidhydrolasen in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  | 7         |
| 2.4       | Lactone  | 9         |
| 2.5       | <i>Saccharomyces</i> Stämme  | 10        |
| 2.5.1     | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  | 10        |
| 2.5.2     | <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>  | 11        |
| 2.5.3     | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Knockout-Mutante   | 12        |
| 2.6       | Stand der Wissenschaft   | 13        |
| 2.7       | Ziel der Arbeit  | 15        |
| <b>3.</b> | <b>Material und Methoden</b>   | <b>16</b> |
| 3.1       | Chemikalien  | 16        |
| 3.2       | Geräte   | 17        |
| 3.2.1     | Gaschromatographie-Massenspektrometrie   | 17        |
| 3.2.2     | Weitere Geräte   | 18        |
| 3.3       | Synthese/Analyse des <i>cis</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters | 20        |
| 3.3.1     | Synthese der 3-Decinsäure  | 20        |
| 3.3.2     | Synthese des 3-Decinsäuremethylesters  | 21        |
| 3.3.3     | Synthese des <i>cis</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-Decensäuremethylesters                | 21        |
| 3.3.4     | Synthese des <i>cis</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3,4-Epoxydecensäuremethylesters         | 21        |
| 3.3.5     | Dünnschicht-Chromatographie  | 22        |
| 3.3.6     | Saure Hydrolyse des <i>cis</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters  | 22        |
| 3.3.7     | Silylierung der Syntheseprodukte   | 22        |
| 3.4       | Arbeitsvorschriften für die PCR-Analyse  | 23        |
| 3.4.1     | Isolierung genomischer DNA   | 23        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.4.2     | PCR  | 24        |
| 3.4.3     | Gelelektrophorese  | 26        |
| 3.5       | Arbeitsvorschriften für die Hefekulturen   | 27        |
| 3.5.1     | Mikroorganismen  | 27        |
| 3.5.2     | Medium   | 27        |
| 3.5.3     | Puffer   | 28        |
| 3.5.4     | Zellanzucht  | 28        |
| 3.5.5     | Abzentrifugieren des Hefemediums   | 29        |
| 3.5.6     | Bestimmung der optischen Dichte und pH-Wert Messung  | 29        |
| 3.5.7     | Zellaufschluss   | 30        |
| 3.5.8     | Ammoniumsulfatfällung  | 31        |
| 3.5.9     | Dialyse  | 31        |
| 3.5.10    | Proteinbestimmung nach Bradford  | 32        |
| 3.5.11    | Isoelektrische Fokussierung  | 32        |
| 3.5.12    | Inkubation/Enzymparameterterest  | 33        |
| 3.5.13    | Probenvorbereitung/Extraktion  | 33        |
| 3.5.14    | Syllierung der Fermentationsproben und GC/MS-Messung   | 33        |
| 3.5.15    | SDS-PAGE   | 33        |
| <b>4.</b> | <b>Ergebnisse und Diskussion</b>   | <b>35</b> |
| 4.1       | Synthese des <i>cis</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters | 36        |
| 4.1.1     | Synthese der 3-Decinsäure  | 36        |
| 4.1.2     | Synthese des 3-Decinsäuremethylesters  | 38        |
| 4.1.3     | Synthese des <i>cis</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-Decensäuremethylester         | 39        |
| 4.1.4     | Synthese des <i>cis</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters | 42        |
| 4.2       | Entwicklung einer GC-SIM-MS-Methode  | 43        |
| 4.3       | PCR-Analytik   | 49        |
| 4.3.1     | Isolierung genomischer DNA   | 49        |
| 4.3.2     | PCR  | 50        |
| 4.4       | Parameter Zellkultur und Inkubation  | 53        |
| 4.4.1     | Grundparameter   | 54        |
| 4.4.2     | Entwicklung Enzymparameterterest und Probenvorbereitung                                      | 57        |
| 4.4.3     | pH-Optimum Phosphatpuffer  | 59        |
| 4.4.4     | pH-Optimum Tris/EDTA-Puffer  | 69        |
| 4.4.5     | Zell- und Substratkonzentration  | 73        |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 4.4.6     | Pufferkonzentration und Inkubationszeit   | 77         |
| 4.4.7     | Temperatur und Schüttelfrequenz   | 80         |
| 4.4.8     | Zusammenfassung der Parameter   | 82         |
| 4.5       | Zellaufschluss  | 84         |
| 4.5.1     | <i>S. cerevisiae</i> Mutante  | 85         |
| 4.5.2     | <i>S. cerevisiae</i> Wildtyp, <i>S. carlsbergensis</i> RH und <i>S. bayanus</i> | 89         |
| 4.6       | Isoelektrische Fokussierung   | 92         |
| 4.6.1     | Grundparameter und Proteinbestimmung nach Bradford                              | 93         |
| 4.6.2     | <i>S. cerevisiae</i> Mutante Proteinmenge und Ampholyte pH-Bereich 3 bis 10     | 95         |
| 4.6.3     | <i>S. cerevisiae</i> Mutante pH-Wert Einstellung                                | 102        |
| 4.6.4     | <i>S. cerevisiae</i> Mutante Ampholyte pH-Bereich 4 bis 6 und 5 bis 7           | 104        |
| 4.6.5     | <i>S. cerevisiae</i> Wildtyp, <i>S. carlsbergensis</i> RH und <i>S. bayanus</i> | 108        |
| 4.7       | SDS-PAGE  | 115        |
| 4.7.1     | <i>S. cerevisiae</i> Mutante  | 116        |
| 4.7.2     | <i>S. cerevisiae</i> Wildtyp, <i>S. carlsbergensis</i> RH und <i>S. bayanus</i> | 120        |
| 4.8       | Ausblick  | 124        |
| <b>5.</b> | <b>Zusammenfassung</b>  | <b>127</b> |
| <b>6.</b> | <b>Literaturverzeichnis</b>   | <b>131</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>Abb.</b>            | Abbildung  |
| AcOH                   | Essigsäure   |
| Am                     | Überstand nach Ammoniumsulfatfällung   |
| <b>B</b>               | <i>Saccharomyces bayanus</i>   |
| bp                     | Basenpaare   |
| BSTFA                  | N,O-bis-Trimethylsilyltrifluoracetamid   |
| BW                     | Blindwert  |
| cEH                    | lösliche Epoxidhydrolase, frei im Cytosol vorliegend   |
| <b>DTT</b>             | 1,4-thiothreitol   |
| DHETE                  | Dihydroxy-7,9- <i>trans</i> -11,14- <i>cis</i> -eicosatetraensäure   |
| dest.                  | destilliert  |
| DNA                    | Desoxyribonukleinsäure   |
| <b>EDTA</b>            | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| EI                     | Elektronenstoßionisation   |
| eq.                    | äquimolare Menge bezogen auf das Substrat  |
| <i>erythro</i> -DiOH   | <i>erythro</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3,4-Dihydroxydekansäure  |
| <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-Hydroxy-γ-decalacton   |
| EtOAc                  | Ethylacetat  |
| EH                     | Epoxidhydrolase(n)   |
| EH-1                   | unbekanntes Enzym, welches epoxidierte Fettsäuren in ihre vicinalen Dirole hydrolysiert  |
| EtOH                   | Ethanol  |
| E/t-Quotient           | Quotient aus der Summe der Konzentrationen der <i>erythro</i> -Produkte und der Summe der Konzentrationen der <i>threo</i> -Produkte |
| <b>GC</b>              | Gaschromatograph/-graphie  |
| GR                     | Marker für die Basenpaare (GeneRuler-Ladder-Mix )  |
| GZ                     | ganze Zellen   |
| <sup>2</sup> H         | Deuterium  |
| IEF                    | Isoelektrische Fokussierung  |
| IEP                    | Isoelektrischer Punkt  |
| ISTD                   | Interner Standard  |
| <b>K</b>               | Proteinmarker (BioRad Kaleidoscope)  |
| LTA <sub>4</sub>       | 5S,6S-Epoxy-7,9- <i>trans</i> -11,14- <i>cis</i> -eicosatetraensäure (Leukotrien A <sub>4</sub> )                                    |

|                    |  |
|--------------------|--|
| LTA <sub>4</sub> H | Leukotrien-A <sub>4</sub> -Hydrolase (LTA <sub>4</sub> Hydrolase)                            |
| LTB                | 5S,12R-Dihydroxy-6,14-cis-8,10- <i>trans</i> -eicosatetraensäure(Leukotrien B <sub>4</sub> ) |
| <b>M</b>           | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 ΔYNL045W (Mutante)                                    |
| mCPBA              | <i>meta</i> -Chloroperbenzoesäure  |
| ME                 | -methylester   |
| mEH                | membrangebundene Epoxidhydrolase   |
| MeOH               | Methanol   |
| MG                 | Molekulargewicht   |
| MS                 | Massenspektrometer/-metrie   |
| m/z                | Verhältnis von Masse zu Ladung   |
| nD                 | Überstand nach Dialyse   |
| NK                 | Negativkontrolle   |
| OD                 | Optische Dichte  |
| ORF                | offener Leserahmen (Open-Reading-Frame)  |
| <b>P</b>           | Pellet   |
| p.a.               | per analysis (Analysenqualität)  |
| PAGE               | Polyacrylamidgel-Elektrophorese  |
| PCC                | Pyridin-Chloro-Chromat   |
| PCR                | Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction)  |
| Pd                 | Palladium  |
| PTM                | posttranslationale Modifikation  |
| PZ                 | nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer   |
| <b>RH</b>          | <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> RH (RH Stamm)  |
| RNA                | Ribonukleinsäure   |
| RT                 | Raumtemperatur   |
| R <sub>T</sub>     | Retentionszeit   |
| <b>S.</b>          | <i>Saccharomyces</i>   |
| SDS                | Natriumdodecylsulfat (Sodium-Dodecyl-Sulfat)   |
| SEC                | Größenausschlusschromatographie  |
| SIM                | Selektiv-Ionen-Modus (Selected-Ion-Monitoring)   |
| SN <sub>1</sub>    | nucleophile Substitution erster Ordnung  |
| T <sub>A</sub>     | Anlagerungstemperatur  |
| Tab.               | Tabelle  |

|                      |   |
|----------------------|---|
| TAE-Puffer           | Tris-Acetat-EDTA-Puffer   |
| T/E-Puffer           | Tris/EDTA-Puffer  |
| <i>threo</i> -DiOH   | <i>threo</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3,4-Dihydroxydecansäure |
| <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-Hydroxy-γ-decalacton  |
| TRIS                 | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol                                 |
| TMS                  | -trimethylsilyl-  |
| t <sub>s</sub>       | Elongationzeit  |
| Ü                    | Überstand   |
| verd.                | verdünnt  |
| (v/v)                | Volumenanteil   |
| WT                   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 (Wildtyp)                          |
| (w/w) %              | Massenanteil  |
| ZA                   | Zellaufschluss  |

## 1. Einleitung

Die Untersuchung von Enzymen und enzymatischen Abbauwegen in Mikroorganismen bedient einerseits vielseitige Forschungsinteressen z. B. im medizinischen Bereich und bietet andererseits eine Möglichkeit zur gezielten Herstellung von industriell gefertigten biotechnologischen Produkten. Enzymatische Reaktionen und Biotransformationen zeichnen sich im Vergleich zu chemischen Herstellungsprozessen durch hohe Selektivität und Spezifität aus.

Der Abbaumechanismus von epoxidierten Fettsäuren ist wissenschaftlich von besonderem Interesse, da sie verbreitet in Zellen vorkommen.

Auf der einen Seite erfüllen sie wichtige Aufgaben, dienen als Lock- und Botenstoffe oder regulieren die Abwehr von Pathogenen, auf der anderen Seite können sie aufgrund ihrer gespannten Ringstruktur toxisch, kanzerogen und mutagen wirken. Die enzymatische Umsetzung epoxidierter Fettsäuren zu ihren vicinalen Diolen erfolgt durch hydrolytische Umwandlung, die vor allem durch Epoxidhydrolasen katalysiert wird. Dabei werden unter Inversion der Konfiguration (*trans*-Hydrolyse) aus *cis*-Epoxiden *threo*-Diole und aus *trans*-Epoxiden *erythro*-Diole. Diese Diole können weiter zu Hydroxylactonen reagieren, welche in der Folge zu Lactonen umgewandelt und als Aroma- und Geschmacksstoffe in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden. Die einzig für *Saccharomyces cerevisiae* bekannte Epoxidhydrolase ist die Leukotrien A<sub>4</sub> Hydrolase. Sie katalysiert substratspezifisch bei Leukotrien A<sub>4</sub>, das angegriffene C-Atom umgekehrt zu den anderen Epoxidhydrolasen unter Retention der Konfiguration.

In Versuchen voran gegangener Arbeiten konnte mittels der Substrate *cis*- und *trans*-[9,10-<sup>18</sup>O]-9,10-Epoxyhexadecansäureethylester das Abbauprodukt *erythro*-3-Hydroxy- $\gamma$ -decalacton bestimmt werden. Somit entstand es einmal unter Inversion der Konfiguration (*trans*-Hydrolyse) und einmal unter Retention der Konfiguration. Um weitere Epoxidhydrolasen in *Saccharomyces* Stämmen charakterisieren zu können sind weitere Untersuchungen nötig.

Zu diesem Zweck soll in der hier vorliegenden Arbeit zunächst eine epoxidierte Fettsäure, *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäure als Methyl ester, synthetisiert und eine GC-SIM-MS Methode zur Analyse seiner Abbauprodukte etabliert werden. Die Einführung einer Isotopenmarkierung in das Substrat erlaubt eine eindeutige Unterscheidung der Abbauprodukte von endogen gebildeten Metaboliten.

Im Folgenden soll ein Enzymparameterstest zur Untersuchung der enzymatischen Umwandlung des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters über vicinale Dihydroxysäuren in Hydroxylactone entwickelt werden. Dabei sollen die Inkubationsparameter für ein bisher unbekanntes Enzym EH-1, welches analog zur Leukotrien A<sub>4</sub> Hydrolase unter Retention der Konfiguration arbeitet, optimiert werden. Für die Untersuchungen wird eine Leukotrien A<sub>4</sub> Hydrolase deletierte Knockout-Mutante (*Saccharomyces cerevisiae* BY4741 ΔYNL045W) verwendet. Die Ergebnisse sollen mit weiteren *Saccharomyces* Stämmen (*Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (Wildtyp), *Saccharomyces carlsbergensis* RH und *Saccharomyces bayanus*) verglichen werden.

Abschließend soll eine möglichst umfassende Charakterisierung des Enzyms EH-1 mit enzymatischer Aktivität gegenüber der epoxidierten Fettsäure *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäure in der Knockout-Mutante *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 ΔYNL045W erzielt werden.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1 Grundlagen

In der Biotechnologie werden Mikroorganismen wie Pilze (z. B. *Penicillium notatum*), Hefen (z. B. *Saccharomyces cerevisiae*) oder Bakterien (z. B. *Escherichia coli*) für verschiedene Fragestellungen genutzt. Sie finden Anwendung in der (medizinischen) Forschung, werden aber auch in der Lebensmittelindustrie zur Herstellung von Aroma- und Geschmacksstoffen eingesetzt.

Daher ist es von besonderem Interesse die Stoffwechselwege von Mikroorganismen aufzuklären, um sie zu verstehen und in Folge effektiv nutzen zu können. Wenn die Reaktionsmechanismen in Mikroorganismen bekannt sind, kann die Produktion von unerwünschten Nebenprodukten durch gentechnische Veränderungen des Mikroorganismus verhindert werden. Hauptsächlich finden genetische Veränderungen in Mikroorganismen bei ihren Enzymen statt.

Durch die Verwendung von Enzymen wird der Einsatz teurer chemischer Katalysatoren überflüssig und minimiert eine aufwändige Aufbereitung oder Reinigung der Produkte. Deshalb kommt der Untersuchung und Charakterisierung von unbekanntem Enzymen und enzymatischen Abbauwegen in Mikroorganismen für viele Forschungs- und Industriezweige eine große Bedeutung zu. Im Bereich der Medizin und Diagnostik können Enzyme, deren Funktion bekannt ist, für Problemstellungen gezielt durch Fusion mit anderen Proteinen modifiziert werden. In der Biotechnologie bietet der gezielte Einsatz von Enzymen eine Möglichkeit zur gezielten Herstellung von Feinchemikalien, die gegenüber chemischen Synthesewegen mit hoher Selektivität katalysiert werden.

Ein besonderes Beispiel stellen dabei Epoxidhydrolasen (EH) und ihre enzymatische Funktion dar. Dabei sind sowohl der Abbau des Substrats, die enantioselektive Biokatalyse [1] und die resultierenden Produkte von Interesse.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden Enzyme (siehe 2.3), die epoxidierte Fettsäuren in ihre vicinalen Diole umwandeln, in (genetisch veränderten) *Saccharomyces* Stämmen (siehe 2.5) untersucht. Als epoxidiertes Substrat wird dabei ein isotopenmarkierter Epoxydecansäuremethylester (siehe 2.2) eingesetzt, bei dessen Abbau Hydroxylactone entstehen (siehe 2.4).

## 2.2 Epoxide und epoxidierte Fettsäuren

### 2.2.1 Epoxide

Epoxide, die auch als Oxirane bezeichnet werden, sind heterozyklische Verbindungen, die in ihrer Epoxidbrücke ein Sauerstoffatom tragen. Sie können aufgrund ihrer gespannten Ringstruktur toxisch, kanzerogen und mutagen wirken, indem sie mit ihren nukleophilen Gruppen mit DNA, RNA und Proteinen reagieren [2].

In der Natur treten Epoxide im Cutin in der Cuticula von Pflanzen auf [3]. Cutin ist aus Monomeren von Hydroxysäuren aufgebaut, die über Ester- und Epoxidbindungen polymerisieren. Diese Schicht bildet zusammen mit Zellulose, Pektin u. a. eine wachsartige nahezu wasserundurchlässige Schicht.

Auf einigen Gebieten der Medizin wird ebenfalls nach den Ursachen von Erkrankungen geforscht an denen Epoxide und ihre Abbauprodukte beteiligt sein können. So wurde die enzymatische Umsetzung von Leukotoxin (*cis*-9,10-Epoxy-12(Z)-octadecenoat) und Isoleukotoxin (*cis*-12,13-Epoxy-9(Z)-octadecenoat) in die entsprechenden Dirole in Zusammenhang mit Brustkrebs und akutem progressiven Lungenversagen gebracht [4, 5].

### 2.2.2 Epoxidierte Fettsäuren

Zur Substanzklasse der Epoxide gehören auch die epoxidierten Fettsäuren, so wie die in dieser Arbeit als Substrat dienende *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäure in Form ihres Methylesters. Epoxidierte Fettsäuren werden in der Natur gebildet, wenn ungesättigte Fettsäuren durch peroxidischen Sauerstoff oder enzymatisch durch Cytochrom P450 Monooxygenasen oxygeniert werden [6]. Epoxidierte Fettsäuren sind wissenschaftlich von besonderem Interesse, da sie ubiquitär vorkommen und ein breites Wirkungsspektrum besitzen. In Pflanzen regulieren sie die Abwehrreaktionen von Pathogenen, in Tieren sind sie an Entzündungsreaktionen und als Botenstoffe in immunologischen Prozessen beteiligt [7]. Die epoxidierten Fettsäuren Thromboxan, Prostaglandin und Leukotrien werden aus der Arachidonsäurekaskade (5, 8, 11, 14-Eicosatetraensäure) gebildet und nehmen dabei gegensätzliche Funktionen ein. Thromboxan bewirkt die Aggregation von Thrombozyten und fördert damit den Gerinnungsprozess, dagegen wird der Gerinnungsprozess von Prostaglandin gehemmt. Leukotrien kommt in Leukozyten vor und spielt eine Rolle bei allergischen und entzündlichen Prozessen [8, 9].

## 2.3 Epoxidhydrolasen

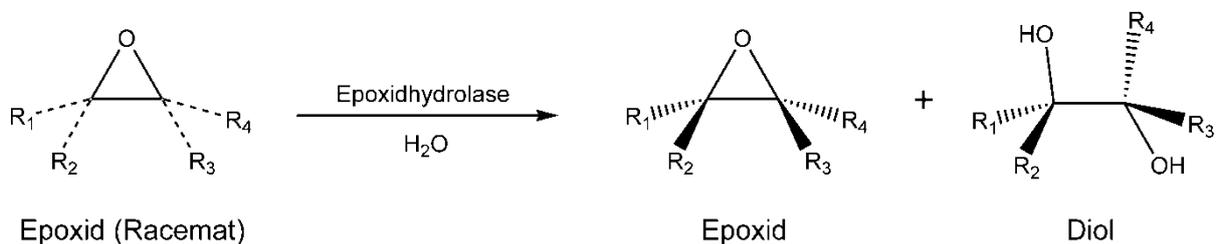
### 2.3.1 Vorkommen und Funktion

Epoxidhydrolasen, die im Mittelpunkt der Untersuchungen dieser Arbeit stehen, sind ubiquitär in vielen Organismen wie Säugetieren [10], Pflanzen [11], Insekten [12], Bakterien [13, 14, 15], Fischen [16], filamentösen Pilzen [17, 18, 19] und Hefen [20, 21] verbreitet. Dort erfüllen sie unterschiedliche Funktionen wie die Entgiftung, die Regulation des Katabolismus und die Steuerung von Signalmolekülen [22]. In Pflanzen sind sie an der Regulation der Stressantwort beteiligt, in Mikroorganismen sind sie an der Entstehung von Kohlenwasserstoffen beteiligt, die für den Abbaustoffwechsel relevant sind [10]. Die bisher in Säugetieren charakterisierten Epoxidhydrolasen werden in mikrosomale bzw. gebundene Epoxidhydrolasen (mEH) [23, 24, 25] sowie in cytosolisch vorliegende bzw. lösliche Epoxidhydrolasen (cEH) [26, 27] unterteilt.

Die Funktionen der cEHs liegen hier vor allem in der Regulation des Blutdrucks und der Regulation der Entzündungsantwort [28, 29]. Die Aufgabe der mEHs ist vor allem die Detoxifizierung von Zellen sowie die Abwehr verschiedener Krankheiten [30, 31].

### 2.3.2 Mechanismus der enzymatische Umwandlung von epoxidierten Fettsäuren

Die enzymatische Umsetzung von epoxidierten Fettsäuren zu ihren Diolen katalysieren Epoxidhydrolasen durch regio- und enantioselektive Hydrolyse. Dabei erfolgt eine Umwandlung zu ihren vicinalen Diolen (*trans*-Hydrolyse) [32]. Die Reaktion läuft nach dem Mechanismus einer  $S_N2$ -Reaktion ab und ist unabhängig von Cofaktoren. Dabei wird die Etherbindung des Epoxids gespalten und Wasser addiert, so dass ein *trans*-konfiguriertes 1,2-Diol gebildet wird (siehe Abb. 1) [33, 34, 35].



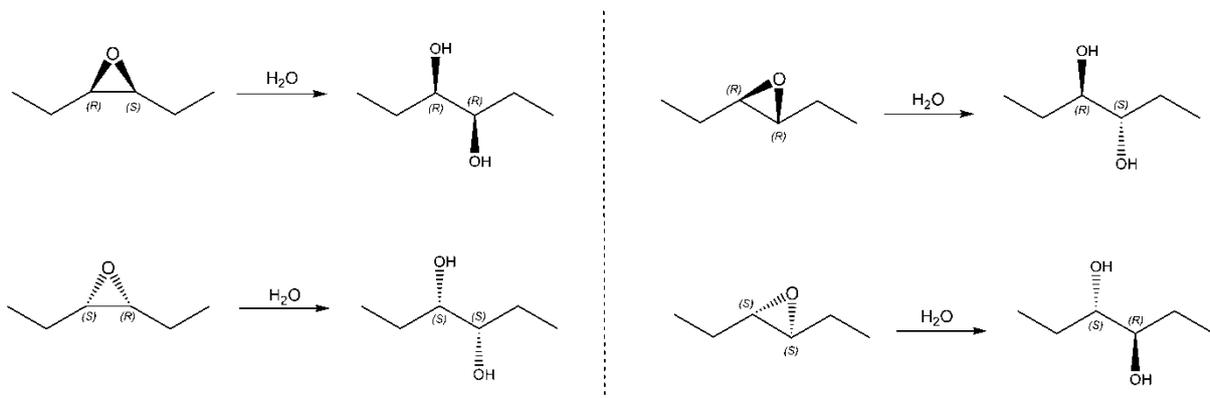
**Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung einer enantioselektiven Bildung eines Diols durch enzymatisch katalysierte Addition von Wasser an einen Epoxidring.**

Von besonderem Interesse ist dabei die Umwandlung von epoxidierten Fettsäuren durch mEH in der Leber, da sie in der Nähe der Cytochrom P 450 Enzyme liegen und so relativ schnell nach der Bildung (siehe 2.2) in die entsprechenden Diole umgewandelt werden können [22]. Dies entspricht der in 2.3.1 aufgeführten Funktion der Entgiftung der Zelle, da

die polaren Diole als Zuckerkonjugate aus der Zelle analog der Medikamentenentgiftung (Phase-II-Mechanismus) ausgeschleust werden können [36].

### 2.3.3 Mechanismus der katalytischen Wirkungsweise von Epoxidhydrolasen

In der Literatur ist die Umsetzung von Epoxiden zu den entsprechenden Diolen durch EH als Reaktion nach dem  $S_N2$ -Mechanismus unter Inversion der Konfiguration beschrieben (*trans*-Hydrolyse) [35]. Im aktiven Zentrum des Enzyms befindet sich eine katalytische Triade, die entweder aus den drei Aminosäuren Histidin, Asparaginsäure und Glutaminsäure bzw. Histidin und zweimal Asparaginsäure besteht. Zu Beginn greift der nukleophile Carboxylrest der Asparaginsäure die epoxidierte Fettsäure an der Rückseite des weniger sterisch gehinderten Kohlenstoffatoms an und öffnet dadurch den Epoxidring. Zwischen der epoxidierten Fettsäure und dem aktiven Zentrum der Epoxidhydrolase bildet sich ein Esterzwischenprodukt, ein kovalent gebundenes Substrat-Enzym-Intermediat. Anschließend greift ein Histidin-aktiviertes basisches Wassermolekül am Carbonyl-Kohlenstoff der Esterbindung an. Das entstandene vicinale Diol wird frei gesetzt und das Enzym regeneriert [37, 38, 39]. Dabei werden aus *cis*-Epoxiden (*erythro*) *threo*-Diolen und aus *trans*-Epoxiden (*threo*) *erythro*-Diolen (siehe Abb. 2).



**Abbildung 2: Enzymatisch katalysierte Hydrolyse von Epoxiden unter Inversion der Konfiguration - links: *trans*-Hydrolyse der *cis*-Epoxide (*erythro*) zu *threo*-Diolen - rechts: *trans*-Hydrolyse der *trans*-Epoxide (*threo*) zu *erythro*-Diolen.**

In wässriger Lösung werden 3,4-Diole, 4,5-Diole oder 5,6-Diole in einem autokatalytischen Weg zu Lactonen umgewandelt [40, 41].

#### 2.3.4 Epoxidhydrolasen in *Saccharomyces cerevisiae*

Im Gegensatz zu dem unter 2.3.3 beschriebenen Reaktionsmechanismus katalysiert die bisher einzig für *Saccharomyces cerevisiae* bekannte Epoxidhydrolase, die Leukotrien A<sub>4</sub>-Hydrolase (LTA<sub>4</sub>H), das angegriffene C-Atom unter Retention der Konfiguration [42]. Bei der Umwandlung unter Retention der Konfiguration werden beispielsweise aus *trans*-Epoxiden *threo*-Diole und nicht wie bei der Umwandlung unter Inversion der Konfiguration *erythro*-Diol (siehe Abb. 2 und 3 a).

Das Enzym LTA<sub>4</sub>H besitzt eine hohe Substratspezifität gegenüber Leukotrien A<sub>4</sub> und hat als bifunktionales Enzym neben der Hydrolase- auch eine Leucyl-Aminopeptidaseaktivität [42, 43].

Im Menschen spielt die LTA<sub>4</sub>H eine wesentliche Rolle bei inflammatorischen Vorgängen und ist an Entzündungsprozessen beteiligt [43]. Zwischen der LTA<sub>4</sub>H im Menschen und der, die in *Saccharomyces cerevisiae* gefunden wurde, konnte eine hohe genetische Übereinstimmung festgestellt werden [44]. Beim menschlichen Arachidonstoffwechsel wird aus 5-Hydroperoxyeicosatetraensäure (5-HPETE) das Intermediat 5S,6S-Epoxy-7,9-*trans*-11,14-*cis*-eicosatetraensäure (Leukotrien A<sub>4</sub> - LTA<sub>4</sub>) gebildet. Aufgrund seiner Instabilität wird es über LTA<sub>4</sub>H zur aktiven Form 5S,12R-Dihydroxy-6,14-*cis*-8,10-*trans*-eicosatetraensäure (Leukotrien B<sub>4</sub> - LTB<sub>4</sub>) umgewandelt. In *S. cerevisiae* konnte die Entstehung von 5S,6S-Dihydroxy-7,9-*trans*-11,14-*cis*-eicosatetraensäure (5S,6S-DHETE) aus LTA<sub>4</sub> nachgewiesen werden [42].

Entgegen der humanen LTA<sub>4</sub>H, die LTB<sub>4</sub> produziert, bildet die LTA<sub>4</sub>H in *S. cerevisiae* drei Produkte. Neben 5S,6S-DHETE entstehen in geringeren Konzentrationen LTB<sub>4</sub> sowie 5S,12R-Dihydroxy-6,10-*trans*-8,14-*cis*-Eicosatetraensäure (siehe Abb. 3 b) [45]. Die Umwandlung verläuft nach dem Mechanismus einer SN<sub>1</sub>-Reaktion [46].

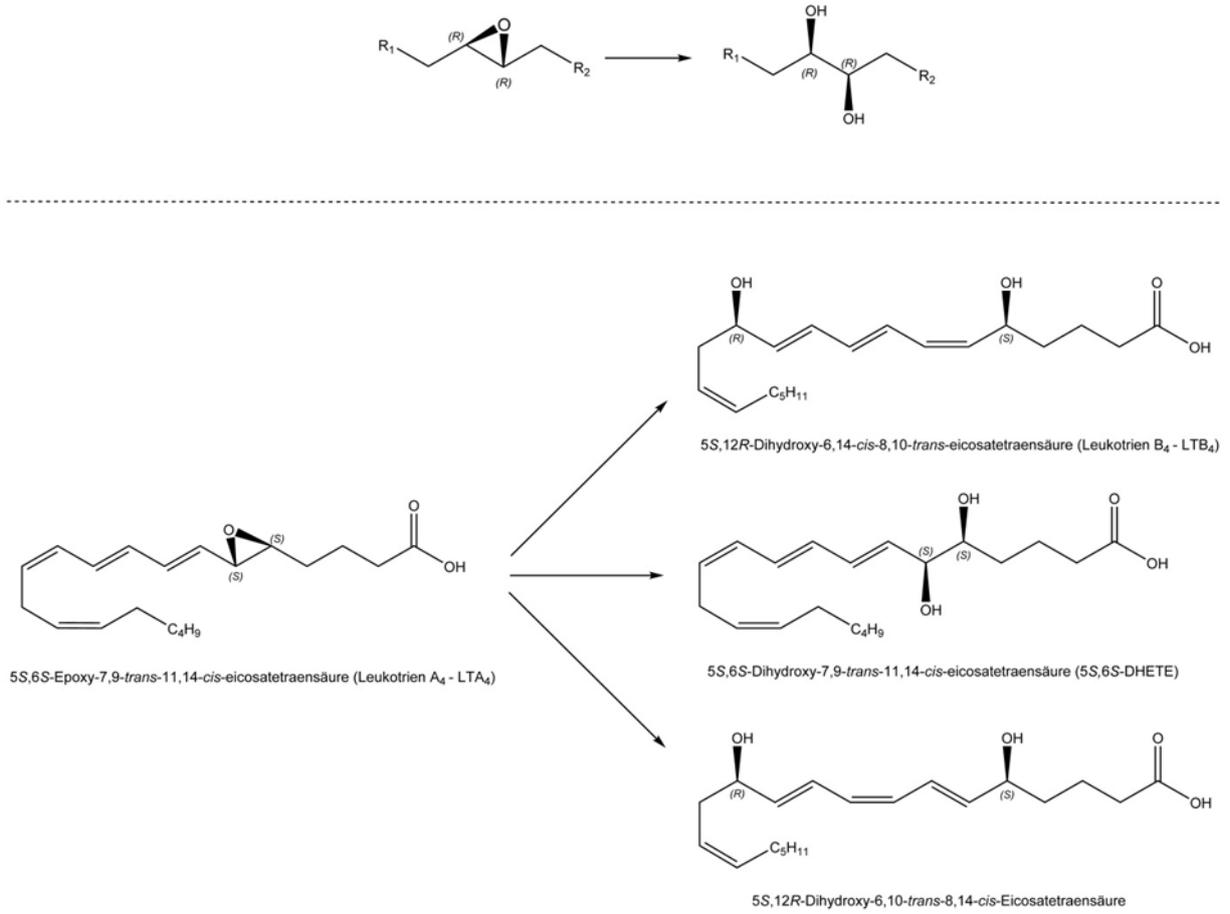


Abbildung 3: Enzymatisch katalysierte Hydrolyse eines Epoxids unter Retention der Konfiguration: Allgemein - *trans*-Epoxide (*erythro*) werden zu *threo*-Diolen (a – oben) / Beispiel -  $LTA_4$  reagiert zu  $LTB_4$ ,  $5S,12R$ -Dihydroxy-6,10-*trans*-8,14-*cis*-Eicosatetraensäure und  $5S,6S$ -DHETE [47] (b – unten).

## 2.4 Lactone

Das *erythro*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Hydroxy- $\gamma$ -Decalacton ist das Endprodukt, des in der vorliegenden Arbeit zu untersuchenden enzymatischen Abbaumechanismus des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters.

Die Erkenntnisse zur Entstehung von 3-Hydroxy- $\gamma$ -Decalactonen in Hefen wurde maßgeblich durch die Arbeiten voran gebracht, die sich mit der Umwandlung von Ricinolsäuremethylester in *Yarrowia lipolytica* beschäftigten [47, 48]. Auch in *S. cerevisiae* gab es bereits Veröffentlichungen zur Bildung und Charakterisierung von Hydroxy- $\gamma$ -lactonen [49, 50].

Allgemein können Hydroxylactone weiter zu so genannten Lactonen reagieren. Als Lactone werden Moleküle bezeichnet, deren Molekülketten mindestens eine intramolekulare Esterbindung besitzen. In vielen Fällen sind es cyclische Ester von Hydroxycarbonsäuren oder Kohlenhydraten. Die Stabilität der sich bildenden Ringstruktur wird im Wesentlichen vom Abstand zwischen Hydroxyl- und Carboxyl-Gruppen bestimmt. Die Lactone mit Fünf- bis Siebenring ( $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Lactone) bilden hierbei die stabilsten Formen [40]. Zu den Lactonen zählen u. a. Ascorbinsäure (Vitamin C), Cumarin und einige wichtige Aromastoffe, wie  $\gamma$ - und  $\delta$ -Lactone. Das Fruchtaroma von Aprikosen und Pfirsichen [51] wird genauso wie die buttrigen Aromen der Kokosnuss [52] maßgeblich von  $\gamma$ - und  $\delta$ -Lactonen bestimmt. Die biotechnologische Herstellung dieser Aromastoffe ist von besonderer Bedeutung, da sie in zahlreiche Lebens- und Genussmitteln Verwendung finden und die ihre natürlichen Quellen nicht ausreichend sind [53, 54, 55]. Die Geschmacks- und Geruchsrezeptoren des Menschen sind in der Lage chirale Aromastoffe (Lactone) voneinander zu unterscheiden. Diese besitzen andere Geruchs- bzw. Geschmackseigenschaften [56, 57].

Weiter können Lactone als Pflanzenschutzmittel eingesetzt werden. Zum Beispiel besitzt  $\gamma$ -Decalacton, das als Hauptkomponente des Pfirsicharomas gilt, sowohl die Funktion als Sexuallockstoff [58 59, 60] als auch die Wirkung als Abwehrpheromon [61, 62]. Letzteres lässt sich für den Einsatz als ökologisches Schädlingsbekämpfungsmittel nutzbar machen [63].

Aufgrund des breiten Anwendungsbereiches kommt der enzymatischen Erzeugung von Lactonen durch Mikroorganismen eine besondere Bedeutung zu.

## 2.5 *Saccharomyces* Stämme

Im Vergleich zu Bakterien, die zu den Prokaryonten gehören, sind die *Saccharomyces* Stämme, die im Rahmen dieser Arbeit als Modellorganismus genutzt werden, den Eukaryonten zugeordnet. Sie stellen eine Gattung in der Familie der Saccharomycetaceae dar und gehören zu der Ordnung der echten Hefen (Ascomyceten, einzellige Pilze) in der Klasse der Saccharomyceten und gelten als nicht pathogen. Sie vermehren sich durch Sprossung [64]. Ihre Kolonien wachsen schnell, cremefarben und sind von flacher und glatter Struktur. Ihre Zellen sind rund bis oval mit einem Durchmesser von 5 bis 10 µm und einer Länge von 3 bis 25 µm. *Saccharomyces* Hefen sind relativ tolerant gegenüber schwankenden pH-Werten (3 bis 11) und Temperaturen (0 bis 45 °C). Für ihr Wachstum benötigen sie Sauerstoff, können ihren Stoffwechsel aber unter anaeroben Bedingungen auf Gärung umstellen (fakultativ anaerob) [64, 65]. Deshalb werden viele *Saccharomyces* Arten, wie die Stämme *S. cerevisiae* und *S. carlsbergensis*, die im Folgenden näher beschrieben werden, bei der Herstellung von Lebensmitteln (Brot- Bier- und Weinherstellung etc.) verwendet [64, 65]. Auch in anderen Industriezweigen und in der Forschung werden sie vielseitig eingesetzt.

### 2.5.1 *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ist sehr tolerant gegenüber niedrigen pH-Werten, hohen Zucker- oder Ethanolkonzentrationen und wächst fakultativ anaerob (siehe oben). Bei Anwesenheit hoher Zuckergehalte kommt es trotz aeroben Bedingungen zur alkoholischen Gärung und somit zur Bildung von Ethanol (Crabtree-Effekt) [66]. Aufgrund ihrer Eigenschaften sind Hefen des Stammes *S. cerevisiae* für viele industrielle Anwendungen, z.B. für die Produktion organischer Säuren, Glycerin und verschiedener Alkohole, gut geeignet [67]. Durch gentechnische Veränderung können der Hefe gewünschte Fähigkeiten hinzugefügt oder entzogen werden. Genetisch modifizierte *S. cerevisiae* Stämme werden beispielsweise genutzt, um durch Vergärung verschiedener Zucker Biokraftstoffe im großen Maßstab herzustellen. Sie tragen somit zur modernen Ideologie der Nachhaltigkeit bei [67, 68].

*Saccharomyces cerevisiae* ist neben *Escherichia coli* der am besten erforschte Modellorganismus, da sie einfach aufgebaut ist und eine hohe Effizienz in ihrer genetischen Manipulierbarkeit besitzt [64].

Als erster Eukaryont wurde 1996 das Genom von *S. cerevisiae* vollständig sequenziert [69]. Mittlerweile gibt es viele verschiedene Datenbanken, die sämtliche Informationen über Gene, Proteine, Knockout-Stämme und bekannte Vektoren speichern (siehe z.B. [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org), [www.ncbi.nlm.nih.gov/protein](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) bzw. [/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)). Die existierenden Knockout Stämme für *S. cerevisiae* decken bisher 96% des gesamten Genoms ab [67]. *S. cerevisiae* nimmt in der

Humanforschung eine wichtige Rolle ein. Da Menschen und Hefen zu den Eukaryonten gehören, werden Hefen als Modellorganismen in der Forschung über Alterung, DNA-Reparatur oder Krebsursachenforschung eingesetzt. Ein Beispiel ist der Zellzyklus der Eukaryonten, der weitestgehend in *S. cerevisiae* erforscht wurde. [70] Ein wichtiger Gesichtspunkt ist zudem das gleiche Expressionssystem von Hefen und Menschen. Eukaryontische Proteine werden nach der Translation auf vielfältige Weise modifiziert, bis sie ihre vorbestimmte Funktion einnehmen können. Diese sog. posttranslationalen Modifikationen (PTM) sind z.B. Glykosylierung, Acetylierung oder Methylierung. Für die pharmazeutische Proteinproduktion ist dies von großem Interesse, da prokaryontische Systeme diese PTM nicht durchführen können. Auch hier werden Vektoren genutzt um die verwendeten Hefen genetisch zu modifizieren, damit diese menschliche Proteine, Wachstumsfaktoren oder Hormone produzieren können. Wichtige Beispiele für den Einsatz von *S. cerevisiae* sind die Produktion von humanem Insulin [71] und dem Hepatitis B-Impfstoff (Antigen HBsAg) [72].

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Stämme *Saccharomyces cerevisiae* BY4741  $\Delta$ YNL045W Mutante (siehe 2.5.3) und der dazu gehörige *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 Wildtyp verwendet.

### 2.5.2 ***Saccharomyces carlsbergensis***

Bei *Saccharomyces carlsbergensis* handelt es sich um einen Hybrid aus *Saccharomyces bayanus* und *Saccharomyces cerevisiae*, er besitzt Ähnlichkeiten zum Phänotyp und Genotyp beider Arten [73]. Im Vergleich zum Genom von *S. cerevisiae* ist das Genom von *Saccharomyces carlsbergensis* um bis zu 60 % größer, da sich das Genom, hier aus denen von zwei Arten zusammensetzt. Der vermutlich größere Teil stammt vom *S. bayanus* [74].

In der Brauerei- und Getränketechnologie werden verschiedene Varianten der Hefearten *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces carlsbergensis* verwendet. Die Zellen der *S. carlsbergensis* teilen sich nach der Knospung vollständig, während die der *S. cerevisiae* Sprossverbände mit vergleichsweise großer Oberfläche bilden. Letzteres führt während der Gärung zum Aufsteigen der Hefe und somit zur Bezeichnung „obergärig“. Im Gegensatz dazu wird *S. carlsbergensis* zu den untergärigen Hefen gezählt, da ihre Zellen während der Gärung absinken. Die verschiedenen Stämme beider Hefen geben durch unterschiedliche Gärungsnebenprodukte den jeweiligen Biersorten ihren typischen Geschmack. *S. carlsbergensis* wurde erstmals 1908 von Hansen in der Carlsberg Brauerei isoliert und beschrieben [75]. Im Vergleich zu *S. cerevisiae* findet *S. carlsbergensis* außerhalb der Brauerei- und Getränketechnologie nur wenig Verwendung.

Die Stämme, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet werden, sind der *Saccharomyces carlsbergensis* RH und ein Stamm des *Saccharomyces bayanus*.

### 2.5.3 *Saccharomyces cerevisiae* Knockout-Mutante

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae* Wildtyp BY4741 ist das Gen YNL045W, welches für die einzig bekannte Epoxidhydrolase LTA<sub>4</sub>H in *S. cerevisiae* codiert, auf dem 14. Chromosom zwischen den Positionen 542.963 und 544.979 lokalisiert. Der Open-Reading-Frame (ORF) des Gens umfasst 2016 Basenpaare (bp). Dies lässt sich mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) überprüfen, wobei die Primer 045-fw und 045-rev außerhalb des Gens ansetzen. Dabei ergibt sich eine Länge von 2480 bp (siehe Abb.4) [76].

```
542.647-3'-  
TGGTCCCTCAAGGACATCATCATCCAGTCATCAGAAAACATCCTGAGTGTTTCCAAATGGAAAAT  
CATAGGGGCGCTCCTTCATGGGTACGCCCTACACAGGTCTTCTCACGGGGCTCGTTGGCCCTC  
TCCTGTCACCATTTTCGGCTGTTTCGTCGTGGCTTTCATTCATCTTTTGACACAATGCGTCTTC  
AGTTTCCGGGGGCATTGCGTATGGAAAATCATGTCACTTTTTTTCTTCCACTTTTTTCGTTTGAC  
TTATAAAGCGCACTTTAGTATAGTTTGCTTTTATGTATTAGTTTATCTTGGTGTCTAATTGATG  
TTCTTG...1998bp...GGTCTTTGAAAAGGGACGTGTGTAACATGAATACGTAAACAATTAATA  
TAACCTACTAATGAGCCTTCATTGCTACTTCTCTGGTTCTAATTAGTGGCGGAGTTCTGTGTGCG  
TGCATACGAATTTTGCCTTTTGTCCATGCAATCGAGGCAA-5'-545.127
```

**Abbildung 4: DNA-Sequenz des ORFs im Gen YNL045W (grau unterlegt) und die Bindungsstellen für die Primer 045-fw bzw. 045-rev (unterstrichen) [76].**

Zusätzlich soll mit einer *S. cerevisiae* Knockout-Mutante gearbeitet werden, bei der das Gen welches die LTA<sub>4</sub> Hydrolase codiert, inaktiviert wurde. So sollen die Eigenschaften und die Größe möglicher anderer Enzyme, die epoxidiertes Fettsäuren hydrolytisch umwandeln, bestimmt werden. Bei der Mutation  $\Delta$ YNL045W wird neben der Deletion des Gens YNL045W mit einer durch homologe Rekombination erzeugte sequenzspezifische Insertion des Kanamycin-Resistenz-Gens kanMX4 gearbeitet, welches kürzer ist als das Wildtyp-Gen (siehe Abb. 5) [77]. So ergibt sich bei der PCR mit den Primern 045-fw bzw. 045-rev für die Mutante eine Länge von etwa 2000 bp. Die Anwesenheit des kanMX4 wird mit den Primern G1-fw und G2-rev überprüft, die sich innerhalb dieses Gens anlagern. Die Länge der Basenpaare beträgt etwa 400 bp. Die richtige Lokalisierung des eingebauten kanMX4 lässt sich mit der Primer Kombination G1-fw und 045-rev bei einer Basenpaarlänge von etwa 1100 bp nachweisen. Die Stabilität des Knockouts in der Mutante lässt sich ebenfalls mittels PCR überprüfen.

```
1-3'-  
ATGGGTAAGGAAAAGACTCACGTTTTGAGGGCCGCGATTAAATCCAAATGGATGCTGATTTA  
TATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGAT  
GGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTT  
ACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCAT  
TTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCACTGCGATCCCCGGCAAACAGCATT  
CAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTG  
CGCCGGTTGCATTCGATTCCTGTTTGTAAATGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTTCGTCTCG  
CTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTTGGTTGATGCGAGTGAATTTTATGATGACGAGCGTA  
ATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAGCTTTTTGCCATTCTCACCGGATT  
CAGTCGTCACCTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGG  
TTGTATTGATGTTGGACGAGTCCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAA  
CTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAATAATGGTATTGATAAT  
CCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAA-5'-810
```

**Abbildung 5: DNA-Sequenz des ORFs im Kanamycin-Resistenz-Gen kanMX4 und die Bindungsstellen für die Primer (PCR) G1-fw und G2-rev (unterstrichen) [78, 79].**

## 2.6 Stand der Wissenschaft

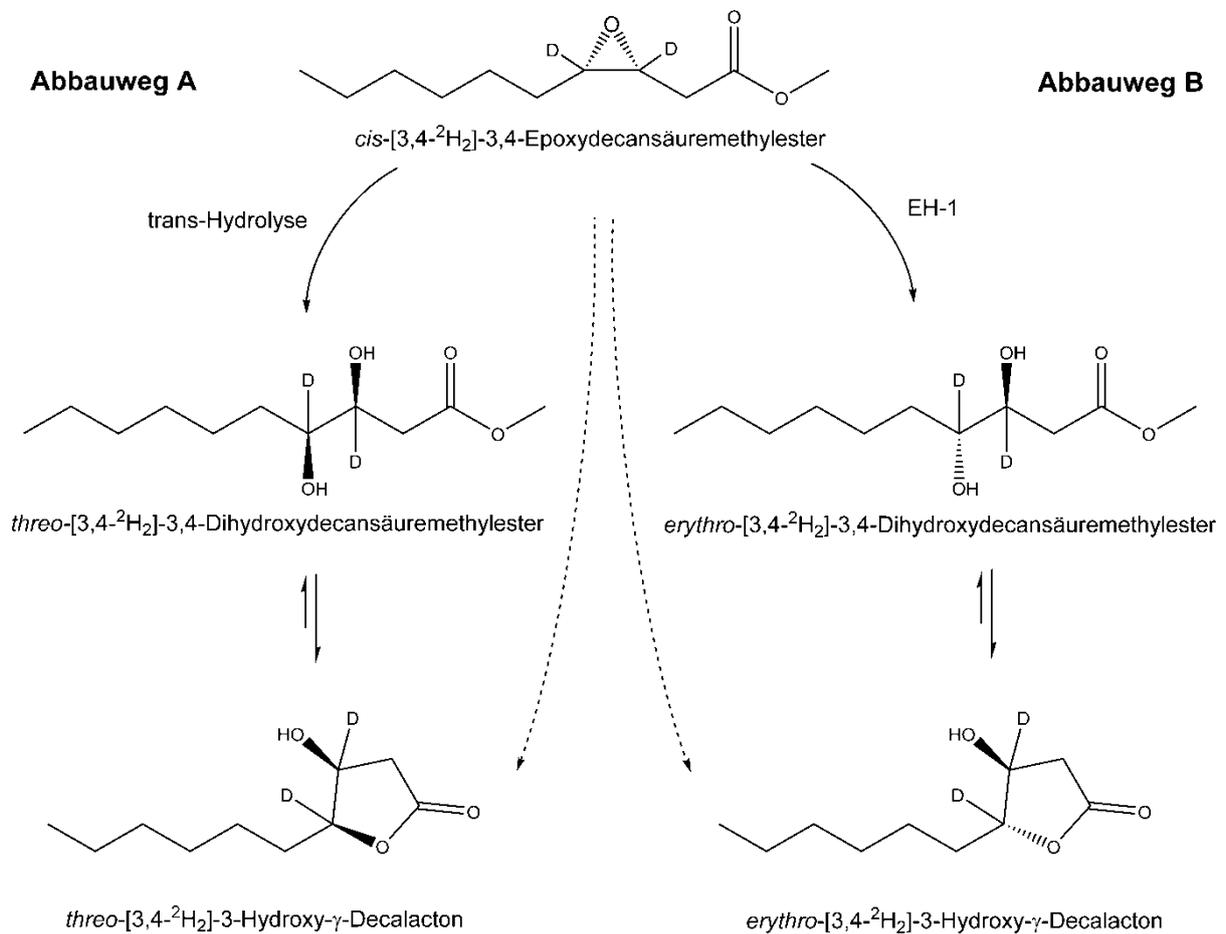
Der Abbaumechanismus epoxidierter Fettsäuren ist, wie einleitend beschrieben, wissenschaftlich von besonderem Interesse.

Die enzymatische Umsetzung epoxidierter Fettsäuren zu ihren vicinalen Diolen erfolgt allgemein durch hydrolytische Umwandlung, die vor allem durch sog. Epoxidhydrolasen katalysiert wird. Dabei werden unter Inversion der Konfiguration (*trans*-Hydrolyse) aus *cis*-Epoxiden *threo*-Diole und aus *trans*-Epoxiden *erythro*-Diole, welche weiter zu Lactonen reagieren können [37, 38, 39] (siehe 2.3.3). Im Gegensatz zu dieser allgemein für Menschen, Tiere, Insekten, Pflanzen, Bakterien und Hefen beschriebenen Reaktion, katalysiert die bisher einzig für *Saccharomyces cerevisiae* bekannte Epoxidhydrolase (die Leukotrien A<sub>4</sub> Hydrolase) unter Retention der Konfiguration (siehe 2.3.4). Bisherige Erkenntnisse deuten auf eine substratspezifische Wirkungsweise gegenüber Leukotrien A<sub>4</sub> hin, eine Aktivität gegenüber anderen epoxidierten Fettsäuren ist nicht beschrieben.

Bisher gibt es kaum Informationen zum Abbaumechanismus anderer epoxidierter Fettsäuren als Leukotrien A<sub>4</sub> in Hefen. Die bisherigen Erkenntnisse basieren auf Ergebnissen von Arbeiten, die sich mit dem Metabolismus ungesättigter (Hydroxy)fettsäuren [80, 81], Mono- und Dihydroxyfettsäuren [82] bzw. Epoxifettsäuren befassten [83].

Die letztgenannte Arbeit [83] beschäftigte sich mit der enzymatischen Umsetzung der *cis*- bzw. *trans*-[9,10-<sup>18</sup>O]-9,10-Epoxyhexadecansäureethylesters in *Saccharomyces carlsbergensis*. Beim Abbau dieses Substrats durch die Hefe wurden zunächst C<sub>2</sub>-Körper der Fettsäure in Form von Acetyl-CoA über  $\beta$ -Oxidation abgebaut [84, 85, 86], aus den dadurch erhaltenen C<sub>12</sub>- bzw. C<sub>10</sub>-Grundkörpern entstanden als Endprodukte  $\gamma$ -Decalacton, *erythro*-6-Hydroxy- $\delta$ -dodecalacton und *erythro*-3-Hydroxy- $\gamma$ -decalacton. Das letztgenannte Produkt entstand sowohl aus der *cis*- als auch aus der *trans*-[9,10-<sup>18</sup>O]-9,10-Epoxyhexadecansäure, also einmal unter Inversion der Konfiguration (*trans*-Hydrolyse) und einmal unter Retention der Konfiguration. Um zu klären welche weiteren Enzyme die zuletzt genannt Umwandlung katalysieren, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Aus den Ergebnissen der oben genannten Arbeiten und bisher unveröffentlichten Ergebnissen lässt sich der Abbau für den in dieser Arbeit verwendeten *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester ableiten. Dabei gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten, beide sind in der nachfolgenden Abbildung 6 dargestellt. Abbauweg A läuft chemisch und evtl. enzymatisch als *trans*-Hydrolyse unter Inversion der Konfiguration ab (Produkt: *threo*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Dihydroxydecansäure), wohingegen Abbauweg B durch ein bisher unbekanntes Enzym EH-1 unter Retention der Konfiguration katalysiert wird (Produkt: *erythro*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Dihydroxydecansäure). Die 3,4-Dihydroxydecansäuren lactonisieren, wie bereits eingangs beschrieben, zu ihren entsprechenden [3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Hydroxy- $\gamma$ -Decalactonen [83].



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der beiden möglichen Abbauwege des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters. Abbauweg A: chemisch und evtl. enzymatische *trans*-Hydrolyse unter Inversion der Konfiguration (Produkt: *threo*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Dihydroxydecansäure). Abbauweg B: enzymatische Hydrolyse unter Retention der Konfiguration, die durch ein bisher unbekanntes Enzym EH-1 katalysiert wird (Produkt: *erythro*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Dihydroxydecansäure). Die entstehenden 3,4-Dihydroxydecansäuren lactonisieren zu ihren entsprechenden [3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Hydroxy- $\gamma$ -Decalactonen.

## 2.7 Ziel der Arbeit

Um den Kenntnisstand hinsichtlich der enzymatischen Umsetzung epoxidierter Fettsäuren in Hefen [82, 83] (siehe 2.6) zu erweitern, sollen im Rahmen dieser Arbeit folgende drei Ziele erreicht werden:

1.) Es soll zunächst *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester synthetisiert werden, der als selektives Substrat für EH in Inkubationsversuchen eingesetzt werden soll. Im Vergleich zu *cis*-[9,10-<sup>18</sup>O]-9,10-Epoxyhexadecansäureethylester, der in einer vorangegangenen Arbeit [83] als Substrat verwendet wurde, wird durch die Kettenverkürzung die  $\beta$ -Oxidation umgangen und die Bildung von Nebenprodukten, wie z.B. *erythro*-6-Hydroxy- $\delta$ -Dodecalacton, reduziert. Die Einführung einer Isotopenmarkierung in das Substrat erlaubt eine eindeutige Unterscheidung seiner Abbauprodukte (siehe Abb. 6) von anderen, endogen gebildeten Metaboliten und ist somit wichtige Grundlage dieser Arbeit. Um Aussagen zur enzymatischen Umwandlung des Substrats treffen zu können, soll für das isotopenmarkierte Substrat und seine Abbauprodukte ein Analyseverfahren mittels GC-SIM-MS etabliert werden.

2.) In Zellkulturversuchen soll ein einfach durchzuführender und reproduzierbarer Enzymparameterstest entwickelt werden, um die enzymatische Umwandlung von *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester in einer LTA<sub>4</sub> Hydrolase deletierten Knockout-Mutante (*Saccharomyces cerevisiae* BY4741  $\Delta$ YNL045W) zu untersuchen. Es sollen durch Variationen verschiedener Inkubationsparameter die Bedingungen für ein bisher unbekanntes Enzym EH-1, welches analog zur LTA<sub>4</sub>H (substratspezifisch für LTA<sub>4</sub>) epoxidierte Fettsäuren unter Retention der Konfiguration umwandelt, optimiert werden. Bei der Umwandlung von *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester entstehen vicinale Dihydroxysäuren die zu Hydroxylactonen weiter reagieren können. Als Bewertungsgrundlage des Enzymparameterstests werden die Konzentrationen der gebildeten *erythro*-Abbauprodukte (unter Retention der Konfiguration) in Bezug zu den Konzentrationen der *threo*-Abbauprodukte (unter Inversion der Konfiguration) gesetzt (E/t-Quotient).

Die Ergebnisse der Knockout-Mutante sollen anschließend mit weiteren *Saccharomyces* Stämmen (*Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (Wildtyp), *Saccharomyces carlsbergensis* RH und *Saccharomyces bayanus*) verglichen werden.

3.) Abschließend soll das bisher unbekanntes Enzym EH-1, welches epoxidierte Fettsäuren umwandelt, in der LTA<sub>4</sub>H deletierten Knockout-Mutante näher charakterisiert werden.

### 3. Material und Methoden

#### **3.1 Chemikalien**

Die verwendeten Chemikalien stammen, in analytischer Reinheit (p.a.), von den Firmen Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Deisenhofen), Van-Waters-Rogers-VWR<sup>®</sup> (Pennsylvania), Roth<sup>®</sup> (Karlsruhe), Rapidozym GmbH (Berlin), Eurofins MWG Operon<sup>®</sup> (Ebersberg).

