

EVA GRIESSER

IMPLEMENTIERUNG VON METHODEN FÜR DIE  
QUALITATIVE UND QUANTITATIVE ANALYSE VON  
METABOLITEN DES LIPIDMETABOLISMUS MIT  
CHROMATOGRAPHIE UND MASSENSPEKTROMETRIE

MASTERARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades  
„Master of Science“

an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Technischen Universität Graz

Mag. Dr. Gerald N. Rechberger

DI Dr. Klaus Natter

Univ.-Prof. DI Dr. Sepp D. Kohlwein

Institut für Molekulare Biowissenschaften

Karl-Franzens-Universität Graz

2011/2012

# Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Methode für die Analyse von Redox-Coenzymen des Zellstoffwechsels in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* etabliert. Außerdem wurde eine Routinemethode für die Quantifizierung von Aminosäuren in Hefemedien entwickelt. Diese Arbeiten sollen zur Verbesserung einer auf einem Computermodell basierenden Analyse von metabolischen Flüssen beitragen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Pyridindinukleotide NAD(P)(H) aus Hefezellen analysiert. Diese essentiellen Coenzyme werden für fast alle reduzierenden und oxidierenden Reaktionen in einer Zelle gebraucht. Große Mengen an NADH entstehen in der Glykolyse und im Citratzyklus. Die Hauptquelle von NADPH ist der oxidative Zweig des Pentosephosphatwegs, der zwei Moleküle NADPH produziert. Eine weitere wichtige NADPH-Quelle ist in Hefe die Oxidation von Acetaldehyd zu Acetat. NADPH wird bei den Synthesen von Aminosäuren, Fettsäuren und Ergosterol benötigt. Die Synthese von Palmitinsäure (C16:0) erfordert z. B. 14 NADPH-Moleküle.  $\text{NAD}^+$  wird bei abbauenden Reaktionen verbraucht.

Um den Einfluss des Redox-Haushaltes auf den Lipidmetabolismus zu untersuchen, wurde eine HPLC-Methode für die qualitative und quantitative Analyse von allen vier Pyridindinukleotiden etabliert. Dabei wurden die oxidierten Moleküle  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  mit Cyanid derivatisiert. Im Gegensatz zu  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  konnten die phosphorylierten Dinukleotide aus Hefeextrakten aufgrund zu geringer Konzentration nicht quantifiziert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine Methode für die quantitative Analyse von Aminosäuren im Kulturmedium etabliert, um metabolische Flüsse von Kohlenstoff und Stickstoff im Zusammenhang mit dem Lipidmetabolismus zu beurteilen. Aminosäuren wurden durch Derivatisierung mit Methylchlorformiat zu flüchtigen Analyten für die GC-MS-Analyse umgewandelt. Die Methode erlaubt eine schnelle Analyse und simultane Detektion der Aminosäurekonzentration in einem typischen synthetischen Hefemedium, das neben den Aminosäuren auch Glucose, Mineralsalze, Vitamine und Spurenelemente enthält. Die Analyse zeigte die unterschiedlichen Aminosäuren-Aufnahmegeschwindigkeiten während des Zellwachstums und bestimmte Aminosäure-Limitierungen im Standard-Hefemedium. Daraus resultiert ein signifikanter Einfluss auf die Lipidkomposition, abhängig von der Wachstumsphase.

# Abstract

In this work a method for the analysis of redox coenzymes in cell metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been established. Furthermore a routine method for the quantification of amino acids in yeast media has been developed. These analyses should contribute to the improvement of computer model-based analysis of metabolic fluxes.

In the first part of the work the pyridine dinucleotides NAD(P)(H) in yeast cells have been analysed. These essential coenzymes are used in the majority of reductive and oxidative reactions in a cell. NADH is mainly produced in glycolysis and in the citric acid cycle. The major source of NADPH is the oxidative branch of the pentose phosphate pathway, which produces two molecules of NADPH. In addition, the oxidation of acetaldehyde to acetate is an important source of NADPH in yeast. Most of the NADPH is used for the synthesis of amino acids, fatty acids and ergosterol. The synthesis of palmitic acid (C16:0) for example requires 14 NADPH molecules. NAD<sup>+</sup> is consumed in oxidative catabolic reactions.

To investigate the influence of the redox state on lipid metabolism we established a HPLC method for the qualitative and quantitative analysis of all four pyridine dinucleotides. For this purpose the oxidized molecules (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>) were derivatized with cyanide. In contrast to NAD<sup>+</sup>/NADH the phosphorylated dinucleotides from yeast extracts could not be quantified due to their low concentration below the detection limit.

In the second part of the work a method has been established to quantify amino acids in yeast culture media. This will allow to assess metabolic fluxes of carbon and nitrogen related to lipid metabolism.

We used a GC-MS method to analyze the changes of AA levels in cell culture media during cell growth. AA were converted to volatile analytes by derivatization with methylchloroformate. The method allows rapid analysis and simultaneous detection of AA levels in a typical yeast synthetic medium containing glucose, mineral salts, vitamins and trace elements. The analysis demonstrated different AA uptake rates during cell growth and certain AA limitations in standard yeast media dependent on growth phase, with significant impact on lipid composition.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Zellmetabolismus in Hefe . . . . .	1
1.1.1	Kohlenstoffmetabolismus . . . . .	1
1.1.2	Lipidmetabolismus . . . . .	2
1.2	Pyridindinukleotide NAD(P)(H) . . . . .	5
1.2.1	Struktur, Eigenschaften, Stabilität . . . . .	5
1.2.2	Biosynthese . . . . .	6
1.2.3	Funktion . . . . .	6
1.3	Aminosäuren im Wachstumsmedium . . . . .	8
1.4	Chromatographie . . . . .	9
1.4.1	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) . . . . .	9
1.4.2	Gaschromatographie (GC) . . . . .	9
1.5	Massenspektrometrie (MS) . . . . .	10
1.5.1	Ionisationsmethoden . . . . .	10
1.5.2	Analysatoren . . . . .	13
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>15</b>
3.1	Geräte- und Chemikalienliste . . . . .	15
3.2	Zellkultur . . . . .	15
3.2.1	Stämme . . . . .	15
3.2.2	Medien . . . . .	15
3.3	Analyse von Aminosäuren . . . . .	16
3.3.1	Anzucht und Wachstumskurve . . . . .	16
3.3.2	Probenvorbereitung . . . . .	17
3.3.3	GC-MS-Methode . . . . .	18
3.3.4	Quantifizierung, Standards . . . . .	18
3.4	Analyse von NAD(P)(H) . . . . .	19
3.4.1	Anzucht und Zellernte . . . . .	19
3.4.2	Probenvorbereitung . . . . .	19

3.4.3	HPLC-Methode . . . . .	21
3.4.4	Standards für die Quantifizierung . . . . .	22
<b>4</b>	<b>Resultate</b>	<b>23</b>
4.1	Analyse von NAD(P)(H) . . . . .	23
4.1.1	Methodenentwicklung . . . . .	23
4.1.2	Überprüfen der Isomerpeaks mit Massenspektrometrie . . . . .	28
4.1.3	Stabilität . . . . .	30
4.1.4	Quantifizierung . . . . .	31
4.1.5	Entwicklung der Extraktion von NAD(P)(H) aus Hefezellen . . . . .	32
4.1.6	Ergebnisse der Analyse von NAD(P)(H) aus Hefezellen . . . . .	36
4.2	Analyse von Aminosäuren . . . . .	40
4.2.1	Qualitative Analyse . . . . .	40
4.2.2	Quantitative Analyse . . . . .	44
4.2.3	Analyse von Realproben . . . . .	47
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>52</b>
5.1	Analyse von NAD(P)(H) . . . . .	52
5.1.1	Methodenentwicklung . . . . .	52
5.1.2	Ergebnisse der Analyse aus Hefezellen . . . . .	55
5.2	Analyse von Aminosäuren . . . . .	56
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>58</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>60</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>62</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Kohlenstoffmetabolismus in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	2
1.2	<i>de novo</i> Fettsäuresynthese und Ergosterolsynthese in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	3
1.3	Synthese von Phospholipiden und Triacylglycerolen in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	4
1.4	Struktur von NAD(P)(H) . . . . .	5
1.5	Synthese von NAD(P) <sup>+</sup> . . . . .	6
1.6	Reaktionswege, die NADPH produzieren . . . . .	7
1.7	Schema einer ESI-Quelle . . . . .	11
1.8	Schema einer EI-Quelle . . . . .	12
1.9	Schema eines Reflektor-TOF-Analysators . . . . .	13
3.1	Temperaturprogramm der GC-MS-Methode für die Aminosäurenanalyse . .	18
4.1	Reaktionsschema der Derivatisierung von NAD <sup>+</sup> und NADP <sup>+</sup> mit Cyanid .	23
4.2	Chromatogramme von NAD(P)(H) bei unterschiedlichen pH-Werten . . . .	25
4.3	Chromatogramme der vier Analyten, einzeln und gemeinsam . . . . .	27
4.4	Chromatogramm von NAD(P)(H) mit optimiertem Gradienten . . . . .	28
4.5	Chromatogramm und Spektren der NADP-CN Isomere . . . . .	28
4.6	Chromatogramm und Spektren der NAD-CN Isomere . . . . .	29
4.7	Chromatogramme und Spektren von NADPH und NADH . . . . .	29
4.8	Chromatogramme und Spektren von Peaks bei m/z 540 und m/z 620 . . .	30
4.9	Stabilität von NAD(P)(H) . . . . .	31
4.10	Kalibrationsgeraden von NAD(P)(H) . . . . .	32
4.11	Arbeitsschema zur Extraktion von NAD(P)(H) aus Hefezellen . . . . .	34
4.12	Chromatogramm einer Realprobe, behandelt mit CN <sup>-</sup> . . . . .	34
4.13	Chromatogramm einer Realprobe, behandelt mit KOH . . . . .	35
4.14	Verhältnis NAD <sup>+</sup> /NADH zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums . .	37
4.15	Reaktionsgleichung der Derivatisierung von Aminosäuren . . . . .	40
4.16	Chromatogramm und Massenspektrum vom derivatisierten Methionin . . .	41
4.17	Massenspektrum der derivatisierten Glutaminsäure . . . . .	42

4.18	Chromatogramme und Spektren von Serin und Threonin . . . . .	43
4.19	Struktur von Arginin . . . . .	44
4.20	Kalibrationsgeraden von Asparaginsäure, Glutaminsäure, Methionin und Phenylalanin . . . . .	45
4.21	Kalibrationskurven von Tyrosin und Lysin . . . . .	45
4.22	Bestimmung der „signal to noise ratio“ eines Peaks . . . . .	46
4.23	Wachstumskurve von Hefewildtyp inkubiert in Minimalmedium . . . . .	48
4.24	Verlauf des Peakflächenverhältnisses Probe/iS von Lysin, Tyrosin und Tryp- tophan im Kulturmedium während des Hefewachstums . . . . .	49
4.25	Verlauf der Konzentration von Asparaginsäure, Glutaminsäure und Phe- nylalanin im Kulturmedium während des Hefewachstums . . . . .	49
4.26	Verlauf der Konzentration von Leucin und Methionin im Kulturmedium während des Hefewachstums . . . . .	50
4.27	Verlauf der Konzentration von Serin und Threonin im Kulturmedium wäh- rend des Hefewachstums . . . . .	50
4.28	Verlauf der Konzentration von Valin im Kulturmedium während des Hefe- wachstums . . . . .	51

## Tabellenverzeichnis

3.1	Genotypen der verwendeten Hefestämme . . . . .	15
3.2	YPD-Medium, in H <sub>2</sub> O bidest. . . . .	16
3.3	Aminosäurestock optimiert, 50x, in H <sub>2</sub> O bidest. . . . .	16
3.4	Minimalmedium optimiert, in H <sub>2</sub> O bidest. . . . .	16
3.5	GC-MS-Methode . . . . .	18
3.6	Aminosäurekonzentrationen der Stocklösungen . . . . .	19
3.7	Derivatisierungsreagenz für die Analyse von NAD(P)(H) . . . . .	20
3.8	Gradient der HPLC-Methode . . . . .	21
4.1	Gradient von Klaidman et al. . . . .	24
4.2	ursprünglicher Gradient der HPLC-Methode . . . . .	26
4.3	Detektionslimit von NAD(P)(H) . . . . .	32