## 3.2 Geräte

### 3.2.1 Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Geräteparameter: SHIMADZU – Corporation - GC/MS-QP2010Plus

|                            |  |
|----------------------------|--|
| Injektionstemperatur       | 240 °C   |
| Trägergas                  | Helium (99,999 %); Firma: AIRLIQUIDE; Typ: ALPHAGAZ™<br><sup>1</sup> He) |
| Gasstrom                   | Lineargeschwindigkeit: 40 cm/s   |
| Ionisationsmodus           | Elektronenstoßionisation (EI)  |
| Temperatur der Ionenquelle | 200 °C   |
| Interface Temperatur       | 250 °C   |
| Detektor                   | Quadrupol-Massenfilter mit SEV   |

Stationäre Phase: J&W Scientific - Agilent Technologies De GmbH DB-5ms - Ultra Inert (122-5532UI)

|              |         |
|--------------|---------|
| Länge        | 30 m    |
| Schichtdicke | 0,25 µm |
| Durchmesser  | 0,25 mm |

Detektionsmodus SIM:

| SIM<br>Substanz  | Qual.<br>m/z | Quant.<br>m/z | R <sub>T</sub><br>[min ] | Intervall<br>[min] |
|--|--------------|---------------|--------------------------|--------------------|
| Decan-1-ol (TMS)   | 215          | 75            | 15,1                     | 14,5 – 15,5        |
| Epoxydecansäuremethylester(ME)   | 104          | 88            | 16,9                     | 16,5 – 17,5        |
| <i>erythro</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-Hydroxy-γ-Decalacton (TMS)     | 117          | 203           | 21,3                     | 20,2 – 23,5        |
| <i>threo</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3,4-DihydroxydecansäureME (2TMS)   | 249          | 188           | 21,4                     | 20,2 – 23,5        |
| <i>erythro</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3,4-DihydroxydecansäureME (2TMS) | 249          | 188           | 21,7                     | 20,2 – 23,5        |
| <i>threo</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-Hydroxy-γ-Decalacton (TMS)       | 117          | 203           | 21,9                     | 20,2 – 23,5        |
| Heptadecansäuremethylester   | 74           | 256           | 27,3                     | 23,6 – 31,0        |

**Detektionsmodus Scan:**

|             |               |
|-------------|---------------|
| <b>Scan</b> | m/z: 29 - 600 |
|-------------|---------------|

**Methodenparameter:**

|  | <b>Programm 1 (Synthese)</b>  | <b>Programm 2 (Inkubation)</b>  |
|--|---|---|
| <b>Temperatur-Programm</b><br>(Linear)             | 70 °C - 2,6 min<br>10 °C/min bis 200 °C<br>200 °C - 5 min<br>50 °C/min bis 300 °C | 50 °C<br>6 °C/min bis 220 °C<br>40°C/min bis 325 °C<br>325 °C - 9 min |
| <b>Dauer</b>                                       | 22,5 min  | 40 min  |
| <b>Säulendruck [kPa]</b>                           | 76,1  | 69,4  |
| <b>Split</b>                                       | 10  | 100   |
| <b>Gasstrom in Säule [mL/min]</b>                  | ~ 1,19  | ~1,22   |
| <b>Vorhaltezeit vor<br/>Detektionsbeginn [min]</b> | 2   | 6   |

**3.2.2 Weitere Geräte**

**PCR-Analyse:**

|                          |                             |
|--------------------------|-----------------------------|
| <b>PCR-Gerät</b>         | Biometra® - T3-Thermocycler |
| <b>Gelelektrophorese</b> | Biorad®-Miniwide            |
| <b>Schüttler</b>         | VORTEX-GENIE 2 Stufe 1      |

**Fermentationsschüttler/Enzymparameter:**

|   |  |                                 |
|---|--|---------------------------------|
| <b>Wasserbad mit<br/>Schüttelfunktion</b> | Gesellschaft für Labortechnik<br>Burgwedel mbH | GLF 1086 (mit externer Kühlung) |
| <b>temperierter Schüttler</b>             | B. BRAUN / Pharmacia Biotech                   | Certomat® U-HK / MultiTemp.     |
| <b>Probenschüttler</b>                    | Scientific Industries                          | VORTEX-GENIE 2 Stufe 1          |

**Zentrifuge:** Eppendorf Centrifuge 5804 R

|                          |                       |                      |
|--------------------------|-----------------------|----------------------|
| <b>Rotor</b>             | FA 45-30-11 (Rotor 1) | FA 34-6-38 (Rotor 2) |
| <b>Temperatur</b>        | 4 °C                  | 4 °C                 |
| <b>Maximales Volumen</b> | 2 mL                  | 45 mL                |

**Kugelmühle:** BIOSPEC PRODUCTS Model 1G918 Clamshell

|                              |                            |
|------------------------------|----------------------------|
| <b>Aufsatz</b>               | 15 mL                      |
| <b>Glasbeads-Durchmesser</b> | 0,5 mm                     |
| <b>Anzahl der Intervalle</b> | 7 mal 1 min                |
| <b>Pause</b>                 | 1 min nach jedem Intervall |

**Weitere Geräte:**

|   |   |
|---|---|
| <b>Autoklav</b>                             | H + P Varioklav® / Dampfdestillator 135 S                 |
| <b>Gelelektrophoresekammer</b>              | BioRad / Mini-Protean Tetra Cell                          |
| <b>IEF</b>                                  | BioRad / Rotofor™ Preparative IEF Cell 193BR              |
| <b>Magnetrührer</b>                         | Heidolph MR 3001 neo Lab                                  |
| <b>pH-Meter</b>                             | Knick Calimatic® / MIKROPROZESSOR-pH-METER                |
| <b>Trockenschrank</b>                       | Memmert Schwabach   |
| <b>UV-Spektrophotometer</b>                 | Kontron Instruments Unikon / SPECTROPHOTOMETER 922        |
| <b>Waagen</b>                               | Sartorius-Analytik / 1204 MP - Sartorius-Analytik / A200S |
| <b>Stromversorgung für IEF und SDS-PAGE</b> | BioRad/ Powerpac basic - Powerpac HV                      |

### 3.3 Synthese/Analyse des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters

Die Synthese des Substrats *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester erfolgt nach den unten aufgeführten Syntheserouten, die nach Vorgaben aus der Literatur modifiziert wurden [80, 82, 83, 87]. Das Substrat und die Zwischenstufen werden mittels Dünnschicht-Chromatographie (siehe 3.3.5) überprüft und anschließend mittels GC/MS Programm 1 (scan) (siehe 3.2.1) analysiert.

Die Berechnung der Ausbeute erfolgt nach folgender Formel:

**Formel 1: Abschätzung der Ausbeuten.**

$$Y_P = (n_{P \text{ nach}} - n_{P \text{ vor}}) / n_{E \text{ vor}} \approx n_{P \text{ vor}} / n_{E \text{ vor}} = (m_{P \text{ nach}} / M_P) / (m_{E \text{ vor}} / M_E) = [\%]$$

$n_{P \text{ nach}}$  = Stoffmenge des gebildeten Produktes nach dem Syntheseschritt (mol)

$n_{P \text{ vor}}$  = Stoffmenge eingesetzten Eduktes vor dem Syntheseschritt (mol)

$n_{E \text{ vor}}$  = Stoffmenge des Eduktes (mol)

$m_P$  = Auswaage des Produktes (g)

$m_E$  = Einwaage des Eduktes (g)

$M_P$  = Molmasse des Produktes (g/mol)

$M_E$  = Molmasse des Eduktes (g/mol)

Die Stoffmenge des Produktes ( $n_{P, \text{vor}}$ ) vor dem Syntheseschritt wird gleich Null gesetzt.

#### 3.3.1 Synthese der 3-Decinsäure

Zur Umsetzung von 1 g 3-Decin-1-ol (6,48 mM) werden 50 mL Acetonitril mit 3,08 g Periodsäure (13,5 mM = 2,08 eq.) 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Lösung wird auf ca. 0 °C gekühlt. Im Anschluss werden 3-Decin-1-ol und 10 mL einer Lösung aus Pyridin-Chloro-Chromat in Acetonitril ( $\approx 0,105 \text{ mM} \approx 1,6\% \text{ eq.}$ ) mit einer Konzentration von 2,27 mg/mL hinzu gegeben. Nach drei Stunden Rühren bei 0 °C werden zur Aufarbeitung 125 mL Ethylacetat zugegeben und im Anschluss mit 10 mL gesättigter Natriumchloridlösung, 25 mL Natriumhydrogensulfidlösung bzw. erneut 10 mL Natriumchloridlösung im Scheidetrichter neutral gewaschen. Die organische Phase wird entnommen und mit Natriumsulfat getrocknet. Bei Trübung der organischen Phase erfolgt ein Abnutschen mit Kieselgur-Filter und mobiler Phase A (siehe 3.3.5). Das Lösungsmittel wird im Anschluss mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt.

### 3.3.2 Synthese des 3-Decinsäuremethylesters

Zur Umsetzung von 1 g 3-Decinsäure (5,94 mM) werden in einem Rundkolben 100 mL Methanol mit 3 mL Acetylchlorid ( $\approx 7$  eq.) versetzt und 15 min bei 0 °C gerührt. Im Anschluss erfolgt die Zugabe der 3-Decinsäure. Die Lösung wird für 45 min bei 20 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird mit ca. 30 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung im Scheidetrichter unter Gasentwicklung vorsichtig neutralisiert. Die wässrige Phase wird im Anschluss dreimal mit je 100 mL Petroleumbenzin extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit ca. 10 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Anschließend wird die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernt.

### 3.3.3 Synthese des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Decensäuremethylesters

Zur Umsetzung von 1 g 3-Decinsäuremethylester (5,49 mM) werden 55 mL Methanol bei 0 °C mit 41 mg ( $\approx 0,4\%$  eq. Pd) Palladium-Katalysator (5 % auf Bariumsulfat) versetzt. Im Anschluss erfolgt die Zugabe von 520  $\mu$ L Chinolin (4,43 mM = 0,8 eq.) unter 15 min Rühren. Nach dreimaligem Evakuieren und Spülen des Reaktionsgefäßes mit Deuterium wird die Lösung unter Normaldruck bis zur Verfärbung des Katalysators von braun nach schwarz gerührt. Durch Zugabe des 3-Decinsäuremethylesters in ca. 1 mL Methanol wird die Reaktion gestartet. Nach Verbrauch von 5,49 mM (= 2 eq.) Deuterium (ca. 129 mL) wird der Ansatz zweimal filtriert, mit 50 mL dest. H<sub>2</sub>O verdünnt und mit einigen Tropfen HCl bis pH 3 angesäuert. Die wässrige Lösung wird viermal mit je 40 mL Petroleumbenzin extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 60 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 20 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung neutral gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels mittels Rotationsverdampfer wird das Produkt mit Kieselgel adsorptionschromatographisch mit mobiler Phase B (siehe 3.3.5) gereinigt.

### 3.3.4 Synthese des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecensäuremethylesters

Für die Umsetzung von 1 g *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Decensäuremethylester (5,37 mM) wird die doppelte Stoffmenge *meta*-Chlorperbenzoesäure (mCPBA) (10,7 mM = 1,8 g = 2 eq.) in 50 mL Dichlormethan bei 0°C für 5 min gerührt. Nach Zugabe des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Decensäuremethylester wird der Ansatz bei Raumtemperatur mindestens 12 h gerührt. Anschließend wird, äquimolar zum mCPBA, Calciumoxid (= 2 eq.) zugesetzt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit Cellite abgenutscht und das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernt. Im Anschluss wird das Produkt mit Kieselgel adsorptionschromatographisch mit mobiler Phase B (siehe 3.3.5) gereinigt.

### 3.3.5 Dünnschicht-Chromatographie

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>Stationäre Phase</b>   | Kieselgel 60 µm F <sub>254</sub> -Beschichtung                    |
| <b>Mobile Phase A</b>     | n-Pentan : Ethylacetat 1 : 5 (v/v)                                |
| <b>Mobile Phase B</b>     | Petroleumbenzin : Ethylacetat 19 : 1(v/v)                         |
| <b>Entwicklungslösung</b> | 25 g/L- Molybdätophosphorsäure in Isopropanol+ 4 Vol. % konz. HCl |

### 3.3.6 Saure Hydrolyse des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters

Zur Umsetzung von ca. 1 mg *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester (5,5 µM) werden 50 µL (c = 20 mg/mL in Ethanol) mit 1 mL einer 0,7 %-igen oder 7 %-igen Perchlorsäure-dest. Wasser-Lösung gemischt. Nach 15 min erfolgt die Extraktion in 1,5 mL Diethylether. Nach der Silylierung (siehe 3.3.7) erfolgt die GC/MS Analyse mittels Programm 2 (scan) (siehe 3.2.1).

### 3.3.7 Silylierung der Syntheseprodukte

Um eine Analyse mittels GC/MS durchführen zu können muss die Flüchtigkeit der Probenbestandteile gewährleistet sein. Wenn die zu untersuchenden Analyten diese Eigenschaft nicht besitzen, kann sie durch eine geeignete Derivatisierung mittels z. B. N,O-bis-Trimethylsilyltrifluoracetamid (BSTFA) erreicht werden. BSTFA tauscht dabei H-Atom von Hydroxylgruppen gegen eine Trimethylsilyl-Gruppe (TMS) aus, somit ist die Flüchtigkeit der Probenbestandteile erreicht und ihre thermische Stabilität erhöht [88].

Für die Silylierung der Syntheseprodukte werden maximal 38 µM Substanz im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt, in 50 µL Ethylacetat (EtOAc) aufgenommen, 20 µL BSTFA/Pyridin (1:1) zugegeben und für die oben genannte Reaktion bei 80 °C für 30 min in einem Trockenschrank erhitzt. Anschließend erfolgt die Analyse der Probe mittels GC/MS Programm 1 (scan) (siehe 3.2.1).

### 3.4 Arbeitsvorschriften für die PCR-Analyse

Die PCR-Analyse dient zur Überprüfung des Knockouts im Gen YNL045W der *S. cerevisiae* Mutante. Dabei soll die Mutante mit dem *S. cerevisiae* Wildtyp und dem *S. carlsbergensis* RH verglichen werden. Zunächst wird dafür die genomische DNA isoliert (siehe 3.4.1) [89]. Bei der anschließenden PCR-Analyse (siehe 3.4.2) werden mit Hilfe von Primern und einer Polymerase Kopien von bestimmten Fragmenten einer Original-DNA (=Template-DNA) erzeugt und vervielfältigt (siehe Abb. 7). Zur Erstellung der DNA-Fragmente werden Primer eingesetzt. Diese sind komplementäre DNA-Oligomere von spezifischen DNA-Abschnitten des zu untersuchenden Gens. Sie dienen mit ihren spezifischen Bindungsstellen in der DNA-Synthese als Startpunkte und begrenzen so den zu synthetisierenden DNA-Bereich von zwei Seiten. Die Größe der bei der PCR entstehenden DNA-Fragmente ist daher abhängig von der Lage und dem Abstand der Bindungsstellen der Primer an die DNA (siehe Abb. 7) [90]. Die Überprüfung der PCR-Analyse, bzw. die Überprüfung der Größe der entstandenen DNA-Fragmente erfolgt mittels Gelelektrophorese (siehe 3.4.3).

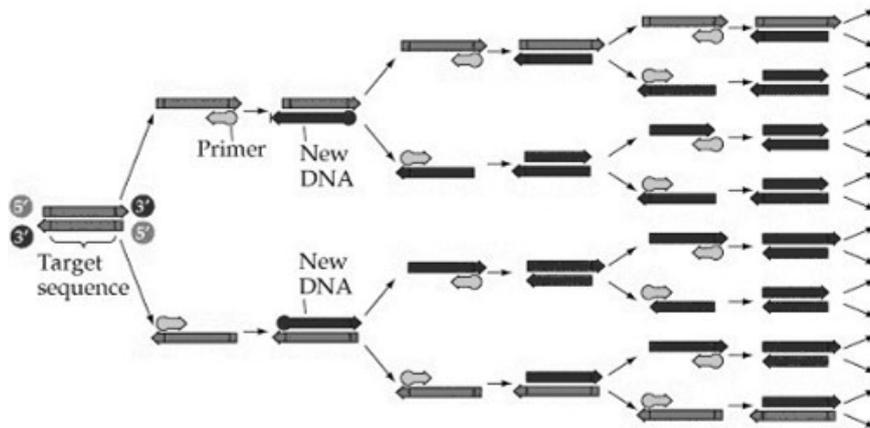


Abbildung 7: Grundprinzip PCR-Analyse (dunkelgrau = Original-DNA; hellgrau = Primer; schwarz = PCR-Produkte) [90].

#### 3.4.1 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung der genomischen DNA eines Hefestammes werden 50 mL Hefemedium in einem 100 mL Erlenmeyerkolben autoklaviert (siehe 3.5.2). Das Animpfen und Schütteln erfolgt nach 3.5.4. Nach 24 h wird das Medium bei 4.942 g (Rotor 2 / 6.200 rpm) für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet anschließend in 5 mL dest. H<sub>2</sub>O resuspendiert. Um die Zellkonzentration zu erhöhen, wird 1 mL vom resuspendierten Pellet erneut bei 20.817 g (Rotor 1 / 14.000 rpm) für 1 min. zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Pellet wird in der verbliebenen Restflüssigkeit resuspendiert, 200 µL entnommen und dazu Lyse-Puffer (Triton X-100 2% (w/w)/ SDS 1% (w/w)/ Tris-HCl, ca. pH 8 100 mM/ EDTA 1 mM), 100 µL Phenol, 100 µL Chlorophorm:Isoamylalkohol (1:24 (v/v)) sowie 0,3 g Glasperlen (Ø 0,5

mm) gegeben. Für die phenolische Fällung ist dabei der alkalische pH-Wert wichtig, damit neben der RNA, die auch im sauren pH-Bereich ausfällt, die DNA ausfallen kann. Der anschließende Zellaufschluss erfolgt durch Schütteln für 4 min. Das erhaltene Zelllysate wird mit 600 µL T/E-Puffer (10/1 mM) versetzt und bei 20.817 g (Rotor 1 / 14.000 rpm) und 4 °C für 5 min zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere Phase wird abgenommen, mit 1 mL Ethanol (96 % (w/w)) versetzt, und unter den oben genannten Bedingungen erneut zentrifugiert. Danach wird der Überstand verworfen und das Pellet in 400 µL T/E-Puffer (10/1 mM) gelöst. Nach Zugabe von 3 µL Ribonuklease-A-Lösung (c = 10 mg/mL) wird der Ansatz 5 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss werden 10 µL Ammonium-Acetat-Lösung (4 M) und 1 mL Ethanol (96 % (w/w)) dazu gegeben. Nach einer letzten Zentrifugation bei 20.817 g (Rotor 1 / 14.000 rpm) und 4 °C für 10 min wird der Überstand verworfen, das Pellet für 2 min getrocknet, in 100 µL dest. H<sub>2</sub>O resuspendiert und 15 min bei 65 °C inkubiert. Die extrahierte DNA wird mittels Gelelektrophorese überprüft (siehe 3.4.2).

### 3.4.2 PCR

Für die PCR-Analyse werden in einem Ansatz 1 µL isolierte DNA (1:10 in dest. H<sub>2</sub>O verd. - c ≈ 0,100 mM) (siehe 3.4.1) zu 19 µL PCR-Master-Mix (siehe unten) bei 0 °C in ein 200 µL PCR-Reaktionsgefäß gegeben.

| Zusammensetzung des PCR-Mastermix    |        |
|--------------------------------------|--------|
| dest. H <sub>2</sub> O               | 8,8 µL |
| 5x PCR-Puffer (Rapidozym®)           | 4,0 µL |
| 50 mM MgCl <sub>2</sub> (Rapidozym®) | 0,2 µL |
| 2,5 mM dNTP                          | 2,0 µL |
| GenTherm®-Polymerase (5 U/µL)        | 0,2 µL |
| fw-Primer (100 µM)                   | 1,0 µL |
| rev-Primer (100 µM)                  | 1,0 µL |

Für die Überprüfung des Knockouts im Gen YNL045W der *S. cerevisiae* Mutante wird eine PCR-Analyse mit folgenden Primern, Primer-Kombinationen, Zeiten, Anlagerungstemperaturen und Temperaturprogrammen durchgeführt:

**Primer (Eurofins MWG Operon®):**

|  |   |
|--|---|
| <b>045 fw</b> (3'-TGGTCCTCAAGGACATCATC-5') | <b>045 rev</b> (3'-TTGCCTCGATTGCATGTGAC-5') |
| <b>G1 fw</b> (3'-ACATGGCAAAGGTAG-5')       | <b>G2 rev</b> (3'-TCACTCGCATCAACC-5')       |

**Primer-Kombinationen, Zeiten und Anlagerungstemperaturen:**

| PCR-Ansatz | G1 fw | G2 rev | 045 fw | 045 rev | t <sub>s</sub> [min] | T <sub>A</sub> [°C] | Δ T [°C/Zyk] | Anzahl Zyk. |
|------------|-------|--------|--------|---------|----------------------|---------------------|--------------|-------------|
| 1.         | x     | x      |        |         | 0,5                  | 54                  | -0,3         | 25          |
| 2.         |       |        | x      | x       | 2,5                  | 60                  | -0,3         | 25          |
| 3.         | x     |        |        | x       | 1,5                  | 54                  | -0,3         | 25          |

**Temperatur-Programm für die PCR:**

| Vorgang                    | Temperatur [°C] | Zeitintervall [min] |
|----------------------------|-----------------|---------------------|
| <b>Vorheizen</b>           | 104             | 2                   |
| <b>Start</b>               | 94              | 3                   |
| <b>25 Zyklen Schmelzen</b> | 94              | 1                   |
| <b>Anlagerung</b>          | T <sub>A</sub>  | 2                   |
| <b>Elongation</b>          | 72              | t <sub>s</sub>      |
| <b>Stop</b>                | 4               | -                   |

Die Temperatur für die DNA-Anlagerungen der verwendeten Primer wird mit Hilfe der nachfolgend aufgeführten Formel 2 näherungsweise bestimmt. Die Starttemperatur wird an den Primer angepasst, der die niedrigste errechnete Anlagerungstemperatur besitzt, wobei der gewählte Temperaturbereich des Gradienten-Programms die errechneten Temperaturen für das Optimum beider Primer beinhalten sollte. Ergibt sich bei errechneten Temperaturen ein negativer Wert wird mit einer Starttemperatur von 50°C begonnen.

**Formel 2: Bestimmung der Anlagerungstemperatur (T<sub>A</sub>).**

$$T_A \text{ [°C]} \approx 4 \times a \text{ (G/C)} + 2 \times a \text{ (A/T)}$$

a (G/C)= Anzahl der Guanin/Cytosin-Basen

a (A/T)= Anzahl der Adenin/Thymin-Basen

Die Elongationzeit (Synthesezeit) der DNA wird aus nachfolgender Formel näherungsweise bestimmt:

**Formel 3: Bestimmung der Elongationszeit ( $t_s$ ) der DNA.**

$$t_s [\text{min}] \approx L [\text{bp}] / 1000 \text{ bp}$$

L [bp] = Länge der Basenpaare (bp) des größten vermuteten PCR-Produktes L eines Ansatzes

Die Überprüfung der PCR-Analyse erfolgt mittels Gelelektrophorese (siehe 3.4.3).

### 3.4.3 Gelelektrophorese

Die Elektrophorese ist eine analytische Methode der Biochemie um Moleküle (u. a. DNA, RNA und Proteine) zu trennen. Dabei werden die Moleküle nach ihrer Größe und Ladung in einem elektrischen Feld durch ein Gel in ionischer Pufferlösung getrennt. Die negativ geladenen Anionen wandern zur positiv geladenen Anode und die positiv geladenen Kationen zur negativ geladenen Kathode. Für die nach der PCR-Analyse entstandenen DNA-Fragmente eignet sich die Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese. Die Zuordnung der Größe und Masse der DNA-Nukleinsäurestränge erfolgt über DNA Stränge definierter Länge (Marker) die mit auf das Gel aufgebracht werden [91].

Zur Kontrolle der PCR-Analyse wird wie folgt vorgegangen:

Agarose wird im Elektrophoresepuffer (0,5 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) 0,8 % (w/w)/ Ethidiumbromid 0,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durch kurzes Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen und Verfestigung wird das Gel in die mit 0,5 x TAE-Puffer (Tris 20 mM/ EDTA 1 mM/ Natriumacetat 10 mM, pH 8,3) gefüllte Gelelektrophoresekammer eingesetzt. Anschließend werden 8 $\mu\text{L}$  der Probe nach der PCR-Analyse (siehe 3.4.2) mit 2  $\mu\text{L}$  Stopper-Lösung (Bromphenol 0,035 % (w/w)/ Saccharose 60 % (w/w)/ EDTA 20 mM) auf das Gel aufgetragen. Als Marker wird ein GeneRuler-Ladder-Mix (GR) verwendet, der ebenfalls auf das Gel aufgetragen wird. Die Entwicklung des Gels erfolgt bei einer Spannung von 100 V für 45 min. Anschließend wird das Gel unter UV-Licht bei 254 nm analysiert.

### 3.5 Arbeitsvorschriften für die Hefekulturen

#### 3.5.1 Mikroorganismen

|                              |  |
|------------------------------|--|
| <b>Mutante (M)</b>           | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741- $\Delta$ YNL045W |
| <b>Wildtyp (WT)</b>          | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741                   |
| <b>RH Stamm (RH)</b>         | <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> RH (IFG 06136)       |
| <b><i>S. bayanus</i> (B)</b> | <i>Saccharomyces bayanus</i>                             |

Die Mikroorganismen werden bei 4 °C auf Würzeagar gelagert.

#### 3.5.2 Medium

Für die Anzucht der Zellen werden 483 mL (Parameter und Zellaufschluss) bzw. 580 mL (Zellaufschluss für die Isoelektrische Fokussierung) des nachfolgend aufgeführten Hefemediums in einem 1L Erlenmeyerkolben bei 121°C für 20 min autoklaviert.

|   |         |
|---|---------|
| <b>Hefeextrakt</b>                                | 3,0 g/L |
| <b>MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O</b>            | 3,0 g/L |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>               | 2,5 g/L |
| <b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> | 2,5 g/L |
| <b>L-Alanin</b>                                   | 2,5 g/L |
| <b>CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O</b>            | 0,1 g/L |

Um Maillard-Reaktionen zu vermeiden wird eine D-(+)-Glucosemonohydratlösung (Konzentration 18 g/100 mL) separat hergestellt und autoklaviert. Vor Anzucht der Zellen werden 17 mL (Parameter und Zellaufschluss) bzw. 20 mL (Zellaufschluss für die Isoelektrische Fokussierung) steril dem Medium zugegeben.

### 3.5.3 Puffer

Phosphat-Puffer nach Sørensen [92]:

|  |         |        |  |
|--|---------|--------|--|
| <b>Lösung A KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>               | 66,7 mM | pH 4,6 | 9,1 g/L                                    |
| <b>Lösung B Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>              | 66,7 mM | pH 9,4 | 11,9 g/L                                   |
| <b>Lösung A KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1:10 verd.)</b>  | 6,67 mM | pH 5,0 | (Ausgangslösung für verschiedene pH-Werte) |
| <b>Lösung B Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1:10 verd.)</b> | 6,67 mM | pH 9,0 | (Ausgangslösung für verschiedene pH-Werte) |
| <b>Lösung A/B</b>  | 5/10 mM | pH 8,5 | (Zellaufschluss)                           |

Tris (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol)/

EDTA (Dinatrium-ethyldiamin-tetraacetat-Dihydrat)-Puffer:

|                          |         |         |  |
|--------------------------|---------|---------|--|
| <b>TRIS</b>              | 66,7 mM | pH 10,8 | 7,8 g/L                                    |
| <b>EDTA</b>              | 66,7 mM | pH 4,7  | 24,6 g/L                                   |
| <b>Tris (1:10 verd.)</b> | 6,67 mM | pH 10,2 | (Ausgangslösung für verschiedene pH-Werte) |
| <b>EDTA (1:10 verd.)</b> | 6,67 mM | pH 4,9  | (Ausgangslösung für verschiedene pH-Werte) |
| <b>Tris/EDTA</b>         | 10/5 mM | pH 8,8  | (ZA / Ammoniumsulfatfällung / IEF)         |

### 3.5.4 Zellanzucht

Für die Hefekultur zur Zellanzucht werden 500 mL (Parameter und Zellaufschluss) bzw. 600 mL (Zellaufschluss für die Isoelektrische Fokussierung) Medium (siehe 3.5.2) in einem 1 L Erlenmeyerkolben vorgelegt. Als Substrat werden 170 bzw. 205 µL Ölsäure zugegeben, bevor mit einer Impföse Zellen der jeweiligen Hefekultur (siehe 3.5.1) angeimpft wird. Der Kolben wird im temperierten Schüttelbad bei Raumtemperatur (RT) 24 ± 1 °C bebrütet. Der Zeitraum für die Zellanzucht ist für die einzelnen *Saccharomyces* Stämme nachfolgend angegeben.

|                              |              |
|------------------------------|--------------|
| <b>Mutante (M)</b>           | 5 Tage       |
| <b>Wildtyp (WT)</b>          | 5 bis 6 Tage |
| <b>RH Stamm (RH)</b>         | 4 Tage       |
| <b><i>S. bayanus</i> (B)</b> | 4 Tage       |

### 3.5.5 **Abzentrifugieren des Hefemediums**

Zur Bestimmung der optischen Dichte (OD) und des pH-Wertes werden 5 mL von der Hefekultur abgenommen. Anschließend wird die Kultur (Zellbrühe) auf sechs Zentrifugenröhrchen mit 40 mL (Parameter und Zellaufschluss) bzw. 45 mL (Zellaufschluss für Isoelektrische Fokussierung) Volumen aufgeteilt und das Medium bei 15.557 g (Rotor 2 / 11.000 rpm) und 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Das überstehende Medium wird abdekantiert, die Zentrifugenröhrchen erneut mit Hefekultur aufgefüllt und die Zentrifugation wiederholt.

#### **Vorbereitung zur Untersuchung verschiedener Parameter:**

Zur Untersuchung der einzelnen Parameter, die Einfluss auf die enzymatische Umwandlung des Substrats haben können, werden die Pellets aus zwei Zentrifugenröhrchen vereint (aus 80 mL Zellbrühe), nach 1 bis 7 Waschsritten in 10 mL Puffer resuspendiert und anschließend eine Inkubation nach 3.5.12 durchgeführt. Bei den Waschsritten wird das Pellet in 40 mL Puffer resuspendiert, bei 15.557 g (Rotor 2 / 11.000 rpm) und 4 °C für 20 min abzentrifugiert und anschließend das Pellet resuspendiert. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis der gewünschte pH-Wert erreicht ist.

#### **Vorbereitung für den Zellaufschluss:**

Zunächst werden die sechs Pellets mit je 45 mL Tris/EDTA-Puffer (T/E-Puffer) 10/5 mM resuspendiert und der Puffer anschließend bei 15.557 g (Rotor 2 / 11.000 rpm) und 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Für den Zellaufschluss (3.5.7) werden die sechs gewaschenen Pellets zusammen in 15 mL des T/E-Puffers resuspendiert.

### 3.5.6 **Bestimmung der optischen Dichte und pH-Wert Messung**

Zur Bestimmung der OD wird 1 mL der Zellkultur in eine Einmalküvette (halbmikro) pipettiert. Mittels Spektralphotometer erfolgt die Messung der Extinktion bei 580 nm gegen Luft.

Zur Bestimmung des pH-Wertes wird das pH-Meter mit den Kalibrierlösungen pH-Wert 4 und pH-Wert 9 kalibriert und der pH-Wert der Zellkulturproben bestimmt.

### 3.5.7 Zellaufschluss

Für die Probe der ganzen Zellen (GZ) werden aus der nach 3.5.5 erhaltenen Zellsuspension zweimal 250 µL abgenommen, 1:1 mit T/E-Puffer 10/5 mM verdünnt und wie unter 3.5.12 beschrieben inkubiert.

Um die Proteine in den Hefestämmen genauer untersuchen zu können, wird ein Zellaufschluss durchgeführt. Die Ausschlussmethode ist abhängig vom Mikroorganismus, dem weiteren Verwendungszweck des Zellysats und dem Aufbau der Zellwand bzw. Zellmembran. Da Hefen, wie sie in dieser Arbeit untersucht werden, eine sehr stabile Zellwand besitzen, wird üblicherweise ein mechanischer Aufschluss mittels Kugelmühle verwendet. Dieser ist einfach durchzuführen und dennoch sehr effizient [91]. Um die Proteine bei der weiteren Untersuchung vor dem Abbau durch Proteasen zu schützen werden Proteaseinhibitoren, hier Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), zugesetzt. Damit die Proteine durch die beim Zellaufschluss entstehende Hitze nicht denaturieren, werden alle Chemikalien und Materialien, sowie der Aufsatz der Kugelmühle gekühlt. Der Zellaufschluss wird wie folgt durchgeführt: Es werden ca. 15 g Glasperlen (Ø 0,5 mm) in den Aufsatz der Kugelmühle (15 mL Volumen) gegeben, anschließend erfolgt die Zugabe von 15 mL der Zellsuspension sowie 10 µL PMSF in Ethanol (c= 17,4 mg/mL). Die Endkonzentration an PMSF in der Zellsuspension beträgt 0,07 mM. Glasperlen und Zellsuspension werden mit einem Glasstab homogenisiert, der Aufsatz auf den Motor der Kugelmühle gesteckt. Der Zellaufschluss erfolgt in sieben Intervallen von je einer Minute. Um eine Überhitzung der aufzuschließenden Zellsuspension zu Verhindern und Zellfragmente bzw. Proteine vor Denaturierung zu schützen wird nach jedem Aufschlussintervall eine Pause von einer Minute eingehalten.

Nach dem Zellaufschluss wird die Zellsuspension von den Glasperlen getrennt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und der Aufsatz der Kugelmühle mit 2 mL T/E-Puffer 10/5 mM gespült. Das Zellysats wird mittels Zentrifugation bei 514 g (Rotor 2 / 2.000 rpm) und 4 °C für 15 min von Zelltrümmern und unaufgeschlossenen ganzen Zellen getrennt. Das Pellet der Zelltrümmer (PZ) wird mit 45 mL T/E-Puffer 10/5 mM gewaschen, bei 15.557 g (Rotor 2 / 11.000 rpm) und 4 °C für 20 min abzentrifugiert und in 15 mL Puffer resuspendiert. Das Zellysats wird bei 11.000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Dabei entstehen ein Pellet (P) und ein Überstand (Ü), die voneinander getrennt werden. P wird analog zu PZ gewaschen, zentrifugiert und resuspendiert. Ü wird fünfmal unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert um evtl. zurück gebliebene Zellfragmente vollständig abzutrennen. Für die Proben von PZ, P und Ü werden je zweimal 500 µL entnommen und wie unter 3.5.12 beschrieben inkubiert.

### 3.5.8 Ammoniumsulfatfällung

Für die Isoelektrische Fokussierung (IEF) (siehe 3.5.11) werden die Proteine aus dem Überstand mittels Ammoniumsulfat nativ gefällt. Bei der Fällung wird die Proteinkonzentration erhöht und bei der IEF störende Bestandteile aus dem Überstand entfernt. Durch das Ammoniumsulfat werden die Proteine nicht denaturiert und behalten somit ihre natürliche Funktion [93].

Vor der Fällung werden die Überstände aus vier Zellaufschlüssen vereinigt, auf zwei Portionen in Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und mit Puffer ein Volumen von 20 mL eingestellt. Dazu werden je 11,2 g Ammoniumsulfat gegeben, so dass eine Konzentration von 80 % erreicht wird. Nach dem vollständigen Lösen der Ammoniumsulfatkristalle unter Rühren erfolgt die Fällung für 2 h unter Kühlung im Eiswasser. Dabei wird in regelmäßigen Abständen gerührt. Anschließend werden die Proben bei 15.557 g (Rotor 2 / 11.000 rpm) und 4 °C für 20 min zentrifugiert um die ausgefallenen Proteine vom Überstand zu trennen. Das Pellet wird für die Dialyse in 15 mL T/E-Puffer 10/5 mM resuspendiert. Für die Probe nach Ammoniumsulfatfällung (Am) werden zweimal 500 µL entnommen und wie unter 3.5.12 beschrieben inkubiert.

### 3.5.9 Dialyse

Bei der IEF (siehe 3.5.11) können Ionen aus der Ammoniumsulfatfällung (siehe 3.5.8) die Trennung der Proteinfractionen stören, weshalb zur Abtrennung dieser Ionen eine Dialyse durchgeführt wird [93].

Zunächst wird der Dialyseschlauch aus Acetyl-Cellulose (semipermeable Membran) zur Quellung für 30 min in dest. H<sub>2</sub>O eingelegt. Im Anschluss daran wird ein Ende des Schlauches mit einer Klammer verschlossen und die Probe mit einem Trichter eingefüllt. Der Schlauch wird nun auch am oberen Ende verschlossen und in ein Becherglas (600 mL) mit T/E-Puffer 10/5 mM gehängt. Die Dialyse erfolgt bei 4 bis 7 °C und unter ständigem Rühren des Puffers. Innerhalb und außerhalb des Dialyseschlauchs befindet sich derselbe Puffer, durch die Ionen aus der Ammoniumsulfatfällung ist Ionenkonzentration innerhalb größer als außerhalb. Die störenden Ionen diffundieren mit Hilfe des Konzentrationsgradienten durch die Semipermeable Membran [93]. Nach 45 min wird der Puffer abdekantiert und durch neuen Puffer ersetzt. Dieser Vorgang wird zur Aufrechterhaltung des Konzentrationsgradienten zweimal wiederholt, bevor die Probe für etwa 18 h weiter gerührt wird. Für die IEF wird die Probe in einen Standzylinder überführt und 50 µL für die Proteinbestimmung nach Bradford entnommen. Für die Inkubation (siehe 3.5.12) der Probe nach Dialyse (nD) werden zweimal 500 µL verwendet.

### 3.5.10 Proteinbestimmung nach Bradford

Die IEF hat einen Arbeitsbereich der auf ca. 5 bis 500 mg Protein begrenzt ist. Daher ist es notwendig im Vorfeld die Gesamtproteinkonzentration zu bestimmen und ggf. Maßnahmen zur Aufkonzentrierung oder Verdünnung zu ergreifen. Zur photometrischen Proteinbestimmung nach Bradford werden 20 µL Probe nD, 1:8 in T/E-Puffer 10/5 mM verdünnt, zu 1 mL der Farbstoff Coomassie-Blau G-250 Lösung (10 mg Coomassie Blue G / 50 mL Methanol / 100 mL 85 %  $H_3PO_4$  / 50 mL dest.  $H_2O$ ) in eine Einmalküvette (halbmikro) gegeben und die Extinktion des Farbumschlags von schwach blau nach intensiv blau dreimal bei 595 nm nach 15 min Reaktionszeit gemessen und der Mittelwert gebildet [94].

Berechnet wird die Konzentration in der Probe nD über eine Kalibriergerade aus dem Auftrag der mitgeführten bekannten Albuminkonzentrationen (0 mg/mL / 0,25 mg/mL / 0,5 mg/mL / 0,75 mg/mL und 1 mg/mL) gegen ihre Extinktionen. Der Verdünnungsfaktor der Probe nD wird bei der Berechnung der Proteinkonzentration in den Proben über die Kalibriergerade berücksichtigt.

### 3.5.11 Isoelektrische Fokussierung

Aminosäuren und Proteine weisen unterschiedliche positive bzw. negative Ladungen auf. Am Isoelektrischen Punkt (IEP) ist ihre Nettogesamtladung gleich Null. Durch die Isoelektrische Fokussierung können Proteine durch einen pH-Gradienten, der durch Zugabe von Ampholyten erzielt wird, nach ihrem IEP getrennt und somit aufkonzentriert werden. Die basischen Ampholyte sind zu Beginn der IEF positiv geladen und die sauren negativ. Durch Anlegen einer Spannung bewegen sich die sauren Ampholyte zum Plus-Pol, die basischen zum Minus-Pol, wodurch ein pH-Gradient ausgebildet wird. Ampholyte und Proteine wandern zu ihrem IEP und konzentrieren sich dort auf. Da hier die Gesamtladung der Proteine gleich Null ist, werden sie dann nicht mehr vom elektrischen Feld beeinflusst und die Trennung ist abgeschlossen [91].

Für die Trennung der Proteine in der Probe mittels IEF werden zu der Probe im Standzylinder (siehe 3.5.9) 1,75 bis 2 mL der Ampholyten die im pH-Bereich von 3 bis 10, 4 bis 6 oder 5 bis 7 arbeiten zugegeben, vermischt und mit T/E-Puffer 10/5 mM auf 35 bis 40 mL aufgefüllt. Die Probe wird mit einer 60 mL Einmalspritze aufgenommen und in die IEF-Kammer eingefüllt. Nach Start der IEF wird eine konstante Spannung von 12 V angelegt. Nach 3 bis 4 h ist die IEF abgeschlossen, die erhaltenen 20 Fraktionen werden aus der Kammer entnommen und der pH-Wert der einzelnen Fraktionen mittels pH-Meter bestimmt. Damit alle Fraktionen vergleichbare Volumina aufweisen, wird mit T/E-Puffer beide 1:10 verd. und einem pH-Wert im Bereich der jeweiligen Fraktion das Volumen an die Fraktion mit

dem höchsten angepasst. Anschließend erfolgt die Inkubation der IEF-Fractionen (je 500 µL als Doppelbestimmung) nach 3.5.12.

#### 3.5.12 Inkubation/Enzymparameterertest

1mL (a) oder 0,5mL (b) der Probe (z.B. GZ, PZ, P, Ü, Am, nD, Fraktionen der IEF etc.) werden als Doppelbestimmung in je ein Flachbodenglas (2,5 mL) gegeben und mit 10 µL des Substrats [3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester ((a) c= 27 mg/mL, (b) c= 13,5 mg/mL in EtOH) versetzt. Die Inkubation bzw. der Enzymparameterertest erfolgt für 20 bis 24 h bei Raumtemperatur mittels Probenschüttler.

#### 3.5.13 Probenvorbereitung/Extraktion

Nach Ablauf der Inkubation werden 25 µL des ISTD-MIX (Heptadecansäuremethylester; 1-Decanol ((a) c=1 mg/mL; (b) c=0,5 mg/mL in Ethylacetat)) und 1,5 mL (a) bzw. (b) 0,75 mL (b) Diethylether zugegeben. Die Proben werden verschlossen und 20 s mittels Probenschüttler homogenisiert. Anschließend werden 1mL (a) bzw. 0,5 mL (b) der organischen Phase in ein GC-Vial überführt und das Lösungsmittel vollständig im N<sub>2</sub>-Strom entfernt.

#### 3.5.14 Syllierung der Fermentationsproben und GC/MS-Messung

Der trockene Rückstand wird in 50 µL Ethylacetat aufgenommen und mit 20 µL BSTFA/Pyridin (1:1) versetzt. Für den Ablauf der in Kapitel 3.3.7 genannten Reaktion wird die Probe in ein Micro-Insert (100 µL) in einem Vial überführt und bei 80 °C für 30 min in einem Trockenschrank erhitzt. Anschließend erfolgt die Analyse der Probe mittels GC/MS Programm 2 (SIM) (siehe 3.2.1).

#### 3.5.15 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) ist im Gegensatz zur Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.4.3) eine Variante der Polyacrylamidgelelektrophorese. Dabei werden Proteine nach ihrer Größe und Ladung in einem elektrischen Feld getrennt. Proteine haben eine unterschiedlich starke Eigenladung, die abhängig von der Länge ihrer Polypeptidkette ist [91]. SDS lagert sich an die Polypeptidkette an und versieht die Proteine proportional zu ihrer Länge mit negativer Ladung. Längere Polypeptidketten sind demnach stärker negativ geladen als kürzere. Damit die räumliche Proteinstruktur (Tertiärstruktur) die Auftrennung nicht stört, wird das Protein bei der Probenvorbereitung denaturiert [95]. Hierzu wird 1,4-Dithiothreitol (DDT) verwendet um die Disulfidbrücken zu spalten [96], die Erhitzung der Proben führt zur Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen.

Zur Trennung mittels SDS-PAGE werden die IEF-Fraktionen (siehe 3.5.11) zunächst mit T/E-Puffer 10/5 mM 1:1 verdünnt. Dann werden 107,7 mg DTT in 2 mL Lithiumborat-Puffer gelöst. Für jede verd. IEF-Fraktion werden 60 µL der DDT-Lithiumborat-Lösung in einem Mikroreaktionsgefäß vorgelegt und je 20 µL Probe zugegeben. Anschließend werden die Proben für 5 min bei 85 bis 95 °C im Wasserbad erhitzt.

Für die SDS-PAGE werden gebrauchsfertige Gele der Firma BioRad (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels) in die Elektrophoresekammer eingesetzt, je Probe werden 5 µL auf das Gel gegeben. Als Laufpuffer wird Tris-Glycin-SDS-Puffer der Firma BIORAD (1:10 verd.) verwendet und als Marker diente BIORAD Kaleidoscope Standard (1,5 µL). Während der Trennung wird an die Kammer eine Spannung von 200 V angelegt. Nach 25 bis 30 min befindet sich die Lauffront der Proben am Ende des Gels und die SDS-PAGE wird beendet. Nach der Entnahme der Gele aus der Kammer werden sie mit dem Roti®-Black P-Kit gefärbt und anschließend in dest. H<sub>2</sub>O bei 4 °C gelagert. Die Auswertung erfolgt über die Proteinmarkerbanden des BIORAD Kaleidoscope.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der durchgeführten Versuche dargestellt und darauf basierend das Erreichen der in Kapitel 2.7 formulierten Ziele diskutiert.

Die Ziele sind:

- 1.) Synthese des Substrats *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester sowie Etablierung einer GC-SIM-MS Methode zur Analyse seiner Abbauprodukte.
  
- 2.) Entwicklung eines Enzymparameter-tests zur Untersuchung der enzymatischen Umwandlung des oben genannten Substrats in einer LTA<sub>4</sub>H deletierten Knockout-Mutante (*Saccharomyces cerevisiae* BY4741  $\Delta$ YNL045W).  
Durch Variationen verschiedener Inkubationsparameter sollen die Bedingungen für ein bisher unbekanntes Enzym EH-1 optimiert werden und die Ergebnisse der Knockout-Mutante mit weiteren *Saccharomyces* Stämmen (*Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (Wildtyp), *Saccharomyces carlsbergensis* RH und *Saccharomyces bayanus*) verglichen werden.
  
- 3) Eine möglichst umfassende Charakterisierung des Enzyms EH-1 mit enzymatischer Aktivität gegenüber epoxidierten Fettsäuren in der LTA<sub>4</sub>H deletierten Knockout-Mutante.

#### 4.1 Synthese des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Untersuchung der enzymatischen Umwandlung von epoxidierten Fettsäuren in *Saccharomyces* Stämmen. Dieses Kapitel befasst sich mit der chemischen Synthese des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters. Die Verwendung eines isotoopenmarkierten Substrats ist dabei für alle nachfolgenden Untersuchungen von elementarer Bedeutung, da der Nachweis der Isotoopenmarkierung in Abbauprodukten des Substrats die einzige Möglichkeit zur eindeutigen Unterscheidung von endogen gebildeten Produkten darstellt.

##### 4.1.1 Synthese der 3-Decinsäure

Im ersten Schritt der Synthese des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters wurde 3-Decin-1-ol zu 3-Decinsäure oxidiert. Die Synthese wurde basierend auf eine Vorschrift aus der Literatur [82] durchgeführt, die Herstellung erfolgte nach 3.3.1. Beide Verfahren sind in der nachfolgenden Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Synthese der 3-Decinsäure.**

|                                       | Literatur   | Durchführung  |
|---------------------------------------|---|---|
| <b>Synthese-Chemikalien</b>           | 6,1 g (=39,5 mmol) 3-Decin-1-ol<br>0,65 eq. PCC/Kaliumdichromat<br>2,2 eq. konz. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (96%) | 5,2 g (= 33,7mmol) 3-Decin-1-ol<br>1,6 % eq. PCC<br>2 eq. Perjodsäure |
| <b>Lösungsmittel</b>                  | 18,6 mL H <sub>2</sub> O / 110 mL Aceton  | 250 mL Acetonitril  |
| <b>Temperatur / Zeit</b>              | 20 °C / 15 h  | 0 °C / 3 h  |
| <b>Extraktionsmittel</b>              | Diethylether  | Ethylacetat   |
| <b>Chemikalien zur Neutralisation</b> | ges. NaCl-Lösung  | ges. NaCl-Lösung / Na <sub>2</sub> HSO <sub>3</sub>                   |
| <b>Aufreinigung</b>                   | Kieselgelchromatografie:<br>[Petroleumbenzin + EtOAc +AcOH]<br>[18 + 2 + 1 %] / [15 + 5 + 1 %]                        | Kieselgurfiltration:<br>[n-Pentan + EtOAc]<br>[1 + 5]                 |

Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurden 4,5 g eines leicht gelblichen Öles erhalten, das mittels GC/MS untersucht wurde.

Die nachfolgende Abbildung zeigt das Massenspektrum des Edukts (3-Decin-1-ol) (siehe Abb. 8 a) im Vergleich zu dem des Produkts (3-Decinsäure) (siehe Abb. 8 b).

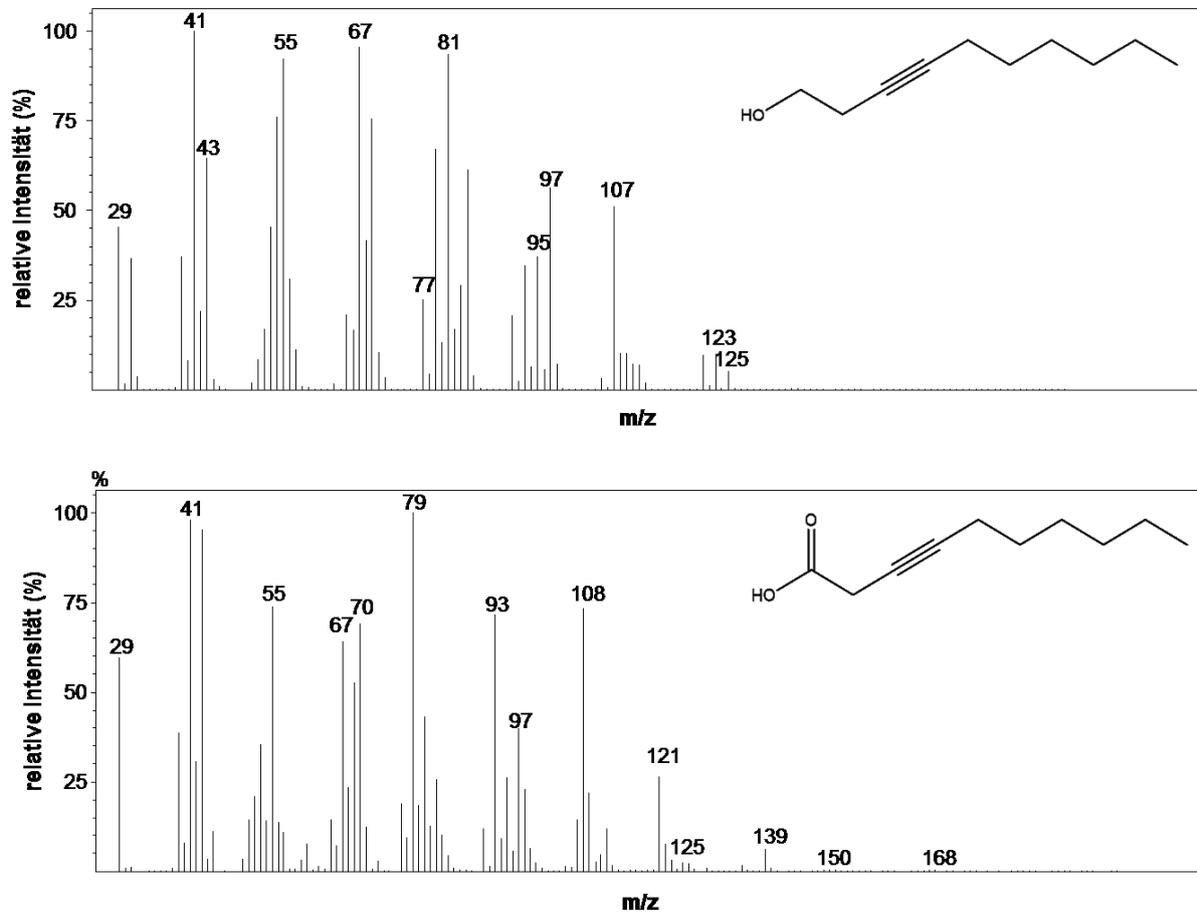


Abbildung 8 a und b: EI-Massenspektrum des 3-Decin-1-ols (a - oben) und der 3-Decinsäure (b - unten).

Laut Literatur wird bei der Synthese von organischen Säuren mittels Pyridin-Chloro-Chromat (PCC) aus primären organischen Alkoholen durch Anwesenheit von Wasser eine Überoxidation angestrebt. Den Übergangszustand bildet jeweils ein Chromsäureester, der unter Oxidation des funktionellen Kohlenstoffs dissoziiert. Nach der ersten wasserfreien Oxidation zum Aldehyd bildet sich durch Anlagerung von Wasser ein Hydrat. Dieses kann wiederum einen Chromsäureester bilden, der ebenfalls oxidativ dissoziiert [97].

Bei dem hier verwendeten Verfahren wurde PCC in katalytischen Mengen als Co-Oxidants eingesetzt, Perjodsäure diente der Regeneration von PCC, [98]. Vor Anlagerung des Substrats bildet sich ein Chlorochromat-Perjodat-Komplex, der bei der Abspaltung des Produktes nach der Oxidation ins Chlorochromat-Ion und Iodsäure zerfällt. Laut Literaturangaben sind bei der Oxidation primärer Alkohole Ausbeuten in Höhe von 72 bis 99% möglich [87, 99]. In diesem Fall wurde die Ausbeute nach dem nächsten Syntheseschritt (siehe 4.1.2) berechnet.

Bei diesem Syntheseschritt ist hervorzuheben, dass der Einsatz von PCC auf katalytische Mengen und der Zeitraum auf ein Fünftel im Vergleich zur Literaturmethode reduziert wurde [82] (siehe Tab. 1).

#### 4.1.2 Synthese des 3-Decinsäuremethylesters

Im zweiten Schritt der Synthese fand eine Methylierung der 3-Decinsäure statt. Die Synthese erfolgte nach 3.3.2. Die Durchführung ist in Tabelle 2 der Methode aus der Literatur gegenüber gestellt [80].

**Tabelle 2: Synthese des 3-Decinsäuremethylesters.**

|                             | Literatur  | Durchführung   |
|-----------------------------|--|--|
| <b>Synthese-Chemikalien</b> | 5 bis 50 mmol Säure<br>45 mL Methanol<br>5 mL ( $\approx$ 2,4 eq.) Acetylchlorid | 25 bis 30 mmol 3-Decinsäure<br>250 mL Methanol<br>15 mL ( $\approx$ 7 eq.) Acetylchlorid |
| <b>Temperatur / Zeit</b>    | 20 °C / 18 h   | 0 °C / 15 min // 20 °C / 45 min  |

Im GC-Chromatogramm war nur ein Peak zu erkennen, was auf eine hohe Reinheit des Produktes schließen lässt (siehe Abb. 9 b). Das entsprechende Massenspektrum ist in Abbildung 9 a dargestellt. Als Produkt wurden ca. 27 mmol 3-Decinsäuremethylester erhalten, dadurch ergibt sich bei der Berechnung nach Formel 1 (siehe 3.3) für die beiden Syntheseschritte 3-Decinsäure und 3-Decinsäuremethylester eine Ausbeute von insgesamt ca. 80 %.

Die Methylierung der 3-Decinsäure wurde durchgeführt, um eine Autohydrolyse des später gebildeten Oxiran-Rings zu verhindern [51, 82]. Zudem wird die anschließende Deuterierung mittels Lindlar-Katalysator erleichtert, da der Festphasen-Katalysator für den gebildeten Methylester deutlich zugänglicher ist als für die polare 3-Decinsäure.

Zur Methylierung wurde Acetylchlorid in Methanol verwendet, da es im Vergleich zum üblicherweise für Methylierungen verwendeten Diazomethan eine geringere Explosionsgefahr und eine geringere Kanzerogenität besitzt [83, 97]. Zudem schafft es eine wasserfreie Umgebung, wodurch die saure Hydrolyse des Esters unterdrückt wird, die sich bildende Salzsäure ist für die saure Veresterung nach FISCHER von entscheidender Bedeutung [100]. Die Synthese konnte im Vergleich zur Literatur von 18 h auf 1 h reduziert werden [80] (siehe Tab. 2).

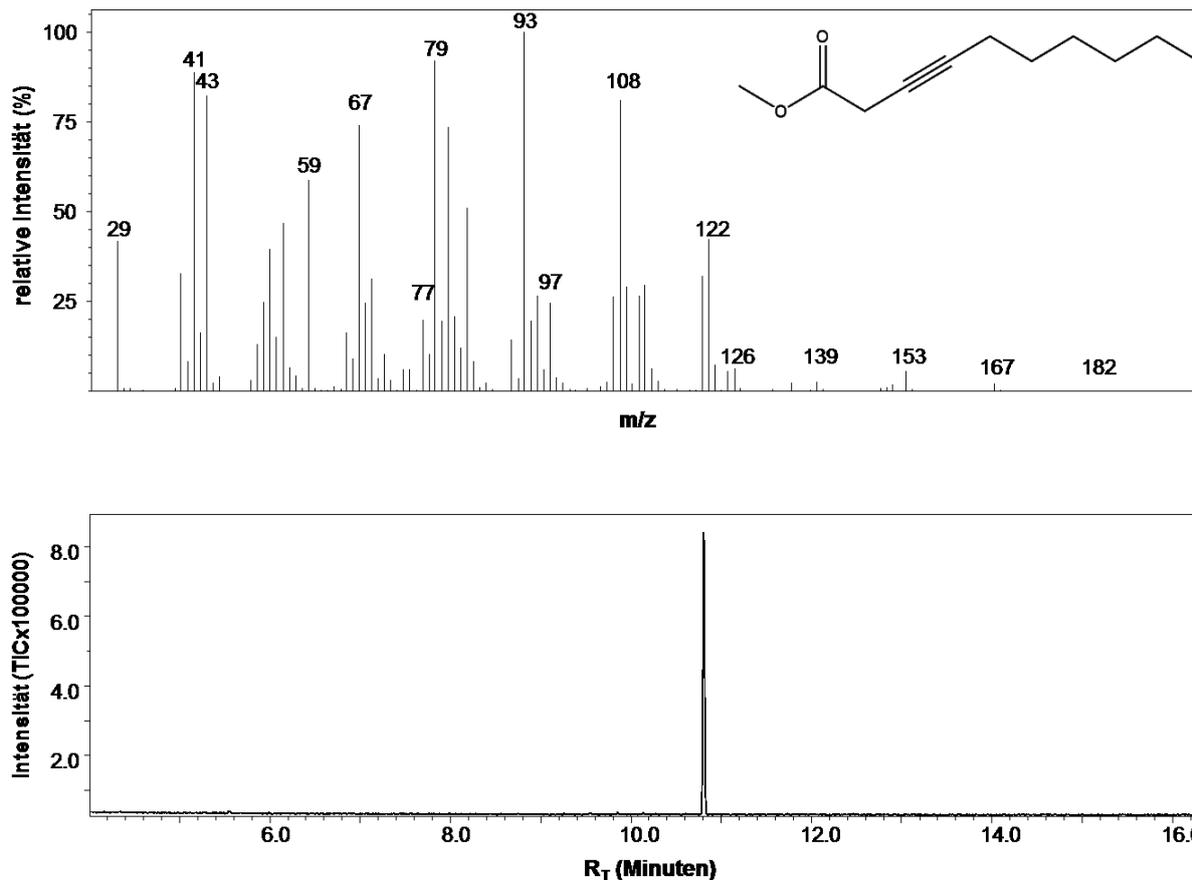


Abbildung 9 a und b: EI-Massenspektrum des 3-Decinsäuremethylesters (a - oben) und GC-Chromatogramm des Produktgemisches nach 3-Decinsäuremethylestersynthese (b - unten).

#### 4.1.3 Synthese des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Decensäuremethylester

Im dritten Syntheseschritt erfolgte die Deuterierung des 3-Decinsäuremethylesters. Die Synthese wurde nach 3.3.3 in Anlehnung an die Angaben aus der Literatur durchgeführt [80]. In Tabelle 3 sind die Parameter der hier durchgeführten Methode den Angaben aus der Literatur gegenüber gestellt.

Das Massenspektrum des Produkts *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Decensäuremethylesters ist in Abbildung 10 dargestellt.

Tabelle 3: Synthese des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Decensäuremethylesters.

|                             | Literatur  | Durchführung   |
|-----------------------------|--|--|
| <b>Synthese-Chemikalien</b> | 2,17 mmol Alkinsäure<br>17 % eq. Pd-Lindlar-Kat.<br>(5 % Pd auf CaCO <sub>3</sub> )<br>0,68 eq. Chinolin<br>1,88 eq. <sup>2</sup> H <sub>2</sub> | 26,95 mmol 3-DecensäureME<br>0,4 % eq. Pd-Katalysator<br>(5 % Pd auf BaSO <sub>4</sub> )<br>0,8 eq. Chinolin<br>(0,94 eq. + 0,8 eq.) <sup>2</sup> H <sub>2</sub> |
| <b>Temperatur / Zeit</b>    | ca. 20 °C / keine Zeitangabe   | 0 °C / 1h - 20 °C / 11h  |

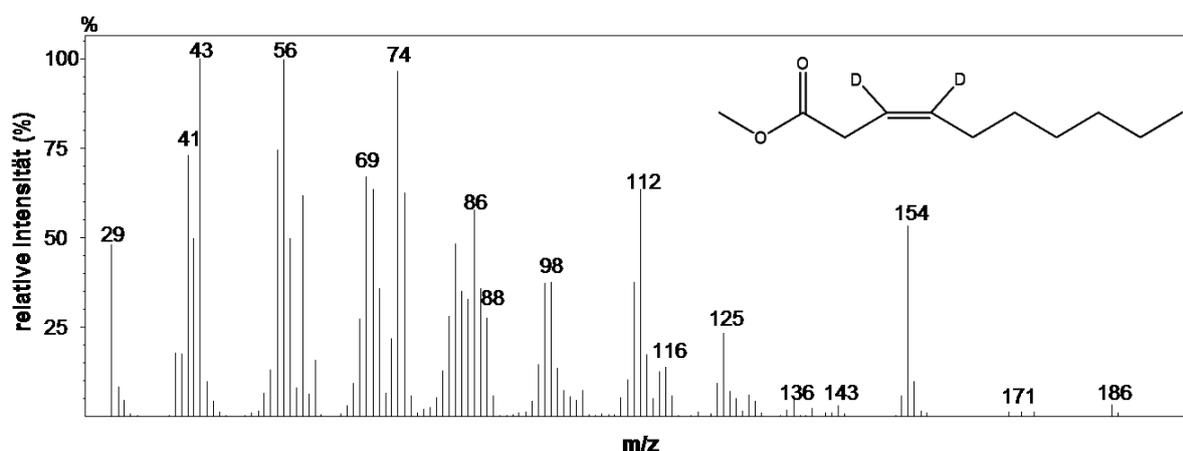


Abbildung 10: EI-Massenspektrum des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Decensäuremethylesters.

Die Berechnung des Deuterierungsgrads des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Decensäuremethylesters erfolgte anhand der in Tabelle 4 dargestellten Formel (siehe auch Abb. 11), wobei die Intensitäten der Fragmentationen mit  $m/z = 154$  (zweifach deuteriertes Produkt),  $m/z = 153$  (einfach deuteriertes Produkt) und  $m/z = 152$  (nicht markiertes Produkt) herangezogen wurden. Über die Intensität des Fragmentations mit  $m/z = 154$  konnte für das zweifach deuterierte Produkt *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Decensäuremethylester ein Deuterierungsgrad von 90,1 % bestimmt werden. Auf das einfach deuterierte Produkt entfielen 9,3 %, vom nicht deuterierten Produkt (*cis*-3-Decensäuremethylester) waren < 1 % vorhanden war.

Die Ausbeute des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Decensäuremethylesters nach Aufreinigung wurde anhand der Formel 1 (siehe 3.3) auf ca. 70 % abgeschätzt. Dies entsprach den Angaben aus der Literatur.

Tabelle 4: Formel zur Berechnung des Deuterierungsgrads des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Decensäuremethylesters.

| Deuterierungsgrad | Absolute Intensität | Prozentualer Anteil                                      |
|-------------------|---------------------|--|
| $P + x$           | $I(P + x)$          | $p(P + x) = \frac{I(P + x)}{I(P) + I(P + 1) + I(P + 2)}$ |
| $152 = P$         | 427                 | 0,5 %  |
| $153 = P + 1$     | 7.498               | 9,3 %  |
| $154 = P + 2$     | 72.367              | 90,1 %   |

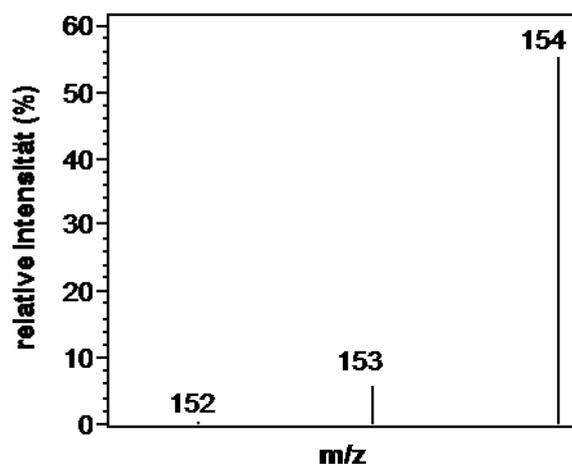


Abbildung 11: Vergrößerter Ausschnitt des EI-Massenspektrums des durch chemische Synthese hergestellten *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Decensäuremethylesters. Anhand der relativen Intensität (%) der Fragmentionen mit  $m/z = 152$ ,  $m/z = 153$  und  $m/z = 154$  kann der Markierungsgrad des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Decensäuremethylesters bestimmt werden.

Eine Deuterierung lässt sich analog zu einer Hydrierung betrachten [80, 101]. Dabei wird der eingesetzte Palladium-Katalysator nach LINDLAR vor Zugabe des Substrats mittels Chinolin vergiftet, damit die Reaktion auf der Stufe der Alkene annähernd zum Erliegen kommt. Durch die höhere Bindungsfähigkeit von Alkinen an das aktive Zentrum findet eine Deuterierung von Alkenen erst nach vollständigem Verbrauch der Alkine statt [101]. So wurde die Reaktion nach Verbrauch einer der äquimolaren Menge Deuterium abgebrochen, um eine weitere Reaktion zu vermeiden. Hierbei war ein verminderter Einsatz an Palladium bei vergleichbarer Umsetzung im Gegensatz zur Literaturvorgabe ausreichend [80].

#### 4.1.4 Synthese des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters

Im letzten Syntheseschritt wurde der *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Decensäuremethylester zu *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester epoxidiert (siehe Abb. 12). Die Synthese wurde nach der Vorschrift 3.3.4 durchgeführt. Alle Angaben wurden dabei aus der Literatur [83] bei einem Einsatz von 19,2 mmol *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Decensäuremethylester übernommen.

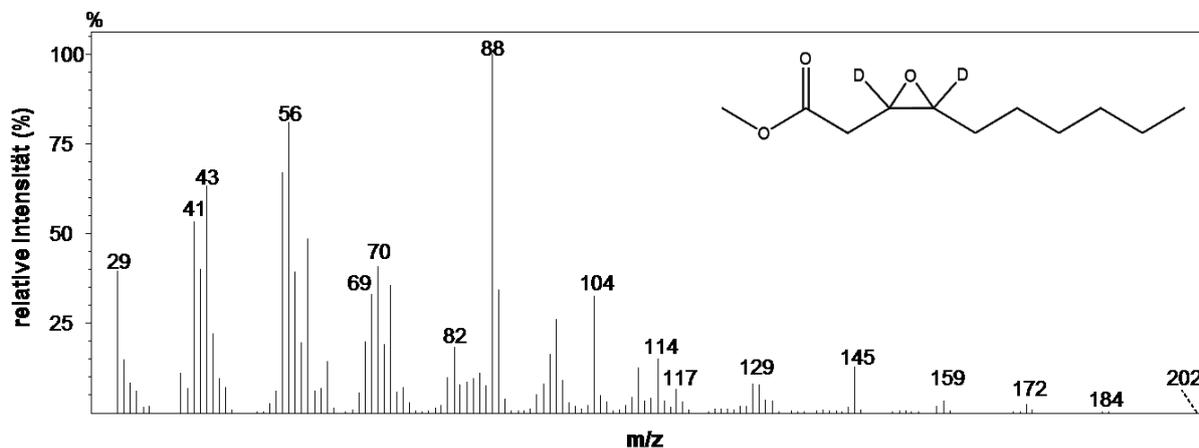


Abbildung 12: EI-Massenspektrum des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters.

Die Aufreinigung des Endproduktes erfolgte an Kieselgel durch Einsatz der mobilen Phase B (siehe 3.3.5). Die mittels Formel 1 (siehe 3.3) berechnete Ausbeute betrug nach Aufreinigung ca. 65% (= 12,6 mmol). In Bezug auf die eingesetzte Stoffmenge des Edukts 3-Decin-1-ol ergibt sich eine Gesamtausbeute der vierstufigen Synthese von ca. 37%. Mittels GC/MS-Messung (siehe 3.2.1) konnte eine weitere Substanz mit identischem Massenspektrum nachgewiesen werden, die im Vergleich der Peakflächen einen Anteil von 2,3% ausmachte (siehe Abb. 13). Dabei handelt es sich um das *trans*-Isomer des [3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters. Auf eine adsorptionschromatographische Trennung beider Isomere wurde aufgrund des geringen Anteils des *trans*-Isomers verzichtet.

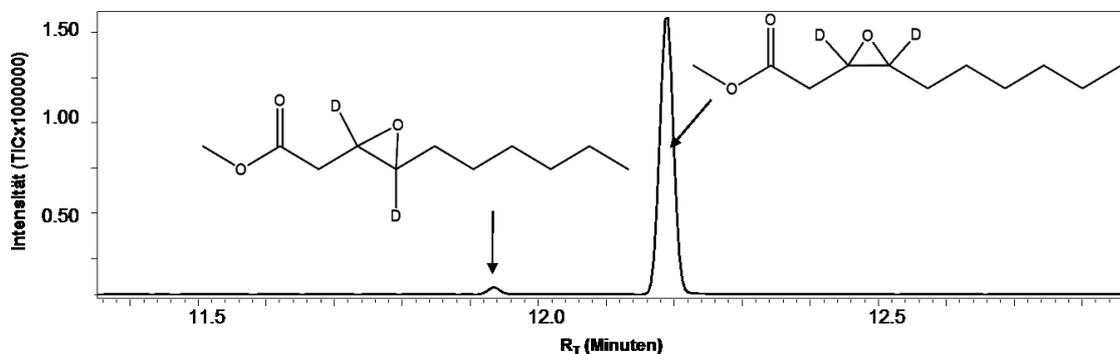


Abbildung 13: GC-Chromatogramm des *trans*- und *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters.

## 4.2 Entwicklung einer GC-SIM-MS-Methode

Dieses Kapitel befasst sich mit der Entwicklung einer GC-SIM-MS Methode zur sensitiven und selektiven Analyse der Abbauprodukte des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters (siehe Abb. 6). Die Einführung einer Isotopenmarkierung in das Substrat erlaubt eine eindeutige Unterscheidung seiner Abbauprodukte von anderen, endogen gebildeten Metaboliten.

Die Quantifizierung der Abbauprodukte ist Voraussetzung zur Etablierung eines Enzymparametertests und setzt im ersten Schritt der Methodenentwicklung sowohl die Bestimmung der Retentionszeiten als auch der Massenspektren der Zielsubstanzen voraus. Unter der Verwendung einer DB-1-Säule aus 100 % Polydimethylsiloxan als stationäre Phase ist die Elutionsreihenfolge der Substanzen im GC-Chromatogramm bereits bekannt (siehe Abb. 14) [82]. Da in dieser Arbeit eine DB-5-Säule aus 95 % Polydimethyl- und 5 % Polyphenylmethylsiloxan verwendet wurde, musste die Elutionsreihenfolge der Abbauprodukte neu bestimmt werden.

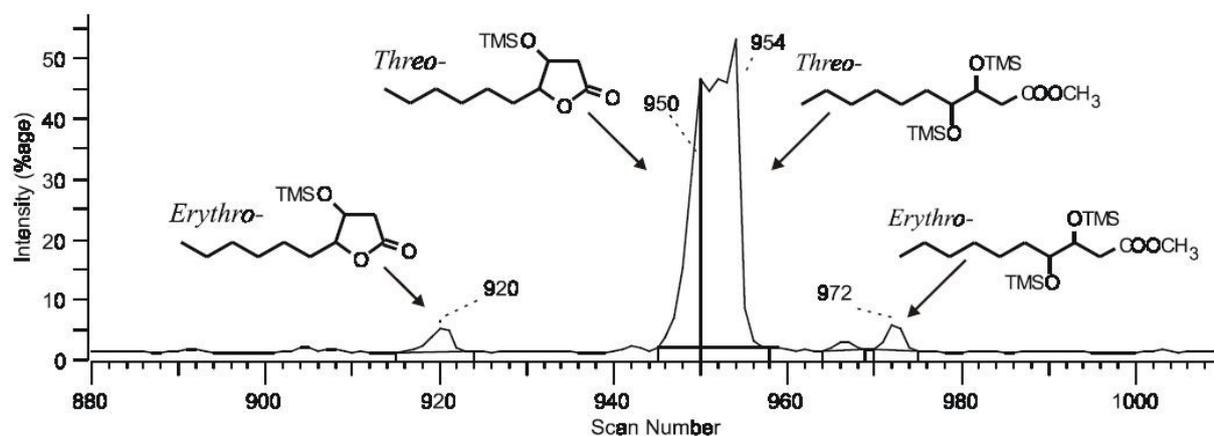


Abbildung 14: GC-Chromatogramm mit Zuordnung der Elutionsreihenfolge der *erythro*- und *threo*-3-Hydroxy- $\gamma$ -Decalactone und der *erythro*- und *threo*-3,4-Dihydroxydecansäuremethylester (nicht isotopenmarkiert) (DB-1-Säule) [82].

Da die in dieser Arbeit zu untersuchenden (isotopenmarkierten) Abbauprodukte nicht kommerziell verfügbar sind, werden sie durch saure Hydrolyse des Substrats mit Perchlorsäure (0,7 bzw. 7 %) chemisch erzeugt und anschließend mittels GC/MS Programm 1 (scan) (siehe 3.2.1), das auch zur Überprüfung der Syntheseprodukte verwendet wurde, gemessen. Unter diesen GC Bedingungen waren die Peaks im GC-Chromatogramm teilweise überlagert. Um eine Trennung der Peaks zu erreichen wurde im Folgenden anstelle des GC/MS Programms 1 mit einem Temperaturgradienten von 10 °C/min das GC/MS Programm 2 (siehe 3.2.1) mit einem Temperaturgradienten von 6 °C/min verwendet. Die nun etwas flachere Rampe im Temperaturgradienten bewirkte eine Trennung der Substanzen im GC-Chromatogramm. Unter Verwendung von 7 % Perchlorsäure wurde der Peak mit der

größten Intensität durch die Substanz 2b hervorgerufen (siehe Abb. 15 a). Die Substanzen 1a, 1b und 2b sind im GC-Chromatogramm zwar deutlich zu erkennen, wiesen aber eine deutlich geringere Intensität auf. Bei der Hydrolyse mit 0,7 % Perchlorsäure wurde fast ausschließlich die Substanz 1b gebildet, die Substanzen 1a, 2a und 2b wurden nur in Spuren detektiert (siehe Abb. 15 b).

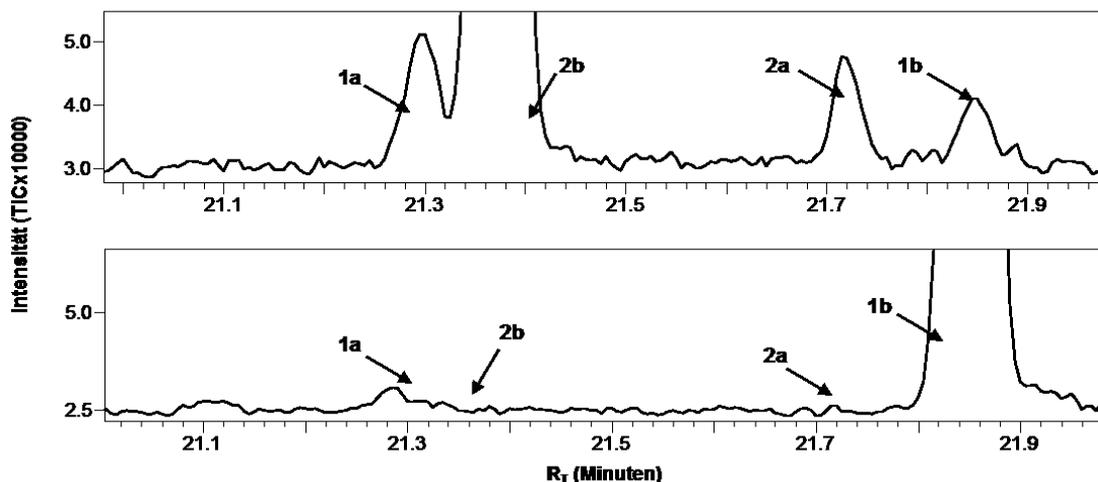


Abbildung 15 a und b: GC-Chromatogramme der Reaktionsprodukte des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters bei saurer Hydrolyse mittels Perchlorsäure (a – oben: 7 %, b – unten: 0,7 %).

Zwei der vier Peaks in den GC-Chromatogrammen wiesen jeweils ein identisches Massenspektrum auf. Dabei entsprach das Spektrum der Substanz 1a dem der Substanz 1b (siehe Abb. 16 a) und das Spektrum der Substanz 2a dem von Substanz 2b (siehe Abb. 16 b). Durch Abgleich der ermittelten Massenspektren mit denen in vorangegangenen Arbeiten publizierten [82, 83] konnten die Abbauprodukte des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters schließlich zugeordnet werden. Bei den Substanzen 1a und b handelt es sich um die Diastereomere *erythro*- und *threo*-3-Hydroxy-TMS- $\gamma$ -Decalacton und bei den Substanzen 2a und 2b um den *erythro*- bzw. *threo*-3,4-Dihydroxy-TMS-decansäuremethylester. Das TMS wurde durch die vor der Messung durchgeführten Silylierung hervorgerufen (siehe 3.3.7).

Da es sich bei der hier durchgeführten Erzeugung der Abbauprodukte des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters durch Perchlorsäure um eine rein chemische Umsetzung handelt, kann es sich bei der Substanz 2b nur um den *threo*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Dihydroxy-TMS-decansäuremethylester und bei der Substanz 1b nur um das *threo*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Hydroxy-TMS- $\gamma$ -Decalacton handeln. Dieser Abbauweg, der chemisch unter Inversion der Konfiguration abläuft, ist der einzig mögliche.

Beim Einsatz von 7 % Perchlorsäure entstand hauptsächlich der *threo*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Dihydroxy-TMS-decansäuremethylester und beim Einsatz von 0,7 % Perchlorsäure hauptsächlich das *threo*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Hydroxy-TMS- $\gamma$ -Decalacton. Die *erythro*-Abbauprodukte

lassen sich aus *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester nur durch Enzyme die analog zur LTA<sub>4</sub>H unter Retention der Konfiguration arbeiten (siehe 2.3.4) oder chemisch unter Inversion der Konfiguration aus *trans*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester herstellen. Dieses *trans*-Diastereomer entstand in Spuren bei der Synthese des Substrats *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester (siehe 4.1.4) und erzeugte bei Zugabe von Perchlorsäure chemisch Spuren von *erythro*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Hydroxy-TMS- $\gamma$ -Decalacton (Substanz 1a) und *erythro*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Dihydroxy-TMS-decansäuremethylester (Substanz 2a).

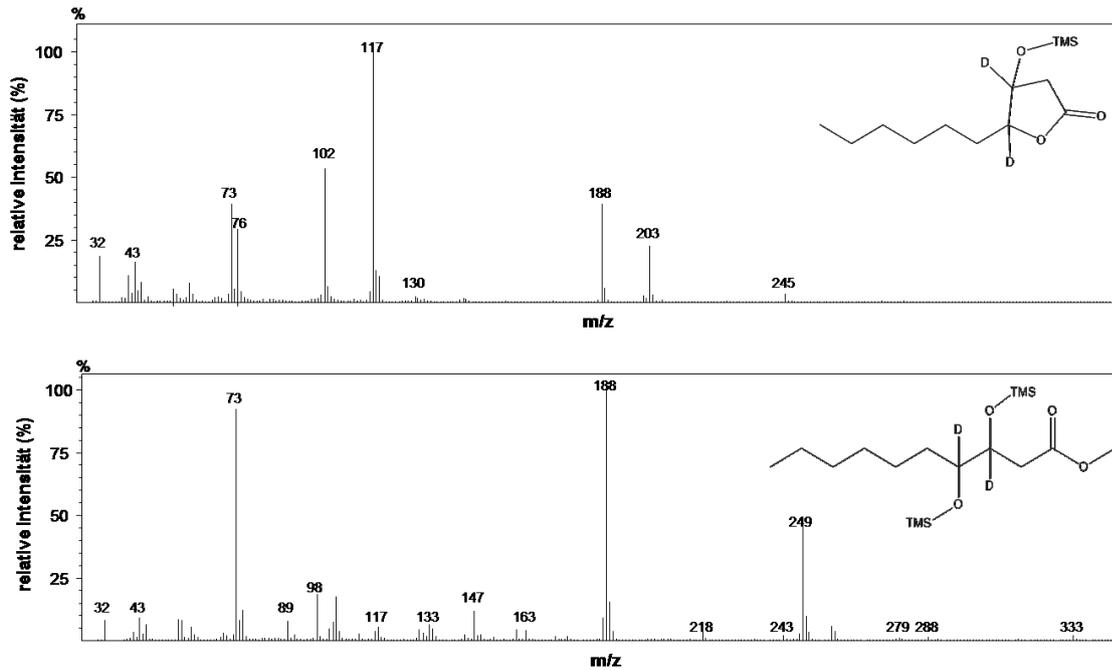


Abbildung 16 a und b: EI-Massenspektren der Substanzen 1a und 1b (a - oben) und 2a und 2b (b - unten).

Die Zuordnung der Substanzen anhand ihrer Retentionszeiten sowie die im Folgenden verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Zuordnung der Reaktionsprodukte nach chemischer Hydrolyse.

| Nummer | R <sub>T</sub> (min) | Substanz   | Abkürzung              |
|--------|----------------------|--|------------------------|
| 1a     | 21,3                 | <i>erythro</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-Hydroxy-γ-Decalacton (TMS)               | <i>erythro</i> -Lacton |
| 2b     | 21,4                 | <i>threo</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3,4-Dihydroxy-decansäuremethylester (2TMS)   | <i>threo</i> -DiOH     |
| 2a     | 22,7                 | <i>erythro</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3,4-Dihydroxy-decansäuremethylester (2TMS) | <i>erythro</i> -DiOH   |
| 1b     | 22,9                 | <i>threo</i> -[3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-Hydroxy-γ-Decalacton (TMS)                 | <i>threo</i> -Lacton   |

Diese Zuordnung der Peaks im GC-Chromatogramm deckt sich auch mit den Ergebnissen aus früheren Untersuchungen (siehe Abb. 14). Die Elutionsreihenfolge der Abbauprodukte innerhalb einer Substanzklasse hat sich unter Verwendung einer DB-5-Säule als stationäre Phase im Vergleich zur Verwendung einer DB-1-Säule nicht verändert. Die Reihenfolge zwischen den beiden Substanzklassen war jedoch ineinander verschoben (siehe Abb. 17).

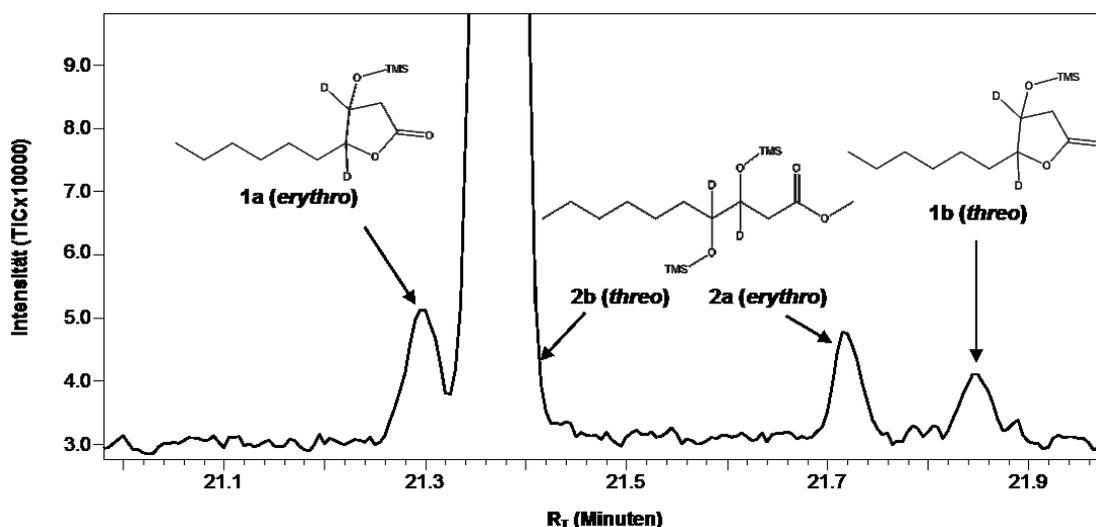
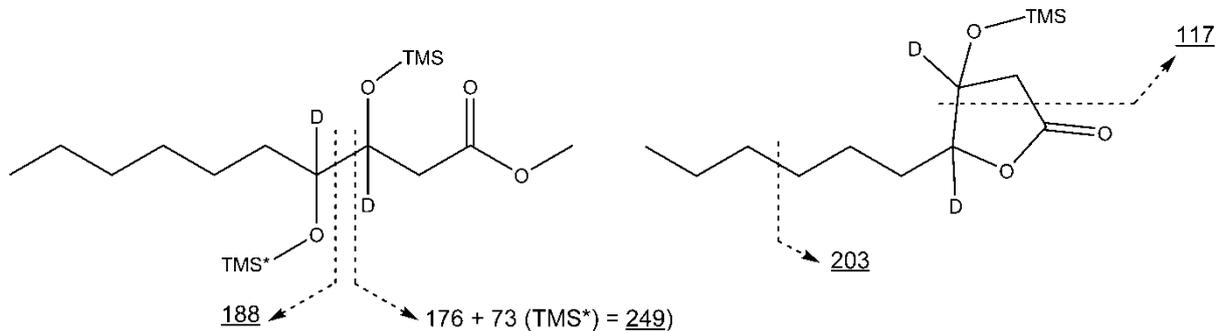


Abbildung 17: GC-Chromatogramm mit Zuordnung der Elutionsreihenfolge der *erythro*- und *threo*-3-Hydroxy-γ-Decalactone und der *erythro*- und *threo*-3,4-Dihydroxydecansäuremethylester (isotopenmarkiert) (DB-5-Säule).

Mit Hilfe der Massenspektren der Substanzen (siehe Abb. 16) und der Intensitäten der Fragmentionen konnte eine GC/MS-Analysenmethode im Selected-Ion-Modus (SIM) etabliert werden. Die Fragmentierung der Substanzen ist in Abbildung 18 dargestellt. Zur quantitativen und qualitativen Analyse werden je Substanz zwei charakteristische Ionen verwendet. Für *erythro*/*threo*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Hydroxy-γ-decalacton (siehe Abb. 18 b) sind dies die Ionen mit m/z = 117 (zur Quantifizierung) und m/z = 203 (zur Qualifizierung), für den

*erythro/threo*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Hydroxydecansäuremethylester (siehe Abb. 18 a) die Ionen mit  $m/z = 249$  (zur Quantifizierung) und  $m/z = 188$  (zur Qualifizierung).



**Abbildung 18 a und b:** Schematische Darstellung der EI-MS-Fragmentierung der *erythro-* und *threo*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Dihydroxydecansäuremethylester (a – links) sowie der *erythro-* und *threo*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Hydroxy- $\gamma$ -decalactone (b – rechts).

Die Quantifizierung der Substanzen in den Zellkulturproben (siehe 4.4 bis 4.7) erfolgte über den internen Standard (ISTD) Heptadecansäuremethylester, der nach der Inkubation in definierter Konzentration zugegeben wurde. Für den ISTD wurde das Ion mit  $m/z = 74$  zur Quantifizierung und das Ion mit  $m/z = 256$  zur Qualifizierung ausgewählt. Zur Absicherung des Standards (Kontrollsubstanz) wurde als weitere Substanz 1-Decanol zugegeben und als TMS über die Ionen 75 (zur Quantifizierung) und 215 (zur Qualifizierung) bestimmt.

Die Quantifizierung der oben genannten Abbauprodukte (Analyten) erfolgte in den Zellkulturproben (siehe 4.4 bis 4.7) nach Formel 4.

**Formel 4: Quantifizierung der Abbauprodukte in den Zellkulturproben.**

$$c (\text{Analyt}) = A (\text{Analyt}) / A (\text{ISTD}) * c (\text{ISTD})$$

c= Konzentration

A = Area (Peakfläche)

ISTD = Interner Standard (Heptadecansäuremethylester)

Die *erythro*-Abbauprodukte können aus dem *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester nur enzymatisch gebildet werden. Da der entsprechende *trans*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester zur chemischen Erzeugung der *erythro*-Abbauprodukte nicht synthetisiert wurde, lagen keine Referenzsubstanzen zur Bestimmung der Responsefaktoren dieser Substanzen vor. Um die Abbauprodukte trotzdem quantitativ bestimmen zu können, wurde der ISTD in einer Größenordnung der zu erwartenden Konzentrationen der Abbauprodukte zugegeben. Die Art der Quantifizierung ist ausreichend, da zur Bewertung der enzymatischen Umwandlung des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters beim Enzymparameter-test ausschließlich die Konzentrationen der gebildeten *erythro*-Abbauprodukte (unter Retention der Konfiguration) in Bezug zu den Konzentrationen der

*threo*-Abbauprodukte (unter Inversion der Konfiguration) gesetzt wurden (E/t-Quotient). Die Substanzen sind jeweils Diastereomere, die sich nur in der Stellung der OH-Gruppe (*erythro/threo*) unterscheiden. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass der Responsefaktor der beiden Substanzen (jeweils *erythro/threo*) bezogen auf den ISTD annähernd gleich ist (Berechnung siehe Formel 5).

**Formel 5: Bestimmung des E/t-Quotienten aus der Summe der Konzentrationen der *erythro*- (Abbau)Produkte und der Summe der Konzentrationen der *threo*- (Abbau)Produkte in den Zellkulturproben.**

**E/t-Quotient = (Summe (c (*erythro*-Lacton) + c (*erythro*-DiOH))) / (Summe (c (*threo*-Lacton) + c (*threo*-DiOH)))**

**E/t-Quotient = (Summe (c (*erythro*-Produkte))) / (Summe (c (*threo*-Produkte)))**

Eine Übersicht der zur Quantifizierung und Qualifizierung verwendeten Ionen der Abbauprodukte, des ISTDs und der Referenzsubstanz ist in 3.2.1 aufgeführt.

### 4.3 PCR-Analytik

Die in diesem Kapitel beschriebene PCR-Analyse diente der genetischen Überprüfung der *Saccharomyces* Stämme, die in den nachfolgenden Kapiteln bei der Zellkultur eingesetzt werden. Im Mittelpunkt stand dabei die Analyse des *S. cerevisiae* Gens YNL045W, welches für die LTA<sub>4</sub>H codiert, die die einzig bekannte Epoxidhydrolase in *S. cerevisiae* ist (siehe 2.5.3), sowie dessen deletierte Variante  $\Delta$ YNL045W, welche das Kanamycin-Resistenz-Gen kanMX4 enthält. Außerdem wurde *S. carlsbergensis* RH eingesetzt um das Gen YNL045W, welches für die LTA<sub>4</sub>H codiert, möglicherweise nachweisen zu können. Als Hybrid aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces bayanus* weist der Stamm Merkmale beider Genotypen bzw. Phänotypen auf (siehe 2.5.2).

Die verwendeten *Saccharomyces* Stämme sind nachfolgend in Tabelle 6 aufgeführt. Die Mutante *S. cerevisiae* BY4147  $\Delta$ YNL045W wurde sowohl nach einem Monat (M) als auch nach 10 Monaten (M2) Lagerung bei 4°C untersucht, um die Stabilität des Knockouts zu überprüfen.

**Tabelle 6: *Saccharomyces* Stämme für die PCR-Analyse.**

| Symbol                | Hefestamm                                    | Lagerzeit bei 4°C         |
|-----------------------|--|---------------------------|
| <b>M (Mutante)</b>    | <i>S. cerevisiae</i> BY4147 $\Delta$ YNL045W | 10 Monate                 |
| <b>M2 (Mutante 2)</b> | <i>S. cerevisiae</i> BY4147 $\Delta$ YNL045W | 1 Monat                   |
| <b>WT (Wildtyp)</b>   | <i>S. cerevisiae</i> BY4147 YNL045W          | 1 Monat                   |
| <b>RH (RH Stamm)</b>  | <i>S. carlsbergensis</i> RH                  | 1 Monat                   |
| <b>GR</b>             | GeneRuler-Ladder-Mix                         | Marker für die Basenpaare |

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte nach 3.4.1, die PCR nach 3.4.2 und die Analyse der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese nach 3.4.3.

#### 4.3.1 Isolierung genomischer DNA

Nach der DNA-Isolierung (siehe Abb. 19) konnte für *S. cerevisiae* BY4147  $\Delta$ YNL045W Mutante (M bzw. M2) und für *S. carlsbergensis* RH (RH) eine ausreichende Konzentration an isolierter genomischer DNA nachgewiesen werden. Da sich nur eine Bande im Bereich von 6000 bis 10000 bp befindet, kann davon ausgegangen werden, dass sich keine Verunreinigung in der isolierten DNA befindet. Die Bande des *S. cerevisiae* BY4147 Wildtyps (WT) wies im Gegensatz zu denen der anderen Hefestämme eine deutlich geringere Intensität auf.

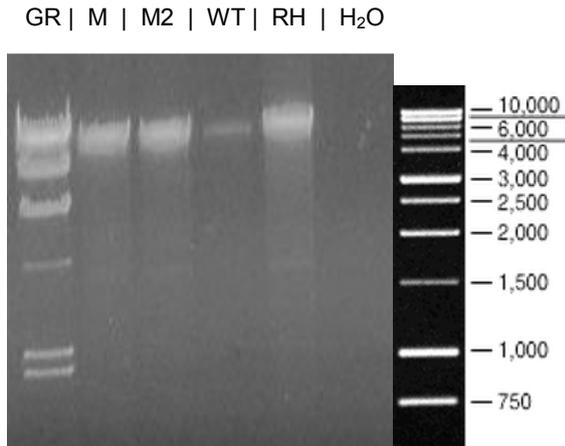


Abbildung 19: Gel der Elektrophorese zur isolierten genomischen DNA der *Saccharomyces* Stämme Mutante (M und M2), Wildtyp (WT) und RH Stamm (RH). GR ist der Marker für die Basenpaare (GeneRuler-Ladder-Mix).

#### 4.3.2 PCR

Die PCR wurde mit den Primerkombinationen G1fw und G2rev (1. Ansatz - Abb. 20), 045fw und 045rev (2. Ansatz - Abb. 21) sowie G1fw und 045rev (3. Ansatz - Abb. 22) durchgeführt.

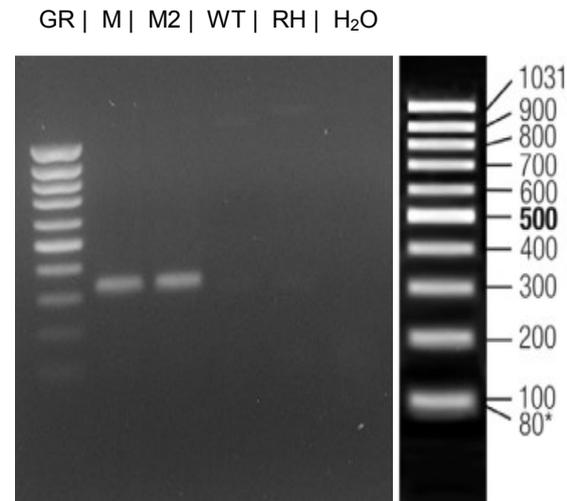
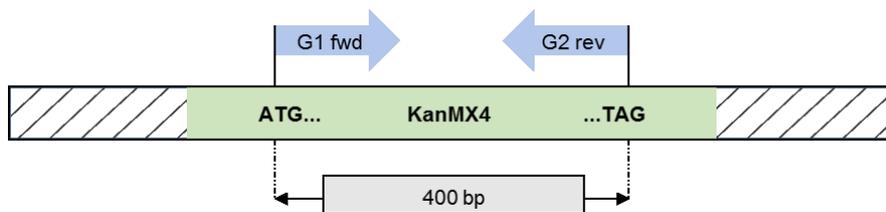
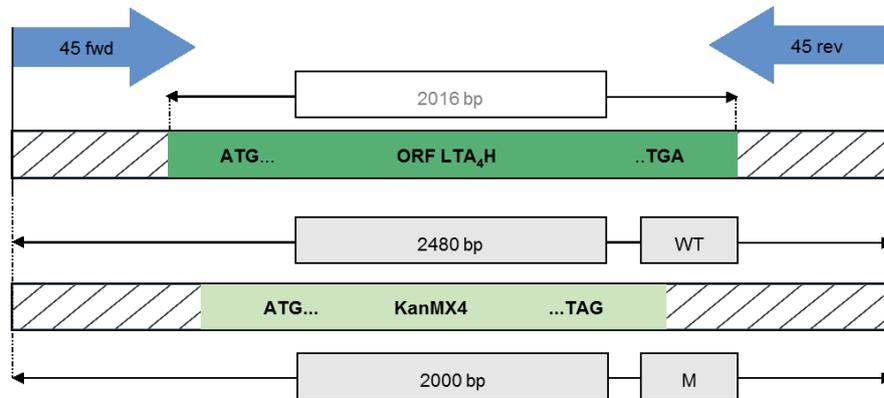


Abbildung 20: Ansatz 1 – Schema (a - oben) und Gel (b – unten) der Elektrophorese zur Gradienten-PCR mit den Primern G1fw und G2rev für die *Saccharomyces* Stämme Mutante (M und M2), Wildtyp (WT) und RH Stamm (RH). GR ist der Marker für die Basenpaare (GeneRuler-Ladder-Mix).

Die im ersten Ansatz der PCR verwendeten Primer G1fw und G2rev dienen dem Nachweis der Deletionskassette  $\Delta YNL045W$  bzw. des kanMX4. Wie erwartet (siehe Schema in Abb. 20 a) war im Gel zur PCR nur bei der Mutante (M und M2) eine Bande sichtbar (siehe Abb. 20

b). Diese befindet sich im Bereich von 400 bp. Da beim Wildtyp und beim RH Stamm keine Deletionskassette mit dem eingebauten kanMX4 besitzen, lässt sich diese Bande bei den Stämmen auch nicht nachweisen.



GR | M | M2 | WT | RH | H<sub>2</sub>O GR | WT' | WT | M2 | H<sub>2</sub>O

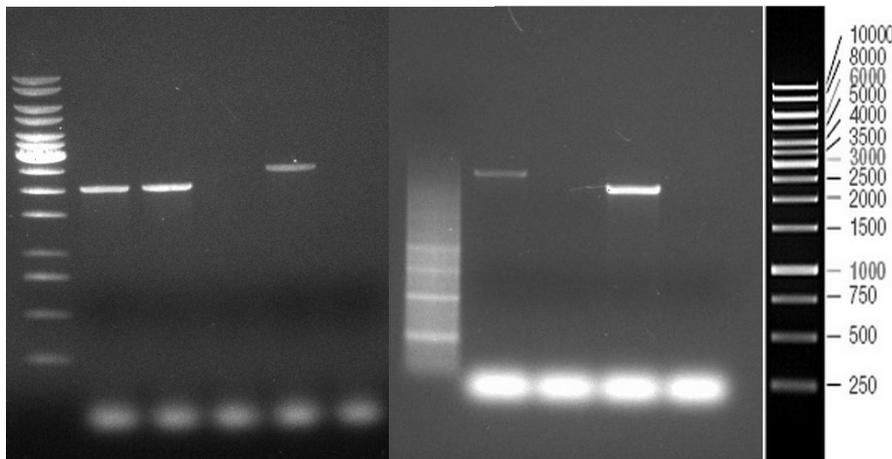
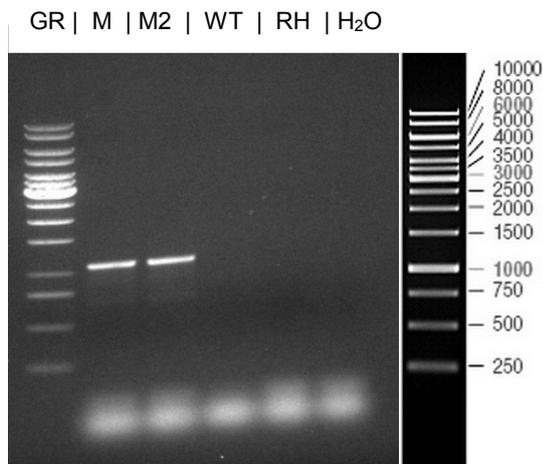
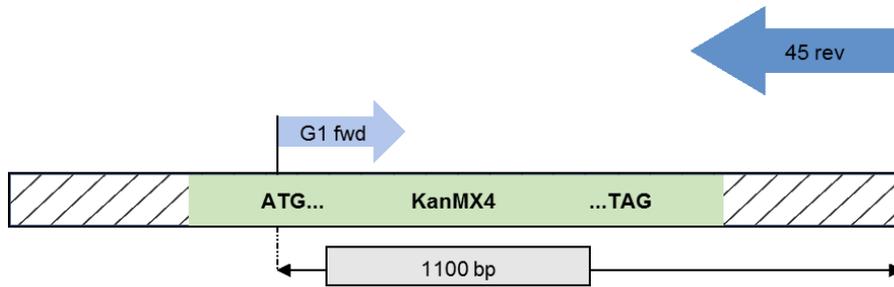


Abbildung 21 a, b und c: Ansatz 2 - Schema (a - oben) und Gele (b – unten/links: 1.Versuch; c – unten/rechts: 2.Versuch) der Elektrophorese zur Gradienten-PCR mit den Primern 045fw und 045rev für die *Saccharomyces* Stämme Mutante (M und M2), Wildtyp (WT) und RH Stamm (RH). GR ist der Marker für die Basenpaare (GeneRuler-Ladder-Mix).

Die verwendete Primerkombination 045fw und 045rev (Ansatz 2) diente der Überprüfung des Wildtypgens *YNL045W*. Da sich die Primer außerhalb des Wildtypgens anlagern, muss im Gel zur PCR in allen Hefestämmen eine Bande vorhanden sein (siehe Abb. 21 a), die in der Mutante aber aufgrund der Deletion kürzer sein muss (siehe 2.5.3). In Abbildung 21 b ist der erste Durchgang abgebildet. Dort war je eine Bande für die Stämme M und M2 auf Höhe des Markers von etwa 2000 bp sowie für den RH Stamm bei 2500 bp sichtbar. Da keine Bande beim Wildtyp erkennbar war, wurde der Ansatz noch einmal mit erhöhter Menge der verdünnten DNA (2  $\mu$ L anstelle von 1  $\mu$ L) wiederholt. Das Ergebnis ist in Abbildung 21 c abgebildet (WT'). Als Vergleich wurde M2 mitgeführt. Bei diesem Gel zur PCR mit erhöhter Konzentration an DNA, war für den Wildtyp eine Bande auf Höhe des Markers bei etwa 2500 bp, wenn auch mit niedriger Intensität, sichtbar. Nach Vergleich mit Abbildung 21 a waren die

Fragmente mit einer Länge von 2480 bp (WT) und einer Länge von 2000 bp (M) zu erwarten und können somit als nachgewiesen angesehen werden.



**Abbildung 22: Ansatz 3 - Schema (a - oben) und Gel (b – unten) der Elektrophorese zur Gradienten-PCR mit den Primern G1fw und 045rev für die *Saccharomyces* Stämme Mutante (M und M2), Wildtyp (WT) und RH Stamm (RH). GR ist der Marker für die Basenpaare (GeneRuler-Ladder-Mix).**

Bei dem Einsatz der Primer aus Ansatz 3 sollte die korrekte Lokalisierung der Deletionskassette nachgewiesen werden (siehe Abb. 22 a). Wie erwartet waren im Gel (siehe Abb. 22 b) keine Banden für den Wildtyp und den RH Stamm sichtbar. Für die Stämme M und M2 war eine Bande im Bereich zwischen den Höhen der Marker bei 1000 und 1500 bp sichtbar. Damit kann die zu erwartende Bande bei 1100 bp als nachgewiesen angesehen werden (siehe 2.5.3).

Bei dem Wildtyp konnte das Gen *YNL045W* welches die einzig in *S. cerevisiae* bekannte Epoxidhydrolase LTA<sub>4</sub>H codiert nachgewiesen werden. Da bei dem *S. carlsbergensis* RH Stamm auch eine Bande im Bereich der Markerbande von 2500 bp zu sehen war, ist davon auszugehen, dass auch dieser Stamm das Gen enthält. Bei der *S. cerevisiae* Mutante konnte sowohl die Deletionskassette  $\Delta$ *YNL045W* bzw. das Kanamycin-Resistenz-Gen (*kanMX4*) nachgewiesen werden, als auch die korrekte Lokalisierung bestimmt werden. Auch die Stabilität der Deletionskassette über einen Zeitraum von 10 Monaten konnte bestätigt werden.

#### 4.4 Parameter Zellkultur und Inkubation

Nachdem das Substrat *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester synthetisiert (siehe 4.1) und eine GC-SIM-MS-Methode für die Abbauprodukte entwickelt wurde (siehe 4.2), befasst sich dieses Kapitel mit der Entwicklung eines Enzymparametertests. Dieser Test dient dazu verschiedene Parameter während der Zellkultur und Inkubation zu untersuchen. Konkret wurde der Einfluss von pH-Wert, Puffersystem, Zellkonzentration und Temperatur auf den enzymatischen Abbau des Substrats untersucht und optimiert (siehe Tab. 7). Dabei sollten Bedingungen geschaffen werden, um ein bisher unbekanntes Enzym EH-1 näher charakterisieren zu können.

**Tabelle 7: Übersicht über die Parameter der Zellkultur und Inkubation, die aufgrund ihres potentiellen Einflusses auf die enzymatische Umwandlung des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters im vorliegenden Kapitel untersucht werden. Für jeden Parameter sind die entsprechenden Bedingungen, die verwendeten Hefestämme (*S. cerevisiae* Mutante (M) und Wildtyp (WT), *S. carlsbergensis* RH (RH) und *S. bayanus* (B)) angegeben und das behandelnde Kapitel aufgeführt.**

| Parameter                         | Versuch/Bedingungen  | M | WT | RH | B | Kapitel |
|-----------------------------------|--|---|----|----|---|---------|
| <b>Grundparameter Zellanzucht</b> | pH-Wert / Zeitraum Zellanzucht                                 | x | -  | x  | - | 4.4.1   |
| <b>pH-Optimum Phosphatpuffer</b>  | V1 bis V3 (verschiedene pH-Werte)                              | a | b  | c  | d | 4.4.3   |
| <b>pH-Optimum T/E-Puffer</b>      | V4 bis V6 (verschiedene pH-Werte)                              | a | b  | c  | d | 4.4.4   |
| <b>Zellkonzentration</b>          | einfache, dreifache, sechsfache, neunfache bzw. 12-fache Konz. | x | x  | x  | x | 4.4.5   |
| <b>Substratkonzentration</b>      | einfache und fünffache Konz.                                   | x | x  | x  | - | 4.4.5   |
| <b>Pufferkonzentration</b>        | 6,67 mM / 22,2 mM / 44,4 mM / 66,7 mM                          | x | -  | x  | x | 4.4.6   |
| <b>Inkubationsdauer</b>           | 22 h / 44 h / 66h  | x | -  | x  | x | 4.4.6   |
| <b>Temperatur</b>                 | 18 °C / 23 °C / 28 °C  | x | -  | x  | - | 4.4.7   |

Bei den Enzymparametertests wurde zunächst eine LTA<sub>4</sub>H deletierte Knockout-Mutante *S. cerevisiae* BY4741 ΔYNL045W (Mutante - M) eingesetzt. In diesem Stamm kann ein enzymatischer Substratabbau nicht durch LTA<sub>4</sub>H beeinflusst werden, so dass sich diese Mutante besonders für die Untersuchung von EH-1 eignet, welches das Substrat *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester analog zur LTA<sub>4</sub>H unter Retention der Konfiguration

über vicinale Dihydroxysäuren in Hydroxylactone umwandelt. LTA<sub>4</sub>H ist die bisher einzig in *S. cerevisiae* bekannte Epoxidhydrolase.

Anschließend wurden die Ergebnisse des Enzymparametertests mit denen der Hefestämme *S. cerevisiae* BY4741 in der das Gen YNL045W, welches für die LTA<sub>4</sub>H codiert, aktiv ist (Wildtyp - WT) und *S. carlsbergensis* RH (RH) verglichen. Im RH Stamm wurde in voran gegangenen Arbeiten bereits eine hohe enzymatische Umsetzung von epoxidierten Fettsäuren in Hydroxylactone nachgewiesen [83]. Da es sich beim RH Stamm um einen Hybrid aus *S. cerevisiae* und *S. bayanus* (siehe 2.5.2) handelt, wurden zusätzlich Versuche mit *S. bayanus* (B) durchgeführt. Mit diesen Versuchen sollte die enzymatische Umwandlung von *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester für die einzelnen Stämme eingeordnet werden.

#### 4.4.1 Grundparameter

Versuch I wurde mit der im Zentrum der Untersuchungen stehenden Mutante *S. cerevisiae* BY4741  $\Delta$ YNL045W durchgeführt.

Es wurden Zellen unter Zugabe von 170  $\mu$ L Ölsäure in 500 mL Hefemedium für 3 Tage (96 h) bei Raumtemperatur (RT) angezogen. Anschließend wurden Proben zur Untersuchung der enzymatischen Umwandlung des Substrats *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester für 3 h, 6 h, 12 h und 24 h inkubiert (siehe 3.5.11 und 3.5.12), extrahiert, derivatisiert und mittels GC-SIM-MS (siehe 3.2.1) analysiert.

Die Konzentration der unter Retention der Konfiguration gebildeten *erythro*-Produkte (Lacton und DiOH; nur enzymatische Bildung analog zur LTA<sub>4</sub>H möglich) und die durch *trans*-Hydrolyse entstandenen *threo*-Produkte (Lacton und DiOH; chemische oder enzymatische Bildung möglich) (siehe Abb. 6) wurden über Heptadecansäuremethylester als internen Standard quantitativ bestimmt. Als Bewertungsgrundlage für die enzymatische Umwandlung des Substrats durch das bisher unbekanntes Enzym EH-1 diente in dieser Arbeit der E/t-Quotient aus der Summe der Konzentrationen der *erythro*-Produkte und der Summe der Konzentrationen der *threo*-Produkten (E/t-Quotient) (siehe 4.2). Dabei gilt, je höher der E/t-Quotient ist, desto höher ist die Konzentration der enzymatisch gebildeten *erythro*-Produkte durch EH-1 im Vergleich zu den chemisch gebildeten *threo*-Produkten.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurde parallel zu Versuch I die Bestimmung einer Negativkontrolle (NK) und eines Blindwertes (BW) durchgeführt. Für NK wurden Zellen ohne Substrat inkubiert. Beim BW, bei dem die Abbauprodukte bei der Inkubation nur chemisch gebildet werden können, wurde Medium (pH-Wert 5,5) verwendet.

Da ausschließlich isotope markierte Abbauprodukte betrachtet wurden, die nicht ohne Zugabe eines isotope markierten Substrats endogen gebildet werden können, wurde bei der NK erwartungsgemäß kein Abbauprodukt nachgewiesen (siehe Tab. 8).

Die für den BW nachgewiesenen Konzentrationen der *erythro*- und *threo*-Produkte sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die Konzentrationen der *threo*-Produkte (*threo*-Lacton 0,20 ppm und *threo*-DiOH 0,87 ppm) lagen mit 1,07 ppm deutlich über der Konzentration der *erythro*-Produkte. Das *erythro*-Lacton war nur in einer Konzentration von 0,02 ppm vorhanden, *erythro*-DiOH konnte nicht nachgewiesen werden. Aus den ermittelten Konzentrationen ergab sich ein E/t-Quotient von 0,02. Da im Blindwert für das *erythro*-Lacton eine Konzentration von 0,02 ppm nachgewiesen wurde, können in Zellkulturversuchen nur höhere Konzentrationen dieses Produktes als enzymatisch gebildet gewertet werden. Diese Spuren des *erythro*-Lactons könnten aus der geringen Konzentration an *trans*-Isomer (2,3 %) in der Substratlösung des *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters chemisch entstanden sein (siehe 4.1.4).

**Tabelle 8: Konzentrationen der gebildeten *erythro*- und *threo*-Produkte, E/t-Quotienten der Inkubationsproben des Versuches I (3 Tage Zellanzucht) und II (5 Tage Zellanzucht) und der pH-Wert des verwendeten Mediums/Puffers. Parallel zu Versuch I wurden eine Blindwertprobe (BW) und eine Negativkontrolle (NK) inkubiert. Bei Versuch II wurden Zellen einerseits direkt und andererseits aufkonzentriert in Phosphatpuffer (GZ) verwendet.**

| Mutante                  | Konzentration in ppm       |                          |                          |                        | E/t-<br>Quotient | pH-Wert<br>Medium/Puffer |
|--------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|------------------|--------------------------|
|                          | <i>erythro</i> -<br>Lacton | <i>erythro</i> -<br>DiOH | <i>threo</i> -<br>Lacton | <i>threo</i> -<br>DiOH |                  |                          |
| BW                       | 0,02                       | 0,00                     | 0,20                     | 0,87                   | 0,02             | 5,5                      |
| NK                       | 0,00                       | 0,00                     | 0,00                     | 0,00                   | 0,00             | 5,5                      |
| Versuch I - 3 Tage       | 0,53                       | 0,02                     | 4,68                     | 1,84                   | 0,08             | -                        |
| Versuch II - 5 Tage      | 0,40                       | 0,01                     | 3,97                     | 1,79                   | 0,07             | -                        |
| Versuch II - 5 Tage – GZ | 1,78                       | 0,00                     | 1,02                     | 0,52                   | 1,16             | 6,9                      |

Die Betrachtung der Konzentrationen der *threo*-Produkte (Lacton und DiOH) ist ungleich komplizierter: Da in den Zellkulturproben teilweise höhere Konzentrationen an *threo*-Produkten im Vergleich zum BW nachgewiesen wurden, kann nicht abschließend geklärt werden, ob ihre Bildung nur chemisch oder zum Teil auch enzymatisch abläuft. Die Charakterisierung dieses Abbauwegs war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit und wurde nicht näher betrachtet. So wurden die *threo*-Produkte im Folgenden als chemisch gebildete Produkte definiert. Bei allen Proben des Versuches I mit Inkubationszeiten von 3 h, 6 h, 12 h und 24 h waren die Konzentrationen für die *threo*-Produkte deutlich höher als die Konzentrationen für die *erythro*-Produkte, so dass sich folglich E/t-Quotienten < 0,1 ergaben. Diese Werte lagen geringfügig über dem des BW, die Absolutwerte der Konzentrationen der gebildeten Produkte (*erythro*-Lacton, *threo*-Lacton und *threo*-DiOH) waren jedoch höher.