4.4	Ergebnisse der Analyse von NAD(H) im Hefewildtyp zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums, bezogen auf das Nassgewicht . . . . .	37
4.5	Ergebnisse der Analyse von NAD(H) im Hefewildtyp zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums, bezogen auf theoretisches Trockengewicht . . . . .	38
4.6	Werte aus der Literatur, bezogen auf das Trockengewicht . . . . .	38
4.7	Ergebnisse der Analyse von NAD(H) aus den Hefestämmen <i>ald6Δ</i> , BY4741, BY4741(ZWF1) und BY4741(EV) . . . . .	39
4.8	Retentionszeiten und charakteristische Massenzahlen der Aminosäuren . . . . .	41
4.9	Detektionslimits der Aminosäuren . . . . .	46
4.10	charakteristische Parameter des iS . . . . .	47
6.1	Geräteliste . . . . .	58
6.2	Chemikalienliste . . . . .	59



# 1 Einleitung

Der Metabolismus einer Zelle ist ein großes Netzwerk von Reaktionen und Metaboliten unterschiedlicher Substanzklassen, die miteinander interagieren und verknüpft sind. Dieses Netzwerk wird anhand von metabolischen Flüssen beschrieben, die in Computer-Modellen dargestellt werden. Speziell die Verfolgung der metabolischen Flüsse von Kohlenstoff und Stickstoff (Aminosäuren) im Zusammenhang mit dem Lipidmetabolismus ist von Interesse. Um diese Flüsse quantitativ beurteilen zu können, ist es notwendig, mit Analytik die Konzentration der Metaboliten zu bestimmen. Chromatographie und Massenspektrometrie dienen dabei meist als Analysemethoden. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird in der Forschung oft als Modellorganismus verwendet, da sie leicht zu handhaben ist und viele Stoffwechselwege zu höheren Eukaryoten konserviert sind.

## 1.1 Zellmetabolismus in Hefe

Der Stoffwechsel einer Zelle umfasst alle biochemischen Reaktionen unterschiedlicher Substanzklassen, die miteinander verknüpft sind. Er lässt sich in die zwei folgenden Kategorien einteilen. Katabolismus bezeichnet den Abbau von Molekülen, wobei Energie freigesetzt wird. Anabolismus nutzt diese freigewordene Energie für den Aufbau von Molekülen. Enzyme spielen dabei eine wichtige Rolle, da sie als Katalysatoren für die biochemischen Reaktionen dienen. Um ihre Funktion bzw. Aktivität zu gewährleisten, benötigen einige Enzyme Cofaktoren. Zu diesen zählen Metallionen und Coenzyme, also kleine organische Moleküle. Coenzyme können u. a. Energieträger sein, wie z. B. ATP oder für den Redoxzustand der Zelle zuständig sein, wie die Pyridindinukleotide  $\text{NAD(P)}^+$  und  $\text{NAD(P)H}$ . Coenzyme sind essentiell für eine Vielzahl an biochemischen Reaktionen. Veränderungen in ihrer Konzentration können somit den Metabolismus beeinflussen. Im folgenden Abschnitt wird ein Überblick des Stoffwechsels verschiedener Substanzklassen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit Bezug auf die Coenzyme gegeben.

### 1.1.1 Kohlenstoffmetabolismus

In Abbildung 1.1 ist ein Überblick des Kohlenstoffmetabolismus in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* dargestellt. Als Hauptkohlenstoffquelle dient meist Glucose. Nach der

Aufnahme aus dem Medium wird der Großteil über die Glykolyse abgebaut. Der restliche Teil an Glucose wird als Trehalose und Glycogen gespeichert und als Glucan in die Zellwand eingebaut. In der Glykolyse werden in zehn Schritten aus einem Molekül Glucose zwei Pyruvatmoleküle gebildet. Außerdem werden je 2 Moleküle ATP und NADH generiert. Glucose-6-Phosphat, das im 1. Schritt der Glykolyse entsteht, wird auch im Pentosephosphatweg abgebaut, wobei 2 Moleküle NADPH freigesetzt werden. Unter respiratorischen Bedingungen wird Pyruvat in die Mitochondrien transportiert, durch oxidative Decarboxylierung zu Acetyl-CoA umgewandelt und im Citratzyklus weiter abgebaut. 4 Moleküle NADH und 1 Molekül ATP und 1 Molekül  $\text{FADH}_2$  werden dabei gebildet. Die freigesetzten NADH- und  $\text{FADH}_2$ -Moleküle werden in der Atmungskette wieder oxidiert, um ATP und somit Energie zu generieren. Unter fermentativen Bedingungen wird Pyruvat im Cytosol zu Acetaldehyd umgewandelt und unter Verbrauch von NADH zu Ethanol reduziert. Acetaldehyd wird außerdem unter NAD(P)H-Freisetzung weiter zu Acetat oxidiert. Anschließend wird daraus Acetyl-CoA gebildet (Rodrigues et al., 2006). Acetyl-CoA dient als Ausgangsmolekül für die Aminosäure-, Fettsäure- und Ergosterolsynthese. Das für die Synthese stickstoffhaltiger Moleküle wichtige L-Glutamat wird aus  $\alpha$ -Ketoglutarat, einem Intermediat des Citratzyklus, unter NADPH-Verbrauch gebildet (siehe auch Abschnitt 1.3, Seite 8).

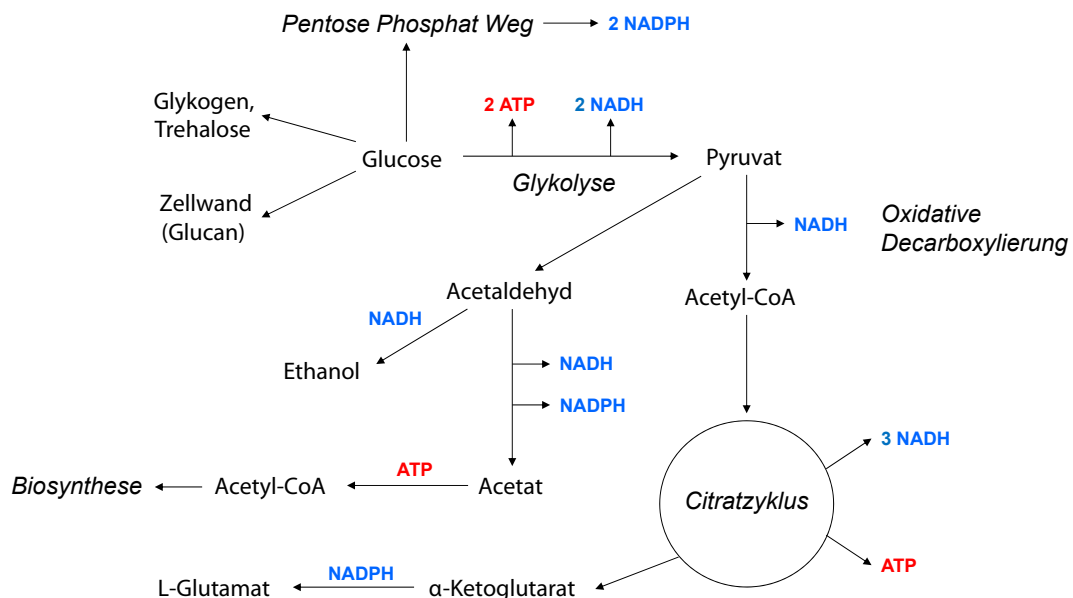


Abbildung 1.1: Kohlenstoffmetabolismus in *Saccharomyces cerevisiae*

### 1.1.2 Lipidmetabolismus

Fettsäuren dienen als Energiespeicher und Signalmoleküle, sind am Aufbau von Zellmembranen beteiligt und werden in der posttranslatorischen Modifikation von Proteinen ver-

wendet. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kommen hauptsächlich die Fettsäuren mit Kettenlängen C16 und C18 vor, wovon 80 % einfach ungesättigt sind. Fettsäuren können durch Aufnahme aus dem Medium, durch Abbau von verschiedenen Lipiden und durch *de novo* Biosynthese gewonnen werden. Acetyl-CoA dient dabei als Ausgangsmolekül und bildet im ersten Schritt unter ATP-Verbrauch Malonyl-CoA. Diese Reaktion ist geschwindigkeitsbestimmend und wird von der Acetyl-CoA-Carboxylase (Acc1p) katalysiert. Malonyl-CoA dient als C2-Donor und reagiert mit Acetyl-CoA zu 3-Ketoacyl-ACP/CoA. Die Acyl-Carrier-Protein-Domäne (ACP) ist Teil des Fettsäure-Synthase-Komplexes (Fas1p, Fas2p). Die Fettsäure ist über ACP mit dem FS-Komplex verbunden. Über mehrere Reaktionsschritte, darunter auch zwei NADPH-abhängige Reduktionen, entsteht Acyl-CoA. Für eine weitere Fettsäureelongation kann nun Acyl-CoA mit Malonyl-CoA reagieren. Somit verbraucht die Synthese einer Fettsäure mit 4 C-Atomen bzw. die Verlängerung einer Fettsäure um 2 C-Atome 2 NADPH und 1 ATP (Tehlivets et al., 2007). Bei der Synthese der Palmitinsäure C16:0 werden z. B. 14 NADPH- und 7 ATP-Moleküle benötigt. Ergosterol ist Bestandteil der Zellmembran in Hefezellen und das Pendant zu Cholesterol in Säugerzellen. Es wird ausgehend von Acetoacetyl-CoA, das aus zwei Acetyl-CoA-Molekülen gebildet wird, über viele Zwischenschritte synthetisiert, wobei 3 ATP- und netto 16 NADPH-Moleküle verbraucht werden.

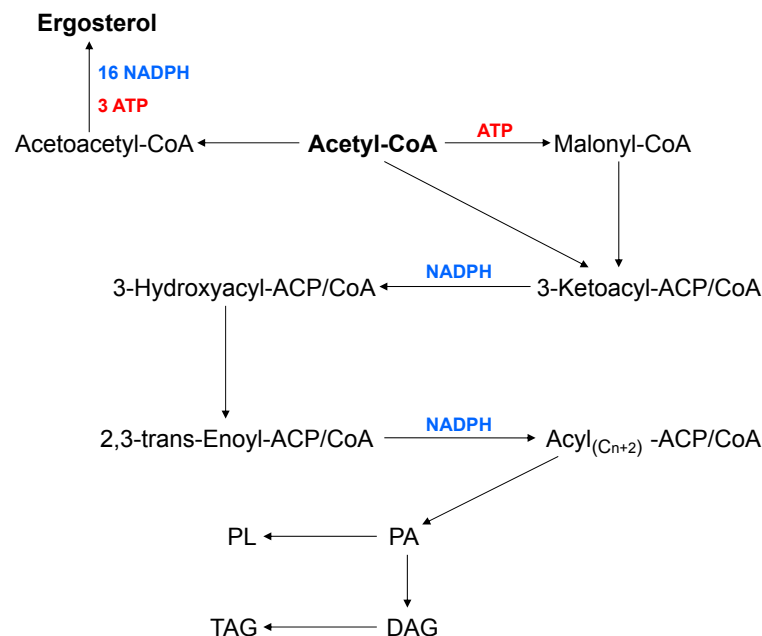


Abbildung 1.2: *de novo* Fettsäuresynthese und Ergosterolsynthese in *Saccharomyces cerevisiae*

Fettsäuren können in Glycerolipide eingebaut werden, zu denen Phospholipide (PL) und Triacylglycerole (TAG) zählen. Dafür werden sie durch die Bindung zu CoA aktiviert und als Acyl-CoA in der Acylierung von Lipiden eingesetzt. Für die Synthese von TAG

und PL (siehe Abbildung 1.3) wird zuerst die Phosphatidsäure (PA) hergestellt. Als Ausgangsmoleküle dafür dienen Glycerol-3-Phosphat (G3P) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP). Durch zwei Acylierungsschritte von G3P entsteht zuerst Lyso-PA (1-Acyl-G3P) und schließlich PA. DHAP ist ein Zwischenprodukt der Glykolyse und kann unter Verbrauch des Coenzyms NADH zu G3P reduziert werden. DHAP kann aber auch vorher zu 1-Acyl-DHAP acyliert und anschließend in einem NADPH-abhängigen Schritt zu Lyso-PA reduziert werden. PA kann außerdem durch Abbau von Glycerophospholipiden mit Phospholipase D gebildet werden. Durch die Dephosphorylierung von PA entsteht DAG. Dieses Molekül wird durch die DAG-Acyltransferase weiter zu TAG acyliert. Durch die TAG-Lipase kann TAG wiederum in DAG umgewandelt werden (Daum et al., 2007; Henry et al., 2012).