*Erythro*-DiOH konnte als Produkt nicht detektiert werden. Die höchste Konzentration für das enzymatisch gebildete *erythro*-Lacton und somit auch der höchste E/t-Quotient konnte bei der in Tabelle 8 dargestellten Probe mit 24 h Inkubationszeit nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Versuche ein Inkubationszeitraum von 20 bis 24 h festgelegt (siehe 3.5.12).

Um den E/t-Quotienten weiter zu erhöhen, wurde der Zellanzuchtzeitraum von ursprünglich 3 Tagen (72 h) bei Versuch I auf 5 Tage (120 h) bei Versuch II verlängert, wobei die anderen Parameter nicht verändert wurden. Der E/t-Quotient für die Inkubationsprobe aus Versuch II war mit 0,07 vergleichbar zu der aus Versuch I (siehe Tab. 8). Zusätzlich wurde eine Probe inkubiert, bei der eine Aufkonzentrierung der ganzen Zellen durchgeführt wurde (GZ). Zur Aufkonzentrierung wurde das Medium von 80 mL Zellbrühe abzentrifugiert und das dabei entstandene Pellet in 10 mL Phosphatpuffer (6,6 mM, pH-Wert 6,9) resuspendiert (siehe 3.5.5). Der Puffer pH-Wert 6,9 wurde verwendet, da in voran gegangenen Arbeiten mit dest. H<sub>2</sub>O gearbeitet wurde, welches einen vergleichbaren pH-Wert aufweist. Die Erhöhung der Zelldichte führte zu einer Erhöhung der Konzentration des *erythro*-Lactons, wobei auch in dieser Inkubationsprobe kein *erythro*-DiOH nachgewiesen wurde. Die Konzentrationen der chemisch gebildeten *threo*-Produkte waren im Vergleich zur nicht-aufkonzentrierten Probe deutlich geringer. Daraus ergab sich für die aufkonzentrierte Probe GZ ein deutlich höherer E/t-Quotient = 1,16 (siehe Tab. 8).

Bei Versuch III wurde die Mutante (M) mit *Saccharomyces carlsbergensis* RH (RH) verglichen. Für den RH Stamm wurde in voran gegangenen Arbeiten bereits eine enzymatische Umwandlung von epoxidierten Fettsäuren unter Retention der Konfiguration nachgewiesen [83]. Es wurden Zellen beider Stämme bei III a für 3 Tage (72 h), bei III b für 5 Tage (120 h) und bei III c für 7 Tage (168 h) angezogen und anschließend vor der Inkubation analog zu Versuch II in Phosphatpuffer (pH-Wert 6,9) aufkonzentriert.

Ein längeres Zellwachstum von 5 Tagen (III b) gegenüber 3 Tagen (III a) führte sowohl für die Mutante als auch für den RH Stamm zu einer Erhöhung des E/t-Quotienten in den Inkubationsproben. Bei einer Verlängerung des Zellwachstums auf 7 Tage (III c) sank der E/t-Quotient für Mutante und RH Stamm wieder ab. Dabei waren in den Inkubationsproben der gleichen Anzuchtzeiten für den RH Stamm die E/t-Quotienten sowie die Zelldichten (optischen Dichte - siehe 3.5.6) jeweils höher als für die Mutante (siehe Abb. 23 a).

Da die E/t-Quotienten für beide Stämme in den Inkubationsproben von III b mit einer Zellanzuchtzeit von 5 Tagen am höchsten waren, wurde für die nachfolgenden Versuche ein Zeitraum von 5 Tagen (120 h) für die Zellanzucht festgelegt.

Um die Konzentration der enzymatisch gebildeten *erythro*-Produkte und somit den E/t-Quotienten weiter zu erhöhen, wurden bei Versuch IV aufkonzentrierte Zellen von Mutante und RH Stamm in Phosphatpuffer pH-Wert 5,5 (pH-Wert des Mediums) inkubiert. So sollte

bei der Inkubation der gleiche pH-Wert eingehalten werden wie bei der Zellanzucht. Die Verringerung des pH-Wertes führte aber nicht zu einer Erhöhung, sondern zu einer Verringerung des E/t-Quotienten, wobei der Wert für die Mutante deutlich geringer war als für den RH Stamm (siehe Abb. 23 b).

Die E/t-Quotienten der Inkubationsproben von Mutante und RH Stamm waren in Phosphatpuffer mit pH-Wert 5,5 niedriger als bei pH-Wert 6,9. Aufgrund dieser Beobachtung sollte im Folgenden der Einfluss verschiedener pH-Werte untersucht werden, um das pH-Optimum des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 bestimmen zu können (siehe 4.4.3).

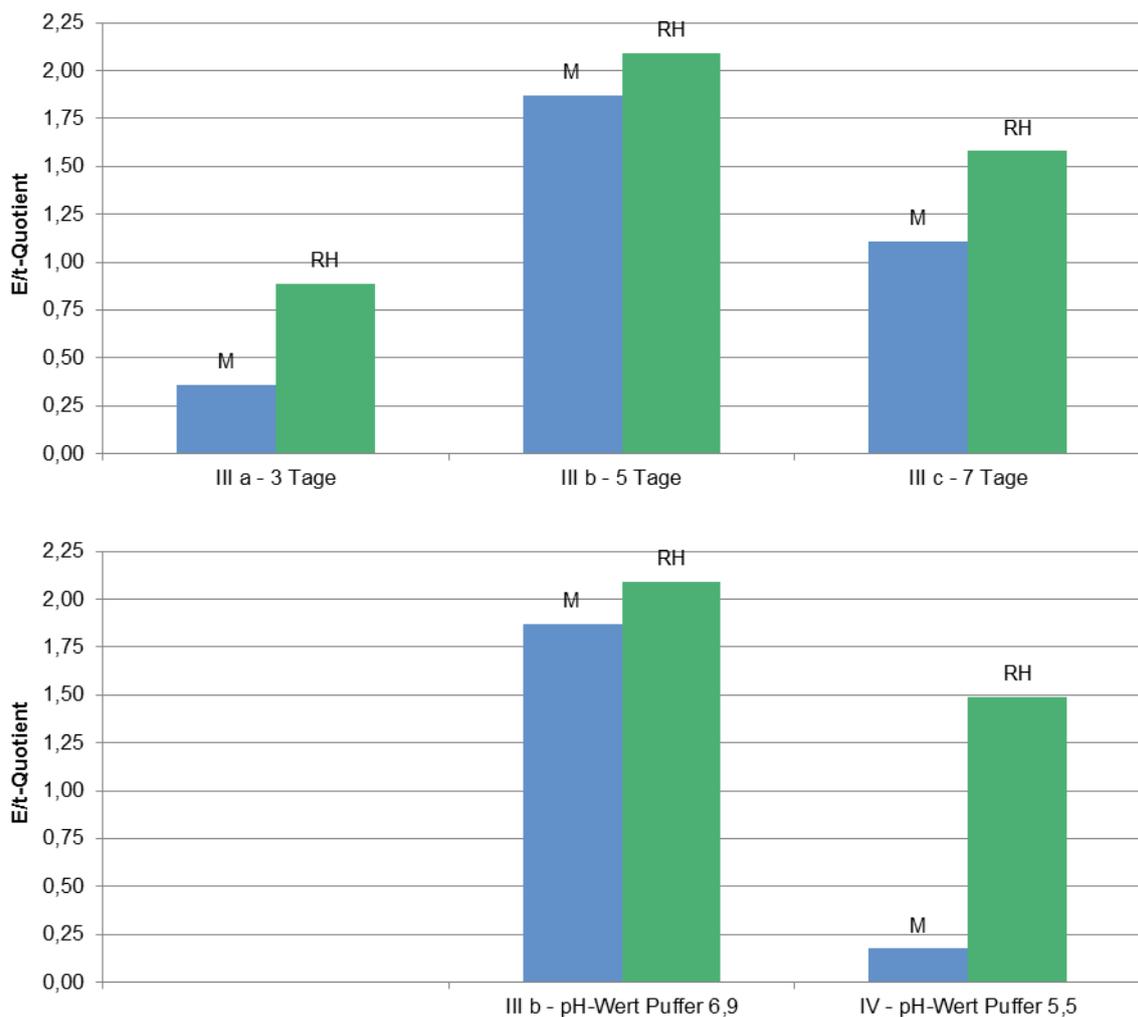


Abbildung 23 a und b: E/t-Quotienten der Inkubationsproben des Versuchs III mit verschiedenen Zellanzuchtzeiten (a - oben) und des Versuchs IV mit verschiedenen pH-Werten des Phosphatpuffers für die Resuspendierung der Inkubationsproben nach Zentrifugation (b - unten).

#### 4.4.2 Entwicklung Enzymparameterstest und Probenvorbereitung

Parallel zu den Zellkulturversuchen I bis IV wurde anhand der Inkubationsproben ein Enzymparameterstest (siehe 3.5.12) und eine Probenvorbereitung (siehe 3.5.13) für die anschließende GC-SIM-MS (Programm 2) Analyse entwickelt (siehe 3.5.14 und 3.2.1) [102]. Die Inkubation erfolgte dabei in geringen Volumina, die Entwicklung dieser

Miniinkubationsansätze (1 mL bzw. 0,5 mL) war Grundvoraussetzung für die Realisierbarkeit der in dieser Arbeit dargestellten umfangreichen Untersuchungen.

Für die Inkubation, die für jede Probe als Doppelbestimmung durchgeführt wurde, stellte sich eine Phosphatpufferkonzentration von maximal 6,67 mM als geeignet heraus. Bei höheren Salzkonzentrationen in der wässrigen Zellprobe bildete sich beim Homogenisieren mittels Probenschüttler (siehe unten) mit einer organischen Phase die Phasengrenze nur unzureichend aus oder die Salzionen wurden von der wässrigen in die organische Phase verdrängt, so dass eine Messung mittels GC-SIM-MS nicht möglich war.

Nach der Inkubation im Flachbodenglas (2,5 mL) für 20 bis 24 h (kürzere Zeiträume stellten sich in Kapitel 4.4.1 als nicht ausreichend dar) wurden die Proben von 1 mL zunächst mit 25  $\mu$ L ISTD-MIX (Heptadecansäuremethylester und 1-Decanol in Ethylacetat;  $c = 1$  mg/mL) versetzt. Diese Konzentration entsprach etwa einem Zehntel der eingesetzten Substratkonzentration des *cis*-[3,4- $^2$ H $_2$ ]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters (10  $\mu$ L -  $c = 27$  mg/mL) und diente zur semiquantitativen Bestimmung der bei der Inkubation entstehenden Abbauprodukte *erythro*- und *threo*-Produkte (Lacton und DiOH) (siehe 4.2). Niedrigere oder höhere Konzentrationen des ISTD-MIX führten zu schlechter reproduzierbaren Ergebnissen. Probenvolumina von 0,5 mL bei angepasster Substrat- bzw. ISTD-MIX-konzentration führten zu vergleichbaren Ergebnissen, so dass der Verbrauch des isotope markierten Substrats verringert wurde.

Um die wässrigen Zellproben mittels GC-SIM-MS analysieren zu können, war es notwendig die zu analysierenden Substanzen in ein geeignetes organisches Lösungsmittel zu überführen. Dabei erwies sich Diethylether aufgrund mehrerer Eigenschaften als geeignet: Diethylether zeigt eine gute Mischbarkeit bei der Homogenisierung mit wässrigen Zellproben mit anschließend klarer Ausbildung einer Phasengrenze, weist gute Extraktionseigenschaften gegenüber den Analyten auf und lässt sich aufgrund des niedrigen Siedepunktes einfach vor der Silylierung entfernen. Ein im Vergleich zur Probe 1,5-faches Diethylethervolumen führte zu einer optimalen Ausbildung der Phasengrenze. Als Zeitraum zur Homogenisierung der wässrigen und organischen Phase mittels Probenschüttler erwiesen sich 20 Sekunden als optimal. Ein kürzerer Zeitraum führte nur zu einer unzureichenden Durchmischung beider Phasen, während bei längeren Zeiträumen nur eine unzureichende Ausbildung der Phasengrenze stattfand (Emulsionsbildung).

Um sicher zu stellen, dass in der organischen Phase keine wässrigen Probenbestandteile vorhanden sind, die die Silylierungsreaktion (siehe 3.5.14) und die Messung mittels GC-SIM-MS stören könnten, wurden nur 2/3 der organischen Phase abgenommen. Vor der Silylierung wurden die Proben vollständig vom Lösungsmittel im N $_2$ -Strom befreit und der trockene Rückstand in 50  $\mu$ L Ethylacetat und 20  $\mu$ L BSTFA/Pyridin (1:1) aufgenommen. Die Silylierung erfolgt für 30 min bei 80 °C im Trockenschrank. Mit einer Verlängerung der

Reaktionszeit (60 min., 90 min. bzw. 120 min.) oder einer Erhöhung der Konzentration der Silylierungsreagenz konnte kein Anstieg der Intensitäten bei der GC/MS Analyse erzielt werden.

#### 4.4.3 pH-Optimum Phosphatpuffer

Die räumliche Struktur von Enzymen wird u. a. durch elektrostatische Anziehungskräfte beeinflusst. Dabei haben Aminosäuren, aus denen die Proteine und somit auch Enzyme aufgebaut sind, durch ihre Seitenketten saure (COOH-Gruppen) bzw. basische (NH<sub>2</sub>-Gruppen) Eigenschaften. Durch die elektrostatischen Anziehungskräfte der Seitenketten untereinander wird die räumliche Struktur des Enzyms im Bereich seines pH-Optimums stabilisiert. Änderungen des pH-Wertes gehen mit einer Ladungsänderung des Enzyms und seiner räumlichen Struktur (Konformität) einher, was dazu führt, dass das Enzym nicht mehr optimal arbeiten kann [93]. Laut Literatur liegt das pH-Optimum für bisher charakterisierte Epoxidhydrolasen im Alkalischen [103].

Für Mutante und RH Stamm wurde bei Inkubationsproben mit höherem pH-Wert (6,9) ein höherer E/t-Quotient nachgewiesen als bei Proben mit niedrigem pH-Wert (5,5) (siehe 4.4.1). In diesem Kapitel sollten Zellkulturproben in Phosphatpuffer mit höheren pH-Einheiten bzgl. der enzymatischen Umsetzung des Substrats *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecan säuremethylester untersucht werden, um das pH-Optimum des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 zu bestimmen.

Bei den Versuchen wurden neben *S. cerevisiae* Mutante (M) und *S. carlsbergensis* RH (RH) auch die Stämme *S. cerevisiae* Wildtyp (WT) und *S. bayanus* (B) verwendet.

Bei V1 wurden Zellen aller 4 Stämme für 5 Tage in 500 mL Medium (siehe 3.5.4) angezogen. Für die Inkubation der Zellen wurden 9 Phosphatpufferlösungen mit verschiedenen pH-Werten in einem breiten pH-Bereich 6,0 bis 8,75 (6,0 / 6,5 / 7,0 / 7,5 / 7,75 / 8,0 / 8,25 / 8,5 / 8,75) aus Lösung A (pH-Wert ca. 9,0) und B (pH-Wert ca. 5) mit Konzentrationen von 6,67 mM hergestellt. Bei den Zellen der einzelnen Stämme wurde das Medium nach Kapitel 3.5.5 abzentrifugiert, das entstandene Pellet in den Phosphatpufferlösungen mit den entsprechenden pH-Werten je dreimal gewaschen, in 10 mL Puffers resuspendiert und anschließend inkubiert (siehe 3.5.12).

Für die Mutante wurden dabei mit allen 9 Phosphatpufferlösungen Inkubationsproben hergestellt, für die anderen drei *Saccharomyces* Stämme (WT, RH und B) wurden teilweise weniger Inkubationsproben verwendet (siehe unten).

Die pH-Werte der Inkubationsproben der Mutante (V1a), die Konzentrationen der *erythro*- und *threo*-Produkte sowie die daraus resultierenden E/t-Quotienten sind in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9: Konzentrationen der gebildeten *erythro*- und *threo*-Produkte, E/t-Quotienten und pH-Werte der Inkubationsproben des Versuches V1a Mutante zur Bestimmung des pH-Optimums des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 in Phosphatpuffer sowie Blindwertproben (BW) des Mediums und des Puffers bzw. autoklavierte Zellen der Mutante.**

| V1a Mutante              | Konzentration in ppm   |                       |                      |                    |              |
|--------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|--------------|
| pH-Wert Probe            | <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> - DiOH | <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -DiOH | E/t-Quotient |
| 5,93                     | 0,76                   | 0,01                  | 2,09                 | 1,43               | 0,22         |
| 6,40                     | 0,78                   | 0,01                  | 0,69                 | 1,31               | 0,39         |
| 6,91                     | 1,07                   | 0,00                  | 0,46                 | 0,61               | 1,00         |
| 7,46                     | 1,05                   | 0,01                  | 0,52                 | 0,33               | 1,24         |
| 7,69                     | 1,55                   | 0,00                  | 0,46                 | 0,20               | 2,32         |
| 7,99                     | 1,55                   | 0,01                  | 0,48                 | 0,05               | 2,92         |
| 8,31                     | 2,78                   | 0,01                  | 0,59                 | 0,07               | 4,24         |
| 8,45                     | 1,33                   | 0,01                  | 0,50                 | 0,05               | 2,42         |
| 8,72                     | 2,39                   | 0,00                  | 0,48                 | 0,06               | 4,40         |
| BW Medium 5,5            | 0,02                   | 0,00                  | 0,20                 | 0,87               | 0,02         |
| BW Puffer 7,00           | 0,02                   | 0,00                  | 0,27                 | 0,61               | 0,02         |
| BW Puffer 8,25           | 0,02                   | 0,00                  | 0,65                 | 0,08               | 0,03         |
| autoklavierte Zell. 8,31 | 0,03                   | 0,00                  | 0,45                 | 0,05               | 0,06         |

Dabei ergab sich für die Proben bis zu einem pH-Wert 8,31 mit steigenden pH-Wert ein stetiger Anstieg der E/t-Quotienten und der Konzentration des *erythro*-Lactons. Der niedrigste E/t-Quotient = 0,22 wurde bei der Probe pH-Wert 5,93 nachgewiesen. Das erste Maximum lag mit E/t-Quotient = 4,24 bei der Probe pH-Wert 8,31. Anschließend fiel der E/t-Quotient auf 2,42 (pH-Wert 8,45). Der maximale E/t-Quotient = 4,40, höchster E/t-Quotient der Versuchsreihe, wurde bei der Probe pH-Wert 8,72 nachgewiesen (siehe Tab. 9).

Die Konzentration des *erythro*-Lactons stieg von 0,76 ppm (pH-Wert 5,93) auf 2,78 ppm (pH-Wert 8,31) an. Danach sank die Konzentration des *erythro*-Lactons (1,33 ppm) analog zum E/t-Quotienten für die Probe pH-Wert 8,45 ab. Für die Probe pH-Wert 8,72 stieg die Konzentration wieder auf 2,39 ppm (siehe Tab. 9). Somit ergab sich ein vergleichbarer Verlauf für den E/t-Quotienten und die Konzentrationen des *erythro*-Lactons, mit je 2 Maxima. *Erythro*-DiOH wurde nicht nachgewiesen.

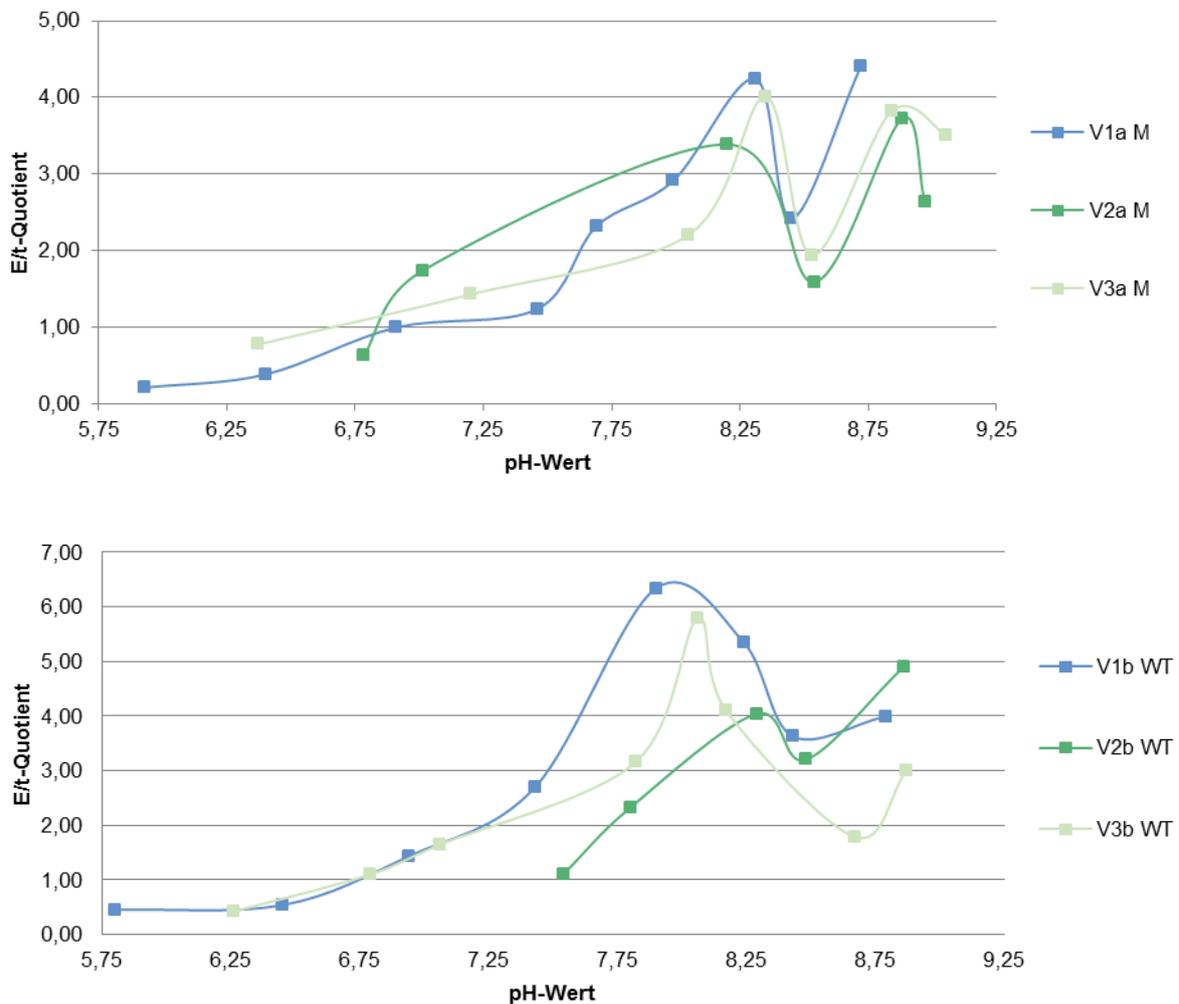
Die Konzentration des *threo*-Lactons nahm bis pH-Wert 7 von 2,09 ppm (pH-Wert 5,93) auf 0,46 ppm (pH-Wert 6,91) stetig ab. Für alle anderen Proben pH-Wert 7,46 bis 8,72 blieb die Konzentration konstant bei ca. 0,5 ppm. Analog dazu nahm die Konzentration der *threo*-DiOH bis pH-Wert 7,7 von 1,43 ppm (pH-Wert 5,93) auf 0,20 ppm (pH-Wert 7,69) ab. Alle anderen Proben der Mutante (V1a) mit einem pH-Wert > 8 wiesen Konzentrationen < 0,1 ppm auf (siehe Tab. 9).

Nachdem in Kapitel 4.4.1 der Blindwert mittels Medium im Sauren (pH-Wert 5,5) bestimmt wurde, sollten mit Hilfe des Phosphatpuffers (pH-Wert 7,00 und pH-Wert 8,25) Blindwerte im Neutralen und im Alkalischen bestimmt werden. Für das *erythro*-Lacton ergab sich für beide Pufferproben eine Konzentration von 0,02 ppm, *erythro*-DiOH konnte nicht detektiert werden. Die Konzentrationen für die *threo*-Produkte betragen 0,87 ppm (Puffer pH-Wert 7,00) bzw. 0,73 ppm (Puffer pH-Wert 8,25), so dass sich E/t-Quotienten von 0,02 bzw. 0,03 ergaben (siehe Tab. 9). Diese Werte waren vergleichbar mit dem, der im Medium bestimmt wurde (E/t-Quotient = 0,02). Bei niedrigem pH-Wert 5,5 (Medium) und bei neutralem pH-Wert 7,00 (Puffer) war die Konzentration des *threo*-Produkts deutlich höher, während im Alkalischen bei pH-Wert 8,25 (Puffer) die Konzentration des *threo*-Lactons deutlich höher lag. Dies deckte sich mit den Ergebnissen der Realproben bei Versuch V1a der Mutante (siehe Tab. 9) und mit den Versuchen zur chemischen Erzeugung der *threo*-Produkte (siehe 4.2). Dort wurde bei hoher Säurekonzentration und somit niedrigem pH-Wert fast ausschließlich *threo*-DiOH gebildet und bei höherem pH-Wert bei niedriger Säurekonzentration fast ausschließlich *threo*-Lacton.

Zusätzlich zu den Blindwertproben in reinem Phosphatpuffer wurden autoklavierte Zellen der Mutante in Puffer verwendet, so wurden möglichst identische Bedingungen im Vergleich mit den Realproben geschaffen. Dafür wurde die Probe (pH-Wert 8,31 in Phosphatpuffer, V1a) mit der höchsten *erythro*-Lacton Konzentration inkubiert und analysiert (siehe Tab. 9). Für das *erythro*-Lacton ergab sich für die autoklavierte Probe eine Konzentration von 0,03 ppm, *erythro*-DiOH wurde auch hier nicht nachgewiesen. Somit konnte für die Auswertung weiterer Versuche sichergestellt werden, dass auch im Alkalischen nahezu keine chemische Bildung der *erythro*-Produkte stattfindet. Die Konzentration für die *threo*-Produkte betrug 0,50 ppm, so dass sich ein E/t-Quotient = 0,06 ergab (siehe Tab. 9). Insgesamt war das Ergebnis für die autoklavierte Probe vergleichbar mit der Blindwertprobe des Phosphatpuffers pH-Wert 8,25.

Nachdem bei V1 Phosphatpufferlösungen im pH-Bereich 6,0 bis 8,75 verwendet wurden und daraus Proben für die Mutante (V1a) im pH-Bereich 5,93 bis 8,72 hergestellt und untersucht wurden, sollte bei V2 der Einfluss des Phosphatpuffers bei pH-Werten > 8,75 überprüft werden. Dazu wurden Phosphatpufferlösungen im pH-Bereich 6,5 bis 9,00 hergestellt. Höhere pH-Werte können mit Phosphatpufferlösungen einer Konzentration von 6,67 mM

nicht erreicht werden. Von der Mutante (V2a) wurden mit den Pufferlösungen Proben im pH-Bereich 6,78 bis 8,97 hergestellt und inkubiert. Der Verlauf von V2a der Mutante war analog zu V1a (siehe Abb. 24 a). Mit steigendem pH-Wert stieg der E/t-Quotient und es wurden 2 Maxima im pH-Bereich > 8 nachgewiesen (siehe Tab. 11). Dazwischen lag für die Probe pH-Wert 8,54 ein Minimum (E/t-Quotient = 1,59). Nach dem zweiten Maximum fiel der E/t-Quotient = 2,63 ebenfalls ab (pH-Wert 8,97). Insgesamt lagen bei V2a der Mutante die E/t-Quotienten im Alkalischen geringfügig niedriger als bei V1a (siehe Abb. 24 a). Dabei war auch die Zelldichte der Mutante, bestimmt mittels optischer Dichte (siehe 3.5.6), bei V2a geringfügig niedriger als bei V1a (siehe Tab. 11).



**Abbildung 24 a und b:** Verlauf der E/t-Quotienten von Inkubationsproben mit verschiedenen pH-Werten des Phosphatpuffers der *Saccharomyces* Stämme Mutante (M) (a – oben), Wildtyp (WT) (b - unten).

V3 diente der Wiederholung von V2. Dabei wurden ebenfalls Phosphatpufferlösungen im pH-Bereich 6,5 bis 9,00 verwendet. Für M ergaben sich daraus bei V3a Proben im pH-Bereich 6,37 bis 9,05. Der Verlauf für die E/t-Quotienten war analog zu den anderen beiden Versuchen (V1a und V2a) (siehe Abb. 24 a) mit 2 Maxima im pH-Bereich > 8 nachgewiesenen (siehe Tab. 11). Die E/t-Quotienten lagen genau zwischen den Werten der

Versuche 1a und 2a (siehe Tab. 11 und Abb. 24 a). Dies korreliert mit der Reihenfolge der Zelldichte für die einzelnen Versuchsreihen, bei der  $V1a > V3a > V2a$  lag (siehe Tab. 11).

Für den Wildtyp wurden bei V1b 8 Inkubationsproben im pH-Bereich 5,80 bis 8,79 untersucht. Die Konzentration des *threo*-Lactons nahm mit steigenden pH-Wert zunächst ab und stieg im Alkalischen (pH-Wert > 8) wieder an (siehe Tab. 10), während die Konzentration der *threo*-DiOH mit steigendem pH-Wert kontinuierlich abnahm. Insgesamt waren die Konzentrationen der *erythro*-Produkte für die einzelnen pH-Werte von Wildtyp (V1b) und Mutante (V1a) vergleichbar, während die *threo*-Produkte beim Wildtyp geringer lagen (siehe Tab. 9 und 10). Daraus ergibt sich ein um etwa 1,5- bis 2-mal höherer maximaler E/t-Quotient für den Wildtyp. Analog zur Mutante wies auch der Wildtyp bei V1b ein zweites Maximum auf (siehe Tab. 10 und Abb. 24 b).

**Tabelle 10: Konzentrationen der gebildeten *erythro*- und *threo*-Produkte, E/t-Quotienten und pH-Werte der Inkubationsproben des Versuches V1b Wildtyp zur Bestimmung des pH-Optimums des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 in Phosphatpuffer.**

| V1b Wildtyp   | Konzentration in ppm   |                       |                      |                    |              |
|---------------|------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|--------------|
| pH-Wert Probe | <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> - DiOH | <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -DiOH | E/t-Quotient |
| 5,80          | 1,25                   | 0,00                  | 1,95                 | 0,83               | 0,45         |
| 6,45          | 1,44                   | 0,00                  | 1,94                 | 0,74               | 0,54         |
| 6,94          | 2,18                   | 0,00                  | 1,06                 | 0,46               | 1,43         |
| 7,43          | 2,33                   | 0,00                  | 0,57                 | 0,30               | 2,70         |
| 7,90          | 2,90                   | 0,00                  | 0,33                 | 0,13               | 6,34         |
| 8,24          | 2,39                   | 0,00                  | 0,35                 | 0,09               | 5,35         |
| 8,43          | 1,74                   | 0,00                  | 0,46                 | 0,02               | 3,63         |
| 8,79          | 2,59                   | 0,00                  | 0,61                 | 0,04               | 3,99         |

Im zweiten Versuch wurden für den Wildtyp (V2b) Inkubationsproben mit pH-Werten 7,54 bis 8,86 untersucht. Der pH-Wert der Probe mit dem ersten Maximums lag etwa 0,4 pH-Einheiten höher als beim Wildtyp V1b, der pH-Wert für das zweite Maximum war vergleichbar (siehe Tab. 11). Der E/t-Quotient für das erste Maximum, lag für den Wildtyp bei V2b niedriger als bei V1b, der E/t-Quotient für das zweite Maximum war geringfügig höher (siehe Tab. 11).

Bei V3b wurden für den Wildtyp Proben im pH-Bereich 6,26 bis 8,87 inkubiert. Der Verlauf für die E/t-Quotienten war analog zu V1b (siehe Abb. 24 b), bei vergleichbaren pH-Werten

wurden für die Maxima niedrigere Absolutwerte bestimmt (siehe Tab. 11). Im Vergleich mit V2b lag für den Wildtyp bei V3b das erste Maximum höher und das zweite Maximum niedriger. Da für den Wildtyp bei keinem Versuch Proben mit pH-Werten > 8,9 gemessen wurden, konnte für den Wildtyp kein Absinken des E/t-Quotienten nach dem zweiten Maximum beobachtet werden.

**Tabelle 11: Zelldichte (OD - optische Dichte) der Stämme nach Zellanzucht, der untersuchte pH-Bereich der Inkubationsproben in Phosphatpuffer, die Maxima der E/t-Quotienten und die dazu gehörigen pH-Werte für die *Saccharomyces* Stämme Mutante (M), Wildtyp (WT), RH Stamm (RH) und *S. bayanus* (B).**

|                   | V1            |            | V2            |            | V3            |            |
|-------------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|
|                   | 1. Maximum    | 2. Maximum | 1. Maximum    | 2. Maximum | 1. Maximum    | 2. Maximum |
| <b>a) M - OD</b>  | 1,53          |            | 1,34          |            | 1,43          |            |
| pH-Bereich        | 5,93 bis 8,72 |            | 6,78 bis 8,97 |            | 6,37 bis 9,05 |            |
| pH-Wert           | 8,31          | 8,72       | 8,20          | 8,88       | 8,35          | 8,84       |
| E/t-Quotient      | 4,24          | 4,40       | 3,39          | 3,72       | 4,01          | 3,82       |
| <b>b) WT - OD</b> | 1,79          |            | 1,58          |            | 1,63          |            |
| pH-Bereich        | 5,80 bis 8,79 |            | 7,54 bis 8,86 |            | 6,26 bis 8,87 |            |
| pH-Wert           | 7,90          | 8,79       | 8,29          | 8,86       | 8,06          | 8,87       |
| E/t-Quotient      | 6,34          | 3,99       | 4,04          | 4,90       | 5,78          | 2,99       |
| <b>c) RH - OD</b> | 1,93          |            | 2,20          |            | 2,11          |            |
| pH-Bereich        | 5,96 bis 8,79 |            | 7,63 bis 9,00 |            | 6,90 bis 8,91 |            |
| pH-Wert           | 8,16          | -          | 8,88          | -          | 8,46          | -          |
| E/t-Quotient      | 6,71          | -          | 7,20          | -          | 5,53          | -          |
| <b>b) B - OD</b>  | 2,11          |            | 2,35          |            | 2,42          |            |
| pH-Bereich        | 6,68 bis 8,68 |            | 6,67 bis 8,81 |            | 6,44 bis 8,82 |            |
| pH-Wert           | 8,26          | -          | 8,47          | -          | 8,75          | -          |
| E/t-Quotient      | 2,14          | -          | 3,66          | -          | 3,78          | -          |

Insgesamt korrelierte für den Wildtyp die Zelldichte mit dem maximalen E/t-Quotienten. Je höher der E/t-Quotient beim ersten Maximum lag, umso höher

auch die Zelldichte. Dies entsprach den Ergebnissen der Mutante. Für den Wildtyp war bei sowohl der erste maximale E/t-Quotient als auch die Zelldichte für V1b > V3b > V2b. Bei vergleichbarer Zelldichte für Wildtyp (V2b) und Mutante (V1a) waren auch die E/t-Quotienten vergleichbar (siehe Tab 11).

Für *Saccharomyces carlsbergensis* RH wurden analog zu Mutante und Wildtyp von *Saccharomyces cerevisiae* Inkubationsproben untersucht (V1c, V2c und V3c). Hierbei konnten folgende Beobachtungen gemacht werden: Bei V1c stiegen für den RH Stamm die E/t-Quotienten und die Konzentration des *erythro*-Lactons mit steigendem pH-Wert bis auf ein Maximum bei Probe pH-Wert 8,16 (E/t-Quotient = 6,71) stetig an. Anders als bei der Mutante und dem Wildtyp ergab sich für den RH Stamm im Alkalischen kein weiteres Maximum (siehe Tab. 12). Die Konzentration des *threo*-Lactons nahm zunächst mit steigenden pH-Wert ab, für Inkubationsproben mit pH-Werten > 8 stieg die Konzentration mit steigendem pH-Wert wieder an. Die Konzentration der *threo*-DiOH nahm mit steigendem pH-Wert kontinuierlich ab (siehe Tab. 12).

**Tabelle 12: Konzentrationen der gebildeten *erythro*- und *threo*-Produkte, E/t-Quotienten und pH-Werte der Inkubationsproben des Versuches V1c RH Stamm zur Bestimmung des pH-Optimums des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 in Phosphatpuffer.**

| V1c RH Stamm  | Konzentration in ppm   |                       |                      |                    |              |
|---------------|------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|--------------|
| pH-Wert Probe | <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> - DiOH | <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -DiOH | E/t-Quotient |
| 5,96          | 2,72                   | 0,00                  | 2,01                 | 0,91               | 0,93         |
| 6,18          | 3,13                   | 0,00                  | 1,88                 | 0,32               | 1,42         |
| 6,49          | 3,28                   | 0,00                  | 1,73                 | 0,18               | 1,72         |
| 6,93          | 4,03                   | 0,00                  | 1,18                 | 0,23               | 2,87         |
| 7, 43         | 4,20                   | 0,01                  | 0,62                 | 0,09               | 5,94         |
| 7,88          | 4,59                   | 0,01                  | 0,61                 | 0,08               | 6,66         |
| 8,16          | 4,62                   | 0,02                  | 0,61                 | 0,07               | 6,71         |
| 8,56          | 4,46                   | 0,00                  | 0,80                 | 0,08               | 5,08         |
| 8,79          | 4,33                   | 0,00                  | 1,56                 | 0,07               | 2,65         |

Der Verlauf des E/t-Quotienten war vergleichbar zu dem von Mutante (V1a) und Wildtyp (V1b). Da jedoch die Konzentration des *erythro*-Lactons beim RH Stamm für die einzelnen pH-Werte durchgängig höher lag als für Mutante und Wildtyp, ergaben sich auch höhere E/t-Quotienten (siehe Tab. 9, 10 und 12).

Der Verlauf der E/t-Quotienten war für den RH Stamm bei V2c und V3c mit V1c vergleichbar (siehe Abb. 25 a). Mit steigendem pH-Wert stieg bei allen Versuchen auch der E/t-Quotient an, wobei nur jeweils ein Maximum im Alkalischen im pH-Bereich 8,1 bis 8,9 nachweisbar war (siehe Tab. 11). Die Werte für den E/t-Quotienten waren insgesamt höher als für die Mutante, im Vergleich zum Wildtyp waren sie vergleichbar bzw. geringfügig höher (siehe Tab. 11). Die Zelldichte war in allen Versuchen für *S. carlsbergensis* RH höher als für *S. cerevisiae* (M und WT) (siehe Tab. 11). Die geringfügig höheren E/t-Quotienten und die höhere Zelldichte lassen sich möglicherweise mit den Genpool des RH Stamms erklären. *S. carlsbergensis* RH weist als Hybrid aus zwei Stämmen neben genetischen Eigenschaften von *S. cerevisiae* auch Ähnlichkeiten zu *S. bayanus* auf (siehe 2.5.2).

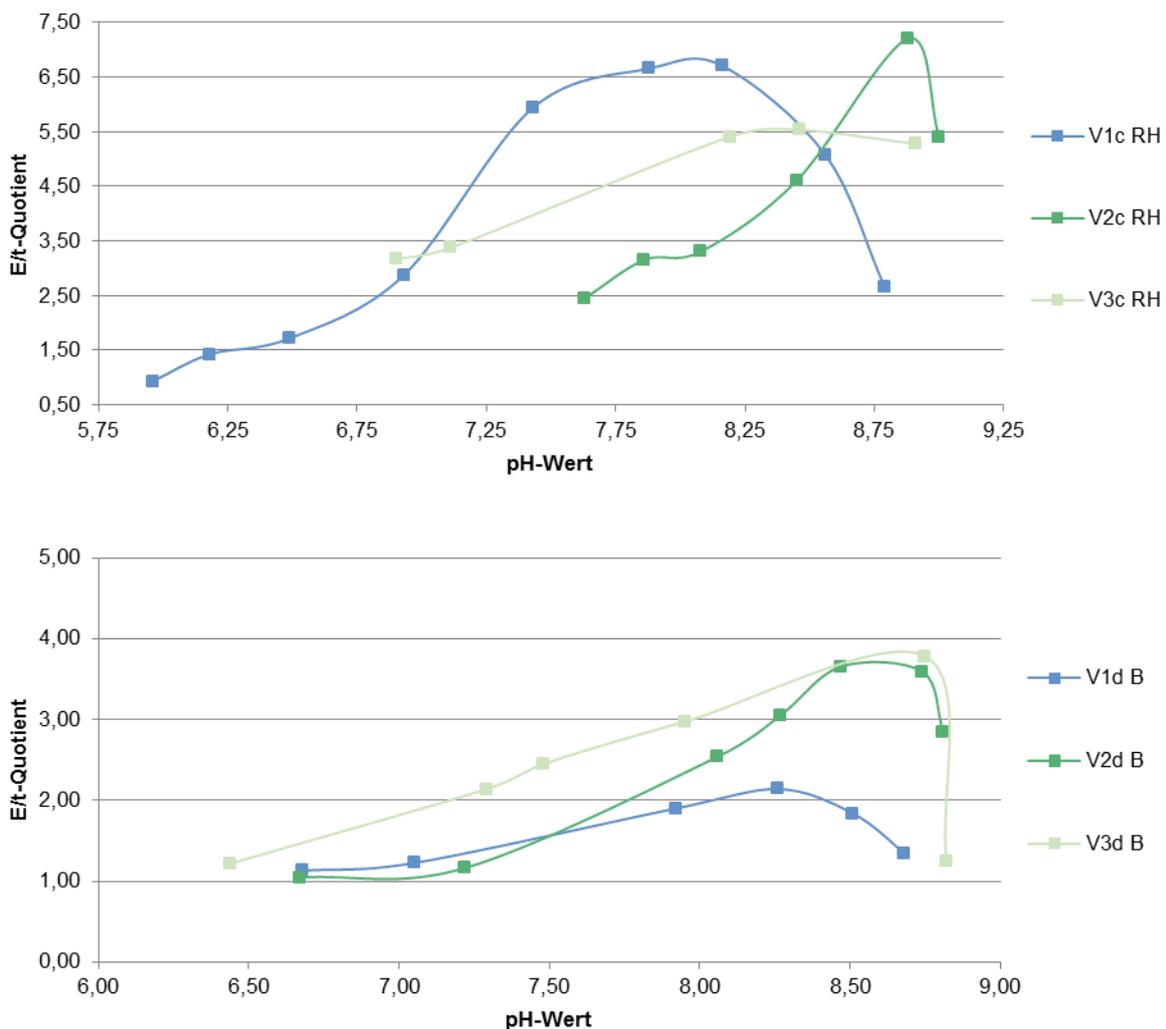


Abbildung 25 a und b: Verlauf der E/t-Quotienten von Inkubationsproben mit verschiedenen pH-Werten des Phosphatpuffers der *Saccharomyces* Stämme RH Stamm (RH) (a – oben), *S. bayanus* (B) (b - unten).

Um die enzymatischen Umsetzung des mit *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylesters in den verschiedenen *Saccharomyces* Stämmen besser vergleichen zu können wurden zusätzlich Inkubationsproben von *S. bayanus* (B) untersucht (V1d, V2d und V3d).

Anders als bei den anderen drei *Saccharomyces* Stämmen nahm für *S. bayanus* bei V1d der E/t-Quotient mit steigendem pH-Wert nur geringfügig zu (siehe Tab. 13), die Konzentration für das *erythro*-Lacton und die *threo*-DiOH waren nahezu konstant. Allein die Konzentration des *threo*-Lactons wurde von der Variation des pH-Wertes beeinflusst, sie sank mit steigendem pH-Wert zunächst ab. Analog zu den anderen Stämmen konnte ab pH-Wert 8 ein Anstieg beobachtet werden (siehe Tab. 9, 10, 12 und 13). Schwankungen des E/t-Quotienten wurden somit durch die Konzentration des chemisch gebildeten *threo*-Lactons bestimmt, das Maximum lag analog zum RH Stamm (E/t-Quotient = 2,14) bei pH-Wert 8,26 vor (siehe Tab. 12 und 13).

**Tabelle 13: Konzentrationen der gebildeten *erythro*- und *threo*-Produkte, E/t-Quotienten und pH-Werte der Inkubationsproben des Versuches V1d *S. bayanus* zur Bestimmung des pH-Optimums des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 in Phosphatpuffer.**

| V1d <i>S. bayanus</i> | Konzentration in ppm   |                       |                      |                    |              |
|-----------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|--------------|
| pH-Wert Probe         | <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> - DiOH | <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -DiOH | E/t-Quotient |
| 6,68                  | 3,23                   | 0,00                  | 2,67                 | 0,18               | 1,13         |
| 7,05                  | 3,39                   | 0,00                  | 2,58                 | 0,18               | 1,23         |
| 7,92                  | 3,71                   | 0,00                  | 1,79                 | 0,16               | 1,90         |
| 8,26                  | 3,73                   | 0,00                  | 1,63                 | 0,11               | 2,14         |
| 8,51                  | 3,75                   | 0,00                  | 1,88                 | 0,16               | 1,84         |
| 8,68                  | 3,55                   | 0,00                  | 2,43                 | 0,21               | 1,34         |

Der Verlauf für den E/t-Quotienten war bei den anderen beiden Versuchen V2d und V3d von B vergleichbar zu V1d (siehe Abb. 25 b). Mit steigendem pH-Wert stieg der E/t-Quotient nur langsam an. Bei allen Versuchen lag analog zum RH Stamm ein Maximum für den E/t-Quotienten pro Versuchsreihe im pH-Bereich 8,2 bis 8,7 (siehe Abb. 25 b) vor, wenn auch mit deutlich niedrigeren Werten (siehe Tab. 11). Die Zelldichte für *S. bayanus* war vergleichbar mit *S. carlsbergensis* RH oder lag etwas höher (siehe Tab. 11).

**Zusammenfassung:**

- In allen Proben konnte für die enzymatisch gebildeten *erythro*-Produkte nur das *erythro*-Lacton, nicht *erythro*-DiOH nachwiesen werden. Die Konzentration des *erythro*-Lactons stieg mit steigenden pH-Wert an.
- Bei den chemisch gebildeten Abbauprodukten entstand für Proben pH-Werte > 7,5 fast ausschließlich das *threo*-Lacton, die Konzentration von *threo*-DiOH stieg mit

sinkendem pH-Wert an. Im stark Sauren lagen zusätzlich hohe Konzentrationen an *threo*-Lacton vor.

- Die niedrigsten maximalen E/t-Quotienten wurden in *S. bayanus* nachgewiesen, gefolgt von *S. cerevisiae* Mutante, dem dazu gehörigen *S. cerevisiae* Wildtyp und *S. carlsbergensis* RH.
- Da in der LTA<sub>4</sub>H deletierten *S. cerevisiae* Knockout-Mutante *erythro*-Lacton nachgewiesen werden konnte, muss neben der LTA<sub>4</sub> Hydrolase (substratspezifisch für LTA<sub>4</sub>) mindestens ein weiteres, bisher unbekanntes Enzym EH-1 vorhanden sein, welches *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester unter Retention der Konfiguration in seine Abbauprodukte umwandelt.
- In allen Versuchen hatte *S. bayanus* die höchste Zelldichte, gefolgt von *S. carlsbergensis* RH, *S. cerevisiae* Wildtyp und *S. cerevisiae* Mutante.
- Für Mutante, Wildtyp und RH Stamm korrelierte die Zelldichte mit dem maximalen E/t-Quotienten. Es gilt, je höher die Zelldichte, desto höher der maximale E/t-Quotient.

Bezüglich der pH-Optima lassen sich folgende Aussagen treffen:

- pH-Optimum *S. cerevisiae* Mutante (M): Zwei Maxima E/t-Quotient pH-Bereich 8,2 bis 8,4 bzw. 8,7 bis 8,9.
- pH-Optimum *S. cerevisiae* Wildtyp (WT): Zwei Maxima E/t-Quotient pH-Bereich 7,9 bis 8,3 bzw. bei ca. 8,8.
- pH-Optimum *S. carlsbergensis* RH (RH): Ein Maximum E/t-Quotient pH-Bereich 8,1 bis 8,9.
- pH-Optimum *S. bayanus* (B): Ein Maximum E/t-Quotient pH-Bereich 8,2 bis 8,8.
- Die in der Literatur beschriebene optimale Wirkungsweise von Epoxidhydrolasen im alkalischen pH-Bereich konnte für das bisher unbekanntes Enzym EH-1 bestätigt werden.
- *S. carlsbergensis* RH weist als Hybrid aus *S. cerevisiae* und *S. bayanus* Gene beider Stämme auf. Bezogen auf den Wert des maximalen E/t-Quotienten entspricht der RH Stamm eher dem Wildtyp, während die Anzahl der Maxima mit eins und die Zelldichte eher *S. bayanus* entsprechen.

#### 4.4.4 pH-Optimum Tris/EDTA-Puffer

Mit den folgenden Versuchen sollte der Einfluss des Puffersystems Tris/EDTA (T/E) im alkalischen pH-Bereich auf die enzymatische Umwandlung des Substrats in den *Saccharomyces* Stämmen (M, WT, RH und B) untersucht und mit den Ergebnissen der Versuche zum Phosphatpuffer verglichen werden. Dabei wurde Tris gewählt, um pH-Werte > 9 einzustellen. Die Versuchsbedingungen wurden analog zum Phosphatpuffer gehalten. Von beiden Komponenten (Tris und EDTA) wurden Lösungen mit Konzentrationen von 6,67 mM eingestellt (siehe 3.5.3) um daraus die entsprechenden pH-Werte einzustellen. Bei V4 wurden T/E-Lösungen im pH-Bereich 6,5 bis 9,0 hergestellt, die Zellen der Stämme für 5 Tage angezogen, das Medium abzentrifugiert und die Zellen in den Pufferlösungen resuspendiert. Nach mehreren Waschschrritten wurden die Proben der Stämme für 20 h bis 24 h inkubiert. Für Mutante (V4a) und Wildtyp (4b) stieg analog zu den Versuchen in Phosphatpuffer (siehe 4.4.3) der E/t-Quotient auch in Tris/EDTA-Puffer mit steigendem pH-Wert an (siehe Abb. 26 a und 26 b) und es konnten zwei Maxima für den E/t-Quotienten im Alkalischen bestimmt werden (siehe Tab. 14).

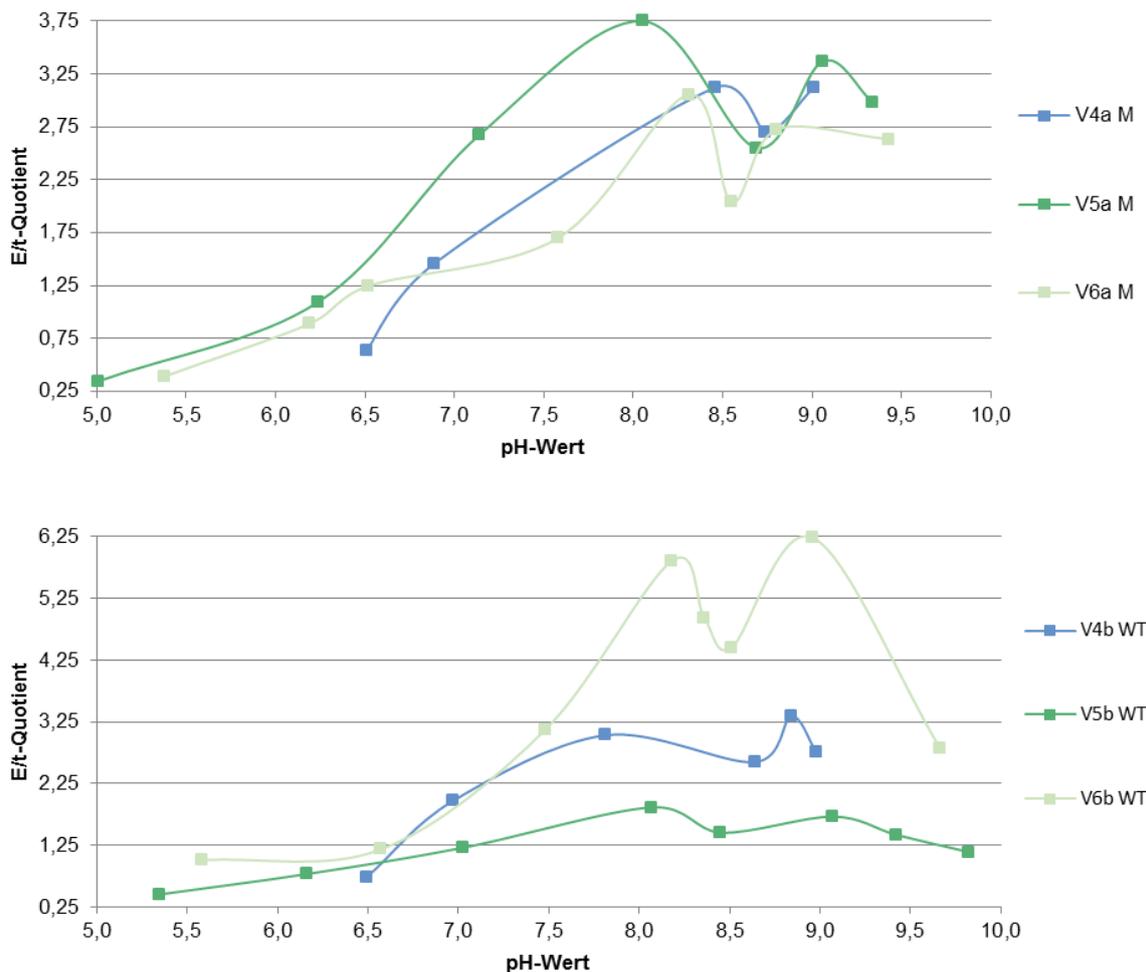


Abbildung 26 a und b: Verlauf der E/t-Quotienten von Inkubationsproben mit verschiedenen pH-Werten des Tris/EDTA-Puffers der *Saccharomyces* Stämme Mutante (M) (a - oben) und Wildtyp (WT) (b - unten).

Für den RH Stamm (V4c) und für *S. bayanus* stieg analog zu den Versuchen in Phosphatpuffer (siehe 4.4.3) und analog zu Mutante und Wildtyp der E/t-Quotient in Tris/EDTA-Puffer mit steigendem pH-Wert auch an (siehe Abb. 27 a und 27 b). Dabei wurde für den RH Stamm im Alkalischen ein Maximum bestimmt, während für *S. bayanus* (V4d), anders als in Phosphatpuffer, zwei Maxima bestimmt werden konnten (siehe Tab. 14).

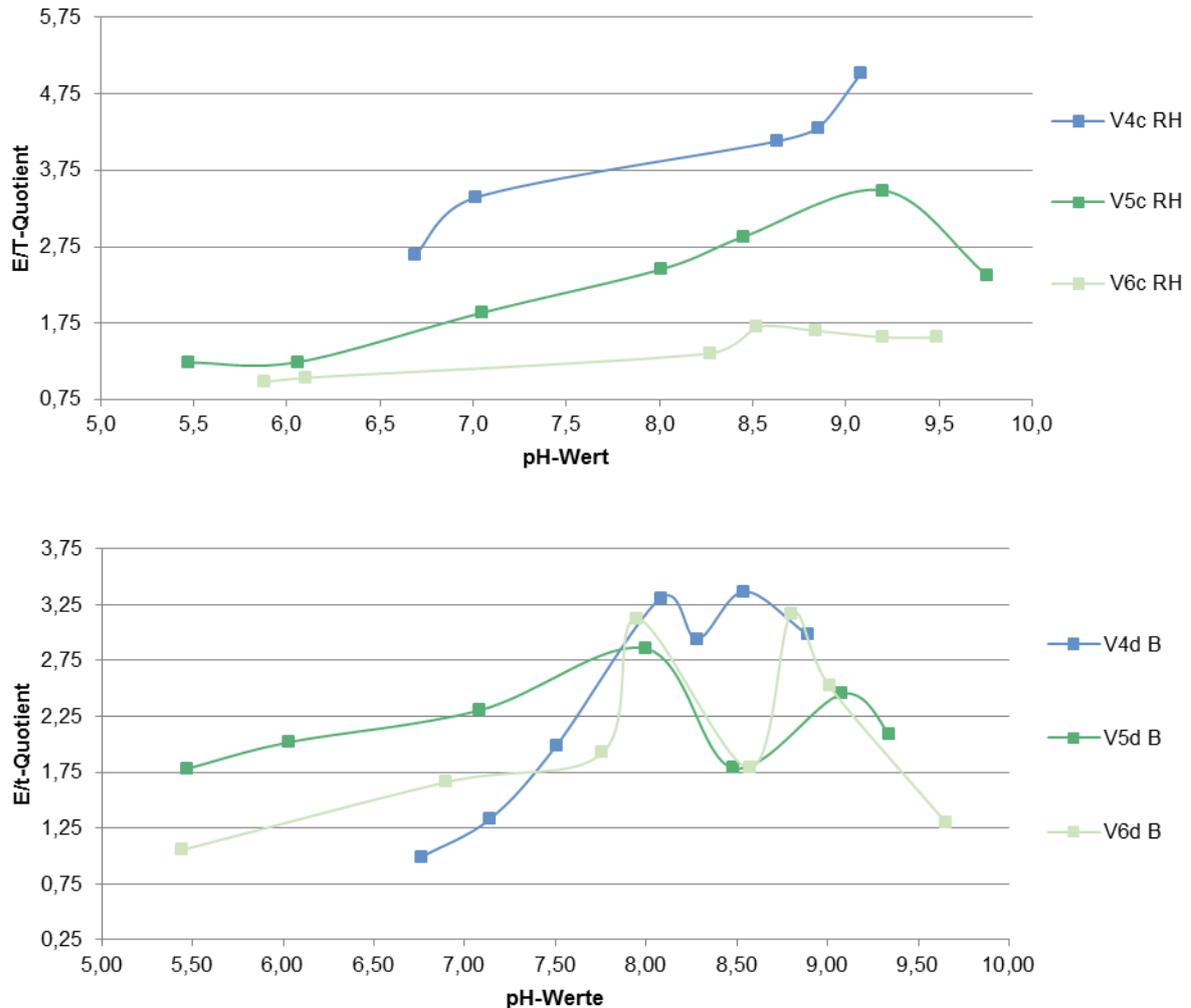


Abbildung 27 a und b: Verlauf der E/t-Quotienten von Inkubationsproben mit verschiedenen pH-Werten des Tris/EDTA-Puffers der *Saccharomyces* Stämme RH Stamm (RH) (a – oben), *S. bayanus* (B) (b - unten).

Insgesamt waren die E/t-Quotienten der beiden Maxima für Mutante und Wildtyp ebenso wie die Zelldichte nach Zellanzucht für beide Stämme vergleichbar (siehe Tab. 14). Der maximale E/t-Quotient für den RH Stamm lag fast doppelt so hoch. Die Zelldichte für den RH Stamm lag dabei auch deutlich höher als für Mutante und Wildtyp. Die Werte der beiden Maxima von *S. bayanus* waren vergleichbar mit der Mutante und dem Wildtyp. Dies korrelierte aber nicht mit der Zelldichte. Sie war nicht vergleichbar mit Mutante und Wildtyp, sondern lag noch höher als für den RH Stamm (siehe Tab 14).

Da auch bei den Inkubationsproben in Tris/EDTA-Puffer, analog zu den Proben in Phosphatpuffer, die Zelldichte vor allem bei den *Saccharomyces* Stämmen M, WT und RH eine entscheidende Rolle bei der enzymatischen Umwandlung des Substrats spielte, wurde bei V5 der Zeitraum für die Zellanzucht auf die Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen *Saccharomyces* Stämme angepasst. Für *S. bayanus*, der wie eingangs beschrieben am schnellsten wächst, wurde die Zellanzucht nach 3 Tagen beendet, beim RH Stamm nach 4 Tagen, bei Mutante und Wildtyp nach 5 Tagen. Die Inkubationsproben wurden in einem pH-Bereich 5,5 bis 9,5 untersucht, die Einstellung von pH-Werten > 9 wurden hierbei durch den Einsatz des T/E-Puffers ermöglicht. Der Verlauf der E/t-Quotienten in V5 war für alle Stämme vergleichbar zum ersten Versuch in Tris/EDTA-Puffer (V4) (siehe Abb. 26 a und 26 b, sowie Abb. 27 a und 27 b). Für die Mutante waren die Maxima in V5a vergleichbar zu V4a (siehe Tab. 14), allein der pH-Wert des ersten Maximums lag um 0,4 pH-Einheiten niedriger.

Auch die Zelldichte nach Zellanzucht bei beiden Versuchen vergleichbar. Bei Wildtyp (V5b), RH Stamm (V5c) und *S. bayanus* (V5d) lagen die Maxima deutlich niedriger als bei den vorherigen Versuchen V4b, V4c und V4d. Dabei lag für alle Stämme auch die Zelldichte deutlich niedriger (siehe Tab. 14). Bei RH Stamm und *S. bayanus* führte der verkürzte Zellanzuchtzeitraum für eine Verminderung der Zelldichte und somit für eine Verringerung der maximalen E/t-Quotienten. In Folge dessen lagen die maximalen E/t-Quotienten für die einzelnen Stämme näher zusammen als vorher. Bei V6 wurde nach Zellanzucht die Zellkonzentration auf den am langsamsten wachsenden Stamm *S. cerevisiae* Wildtyp angepasst. Dafür wurde das Zellvolumen, das bei der Zentrifugation zur Aufkonzentrierung eingesetzt wurde, von RH Stamm bzw. *S. bayanus* gegenüber dem des Wildtyps und der Mutante verringert. Zusätzlich wurde die Zellanzucht vom Wildtyp von 5 Tagen auf 6 Tage verlängert. Der untersuchte pH-Bereich für die Inkubationsproben war analog zu V5.

Insgesamt war der Verlauf für alle Stämme analog zu V5 (siehe Abb. 26 a und 26 b, sowie Abb. 27 a und 27 b). Durch das angepasste Zellvolumen auf den Wildtyp konnte aber gezeigt werden, dass für Mutante, Wildtyp und RH Stamm der Wert für den maximalen E/t-Quotient entscheidend von der Zellkonzentration abhängt, da bei diesem Versuch der Wildtyp die höchsten maximalen E/t-Quotienten aufwies (siehe Tab. 14).

**Tabelle 14: Zelldichte (OD - optische Dichte) der Stämme nach Zellanzucht, der untersuchte pH-Bereich der Inkubationsproben in Tris/EDTA-Puffer, die Maxima der E/t-Quotienten und die dazu gehörigen pH-Werte für die *Saccharomyces* Stämme Mutante (M), Wildtyp (WT), RH Stamm (RH) und *S. bayanus* (B). In V6 wurde das Zellvolumen von RH und B auf die Zelldichte von M und WT angepasst.**

|                   | V4            |            | V5            |            | V6            |            |
|-------------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|
|                   | 1. Maximum    | 2. Maximum | 1. Maximum    | 2. Maximum | 1. Maximum    | 2. Maximum |
| <b>a) M – OD</b>  | 1,92          |            | 1,85          |            | 1,87          |            |
| Zellanzucht       | 5 Tage        |            | 5 Tage        |            | 5 Tage        |            |
| pH-Bereich        | 6,51 bis 9,01 |            | 5,01 bis 9,34 |            | 5,38 bis 9,43 |            |
| pH-Wert           | 8,46          | 9,01       | 8,05          | 9,06       | 8,31          | 8,80       |
| E/t-Quotient      | 3,12          | 3,12       | 3,75          | 3,37       | 3,06          | 2,72       |
| <b>b) WT – OD</b> | 1,85          |            | 1,56          |            | 1,90          |            |
| pH-Bereich        | 6,49 bis 8,98 |            | 5,35 bis 9,82 |            | 5,58 bis 9,67 |            |
| Zellanzucht       | 5 Tage        |            | 5 Tage        |            | 6 Tage        |            |
| pH-Wert           | 7,81          | 8,84       | 8,07          | 9,07       | 8,18          | 8,96       |
| E/t-Quotient      | 3,03          | 3,34       | 1,87          | 1,72       | 5,86          | 6,23       |
| <b>c) RH - OD</b> | 2,41          |            | 2,09          |            | 2,33          |            |
| pH-Bereich        | 6,69 bis 9,08 |            | 5,47 bis 9,76 |            | 5,88 bis 9,49 |            |
| Zellanzucht       | 5 Tage        |            | 4 Tage        |            | 4 Tage        |            |
| pH-Wert           | 9,08          | -          | 9,20          | -          | 8,84          | -          |
| E/t-Quotient      | 5,01          | -          | 3,49          | -          | 1,65          | -          |
| <b>b) B - OD</b>  | 2,64          |            | 2,48          |            | 2,42          |            |
| pH-Bereich        | 6,76 bis 8,95 |            | 5,47 bis 9,34 |            | 5,44 bis 9,65 |            |
| Zellanzucht       | 5 Tage        |            | 3 Tage        |            | 3 Tage        |            |
| pH-Wert           | 8,08          | 8,54       | 8,00          | 9,08       | 7,95          | 8,80       |
| E/t-Quotient      | 3,31          | 3,37       | 2,85          | 2,45       | 3,12          | 3,16       |

### Zusammenfassung:

- Es wurde ein entscheidender Einfluss der Zelldichte auf den maximalen E/t-Quotienten bei den *Saccharomyces* Stämmen M, WT und RH festgestellt. Hierbei gilt, je höher die Zelldichte lag, desto höher waren die E/t-Quotienten.
- *S. bayanus* wies trotz höchster Zelldichte in allen Versuchen den niedrigsten E/t-Quotienten auf.

Bezüglich der pH-Optima lassen sich folgende Aussagen treffen:

- pH-Optimum *S. cerevisiae* Mutante (M): Zwei Maxima für den E/t-Quotienten im pH-Bereich 8,0 bis 8,4 bzw. 8,8 bis 9,1.
- pH-Optimum *S. cerevisiae* Wildtyp (WT): Zwei Maxima für den E/t-Quotienten im pH-Bereich 7,8 bis 8,2 bzw. 8,8 bis 9,1.
- pH-Optimum *S. carlsbergensis* RH (RH): Ein Maximum für den E/t-Quotienten im pH-Bereich 8,8 bis 9,2.
- pH-Optimum *S. bayanus* (B): Zwei Maxima für den E/t-Quotienten im pH-Bereich ca. 8,0 bzw. 8,5 bis 9,1.
- Insgesamt lagen die maximalen E/t-Quotienten für Tris/EDTA bei allen *Saccharomyces* Stämmen niedriger als in Phosphatpuffer. Diese Beobachtung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass EDTA Metallionen im aktiven Zentrum von Enzymen (z.B. Zink) komplexiert und somit die Wirkung des Enzyms herabsetzt [104].

Basierend auf diesen Beobachtungen wurden in den folgenden Versuchen zur Überprüfung des Einflusses weiterer Parameter auf die enzymatische Umwandlung von *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester (siehe 4.4.5 bis 4.4.7) Inkubationsproben in Phosphatpuffer verwendet.

#### 4.4.5 Zell- und Substratkonzentration

In den in Kapitel 4.4.3 und Kapitel 4.4.4 dargestellten Versuchen wurde gezeigt, dass die Zelldichte nach der Zellanzucht einen entschiedenen Einfluss auf die enzymatische Umwandlung des Substrats durch das bisher unbekanntes Enzym EH-1 hat. In diesem Kapitel sollte der Einfluss verschiedener Zell- und Substratkonzentrationen bei der Inkubation untersucht werden. Dabei wurden im Gegensatz zu Kapitel 4.4.4, wo das Zellvolumen auf den am langsamsten wachsenden Wildtyp angepasst wurde, verschiedene

Zellkonzentrationen eines Stammes miteinander verglichen. Der für die Inkubation verwendete Phosphatpuffer (6,67 mM) hatte einen pH-Wert im Bereich des unter Kapitel 4.4.3 bestimmten pH-Optimums (pH-Wert 8,7 bis 8,9) des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 in der Mutante.

Zur Zellanzucht wurden Zellen der Mutante, des RH Stammes und des *S. bayanus* in je einem Kolben, Zellen des Wildtyps in zwei Kolben mit je 500 mL Medium für 5 Tage geschüttelt (siehe 3.5.4). In Anschluss wurden von 480 mL (Mutante, RH Stamm und *S. bayanus*) bzw. 960 mL (Wildtyp) der Zellbrühe das Medium abzentrifugiert, dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen und das Pellet in 10 mL Puffer resuspendiert. Dies entsprach einer sechsfachen (Mutante, RH Stamm und *S. bayanus*) bzw. 12-fach (Wildtyp) Zellkonzentration im Vergleich zu den Versuchen aus Kapitel 4.4.3. Daraus wurden für Mutante, RH Stamm und *S. bayanus* Proben mit dreifacher und einfacher Konzentration (Vergleich 4.4.3 – 80 mL Zellbrühe in 10 mL Puffer resuspendiert) hergestellt. Für den Wildtyp wurden aus der Probe mit 12-facher Zellkonzentration Proben neunfacher, sechsfacher, dreifacher und einfacher Konzentration hergestellt.

Für die Mutante stieg der E/t-Quotient bei der Probe mit dreifacher Zellkonzentration im Vergleich zur Probe einfacher Zellkonzentration geringfügig an, die Proben mit sechsfacher Zellkonzentration war mit der Probe mit einfacher Zellkonzentration vergleichbar (siehe Abb. 28 a).

Für den Wildtyp ergab sich bei den Proben mit einfacher und dreifacher Zellkonzentration ein Bild analog zur Mutante M (siehe Abb. 28 a). Der E/t-Quotient für die Probe mit sechsfacher Zellkonzentration lag geringfügig über dem der dreifachen Zellkonzentration, und der der neunfacher Zellkonzentration lag geringfügig über dem der sechsfachen Zellkonzentration. Der E/t-Quotient für die Probe mit 12-facher Zellkonzentration nahm im Vergleich mit der neunfachen Zellkonzentration geringfügig ab (siehe Tab. 15).

Für den RH Stamm wurde ein Verlauf entgegengesetzt zur Mutante beobachtet. Der E/t-Quotient war für die Proben mit einfacher und sechsfacher Zellkonzentration geringfügig höher als bei der Probe mit dreifacher Zellkonzentration (siehe Abb. 28 a).

Für *S. bayanus* ergab sich ein analoger Verlauf zum Wildtyp. Der E/t-Quotient stieg für alle Proben mit steigender Zellkonzentration geringfügig an (siehe Abb. 28 a).

Es ist insgesamt festzustellen, dass die Änderung der E/t-Quotienten für die einzelnen Hefestämme bei den verschiedenen Zellkonzentrationen sehr gering ist und demzufolge die Erhöhung der Zellkonzentration offensichtlich keinen wesentlichen Einfluss auf die enzymatische Umwandlung des Substrats hat. Anderes galt für die Zelldichte. Auch bei diesen Versuchen bestand analog zu den vorherigen (siehe 4.4.3 und 4.4.4) für die *Saccharomyces* Stämme ein Zusammenhang zwischen einem hohen E/t-Quotienten und einer hohen Zelldichte. Die E/t-Quotienten (ca. 3,80 bis 4,40) waren für den RH Stamm und

die Mutante vergleichbar. Die Werte für den Wildtyp waren niedriger (E/t-Quotienten um 2,5) und die für *S. bayanus* von allen Stämmen am niedrigsten (E/t-Quotienten um 1,5). Die Zelldichte lag analog zu den Versuchen zum pH-Optimum für *S. bayanus* am höchsten, gefolgt vom RH Stamm, die etwa doppelt so hoch war als die für den Wildtyp. Die optische Dichte der Mutante lag zwischen RH Stamm und Wildtyp.

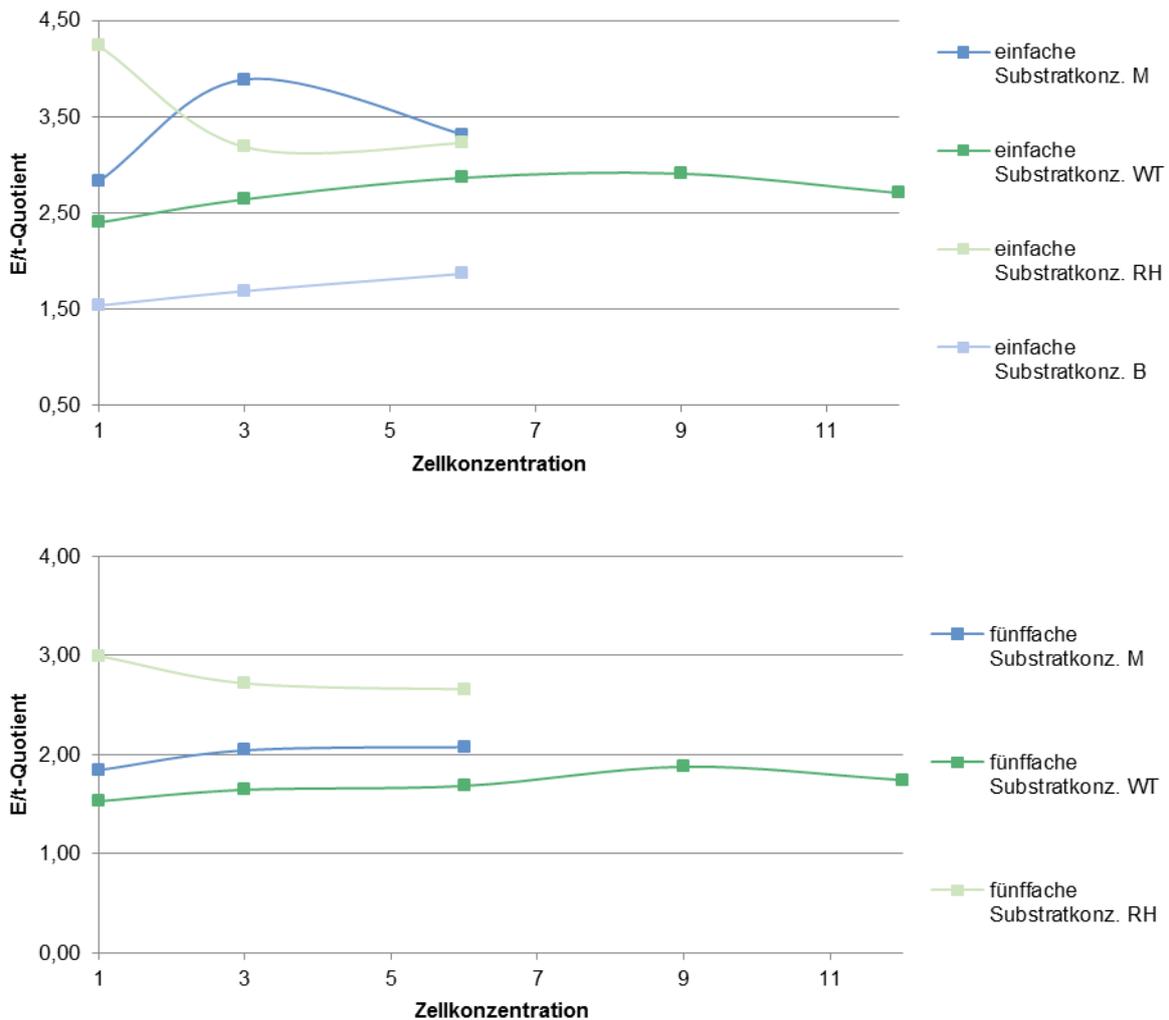


Abbildung 28 a und b: E/t-Quotienten verschiedener Inkubationsproben der *Saccharomyces* Stämme Mutante (M), Wildtyp (WT), RH Stamm (RH) und *S. bayanus* (B) bei verschiedenen Zellkonzentrationen und einfacher (a – oben) bzw. fünffacher Substratkonzentration (b – unten) in Phosphatpuffer.

Auch wenn sich nur geringfügige Unterschiede zwischen den E/t-Quotienten für die verschiedenen Zellkonzentrationen feststellen lassen, ergeben sich für die Konzentrationen der *erythro*- bzw. *threo*-Produkte deutliche Unterschiede. Für *S. cerevisiae* Wildtyp sind sie exemplarisch in Tabelle 15 aufgeführt.

Es wird ersichtlich, dass mit steigender Zellkonzentration sowohl die Konzentration des *erythro*-Lactons, als auch des *threo*-Lactons anstieg. Ein vergleichbarer Anstieg beider Reaktionsprodukte hat konstante E/t-Quotienten zur Folge. Die Konzentrationen der *threo*-DiOH waren deutlich geringer als für die anderen Abbauprodukte und nahmen mit steigender

Zellkonzentration geringfügig ab. Den vorherigen Versuchen entsprechend wurde *Erythro-DiOH* nicht nachgewiesen.

**Tabelle 15: Konzentrationen der gebildeten erythro- und threo-Produkte und E/t-Quotienten der Inkubationsproben bei verschiedenen Zell- und Substratkonzentrationen für *S. cerevisiae* Wildtyp in Phosphatpuffer.**

| Wildtyp              | Konzentration in ppm |              |              |            | E/t-Quotient |
|----------------------|----------------------|--------------|--------------|------------|--------------|
|                      | erythro-Lacton       | erythro-DiOH | threo-Lacton | threo-DiOH |              |
| Einfache/einfache    | 3,63                 | 0,00         | 1,33         | 0,19       | 2,40         |
| Einfache/dreifache   | 4,87                 | 0,00         | 1,73         | 0,12       | 2,64         |
| Einfache/sechsfache  | 5,18                 | 0,00         | 1,72         | 0,09       | 2,87         |
| Einfache/neunfache   | 6,79                 | 0,00         | 2,20         | 0,14       | 2,91         |
| Einfache/12-fache    | 6,77                 | 0,00         | 2,44         | 0,06       | 2,71         |
| Fünffache/einfache   | 7,36                 | 0,00         | 2,93         | 2,20       | 1,53         |
| Fünffache/dreifache  | 12,79                | 0,00         | 5,58         | 3,23       | 1,64         |
| Fünffache/sechsfache | 16,98                | 0,00         | 8,19         | 4,75       | 1,68         |
| Fünffache/neunfache  | 19,68                | 0,00         | 9,20         | 4,19       | 1,88         |
| Fünffache/12-fache   | 21,25                | 0,00         | 11,19        | 4,59       | 1,74         |

Um den Einfluss der Substratkonzentration auf die enzymatische Umwandlung von *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester zu untersuchen, wurden zusätzlich für die *Saccharomyces* Stämme M, WT und RH zu den oben beschriebenen Proben mit verschiedenen Zellkonzentrationen, die mit 10 µL der Substratlösung (siehe 3.5.12) (0,27 mg auf 1 mL Probe) inkubiert wurden, Proben mit 50 µL Substratlösung (1,35 mg auf 1 mL Probe) inkubiert. Mit dieser fünffachen Substratkonzentration sollte ein Substratüberschuss erzielt und der enzymatische Abbau begünstigt werden. Der Verlauf für die einzelnen Zellkonzentrationen war für Mutante, Wildtyp und RH Stamm analog zu den oben beschriebenen Ergebnissen mit einfach Substratkonzentration (siehe Abb. 28 a und 28 b). Bei fünffacher Substratkonzentration lagen die E/t-Quotienten für den RH Stamm höher als für die Mutante, bei einfacher Substratkonzentration waren sie noch vergleichbar. Insgesamt lagen die Absolutwerte für den E/t-Quotienten bei fünffacher Substratkonzentration für alle *Saccharomyces* Stämme geringfügig niedriger als bei einfacher Substratkonzentration.

Wie an den Konzentrationen der Abbauprodukte für den Wildtyp zu erkennen ist (siehe Tab. 15), liegt die Ursache dieser Beobachtung darin begründet, dass bei erhöhter Substratkonzentration (1,35 mg) zwar die Konzentration des *erythro*-Lactons (einziges *erythro*-Produkt) deutlich anstieg, jedoch unter dem Konzentrationsanstieg der *threo*-Produkte (*threo*-Lacton und die *threo*-DiOH) blieb.

Diese Ergebnisse wiesen auf eine Enzymsättigung bei gesteigerter Substratkonzentration hin, so dass in den folgenden Versuchen die Inkubationsproben weiter mit 0,27 mg inkubiert wurden.

Da auch die Erhöhung der Zellkonzentration nicht zu einer Erhöhung des E/t-Quotienten führte, wurde weiterhin mit einfacher Zellkonzentration (80 mL Zellbrühe in 10 mL Puffer resuspendiert) gearbeitet.

#### 4.4.6 Pufferkonzentration und Inkubationszeit

Nach der Untersuchung des Einflusses der Zell- und Substratkonzentration auf die enzymatische Umwandlung des Substrats *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester wurde in diesem Kapitel der Einfluss der Pufferkonzentration untersucht. Für die Inkubation wurden Zellen nach 5 Tagen Zellanzucht von Mutante, RH Stamm und *S. bayanus* in Phosphatpuffer mit Pufferkonzentrationen von 6,67 mM; 22,2 mM; 44,4 mM und 66,7 mM (pH-Wert ca. 8,7) verwendet. Sowohl für die Mutante als auch für den RH Stamm und *S. bayanus* nahm der E/t-Quotient für die Proben alternierend mit steigender Pufferkonzentration entweder geringfügig zu oder geringfügig ab (siehe Tab. 16). Die E/t-Quotienten lagen zwischen 3,97 und 5,14 (Mutante), zwischen 6,98 und 7,45 (RH Stamm) und zwischen 1,18 und 1,44 (B). Die niedrigeren E/t-Quotienten für *S. bayanus* im Vergleich zu Mutante und RH Stamm entsprachen den Beobachtungen aus den Versuchen zum pH-Optimum in Phosphatpuffer (siehe 4.4.3).

Insgesamt waren die Konzentrationen *erythro*-Produkte und die Konzentrationen der *threo*-Produkte für alle Stämme nahezu konstant, oder sanken mit steigender Pufferkonzentration minimal ab. Eine mögliche Ursache für die geringfügige Abnahme der Konzentrationen der enzymatisch gebildeten *erythro*-Produkte mit steigender Pufferkonzentration könnte eine Hemmung des Enzyms sein. Je höher die Pufferkonzentration ist, desto mehr Salzionen befinden sich in Lösung, die möglicherweise die Funktionalität des Enzyms, wenn auch nur geringfügig, stören können.

Da mit Erhöhung der Pufferkonzentration insgesamt keine Erhöhung der E/t-Quotienten erzielt wurde, wurde in den folgenden Versuchen weiter mit einer Pufferkonzentration von 6,67 mM gearbeitet. Dies ist auch im Hinblick auf die Probenvorbereitung sinnvoll, je niedriger die Pufferkonzentration in der Probe ist, umso geringer ist die

Salzonenkonzentration und umso besser lassen sich die zu bestimmenden *erythro*- und *threo*-Abbauprodukte in die organische Phase zur GC/MS-Messung überführen (siehe 4.4.2).

**Tabelle 16: Konzentrationen der gebildeten *erythro*- und *threo*-Produkte und E/t-Quotienten der Inkubationsproben bei verschiedenen Pufferkonzentrationen des Phosphatpuffers für *S. cerevisiae* Mutante (M), *S. carlsbergensis* RH (RH) und *S. bayanus* (B).**

| Pufferkonzentration | Konzentration in ppm   |                       |                      |                    | E/t-Quotient |
|---------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|--------------|
|                     | <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> - DiOH | <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -DiOH |              |
| M – 6,67 mM         | 1,52                   | 0,00                  | 0,23                 | 0,08               | 4,90         |
| M – 22 mM           | 1,55                   | 0,00                  | 0,36                 | 0,03               | 3,97         |
| M – 44 mM           | 1,49                   | 0,00                  | 0,26                 | 0,03               | 5,14         |
| M – 66 mM           | 1,37                   | 0,00                  | 0,28                 | 0,01               | 4,72         |
| RH – 6,67 mM        | 3,84                   | 0,00                  | 0,54                 | 0,01               | 6,98         |
| RH – 22 mM          | 3,63                   | 0,00                  | 0,48                 | 0,02               | 7,26         |
| RH – 44 mM          | 3,28                   | 0,00                  | 0,41                 | 0,06               | 6,98         |
| RH – 66 mM          | 3,65                   | 0,00                  | 0,42                 | 0,07               | 7,45         |
| B – 6,67 mM         | 4,30                   | 0,00                  | 3,01                 | 0,28               | 1,31         |
| B – 22 mM           | 3,59                   | 0,00                  | 2,79                 | 0,25               | 1,18         |
| B – 44 mM           | 4,43                   | 0,00                  | 2,78                 | 0,30               | 1,44         |
| B – 66 mM           | 3,94                   | 0,00                  | 2,56                 | 0,20               | 1,43         |

Im Anschluss an die Optimierung der Pufferkonzentration wurde der Einfluss der Inkubationszeit auf die enzymatische Umwandlung des Substrats untersucht. Dabei wurden Proben von Mutante, RH Stamm und *S. bayanus* in Phosphatpuffer (6,67 mM) für 22 h, 44 h und 66 h inkubiert. Inkubationszeiten unter 20 h stellten sich bereits in Kapitel 4.4.1 in Bezug auf die enzymatische Umwandlung als nicht ausreichend heraus.

Für alle drei *Saccharomyces* Stämme (M, RH und B) nahm der E/t-Quotient für die Proben mit 22 h, über die mit 44 h bis zu denen mit 66 h Inkubationszeit stetig ab (siehe Abb. 29).

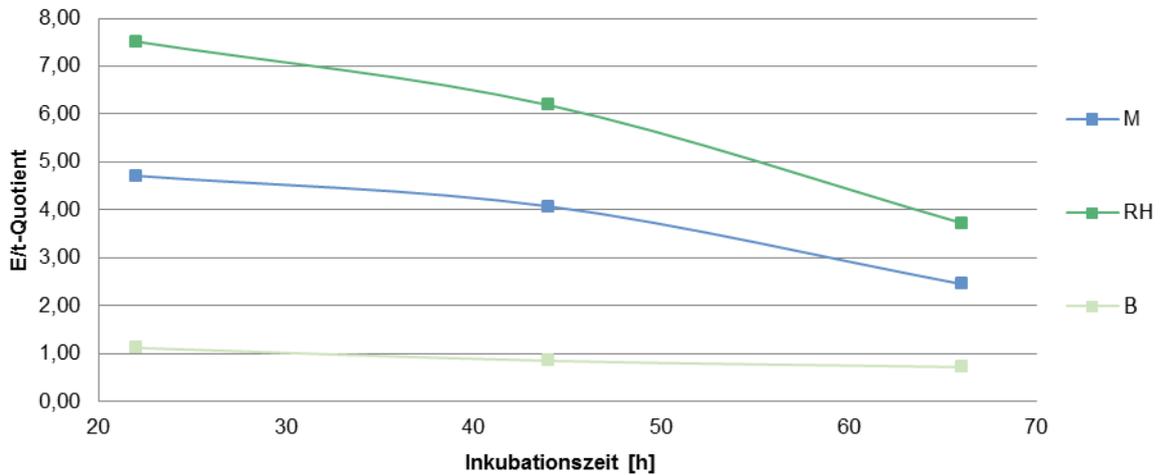


Abbildung 29: E/t-Quotienten verschiedener Inkubationsproben der *Saccharomyces* Stämme Mutante (M), RH Stamm (RH) und *S. bayanus* (B) bei verschiedenen Inkubationszeiten.

Dies entstand durch den deutlich höheren Anstieg der chemisch gebildeten *threo*-Produkte im Vergleich zu den enzymatisch gebildeten *erythro*-Produkten (siehe Tab. 17). Die E/t-Quotienten waren für *S. bayanus*, analog zu den Versuchen der vorherigen Kapitel niedriger als für Mutante und RH Stamm.

Tabelle 17: Konzentrationen der gebildeten *erythro*- und *threo*-Produkte und E/t-Quotienten der Inkubationsproben bei verschiedenen Inkubationszeiten für *S. cerevisiae* Mutante (M), *S. carlsbergensis* RH (RH) und *S. bayanus* (B) in Phosphatpuffer.

| Inkubationszeit | Konzentration in ppm   |                       |                      |                    | E/t-Quotient |
|-----------------|------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|--------------|
|                 | <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> - DiOH | <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -DiOH |              |
| M – 22 h        | 2,20                   | 0,00                  | 0,38                 | 0,08               | 4,71         |
| M – 44 h        | 3,72                   | 0,00                  | 0,90                 | 0,01               | 4,08         |
| M – 66 h        | 5,09                   | 0,00                  | 2,06                 | 0,01               | 2,45         |
| RH – 22 h       | 3,65                   | 0,00                  | 0,42                 | 0,07               | 7,52         |
| RH – 44 h       | 4,44                   | 0,00                  | 0,59                 | 0,13               | 6,19         |
| RH – 66 h       | 5,07                   | 0,00                  | 1,29                 | 0,07               | 3,73         |
| B – 22 h        | 3,25                   | 0,00                  | 2,70                 | 0,21               | 1,12         |
| B – 44 h        | 3,43                   | 0,00                  | 3,86                 | 0,19               | 0,85         |
| B – 66 h        | 3,83                   | 0,00                  | 5,14                 | 0,18               | 0,72         |

Die stetige Abnahme der E/t-Quotienten mit steigender Inkubationszeit in den Stämmen ist möglicherweise auf eine Verminderung Wirkung des unbekanntes Enzyms EH-1 zurückzuführen.

Anhand dieser Ergebnisse konnte die Inkubationszeit auf eine Zeitspanne von 20 bis 24 h optimiert werden, die in allen nachfolgenden Versuchen eingehalten wurde.

#### 4.4.7 Temperatur und Schüttelfrequenz

Um den Einfluss der Temperatur auf Zellwachstum und enzymatische Umwandlung des Substrats *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecan säuremethylester zu untersuchen, wurden mit 18 °C, 23 °C und 28 °C verschiedene Temperaturen bei Zellanzucht und Inkubation verwendet. Bei 23 °C wurde mit erhöhter Schüttelfrequenz gearbeitet als bei 18 °C und 28 °C.

Um das Zellwachstum und die pH-Werte von Mutante und RH Stamm bei den einzelnen Temperaturen zu vergleichen, wurden während der Zellanzucht nach 3 Tagen, 4 Tagen und 5 Tagen (Endpunkt) die optische Dichte und die pH-Werte der Stämme (siehe 3.5.6). Für Mutante und RH Stamm wurde für alle Temperaturen eine stetige Zunahme der optischen Dichte beobachtet (siehe Tab. 18).

Das höchste Zellwachstum (optische Dichte) wurde für Mutante und RH Stamm nach 5 Tagen bei 23 °C mit erhöhter Schüttelfrequenz erreicht. Die Werte für 18 °C und 28 °C waren insgesamt niedriger, dabei war das Zellwachstum bei 18 °C nur geringfügig niedriger als bei 28 °C. Die optische Dichte war bei allen Zeitpunkten für den RH Stamm höher als für die Mutante. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.4.1.

**Tabelle 18: Zelldichte (OD - optische Dichte) und pH-Werte für verschiedene Temperaturen bei verschiedenen Zellanzuchtzeiten für die Stämme *S. cerevisiae* Mutante (M) und *S. carlsbergensis* RH (RH).**

| Temperatur      | OD    |       |       | pH-Wert |       |       |
|-----------------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|
|                 | Tag 3 | Tag 4 | Tag 5 | Tag 3   | Tag 4 | Tag 5 |
| <b>M 18 °C</b>  | 1,31  | 1,35  | 1,45  | 4,40    | 4,30  | 4,23  |
| <b>M 23 °C</b>  | 1,84  | 1,89  | 1,93  | 4,23    | 4,12  | 4,00  |
| <b>M 28 °C</b>  | 1,49  | 1,57  | 1,64  | 4,13    | 4,09  | 4,00  |
| <b>RH 18 °C</b> | 1,61  | 1,97  | 1,98  | 4,55    | 4,77  | 4,92  |
| <b>RH 23 °C</b> | 2,25  | 2,46  | 2,55  | 5,51    | 5,88  | 6,31  |
| <b>RH 28 °C</b> | 1,63  | 1,74  | 1,84  | 4,96    | 5,06  | 5,44  |

Um die enzymatische Umwandlung des Substrats in den Stämmen besser vergleichen zu können, wurde bei den nachfolgenden Versuchen, wie schon in Kapitel 4.4.4 zum pH-Optimum in Tris/EDTA-Puffer, die Zelldichte der Stämme für die Inkubation angepasst. Die Regulation erfolgte über den Zeitraum der Zellanzucht: 3 Tage für *S. bayanus*, 4 Tage für den RH Stamm, 5 Tage für die Mutante und 5 bis 6 Tage für den Wildtyp. Da *S. bayanus* in den meisten Versuchen am schnellsten und der Wildtyp am langsamsten wuchs.

Bei der Betrachtung der pH-Werte ergab sich für Mutante und RH Stamm ein unterschiedliches Bild. Für die Mutante sank bei steigendem Zellwachstum der pH-Wert kontinuierlich ab und hatte nach 5 Tagen mit einem pH-Wert 4,00 und einer Zellanzucht bei 23 bzw. 28 °C den niedrigsten pH-Wert, während er beim RH Stamm kontinuierlich anstieg und nach 5 Tagen und einer Zellanzucht bei 23 °C den höchsten pH-Wert 6,31 erreichte. Zu Beginn der Zellanzucht entsprach der pH-Wert 5,5 dem des eingesetzten Mediums.

Bei dem Enzymparameterstest wurden die für Phosphatpuffer in den Kapiteln 4.4.1 bis 4.4.6 optimierten Parameter (pH-Wert: 8,7, Substratmenge: 10 µL, Pufferkonzentration: 6,67 mM, und Inkubationszeit: ca. 22 h) verwendet und die Proben von Mutante und RH Stamm bei 18 °C, 23 °C und 28 °C inkubiert. Aufgrund der RGT-Regel wurde angenommen, dass die enzymatische Umwandlung des Substrats mit steigender Temperatur ansteigt [93], da die Geschwindigkeit der Substratumsetzung durch die Zunahme der Teilchenbewegung zunehmen sollte.

Analog zur optischen Dichte war für beide Stämme der E/t-Quotient in den Proben mit einer Zellanzucht- bzw. Inkubationstemperatur von 23 °C und höherer Schüttelfrequenz größer als bei 18 °C bzw. 28 °C und reduzierter Schüttelfrequenz (siehe Abb. 30 a und 30 b).

Insgesamt lagen die Werte für den RH Stamm bei gleichen Bedingungen geringfügig oberhalb denen der Mutante. Für die Mutante waren die E/t-Quotienten für alle Inkubationsproben (18 °C, 23 °C und 28°C) deren Zellanzucht bei 28 °C erfolgte geringfügig niedriger als für die Inkubationsproben deren Zellanzucht bei 18 °C erfolgte.

Für die Inkubationsproben des RH Stamms bei 18 °C und 28 °C, deren Zellanzucht bei 28 °C erfolgte, lagen die E/t-Quotienten geringfügig oberhalb der Inkubationsproben bei 18 °C und 28 °C mit einer Zellanzuchttemperatur von 18 °C.

Bei der Probe, die bei 23 °C inkubiert wurde und eine Zellanzuchttemperatur von 28 °C hatte, lagen die E/t-Quotienten geringfügig unterhalb der Probe mit einer Zellanzucht- und Inkubationstemperatur von 23 °C bei erhöhter Schüttelfrequenz. Die in diesem Kapitel dargestellten Versuche zeigten, dass sich Temperaturen von größer 20 °C positiv auf das Zellwachstum und die enzymatische Umsetzung auswirkten. Insgesamt lässt sich feststellen, dass eine Erhöhung der Schüttelfrequenz eher zu einer Erhöhung der Bildung der enzymatisch gebildeten *erythro*-Abbauprodukte und somit zu einer Erhöhung der E/t-Quotienten führte als eine Temperaturerhöhung.

Deshalb wurde sowohl für die Zellanzucht, als auch für die Inkubation bei allen nachfolgenden Versuchen mit einer Temperatur von  $24 \pm 1 \text{ °C}$  und einer möglichst hohen Schüttelfrequenz gearbeitet.

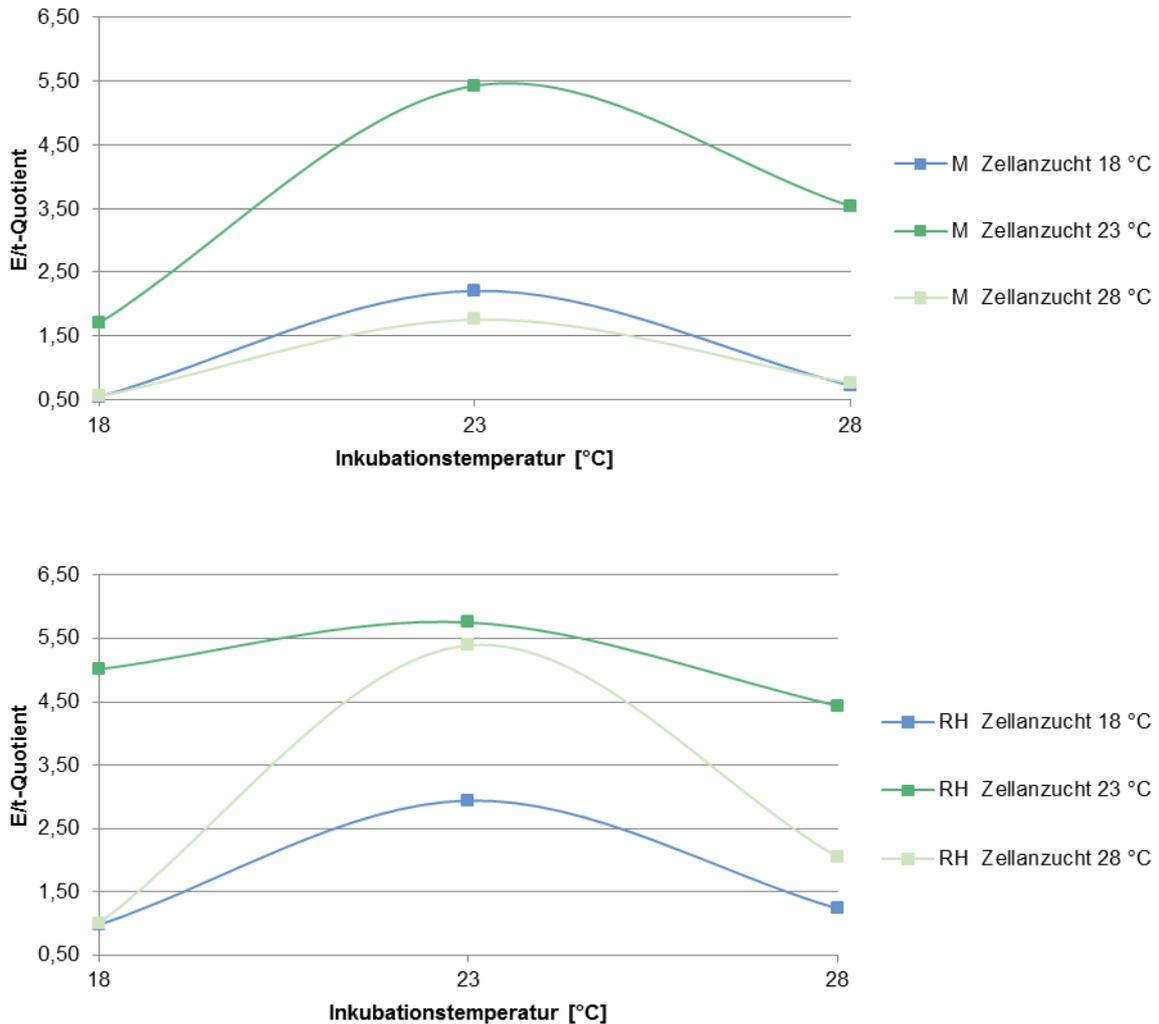


Abbildung 30 a und b: E/t-Quotienten verschiedener Inkubationsproben (Variation der Zellanzuchttemperatur) der *Saccharomyces* Stämme Mutante (M) und RH Stamm (RH) bei verschiedenen Inkubationstemperaturen.

#### 4.4.8 Zusammenfassung der Parameter

In Kapitel 4.4 konnte ein Enzymparametertest mit anschließender Probenvorbereitung entwickelt werden. Anhand dieses Enzymparametertests wurde die Existenz eines bisher unbekanntes Enzym EH-1, welches das Substrat *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester in der LTA<sub>4</sub>H deletierten Knockout-Mutante *S. cerevisiae* BY4741  $\Delta$ YNL045W umwandelt, nachgewiesen. Die E/t-Quotienten für diese Mutante waren in den meisten Versuchen vergleichbar mit *S. cerevisiae* BY4741 und *S. carlsbergensis* RH, oder nur geringfügig niedriger. Für *S. bayanus* lagen die E/t-Quotienten aber niedriger als für alle drei anderen Stämme.

Die Unterschiede zwischen Mutante, Wildtyp und RH Stamm standen im Zusammenhang mit der Zelldichte. Für die meisten Versuche wurden für den Stamm mit der geringsten Zelldichte auch die geringsten E/t-Quotienten nachgewiesen. Dabei spielten die Parameter der Zellanzucht, wie die Zellanzuchttemperatur, eine entscheidende Rolle. Bei *S. bayanus* war dies hingegen anders. Trotz der höchsten Zelldichte in allen Versuchen, waren die E/t-Quotienten für diesen Stamm in allen Versuchen am geringsten. Um in den folgenden Kapiteln zu reproduzierbaren Ergebnissen zu kommen, wurde die Zelldichte der *Saccharomyces* Stämme durch unterschiedliche Wachstumszeiträume angeglichen (WT - 5 bis 6 Tage, M - 5 Tage, RH - 4 Tage und B - 3 Tage).

In Inkubationsversuchen wurden wichtige Parameter für die enzymatische Umwandlung des Substrats *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester durch das bisher unbekannte Enzym EH-1 in der *S. cerevisiae* Mutante optimiert. Die Optimalbedingungen der Parameter sind in Tabelle 19 zusammengestellt. Alle Parameterversuche mit Ausnahme der Bestimmung des pH-Optimums in T/E-Puffer wurden in Phosphatpuffer durchgeführt.

**Tabelle 19: Optimierte Parameter für die enzymatische Umwandlung von *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester in der *S. cerevisiae* Mutante.**

| Parameter                         | Optimalbedingungen                             | Kapitel       |
|-----------------------------------|--|---------------|
| <b>Grundparameter Zellanzucht</b> | 500 mL Hefemedium, 170µL Ölsäure, 1 Kolonie    | 4.4.1         |
| <b>pH-Optimum Phosphatpuffer</b>  | pH-Bereich 8,2 bis 8,3 bzw. 8,7 bis 8,9        | 4.4.3         |
| <b>pH-Optimum T/E-Puffer</b>      | pH-Bereich 8,0 bis 8,2 bzw. 8,7 bis 8,9        | 4.4.4         |
| <b>Zellkonzentration</b>          | Pellet von 80 mL Zellbrühe in 10 mL Puffer     | 4.4.5         |
| <b>Substratkonzentration</b>      | 0,27 mg/mL                                     | 4.4.5         |
| <b>Pufferkonzentration</b>        | 6,67 mM  | 4.4.6         |
| <b>Inkubationsdauer</b>           | 20 bis 24 h                                    | 4.4.6         |
| <b>Temperatur</b>                 | 24 ± 1 °C bei möglichst hoher Schüttelfrequenz | 4.4.7         |
| <b>Zeitraum Zellanzucht</b>       | 5 Tage   | 4.4.4 / 4.4.7 |

## 4.5 Zellaufschluss

In Kapitel 4.4 wurden durch Untersuchung verschiedener Inkubationsparameter optimale Bedingungen für die enzymatische Umwandlung des Substrats *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester durch das bisher unbekannte Enzym EH-1 in der Knockout-Mutante *S. cerevisiae* BY4741 ΔYNL045W (M) geschaffen und mit den Stämmen *S. cerevisiae* Wildtyp BY4741 (WT), *S. carlsbergensis* RH (RH) und *S. bayanus* (B) verglichen. Ein wichtiger Schritt bei der Charakterisierung von Enzymen ist ihre Lokalisierung in der Zelle. Um zu klären ob es sich bei EH-1 um ein membrangebundenes (mEH) oder um ein frei im Cytosol vorliegendes (cEH) Enzym handelt, wurden mechanisch Zellaufschlüsse mittels Kugelmühle durchgeführt. Dabei wurde zunächst die Mutante verwendet (siehe 4.5.1), die Ergebnisse aus diesen Versuchen sollten anschließend mit denen aus Versuchsreihen mit Wildtyp, RH Stamm und *S. bayanus* verglichen werden (siehe 4.5.2). Eine Übersicht über die durchgeführten Zellaufschlüsse ist in Tabelle 20 aufgeführt.

**Tabelle 20: Übersicht der mechanischen Zellaufschlüsse (ZA). Es sind die entsprechenden Bedingungen (Zellvolumina und Puffer), die verwendeten Stämme (*S. cerevisiae* Mutante (M) und Wildtyp (WT), *S. carlsbergensis* RH (RH) und *S. bayanus* (B)) und das behandelnde Kapitel aufgeführt.**

| Versuch | Zellvolumen | Puffer                | M | WT | RH | B | Kapitel |
|---------|-------------|-----------------------|---|----|----|---|---------|
| ZA 1a   | 160 mL      | Phosphat pH-Wert 5,5  | x | -  | -  | - | 4.5.1   |
| ZA 1b   | 160 mL      | Phosphat pH-Wert 6,9  | x | -  | -  | - | 4.5.1   |
| ZA 1c   | 160 mL      | Phosphat pH-Wert 8,8  | x | -  | -  | - | 4.5.1   |
| ZA 2a   | 480 mL      | Phosphat pH-Wert 8,8  | x | -  | -  | - | 4.5.1   |
| ZA 2b   | 480 mL      | Tris/EDTA pH-Wert 8,8 | x | -  | -  | - | 4.5.1   |
| ZA 3a   | 480 mL      | Phosphat pH-Wert 8,8  | x | -  | -  | - | 4.5.1   |
| ZA 3b   | 480 mL      | Tris/EDTA pH-Wert 8,8 | x | -  | -  | - | 4.5.1   |
| ZA 4a   | 480 mL      | Phosphat pH-Wert 8,8  | x | x  | x  | x | 4.5.1/2 |
| ZA 4b   | 480 mL      | Tris/EDTA pH-Wert 8,8 | x | x  | x  | x | 4.5.1/2 |
| ZA 5    | 480 mL      | Tris/EDTA pH-Wert 8,8 | - | x  | x  | x | 4.5.2   |

Als Bewertungsgrundlage für die enzymatische Umwandlung des Substrats wurde analog zu den Versuchen in Kapitel 4.4 der E/t-Quotienten verwendet. Der E/t-Quotienten ist der Quotient aus der Summe der Konzentrationen der *erythro*-Produkte und der Summe der Konzentrationen der *threo*-Produkte, die als Abbauprodukte aus dem *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester entstehen.

#### 4.5.1 *S. cerevisiae* Mutante

Beim ersten Zellaufschluss (ZA) mit der Mutante (ZA 1 M) wurden Zellen mit den in Tabelle 19 dargestellten optimierten Parameter (siehe 4.4.8) angezogen. 480 mL Zellbrühe wurden auf 12 Zentrifugenröhrchen aufgeteilt, bei 15.557 g abzentrifugiert und mit Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden je 4 Pellets der ganzen Zellen (GZ) zusammen in 15 mL Phosphatpuffer verschiedener pH-Werte (ZA 1a M pH-Wert 5,5 / ZA 1b M pH-Wert 6,9 / ZA 1c M pH-Wert 8,8) resuspendiert. 1a war der pH-Wert des Mediums bei der Zellanzucht, 1b war der pH-Wert der in voran gegangenen Arbeiten verwendet wurde und 1c war der pH-Wert, der in Kapitel 4.4.3 als pH-Optimum für die enzymatischen Umwandlung des Substrats durch EH-1 bestimmt wurde.

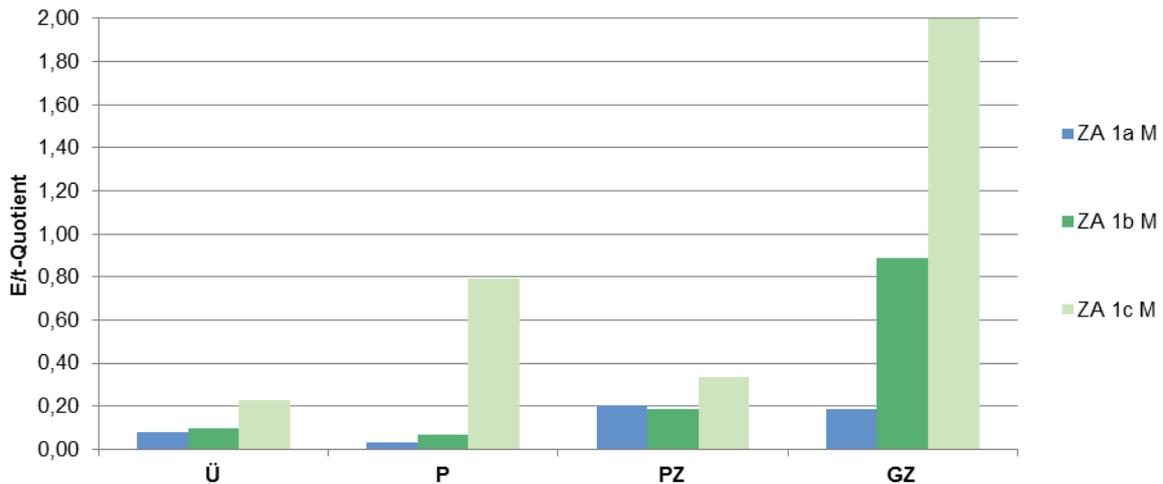
Für die Zellaufschlüsse ZA 1a M, ZA 1b M und ZA 1c M der Mutante wurde je ein Zellaufschluss mittels Kugelmühle (Aufsatz 15 mL) durchgeführt (siehe 3.5.7). Um verbliebene ganze Zellen und Zellfragmente (Zellwände etc.) nach dem Zellaufschluss sicher abzutrennen, wurde zunächst bei 514 g zentrifugiert. Das daraus resultierende Pellet (PZ) wurde später mit den anderen Proben (Überstand (Ü), Pellet (P) und ganze Zellen (GZ)) gemeinsam inkubiert. Nach Abtrennung des PZ wurden zur Lokalisierung des Enzyms Überstand und Pellet bei 15.557 g in der Zentrifuge voneinander getrennt. Das Pellet in Phosphatpuffer resuspendiert und beide Fraktionen mehrmals in der Zentrifuge bei 15.557 g gewaschen. Für die Lokalisierung des Enzyms gilt: Ein membrangebundenes Enzym (mEH) würde vorwiegend im Pellet vorkommen, ein frei im Cytosol vorliegendes Enzym (cEH) vorwiegend im Überstand.

Für die ZA 1a M und ZA 1b M lagen die E/t-Quotienten für Ü bei ca. 0,1 (siehe Abb. 31), die Werte für P waren geringfügig niedriger. Die PZ Inkubationsproben hatten bei beiden Zellaufschlüssen einen E/t-Quotienten von ca. 0,2. Ein Unterschied ergab sich bei der Betrachtung der ganzen Zellen (GZ). Bei ZA 1a M (pH-Wert 5,5) lag für GZ der E/t-Quotient bei ca. 0,2, während der E/t-Quotient mit ca. 0,9 für GZ ZA 1b M (pH-Wert 6,9) deutlich höher (siehe Abb. 31) lag. Für die Proben bei ZA 1c M (pH-Wert 8,8) lagen die E/t-Quotienten in allen untersuchten Fraktionen höher als bei den Versuchen niedrigeren pH-Werten des beim ZA verwendeten Phosphatpuffers. Für den Überstand lag der E/t-Quotient = 0,2 etwa doppelt so hoch und für das Pellet = 0,8 etwa 8-mal so hoch. Damit lag der Wert für P bei ZA 1c M deutlich höher als für Ü. Für die PZ Probe lag der Wert bei ZA 1c M (E/t-Quotient = 0,3) etwa ein Drittel höher als bei den Zellaufschlüssen ZA 1a M und ZA 1b M.

Für die Inkubationsprobe der ganzen Zellen von ZA 1c M (pH-Wert 8,8) vor Zellaufschluss lag der E/t-Quotient > 2 und war deutlich höher als bei ZA 1b (E/-Quotient = 0,9 / pH-Wert 6,9) und ZA 1a (E/t-Quotient = 0,2 / pH-Wert 5,5).

Die Ergebnisse für die ganzen Zellen entsprachen den Ergebnissen zur Bestimmung des pH-Optimums (siehe 4.4.3). Mit steigenden pH-Wert stieg auch der E/t-Quotient an. Aus

diesem Grund wurde in den folgenden Zellaufschlüssen mit Phosphatpuffer pH-Wert 8,8 bis 8,9 (6,67 mM) gearbeitet.



**Abbildung 31: E/t-Quotienten des Zellaufschlusses der *S. cerevisiae* Mutante (M) in Phosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten (ZA 1a M pH-Wert 5,5 / ZA 1b M pH-Wert 6,9 / ZA 1c M pH-Wert 8,8). Ü = Überstand, P = Pellet, PZ = Zellfragmente, Membranbestandteile und nicht aufgeschlossene Zellen, GZ = ganze Zellen vor Zellaufschluss.**

Um die E/t-Quotienten zu steigern und somit das bisher unbekannte Enzym EH-1 besser lokalisieren zu können, wurde das Zellvolumen der Mutante für Versuch ZA 2a M erhöht. Dazu wurden mit einem Kolben angezogener Zellen anstelle von drei Zellaufschlüssen nur einer in Phosphatpuffer pH-Wert 8,8 bis 8,9 durchgeführt. Durch das erhöhte Zellvolumen konnte mit ZA 2a eine Erhöhung der E/t-Quotienten im Vergleich zu ZA 1c M für die Überstand- und Pelletproben erzielt werden. Für P lag der E/t-Quotient = 1,32 und war somit etwa doppelt so hoch wie für Ü (E/t-Quotient = 0,65) (siehe Tab. 21).

Dabei war für das Pellet die Konzentration des *erythro*-Lactons mit 1,47 ppm auch doppelt so hoch wie für den Überstand (0,70 ppm).

Die Konzentration der *threo*-DiOH war im Überstand höher als für alle anderen Proben bei niedrigerem pH-Wert (siehe Tab. 21). Dies deckt sich mit den Ergebnissen zur Bestimmung des pH-Optimums (siehe 4.4.3).

Die höheren E/t-Quotienten in den Pelletproben im Vergleich zu den Überstandproben bei ZA 1c M und ZA 2a M (beide pH-Wert 8,8) lieferten einen Hinweis darauf, dass es sich bei dem unbekanntem Enzym EH-1 um ein membrangebundenes Enzym handeln könnte.

Der E/t-Quotient für PZ lag bei ZA 2a M mit 0,10 niedriger als bei ZA 1c M und war vergleichbar zu ZA 1a M und ZA 1b M. Der E/t-Quotient für GZ lag nur geringfügig niedriger als bei ZA 1c M (siehe Tab. 21). Damit wurden die Ergebnisse aus Kapitel 4.4.5 bestätigt, bei denen gezeigt wurde, dass die Zellkonzentration kaum einen Einfluss auf den E/t-Quotienten hat.