Die Phospholipidsynthese erfolgt über zwei verschiedene Wege. PA und DAG sind dafür wichtige Ausgangsmoleküle. Beim „CDP-DAG-Pathway“ wird zuerst aus PA und CTP das Molekül Cytidindiphosphat-Diacylglycerol (CDP-DAG) gebildet. Dieses kann mit Inositol zu Phosphatidylinositol (PI) und mit Serin zu Phosphatidylserin (PS) reagieren. PS ist auch das Ausgangsmolekül für die Synthese von Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylcholin (PC). PS wird zuerst zu PE decarboxyliert und dieses anschließend zu PC methyliert. PE und PC können auch über den sogenannten „Kennedy Pathway“ synthetisiert werden, wie in Abbildung 1.3 zu sehen ist. Dafür müssen allerdings Ethanolamin (Etn) und Cholin (Cho) vorhanden sein (Henry et al., 2012). Die beiden Coenzyme NADH und NADPH spielen nur bei der Bildung von PA ausgehend von DHAP eine Rolle.

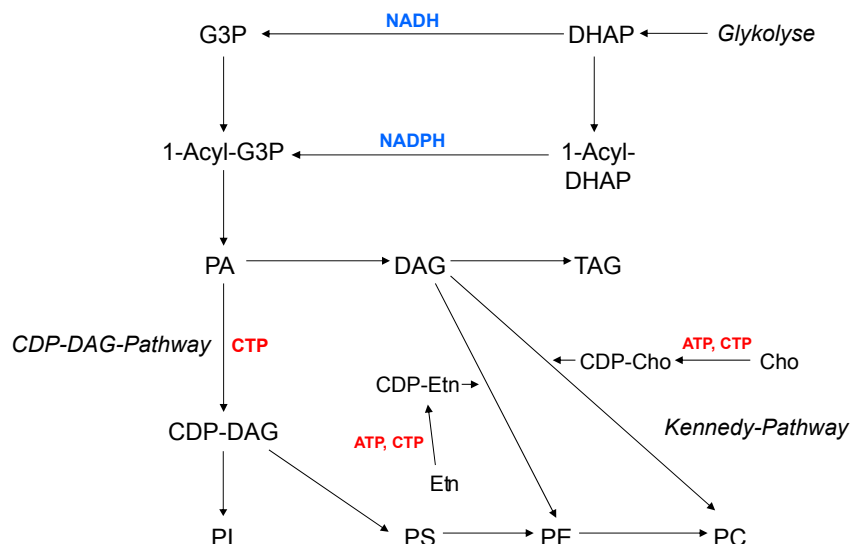


Abbildung 1.3: Synthese von Phospholipiden und Triacylglycerolen in *Saccharomyces cerevisiae*

## 1.2 Pyridindinukleotide NAD(P)(H)

### 1.2.1 Struktur, Eigenschaften, Stabilität

Zu den Pyridindinukleotiden zählen die jeweils reduzierten und oxidierten Formen von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD(H)) und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP(H)). Die Struktur dieser Moleküle ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

Wie schon der Name verrät, sind zwei Nukleotide über ihre Phosphatgruppen miteinander verbunden, wobei an einem Ribosemolekül Adenin und am anderen Nicotinamid gebunden ist. NADP(H) trägt eine zusätzliche Phosphatgruppe. Der Unterschied zwischen oxidierten und reduzierten Molekülen, also  $\text{NAD(P)}^+$  und  $\text{NAD(P)H}$ , liegt in der Struktur des Nicotinamidrings. Bei der reduzierten Spezies sind zwei Wasserstoffatome am C3 des Rings gebunden. Dadurch entsteht ein chinoides System, welches auch der Grund für die Fluoreszenz von  $\text{NAD(P)H}$  ist. Die oxidierten Spezies haben nur ein Wasserstoffatom am C3 gebunden, wodurch der Stickstoff positiv geladen ist. Diese Moleküle weisen keine fluoreszierende Eigenschaft auf. Die Absorptionseigenschaften der Dinukleotide hängen ebenfalls von ihrem Redoxzustand ab. Alle Moleküle absorbieren bei 260 nm aufgrund der Adenin-Gruppe. Aber nur die reduzierten Coenzyme NADH und NADPH zeigen auch Absorption bei 340 nm aufgrund des chinoiden Systems ihrer Nicotinamidringe (Engelking, 2004). Die Stabilität der Dinukleotide unterscheidet sich ebenfalls aufgrund ihres Redoxzustandes.  $\text{NAD(P)}^+$  ist nur unter sauren Bedingungen stabil,  $\text{NAD(P)H}$  hingegen nur unter basischen Bedingungen (Lowry et al., 1961).

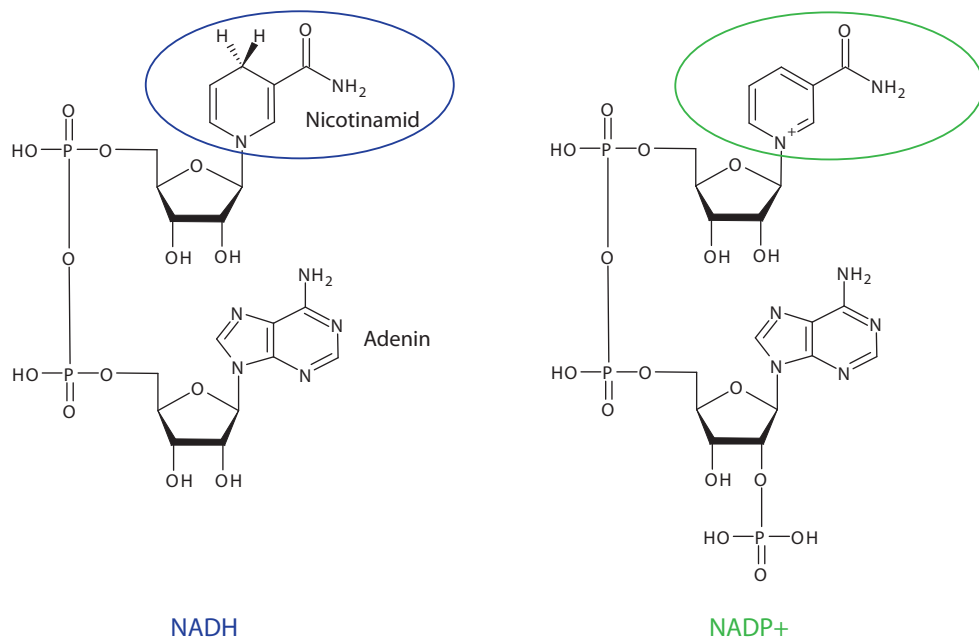


Abbildung 1.4: Struktur von NAD(P)(H)

## 1.2.2 Biosynthese

Die Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  erfolgt in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* auf zwei verschiedenen Wegen (siehe Abbildung 1.5).

Bei der *de novo* Biosynthese wird aus L-Tryptophan über mehrere Schritte Chinolinsäure (QA) gebildet. Mit der Chinolinat-Phosphoribosyltransferase (QAPRT) wird QA schließlich zu Nicotinsäure-Mononukleotid (NAMN) umgewandelt. Beim sogenannten „Salvage Pathway“ wird freies Nicotinamid (Nam) bzw. Nicotinsäure (NA) rezykliert. Da in Hefe NA das präferierte Startmolekül ist, wird Nam durch die Nicotinamidase zu NA deaminiert. Durch die Nicotinsäure-Phosphoribosyltransferase (NAPRT) wird NAMN gebildet. Mit einem weiteren Enzymschritt und der Übertragung von AMP auf NAMN von ATP unter Freisetzung von Diphosphat entsteht Nicotinsäure-Adenin-Dinukleotid (NAAD). Schließlich wird NAAD durch die NAD-Synthase zu  $\text{NAD}^+$  aminiert. Der „Salvage Pathway“ ist für die  $\text{NAD}^+$ -Synthese wichtiger als die *de novo* Biosynthese.  $\text{NADP}^+$  wird durch Phosphorylierung von  $\text{NAD}^+$  durch die NAD-Kinase (NADK) gebildet (Pollak et al., 2007).

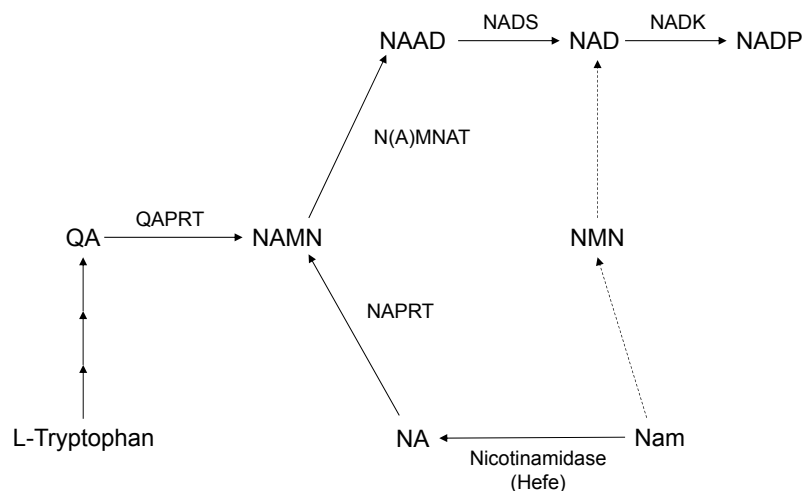


Abbildung 1.5: Synthese von  $\text{NAD(P)}^+$ , adaptiert von Pollak et al. 2007,  
 QA Chinolinsäure, QAPRT Chinolinat-Phosphoribosyltransferase,  
 NA Nicotinsäure, NAPRT Nicotinsäure-Phosphoribosyltransferase,  
 NAMN Nicotinsäure-Mononukleotid, Nam Nicotinamid, NMN  
 Nicotinamid-Mononukleotid, N(A)MNAT Nam/NA-Mononukleotid-  
 Adenylyltransferase, NAAD Nicotinsäure-Adenin-Dinukleotid, NADS  
 NAD-Synthase, NADK NAD-Kinase

## 1.2.3 Funktion

Die Paare  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  und  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  spielen eine wichtige Rolle in Redoxreaktionen und sind für den Redox-Status der Zelle verantwortlich. Außerdem sind  $\text{NAD}^+$  und

NADP<sup>+</sup> auch in die Signaltransduktion involviert. NAD<sup>+</sup>/NADH bevorzugen oxidierende Prozesse und sind deshalb im Katabolismus anwesend (Hou et al., 2009). NADH entsteht, wie schon in Abbildung 1.1 dargestellt, u. a. während der Glykolyse und dem Citratzyklus. Während der Atmungskette wird es zur Produktion von ATP wieder zu NAD<sup>+</sup> oxidiert. Das totale Verhältnis NAD<sup>+</sup>/NADH liegt bei ca. 7,5 (Canelas et al., 2008). NADP<sup>+</sup>/NADPH sind bei reduzierenden Prozessen im Anabolismus wichtig (Hou et al., 2009). NADPH wird u. a. bei der Synthese von Fettsäuren und Sterolen benötigt. Auch bei der Synthese von Aminosäuren (z.B. Glutamat und Prolin) wird NADPH verbraucht. Des Weiteren wird es bei der Reduktion von Ribonukleotiden zu Desoxyribonukleotiden eingesetzt (Agedal et al., 2010). Das Verhältnis NADP<sup>+</sup>/NADPH ist kleiner als 0,01. In Hefe ist die Menge von NADP(H) zehnmal geringer als NAD(H). *In vivo* ist ein Großteil der Coenzyme an Proteine gebunden (Murray et al., 2011). Die meisten in der Literatur beschriebenen Methoden unterscheiden allerdings nicht zwischen freien und Protein-gebundenen Metaboliten, sondern messen die totale Konzentration.