**Tabelle 21: Konzentrationen der gebildeten *erythro*- und *threo*-Produkte, E/t-Quotienten und pH-Werte der Inkubationsproben des Versuches ZA 2a M der *S. cerevisiae* Mutante in Phosphatpuffer. Ü = Überstand, P = Pellet, PZ = Zellfragmente, Membranbestandteile und nicht aufgeschlossene Zellen, GZ = ganze Zellen vor Zellaufschluss.**

| Phosphatpuffer | Konzentration in ppm   |                      |                      |                    |              |         |
|----------------|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------|---------|
| ZA 2a M        | <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> -DiOH | <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -DiOH | E/t-Quotient | pH-Wert |
| GZ             | 3,97                   | 0,00                 | 2,05                 | 0,00               | 1,94         | 8,60    |
| PZ             | 0,81                   | 0,00                 | 1,91                 | 0,10               | 0,40         | 8,77    |
| P              | 1,47                   | 0,00                 | 1,07                 | 0,05               | 1,32         | 8,68    |
| Ü              | 0,70                   | 0,00                 | 0,89                 | 0,20               | 0,65         | 7,44    |

Um zu sehen ob das Puffersystem einen Einfluss auf die enzymatische Umwandlung des Substrats in den Überstand- und Pelletproben hat, wurde parallel zu Zellaufschluss ZA 2a M ein Zellaufschluss ZA 2b M mit der Mutante in Tris/EDTA-Puffer (10/5 mM; pH-Wert 8,8 bis 8,9) durchgeführt. Der E/t-Quotient war bei ZA 2b M in der Überstandprobe mit 1,18 höher als in Phosphatpuffer (ZA 2a M: E/t-Quotient = 0,65) und in der Pelletprobe mit 0,70 niedriger als in Phosphatpuffer (ZA 2a M: E/t-Quotient = 1,32) (siehe Tab. 21 und 22). Mit analog höherer Konzentration für das *erythro*-Lacton (0,80 ppm) im Überstand und niedriger Konzentration für das *erythro*-Lacton (0,77 ppm) im Pellet.

**Tabelle 22: Konzentrationen der gebildeten *erythro*- und *threo*-Produkte, E/t-Quotienten und pH-Werte der Inkubationsproben des Versuches ZA 2b M der *S. cerevisiae* Mutante in Tris/EDTA-Puffer (T/E-Puffer). Ü = Überstand, P = Pellet, PZ = Zellfragmente, Membranbestandteile und nicht aufgeschlossene Zellen, GZ = ganze Zellen vor Zellaufschluss.**

| T/E- Puffer | Konzentration in ppm   |                      |                      |                    |              |         |
|-------------|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------|---------|
| ZA 2b M     | <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> -DiOH | <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -DiOH | E/t-Quotient | pH-Wert |
| GZ          | 3,42                   | 0,00                 | 2,02                 | 0,05               | 1,65         | 8,83    |
| PZ          | 0,69                   | 0,00                 | 2,53                 | 0,00               | 0,27         | 8,81    |
| P           | 0,77                   | 0,00                 | 1,08                 | 0,02               | 0,70         | 8,80    |
| Ü           | 0,80                   | 0,00                 | 0,36                 | 0,31               | 1,18         | 7,15    |

Damit lieferte dieser Zellaufschluss in T/E-Puffer entgegen zu den Ergebnissen in Phosphatpuffer eher einen Hinweis darauf, dass es sich bei dem unbekanntem Enzym EH-1 um ein frei im Cytosol vorliegendes Enzym handeln könnte (siehe Tab. 22).

Der E/t-Quotient der Proben PZ und GZ lagen in T/E-Puffer geringfügig unterhalb dieser Proben in Phosphatpuffer (siehe Tab. 21 und 22). Für die ganzen Zellen war dies vergleichbar mit den Ergebnissen zu den Versuchen zum pH-Optimum (siehe 4.4.3 und 4.4.4).

Die Ergebnisse bzgl. der E/t-Quotienten in den Überstand- und Pelletproben konnten in Phosphatpuffer mit den Zellaufschlüssen ZA 3a M ZA 4a M (siehe Abb. 32 a) und für Tris/EDTA-Puffer mit den Zellaufschlüssen ZA 3b M und ZA 4b M bestätigt werden (siehe Abb. 32 b).

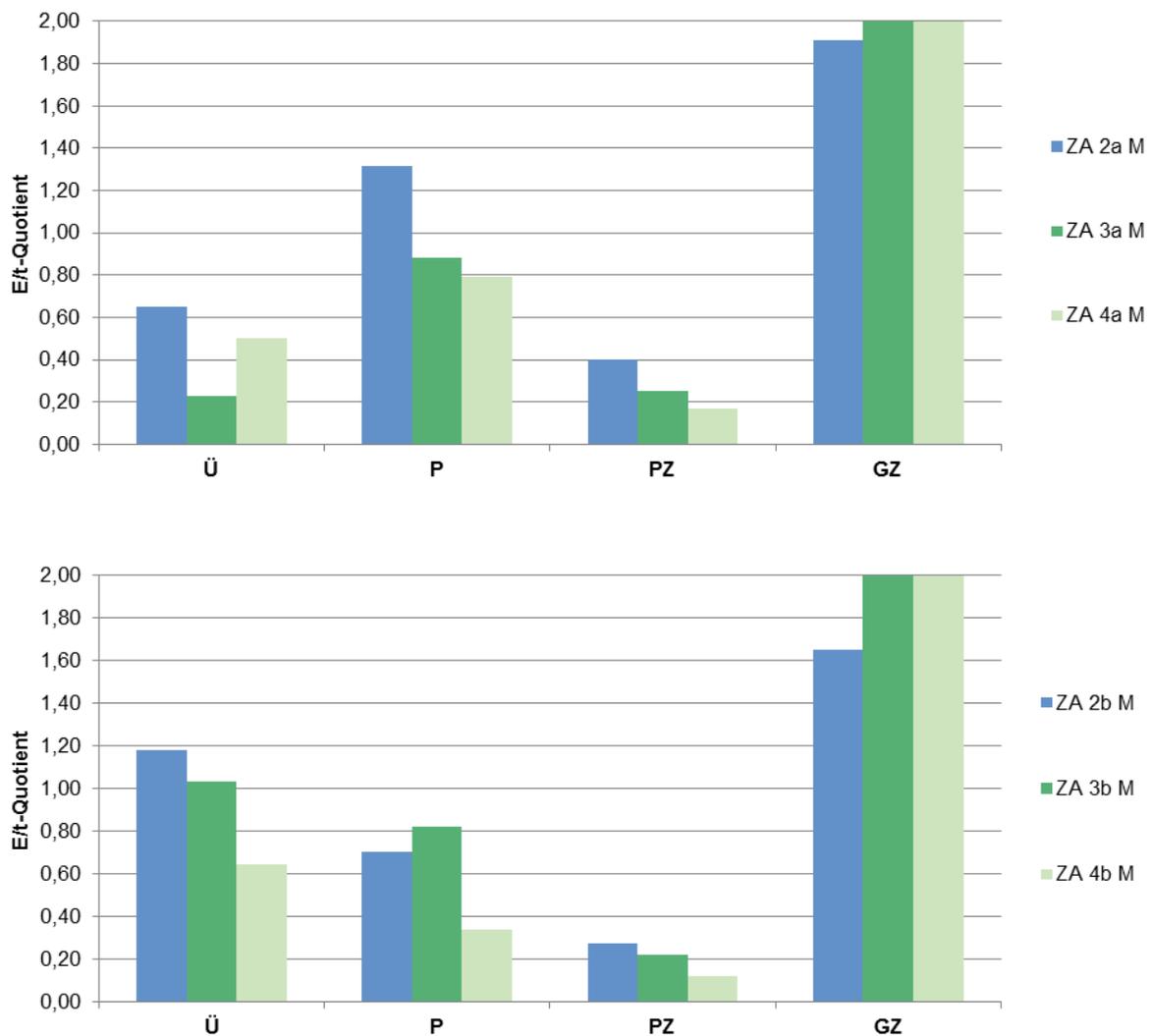


Abbildung 32 a und b: E/t-Quotienten des Zellaufschlusses der *S. cerevisiae* Mutante (M) in Phosphatpuffer (a - oben) und in Tris/EDTA-Puffer (b - unten) Ü = Überstand, P = Pellet, PZ = Zellfragmente, Membranbestandteile und nicht aufgeschlossene Zellen, GZ = ganze Zellen vor Zellaufschluss.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass bei den Pelletproben in Phosphatpuffer höhere E/t-Quotienten nachgewiesen wurden als im T/E-Puffer. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem bisher unbekanntem Enzym EH-1 um ein membrangebundenes (mEH) Enzym handelt. Für die Überstandproben verhielt es sich entgegengesetzt, hier waren die E/t-

Quotienten in den Proben in T/E-Puffer höher als in den Proben in Phosphatpuffer, was wiederum auf ein frei im Cytosol vorliegendes Enzym (cEH) hindeutet.

Um die Lokalisierung von EH-1 genauer charakterisieren zu können, wurden im Folgenden Zellaufschlüsse mit den anderen Stämmen Wildtyp, RH Stamm und *S. bayanus* durchgeführt.

#### 4.5.2 ***S. cerevisiae* Wildtyp, *S. carlsbergensis* RH und *S. bayanus***

Die Enzymcharakterisierung des unbekanntes Enzyms EH-1 beschränkt sich auf die Knockout-Mutante *S. cerevisiae* BY4741  $\Delta$ YNL045W, da bei ihr das Gen, welches für die einzig in *S. cerevisiae* bekannten Epoxidhydrolase LTA<sub>4</sub>H codiert, deletiert wurde. Um die Ergebnisse der Mutante besser einordnen zu können, wurden zum Vergleich Versuche mit den Stämmen *S. cerevisiae* BY4741 Wildtyp (WT), *S. carlsbergensis* RH (RH) und *S. bayanus* (B) durchgeführt.

Dafür wurden parallel zu ZA 4 M der Mutante Zellaufschlüsse der drei anderen *Saccharomyces* Stämme in Phosphatpuffer (ZA 4a WT, ZA 4a RH und ZA 4a B) sowie in Tris/EDTA-Puffer (ZA 4b WT, ZA 4b RH und ZA 4b B) durchgeführt, wobei die Bedingungen denen der Zellaufschlüsse der Mutante entsprachen (siehe 4.5.1).

In Phosphatpuffer waren für die *Saccharomyces* Stämme WT, RH und B die E/t-Quotienten vergleichbar mit denen der Mutante, die E/t-Quotienten der Pelletproben waren höher als die der Überstandproben. Insgesamt waren die Werte für den RH Stamm und *S. bayanus* deutlich höher als für Mutante und Wildtyp. Im Wildtyp wurden die niedrigsten E/t-Quotienten für Überstand und Pellet, wohingegen die jeweils höchsten für *S. bayanus* nachgewiesen wurden (siehe Abb. 33 a, 33 b und 33 c).

Für die PZ Proben waren die E/t-Quotienten beim Wildtyp ebenso gering wie bei der Mutante, für den RH Stamm und *S. bayanus* waren sie geringfügig höher (siehe Abb. 33 a, 33 b und 33 c). Dies könnte mit dem schnelleren Wachstum von RH Stamm und *S. bayanus* in Zusammenhang gebracht werden. Zum Zeitpunkt des Zellaufschlusses lagen beim RH Stamm und *S. bayanus* deutlich mehr Zellen vor, die unter Umständen nicht vollständig aufgeschlossen wurden. Die höhere Zelldichte ist auch ein möglicher Erklärungsansatz für die höheren E/t-Quotienten im Überstand und vor allen im Pellet. Möglicherweise waren nach dem Zellaufschluss beim RH Stamm und *S. bayanus* noch nicht aufgeschlossene Zellen im Pellet enthalten. Für die ganzen Zellen (GZ) lagen die E/t-Quotienten für den RH Stamm auch deutlich höher als für Mutante und Wildtyp (siehe Abb. 33 a und 33 b). Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.4. Für *S. bayanus* war der E/t-Quotient für GZ, analog zu den Ergebnissen bei den Parametern, von allen Stämmen am niedrigsten.

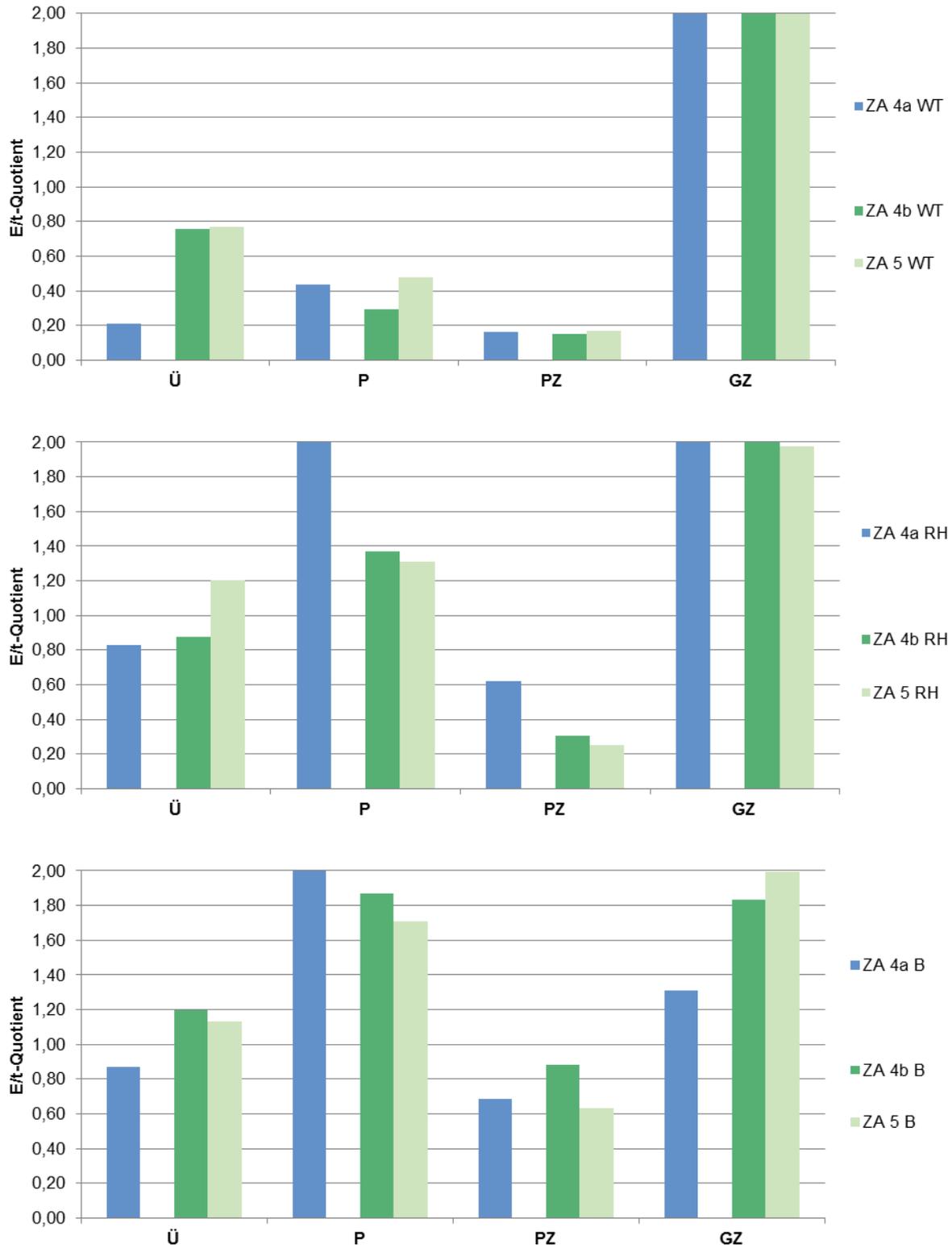


Abbildung 33 a, b und c: E/t-Quotienten des Zellaufschlusses in Phosphatpuffer (ZA 4a) und in Tris/EDTA-Puffer (ZA 4b und ZA 5) für die Stämme *S. cerevisiae* Wildtyp (WT) (oben), *S. carlsbergensis* RH (RH) (Mitte) und *S. bayanus* (B) (unten). Ü = Überstand, P = Pellet, PZ = Zellfragmente, Membranbestandteile und nicht aufgeschlossene Zellen, GZ = ganze Zellen vor Zellaufschluss.

Die Ergebnisse der Zellaufschlüsse in Tris/EDTA-Puffer waren für den Wildtyp (ZA 4b WT und ZA 5 WT) vergleichbar mit denen der Mutante (siehe Abb. 33 a und 33 b). Die E/t-Quotienten lagen in den Überstandproben analog zur Mutante über den E/t-Quotienten der Pelletproben. Für den RH Stamm (ZA 4b RH und ZA 5 RH) und *S. bayanus* (ZA 4b B und ZA 5 B) waren entgegengesetzt zu Mutante und Wildtyp auch die E/t-Quotienten in den Pelletproben höher als in den Überstandproben. Dabei waren aber die Werte für P niedriger im Vergleich zu denen in Phosphatpuffer, in den Überstandproben dagegen höher als in Phosphatpuffer. Somit lieferten die Zellaufschlüsse in Tris/EDTA-Puffer höhere Werte für die Überstandproben als in Phosphatpuffer.

### **Zusammenfassung:**

- Die Lokalisierung des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 konnte mittels mechanischen Zellaufschluss nicht abschließend geklärt werden.
- Für alle Stämme wurden in Phosphatpuffer höhere E/t-Quotienten im Pellet als im Überstand nachgewiesen, was auf ein membrangebundenes Enzym (mEH) hinweist.
- Für RH Stamm und *S. bayanus* wurden auch in Tris/EDTA-Puffer höhere E/t-Quotienten im Pellet als im Überstand nachgewiesen. Die E/t-Quotienten im Überstand waren in Tris/EDTA-Puffer aber insgesamt höher als in Phosphatpuffer.
- Für Mutante und Wildtyp in Tris/EDTA-Puffer wurden höhere E/t-Quotienten im Überstand als im Pellet nachgewiesen, was auf frei im Cytosol vorliegendes Enzym (cEH) hinweist.

Aus den dargestellten Ergebnissen lässt sich ableiten, dass sich für weitere Untersuchungen vom Pellet der Phosphatpuffer und für weitere Untersuchungen vom Überstand der Tris/EDTA-Puffer eignet.

In Kapitel 4.6 sollte mittels IEF der Isoelektrische Punkt des unbekanntes Enzyms EH-1 bestimmt werden. Da dabei ausschließlich lösliche Fraktionen untersucht werden können, wurde bei der IEF mit dem Überstand nach Zellaufschluss in T/E-Puffer gearbeitet.

## 4.6 Isoelektrische Fokussierung

In Kapitel 4.5 zum mechanischen Zellaufschluss konnte nicht abschließend geklärt werden, ob es sich bei dem unbekanntem Enzym EH-1 (in der Knockout-Mutante) um ein membrangebundenes (mEH) oder um ein lösliches, frei im Cytosol vorliegendes (cEH) Enzym handelt. In Versuchen dieses Kapitels sollte mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung (IEF), bei der Proteine nach ihrem Isoelektrischen Punkt (IEP) getrennt werden, der IEP von EH-1 über den pH-Wert in der IEF-Fraktion mit dem höchsten E/t-Quotient bestimmt werden.

Dabei wurde zunächst mit der Knockout-Mutante *S. cerevisiae* BY4741  $\Delta$ YNL045W (M) gearbeitet (siehe 4.6.2 bis 4.6.4). Anschließend sollten die Ergebnisse mit denen der Stämmen *S. cerevisiae* Wildtyp BY4741 (WT), *S. carlsbergensis* RH (RH) und *S. bayanus* (B) verglichen werden (siehe 4.6.5). Eine Übersicht über die durchgeführten IEF bietet Tabelle 23.

**Tabelle 23: Übersicht der Isoelektrischen Fokussierungen (IEF). Es sind die entsprechenden Bedingungen (pH-Bereich der Ampholyte und eingesetzte Proteinmenge), die verwendeten Stämme (*S. cerevisiae* Mutante (M) und Wildtyp (WT), *S. carlsbergensis* RH (RH) und *S. bayanus* (B)) und das behandelnde Kapitel aufgeführt.**

| Versuch | Ampholyt            | M      | WT        | RH        | B         | Kapitel |
|---------|---------------------|--------|-----------|-----------|-----------|---------|
| ZA      | Grundparameter      | x      | -         | -         | -         | 4.6.1   |
| IEF 1   | pH-Bereich 3 bis 10 | 163 mg | -         | -         | -         | 4.6.2   |
| IEF 2   | pH-Bereich 3 bis 10 | 104 mg | -         | -         | -         | 4.6.2   |
| IEF 3   | pH-Bereich 3 bis 10 | 70 mg  | -         | -         | -         | 4.6.2   |
| IEF 4   | pH-Bereich 3 bis 10 | 68 mg  | -         | -         | -         | 4.6.2   |
| IEF 5   | pH-Bereich 3 bis 10 | 60 mg  | -         | -         | -         | 4.6.3   |
| IEF 6   | pH-Bereich 4 bis 6  | 69 mg  | -         | -         | -         | 4.6.4   |
| IEF 7   | pH-Bereich 5 bis 7  | 67 mg  | -         | -         | -         | 4.6.4   |
| IEF 8   | pH-Bereich 3 bis 10 | -      | a - 76 mg | b – 80 mg | c – 77 mg | 4.6.5   |
| IEF 9   | pH-Bereich 3 bis 10 | -      | a - 61 mg | b – 61 mg | c – 65 mg | 4.6.5   |

#### 4.6.1 Grundparameter und Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Durchführung der Isoelektrische Fokussierung ist der Einsatz verschiedener Chemikalien und Aufarbeitungsschritte nötig. Um zu überprüfen ob dies die enzymatische Umwandlung des Substrats *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester durch das bisher unbekannte Enzym EH-1 beeinflussen kann, wurde der Einfluss von Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Ammoniumsulfat, Dialyse und Ampholytzugabe vor Durchführung einer IEF untersucht. Analog zu Kapitel 4.5 wurde mit der Mutante ein Zellaufschluss in T/E-Puffer durchgeführt: Dieser Puffer erwies sich als optimaler Puffer zur Untersuchung des löslichen Überstands, der in diesem Kapitel näher mittels IEF untersucht werden sollte. Zu dem Überstand (nach ZA) wurden die oben genannten Chemikalien zugesetzt oder Aufarbeitungsschritte durchgeführt.

Vor dem ZA (siehe 3.5.7) wurde PMSF als Proteaseinhibitor mit einer Endkonzentration von 0,07 mM zugesetzt, um die Proteine während der IEF vor dem Abbau durch Proteasen zu schützen. Der E/t-Quotient = 0,67 lag im Vergleich mit in Kapitel 4.5.1 untersuchten Überständen ohne PMSF-Zugabe niedrigerer (siehe Tab. 22 und Tab. 24). Somit wurde eine geringfügige Hemmung des Enzyms durch PMSF-Zugabe nachgewiesen.

Zusätzlich wurden Überstände inkubiert mit denen eine Ammoniumsulfatfällung (siehe 3.5.8) durchgeführt wurde. Die Fällung erfolgte bei 20, 40, 60 bzw. 80 %iger Ammoniumsulfatkonzentration (80 % = 0,561 mg/mL) in kleinen Portionen der Überstandprobe. Bei 20 und 40 %iger Ammoniumsulfatkonzentration ließen sich keine Proteine ausfällen, bei der 60 %igen Ammoniumsulfatkonzentration (Am60) war optisch ein deutlich geringeres Pellet wahrnehmbar als bei der 80 %igen Ammoniumsulfatkonzentration (Am80). Diese Beobachtung spiegelte sich auch in den Ergebnissen nach der Messung mittels GC/MS wieder (siehe Tab. 24). Für Am80 wurde ein E/t-Quotient = 1,13 nachgewiesen, während er für Am60 nur bei 0,81 lag. Für die Proben Am60 und Am80 wurden die Proteine aufkonzentriert, indem das nach der Fällung entstandene Pellet in halbem Volumen zum Ü PMSF aufgenommen wurde. Somit lassen sich die höheren E/t-Quotienten für die Fällungsproben im Vergleich zu Ü PMSF mit der Aufkonzentrierung erklären (siehe Tab. 24). Die Verringerung des E/t-Quotienten durch PMSF wurde somit durch die Aufkonzentrierung der Probe bei der Proteinfällung für die IEF ausgeglichen.

Mit einem Teil der Probe Am80 wurde nach der Ammoniumsulfatfällung eine Dialyse durchgeführt (siehe 3.5.9). Die Dialyse dient der Abtrennung störender Ionen aus der Ammoniumsulfatfällung vor der IEF. Da der E/t-Quotient = 0,96 (nD) vergleichbar war mit dem E/t-Quotienten = 1,13 für Am80, konnte der Einfluss der Dialyse auf die enzymatische Umwandlung des Substrats vernachlässigt werden.

Da für die Durchführung der IEF ein 2 %iger Zusatz von Ampholyten nötig ist, wurde der Einfluss von Ampholyten pH-Bereich 3 bis 10 getestet, indem sie einer Teilprobe von Ü PMSF zugesetzt wurden und parallel inkubiert wurden. Der E/t-Quotient = 0,60 war für diese Probe (Amph 3-10) nur geringfügig geringer als für Ü PMSF (siehe Tab. 24). Somit hatte die Ampholytzugabe analog zur Dialyse einen zu vernachlässigenden Einfluss auf die enzymatische Umwandlung des Substrats.

Insgesamt lässt sich also sagen, dass die Bedingungen und Vorbereitungen, die für die Durchführung einer IEF notwendig waren, nur geringfügig Einfluss auf den E/t-Quotient haben und verwendet werden können.

**Tabelle 24: Konzentrationen der gebildeten *erythro*- und *threo*-Produkte, E/t-Quotienten und pH-Werte der Inkubationsproben der *S. cerevisiae* Mutante (M) nach Zellaufschluss (ZA) in Tris/EDTA-Puffer. GZ = ganze Zellen vor Zellaufschluss, PZ = Zellfragmente, Membranbestandteile und nicht aufgeschlossene Zellen, P = Pellet. Zum Überstand wurden verschiedene Chemikalien zugesetzt, die bei der Isoelektrischen Fokussierung zugesetzt werden. Ü PMSF = Überstand mit Zusatz von Phenylmethylsulfonylfluorid als Proteaseinhibitor, Amph 3-10 = Überstand bei dem Ampholyte pH-Bereich 3 bis 10 zugesetzt wurden, Am60 bzw. Am 80 = Überstand – Fällung mit 60 %iger bzw. 80 %iger Ammoniumsulfatkonzentration und Aufkonzentrierung in Tris/EDTA-Puffer, und nD = Überstand nach Dialyse.**

| ZA M             | Konzentration in ppm   |                      |                      |                    | E/t-Quotient | pH-Wert     |
|------------------|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------|-------------|
|                  | <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> -DiOH | <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -DiOH |              |             |
| GZ               | 4,72                   | 0,00                 | 0,97                 | 0,01               | 4,81         | 7,96        |
| PZ               | 0,15                   | 0,00                 | 0,79                 | 0,00               | 0,19         | 8,74        |
| P                | 0,26                   | 0,00                 | 0,66                 | 0,00               | 0,40         | 8,82        |
| <b>Ü PMSF</b>    | <b>0,34</b>            | <b>0,00</b>          | <b>0,51</b>          | <b>0,00</b>        | <b>0,67</b>  | <b>6,59</b> |
| <b>Amph 3-10</b> | <b>0,31</b>            | <b>0,00</b>          | <b>0,52</b>          | <b>0,00</b>        | <b>0,60</b>  | <b>6,44</b> |
| <b>Am60</b>      | <b>0,21</b>            | <b>0,00</b>          | <b>0,25</b>          | <b>0,01</b>        | <b>0,81</b>  | <b>6,10</b> |
| <b>Am80</b>      | <b>0,29</b>            | <b>0,00</b>          | <b>0,25</b>          | <b>0,01</b>        | <b>1,13</b>  | <b>5,95</b> |
| nD               | 0,31                   | 0,00                 | 0,31                 | 0,02               | 0,96         | 7,36        |

Bei der IEF (siehe 3.5.11) kann eine Proteinmenge von 5 bis 500 mg aufgegeben werden. Um den Proteingehalt der Überstandproben nach Zellaufschluss (siehe 3.5.7), Ammoniumsulfatfällung (siehe 3.5.8) und Dialyse (siehe 3.5.9) vor dem Einfüllen in die IEF-Kammer zu kennen, wurde eine Bestimmung der Gesamteinkonzentration nach Bradford (siehe 3.5.10) durchgeführt. Diese Methode beruht auf einem Farbumschlag von rot nach blau, der als Zunahme der Extinktion bei 595 nm gemessen wird. Um die Proteinkonzentration der Überstandproben bestimmen zu können, wurden zu jeder IEF

Kalibrationspunkte mit Konzentrationen von 0 bis 1 mg/mL Albumin gemessen und anschließend zur Berechnung der Proteinkonzentration eine Kalibriergerade erstellt.

#### 4.6.2 ***S. cerevisiae* Mutante Proteinmenge und Ampholyte pH-Bereich 3 bis 10**

Zur Bestimmung des IEP des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 in der LTA<sub>4</sub>H deletierten *S. cerevisiae* Knockout-Mutante wurden für IEF M 1 in 10 Kolben Zellen mit den optimierten Parametern (siehe 3.5, 4.5.1 und 4.6.1) angezogen und 8 Zellaufschlüsse durchgeführt. Um eine möglichst hohe Proteinmenge bei der IEF aufzugeben, wurde das Volumen des Mediums zur Zellanzucht in den Kolben von 500 mL auf 600 mL erhöht. (600 mL stellt das maximale Fassungsvermögen des 1 L Erlenmeyerkolbens dar.) Nach 80 %iger Ammoniumsulfatfällung (siehe 3.5.8), Dialyse (siehe 3.5.9) mittels T/E-Puffer 10/5 mM und Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 3.5.10) wurde der Überstand (163 mg Protein) unter Verwendung von Ampholyten pH-Bereich 3 bis 10 in die IEF-Kammer aufgegeben und die IEF für 4 h zur Proteintrennung nach dem IEP durchgeführt. Die Inkubation und GC-SIM-MS Analyse (siehe 3.5.12 und 3.5.13) erfolgte nach pH-Wert Messung und Einstellung der IEF-Fractionen auf das Volumen der Fraktion mit dem höchsten Volumen (2 mL).

Um die Ergebnisse besser einordnen zu können und mit denen aus Kapitel 4.5.1 vergleichen zu können, wurden zusätzlich die Zellaufschlussproben inkubiert und analysiert. Die E/t-Quotienten für die Zellaufschlussproben waren vergleichbar mit denen aus Kapitel 4.5.1, so dass sie nicht weiter betrachtet wurden.

Von der IEF M 1 wurden die Fraktionen 4 bis 14 mit pH-Werten 4,21 bis 7,74 untersucht. Der maximale E/t-Quotienten = 0,77 wurde bei Fraktion 9 (pH-Wert 5,72) nachgewiesen, die Konzentration der *erythro*-Produkte (Lacton und DiOH) lag bei 0,28 ppm und die der *threo*-Produkte (Lacton und DiOH) bei 0,36 ppm (siehe Tab. 25).

Insgesamt lag der E/t-Quotient > 0,5 in 4 Fraktionen (Fraktionen 8 bis 11) und in 7 Fraktionen > 0,40 (Fraktionen 7 bis 13). Bei den Fraktionen 4, 5, 6 und 14 wurden E/t-Quotienten < 0,35 nachgewiesen. Die höchste Konzentration für das *erythro*-Lacton (0,31 ppm) und für das *threo*-Lacton (0,47 ppm) wurden in Fraktion 11 (pH-Wert 6,62) nachgewiesen. *Erythro*-DiOH konnte nicht nachgewiesen werden, während die höchste Konzentration für *threo*-DiOH (0,56 ppm) in Fraktion 4 (pH-Wert 4,21) mit dem niedrigsten pH-Wert bestimmt wurde. Die E/t-Quotienten und Konzentrationen der *erythro*- bzw. der *threo*-Produkte aller untersuchten Fraktionen sind in Tabelle 25 aufgeführt.

Mit IEF M1 konnte der IEP des bisher unbekanntes Enzyms EH-1, über die Fraktionen 7 bis 13 (E/t-Quotient > 0,40), auf einen pH-Bereich 4,92 bis 7,48 eingegrenzt werden. Dabei gab es keine scharfe Trennung der Fraktionen mit hohem und mit niedrigem E/t-Quotienten. Möglicherweise reichte die Trennleistung der Isoelektrischen Fokussierung für eine Gesamtproteinmenge von 163 mg nicht aus.

**Tabelle 25: Konzentrationen der gebildeten *erythro*- und *threo*-Produkte, E/t-Quotienten und pH-Werte der IEF-Fraktionen der *S. cerevisiae* Mutante (Proteinmenge 163 mg) nach Isoelektrischer Fokussierung IEF M 1 (Ampholyte pH-Bereich 3 bis 10).**

| IEF M 1           | Konzentration in ppm   |                      |                      |                    | E/t-Quotient | pH-Wert     |
|-------------------|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------|-------------|
|                   | <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> -DiOH | <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -DiOH |              |             |
| Fraktion 4        | 0,06                   | 0,00                 | 0,26                 | 0,56               | 0,07         | 4,21        |
| Fraktion 5        | 0,06                   | 0,00                 | 0,21                 | 0,28               | 0,12         | 4,50        |
| Fraktion 6        | 0,14                   | 0,00                 | 0,27                 | 0,23               | 0,28         | 4,68        |
| Fraktion 7        | 0,18                   | 0,00                 | 0,22                 | 0,19               | 0,44         | 4,92        |
| Fraktion 8        | 0,16                   | 0,00                 | 0,13                 | 0,12               | 0,66         | 5,43        |
| <b>Fraktion 9</b> | <b>0,28</b>            | <b>0,00</b>          | <b>0,26</b>          | <b>0,10</b>        | <b>0,77</b>  | <b>5,72</b> |
| Fraktion 10       | 0,29                   | 0,00                 | 0,28                 | 0,11               | 0,76         | 6,31        |
| Fraktion 11       | 0,31                   | 0,00                 | 0,47                 | 0,07               | 0,57         | 6,62        |
| Fraktion 12       | 0,21                   | 0,00                 | 0,42                 | 0,03               | 0,48         | 7,07        |
| Fraktion 13       | 0,17                   | 0,00                 | 0,35                 | 0,00               | 0,49         | 7,48        |

Um eine scharfe Trennung der Fraktionen mit hohem und mit niedrigem E/t-Quotienten zu erreichen und damit eine Eingrenzung des IEP auf einen schmalen pH-Bereich zu erzielen, wurde bei IEF M 2 mit verringerter Kolbenanzahl bei der Zellanzucht gearbeitet (6 Kolben anstelle von 10 Kolben mit 6 Zellaufschlüssen). Alle anderen Parameter wurden analog zu IEF M 1 gewählt.

Mit einer Gesamtproteinmenge von 104 mg wurde eine IEF (4 h) durchgeführt (Ampholyte pH-Bereich 3 bis 10). Danach wurde der pH-Wert der IEF-Fraktionen (ohne Fraktion 9, die kein Volumen enthielt) gemessen, das Volumen auf 2 mL eingestellt und die Fraktionen inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die GC-SIM-MS Analyse.

Von der IEF M 2 wurden die Fraktionen 5 bis 14 mit pH-Werten 4,26 bis 7,50 untersucht. Der Verlauf für die E/t-Quotienten der Fraktionen entsprach bei IEF M 2 dem Verlauf von IEF M 1 (siehe Abb. 34).

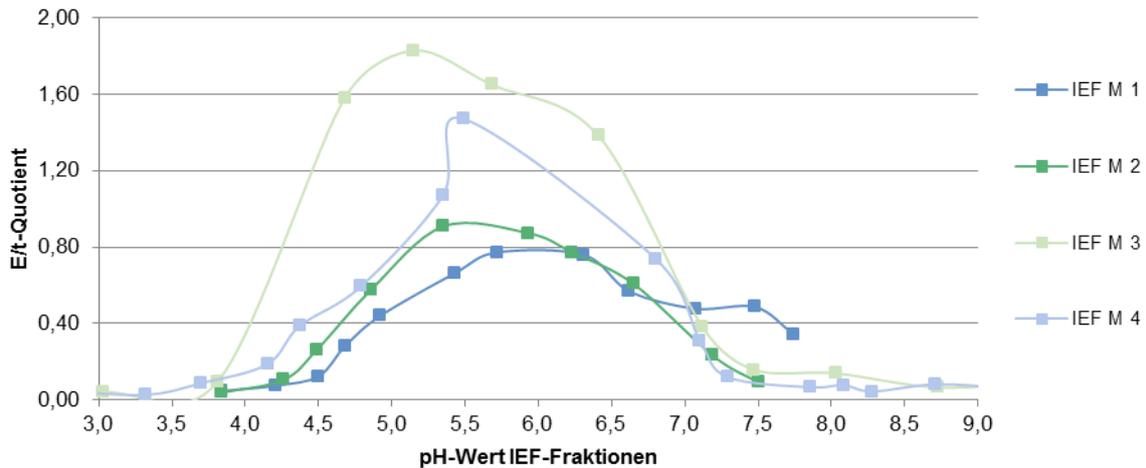


Abbildung 34: E/t-Quotienten und pH-Werte der IEF-Fractionen der *S. cerevisiae* Mutante nach Isoelektrischer Fokussierung mit Ampholyten pH-Bereich 3 bis 10. Dabei wurden verschiedene Proteinmengen eingesetzt: IEF M 1 - 163 mg, IEF M 2 104 mg, IEF M 3 70 mg und IEF M 4 – 68 mg.

Der maximale E/t-Quotienten = 0,91 lag bei Fraktion 8 (pH-Wert 5,35), und somit höher als bei IEF M 1 (E/t-Quotient = 0,77). Die Konzentration der *erythro*-Produkte lag bei 0,26 ppm und die der *threo*-Produkte bei 0,28 ppm (siehe Tab. 26).

Tabelle 26: Konzentrationen der gebildeten *erythro*- und *threo*-Produkte, E/t-Quotienten und pH-Werte der IEF-Fractionen der *S. cerevisiae* Mutante (Proteinmenge 104 mg) nach Isoelektrischer Fokussierung IEF M 2 (Ampholyte pH-Bereich 3 bis 10).

| IEF M 2           | Konzentration in ppm   |                      |                      |                    | E/t-Quotient | pH-Wert     |
|-------------------|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------|-------------|
|                   | <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> -DiOH | <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -DiOH |              |             |
| Fraktion 5        | 0,05                   | 0,00                 | 0,17                 | 0,29               | 0,10         | 4,26        |
| Fraktion 6        | 0,07                   | 0,00                 | 0,17                 | 0,09               | 0,26         | 4,49        |
| Fraktion 7        | 0,13                   | 0,00                 | 0,16                 | 0,06               | 0,58         | 4,86        |
| <b>Fraktion 8</b> | <b>0,26</b>            | <b>0,00</b>          | <b>0,22</b>          | <b>0,06</b>        | <b>0,91</b>  | <b>5,35</b> |
| Fraktion 10       | 0,25                   | 0,00                 | 0,23                 | 0,05               | 0,87         | 5,93        |
| Fraktion 11       | 0,25                   | 0,00                 | 0,30                 | 0,02               | 0,77         | 6,23        |
| Fraktion 12       | 0,17                   | 0,00                 | 0,28                 | 0,00               | 0,61         | 6,65        |
| Fraktion 13       | 0,17                   | 0,00                 | 0,73                 | 0,00               | 0,23         | 7,19        |
| Fraktion 14       | 0,11                   | 0,00                 | 1,21                 | 0,00               | 0,09         | 7,50        |

Damit waren die Konzentrationen der *erythro*-Produkte vergleichbar mit IEF M 1, während die Konzentrationen der *threo*-Produkte verringert waren. Die Konzentration des *erythro*-

Lactons (0,26 ppm) war die höchste bestimmte Konzentration von allen untersuchten IEF-Fraktionen. Mit IEF M 2 konnte eine schärfere Trennung zwischen den Fraktionen mit hohem und mit niedrigem E/t-Quotienten erreicht werden. Bei IEF M 2 hatten nur noch 5 Fraktionen (Fraktionen 7 bis 12) einen E/t-Quotienten  $> 0,40$  (siehe Tab. 26).

Bei IEF M1 waren es noch 7 Fraktionen. Bei den Fraktionen 5, 6, 13 und 14 wurden E/t-Quotienten  $< 0,30$  nachgewiesen. Die höchste Konzentration für das *threo*-Lacton (1,21ppm) wurde in der Fraktion mit dem höchsten pH-Wert nachgewiesen (Fraktion 14 - pH-Wert 7,50) und die höchste Konzentration (0,29 ppm) für *threo*-DiOH in der Fraktion mit dem niedrigsten pH-Wert (Fraktion 5 - pH-Wert 4,26). Die E/t-Quotienten und Konzentrationen der *erythro*- bzw. der *threo*-Produkte aller untersuchten Fraktionen sind in Tabelle 26 aufgeführt.

Der IEP konnte mit IEF M 2 über die Fraktionen 7 bis 12 mit einem E/t-Quotienten über 0,55 auf einen pH-Bereich 4,86 bis 6,23 weiter eingegrenzt werden.

Da die Verringerung der Proteinmenge bei der IEF zu einer schärferen Trennung der Fraktionen mit hohem und mit niedrigem E/t-Quotienten führte, wurde bei IEF M 3 die Anzahl der Kolben bei der Zellanzucht weiter verringert (von 6 Kolben auf 4 Kolben mit 4 Zellausschlüssen). Damit sollte die Trennung noch deutlicher zu erkennen sein und somit der IEP auf einen schmalen pH-Bereich eingegrenzt werden können. Bei der IEF M 3 wurden 70 mg eingesetzt. (Bedingungen waren analog zu IEF M 1 und IEF M 2).

Bei IEF M 2 wurde die höchste Konzentration für das *threo*-Lacton in der Fraktion mit dem höchsten pH-Wert 7,50 nachgewiesen und die höchste Konzentration für die *threo*-DiOH in der Fraktion mit dem niedrigsten pH-Wert 4,26. Deshalb wurden bei IEF M 3 die Fraktionen 5 bis 16 mit pH-Werten 3,03 bis 9,51 inkubiert, um einen breiteren pH-Bereich abzudecken.

Der Verlauf für die E/t-Quotienten der Fraktionen entsprach bei IEF M 3 dem Verlauf von IEF M 1 bzw. IEF M 2 (siehe Abb. 34). Der maximale E/t-Quotienten = 1,83 lag bei Fraktion 9 (pH-Wert 5,15) und war somit doppelt so hoch wie als bei IEF M 2 (E/t-Quotient = 0,91). Die Konzentration der *erythro*-Produkte lag bei 0,19 ppm und die der *threo*-Produkte bei 0,10 ppm (siehe Tab. 27).

Die Trennung zwischen den Fraktionen mit hohem und mit niedrigem E/t-Quotienten war im Vergleich zu IEF M 2 noch schärfer. Es gab dabei 4 Fraktionen (Fraktionen 8 bis 11) mit einem E/t-Quotienten  $> 1,35$ . Für alle anderen Fraktionen lag der E/t-Quotienten  $< 0,40$  (siehe Tab. 27). Die höchste Konzentration für das *erythro*-Lacton (0,31 ppm) wurde in Fraktion 10 (pH-Wert 5,68) nachgewiesen, die höchste Konzentration für das *threo*-Lacton (1,25 ppm) wurde in Fraktion 15 (pH-Wert 8,73) nachgewiesen und die höchste Konzentration (1,86 ppm) für *threo*-DiOH in Fraktion 5 (pH-Wert 3,03). Dabei konnte für die *threo*-DiOH wieder die höchste Konzentration in der Fraktion mit dem niedrigsten pH-Wert bestimmt werden, während die Konzentration für das *threo*-Lacton in Fraktion 16 (pH-Wert 9,51) mit 0,84 ppm niedriger war als bei Fraktion 15 (pH-Wert 8,73). Die E/t-Quotienten und

Konzentrationen der *erythro*- bzw. der *threo*-Produkte aller untersuchten Fraktionen sind in Tabelle 27 aufgeführt

**Tabelle 27: Konzentrationen der gebildeten *erythro*- und *threo*-Produkte, E/t-Quotienten und pH-Werte der IEF-Fractionen der *S. cerevisiae* Mutante (Proteinmenge 70 mg) nach Isoelektrischer Fokussierung IEF M 3 (Ampholyte pH-Bereich 3 bis 10).**

| IEF M 3           | Konzentration in ppm   |                      |                      |                    | E/t-Quotient | pH-Wert     |
|-------------------|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------|-------------|
|                   | <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> -DiOH | <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -DiOH |              |             |
| Fraktion 5        | 0,08                   | 0,00                 | 0,34                 | 1,86               | 0,04         | 3,03        |
| Fraktion 6        | 0,08                   | 0,00                 | 0,16                 | 0,7                | 0,09         | 3,81        |
| Fraktion 8        | 0,18                   | 0,00                 | 0,1                  | 0,01               | 1,58         | 4,68        |
| <b>Fraktion 9</b> | <b>0,19</b>            | <b>0,00</b>          | <b>0,09</b>          | <b>0,01</b>        | <b>1,83</b>  | <b>5,15</b> |
| Fraktion 10       | 0,32                   | 0,00                 | 0,18                 | 0,01               | 1,65         | 5,68        |
| Fraktion 11       | 0,31                   | 0,00                 | 0,22                 | 0,01               | 1,38         | 6,41        |
| Fraktion 12       | 0,17                   | 0,00                 | 0,44                 | 0,00               | 0,38         | 7,12        |
| Fraktion 13       | 0,09                   | 0,00                 | 0,57                 | 0,00               | 0,16         | 7,47        |
| Fraktion 14       | 0,12                   | 0,00                 | 0,87                 | 0,00               | 0,14         | 8,03        |
| Fraktion 15       | 0,08                   | 0,00                 | 1,25                 | 0,00               | 0,06         | 8,73        |
| Fraktion 16       | 0,08                   | 0,00                 | 0,84                 | 0,00               | 0,10         | 9,51        |

Mit IEF M3 konnte eine scharfe Trennung der Fraktionen mit hohem und mit niedrigem E/t-Quotienten erreicht werden. Der pH-Bereich des IEP für die Fraktionen 8 bis 11 mit einem hohen E/t-Quotienten (> 1,35) lag zwischen pH-Wert 4,68 und 6,41 und war somit mit dem pH-Bereich für den IEP vergleichbar, der bei IEF M 2 eingegrenzt wurde.

Um die Ergebnisse bestätigen zu können, und den pH-Bereich für den IEP des bisher unbekanntes Enzyms besser einzugrenzen zu können, wurde mit IEF M 4 analog zu IEF M 3 bei der Zellanzucht 4 Kolben verwendet und anschließend 4 Zellaufschlüsse durchgeführt. 68 mg Protein wurden unter den gleichen Bedingungen mittels IEF fraktioniert, der pH-Wert gemessen und ein Volumen von 1,75 mL eingestellt. Die Fraktionen 1 bis 15 (pH-Wert 3,32 bis 9,19) wurden inkubiert und mittels GC-SIM-MS analysiert.

Der Verlauf für die E/t-Quotienten in den Fraktionen im pH-Bereich des IEP lag zwischen denen von IEF M 2 und IEF M 3 (siehe Abb. 34). Analog zu IEF M 3 ein E/t-Quotient > 0,5 in

4 Fraktionen (Fraktion 6 bis 9) nachgewiesen. Alle anderen Fraktionen haben einen E/t-Quotienten < 0,4. Der maximale E/t-Quotient = 1,47 lag bei Fraktion 8 (pH-Wert 5,49) mit einer Konzentration der *erythro*-Produkte (nur *erythro*-Lacton) von 0,19 ppm. Dies war die höchste Konzentration aller IEF-Fraktionen. Die Konzentration der *threo*-Produkte betrug bei Fraktion 8 0,13 ppm (siehe Tab. 28).

**Tabelle 28: Konzentrationen der gebildeten *erythro*- und *threo*-Produkte, E/t-Quotienten und pH-Werte der IEF-Fraktionen der *S. cerevisiae* Mutante (Proteinmenge 68 mg) nach Isoelektrischer Fokussierung IEF M 4 (Ampholyte pH-Bereich 3 bis 10).**

| IEF M 4           | Konzentration in ppm   |                      |                      |                    | E/t-Quotient | pH-Wert     |
|-------------------|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------|-------------|
|                   | <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> -DiOH | <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -DiOH |              |             |
| Fraktion 2        | 0,05                   | 0,00                 | 0,35                 | 1,56               | 0,03         | 3,32        |
| Fraktion 3        | 0,04                   | 0,00                 | 0,13                 | 0,11               | 0,19         | 3,70        |
| Fraktion 4        | 0,06                   | 0,00                 | 0,30                 | 0,34               | 0,09         | 4,15        |
| Fraktion 5        | 0,06                   | 0,00                 | 0,10                 | 0,06               | 0,39         | 4,37        |
| Fraktion 6        | 0,08                   | 0,00                 | 0,09                 | 0,05               | 0,59         | 4,79        |
| Fraktion 7        | 0,16                   | 0,00                 | 0,15                 | 0,00               | 1,07         | 5,35        |
| <b>Fraktion 8</b> | <b>0,19</b>            | <b>0,00</b>          | <b>0,13</b>          | <b>0,00</b>        | <b>1,47</b>  | <b>5,49</b> |
| Fraktion 9        | 0,19                   | 0,00                 | 0,25                 | 0,00               | 0,74         | 6,80        |
| Fraktion 10       | 0,16                   | 0,00                 | 0,51                 | 0,01               | 0,31         | 7,10        |
| Fraktion 11       | 0,06                   | 0,00                 | 0,53                 | 0,00               | 0,12         | 7,29        |
| Fraktion 12       | 0,06                   | 0,00                 | 0,86                 | 0,00               | 0,06         | 7,86        |
| Fraktion 13       | 0,10                   | 0,00                 | 1,30                 | 0,00               | 0,08         | 8,08        |
| Fraktion 14       | 0,04                   | 0,00                 | 0,95                 | 0,00               | 0,04         | 8,28        |
| Fraktion 15       | 0,07                   | 0,00                 | 0,89                 | 0,00               | 0,08         | 8,71        |
| Fraktion 16       | 0,04                   | 0,00                 | 0,71                 | 0,00               | 0,06         | 9,19        |

Die höchste Konzentration für das *threo*-Lacton (1,30 ppm) wurde in Fraktion 13 (pH-Wert 8,08) nachgewiesen und die höchste Konzentration (1,56 ppm) für die *threo*-DiOH in Fraktion 2 (pH-Wert 3,32). Dabei konnte für die *threo*-DiOH wie in allen vorherigen IEF die höchste

Konzentration in der Fraktion mit dem niedrigsten pH-Wert bestimmt werden, während die Konzentration für das *threo*-Lacton in Fraktion 13 (pH-Wert 8,08) dem höchsten lag und anschließend für die Fraktionen 14 bis 19 (pH-Werte 8,28 bis 9,19) wieder stetig abnahm (siehe Tab. 28).

Somit konnte die Beobachtung aus IEF M 3 bestätigt werden. Die E/t-Quotienten und Konzentrationen der *erythro*- bzw. der *threo*-Produkte aller untersuchten Fraktionen sind in Tabelle 28 aufgeführt

Der IEP konnte bei IEF M 4 auf den pH-Bereich 4,79 bis 6,80 durch die Fraktionen 6 bis 9 mit hoher E/t-Quotienten  $> 0,5$  eingegrenzt werden und war vergleichbar mit dem pH-Bereich bei IEF M2 und IEF M 3.

### Zusammenfassung:

- Eine Verringerung der Proteinmenge von ca. 160 mg (IEF M 1) bzw. ca. 100 mg (IEF M 2) auf ca. 70 mg (IEF M 2 und IEF M 4) führte zu einer besseren Trennung der Fraktionen mit hohem und mit niedrigem E/t-Quotienten.
- Der IEP des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 konnte mit den Fraktionen, die einen E/t-Quotienten  $> 0,5$  haben auf einen pH-Bereich von 4,68 bis 6,80 eingegrenzt werden.
- Die Konzentration des *erythro*-Lactons war in der Fraktion mit dem höchsten E/t-Quotienten (IEF M 2 und IEF M 4) am höchsten. Bei IEF M 3 bzw. IEF M 1 lag die höchste Konzentration des *erythro*-Lactons in der Fraktion vor, die um 0,5 bzw. 0,9 pH-Einheiten höher lag als die Fraktion mit dem maximalen E/t-Quotienten.
- Die Konzentration des *threo*-Lactons nahm in allen IEF mit steigendem pH-Wert stetig zu und war in der Fraktion mit einem pH-Wert ca. 8,5 am höchsten. In Fraktionen mit pH-Werten  $> 8,5$  nahm die Konzentration für das *threo*-Lacton wieder ab. Im sehr niedrigen sauren pH-Bereich lag ebenfalls eine hohe Konzentration des *threo*-Lactons vor. Dies deckte sich mit den Ergebnissen zur Bestimmung des pH-Optimums (siehe 4.4.3 und 4.4.4).
- Die Konzentration der *threo*-DiOH war bei allen IEF in der Fraktion mit dem niedrigsten pH-Wert am höchsten und nahm mit steigendem pH-Wert, analog zu den Versuchen zur Bestimmung des pH-Optimums (siehe 4.4.3 und 4.4.4), stetig ab.

#### 4.6.3 *S. cerevisiae* Mutante pH-Wert Einstellung

Nachdem in Kapitel 4.6.2 die optimale Proteinmenge für die erfolgreiche Durchführung einer IEF bestimmt werden konnte, sollte in diesem Kapitel mit IEF M 5 untersucht werden, ob mit einer pH-Werteinstellung der IEF-Fractionen auf das pH-Optimum von EH-1 (in Tris/EDTA-Puffer (pH-Wert ca. 8,0 - siehe 4.4.4), eine Erhöhung der E/t-Quotienten erzielt werden kann. Die Bedingungen wurden analog zu IEF M 3, mit dem bisher höchsten E/t-Quotienten für eine IEF-Fraktion von 1,83 (pH-Wert 5,15) gewählt. Die bei der IEF eingesetzte Proteinmenge lag mit 60 mg geringfügig unterhalb der bei IEF M 3 (70 mg). Nach der IEF wurde der pH-Wert der Fraktionen 4 bis 15 (pH-Wert 3,87 bis 9,30) gemessen, anschließend wurden 500 µL entnommen und direkt inkubiert (IEF M 5) und bei weiteren 500 µL jeder Fraktion vor der Inkubation mittels einiger Tropfen NaOH (5 M) bzw. HCl (5 M) ein pH-Wert ca. 8,0 eingestellt (IEF M 5 pH-Wert 8).

Der Verlauf für die E/t-Quotienten war für beide Versuchsreihen vergleichbar (siehe Abb. 35). Die Fraktion mit dem maximalen E/t-Quotienten bei der Versuchsreihe der Proben, bei denen der pH-Wert auf 8,0 eingestellt wurde, war um eine Fraktion nach oben verschoben. Für die direkt inkubierten Proben (IEF M 5) lag der maximale E/t-Quotienten = 0,67 bei Fraktion 7 (pH-Wert 5,59) und für die auf pH-Wert 8 eingestellten Proben (IEF M5 pH-Wert 8) lag der maximale E/t-Quotient = 0,71 bei Fraktion 8 (pH-Wert 6,21). Die geringeren maximalen E/t-Quotienten im Vergleich zu IEF M 3 ergaben sich möglicherweise aus der Lagerung dieses Überstandes zwischen Dialyse und IEF (4 Wochen / - 20 °C). Dies könnte zu einem Verlust der Wirkungsweise des Enzyms EH-1 geführt haben.

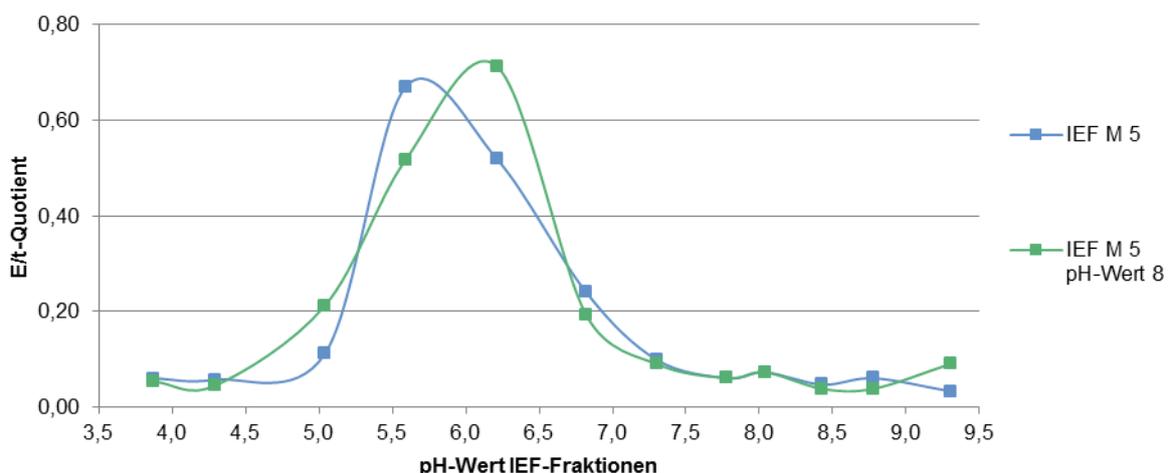


Abbildung 35: E/t-Quotienten und pH-Werte der IEF-Fractionen der *S. cerevisiae* Mutante nach Isoelektrischer Fokussierung (Ampholyte pH-Bereich 3 bis 10). Dabei wurden die IEF-Fractionen einmal direkt verwendet (IEF M 5) und auf das pH-Optimum des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 eingestellt (IEF M 5 pH-Wert 8).

Zum Vergleich sind die Konzentrationen der *erythro-* und *threo-*Produkte der direkt verwendeten Fraktionen (IEF M 5) und der Proben nach pH-Wert Einstellung (IEF M5 pH-Wert 8) in Tabelle 29 zusammen gestellt.

**Tabelle 29: Konzentrationen der gebildeten *erythro-* und *threo-*Produkte, E/t-Quotienten und pH-Werte der IEF-Fraktionen der *S. cerevisiae* Mutante (Proteinmenge 60 mg) nach Isoelektrischer Fokussierung mit Ampholyten pH-Bereich 3 bis 10. Dabei wurden die IEF-Fraktionen einmal direkt verwendet (IEF M 5) und einmal auf das pH-Optimum des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 eingestellt (IEF M 5 pH-Wert 8).**

|         |             | IEF M 5                |                      |                    |             | IEF M 5 pH-Wert 8    |                        |                      |                    |             |
|---------|-------------|------------------------|----------------------|--------------------|-------------|----------------------|------------------------|----------------------|--------------------|-------------|
|         |             | Konzentration in ppm   |                      |                    |             | Konzentration in ppm |                        |                      |                    |             |
| IEF-Fr. | pH-Wert     | <i>erythro-</i> Lacton | <i>threo-</i> Lacton | <i>threo-</i> DiOH | E/t-Q       | pH-Wert              | <i>erythro-</i> Lacton | <i>threo-</i> Lacton | <i>threo-</i> DiOH | E/t-Q       |
| 4       | 3,87        | 0,09                   | 0,09                 | 2,01               | 0,04        | 7,76                 | 0,04                   | 0,48                 | 0,29               | 0,05        |
| 5       | 4,29        | 0,09                   | 0,04                 | 1,48               | 0,06        | 7,97                 | 0,06                   | 1,14                 | 0,15               | 0,04        |
| 6       | 5,04        | 0,08                   | 0,05                 | 0,63               | 0,11        | 8,16                 | 0,21                   | 0,94                 | 0,06               | 0,21        |
| 7       | <b>5,59</b> | <b>0,22</b>            | <b>0,14</b>          | <b>0,19</b>        | <b>0,67</b> | 7,87                 | 0,30                   | 0,50                 | 0,08               | 0,52        |
| 8       | 6,21        | 0,20                   | 0,19                 | 0,19               | 0,52        | <b>8,11</b>          | <b>0,39</b>            | <b>0,50</b>          | <b>0,04</b>        | <b>0,71</b> |
| 9       | 6,82        | 0,15                   | 0,24                 | 0,38               | 0,24        | 8,10                 | 0,19                   | 0,90                 | 0,08               | 0,19        |
| 10      | 7,30        | 0,08                   | 0,48                 | 0,38               | 0,10        | -                    | -                      | -                    | -                  | -           |
| 11      | 7,78        | 0,07                   | 0,96                 | 0,17               | 0,06        | -                    | -                      | -                    | -                  | -           |
| 12      | 8,04        | 0,08                   | 0,96                 | 0,08               | 0,07        | -                    | -                      | -                    | -                  | -           |
| 13      | 8,43        | 0,07                   | 1,27                 | 0,13               | 0,05        | 8,14                 | 0,05                   | 1,27                 | 0,09               | 0,04        |
| 14      | 8,78        | 0,09                   | 1,46                 | 0,01               | 0,06        | 8,17                 | 0,07                   | 1,75                 | 0,14               | 0,04        |
| 15      | 9,30        | 0,09                   | 1,30                 | 0,00               | 0,06        | 8,10                 | 0,09                   | 1,46                 | 0,00               | 0,06        |

Die Konzentrationen des *erythro*-Lactons waren in den Proben, bei denen pH-Wert 8 eingestellt wurde, wie schon bei den Versuchen zum pH-Optimum zu beobachten war (siehe 4.4.4), insgesamt höher. Da aber auch die Summe der *threo*-Produkte höher war, waren die E/t-Quotienten insgesamt mit den Proben die direkt inkubiert wurden vergleichbar.

Für die Fraktionen 4 bis 9 lagen für die Proben mit eingestelltem pH-Wert (IEF M 5 pH-Wert 8) die Konzentrationen der *threo*-DiOH niedriger als in den IEF-Fraktionen die direkt verwendet wurden (IEF M5). Für die Konzentrationen des *threo*-Lactons war dies umgekehrt. Im Alkalischen, ab Fraktion 10, nahm die Konzentration des *threo*-Lactons mit steigendem

pH-Wert zu. Bei Fraktion 15 nahm für beide Probenreihen die Konzentration des *threo*-Lactons wieder ab. Diese Beobachtung und den Ergebnissen zu den ersten Versuchen der IEF (siehe 4.7.3).

Insgesamt konnte anhand der vergleichbaren E/t-Quotienten für beide Probenreihen gezeigt werden, dass die pH-Werteinstellung der IEF-Fractionen auf das pH-Optimum des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 nur einen geringfügigen Einfluss auf die enzymatische Umwandlung des Substrats hat. In den folgenden Versuchen wurde weiter mit den IEF-Fractionen ohne pH-Werteinstellung gearbeitet. Insgesamt konnte bei IEF M 5 der IEP auf einen pH-Bereich 5,59 bis 6,21, durch die beiden Fractionen 7 und 8 mit einem E/t-Quotienten > 0,5, eingegrenzt werden.

#### 4.6.4 *S. cerevisiae* Mutante Ampholyte pH-Bereich 4 bis 6 und 5 bis 7

In Kapitel 4.7.3 konnte mit ca. 70 mg die optimale Proteinmenge für die IEF bestimmt werden. Weiter konnte unter Verwendung von Ampholyten (pH-Bereich 3 bis 10) der IEP des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 mit Hilfe der IEF M 1 bis 5 auf einen pH-Bereich 4,68 bis 6,80 eingegrenzt werden. Mit Ampholyten, die im pH-Bereich des bisher ermittelten IEP arbeiten, sollte in diesem Kapitel der IEP weiter auf einen schmaleren Bereich eingegrenzt werden. Bei IEF M 6 wurden Ampholyte pH-Bereich 4 bis 6 und bei IEF M 7 Ampholyte pH-Bereich 5 bis 7 verwendet. Bei beiden Versuchen wurden die Bedingungen analog zu IEF M 3 gewählt. Bei der Zellanzucht wurden 4 Kolben mit anschließend 4 Zellaufschlüssen eingesetzt. Nach Ammoniumsulfatfällung und Dialyse wurden mit 69 mg (IEF M 6) bzw. 67 mg (IEF M 7) Protein die IEF (4 h) durchgeführt. Bei den zur Inkubation und GC-SIM-MS Analyse verwendeten IEF-Fractionen wurde der pH-Wert gemessen und das Volumen Versuchen auf etwa 1,75 mL eingestellt.

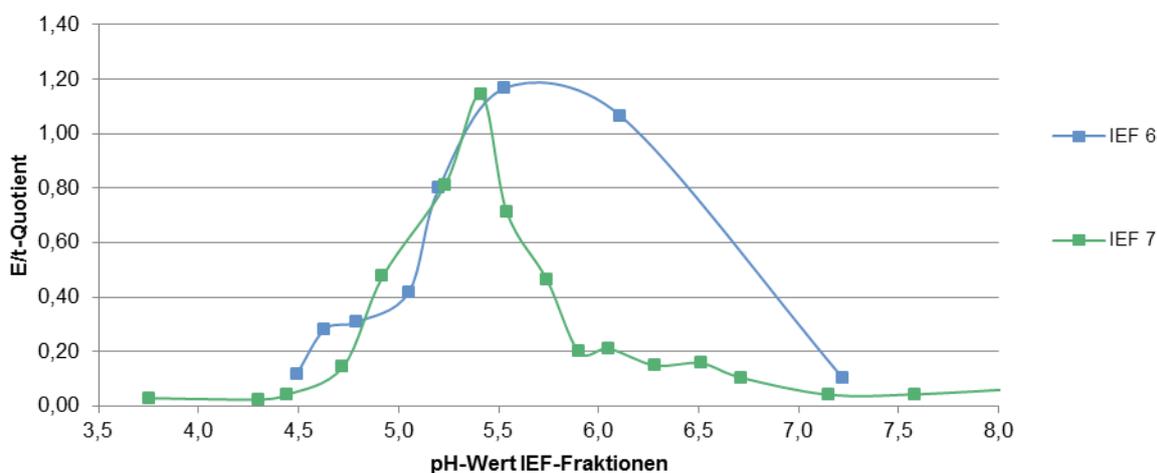


Abbildung 36: E/t-Quotienten und pH-Werte der IEF-Fractionen der *S. cerevisiae* Mutante nach Isoelektrischer Fokussierung Dabei wurden verschiedene Ampholyte eingesetzt: IEF M 6 - pH-Bereich 4 bis 6, IEF M 7 - pH-Bereich 5 bis 7.

Die Verläufe für die E/t-Quotienten in den Fraktionen der IEF M 6 und IEF M 7 war vergleichbar mit denen unter Verwendung der Ampholyte pH-Bereich 3 bis 10 (siehe Abb. 34 und Abb. 36).

Bei IEF M 6 wurden die Fraktionen 11 bis 18 (pH-Wert 4,49 bis 7,22) untersucht. Dabei wurden in 3 Fraktionen (Fraktion 15 bis 17) ein E/t-Quotient  $> 0,8$  nachgewiesen. Alle anderen Fraktionen hatten einen E/t-Quotienten  $< 0,45$  (siehe Tab. 30).

**Tabelle 30: Konzentrationen der gebildeten erythro- und threo-Produkte, E/t-Quotienten und pH-Werte der IEF-Fraktionen der *S. cerevisiae* Mutante (Proteinmenge 69 mg) nach Isoelektrischer Fokussierung IEF M 6 (Ampholyte pH-Bereich 4 bis 6).**

| IEF M 6            | Konzentration in ppm   |                      |                      |                    | E/t-Quotient | pH-Wert     |
|--------------------|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------|-------------|
|                    | <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> -DiOH | <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -DiOH |              |             |
| Fraktion 11        | 0,06                   | 0,00                 | 0,24                 | 0,28               | 0,12         | 4,49        |
| Fraktion 12        | 0,14                   | 0,00                 | 0,24                 | 0,25               | 0,28         | 4,63        |
| Fraktion 13        | 0,16                   | 0,00                 | 0,27                 | 0,24               | 0,31         | 4,79        |
| Fraktion 14        | 0,23                   | 0,00                 | 0,36                 | 0,18               | 0,42         | 5,05        |
| Fraktion 15        | 0,38                   | 0,00                 | 0,34                 | 0,13               | 0,80         | 5,20        |
| <b>Fraktion 16</b> | <b>0,42</b>            | <b>0,00</b>          | <b>0,22</b>          | <b>0,13</b>        | <b>1,17</b>  | <b>5,53</b> |
| Fraktion 17        | 0,32                   | 0,00                 | 0,25                 | 0,05               | 1,06         | 6,11        |
| Fraktion 18        | 0,14                   | 0,00                 | 1,32                 | 0,04               | 0,10         | 7,22        |

Damit konnte analog zu IEF M 3 eine scharfe Trennung zwischen den Fraktionen mit hohem und mit niedrigem E/t-Quotienten erzielt werden. Der maximale E/t-Quotient = 1,17 lag bei Fraktion 16 (pH-Wert 5,53) mit einer Konzentration der *erythro*-Produkte (nur Lacton) von 0,42 ppm. Dies war die höchste Konzentration aller IEF-Fraktionen und die Konzentration lag auch höher als bei allen IEF Ampholyte 3 bis 10.

Die Konzentration der *threo*-Produkte (Lacton und DiOH) betrug bei Fraktion 16 0,35 ppm (siehe Tab. 30). Die höchste Konzentration für das *threo*-Lacton (1,30 ppm) wurde in Fraktion 18 (pH-Wert 7,22) nachgewiesen und die höchste Konzentration (0,28 ppm) für die *threo*-DiOH in Fraktion 11 (pH-Wert 4,49). Dabei konnte für die *threo*-DiOH wie in allen vorherigen IEF (Ampholyte 3 bis 10) die höchste Konzentration in der Fraktion mit dem niedrigsten pH-Wert bestimmt werden. Bei dieser IEF wurde die Konzentration für das *threo*-Lacton in der Fraktion mit dem höchsten untersuchten pH-Wert nachgewiesen. (siehe Tab.

30). Die E/t-Quotienten und Konzentrationen der *erythro*- bzw. der *threo*-Produkte aller untersuchten Fraktionen sind in Tabelle 30 aufgeführt. Der pH-Bereich für den IEP lag bei IEF M 6 vergleichbar mit den vorherigen Versuchen im pH-Bereich 5,20 bis 6,11.

Bei IEF M 7 wurden die Fraktionen 3 bis 18 (pH-Wert 4,30 bis 8,14) untersucht. Analog zu IEF M 6 der Mutante, wurde auch hier in 3 Fraktionen (Fraktion 7 bis 9) ein E/t-Quotient > 0,7 nachgewiesen (siehe Tab. 31).

**Tabelle 31: Konzentrationen der gebildeten *erythro*- und *threo*-Produkte, E/t-Quotienten und pH-Werte der IEF-Fraktionen der *S. cerevisiae* Mutante (Proteinmenge 67 mg) nach Isoelektrischer Fokussierung IEF M 7 (Ampholyte pH-Bereich 5 bis 7).**

| IEF M 7           | Konzentration in ppm   |                      |                      |                    | E/t-Quotient | pH-Wert     |
|-------------------|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------|-------------|
|                   | <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> -DiOH | <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -DiOH |              |             |
| Fraktion 3        | 0,03                   | 0,00                 | 0,50                 | 0,55               | 0,02         | 4,30        |
| Fraktion 4        | 0,03                   | 0,00                 | 0,34                 | 0,35               | 0,04         | 4,44        |
| Fraktion 5        | 0,06                   | 0,00                 | 0,28                 | 0,16               | 0,14         | 4,72        |
| Fraktion 6        | 0,12                   | 0,00                 | 0,14                 | 0,10               | 0,48         | 4,92        |
| Fraktion 7        | 0,15                   | 0,00                 | 0,16                 | 0,02               | 0,81         | 5,23        |
| <b>Fraktion 8</b> | <b>0,24</b>            | <b>0,00</b>          | <b>0,12</b>          | <b>0,09</b>        | <b>1,14</b>  | <b>5,41</b> |
| Fraktion 9        | 0,12                   | 0,00                 | 0,14                 | 0,03               | 0,71         | 5,54        |
| Fraktion 10       | 0,08                   | 0,00                 | 0,14                 | 0,03               | 0,46         | 5,90        |
| Fraktion 11       | 0,03                   | 0,00                 | 0,14                 | 0,03               | 0,20         | 6,05        |
| Fraktion 12       | 0,03                   | 0,00                 | 0,10                 | 0,02               | 0,21         | 6,28        |
| Fraktion 13       | 0,03                   | 0,00                 | 0,16                 | 0,04               | 0,15         | 6,51        |
| Fraktion 14       | 0,03                   | 0,00                 | 0,14                 | 0,04               | 0,16         | 6,31        |
| Fraktion 15       | 0,03                   | 0,00                 | 0,27                 | 0,04               | 0,11         | 6,71        |
| Fraktion 16       | 0,02                   | 0,00                 | 0,37                 | 0,02               | 0,04         | 7,15        |
| Fraktion 17       | 0,02                   | 0,00                 | 0,41                 | 0,00               | 0,04         | 7,58        |
| Fraktion 18       | 0,02                   | 0,00                 | 0,71                 | 0,00               | 0,03         | 8,14        |

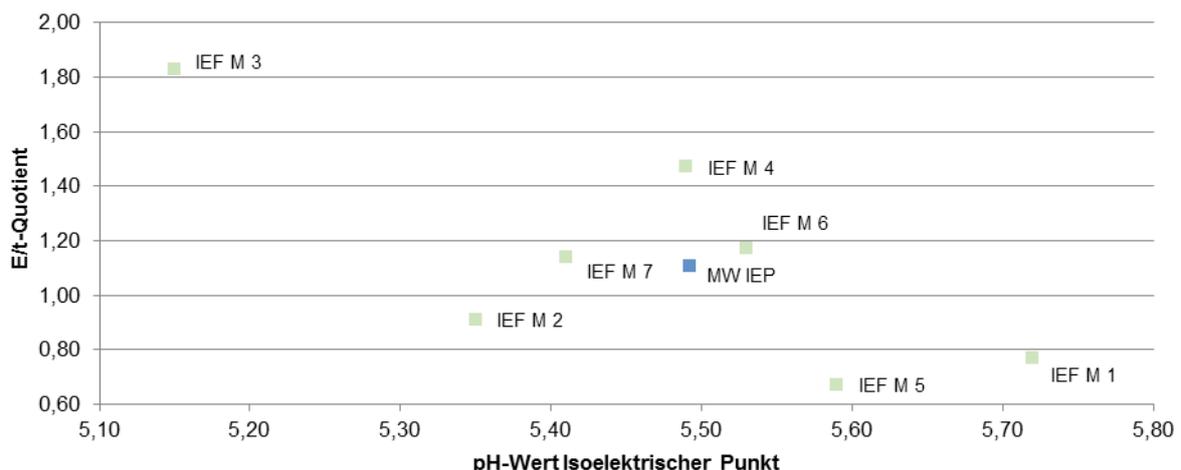
Alle anderen Fraktionen hatten einen E/t-Quotienten  $< 0,5$ . Der maximale E/t-Quotient = 1,14 wurde bei Fraktion 8 mit (pH-Wert 5,41) nachgewiesen und war vergleichbar mit dem maximalen E/t-Quotienten = 1,17 für IEF M 6 (pH-Wert 5,53). Auch hier war die Konzentration des *erythro*-Lactons mit 0,24 ppm in Fraktion 8 mit dem maximalen E/t-Quotienten am höchsten. Für die *threo*-Produkte (Lacton und DiOH) wurde in dieser Fraktion eine Konzentration von 0,21 ppm bestimmt.

Analog zu IEF M 6 wurde die höchsten Konzentrationen der *threo*-DiOH (0,55 ppm) in der Fraktion mit dem niedrigsten pH-Wert (Fraktion 3 – pH-Wert 4,30) und die höchste Konzentration des *threo*-Lactons (0,71 ppm) in der Fraktion mit dem höchsten pH-Wert (Fraktion 18 - pH-Wert 8,14) bestimmt (siehe Tab. 31).

Unter Verwendung der Ampholyte pH-Bereich 3 bis 10, wurde der IEP auf den pH-Bereich 4,68 bis 6,8 begrenzt. Mit Hilfe der Ampholyte pH-Bereich 4 bis 6 bzw. pH-Bereich 5 bis 7 konnte der IEP auf einen schmalen pH-Bereich von 5,20 bis 6,11 (pH-Bereich etwa 5 bis 6) eingegrenzt werden.

Der höchste maximale E/t-Quotient = 1,83 aller Versuche wurde bei IEF M 3 bestimmt und der niedrigste maximale E/t-Quotient = 0,67 bei IEF M 5. Die Verringerung der enzymatischen Wirkungsweise von EH-1 bei IEF M 5 lag möglicherweise an der Lagerung des Überstands für 4 Wochen bei  $- 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Der IEP für das bisher unbekannte Enzym EH-1 wurde aus den pH-Werten der Fraktionen mit dem maximalen E/t-Quotienten der IEF M 1 bis IEF M7 bestimmt und lag im pH-Bereich 5,15 bis 5,75, mit einem Mittelwert von 5,49 und einem Mittelwert für den E/t-Quotienten von 1,10 (siehe Abb. 37).



**Abbildung 37: pH-Werte der IEF-Fractionen mit den höchsten E/t-Quotienten (Isoelektrischer Punkt) bei den einzelnen Isoelektrischen Fokussierungen der *S. cerevisiae* Mutante (IEF M 1 bis IEF M7).**

#### 4.6.5 *S. cerevisiae* Wildtyp, *S. carlsbergensis* RH und *S. bayanus*

Um die Ergebnisse der IEF zur Bestimmung des IEP des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 in der *S. cerevisiae* Knockout-Mutante besser einordnen zu können, wurden in diesem Kapitel zum Vergleich IEF mit den *Saccharomyces* Stämmen WT, RH und B durchgeführt.

In Kapitel 4.6.2 wurde für die Mutante eine ideale Kolbenanzahl von 4 Kolben für die Zellanzucht (siehe 3.5.4) bestimmt. Diese Kolbenanzahl wurde ebenfalls für den RH Stamm und *S. bayanus* eingesetzt. Für den Wildtyp wurden 5 Kolben verwendet, da dieser Stamm ein langsames Zellwachstum aufweist (siehe 4.4). Nach Ammoniumsulfatfällung (siehe 3.5.8), Dialyse (siehe 3.5.9) und Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 3.5.10) wurde in die IEF-Kammer mittels Ampholyte pH-Bereich 3 bis 10 eine Proteintrennung nach dem IEP durchgeführt (siehe 3.5.11). Nach pH-Wert Messung und Anpassung des Volumens an die IEF-Fraktion mit dem größten Volumen (1,75 mL bis 2 mL), erfolgte die Inkubation und Analyse mittels GC-SIM-MS (siehe 3.5.13 und 3.5.14).

Für *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp wurden bei der IEF WT 8a 76 mg Protein verwendet und nach Durchführung der IEF die Fraktionen 3 bis 15 mit pH-Werten 3,69 bis 8,56 untersucht. Der Verlauf für den E/t-Quotienten war für den Wildtyp insgesamt vergleichbar zu den Verläufen der IEF der Mutante.

Der maximale E/t-Quotient lag bei Fraktion 8 mit 1,23 (pH-Wert 5,76), mit einer Konzentration der *erythro*-Produkte von 0,16 ppm und die der *threo*-Produkte bei 0,11 ppm (siehe Tab. 32).

Insgesamt lag in 3 Fraktionen der E/t-Quotient  $> 0,7$  (Fraktionen 7 bis 9) und in 5 Fraktionen  $> 0,40$  (Fraktionen 6 bis 10). Dies war vergleichbar mit IEF M 7. Bei den Fraktionen 3 bis 5 und 11 bis 14 wurden E/t-Quotienten  $< 0,20$  nachgewiesen. Der maximale E7t-Quotient wurde in Fraktion 8 (pH-Wert 5,76 nachgewiesen mit Konzentrationen der *erythro*-Produkte (nur Lacton) von 0,16 ppm und Konzentrationen der *threo*-Produkte (Lacton und DiOH) von 0,11 ppm. Die höchste Konzentration für das *erythro*-Lacton wurde mit 0,20 ppm in Fraktion 7 (pH-Wert 5,37) und die höchste Konzentration für das *threo*-Lacton mit 0,90 ppm wurde in Fraktion 14 (pH-Wert 8,15) nachgewiesen. *Erythro*-DiOH konnte nicht nachgewiesen werden, während die höchste Konzentration mit 0,60 ppm für *threo*-DiOH für in Fraktion 3 (pH-Wert 3,69) bestimmt wurde. Die E/t-Quotienten und Konzentrationen der *erythro*- bzw. der *threo*-Produkte aller untersuchten Fraktionen sind in Tabelle 32 aufgeführt.

In einer zweiten IEF WT 9a konnten die Ergebnisse bestätigt werden; der Verlauf für die E/t-Quotienten war analog zu IEF WT 8a. (siehe Abb. 38 a). Aufgrund der niedrigeren eingesetzten Proteinmenge von 61 mg im Vergleich zu 76 mg bei der ersten IEF, war der maximale E/t-Quotient geringfügig niedriger und lag um etwa 0,5 pH-Einheiten höher.

Der IEP konnte mit IEF WT 8a auf einen pH- Bereich von 5,37 bis 6,07 und mit IEF WT 9a auf einen pH- Bereich von 5,50 bis 6,62 eingegrenzt werden, was den Ergebnissen zum IEP in der Mutante entsprach.

**Tabelle 32: Konzentrationen der gebildeten *erythro*- und *threo*-Produkte, E/t-Quotienten und pH-Werte der IEF-Fraktionen des *S. cerevisiae* Wildtyps (Proteinmenge 76 mg) nach Isoelektrischer Fokussierung IEF WT 8a (Ampholyte pH-Bereich 3 bis 10).**

| IEF WT 8a         | Konzentration in ppm   |                      |                      |                    | E/t-Quotient | pH-Wert     |
|-------------------|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------|-------------|
|                   | <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> -DiOH | <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -DiOH |              |             |
| Fraktion 3        | 0,05                   | 0,00                 | 0,55                 | 0,60               | 0,04         | 3,69        |
| Fraktion 4        | 0,04                   | 0,00                 | 0,26                 | 0,22               | 0,08         | 4,08        |
| Fraktion 5        | 0,03                   | 0,00                 | 0,16                 | 0,11               | 0,12         | 4,42        |
| Fraktion 6        | 0,09                   | 0,00                 | 0,13                 | 0,08               | 0,43         | 4,94        |
| Fraktion 7        | 0,20                   | 0,00                 | 0,14                 | 0,13               | 0,73         | 5,37        |
| <b>Fraktion 8</b> | <b>0,16</b>            | <b>0,00</b>          | <b>0,09</b>          | <b>0,04</b>        | <b>1,23</b>  | <b>5,76</b> |
| Fraktion 9        | 0,10                   | 0,00                 | 0,12                 | 0,02               | 0,77         | 6,07        |
| Fraktion 10       | 0,12                   | 0,00                 | 0,24                 | 0,02               | 0,49         | 6,60        |
| Fraktion 11       | 0,06                   | 0,00                 | 0,27                 | 0,01               | 0,20         | 7,05        |
| Fraktion 12       | 0,07                   | 0,00                 | 0,66                 | 0,00               | 0,11         | 7,40        |
| Fraktion 13       | 0,04                   | 0,00                 | 0,66                 | 0,00               | 0,07         | 7,78        |
| Fraktion 14       | 0,04                   | 0,00                 | 0,90                 | 0,00               | 0,05         | 8,15        |
| Fraktion 15       | 0,03                   | 0,00                 | 0,41                 | 0,00               | 0,09         | 8,56        |

Für *Saccharomyces carlsbergensis* RH wurden bei der IEF RH 8b 80 mg Protein eingesetzt und die Fraktionen 3 bis 15 mit pH-Werten 3,90 bis 8,88 untersucht. Der maximale E/t-Quotient lag bei Fraktion 8 mit 1,22 (pH-Wert 5,84), mit einer Konzentration der *erythro*-Produkte (Lacton) von 0,30 ppm und die der *threo*-Produkte (Lacton und DiOH bei 0,24 ppm (siehe Tab. 33).

Insgesamt lag der E/t-Quotient in 5 Fraktionen > 0,5 (Fraktionen 5 bis 9). Bei allen anderen wurden E/t-Quotienten < 0,25 nachgewiesen. Die höchste Konzentration für das *erythro*-Lacton (0,30 ppm) wurde in der Fraktion mit dem höchsten E/t-Quotienten nachgewiesen (Fraktion 8), die für das chemisch gebildete *threo*-Lacton (1,05 ppm) wurde in Fraktion 14

(pH-Wert 8,65) nachgewiesen. *Erythro*-DiOH konnte nicht nachgewiesen werden, während die höchste Konzentration für *threo*-DiOH mit 0,61 ppm analog zu Mutante und Wildtyp in der Fraktion mit dem niedrigsten pH-Wert (Fraktion 3) bestimmt wurde (siehe Tab. 33).

Der Verlauf für den E/t-Quotienten war für den RH Stamm war mit dem von Mutante und Wildtyp vergleichbar. Die Ergebnisse konnten auch mit der zweiten IEF RH 9b bestätigt werden (siehe Abb. 38 b). Da auch hier, analog zum Wildtyp, eine niedrigere Proteinmenge von 61 mg im Vergleich zu 80 mg bei der ersten IEF eingesetzt wurde, lag der maximale E/t-Quotient auch für den RH Stamm etwas niedriger war und lag um etwa 1,0 pH-Einheiten höher. Dabei gab nur 2 Fraktionen mit einem E/t-Quotienten > 0,65.

Der IEP konnte mit IEF RH 8b auf einen pH- Bereich von 4,63 bis 6,41 und mit IEF RH 9b auf einen schmaleren pH-Bereich von 5,74 bis 6,53 eingegrenzt werden. Dies entsprach in etwa den Ergebnissen zu Mutante und Wildtyp.

**Tabelle 33: Konzentrationen der gebildeten *erythro*- und *threo*-Produkte, E/t-Quotienten und pH-Werte der IEF-Fraktionen des *S. carlsbergensis* RH (Proteinmenge 80 mg) nach Isoelektrischer Fokussierung IEF RH 8b (Ampholyte pH-Bereich 3 bis 10).**

| IEF RH 8b         | Konzentration in ppm   |                      |                      |                    | E/t-Quotient | pH-Wert     |
|-------------------|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------|-------------|
|                   | <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> -DiOH | <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -DiOH |              |             |
| Fraktion 3        | 0,06                   | 0,00                 | 0,28                 | 0,61               | 0,07         | 3,90        |
| Fraktion 4        | 0,06                   | 0,00                 | 0,14                 | 0,29               | 0,13         | 4,19        |
| Fraktion 5        | 0,08                   | 0,00                 | 0,16                 | 0,00               | 0,51         | 4,63        |
| Fraktion 6        | 0,14                   | 0,00                 | 0,12                 | 0,09               | 0,67         | 5,00        |
| Fraktion 7        | 0,21                   | 0,00                 | 0,12                 | 0,13               | 0,83         | 5,35        |
| <b>Fraktion 8</b> | <b>0,30</b>            | <b>0,00</b>          | <b>0,15</b>          | <b>0,09</b>        | <b>1,22</b>  | <b>5,84</b> |
| Fraktion 9        | 0,22                   | 0,00                 | 0,17                 | 0,11               | 0,78         | 6,41        |
| Fraktion 10       | 0,10                   | 0,00                 | 0,37                 | 0,02               | 0,24         | 6,95        |
| Fraktion 11       | 0,07                   | 0,00                 | 0,87                 | 0,01               | 0,08         | 7,58        |
| Fraktion 12       | 0,07                   | 0,00                 | 0,66                 | 0,01               | 0,10         | 7,97        |
| Fraktion 13       | 0,05                   | 0,00                 | 0,45                 | 0,00               | 0,11         | 8,24        |
| Fraktion 14       | 0,06                   | 0,00                 | 1,05                 | 0,00               | 0,06         | 8,56        |
| Fraktion 15       | 0,04                   | 0,00                 | 0,42                 | 0,00               | 0,09         | 8,88        |

Für die IEF B 8c wurden 77 mg Protein bei der IEF eingesetzt und Fraktionen im gleichen pH-Bereich wie bei IEF WT 8a und IEF RH 8b untersucht (Fraktion 3 bis 15 - pH-Wert 3,77 bis 8,11).

Der Verlauf für *S. bayanus* unterschied sich im pH-Bereich des IEP des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 deutlich von den anderen *Saccharomyces* Stämme M, WT und RH. Im Gegensatz zu diesen Stämmen gab es für beide IEF von B zwei Maxima (siehe Abb. 38 c).

Bei IEF 8c B lag das erste Maximum in Fraktion 5 mit 0,74 (pH-Wert 4,65), der zweite maximale E/t-Quotient bei Fraktion 8 mit 0,84 (pH-Wert von 5,38). Die E/t-Quotienten für die Fraktionen 6 und 7 dazwischen lagen mit 0,63 (pH-Wert 4,93) und 0,72 (pH-Wert 5,11) geringfügig niedriger. Auch Fraktion 9 (pH-Wert 5,62) wies einen E/t-Quotienten = 0,72 auf, für Fraktion 10 (pH-Werten 6,48) lag er bei 0,42. Alle anderen untersuchten Fraktionen wiesen E/t-Quotienten < 0,40 auf (siehe Tab. 34).

**Tabelle 34: Konzentrationen der gebildeten erythro- und threo-Produkte, E/t-Quotienten und pH-Werte der IEF-Fraktionen des *S. bayanus* (B) (Proteinmenge 77 mg) nach Isoelektrischer Fokussierung IEF B 8c (Ampholyte pH-Bereich 3 bis 10).**

| IEF B 8c          | Konzentration in ppm   |                      |                      |                    | E/t-Quotient | pH-Wert     |
|-------------------|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------|-------------|
|                   | <i>erythro</i> -Lacton | <i>erythro</i> -DiOH | <i>threo</i> -Lacton | <i>threo</i> -DiOH |              |             |
| Fraktion 3        | 0,07                   | 0,00                 | 0,19                 | 0,32               | 0,14         | 3,77        |
| Fraktion 4        | 0,06                   | 0,00                 | 0,11                 | 0,06               | 0,33         | 4,27        |
| <b>Fraktion 5</b> | <b>0,10</b>            | <b>0,00</b>          | <b>0,13</b>          | <b>0,02</b>        | <b>0,74</b>  | <b>4,65</b> |
| Fraktion 6        | 0,13                   | 0,00                 | 0,16                 | 0,04               | 0,63         | 4,93        |
| Fraktion 7        | 0,10                   | 0,00                 | 0,11                 | 0,02               | 0,72         | 5,11        |
| <b>Fraktion 8</b> | <b>0,10</b>            | <b>0,00</b>          | <b>0,11</b>          | <b>0,02</b>        | <b>0,84</b>  | <b>5,38</b> |
| Fraktion 9        | 0,09                   | 0,00                 | 0,11                 | 0,02               | 0,72         | 5,62        |
| Fraktion 10       | 0,08                   | 0,00                 | 0,17                 | 0,01               | 0,42         | 6,48        |
| Fraktion 11       | 0,08                   | 0,00                 | 0,20                 | 0,01               | 0,39         | 6,63        |
| Fraktion 12       | 0,06                   | 0,00                 | 0,23                 | 0,00               | 0,26         | 7,08        |
| Fraktion 13       | 0,05                   | 0,00                 | 0,43                 | 0,00               | 0,12         | 7,60        |
| Fraktion 14       | 0,04                   | 0,00                 | 0,44                 | 0,00               | 0,10         | 7,78        |
| Fraktion 15       | 0,04                   | 0,00                 | 0,48                 | 0,00               | 0,08         | 8,11        |

Die höchste Konzentration für das *erythro*-Lacton (0,13 ppm) wurde in Fraktion 6 (pH-Wert 4,93) nachgewiesen, die für das *threo*-Lacton (0,48 ppm) wurde in Fraktion 15 mit dem höchsten pH-Wert 8,11 nachgewiesen. *Erythro*-DiOH konnte nicht nachgewiesen werden, während die höchste Konzentration für *threo*-DiOH (0,32 ppm) für in Fraktion 3 mit dem niedrigsten pH-Wert (pH-Wert 3,77) bestimmt wurde. Die E/t-Quotienten und Konzentrationen der *erythro*- bzw. der *threo*-Produkte aller untersuchten Fraktionen sind in Tabelle 34 aufgeführt.

In einer zweiten IEF B 9c wurden die Ergebnisse bestätigt. Es gab erneut 2 Maxima für den E/t-Quotienten, mit geringfügig niedrigeren E/t-Quotienten im Vergleich mit IEF B 8c (siehe Abb. 38 c). Auch für *S. bayanus* lag die eingesetzte Proteinmenge mit 65 mg niedrigerer im Vergleich zur ersten IEF (77 mg) und die maximalen E/t-Quotienten lagen um etwa 0,7 pH-Einheiten höher.

Der IEP konnte mit IEF B 8c auf einen pH-Bereich von 4,68 bis 6,48 und mit IEF B 9c auf einen pH- Bereich von 4,75 bis 6,60 eingegrenzt werden. Dies entsprach den Ergebnissen zum IEP in der Mutante. Dabei lagen für *S. bayanus* im Gegensatz zu Mutante, Wildtyp und RH Stamm dabei 2 Maxima und nicht nur ein Maximum für den E/t-Quotienten vor.

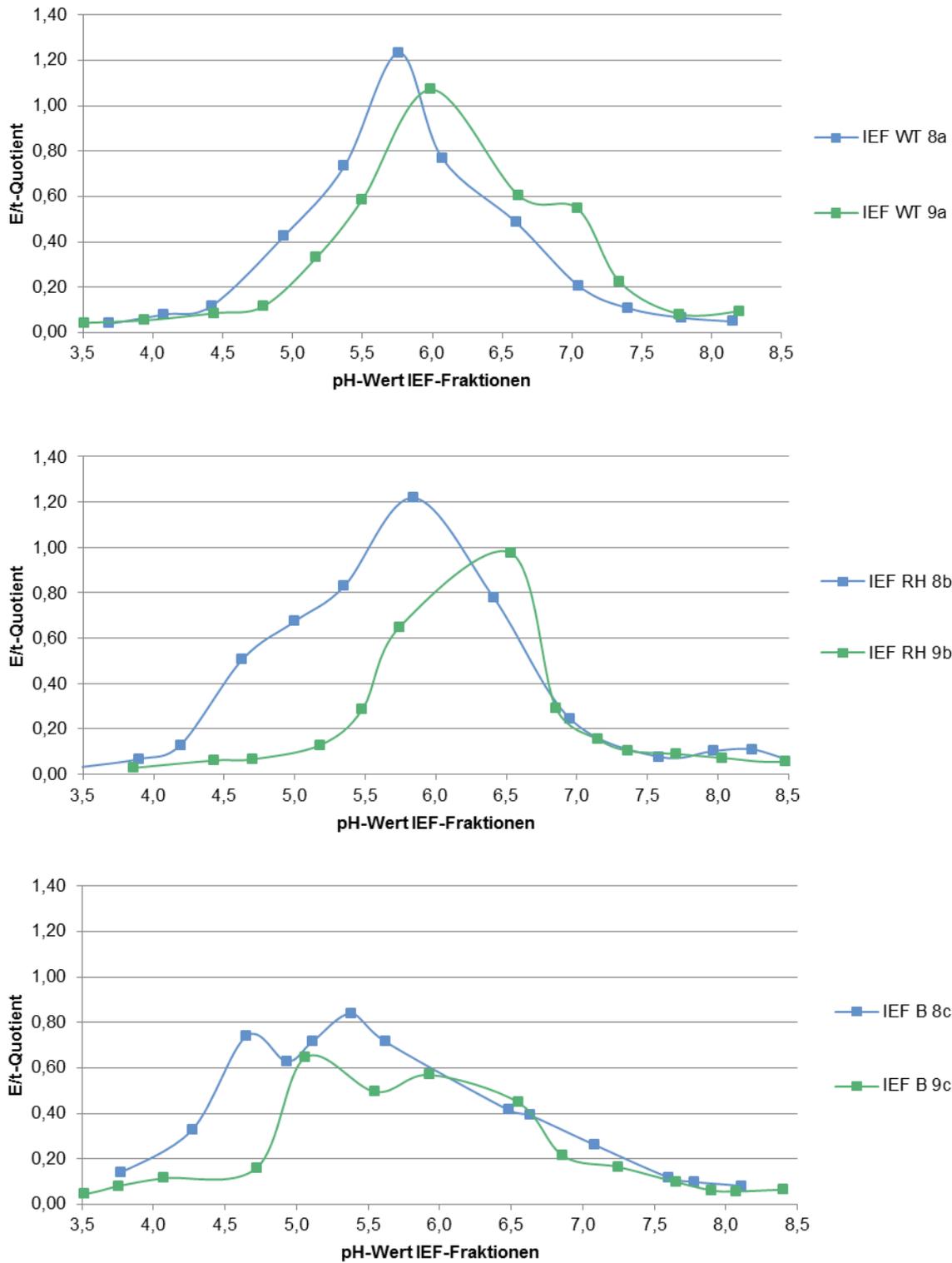


Abbildung 38: E/t-Quotienten und pH-Werte der IEF-Fractionen von *Saccharomyces* Stämmen nach Isoelektrischer Fokussierung mit Ampholyten pH-Bereich 3 bis 10. *S. cerevisiae* Wildtyp (IEF 8a WT und IEF 9a WT) (oben), *S. carlsbergensis* RH (IEF RH 8b und IEF RH 9b) (Mitte) und *S. bayanus* (IEF B 8c und IEF 9c) (unten).

### Zusammenfassung:

- Mit Hilfe der Mutante wurde der IEP für das bisher unbekannte Enzym EH-1 aus den pH-Werten der IEF-Fraktionen mit dem maximale E/t-Quotienten der IEF M 1 bis IEF M7 auf einen pH-Bereich 5,15 bis 5,75 eingegrenzt (Mittelwert 5,49).
- Die Ergebnisse der Mutante wurden mit IEF des Wildtyps und des RH Stamms bestätigt. Dabei waren die pH-Werte für die IEF-Fraktionen mit dem maximale E/t-Quotienten vergleichbar oder um etwa 0,5 bis 1,0 pH-Einheiten höher.
- Die maximalen E/t-Quotienten waren für die beiden IEF von Wildtyp und RH Stamm im Vergleich mit der Mutante größer als bei IEF M 1 und IEF M 2 und kleiner als bei IEF M 3 und IEF M 4.
- Für *S. bayanus* lag der IEP im vergleichbaren pH-Bereich zu den anderen *Saccharomyces* Stämmen, dabei gab es für den E/t-Quotienten nicht nur ein Maximum, sondern zwei Maxima.
- Die maximalen E/t-Quotienten waren für die IEF von *S. bayanus* im Vergleich mit den anderen Stämmen immer am niedrigsten. Dies entsprach allen voran gegangenen Versuchen.
- Für alle *Saccharomyces* Stämme sind Proteine am IEP ausgefallen.

Eine in der Literatur beschriebene Epoxidhydrolase in Sojabohnen besitzt einen IEP bei pH-Wert 5,4 mit einem Molekulargewicht von  $32 \pm 1$  kDa [34]. Analog konnte für den IEP des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 in der Knockout-Mutante ein pH-Bereich von 5,15 bis 5,75 bestimmt werden. Um auch das Molekulargewicht von EH-1 bestimmen zu können, wurden im Folgenden (siehe 4.7) Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit IEF-Fraktionen, die in den Tabellen in diesem Kapitel grau unterlegt sind, durchgeführt.

## 4.7 SDS-PAGE

In Kapitel 4.5 wurden Zellaufschlüsse zur Lokalisierung des unbekanntes Enzyms EH-1 in der LTA<sub>4</sub>H deletierten Knockout-Mutante durchgeführt und in Kapitel 4.7 Isoelektrische Fokussierungen zur Bestimmung des Isoelektrischen Punktes des Enzyms EH-1 durchgeführt. Mit den Versuchen in diesem Kapitel zur Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) sollte das Molekulargewicht (MG) des Enzyms eingegrenzt werden.

Als Anhaltspunkt diente dabei eine in der Literatur beschriebene Epoxidhydrolase in Sojabohnen, die einen IEP von 5,4 mit einem MG von  $32 \pm 1$  kDa besitzt [34]. Analog konnte für den IEP von Enzyms EH-1 ein pH-Bereich von 5,15 bis 5,75 bestimmt werden. Mit Hilfe der SDS-PAGE sollte dann überprüft werden, ob auch das MG in dem Bereich der Epoxidhydrolase in Sojabohnen liegt.

Dabei wurden zunächst IEF-Fractionen (in den Tabellen in 4.6 grau unterlegt) der Mutante auf SDS-Gele aufgebracht und die enthaltenen Proteine nach MG getrennt (siehe 4.7.1). Die Ergebnisse dieser SDS-PAGE wurden anschließend mit denen der *Saccharomyces* Stämme WT, RH und B verglichen (siehe 4.7.2). In Tabelle 35 sind die durchgeführten SDS-PAGE für die einzelnen Stämme zusammen gestellt.

**Tabelle 35: Übersicht der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zu den aufgeführten Isoelektrischen Fokussierungen (IEF) der Stämme *S. cerevisiae* Mutante (M) und Wildtyp (WT), *S. carlsbergensis* RH (RH) und *S. bayanus* (B). Es sind die verwendeten IEF-Fractionen, die eingesetzten Aufgabevolumina und das behandelnde Kapitel aufgeführt.**

| Versuch                | Stamm             | IEF-Fractionen        | Volumen | Kapitel |
|------------------------|-------------------|-----------------------|---------|---------|
| SDS-PAGE der IEF M 2   | Mutante           | 6 bis 8 und 10 bis 13 | 10 µL   | 4.7.1   |
| SDS-PAGE der IEF M 2   | Mutante           | 6 bis 8 und 10 bis 13 | 5 µL    | 4.7.1   |
| SDS-PAGE der IEF M 3   | Mutante           | 6, 8 bis 13           | 10 µL   | 4.7.1   |
| SDS-PAGE der IEF M 6   | Mutante           | 12 bis 18             | 5 µL    | 4.7.1   |
| SDS-PAGE der IEF WT 8a | Wildtyp           | 4 bis 10              | 5 µL    | 4.7.2   |
| SDS-PAGE der IEF RH 8b | RH Stamm          | 4 bis 11              | 5 µL    | 4.7.2   |
| SDS-PAGE der IEF B 8c  | <i>S. bayanus</i> | 4 bis 10              | 5 µL    | 4.7.2   |

#### 4.7.1 *S. cerevisiae* Mutante

Die IEF-Fractionen 6 bis 8 sowie 10 bis 13 der IEF M 2 wurden wie unter 3.5.15 beschrieben verdünnt, 10  $\mu$ L dieser Lösung zusammen mit 1,5  $\mu$ L des Markers BIORAD Kaleidoscope auf ein Gel aufgebracht und eine SDS-PAGE zur Trennung durchgeführt (siehe Abb. 39). Verwendet wurden die grau unterlegten Fraktionen der Tabelle 26. Als Anhaltspunkt für das MG diente das oben genannte MG von  $32 \pm 1$  kDa einer Epoxidhydrolase in Sojabohnen. Das verwendete Gel und der Marker bilden einen Bereich von 10 bis 100 kDa ab.

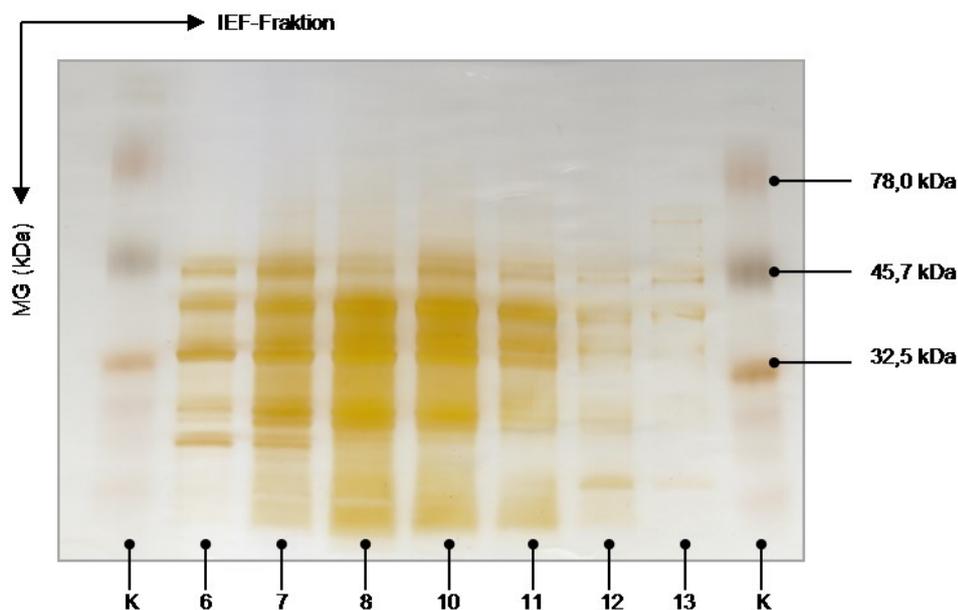
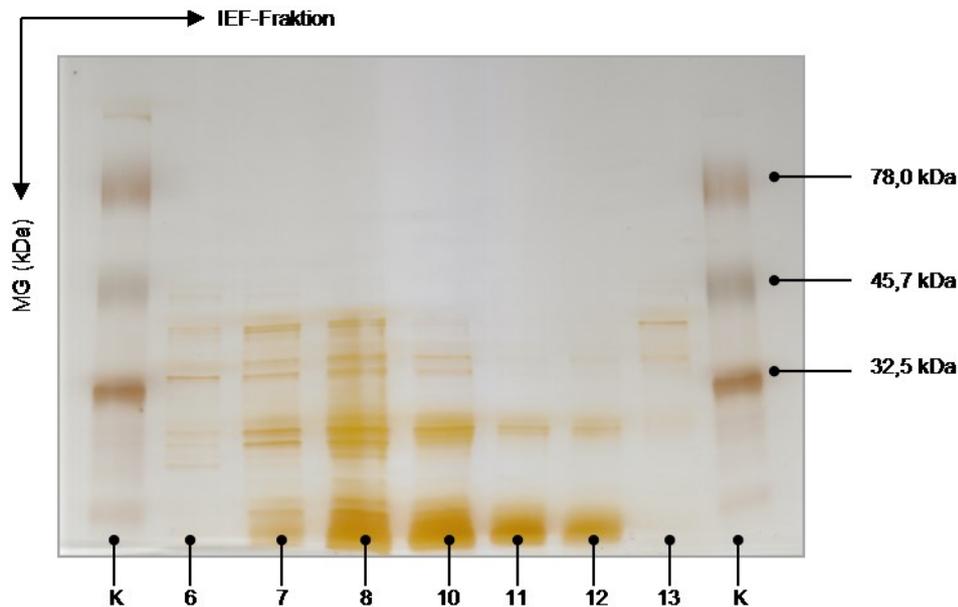


Abbildung 39: SDS-PAGE der IEF-Fractionen 6 bis 13 der IEF M 2 - *S. cerevisiae* Mutante (grau unterlegte Fraktionen in Tabelle 26), Aufgabevolumen 10  $\mu$ L je Fraktion. K = Proteinmarker (BioRad Kaleidoscope); MG = Molekulargewicht.

Beim ersten Gel der IEF M 2 waren für die IEF-Fractionen zahlreiche Banden im MG Bereich bis 78 kDa erkennbar. Dabei gab es Unterschiede im Bandenmuster zwischen den IEF-Fractionen mit hohem und mit niedrigem E/t-Quotienten: Für die Fraktionen 8 und 10 mit hohem E/t-Quotienten, waren intensive Banden geringfügig unterhalb der Markerproteinbande von 32,5 kDa erkennbar, während diese Banden bei den Fraktionen 7, 11 und 12 mit mittlerem E/t-Quotienten deutlich schwächer ausgeprägt waren. Für die Fraktionen mit niedrigem E/t-Quotienten, 6 und 13 waren diese Banden nur geringfügig ausgeprägt.

Im Bereich zwischen den Markerproteinbanden von 32,5 kDa und 45,7 kDa wiesen die Fraktionen 8 und 10 sehr intensive, nahezu überladene Proteinbanden auf. Um diese Überladung zu Vermeiden und über schmale Banden eine bessere Aussage zur Verteilung in den einzelnen Fraktionen (Bandenmuster) treffen zu können, wurde zur IEF M 2 ein

zweites Gel mit halbiertem Aufgabevolumen der IEF-Fractionen (5  $\mu\text{L}$  anstelle von 10  $\mu\text{L}$ ) angefertigt (siehe Abb. 40). Verwendet wurden analog zum ersten Gel die grau unterlegten IEF-Fractionen in Tabelle 26.



**Abbildung 40:** SDS-PAGE der IEF-Fractionen 6 bis 13 der IEF M 2 - *S. cerevisiae* Mutante (grau unterlegte Fractionen in Tabelle 26), Aufgabevolumen 5  $\mu\text{L}$  je Fraktion. K = Proteinmarker (BioRad Kaleidoscope); MG = Molekulargewicht.

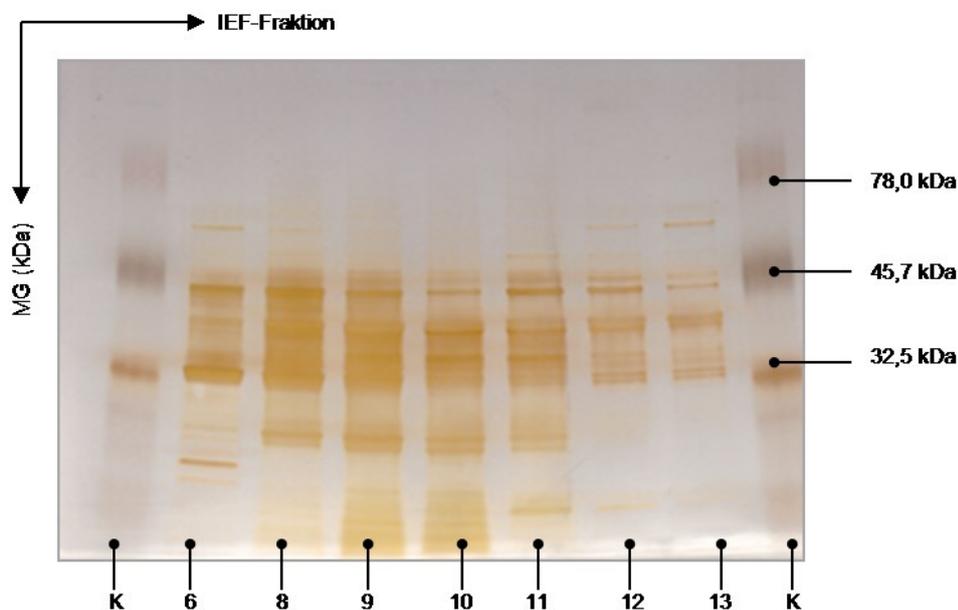
Bei dieser Wiederholung unter Aufgabe eines geringeren Aufgabevolumens waren die Banden im Bereich zwischen den Markerproteinbanden von 32,5 kDa und 45,7 deutlicher erkennbar als beim ersten Gel zur IEF M 2. In den Fractionen mit hohem E/t-Quotienten (Fraktion 7, 8 und 10) waren in diesem Bereich nur drei Proteinbanden zu erkennen. Die Intensitäten der Banden der Fractionen 7 und 10 waren dabei geringer als in Fraktion 8, in der der höchste E/t-Quotient = 0,91 nachgewiesen wurde. Dabei waren die Intensitäten der Banden in Fraktion 7 (mittlerer E/t-Quotient) größer als in Fraktion 10 (hoher E/t-Quotient). In den Fractionen 11 und 12 (mittlerer E/t-Quotient) und den Fractionen 6 und 13 (niedriger E/t-Quotient) traten diesen Banden nicht oder nur mit deutlich niedrigerer Intensität auf. So ergab sich keine eindeutige Korrelation zwischen der enzymatischen Umwandlung des Substrats *cis*-[3,4- $^2\text{H}_2$ ]-3,4-Epoxydecansäuremethylester durch das bisher unbekannte Enzym EH-1 und der Intensität der Banden zwischen den Markerproteinbanden 32,5 kDa und 45,7 kDa.

Im Bereich der Markerproteinbanden unter 32,5 kDa war für die Fractionen 7 bis 12 analog zum ersten Gel der IEF M 2 zwei schmale Banden erkennbar. Die Intensitäten der Banden waren bei den Fractionen 7, 11 und 12 erneut geringer als bei den Fractionen 8 und 10. Da die Fractionen 8 und 10 die Fractionen mit den höchsten E/t-Quotienten sind, korrelierte die

Intensität der Banden unterhalb von 32,5 kDa mit der enzymatischen Umwandlung des Substrats durch das Enzym EH-1.

Um genauere Aussagen zum MG des zu unbekanntes Enzyms EH-1 treffen zu können, waren weitere Untersuchungen mittels SDS-PAGE notwendig.

Anschließend wurde mit IEF M 3 eine SDS-PAGE mit den grau unterlegten IEF-Fractionen der Tabelle 27 durchgeführt (siehe Abb. 41). In Fraktion 9 wurde der höchste E/t-Quotient = 1,83 aller IEF-Fractionen nachgewiesen. Bei der IEF M 3 wurde weniger Protein aufgebracht (70 mg) als bei IEF M 2 (104 mg). Dies hatte eine geringere Proteinmenge der einzelnen IEF-Fractionen zur Folge, weshalb das Aufgabevolumen bei der SDS-PAGE wieder von 5 µL auf 10 µL erhöht wurde.



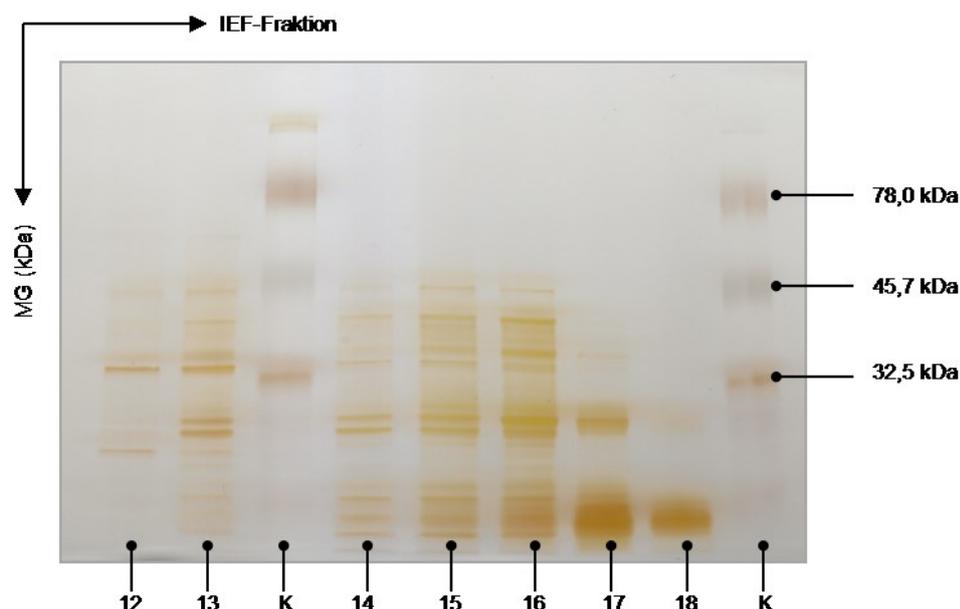
**Abbildung 41: SDS-PAGE der IEF-Fractionen 6 bis 13 der IEF M 3 - *S. cerevisiae* Mutante (grau unterlegte Fractionen in Tabelle 27), Aufgabevolumen 10 µL je Fraktion. K = Proteinmarker (BioRad Kaleidoscope); MG = Molekulargewicht.**

Für die vier Fractionen 8 bis 11 mit hohem E/t-Quotient  $> 1,35$  waren analog zum Gel der IEF M 2 Banden mit hoher Intensität geringfügig unterhalb der Markerproteinbande von 32,5 kDa deutlich erkennbar. Entsprechende Banden waren in den Fractionen 6, 12 und 13 mit niedrigem E/t-Quotient nicht oder nur geringfügig nachweisbar.

Im Bereich zwischen den Markerproteinbanden von 32,5 kDa und 45,7 kDa waren, ebenfalls analog zu IEF M 2, in den Fractionen 8 bis 11 mit großer enzymatischer Aktivität sehr viele Banden mit hoher Intensität erkennbar. Die entsprechenden Banden waren ebenfalls in den anderen vier Fractionen mit niedrigem E/t-Quotient erkennbar, hier waren sie jedoch erneut von deutlich geringerer Intensität.

Auch für die IEF M 6, Ampholyte pH-Bereich 4 bis 6, wurde ein SDS-PAGE Trenngang analog zu den vorherigen angefertigt (siehe Abb. 42). Verwendet wurden dabei die in Tabelle 30 grau unterlegten IEF-Fractionen.