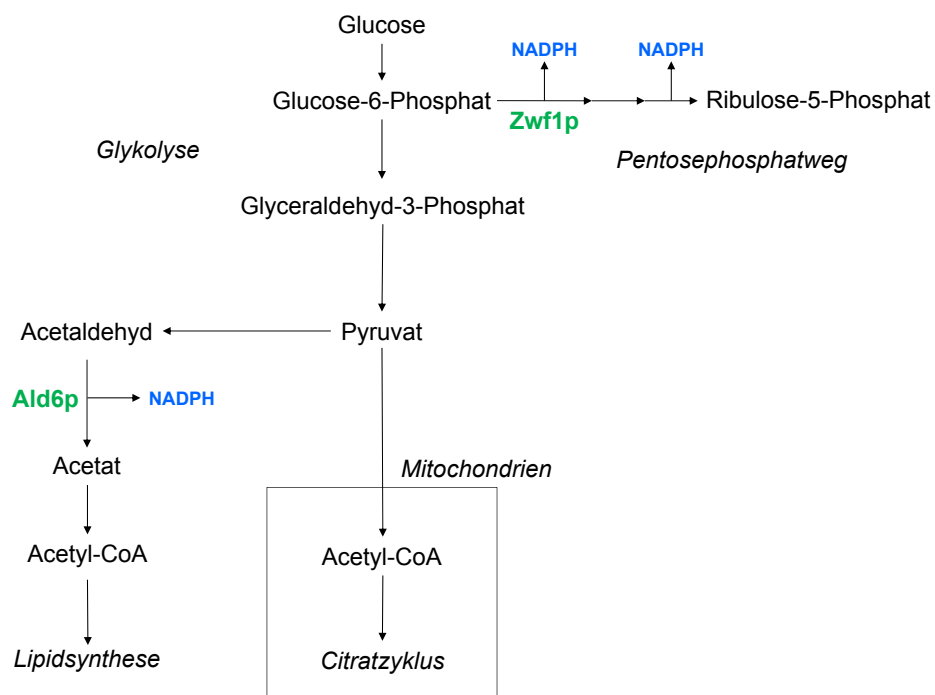


Abbildung 1.6: Reaktionswege, die NADPH produzieren, adaptiert von Butcher & Schreiber 2004

NADPH wird in Hefe vor allem im Pentosephosphatweg und bei der Oxidation von Acetaldehyd zu Acetat produziert, wie in Abbildung 1.6 dargestellt ist. Im oxidativen Teil des Pentosephosphatwegs wird ausgehend von Glucose-6-Phosphat über drei Schritte Ribulose-5-Phosphat gebildet. Dabei werden 2 Moleküle NADPH gewonnen. Der erste Schritt des Pentosephosphatwegs ist geschwindigkeitsbestimmend und wird vom Enzym

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase katalysiert. Dieses wird vom Gen *ZWF1* codiert. Bei der Deletion von *ZWF1* weist die Mutante eine Methionin-Auxotrophie auf (Minard & McAlister-Henn, 2005). Die Oxidation von Acetaldehyd zu Acetat wird von der cytosolischen Acetaldehyd-Dehydrogenase katalysiert. Diese wird durch das Gen *ALD6* codiert. Ald6p wird durch  $Mg^{2+}$  aktiviert und ist  $NADP^+$ -spezifisch (Meaden et al., 1997). Das Enzym ist auch wichtig für die Verfügbarkeit von Acetyl-CoA im Cytosol. *ZWF1* und *ALD6* überlappen in ihrer Rolle als NADPH-Produzenten (Butcher & Schreiber, 2004). Ald6p ist essentiell für die Produktion von NADPH in Abwesenheit von Zwf1p. Die Mutante *zwf1Δald6Δ* ist nicht lebensfähig (Minard & McAlister-Henn, 2005).

### 1.3 Aminosäuren im Wachstumsmedium

In einem Minimalmedium für das Wachstum von Hefezellen sind typischerweise Aminosäuren enthalten. Diese dienen einerseits als zusätzliche Stickstoffquelle, andererseits als Wachstumsfaktoren. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wäre aber auch fähig, die meisten Aminosäuren als alleinige Stickstoffquelle zu nutzen (Petersen et al., 1988). Nach ihrer Aufnahme in die Zelle werden die Aminosäuren entweder direkt in neu synthetisierte Proteine eingebaut oder im Katabolismus abgebaut. Die Hauptprodukte, die daraus entstehen, sind Ammonium-Ionen durch Deaminierung und Glutamat durch Transaminierung (Horák, 1997). Glutamat entsteht auch durch Reaktion von Ammonium mit  $\alpha$ -Ketoglutarat (Intermediat des Citratzyklus) und NADPH. Es reagiert mit einem weiteren Ammonium-Ion zu Glutamin (Magasanik & Kaiser, 2002). Die Amino-Gruppe von Glutamat dient als Quelle für 85 % aller zellulären, stickstoffhaltigen Moleküle und das Amid von Glutamin dient als Quelle für die restlichen 15 % (Magasanik & Kaiser, 2002). Laborhefestämme können auch Aminosäure-Auxotrophien aufweisen. Dies bedeutet, dass die Stämme bestimmte Aminosäuren nicht selbst synthetisieren können und auf ihre Aufnahme aus dem Medium angewiesen sind. Je nach Stickstoffquelle, ob von der Hefe präferiert oder nicht, kann sich die Wachstumsrate erhöhen und somit das Wachstum verbessern. Deshalb ist eine ausreichende Menge an Aminosäuren im Medium für ein optimales Wachstum von Vorteil.

Der quantitative Nachweis von Aminosäuren erfolgt typischerweise über chromatographische Verfahren, die häufig mit Massenspektrometrie gekoppelt sind (Kaspar et al., 2009).



## 1.4 Chromatographie

Die Chromatographie ist eine Analysemethode, bei der die Analyten durch ihre unterschiedliche Wechselwirkung mit einer stationären und einer mobilen Phase aufgetrennt werden. Sie unterscheiden sich in ihrer Retentionszeit und werden nach ihrer Detektion als Peaks dargestellt. Durch Vergleiche von unbekanntem Proben mit einem bekannten Standard können die Peaks den Analyten zugeordnet und dadurch identifiziert werden. In dieser Arbeit wurde für die Analyse von Pyridindinukleotiden Flüssigchromatographie angewendet. Die Aminosäuren hingegen wurden mit Gaschromatographie analysiert. Beide Analysemethoden werden im folgenden Abschnitt kurz beschrieben.

### 1.4.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die HPLC trennt die Analyten aufgrund ihrer unterschiedlichen Wechselwirkung mit der festen stationären Phase und der flüssigen mobilen Phase. Ein HPLC-System besteht allgemein aus dem Laufmittel-Reservoir, der Pumpe, dem Probenaufgabesystem, der Säule, dem Detektor und einer Auswerteeinheit. Das Laufmittel wird mit einer Hochdruckpumpe durch das System bewegt. Die Analyse kann isokratisch erfolgen, wobei die Laufmittelzusammensetzung während der Messung konstant bleibt. Die Analyten können aber auch mit einem Gradienten, bei dem sich die Laufmittelzusammensetzung während der Analyse ändert, aufgetrennt werden. Die Laufmittelkomponenten werden dazu in einem Mischventil gemischt. Die Probenaufgabe erfolgt automatisch durch den Autosampler. Hier wird die Probe durch die Spritze in eine Schleife gezogen und durch Umschalten von Ventilen mit dem Laufmittel auf die Säule gebracht. Die Säule kann aus einer polaren stationären Phase, wie z. B. Kieselgel bestehen („Normalphase“). Wenn an das Kieselgel Kohlenstoffketten (z. B. C18 oder C8) kovalent gebunden sind, die stationäre Phase also unpolar ist, spricht man von „Umkehrphase“. Des Weiteren kann sich die Säule in einem Säulenofen befinden, um die Temperatur während der Messung konstant zu halten. Nach dem Durchlaufen der Säule wird das Laufmittel (mit der Probe) durch eine Flusszelle des Detektors geleitet. Die gewünschte Eigenschaft (z. B. Fluoreszenz, Absorption) wird gemessen und in elektrische Signale umgewandelt. Diese werden als Chromatogramme dargestellt (Kaltenböck, 2008).

### 1.4.2 Gaschromatographie (GC)

In der Gaschromatographie erfolgt die Auftrennung der gasförmigen Analyten aufgrund ihrer unterschiedlichen Wechselwirkung mit der gasförmigen mobilen Phase und der stationären Phase. Die stationäre Phase kann fest oder flüssig sein, dementsprechend ist von einer Adsorptionschromatographie bzw. von einer Verteilungschromatographie die Rede. Wenn man heute von der Gaschromatographie spricht, ist die Verteilung zwischen flüs-

siger und gasförmiger Phase gemeint. Die flüssige Phase ist dabei auf einer festen Phase immobilisiert. Es werden gepackte Säulen (2-4 m Länge, 2-4 mm Innendurchmesser (ID)) bzw. Kapillarsäulen (10-60 m Länge, 0,15-0,53 mm ID) verwendet. Als mobile Phase dient ein inertes Gas, wie z. B. Helium oder Stickstoff. Mit Hilfe dieses Trägergases wird die gasförmige Probe durch die Säule transportiert und durch die Wechselwirkung mit der stationären Phase werden die Analyten aufgetrennt. Mit der Gaschromatographie können Substanzen analysiert werden, die flüchtig sind bzw. ohne Zersetzung verdampft werden können. Oft ist es erforderlich, die Proben vor der Messung zu derivatisieren, um ihre Flüchtigkeit bzw. Stabilität zu erhöhen. Die flüssige Probe wird in eine beheizte Verdampfungskammer injiziert, in der diese verdampft und durch die mobile Phase auf die Säule geleitet wird. Die Verdampfungskammer wird durch ein Septum geschützt. Häufig kommen Split/Splitless-Injektoren zum Einsatz. Bei der Splitless-Injektion wird die gesamte Probe aufgetragen. Bei Split-Injektion wird der Gasstrom geteilt und nur ein kleiner Teil der Probe gelangt auf die Säule. Die Säule befindet sich im sogenannten Säulenofen. Um eine vollständige Auftrennung zu gewährleisten, wird ein Temperaturgradient gefahren. Die Analyten werden sowohl anhand ihres Siedepunkts als auch anhand ihrer Wechselwirkung mit der stationären Phase getrennt. Nach dem Durchfluss der Säule wird die Probe von einem Detektor detektiert und das elektrische Signal wird an einen Computer weitergeleitet und bildlich dargestellt (Schwedt & Vogt, 2010).

## 1.5 Massenspektrometrie (MS)

Chromatographische Analysemethoden sind oft an Massenspektrometer gekoppelt, um mehr Informationen über die Analyten zu erhalten, wie z. B. das Molekulargewicht und die Struktur. In dieser Arbeit wurde für die Aminosäurenanalyse GC-MS verwendet und auch für Analyse von NAD(P)(H) wurde die HPLC für einige Messungen an ein MS gekoppelt. Ein Massenspektrometer besteht grundsätzlich aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor, der die detektierten Ionen in elektrische Signale umwandelt. Im folgenden Abschnitt werden die verwendeten Ionenquellen und Analysatoren kurz beschrieben (Hesse et al., 2011).