Das aufgetragene Volumen der IEF-Fractionen wurde erneut auf 5  $\mu\text{L}$  verringert, da die Intensität der Banden im SDS-Gel der IEF M 3 trotz geringerer Proteinmenge analog zum SDS-Gel der IEF M 2 (beide 10  $\mu\text{L}$ ) überladen war.



**Abbildung 42:** SDS-PAGE der IEF-Fractionen 12 bis 18 der IEF M 6 - *S. cerevisiae* Mutante (grau unterlegte Fractionen in Tabelle 30), Aufgabevolumen 5  $\mu\text{L}$  je Fraktion. K = Proteinmarker (BioRad Kaleidoscope); MG = Molekulargewicht.

Auch bei dem Gel der IEF M 6 waren in einigen Fractionen die bereits bekannten Banden zwischen den Markerproteinbanden 32,5 kDa und 45,7 kDa, sowie unterhalb der Markerproteinbande von 32,5 kDa deutlich erkennbar. Die Banden zwischen den Markerproteinbanden 32,5 kDa und 45,7 kDa waren vor allem bei den Fractionen 13 bis 16 erkennbar, Fraktion 16 wies sowohl die höchste Intensität dieser Banden als die auch der höchste E/t-Quotienten = 1,17 auf. In Fraktion 17, in der der zweithöchste E/t-Quotient nachgewiesen wurde, waren in diesem Bereich keine Banden sichtbar. So ergab sich analog zu den vorherigen SDS-Gelen für die Proteinbanden zwischen 32,5 kDa und 45,7 kDa keine eindeutige Korrelation zwischen Bandenintensität und enzymatischer Umwandlung des Substrats durch das Enzym EH-1.

Im Bereich unterhalb der Markerproteinbande von 32,5 kDa waren analog zu den Gelen der IEF M 2 und IEF M 3 die bekannten zwei nah beieinander liegenden Banden in den Fractionen 13 bis 17 mit höchster Intensität für Fraktion 16 (auch höchster E/t-Quotient) erkennbar. Somit konnte auch bei IEF M 6 eine Korrelation zwischen der Intensität der

Proteinbande unter 32,5 kDa und der enzymatischen Umwandlung des Substrats durch das Enzym EH-1 festgestellt werden.

Diese Ergebnisse wurden mit den SDS-Gelen der anderen IEF der Mutante bestätigt. Um die Proteinmuster der anderen Stämme (*S. cerevisiae* Wildtyp, *S. carlsbergensis* RH und *S. bayanus*) mit dem der *S. cerevisiae* Mutante vergleichen zu können, wurden von den drei Stämmen analog zur Mutante IEF- Fraktionen mittels SDS-PAGE untersucht.

#### 4.7.2 *S. cerevisiae* Wildtyp, *S. carlsbergensis* RH und *S. bayanus*

Von Wildtyp, RH Stamm und *S. bayanus* IEF- Fraktionen von IEF WT 8a, IEF RH 8b und IEF B 8c untersucht. Dafür wurden die Fraktionen 1:1 verdünnt, 5  $\mu$ L auf ein Gel zusammen mit 1,5  $\mu$ L des Markers BIORAD Kaleidoscope aufgegeben und die SDS-PAGE wie unter Kapitel 3.5.15 beschrieben durchgeführt.

Für den Wildtyp wurden die grau unterlegten IEF-Fraktionen von IEF WT 8a, aufgeführt in Tabelle 32, verwendet. Die Bandenverteilung im Gel von IEF WT 8a war analog zum Gel von IEF M 2 (siehe Abb. 43).

Für die Fraktionen mit hohem E/t-Quotient Fraktion 7 (E/t-Quotient = 0,73), Fraktion 8 (E/t-Quotient = 1,23) und Fraktion 9 (E/t-Quotient = 0,77) waren die beiden Banden geringfügig unterhalb der Markerproteinbande von 32,5 kDa in vergleichbarer Intensität erkennbar, während sie in den anderen Fraktionen, vergleichbar mit der Mutante, nicht wahrnehmbar waren.

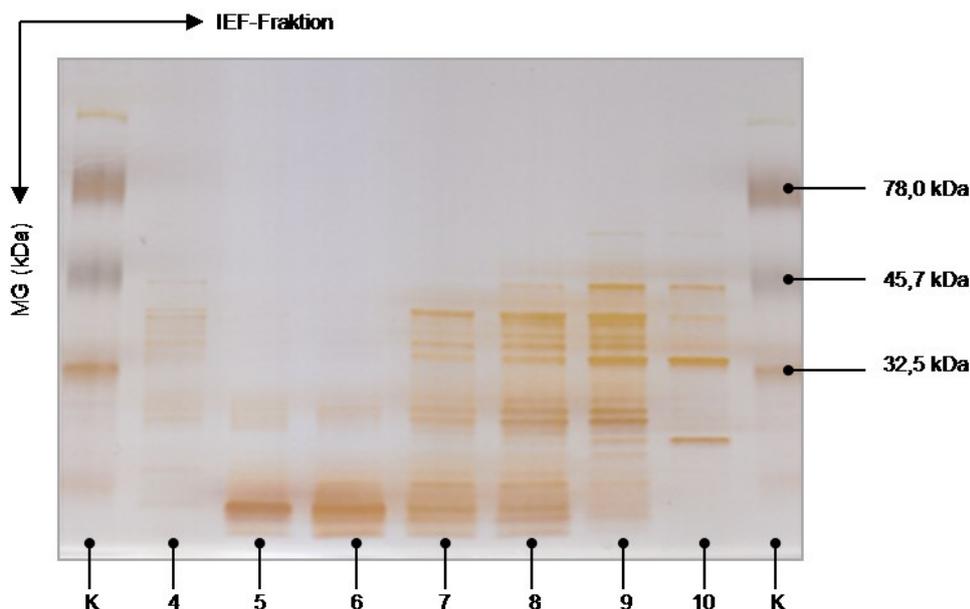


Abbildung 43: SDS-PAGE der IEF-Fraktionen 4 bis 10 der IEF WT 8a - *S. cerevisiae* Wildtyp (grau unterlegte Fraktionen in Tabelle 32), Aufgabevolumen 5  $\mu$ L je Fraktion. K = Proteinmarker (BioRad Kaleidoscope); MG = Molekulargewicht.

Im Bereich zwischen den Markerproteinbanden von 32,5 kDa und 45,7 kDa waren analog zur Mutante einige Banden geringer Intensität in den Fraktionen 7 bis 9 mit hohem E/t-Quotient, sowie in Fraktion 10, mit mittlerem E/t-Quotient = 0,49 erkennbar.

Für den RH Stamm wurde eine SDS-PAGE mit den IEF-Fractionen von IEF RH 8b, grau unterlegte Fraktionen in Tabelle 33, durchgeführt. Die Intensität der Banden war insgesamt etwas höher als bei dem Gel des Wildtyps (siehe Abb. 44).

Die beiden Banden geringfügig unterhalb der Markerproteinbande von 32,5 kDa waren mit hoher Intensität in den Fraktionen 7 bis 9 (Fraktion 7 (E/t-Quotient = 0,83), Fraktion 8 (E/t-Quotient = 1,22) und Fraktion 9 (E/t-Quotient = 0,78) mit hohem E/t-Quotient erkennbar. Dies war vergleichbar mit Mutante und Wildtyp. Zusätzlich waren diese Banden, wenn auch deutlich schwächer ausgeprägt, in einigen anderen Fraktionen ebenfalls erkennbar. Für die Banden im Bereich zwischen den Markerproteinbanden von 32,5 kDa und 45,7 kDa war das Ergebnis vergleichbar, sie waren in den meisten Fraktionen erkennbar mit der höchsten Intensitäten für die Fraktionen 7 bis 9. Insgesamt entspricht das Gesamtbild des Gels vom RH Stamms dem von Mutante und Wildtyp. In keinem Gel waren Banden oberhalb der Markerproteinbande von 78 kDa erkennbar und zwischen den Markerproteinbanden 45,7 kDa und 78 kDa nur Banden mit schwacher Intensität.

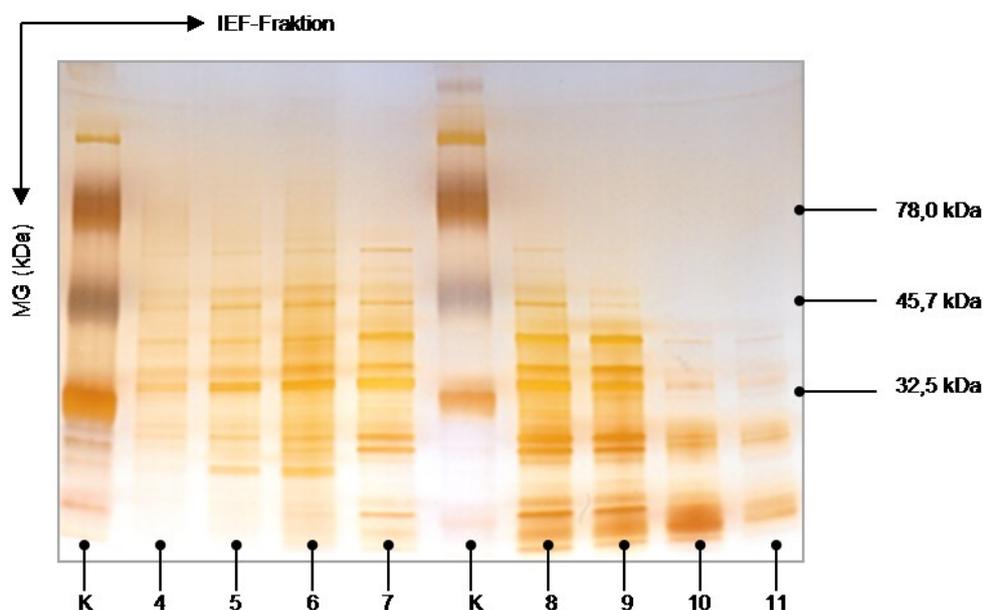


Abbildung 44: SDS-PAGE der IEF-Fractionen 4 bis 11 der IEF RH 8b - *S. carlsbergensis* RH (grau unterlegte Fraktionen in Tabelle 33), Aufgabevolumen 5  $\mu$ L je Fraktion. K = Proteinmarker (BioRad Kaleidoscope); MG = Molekulargewicht.

Für die SDS-PAGE von *S. bayanus* wurden die in Tabelle 34 grau unterlegten IEF-Fractionen der IEF B 8c verwendet. Abweichend zu den Gelen der anderen Stämme war im Gel von *S. bayanus* Banden über den gesamten Bereich bis 78 kDa erkennbar (siehe Abb. 45).

Die Banden unterhalb der Markerproteinbande von 32,5 kDa und die vielen Banden zwischen den Markerproteinbanden von 32,5 kDa und 45,7 kDa hatten in allen Fraktionen eine vergleichbare Intensität. Insgesamt wurde für die meisten Banden die höchste Intensität in Fraktion 4 nachgewiesen. Dies ist die Fraktion mit dem niedrigsten E/t-Quotient = 0,33. Somit ergab sich für das Gel von *S. bayanus* ein anderes Bild als für die anderen *Saccharomyces* Stämme M, WT und RH. Dies deckte sich mit den Ergebnissen zu den Parametern (siehe 4.4), dem ZA (siehe 4.5) und der IEF (siehe 4.7). In diesen Kapiteln weichten die Ergebnisse von *S. bayanus* deutlich von den Ergebnissen zu den anderen Stämmen ab.

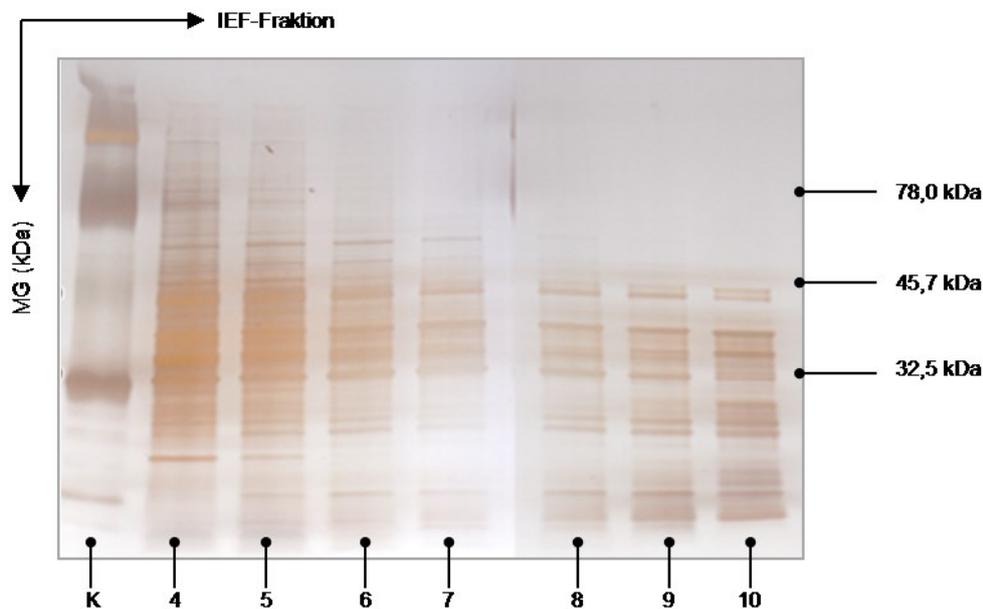


Abbildung 45: SDS-PAGE der IEF-Fractionen 4 bis 10 der IEF B 8c - *S. bayanus* (grau unterlegte Fraktionen in Tabelle 34), Aufgabevolumen 5  $\mu$ L je Fraktion. K = Proteinmarker (BioRad Kaleidoscope); MG = Molekulargewicht.

### Zusammenfassung:

*S. cerevisiae* Mutante und Wildtyp, sowie *S. carlsbergensis* RH:

- In keinem Gel waren Banden oberhalb der Markerproteinbande von 78 kDa erkennbar. Dies führt zu der Annahme, dass das MG des unbekanntes Enzyms EH-1 unter 78 kDa liegt.
- Zwischen den Markerproteinbanden 45,7 kDa und 78 kDa waren nur geringfügig Banden erkennbar.
- Für die meisten Fraktionen mit hohem E/t-Quotient wurden zahlreiche Banden zwischen 32,5 kDa und 45,7 kDa nachgewiesen, z. T. auch in Fraktionen mit niedrigem E/t-Quotient. Somit ergab sich keine eindeutige Korrelation zwischen

Bandenintensität und der enzymatischen Umwandlung des Substrats durch das bisher unbekannte Enzym EH-1.

- Geringfügig unterhalb der Markerproteinbande von 32,5 kDa waren zwei Banden für alle IEF-Fractionen mit hohem E/t-Quotient nachweisbar. Daraus ergab sich eine eindeutige Korrelation zwischen Bandenintensität und der enzymatischen Umwandlung des Substrats durch das bisher unbekannte Enzym EH-1.
- Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das MG des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 etwa 30 kDa beträgt.
- Dies ist insofern hervorzuheben, da wie bereits zu Beginn des Kapitels erwähnt, eine Epoxidhydrolase in Sojabohnen mit einem MG von  $32 \pm 1$  kDa nachgewiesen wurde. Diese Epoxidhydrolase hatte auch einen mit EH-1 vergleichbaren IEP bei pH-Wert 5,4.

#### *S. bayanus*:

- Für *S. bayanus* waren Banden über den gesamten Bereich bis 78 kDa erkennbar.
- Für die Banden unterhalb der Markerproteinbande von 32,5 kDa und den Banden zwischen den Markerproteinbanden von 32,5 kDa und 45,7 kDa war die Bandenintensität unabhängig von dem Wert der E/t-Quotienten in allen Fraktionen vergleichbar. Somit ergab sich keine Korrelation zwischen Bandenintensität und der enzymatischen Umwandlung des Substrats durch das bisher unbekannte Enzym EH-1.
- Insgesamt wich die SDS-PAGE für *S. bayanus* deutlich von denen der anderen *Saccharomyces* Stämmen M, WT und RH ab, was sich mit den Erkenntnissen der vorherigen Kapiteln (Parameter (siehe 4.4), ZA (siehe 4.5) und IEF (siehe 4.7)) deckt.
- Dies stärkt die Vermutung, dass für *S. carlsbergensis* RH, der ein Hybrid aus *S. cerevisiae* und *S. bayanus* ist, in Bezug auf den enzymatischen Abbau epoxidierter Fettsäuren die genetische Ausprägung der *S. cerevisiae* dominiert.

Weitere Möglichkeiten zur Bestimmung des Molekulargewichtes des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 in der *S. cerevisiae* Knockout-Mutante sind im folgenden Kapitel 4.8 aufgelistet.

## 4.8 Ausblick

In den vorherigen Kapiteln wurden umfassende Untersuchungen zur Charakterisierung eines bisher unbekanntes Enzyms EH-1 durchgeführt, welches *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester in einer Leukotrien A<sub>4</sub> Hydrolase deletierten Knockout-Mutante *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 ΔYNL045W unter Retention der Konfiguration in *erythro*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Dihydroxydecansäuremethylester bzw. *erythro*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Hydroxy-γ-decalacton umwandelt.

Der IEP von EH-1 konnte, wie in Kapitel 4.6 ausführlich beschrieben, auf den pH-Bereich 5,15 bis 5,75 eingrenzt werden. Diese Eingrenzung basiert auf der Tatsache, dass in den IEF-Fractionen hohe E/t-Quotienten nachgewiesen wurden. Mit der in Kapitel 4.5 dargestellten Versuchsreihe zur Durchführung mechanischer Zellaufschlüsse sollte die Lokalisierung von EH-1 in Hefezellen bestimmt werden. In den Versuchen konnte nicht abschließend geklärt werden, ob es sich bei EH-1 um ein membrangebundenes Enzym (mEH) oder ein frei im Cytosol vorliegendes Enzym (cEH) handelt.

Die in Kapitel 4.7 dargestellten Versuche zur SDS-PAGE lieferten Hinweise zum Molekulargewicht von EH-1. Dabei konnte eine Korrelation zwischen intensiven Proteinbanden von ca. 30 kDa im Gel und den IEF-Fractionen mit hohem E/t-Quotient erkannt werden. Die durchgeführten Untersuchungen lieferten wichtige Erkenntnisse zur Charakterisierung der EH-1. Um das MG (I) genauer zu bestimmen und das Enzym lokalisieren (II) zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig.

### (I) Molekulargewicht:

- Größenausschlusschromatographie (SEC)
- hydrophobe Interaktionschromatographie
- Ionenaustauscherchromatographie
- Affinitätschromatographie
- Massenspektrometrie
- Ausschneiden und untersuchen von Gel-Banden der SDS-PAGE

In ersten weiteren Untersuchungen wurden zwei Möglichkeiten der Proteintrennung für Enzyme mittels Säulenchromatographie verwendet.

1.) Größenausschlusschromatographie:

Nach der IEF wurden die verwendeten Ampholyte abgetrennt und die bei der IEF ausgefallenen Proteine versucht in Lösung zu bringen. Die Elution der Probe erfolgte mittels manueller SEC mit Sephacryl 100 (stationäre Phase) und T/E-Puffer pH-Wert 8,8 (mobile Phase). In den erhaltenen Fraktionen wurden E/t-Quotienten  $< 0,1$  im Bereich des Blindwertes (siehe 4.4.1). nachgewiesen. Möglicherweise konnte das Enzym für die SEC nach Umpufferung auf das pH-Optimum nicht vollständig in Lösung gebracht werden, so dass es auf der Säule zurück gehalten wurde. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei dem unbekanntem Enzym EH-1 möglicherweise um ein membrangebundenes Enzym handelt (mEH).

2.) hydrophobe Interaktionschromatographie:

Nach Zellanzucht wurde ein Zellaufschluss mit TEDANG-Puffer (20 mM Tris; 1 mM EDTA; 1 mM Dithiothreitol; 0,02 % (w/Vol)  $\text{NaN}_3$ , 200 mM NaCl und 10 % Glycerol (v/v) durchgeführt. Dieser Puffer wurde in der Literatur bereits erfolgreich zur Untersuchung von Epoxidhydrolasen eingesetzt [105]. Nach Ammoniumsulfatfällung und Dialyse in TEDANG-Puffer enthielt der Überstand (Ü) ein gelartiges Pellet (PÜ), welches möglicherweise durch Glycerol im Puffer hervorgerufen wurde. Dieses wurde mittels Zentrifugation vom Überstand getrennt und in Phosphatpuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Proteine in beiden Proben Ü und PÜ nacheinander mittels automatischer flüssigchromatographischer Trennung (Äkta) an einer hydrophoben Octanyl-Sepharose-Säule (stationäre Phase) mittels Phosphatpuffer (mobile Phase) getrennt. Es wurde die Methode zur Charakterisierung der Epoxidhydrolase in Sojabohnen verwendet [34]. Die Chromatogramme der Fraktionen ergaben für beiden Proben Ü und PÜ ein analoges Bild zu dem in der Literatur beschriebenen Chromatogramm [34]. Abweichend waren allerdings zusätzlich zahlreiche Peaks mit vergleichsweise hoher Intensität in den Beladungsfraktionen der Säule erkennbar. Enzymatisch gebildete *erythro*-Abbauprodukte wurden ausschließlich in diesen Fraktionen nachgewiesen, mit höheren E/t-Quotienten in den Ü-Fraktionen gegenüber den ÜP-Fraktionen. Dies deutet entgegen den Ergebnissen zur SEC eher auf ein frei im Cytosol vorliegendes Enzym (cEH) hin.

**(II) Lokalisierung:**

- Ultrazentrifugation

Bei der Ultrazentrifugation wird durch Zentrifugation des Überstands sichergestellt, dass Membranbestandteile vollständig abgetrennt werden. In ersten Versuchen konnten keine eindeutigen Ergebnisse mittels Ultrazentrifugation erzielt werden: In einem Versuch waren die E/t-Quotienten im Pellet höher, was für eine mEH sprechen würde, in einem weiteren Versuch war sie im Überstand nach Ultrazentrifugation genau so hoch wie im Überstand vor Ultrazentrifugation. Letzteres deutet auf eine cEH hin.

Die Ergebnisse zur Lokalisierung von EH-1 lieferten sowohl mittels mechanischen Zellaufschluss als auch mittels Ultrazentrifugation kein eindeutiges Ergebnis. Da einige Ergebnisse auf ein membrangebundenes und anderen auf ein frei im Cytosol vorliegendes Enzym hinweisen, handelt es sich bei EH-1 möglicherweise nicht um ein Enzym, sondern um zwei Enzyme. Bei einem Enzym könnte es sich um eine mEH und bei dem anderen Enzym um eine cEH handeln. Diese These wird durch 2 Maxima für den E/t-Quotient in Phosphatpuffer (siehe 4.4.3) und in Tris/EDTA-Puffer (siehe 4.4.4) für die Knockout-Mutante gestützt. Auch ein relativ breiter pH-Bereich für den Isoelektrischen Punkt könnte auf zwei Enzyme hindeuten (siehe 4.6).

## 5. Zusammenfassung

### **Substratherstellung:**

Zur Untersuchung der enzymatischen Umsetzung epoxidierter Fettsäuren in *Saccharomyces* Stämmen wurde zunächst der *cis*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Epoxydecansäuremethylester als Substrat aus 3-Decin-1-ol synthetisiert. Die erfolgreiche Synthese dieses Substrats war die wichtige Grundlage für die folgenden Zellkulturversuche, die Isotopenmarkierung ermöglicht eine eindeutige Unterscheidung der Abbauprodukte zu endogen gebildeten Produkten.

Für den Substratabbau gibt es zwei Möglichkeiten: Auf der einen Seite die *trans*-Hydrolyse (chemisch und evtl. enzymatisch), die unter Inversion der Konfiguration abläuft und die Produkte *threo*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Dihydroxydecansäuremethylester (*threo*-DiOH) bzw. *threo*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Hydroxy-γ-decalacton (*threo*-Lacton) liefert. Auf der anderen Seite den Abbau durch ein bisher unbekanntes Enzym EH-1, welches die Hydrolyse unter Retention der Konfiguration katalysiert und *erythro*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3,4-Dihydroxydecansäuremethylester (*erythro*-DiOH) bzw. *erythro*-[3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Hydroxy-γ-decalacton (*erythro*-Lacton) als Produkte liefert. Dieses unbekanntes Enzym EH-1 stand bei den Zellkulturversuchen im Zentrum dieser Arbeit, demzufolge wurde nur der Abbauweg unter Retention der Konfiguration mit den *erythro*-Produkten näher untersucht.

### **GC-MS Methode:**

Um die Abbauprodukte des Substrats quantitativ zu erfassen und somit Aussagen zur enzymatischen Wirkungsweise von Epoxidhydrolasen treffen zu können, wurde ein Analyseverfahren mittels GC-EI-MS (SIM-Modus) etabliert. Als Messgröße für die enzymatische Umwandlung des Substrats durch das bisher unbekanntes Enzym EH-1 wurde in dieser Arbeit der E/t-Quotient aus der Summe der Konzentrationen der oben genannten *erythro*-Produkte zu der Summe der Konzentrationen der *threo*-Produkte festgelegt.

### **Enzymparameterertest:**

Um die enzymatische Umwandlung des Substrats durch das Enzym EH-1 zu charakterisieren, wurde ein einfach durchzuführender und reproduzierbarer Enzymparameterertest im Miniinkubationsansatz inkl. Probenvorbereitung entwickelt und die Abbauprodukte mittels GC-EI-MS gemessen. Dieser Miniinkubationsansatz stellte die Grundlage für die umfangreichen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit dar und bietet perspektivisch eine gute Möglichkeit zur Untersuchung der enzymatischen Umwandlung durch bereits bekannte Epoxidhydrolasen.

### **Parameteroptimierung:**

In Zellkulturversuchen konnte mit Hilfe des Enzymparametertests die Existenz des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 in einer LTA<sub>4</sub> Hydrolase deletierten Knockout-Mutante *S. cerevisiae* BY4741  $\Delta$ YNL045W (Mutante) nachgewiesen werden. Die LTA<sub>4</sub> Hydrolase, die substratspezifisch LTA<sub>4</sub> unter Retention der Konfiguration hydrolysiert, ist die bisher einzig in *S. cerevisiae* bekannte Epoxidhydrolase. Zur Bestimmung der optimalen Bedingungen für die enzymatische Umwandlung des synthetisierten Substrats durch das Enzym EH-1, wurden verschiedene Inkubationsparameter untersucht.

Bei allen Stämmen stieg mit steigendem pH-Wert der E/t-Quotient an und analog auch die Konzentration des *erythro*-Lactons, *erythro*-DiOH wurde nicht nachgewiesen. Bei den *threo*-Produkten entstand bei Proben mit pH-Werten > 7,5 fast ausschließlich das *threo*-Lacton, die Konzentration von *threo*-DiOH stieg mit sinkendem pH-Wert an. Im stark Sauren lagen zusätzlich hohe Konzentrationen an *threo*-Lacton vor. Auch in Blindwertproben wurde im Alkalischen als *threo*-Produkt v.a. das *threo*-Lacton nachgewiesen und im Sauren v.a. die *threo*-DiOH. *Erythro*-DiOH wurden nicht nachgewiesen und das *erythro*-Lacton lag nur im Spurenbereich vor. Somit wurde nachgewiesen, dass die Bildung der *erythro*-Produkte ausschließlich enzymatisch abläuft.

Für die Mutante wurden in Phosphatpuffer zwei Maxima für das pH-Optimum im pH-Bereich 8,2 bis 8,3 bzw. pH-Bereich 8,7 bis 8,9 nachgewiesen. In Tris/EDTA-Puffer lagen sie im pH-Bereich 8,0 bis 8,2 bzw. pH-Bereich 8,7 bis 8,9. Dabei ergaben sich höhere E/t-Quotienten in Phosphatpuffer. Für den der Mutante entsprechenden *S. cerevisiae* BY4741 Wildtyp (Wildtyp) wurden ebenfalls zwei Maxima im vergleichbaren pH-Bereich nachgewiesen, während es für *S. carlsbergensis* RH (RH Stamm) für beide Puffersysteme nur ein pH-Optimum gab.

In weiteren Zellkulturversuchen wurde mittels Enzymparametertests die Parameter Zellkonzentration (80 mL Zellbrühe auf 10 mL Puffer), Substratkonzentration (0,27 mg/mL), Pufferkonzentration (10 mM) sowie die Dauer der Inkubation (20 bis 24 h) in Phosphatpuffer für das unbekanntes Enzym EH-1 in der Mutante optimiert.

Nach entsprechenden Untersuchungen für Mutante, Wildtyp und RH Stamm konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede bei der enzymatischen Umwandlung durch das Enzym EH-1 zwischen den einzelnen Stämmen in Zusammenhang mit der Zelldichte standen. Bei den meisten Versuchen wurden für den Stamm mit der höchsten Zelldichte auch die höchsten E/t-Quotienten nachgewiesen. Dabei spielten die Parameter der Zellanzucht, Temperatur und Schüttelfrequenz, eine entscheidene Rolle. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde die Zelldichte der Stämme durch unterschiedliche Wachstumszeiträume bei konstanter Temperatur ( $24 \pm 1$  °C) und Schüttelfrequenz angeglichen. So lagen je nach Zelldichte in Mutante, Wildtyp oder RH Stamm die E/t-Quotienten am höchsten.

Obwohl für *S. bayanus* in den Versuchen meist die höchste Zelldichte nachgewiesen wurde, waren die E/t-Quotienten niedriger als für die anderen Stämme. Dies lag möglicherweise an dem unterschiedlichen Genotyp im Vergleich zu den beiden *S. cerevisiae* Stämmen (Mutante und Wildtyp). Bei *S. carlsbergensis* RH handelt es sich um einen Hybrid aus *S. bayanus* und *S. cerevisiae*. Da *S. carlsbergensis* RH in den durchgeführten Untersuchungen Ergebnisse vergleichbar zu denen der *S. cerevisiae* Stämme lieferte, ist davon auszugehen, dass in Bezug auf den Abbau epoxidiertes Fettsäuren die genetische Ausprägung der *S. cerevisiae* dominiert.

#### **Lokalisierung:**

Um das bisher unbekannte Enzym EH-1 in der Knockout-Mutante lokalisieren zu können, wurden im Anschluss, aufbauend auf die Inkubationsparameter, die Bedingungen für einen mechanischen Zellaufschluss mittels Kugelmühle optimiert. Anschließend wurden Pellet und Überstand mittels Zentrifugation bei 15.000 g voneinander getrennt. Membrangebundene Enzyme sind nach dem Zellaufschluss eher im Pellet (mEH) zu finden, frei im Cytosol vorliegende (cEH) eher im Überstand. In der Knockout-Mutante lagen die E/t-Quotienten in Phosphatpuffer im Pellet und in Tris/EDTA-Puffer im Überstand höher. Auch Versuche, bei denen die Zentrifugation mittels Ultrazentrifuge bei 200.000 g durchgeführt wurde, führten nicht zu eindeutigen Ergebnissen bezüglich der Lokalisierung des Enzyms EH-1.

Bei der Enzymcharakterisierung mittels Säulenchromatographie führte die Anwendung verschiedener Methoden zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die Versuche zur Größenausschlusschromatographie wiesen auf ein membrangebundenes, die Versuche zur hydrophoben Interaktionschromatographie auf ein frei im Cytosol vorliegendes Enzym hin.

Für den Wildtyp waren die Ergebnisse bzgl. des Zellaufschlusses ähnlich zur Mutante. In Phosphatpuffer waren die E/t-Quotienten im Pellet und in Tris/EDTA-Puffer im Überstand höher. Abweichend davon waren für den RH Stamm die E/t-Quotienten in Tris/EDTA-Puffer für Überstand und Pellet vergleichbar. Dabei waren die E/t-Quotienten, abhängig von der Zelldichte, insgesamt für den Wildtyp niedriger und für den RH Stamm höher als für die Mutante. Für *S. bayanus* waren die Ergebnisse vergleichbar mit dem RH Stamm, z. T. waren die E/t-Quotienten für die Pelletproben bei *S. bayanus* höher als bei dem RH Stamm.

#### **Isoelektrischer Punkt:**

Für die Versuche zur Isoelektrischen Fokussierung (IEF), die zur Bestimmung des Isoelektrischen Punktes des Enzyms EH-1 dienten, wurden Überstandproben der Mutante in Tris/EDTA-Puffer unter Verwendung verschiedener Ampholyte untersucht. Dabei wurden für jede IEF in mehreren IEF-Fraktionen hohe E/t-Quotienten über einen pH-Bereich von ein bis zwei pH-Einheiten nachgewiesen. Der Isoelektrische Punkt wurde über die Fraktionen mit dem höchsten E/t-Quotienten auf den pH-Bereich 5,15 bis 5,75 eingegrenzt.

Die Ergebnisse für Wildtyp und RH Stamm waren insgesamt vergleichbar zur Mutante, mit einem Isoelektrischen Punkt, der um ein paar pH-Einheiten höher lag. Bei *S. bayanus* gab es zwei Maxima für den E/t-Quotienten im vergleichbaren pH-Bereich. Die Absolutwerte des E/t-Quotienten lagen dabei geringfügig unterhalb derer, die für die anderen Stämme nachgewiesen wurden.

### **Molekulargewicht:**

Das Molekulargewicht (MG) des Enzyms EH-1 konnte in der Mutante auf einen Bereich bis 78 kDa eingegrenzt werden. Dieses Ergebnis entspricht dem in der Literatur beschriebenen MG Bereich für EHs.

Bei der Untersuchung mittels SDS-PAGE wurden für die meisten Fraktionen mit hohem E/t-Quotient zahlreiche Banden zwischen 32,5 kDa und 45,7 kDa nachgewiesen. Da diese z. T. auch in Fraktionen mit niedrigem E/t-Quotient vorlagen konnte keine eindeutige Korrelation zwischen Bandenintensität und enzymatischer Umwandlung des Substrats durch das Enzym EH-1 festgestellt werden. Für alle IEF-Fraktionen mit hohem E/t-Quotient waren geringfügig unterhalb der Markerproteinbande von 32,5 kDa zwei Banden erkennbar, so dass sich hier eine eindeutige Korrelation zwischen Bandenintensität und enzymatischer Umwandlung des Substrats durch das Enzym EH-1 ergab. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das MG des bisher unbekanntes Enzyms EH-1 ca. 30 kDa beträgt. Dies ist insofern hervorzuheben, da für eine Epoxidhydrolase in Sojabohnen bei vergleichbarem IEP (pH-Wert 5,4) ein MG von  $32 \pm 1$  kDa nachgewiesen wurde.

Bei entsprechenden Untersuchungen der Fraktionen mit hohem E/t-Quotient von Wildtyp und RH Stamm waren im SDS-Gel zur Mutante vergleichbare Bandenmuster erkennbar. Das Bandenmuster von *S. bayanus* war abweichend, bei diesem Stamm waren deutlich mehr Proteinbanden zu erkennen als bei den anderen drei Stämmen.

Insgesamt konnte die Existenz eines bisher unbekanntes Enzyms EH-1, welches epoxidierte Fettsäuren in ihre vicinalen Diole umwandelt, in der Knockout-Mutante *S. cerevisiae* BY4741  $\Delta$ YNL045W nachgewiesen und verschiedene Parameter für die optimale Wirkungsweise des Enzym entwickelt werden.

Da die Ergebnisse zur Lokalisierung des Enzyms EH-1 in einigen Untersuchungen auf ein membrangebundenes und in anderen auf ein frei im Cytosol vorliegendes Enzym hinweisen, handelt es sich dabei möglicherweise nicht um ein Enzym, sondern um verschiedene Enzyme. Dabei konnte es sich bei einem Enzym um eine mEH und bei einem anderen Enzym um eine cEH handeln. Diese These wird durch zwei Maxima für das pH-Optimum in Phosphat- und in Tris/EDTA-Puffer gestützt. Auch ein relativ breiter pH-Bereich für den Isoelektrischen Punkt und viele Banden im SDS-Gel könnten auf verschiedene Enzyme hindeuten.

## 6. Literaturverzeichnis

---

- [1] Arand M et al. (1999) Cloning and molecular characterization of a soluble epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* that is related to mammalian microsomal epoxide hydrolase. *Biochem. J.* Vol. 344, S. 273–280
- [2] Seidegard, J. / Depierre, J. W. (1983) Microsomal epoxide hydrolase properties, regulation and function. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. 695(3-4), S. 251-270
- [3] Stark, R. E. / Tian, S. (2006) The Cutin biopolymer matrix. *Blackwell Publishing.* S.145-181
- [4] Moran, J. H. / Weise, R., Schnellmann, R. G / Freeman, J. P.;/ Grant, D. F. (1997) Cytotoxicity of linoleic acid diols to renal proximal tubular cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* Vol. 146 (1), S. 53-59
- [5] Zheng, J / Plopper, C. G. / Lakritz, J / Storms, D. H. / Hammock, B. D. (2001) Leukotoxin-Diol – A Putstive Toxic Mediator Involved in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Vol. 25
- [6] Gerwick, W. H. / Moghaddam, M. / Hamberg, M. (1991) Oxylin metabolism in the red alga *Gracilaria lemaneiformis*: mechanism of formation of vicinal dihydroxy fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 290, S 436 – 444
- [7] Samuelson, B. / Dahlän, S. E. / Lindgren, J. Ü. / Rouzer, C. A. / Serhan, C. N. (1987) Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis and biological effects. *Science*, Vol. 237, S. 1171 – 1175
- [8] Samuelsson, B (1983) Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science.* Vol. 220 (4597), S. 568–575
- [9] Funk, C. D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* Vol. 294 (5548), S. 1871–1875
- [10] Bellucci, G. / Chiappe, C. / Marioni, F. / Benetti, M. (1991) Regio- and Enantioselectivity of the Cytosolic Epoxide Hydrolase-Catalysed Hydrolysis of Monosubstituted Alkyloxiranes. *J Chem Soc, Perkin Trans.* Vol. 1, S. 361–363
- [11] Arahira, M. / Nong, V. H. / Udaka, K. / Fukazawa, C. (2000) Purification, molecular cloning and ethylene-inducible expression of a soluble-type epoxide hydrolase from soybean. *Eur J Biochem.* Vol. 267, S. 2649–2657
- [12] Debernard, S. / Morisseau, C. / Severson, T.F. / Feng, L. / Wojtasek, H. / Prestwich, G. D. / Hammock, B. D. Expression and characterization of the recombinant juvenile hormone epoxide hydrolase (JHEH) from *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* Vol. 28 (5-6), S. 409–419
- [13] Faber, K. / Mischitz, M. / Kroutil, W. (1996) Microbial epoxide hydrolases. *Acta Chem Scand .* Vol 50, S. 249
- [14] Krenn, W. / Osprian, I. / Kroutil, W. / Braunegg, G. / Faber, K. (1999) Bacterial epoxide hydrolases of opposite enantiopreference. *Biotechnol Lett.* Vol. 21, S. 687

- 
- [15] Orru, R. V. / Faber, K. (1999) Stereoselectivities of microbial epoxide hydrolases. *Curr Opin Chem Biol.* Vol. 3 (1), S. 16–21
- [16] Kim, H.S. / Lee, S. J. / Lee, E. J. / Hwang, J.W. / Park, S. / Kim, S. J. / Lee, E. Y. (2005) Cloning and characterization of a fish microsomal epoxide hydrolase of *Danio rerio* and application to kinetic resolution of racemic styrene oxide. *J of Mol Catal B Enzym.* Vol. 37, S. 30–35
- [17] Pedragosa-Moreau, S. / Archelas, A. / Furstoss, R. (1996) Microbiological transformations Part 32: Use of epoxide hydrolase mediated biohydrolysis as a way to enantiopure epoxides and vicinal diols: Application to substituted styrene oxides. *Tetrahedron.* Vol. 52, S. 45
- [18] Grogan, G. / Roberts, S. M. / Willetts, A. J. (1996) Novel aliphatic epoxide hydrolase activities from dematiaceous fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* Vol. 141 (2-3), S. 239–243
- [19] Choi, W. J. / Huh, E. C. / Park, H. J. (1998) Kinetic resolution for optically active epoxides by microbial enantioselective hydrolysis. *Biotechnol. Tech.* Vol. 12, S. 225
- [20] Weijers, C. A. (1997) Enantioselective hydrolysis of aryl, alicyclic and aliphatic epoxides by *Rhodotorula glutinis*. *Tetrahedron.* Vol. 8, S. 639
- [21] Weijers, C. A. / de Bont, J. A. (1999) Epoxide hydrolases from yeasts and other sources : versatile tools in biocatalysis. *J Mol Catal B Enzym.* Vol. 6, S. 199
- [22] Newman, J. W. / Morisseau, C. / Hammock, B. D. (2005) Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Prog. Lipid Res.* Vol. 44 (1), S. 1–51
- [23] Barili, P. L. / Berti, G. / Mastroilli, E. (1993) Regio- and stereochemistry of the acid catalyzed and of a highly enantioselective enzymatic hydrolysis of some epoxytetrahydrofurans. *Tetrahedron Letters.* Vol. 49, S. 62-63
- [24] Bellucci, G. / Chiappe, C. / Cordoni, A. / Marioni, F. (1994) Different enantioselectivity and regioselectivity of the cytosolic and microsomal epoxide hydrolase catalyzed hydrolysis of simple phenyl substituted epoxides. *Tetrahedron Letters.* Vol. 35, S. 42-49
- [25] Bellucci, G. / Chiappe, C. / Ingrosso, G. (1994) Kinetics and stereochemistry of the microsomal epoxide hydrolase-catalyzed hydrolysis of cis-stilbene oxides. *Chirality.* Vol. 6 (7), S. 577–582
- [26] Dietze, E. C. / Kuwano, E. / Hammock, B. D. (1993) The interaction of cytosolic epoxide hydrolase with chiral epoxides. *Int. J. Biochem.* Vol. 25 (1), S. 43–52
- [27] Williamson, K. C. / Morisseau, C. / Maxwell, J. E. / Hammock, B. D. (2000) Regio- and enantioselective hydrolysis of phenyloxiranes catalyzed by soluble epoxide hydrolase. *Tetrahedron Letters.* Vol. 11, S. 44-51
- [28] Moghaddam, M. F. / Grant, D. F. / Cheek, J. M. / Greene, J. F. / Williamson, K. C. / Hammock, B. D. (1997) Bioactivation of leukotoxins to their toxic diols by epoxide hydrolase. *Nat. Med.* Vol. 3 (5), S. 562–566

- 
- [29] Sinal, C. J. / Miyata, M. / Tohkin, M. / Nagata, K. / Bend, J. R. / Gonzalez, F. J. (2000) Targeted disruption of soluble epoxide hydrolase reveals a role in blood pressure regulation. *J. Biol. Chem.* Vol. 275 (51), S. 40504–40510
- [30] de Jong, D. J. / van der Logt, E. M. / van Schaik, A. / Roelofs, H. M. / Peters, W. / Naber, T. H. (2003) Genetic polymorphisms in biotransformation enzymes in Crohn's disease: association with microsomal epoxide hydrolase. *Gut.* Vol. 52 (4), S. 547–551
- [31] Baxter, S. W. / Choong, D. Y. / Campbell, I. G. (2002) Microsomal epoxide hydrolase polymorphism and susceptibility to ovarian cancer. *Cancer Letters.* Vol. 177 (1), S. 75–81
- [32] Haeggström, J. Z. / Kull, F. / Rudberg, P. C. / Tholander, F. / Thunissen, M. M. (2002) Leukotriene A4 Hydrolase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* Vol. 68-69, S.495 – 510
- [33] Armstrong, R. N. (1999) Kinetic and chemical mechanism of epoxide hydrolase. *Drug Metal Rev.* Vol. 31, S. 71–86
- [34] Blée, E. / Schubert, F. (1992) Occurrence of fatty acid epoxide hydrolases in soybean (*Glycine max*). *J Biochem:* Vol. 282, S. 711–714
- [35] Blée, E. / Schubert, F. (1995) Stereocontrolled hydrolysis of the linoleic acid monoepoxide regioisomers catalyzed by soybean epoxide hydrolase. *J. Biochem.* Vol. 230, S. 229–234
- [36] Nuhn, P. (1993) Biochemische Grundlagen toxischer Wirkungen von Pharmaka und anderen Xenobiotika. *Pharm. Uns. Zeit.* Vol. 22, S. 119-133
- [37] Lacourciere, G. M. / Armstrong, R. N. (1993) The catalytic mechanism of microsomal epoxide hydrolase involves an ester intermediate. *J Am Chem Soc.* Vol. 115, S. 10466–10467
- [38] Borhan, B. / Jones, A. D. / Pinot, F. / Grant, D. F. / Kurth, M. J. / Hammock, B. D. (1995) *Mechanism of soluble epoxide hydrolase.* Formation of an alpha-hydroxy ester-enzyme intermediate through Asp-333. *J. Biol. Chem.* Vol. 270 (45), S. 26923–26930
- [39] Rink, R. / Janssen, D. B. (1998) Kinetic Mechanism of the Enantioselective Conversion of Styrene Oxide by Epoxide Hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1. *Biochemistry.* Vol. 37, S. 18119–18127
- [40] Cherdron, H. / Ohse, H. / Korte, F. (1962) Die Polymerisation von Lactonen. 1. Homopolymerisation 4-gliedriger, 6-gliedriger und 7 gliedriger Lactone mit kationischen Initiatoren. *Die Makromolekulare Chemie.* Vol. 56, S. 179–186
- [41] Vollhardt, K. P./ Butenschön, H. / Elvers, B. / Schore, N. E. (2009) Organische Chemie. 4. Aufl., 2. Nachdr. Weinheim: Wiley-VCH. S. 410-411, 590ff
- [42] Kull, F. / Ohlson, E. / Haeggström, J. Z. (1999) Cloning and Charakterization of a Bifunctional Leukotriene A4 Hydrolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* Vol. 274, S. 34683-34690
- [43] Wetterholm, A. / Haeggström, J. Z. (1992) Leukotriene A4 hydrolase: an anion activated peptidase. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. 1123 (3), S. 275–281

- 
- [44] Haeggström, J. Z. (2004) Leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase, the gatekeeper of chemotactic leukotriene B4 biosynthesis. *J. Biol. Chem.* Vol. 279 (49), S. 50639–50642
- [45] Kull, F. / Ohlson, E. / Lind, B. / Haeggström, J. Z. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* leukotriene A4 hydrolase: formation of leukotriene B4 and identification of catalytic residues. *Biochemistry.* Vol. 40, S. 12695-12703
- [46] Blomster Andberg, M. / Hamberg, M. / Haeggström, J.Z. (1997) Mutation of Tyrosine 383 in Leukotriene A4 Hydrolase Allows Conversion of Leukotriene A4 into 5S,6S-Dihydroxy-7,9-trans-11,14-cis-eicosatetraenoic. *Acid J Biol Chem.* Vol. 272, S. 23057–23063
- [47] Gatfield, I. L. / Güntert, M. / Sommer, H. / Werkhoff, P. (1993) Some aspects of the microbiological production of flavor-active lactones with particular reference to  $\gamma$ -decalactone. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* Vol. 15, S. 165–170
- [48] Waché, Y. / Aguedo, M. Choquet, M. / Gatfield, I. L. / Nicaud, J.-M. / Belin, J.-M. (2001) Role of  $\beta$ -Oxidation Enzymes in  $\gamma$ -Decalactone Production by the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 67 (12) S. 5700-5704
- [49] Garbe; L.-A. / Tressl, R. (2004) Metabolism of Deuterated *threo*-Dihydroxy Fatty Acids in *Saccharomyces cerevisiae*: Enantioselective Formation and Characterization of Hydroxylactones and  $\gamma$ -Lactons. *Helvetica Chimica Acta*, Vol. 87, S. 180-196
- [50] Garbe; L.-A. / Morgenthal, K. / Kuscher, K. / Tressl, R. (2008) Metabolism of Deuterated *erythro*-Dihydroxy Fatty Acids in *Saccharomyces cerevisiae*: Enantioselective Formation and Characterization of Hydroxylactones. *Helvetica Chimica Acta*, Vol. 91, S. 993-1007
- [51] Albrecht, W. (1991) Untersuchung zur Biosynthese chiraler aliphatischer Lactone in Früchten und Mikroorganismen. Dissertation - TU Berlin. S.197 ff
- [52] Rali, T. / Wossa, S. W. / Leach, D. N. (2007) Comparative Chemical Analysis of the Essential Oil Constituents in the Bark, Heartwood and Fruits of *Cryptocarya massoy* (Oken) Kosterm. (Lauraceae) from Papua New Guinea. *Molecules.* Vol. 12/2, S.149-154
- [53] Krings, U. / A Berger, R. G. (1998) Biotechnological production of flavours and fragrances. *J Applied Microbiology and Biotechnology.* Vol. 49 (1), S. 1-8.
- [54] Serra, S. / Claudio Fuganti, C. / Brenna, E. (2005) Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends in Biotechnology.* S. 193-198
- [55] Cheetham, P. (1993) The use of biotransformation for the production of flavours and fragrances. *Trends in Biotechnology.* Vol. 11, S. 478–488
- [56] Engel, K. H. / Schreier, P. (1988) Investigation of chiral compounds in biological systems by chromatographic micromethods. *Bioflavor.* Vol. 87, S.75-88

- 
- [57] Mosandl, A. (1988) Chirality in flavor chemistry - recent developments in synthesis and analysis. *Food Review International*. Vol. 1
- [58] Ikan, R. / Gottlieb, G. / Bergmann, E. D. (1969) Lipids of the queen of the oriental hornet, *Vespa orientalis*. *Journal of Insect Physiology*. Vol. 15, S.1909 ff
- [59] Yarger, R. G. / Silverstein, R. M. / Burkholder, W. E. (1975) Sex pheromone of the female dermestid beetle *Trogoderma glabrum*. *Journal of Chemical Ecology*. Vol. 1, S.323-334
- [60] Phelau, P. L. / Silk, P. J. / Northcott, C. J. (1986) Chemical identification and behavioral characterization of the male wing pheromone of *Ephesia elutella*. *Journal of Chemical Ecology*. Vol. 12, S.135-146
- [61] Wheeler, J. W. / Happ, G. M. / Aranjó, J. (1972)  $\gamma$ -Dodecalactone from rove beetles. *Tetrahedron Letters*. Vol. 46, S.4635-4638
- [62] Dettner, K. / Schwinger, G. (1982) Defensive secretions of three oxytelinae rove beetles - Coleoptera staphylinidae. *Journal of Chemical Ecology*. Vol. 8, S.1411-1420
- [63] Bulmer, M. S. / Bachelet, I. / Raman, R. (2009) Targeting an antimicrobial effector function in insect immunity as a pest control strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 106 (31), S.12652-12657
- [64] Schlegel, H.G. / Fuchs, G. (2007) Allgemeine Mikrobiologie. *Thieme Verlag, Stuttgart*. 8. Auflage
- [65] Krämer, J. (2002) Lebensmittel-Mikrobiologie. *Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart*. 4. Auflage. S.19-21
- [66] Kayse, O. / Aversch, N. (2015) Technische Biochemie – Die Biochemie und industrielle Nutzung von Naturstoffen. *Springer Spektrum*. 1. Auflage
- [67] Nevoigt, E. (2008) Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Vol. 72 (3), S. 379
- [68] Rungupha, W. / Keasling J. D. (2014) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals. *Metab Eng.* Vol. 21, S. 103-113
- [69] Goffeau A et al. (1996) Life with 6000 Genes. *Science*. Vol. 274, S. 546-567
- [70] Spradling A et al. (2006) New Roles for Model Genetic Organisms in Understanding and Treating Human Disease: Report From The 2006 Genetics Society of America Meeting. *Genetics*. Vol. 172, S. 2025–2032
- [71] Ferrer-Miralles, N. / Domingo-Espín, J. / Corchero, J. L. / Vázquez, E. / Villaverde, A.(2009) Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories*. Vol. 8, S. 17
- [72] McAleer, W. J. et al. (1984) Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature*. Vol. 307, S. 178 – 180

- 
- [73] Tamai, Y. / Momma, T. / Yoshimoto, H. / Kaneko, Y. (1998) Co-existence of two types of chromosome in the bottom fermenting yeast, *Saccharomyces pastorianus*. *Yeast*. Vol. 14, S. 1195-1203
- [74] Montrocher, R. *et al* (1998) Phylogenetic Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* Group Based on Polymorphisms of the rDNA Spacer Sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* Vol. 48, S. 295–303
- [75] Reiff F *et al.*(1962) Die Hefen-Band 2. Technologie der Hefen. Hans Carl Verlag, Nürnberg
- [76] Cherry, J. M. / Hong, E. L. / Amundsen, C. (2011) *Saccharomyces* Genome Database: the genomic resource of budding yeast. *Nucleic Acids Research*. S.1-6
- [77] Wach, A. / Brachat, A. / Pohlmann, R. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. Vol. 10, S.1793-1808
- [78] Galperin, M. Y. / Fernandez-Suarez, X. M. (2012) The 2012 Nucleic Acids Research Database Issue and the online Molecular Biology Database Collection. *Nucleic Acids Research*. Vol. 40, D1-D8
- [79] Kim, D.-U. / Hayles, J. / Kim, D. (2010) Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature Biotechnology*. Vol. 28, S.617-623
- [80] Haffner, T. (1997) Untersuchungen zum Metabolismus ungesättigter Fettsäuren unter besonderer Berücksichtigung der Bildung chiraler aliphatischer Lactone in Hefen. *Dissertation*.TU Berlin.
- [81] Lange, H. (2001) Untersuchung des Metabolismus ungesättigter Hydroxyfettsäuren in Hefen. *Dissertation*.TU Berlin.
- [82] Garbe, L.-A. (2002) Untersuchungen zum Metabolismus von Mono- und Dihydroxyfettsäuren in Hefen. *Dissertation*.TU Berlin.
- [83] Minuth, D. Charakterisierung des Abbaus von Epoxyfettsäuren in Hefen. (2007) *Dissertation*.TU Berlin.
- [84] Lehninger, A. L. / Nelson, D. L. / Cox, M. M. (1994) Prinzipien der Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin*. 2. Auflage.
- [85] Gurvitz, A. / Wabnegger, L. / Yagi, A. I. / Binder, M. / Hartig, A. / Ruis, H. / Hamilton, B. / Dawes, I. W. / Hiltunen, J. K. / Rottensteiner, H. (1999). Function of human mitochondrial 2,4-dienoyl-CoA reductase and rat monofunctional Delta3-Delta2-enoyl-CoA isomerase in beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *Biochem. J.* Vol. 344, S. 903 – 914
- [86] Allenbach, L. / Poirier, Y. (2000). Analysis of the alternative pathways for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids usingtransgenic plants synthesizing polyhydroxyalkanoates in peroxysomes. *Plant Physiol.* Vol. 124, S.1159 – 1168
- [87] Hunsen, M. (2005) Synthesis - Carboxylic Acids from Primary Alcohols and Aldehydes by a Pyridinium Chlorochromate Catalyzed Oxidation”, *Synthesis*. Vol. 15. S.2487-2490

- 
- [88] Supelco (1997) *BSTFA Product specification 1997*.  
<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4800/4746.pdf> (abgerufen am 25.5.2014)
- [89] Liang, Q. / Richardson, T. (1992). A simple and rapid method for screening transformant yeast colonies using PCR. *BioTechnique*. Vol. 13, S. 730 - 732, 735
- [90] Purves, W. / Sadava, D. / Orians, G. (2001) *Life: The Science of Biology*. 6.Auflage. S.210-217
- [91] Lottspeich, F. / Engels, J. W. (2012) *Bioanalytik*. Springer *Spektrum*, 3. Auflage
- [92] Romeis, B. (1968) *Mikroskopische Technik*. R. Oldenbourg Verlag, München. 16. Auflage
- [93] Berg, J. M. / Tymoczko, J. L. / Stryer L. (2010) *Stryer-Biochemie*. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*. 6.Auflage
- [94] Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. Vol. 72, S. 248-254
- [95] Al-Tubuly, AA. (2000) SDS-PAGE and Western Blotting. *Methods Mol Med.*, Vol. 40. S. 391-405
- [96] Sigma-Aldrich. DL-Dithiothreitol; 2014  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/d0632?lang=de&region=DE> (abgerufen am 25.4.2014)
- [97] Brückner, R. (2003) *Reaktionsmechanismen*. *Spektrum-Verlag, Heidelberg/Berlin*. 2. Auflage. S.750–758
- [98] Holleman, A. F. / Wilberg, N. / Vilberg, N. (2007) *Lehrbuch der anorganischen Chemie*. de Gruyter, Berlin. 102. Auflage
- [99] Hunsen, M. (2005) Pyridinium chlorochromate catalyzed oxidation of alcohols to aldehydes and ketones with periodic acid. *Tetrahedron Letters*. Vol. 46, S.1651-1653
- [100] Hallaq, Y. / Beckert, T. C. / Manno, C. S. / Laposata, M. (1993) Use of Acetyl Chloride/Methanol for Assumed Selective Methylation of Plasma Nonesterified Fatty Acids Results in Significant Methylation of Esterified Fatty Acids. *Lipids*. Vol. 28 (4), S.355-360
- [101] Overman, L. E. / Brown, M. J. / Mccann, S. F. (1993) (Z)-4-(Trimethylsilyl)-3-Buten-1-ol. *Organic Syntheses Collected*. Vol. 8, S.60
- [102] Thörner, S. / Knoke, L. / Garbe, L.-A. (2013) Analytik der enzymatischen Umsetzung von epoxidierten Fettsäuren in *Saccharomyces* Stämmen mittels GC-SIM-MS. 42. *Deutscher Lebensmittelchemikertag Braunschweig*.
- [103] Wixtrom, R. / Hammock, B. D. (1985) Membrane-bound and Soluble-Fraction Epoxide Hydrolases. In Zakim, D. / Vessey, D. A. (Eds.), *Biophysical Pharmacology and Toxicology Methodological Aspects of Drug Metabolism*. *John Wiley, New York* S. 1-93

---

[104] Nyborg, J. K. / Peersen, O.B. (2004) That zincing feeling: the effects of EDTA on the behaviour of zinc-binding transcriptional regulators. *Biochem. J.* Vol. 381 (3), S. 3-4

[105] Loo van, B. / Kingma, J. / Arand, M. / Wubbolts, M. G. / Janssen, D. B. (2006) Diversity and Biocatalytic Potential of Epoxide Hydrolases Identified by Genome Analysis. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 72 (4); S. 2905-2917