### 1.5.1 Ionisationsmethoden

#### Elektrosprayionisation (ESI)

Die Elektrosprayionisation wird vorwiegend in der Flüssigchromatographie angewendet. Die Ionisation findet bei Atmosphärendruck statt. Sie ist schonend und gut geeignet für große Biomoleküle. ESI zählt zu den weichen Ionisierungstechniken, da die Moleküle kaum

fragmentieren. Deshalb kann die Molekülmasse der Proben festgestellt und anhand dieser den Analyten zugeordnet werden. Bei ESI können auf zwei Arten Ionen gebildet werden, und zwar im positiven und im negativen Modus. Im positiven Modus bilden sich vor allem  $[M+H]^+$ -Ionen, im negativen Modus  $[M-H]^-$ . Zusätzlich können auch weitere Adduktionen gebildet werden, die Bestandteile des Lösungsmittels adsorbiert haben.

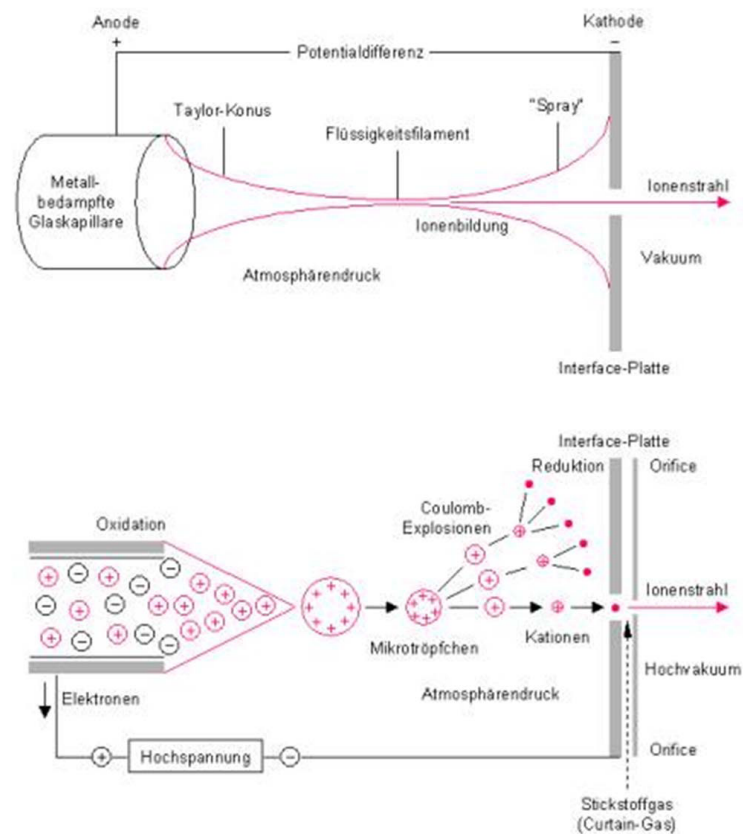


Abbildung 1.7: Schema einer ESI-Quelle<sup>1</sup>

Die ESI-Quelle besteht aus einer Metallkapillare, durch die die Analytlösung strömt, und der Gegenelektrode mit der Eintrittsöffnung ins Massenspektrometer. Durch das Anlegen einer Spannung wird ein elektrisches Feld zwischen den beiden Elektroden erzeugt. Es kommt zu einer Trennung von positiv und negativ geladenen Ionen an der Lösungsmitteloberfläche und es bildet sich ein Sprühkegel aus kleinen, geladenen Tröpfchen (der sogenannte „Taylor Konus“) an der Austrittsstelle der Kapillare. Die Tröpfchen mit mehreren Ladungen einer Sorte werden zur Gegenelektrode hin beschleunigt und werden durch die Temperatur in der Ionenquelle und durch einen angelegten Stickstoffstrom desolvatisiert und damit verkleinert. Für den weiteren Ablauf der Ionisation gibt es zwei unterschiedliche Modelle (Wilm, 2011).

<sup>1</sup><http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/BMFZ/mambo/images/msimage004.jpg>

- Charge Residue Model (CRM): Die Ladungen lagern sich an der Tröpfchenoberfläche an. Durch das Verdampfen des Lösungsmittels und das fortschreitende Schrumpfen des Tröpfchens, stoßen sich die Ladungen ab. Sobald das Rayleigh Limit erreicht ist, also die Abstoßungsenergie größer als die Oberflächenspannung des Tröpfchens ist, kommt es zur Coulomb Explosion, die kleinere, geladene Tröpfchen hervorbringt. Dies erfolgt so lange, bis die Tröpfchen nur noch aus einem Molekülion bestehen.
- Ion Evaporation Model (IEM): Sobald der Radius des Tröpfchens einen bestimmten Wert unterschreitet, treten aus den mehrfach geladenen Tröpfchen einzelne geladene Molekülionen aus, um die Ladungsdichte im Tröpfchen zu verringern.

In der Realität tritt wahrscheinlich eine Kombination aus beiden Modellen auf.

### Elektronenstoßionisation (EI)

Die Elektronenstoßionisation wird klassischerweise in der Gaschromatographie angewendet. Sie zählt zu den harten Ionisationsmethoden, da die Moleküle fragmentiert werden. Die EI-Ionisationsquelle befindet sich in einem Hochvakuum. Aus einem beheizten Wolfram- oder Rheniumdraht treten Elektronen aus, die in einem elektrischen Feld zur Gegenelektrode hin beschleunigt werden. Diese Elektronen besitzen typischerweise eine kinetische Energie von 70 eV und treffen auf die gasförmigen Analytmoleküle. Dadurch werden aus den Molekülen Elektronen herausgeschlagen und es entstehen Radikalkationen der Moleküle. Durch die überschüssige Energie zerfallen diese zu weiteren Fragmentionen. Die gebildeten Ionen werden in einem schwach elektrischen Feld aus der Quellregion und in den Analysator transportiert. Aus dem Spektrum kann mit dem Molekülpeak die Molekularmasse und aus den Fragmentpeaks die Struktur ermittelt werden.

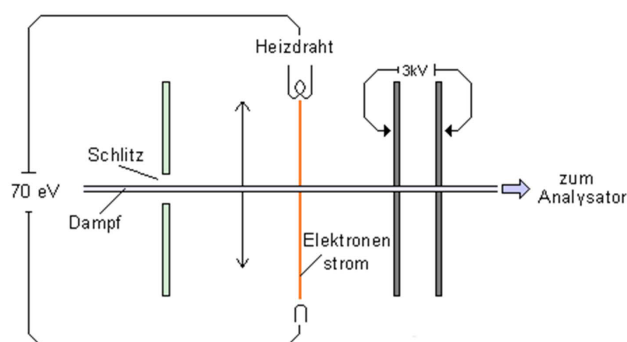


Abbildung 1.8: Schema einer EI-Quelle<sup>2</sup>

<sup>2</sup>[http://www.vias.org/tmanalytik\\_germ/img/aw\\_ms\\_ionisierungskammer.png](http://www.vias.org/tmanalytik_germ/img/aw_ms_ionisierungskammer.png)

## 1.5.2 Analysatoren

### Quadrupol

Der Quadrupol-Massenanalysator besteht aus vier zylinderförmigen Metallelektroden, wobei jeweils zwei sich gegenüberliegen. Paarweise wird an den Stäben Gleich- bzw. Wechselspannung mit einer Phasenverschiebung von  $180^\circ$  angelegt. Dies führt dazu, dass nur Ionen mit einem bestimmten Masse-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) mit stabiler Flugbahn durch den Quadrupol gelangen und detektiert werden. Andere Ionen kollidieren vorher mit den Elektroden. Durch Anlegen von unterschiedlichen Spannungen und Frequenzen kann ein großer Bereich an  $m/z$ -Werten abgescannt werden. Daraus erhält man ein komplettes Massenspektrum (full scan).

### Time of Flight (TOF)

Der TOF-Massenanalysator trennt die Ionen nach ihrer Masse. Beim Eintritt in den Analysator werden die Ionen auf die gleiche kinetische Energie gebracht. Durch die unterschiedlichen Massen weisen sie unterschiedliche Geschwindigkeiten auf und werden deshalb zu unterschiedlichen Zeitpunkten detektiert. Leichte Ionen erreichen den Detektor schneller als schwere Ionen. Im Gegensatz zum Quadrupol besitzt TOF eine bessere Auflösung und ein größerer Massenbereich kann gescannt werden. Um die Auflösung zu verbessern, kann ein Reflektor-TOF-Analysator verwendet werden, bei dem die Flugstrecke verlängert wird. Die Ionen werden dabei durch ein elektrisches Feld, das von einem Ionenspiegel am Ende ihrer Flugstrecke angelegt wird, wieder reflektiert.

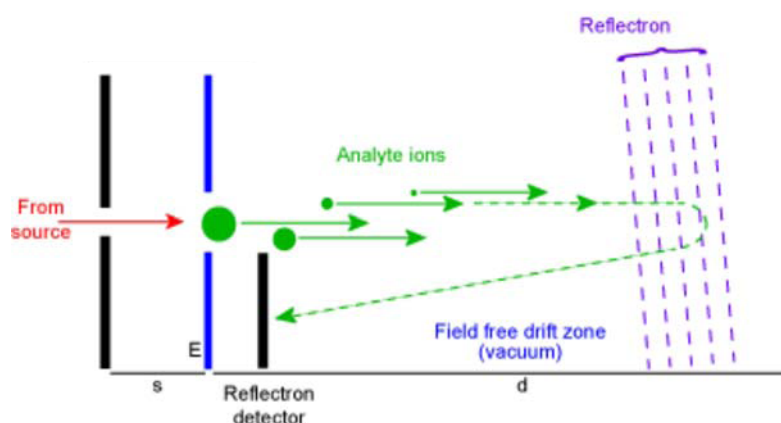


Abbildung 1.9: Schema eines Reflektor-TOF-Analysators<sup>3</sup>

<sup>3</sup><http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/tof-massspec.html>

## 2 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit

Zur quantitativen Beschreibung des zellulären Stoffwechsels und der metabolischen Flüsse wird ein Computermodell verwendet. Voraussetzung dafür ist die genaue Kenntnis der Metabolit-Konzentrationen. Ziel dieser Arbeit war es, Analysemethoden zu etablieren, um extrazelluläre (Aminosäuren) und intrazelluläre (Pyridindinukleotide) Konzentrationen zu bestimmen.

NADPH ist in der Synthese von Fettsäuren und Ergosterol stark involviert. Es sollte daher untersucht werden, welchen Einfluss eine Änderung im NADP(H)-Gehalt auf den Lipid-metabolismus hat. Dafür sollte eine HPLC-Methode für die qualitative und quantitative Analyse von NAD(P)(H) aus Hefezellen etabliert werden. Ziel war es, die vier Dinukleotide gemeinsam zu extrahieren und ihren Gehalt zu bestimmen. Nach erfolgreicher Etablierung der Methode sollten die Konzentrationen von NAD(P)(H) in Hefewildtyp und Mutanten analysiert werden.

Die zelluläre Lipidzusammensetzung wird von den im Wachstumsmedium zur Verfügung stehenden Nährstoffen beeinflusst. Im zweiten Teil der Arbeit sollte deshalb das Medium hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung untersucht werden. Es sollte eine GC-MS-Methode für die qualitative und quantitative Analyse von Aminosäuren etabliert werden, um ihre extrazelluläre Konzentration im Verlauf des Wachstums von Hefezellen zu messen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Geräte- und Chemikalienliste

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Geräte sind im Anhang aufgelistet (siehe Abschnitt 6, Seite 58).

### 3.2 Zellkultur

#### 3.2.1 Stämme

In dieser Arbeit wurden folgende Hefestämme verwendet:

BY4741	Wildtyp
BY4741(EV)	Wildtyp mit transformiertem leeren Vektor
BY4741(ZWF1)	<i>ZWF1</i> -überexprimierender Stamm
<i>ald6</i> $\Delta$	Deletion von <i>ALD6</i>

Die Genotypen der Stämme sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: Genotypen der verwendeten Hefestämme

Stamm	Genotyp
BY4741	BY4741 <i>MATa his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0
BY4741(EV)	BY4741 <i>MATa his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 [ <i>pYEX4T-1</i> ]
BY4741(ZWF1)	BY4741 <i>MATa his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 [ <i>pYEX4T-1/ZWF1</i> ]
<i>ald6</i> $\Delta$	BY4741 <i>MATa his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>ald6::KanMX4</i>

#### 3.2.2 Medien

Die Zusammensetzung der verwendeten Medien bzw. Medienbestandteile ist in den folgenden Tabellen aufgelistet. YPD-Medium sowie Glucose- und YNB-Lösung für das Minimalmedium wurden bei 121 °C autoklaviert. Die restlichen Lösungen wie z.B. der Aminosäurestock sind hitzelabil und wurden steril filtriert. Nach dem Abkühlen der autoklavierten Lösungen wurden diese mit den anderen Bestandteilen gemischt.

Tabelle 3.2: YPD-Medium, in H<sub>2</sub>O bidest.

Hefeextrakt	10 g/l
Pepton	20 g/l
Glucose	20 g/l

Tabelle 3.3: Aminosäurestock optimiert, 50x, in H<sub>2</sub>O bidest.

Adenin	2,00 g/l
Arginin	0,96 g/l
Asparaginsäure	4,80 g/l
Glutaminsäure	4,80 g/l
Histidin	2,28 g/l
Leucin	5,40 g/l
Lysin	7,20 g/l
Methionin	5,76 g/l
Phenylalanin	2,40 g/l
Serin	18,00 g/l
Threonin	9,60 g/l
Thryptophan	1,92 g/l
Tyrosin	0,72 g/l
Valin	7,20 g/l

Tabelle 3.4: Minimalmedium optimiert, in H<sub>2</sub>O bidest.

Glucose	20 g/l
YNB wo AA	6,7 g/l
Aminosäurestock opt., 50x	20 ml/l
Uracil, 2 mg/ml, 50x	20 ml/l
MES Puffer, 1 M, 50x	20 ml/l
Inositol, 10 mg/ml, 1000x	1 ml/l
Ampicillin, 100 mg/ml, 1000x	1 ml/l

### 3.3 Analyse von Aminosäuren

#### 3.3.1 Anzucht und Wachstumskurve

5 ml Minimalmedium in einem Röhrchen wurden mit einer Einzelkolonie des Hefewildtyps BY4741 (auf YPD-Platten ausgestrichen) inokuliert und über Nacht im Schüttelinkubator bei 30 °C und 180 rpm gezüchtet (over night culture, ONC). Am nächsten Tag wurden 50 ml Minimalmedium in einem 250 ml Kolben als Vorkultur mit 0,5 ml dieser ONC beimpft und anschließend für  $72 \pm 2$  h inkubiert.

Die Hauptkultur (100 ml Minimalmedium im 500 ml Kolben) wurde mit dem entsprechen-



den Volumen an Vorkultur beimpft, um eine Zellzahl von ca.  $3 \times 10^6$  Zellen/ml zu erhalten. Die Zellzahl wurde mit CASY<sup>®</sup> ermittelt. Zum Zeitpunkt der Beimpfung (= Zeitpunkt 0) und jede weitere Stunde wurde die Zellzahl gemessen und 2 ml der Hauptkultur wurden als Probe in zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und abzentrifugiert, um die Zellen vom Medium zu trennen. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Dies wurde solange durchgeführt, bis die Hefezellen die stationäre Phase erreicht hatten.

### 3.3.2 Probenvorbereitung

Für die Messung mit GC-MS müssen die Aminosäuren derivatisiert werden. Die Derivatisierung wurde mit Optimierungen nach der Methode von Villas-Bôas et al. durchgeführt (Villas-Bôas et al., 2003). Erklärungen dieser Änderungen befinden sich im Abschnitt 4.2.1 (Seite 40).

Anmerkung: Als interner Standard (iS) wurden 167  $\mu$ l einer 500  $\mu$ M C17:0 Lösung in Methanol verwendet. Sollte die Derivatisierung ohne iS durchgeführt werden, nimmt man stattdessen 167  $\mu$ l Methanol.

- 200  $\mu$ l Probe, 200  $\mu$ l 1 % NaOH, 167  $\mu$ l iS und 34  $\mu$ l Pyridin in ein 15 ml Pyrexröhrchen geben und kurz vortexen
- 20  $\mu$ l Methylchlorformiat (MCF) dazu pipettieren und 30 s vortexen
- den vorherigen Schritt wiederholen
- 400  $\mu$ l Chloroform hinzugeben und 10 s vortexen
- 400  $\mu$ l 50 mM NaHCO<sub>3</sub> hinzugeben und 10 s vortexen
- 1 ml n-Hexan hinzugeben und 15 s vortexen
- 1 ml der oberen, organischen Phase in ein Glasvial überführen
- im N<sub>2</sub>-Strom abblasen
- Rückstand in 200  $\mu$ l n-Hexan aufnehmen und gut vortexen
- Probe in ein Spitzvial überführen und abblasen
- Rückstand in 50  $\mu$ l n-Hexan aufnehmen, Vial mit einer Metallkappe verschließen und vortexen
- GC-MS-Messung

### 3.3.3 GC-MS-Methode

Die GC-MS-Messung der Proben wurde mit dem Standardprogramm des Labors durchgeführt. Das Temperaturprogramm und die Parameter der Methode sind in Abbildung 3.1 und Tabelle 3.5 aufgeführt.

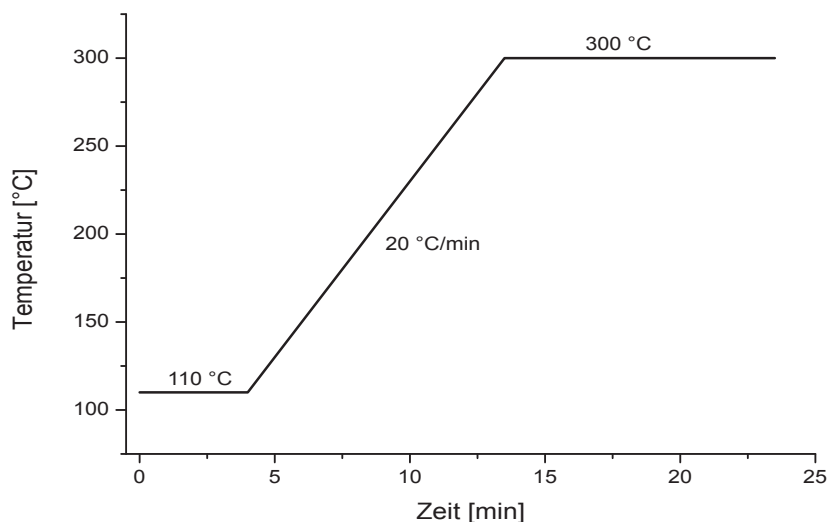


Abbildung 3.1: Temperaturprogramm der GC-MS-Methode für die Aminosäurenanalyse

Tabelle 3.5: GC-MS-Methode

<b>Autosampler</b>	
Probenvolumen	1 $\mu$ l
<b>Injektor</b>	
Basis Temperatur	250 °C
Modus	Splitless
<b>MS-Methode</b>	
Quell Temperatur	280 °C
Scan Modus	Full Scan
Messbereich	50-700 m/z

### 3.3.4 Quantifizierung, Standards

Für die Quantifizierung wurden Aminosäurestandards hergestellt. Zur besseren Löslichkeit der Aminosäuren wurde 1 % NaOH als Lösungsmittel verwendet. Des Weiteren wurden sie auf zwei Stocklösungen aufgeteilt. Histidin und Arginin wurden dabei nicht berücksichtigt, Begründung siehe Abschnitt 4.2.1 (ab Seite 40). Folgende Lösungen wurden hergestellt:

Tabelle 3.6: Aminosäurekonzentrationen der Stocklösungen

<i>Lösung 1</i>		<i>Lösung 2</i>	
<b>Aminosäure</b>	<b>mM</b>	<b>Aminosäure</b>	<b>mM</b>
Asparaginsäure	20	Lysin	50
Glutaminsäure	30	Serin	100
Leucin	20	Threonin	100
Methionin	30	Tryptophan	30
Phenylalanin	20	Tyrosin	10
Valin	30		

Mit den beiden Stocklösungen wurden Verdünnungsreihen hergestellt. Ausgehend von einer 1:10 Verdünnung wurden die Standards bis zu 1:640 jeweils in 1:2 Schritten verdünnt. Die Standards wurden wie zuvor beschrieben derivatisiert. Für eine Kalibrationsgerade wurden mindestens zwei, idealerweise drei Verdünnungsreihen hergestellt. Nach der Messung wurden die erhaltenen Peaks mit der Software Xcalibur<sup>TM</sup> 1.4 integriert und die Kalibrationsgeraden ermittelt.

## 3.4 Analyse von NAD(P)(H)

### 3.4.1 Anzucht und Zellernte

5 ml Medium in einem Röhrchen wurden mit einer Einzelkolonie eines Hefestamms (auf YPD-Platten ausgestrichen) inokuliert und über Nacht im Schüttelinkubator bei 30 °C und 180 rpm gezüchtet (ONC). Am nächsten Tag wurden 50 ml Medium in einem 250 ml Kolben als Vorkultur mit 0,5 ml dieser ONC beimpft und anschließend für  $72 \pm 2$  h inkubiert. Die Hauptkultur (400 ml Medium im 2000 ml Kolben) wurde mit dem entsprechenden Volumen an Vorkultur beimpft, um eine Zellzahl von ca.  $5 \times 10^4$  Zellen/ml zu erhalten. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit CASY<sup>®</sup>. Die Zellen wurden in der spätlogarithmischen Phase bei ca.  $1 \times 10^8$  Zellen/ml geerntet. Ein Volumen, welches  $10^{10}$  Zellen entspricht, wurde bei 4000 rpm für 3 min abzentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.4.2 Probenvorbereitung

Für die gemeinsame Analyse von NAD(P)(H) müssen NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup> derivatisiert werden. Die Reaktion findet während des Zellaufschlusses statt. Die Probenvorbereitung

inklusive Derivatisierung wurde mit einigen Änderungen nach der Methode von Klaidman et al. durchgeführt (Klaidman et al., 1995).

Tabelle 3.7: Derivatisierungsreagenz für die Analyse von NAD(P)(H)

<b>CN<sup>-</sup>-Lösung</b>	
KCN	200 mM
KOH	90 mM
Bathophenanthrolindisulfonsäure	1 mM

- Zellpellet in 1 ml H<sub>2</sub>O bidest. suspendieren und in ein 25 ml Pyrexröhrchen überführen
- abzentrifugieren (3 min, 4000 rpm, 4 °C) und Überstand verwerfen
- 1 ml Glaskugeln, 2 ml MeOH und 2 ml CN<sup>-</sup>-Lösung (bzw. 200 mM KOH) dazugeben
- Aufschluss in der Multi Reax Schüttelvorrichtung (Stufe 10) für 30 min im Kühlraum (4 °C)
- abzentrifugieren (3 min, 4000 rpm, 4 °C)
- Überstand in ein 15 ml Pyrexröhrchen überführen
- jeweils 1 ml MeOH und CHCl<sub>3</sub> dazu pipettieren und vortexen
- zentrifugieren (10 min, 4000 rpm, 4 °C)
- obere Phase in ein neues Röhrchen überführen
- nochmal 1 ml CHCl<sub>3</sub> zugeben, vortexen und 10 min zentrifugieren (4000 rpm, 4 °C)
- obere Phase in ein 15 ml Kunststoffröhrchen überführen
- Probe mit Speed Vac einengen (Dauer ca. 6 h)
- nach 3-4 h überprüfen, ob CHCl<sub>3</sub>-Phase bzw. Proteinphase vorhanden ist, gegebenenfalls obere Phase in ein neues Röhrchen überführen und weiter einengen
- Speed Vac Schritt beenden, wenn nur noch zähflüssige, dunkelrote Masse (ca. 50 µl) übrig ist
- 150 µl H<sub>2</sub>O bidest. dazu geben, vortexen und Probe in einen Nylon-Filter überführen
- zentrifugieren (3 min, 15000 rpm, 4 °C)

- 50  $\mu\text{l}$  der Probe in ein Glasvial mit Einsatz überführen, 50  $\mu\text{l}$  0,2 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  dazu geben, Vial mit Metallkappe verschließen und vortexen
- Probe mit HPLC messen

Anmerkung: KCN ist giftig, deshalb wurden alle Arbeiten unter dem Abzug durchgeführt und Schutzhandschuhe getragen. Des Weiteren wurden die Proben zwischen den Schritten auf Eis gelagert.

### 3.4.3 HPLC-Methode

Die Proben wurden mit HPLC gemessen und mit einem Fluoreszenz- und UV/Vis-Detektor detektiert. Folgende Parameter wurden für die Methode verwendet:

HPLC: Waters Alliance<sup>®</sup>, e2695-Trennmodul

Autosampler Temperatur: 5 °C

Säule: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8, 4,6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$

Säulentemperatur: 23 °C

Laufmittel A:  $\text{NH}_4\text{-Ac}$ , 0,2 M in Wasser, pH 7,5 (mit 1 M KOH eingestellt)

Laufmittel B: Methanol

Fluss: 0,25 ml/min

Dauer: 45 min

Gradient:

Tabelle 3.8: Gradient der HPLC-Methode

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	100	0
10	100	0
25	85	15
26	0	100
30	0	100
31	100	0
45	100	0

Detektion:

Fluoreszenzdetektor: Absorption: 330 nm, Emission: 460 nm

UV/Vis-Detektor: Absorption 340 nm

Software: Empower<sup>TM</sup> 2 (Empower Pro)

Vor Beginn der Messung sollte die Säule mindestens 1 h mit dem Laufmittel A gespült werden. Vor der Analyse der Proben sollte ein Leerwert (reines Laufmittel A) gemessen werden.

#### 3.4.4 Standards für die Quantifizierung

Ausgehend von einer Lösung der vier Analyten mit einer Konzentration von je ca. 1 mM wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dafür wurden 50  $\mu\text{l}$  der Ausgangslösung in 1:2 Schritten mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. bis zu 1:128 verdünnt. Die hergestellten Standards wurden mit 50  $\mu\text{l}$   $\text{CN}^-$ -Lösung derivatisiert und für 5 min zum Reagieren stehen gelassen. Anschließend wurden je 50  $\mu\text{l}$  der derivatisierten Standardlösungen in Glasvials mit Einsatz pipettiert und mit 50  $\mu\text{l}$  des Laufmittels A verdünnt. Für eine Kalibrationsgerade wurde die Verdünnungsreihe in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Anschließend wurden die erhaltenen Peaks mit der Software Empower<sup>TM</sup> 2 von Waters integriert und Kalibrationsgeraden ermittelt.

## 4 Resultate

### 4.1 Analyse von NAD(P)(H)

#### 4.1.1 Methodenentwicklung

In der Literatur werden die Pyridindinukleotide anhand von Enzym-Assays oder chromatographischen Methoden analysiert (siehe z. B. Sparty et al. 2008, Wagner & Scott 1994). Oft wird aber nur ein Paar bzw. ein Redoxzustand der vier Moleküle gemeinsam extrahiert und gemessen, z. B.  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  oder  $\text{NADH}/\text{NADPH}$ . Die Probleme, die bei der gemeinsamen Analyse der vier Dinukleotide auftreten, resultieren aus der unterschiedlichen Stabilität bei verschiedenen pH-Werten. Die oxidierten Spezies ( $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ) sind nur in saurer Umgebung stabil, die reduzierten ( $\text{NADPH}$ ,  $\text{NADH}$ ) nur im basischen Milieu. Für die in dieser Arbeit entwickelte und verwendete Methode war das Ziel, alle vier Substanzen gemeinsam zu analysieren und mit HPLC zu messen. Sie basiert auf der Publikation von Klaidman et al. und beinhaltet die Derivatisierung der oxidierten Analyten  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  mit Cyanid (Klaidman et al., 1995). In der folgenden Abbildung ist das Reaktionsschema dargestellt.

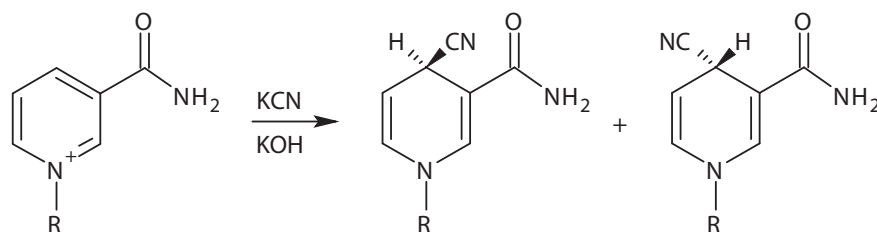


Abbildung 4.1: Reaktionsschema der Derivatisierung von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  mit Cyanid

Durch die Derivatisierung sind die oxidierten Spezies nun auch im basischen Milieu stabil. Dadurch ist eine gemeinsame Analyse mit den reduzierten Spezies unter basischen Bedingungen möglich. Des Weiteren zeigen die Derivate nun Fluoreszenz. Diese Eigenschaft weisen  $\text{NADPH}$  und  $\text{NADH}$  von Natur aus auf. Ein weiteres Problem, welches in der Literatur genannt wird, stellt die Oxidation der reduzierten Analyten dar. Deshalb wird die Probenvorbereitung bei niedrigen Temperaturen durchgeführt. Außerdem

ist im Derivatisierungsreagenz Bathophenanthrolindisulfonsäure als Chelator enthalten. Dieser bildet mit Metallionen einen Komplex und schützt damit die reduzierten Spezies vor der Oxidation. Durch die Derivatisierung der beiden oxidierten Moleküle entstehen je zwei Stereoisomere. Deshalb sind in einem Chromatogramm einer Probe mit den vier Analyten sechs Peaks zu erwarten.

Damit sind die Grundlagen und das Ziel der verwendeten Methode erklärt. Folgend wurden die ersten Messungen von Standards mit HPLC gestartet. Dafür wurden die Bedingungen der Publikation von Klaidman et al. verwendet.

Autosampler Temperatur: 5 °C

Säule: C18, 4,6 x 250 mm, 5 µm

Laufmittel A: NH<sub>4</sub>-Ac, 0,2 M in Wasser, pH 5,9

Laufmittel B: Methanol

Fluss: 1 ml/min

Gradient:

Tabelle 4.1: Gradient von Klaidman et al.

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	96	4
1	96	4
26	91	9

Die Methode musste allerdings verändert werden, um eine saubere Trennung der sechs Analyt-Peaks zu erhalten. Um eine HPLC-Methode zu entwickeln bzw. zu optimieren, gibt es einige Parameter, die variiert werden können. Diese werden im folgenden Abschnitt mit Bezug auf diese Arbeit beschrieben.

#### **Säule:**

Nach einigen Versuchen mit der C18-Säule, bei der die Analyten zu Beginn der Messung mit ähnlichen Retentionszeiten eluierten, wurde diese relativ rasch gegen eine C8-Säule ausgetauscht. Durch die kürzeren Kohlenstoffketten wurde eine bessere Wechselwirkung erwartet und dadurch längere Retentionszeiten bzw. eine bessere Auftrennung der Peaks angestrebt. Diese Erwartung wurde erfüllt. In dieser Arbeit kamen zwei verschiedene C8-Säulen zur Anwendung (siehe Geräteliste im Anhang, Seite 58).

#### **Fluss:**

Zu Beginn wurde, wie in der Publikation angeführt, ein Fluss von 1 ml/min eingestellt. Er musste allerdings beim Wechsel auf die erste C8-Säule verringert werden, da diese mit 2,1



mm einen geringeren Innendurchmesser hatte und somit der Druck zu hoch war. Später wurde zwar eine C8-Säule mit größerem Innendurchmesser (4,5 mm) für die Messungen verwendet, allerdings wurde der geringe Fluss von 0,25 ml/min beibehalten. Generell ist zu sagen, dass mit kleinen Flussänderungen kaum Unterschiede in der Auftrennung und den Retentionszeiten erzielt werden.

### Temperatur:

Mit Variieren der Temperatur lassen sich kleine Änderungen des Elutionsverhaltens der Moleküle erzielen. Bei höherer Temperatur weisen die Analyten kürzere Retentionszeiten auf.

### Gradient:

Ausgehend von den Bedingungen der Publikation wurde der Gradient entwickelt. Dabei wurde die Anfangszusammensetzung der Laufmittel verändert. Außerdem wurden Stufen innerhalb des Gradienten eingebaut. Wenn der Gradient die meisten der sechs Peaks aufgetrennt hatte, wurde mit unterschiedlichen pH-Werten versucht, die noch coeluiierenden Peaks zu trennen.

### pH-Wert:

Durch unterschiedliche pH-Werte im Laufmittel kommt es zu Änderungen der Ladung der Analyten und dementsprechend auch zu Änderungen ihrer Wechselwirkung zur Säule. Es wurden pH-Werte zwischen 5,5 und 8,5 getestet. In Abbildung 4.2 sind die Chromatogramme von Messungen der Dinukleotid-Lösung bei unterschiedlichen pH-Werten dargestellt.

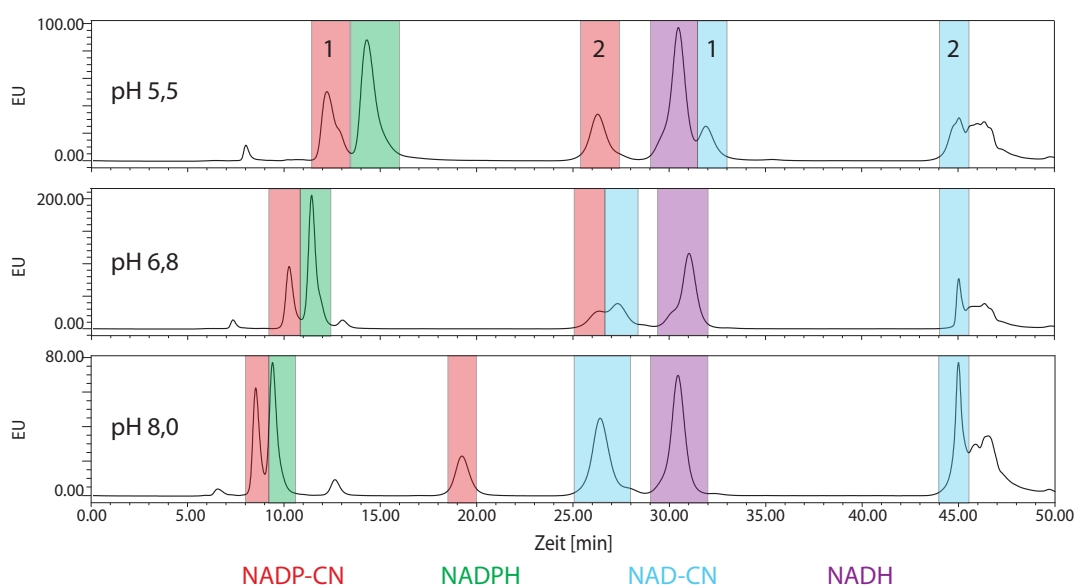


Abbildung 4.2: Chromatogramme von NAD(P)(H) bei unterschiedlichen pH-Werten

NADH und NAD-CN 2 eluieren jeweils zur gleichen Zeit. Die Peaks der anderen Analyten hingegen verschieben sich mit höherem pH-Wert zu früheren Retentionszeiten. Dadurch gelingt es, NADP-CN 2, NAD-CN 1 und NADH zu trennen. Die Peaks von NADP-CN 1 und NADPH schieben sich jedoch bei höheren pH-Werten zusammen. Sie sind also bei pH 5,5 besser aufgetrennt. Des Weiteren eluiert unter sauren Bedingungen der Peak von NAD-CN 1 sogar nach jenem von NADH.

Durch die Änderung des pH-Wertes im Laufmittel konnte die Auftrennung der Peaks erheblich verbessert werden.

Nach der Optimierung der Methode wurden folgende Parameter für die Messungen verwendet:

Autosampler Temperatur 5 °C

Säule: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8, 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m

Säulentemperatur 23 °C

Laufmittel A: NH<sub>4</sub>-Ac, 0,2 M in Wasser, pH 7,5 (mit 1 M KOH eingestellt)

Laufmittel B: Methanol

Fluss: 0,25 ml/min

Dauer: 45 min

Gradient:

Tabelle 4.2: ursprünglicher Gradient der HPLC-Methode

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	99	1
15	99	1
30	85	15
31	0	100
35	0	100
36	99	1
45	99	1

Um die einzelnen Peaks im Chromatogramm einer derivatisierten Lösung der vier Dinukleotide zu identifizieren, wurden zusätzlich die Einzelsubstanzen gemessen. Die dadurch erhaltenen Peaks wurden mit jenen der gemischten Lösung verglichen. Somit konnten alle Peaks den jeweiligen Analyten zugeordnet werden (siehe Abbildung 4.3).

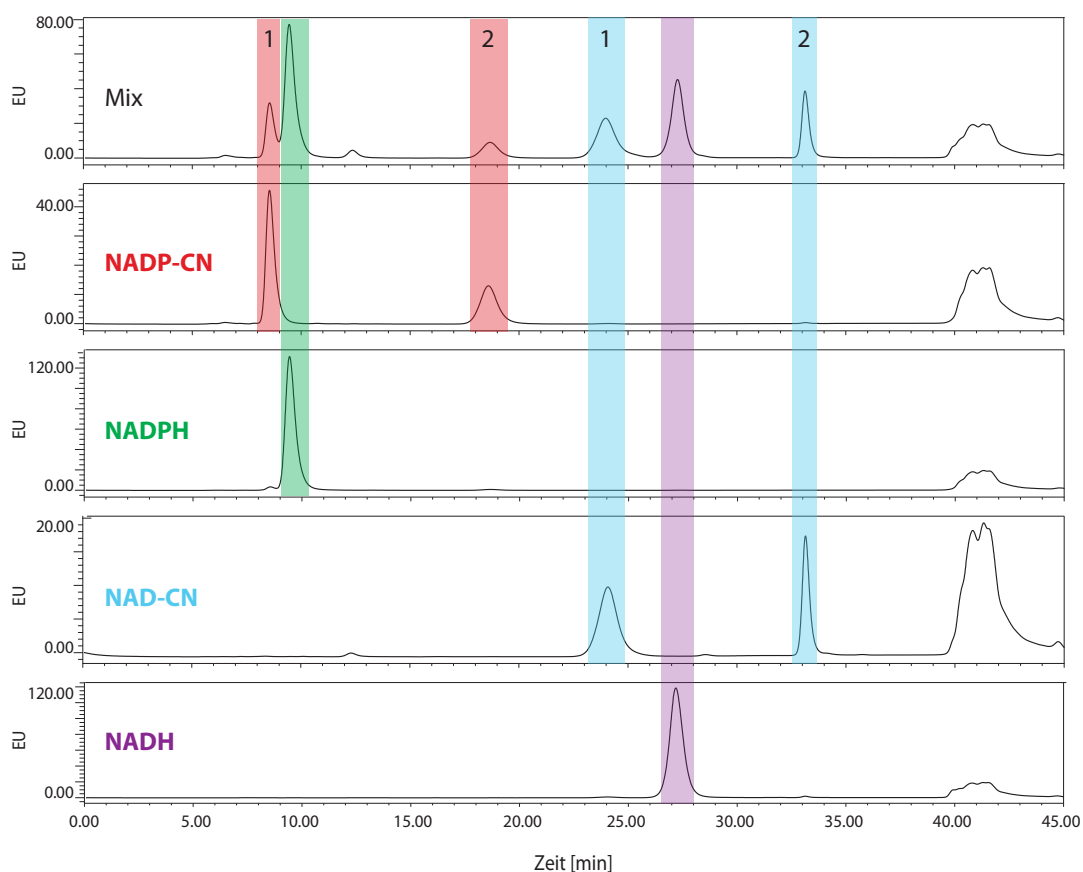


Abbildung 4.3: Chromatogramme der vier Analyten, einzeln und gemeinsam

Mit Beginn der Messung der ersten Extrakte aus Hefezellen traten Probleme mit der Säule auf. Die Peaks waren nicht mehr symmetrisch und klar getrennt wie in Abbildung 4.3, sondern unsymmetrisch und mit Tailing und Doppelpeaks versehen. Eine vermutete Ursache dafür war eine Verstopfung mit Proteinen, da unter den verwendeten Bedingungen ein Teil der Proteine nicht ausgefällt und damit abgetrennt wurde. Die Säule wurde lange gespült und diverse Lösungsmittel wurden dafür verwendet, u. a. Methanol, Iso-propanol,  $\text{NH}_4\text{Ac}$  mit 0,1 % TCA. Nach langer Spülzeit konnte die Säule wieder benutzt werden, allerdings veränderte sich das Elutionsverhalten der Analyten und damit auch das Chromatogramm, wie in Abbildung 4.4 zu sehen ist. Deshalb mussten die Bedingungen minimal verändert werden (siehe Tabelle 3.8, Seite 21).

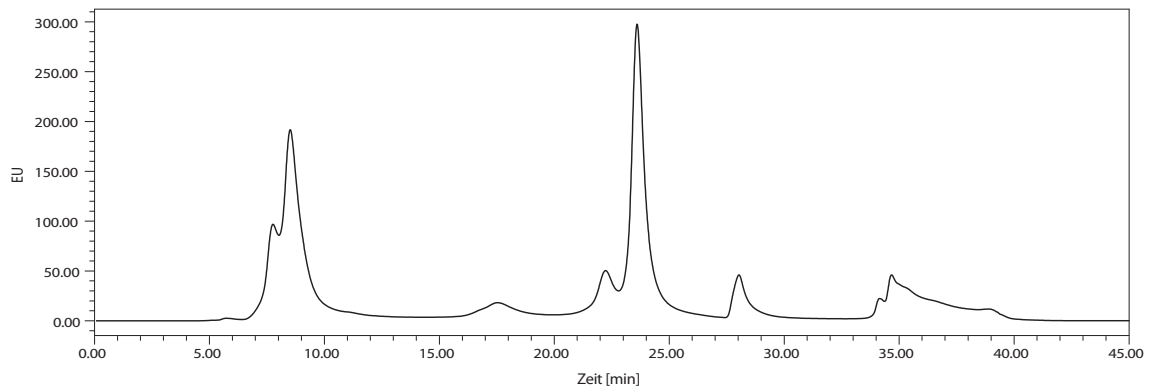


Abbildung 4.4: Chromatogramm von NAD(P)(H) mit optimiertem Gradienten

### 4.1.2 Überprüfen der Isomerpeaks mit Massenspektrometrie

Normalerweise sind Isomere schwer zu trennen, aber bei der verwendeten Methode eluieren sie mit deutlich unterschiedlicher Retentionszeit, was auch in der Publikation von Klaidman et al. beschrieben wird. Trotzdem wurde mit Massenspektrometrie überprüft, ob die erhaltenen Isomerpeaks tatsächlich NAD-CN bzw. NADP-CN zuzuordnen sind. Dafür wurde die HPLC an ein Massenspektrometer angeschlossen. Die Probe wurde damit direkt nach dem Durchlauf der Detektoren in das MS weitergeleitet und mit ESI (negativer Modus) ionisiert. Durch den ESI-Prozess verlieren die Moleküle ein Proton ( $H^+$ ) und werden als  $[M-H]^-$  detektiert. Als Analysator der Ionen diente ein qTOF-Massenspektrometer. Die Analyten wurden zuerst einzeln injiziert, um ihre Massenspektren und Massenzahlen festzustellen. Danach wurde eine Probe mit allen vier Molekülen mit HPLC-MS analysiert. Die Chromatogramme sowie die Spektren der jeweiligen Analyten sind in den folgenden Abbildungen zu sehen.

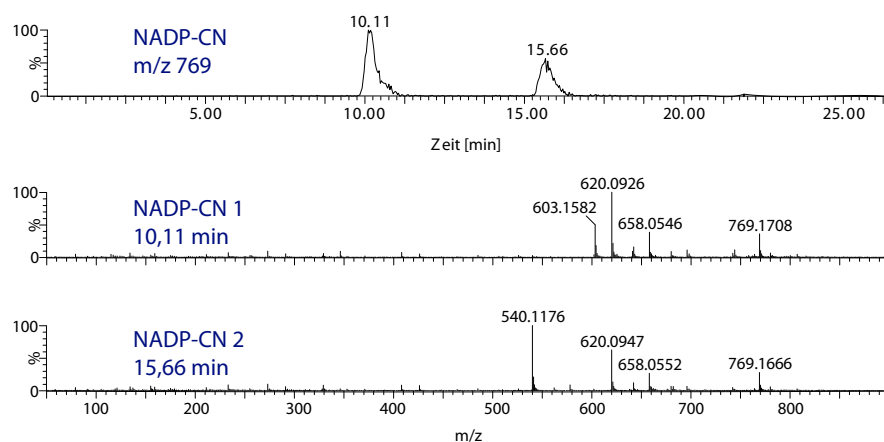


Abbildung 4.5: Chromatogramm und Spektren der NADP-CN Isomere

In Abbildung 4.5 sind die Isomerpeaks von NADP-CN bei ihrer spezifischen Massenzahl  $m/z$  769 dargestellt. Außerdem sind die Massenspektren der beiden Peaks abgebildet. NADP-CN 1 und NADP-CN 2 weisen beide die Massenzahlen  $m/z$  620,  $m/z$  658 und  $m/z$  769 auf. Somit sind die Spektren der beiden Isomerpeaks von NADP-CN ident.  $m/z$  540 im Spektrum von NADP-CN 2 dürfte aus einer Überlappung mit dem Peak bei 14,02 min resultieren (siehe Abbildung 4.8).

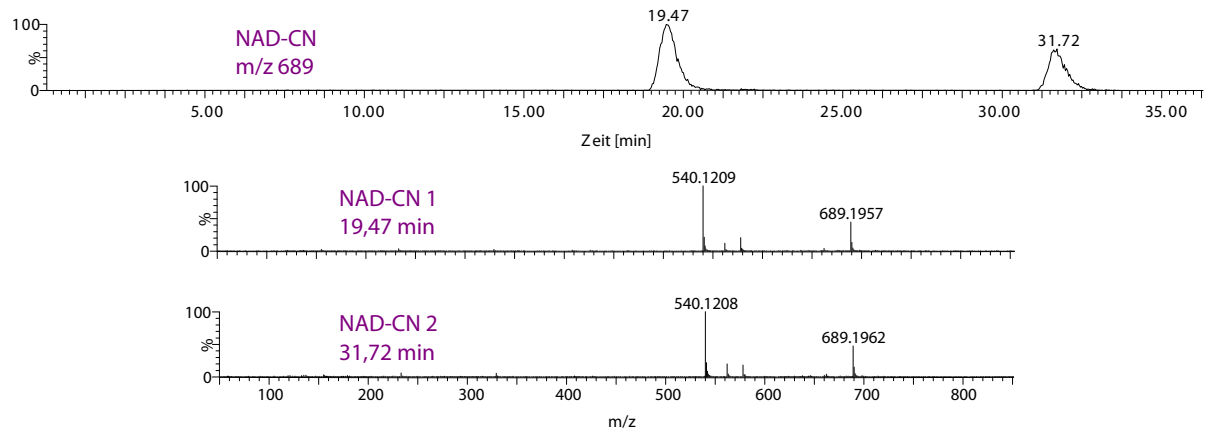


Abbildung 4.6: Chromatogramm und Spektren der NAD-CN Isomere

Abbildung 4.6 zeigt die beiden Isomerpeaks von NAD-CN und ihre Massenspektren. Sowohl im Spektrum von NAD-CN 1 als auch in jenem von NAD-CN 2 sind die beiden Massenzahlen  $m/z$  540 und  $m/z$  689 enthalten. Die Spektren der Isomere von NAD-CN sind somit ebenfalls ident.

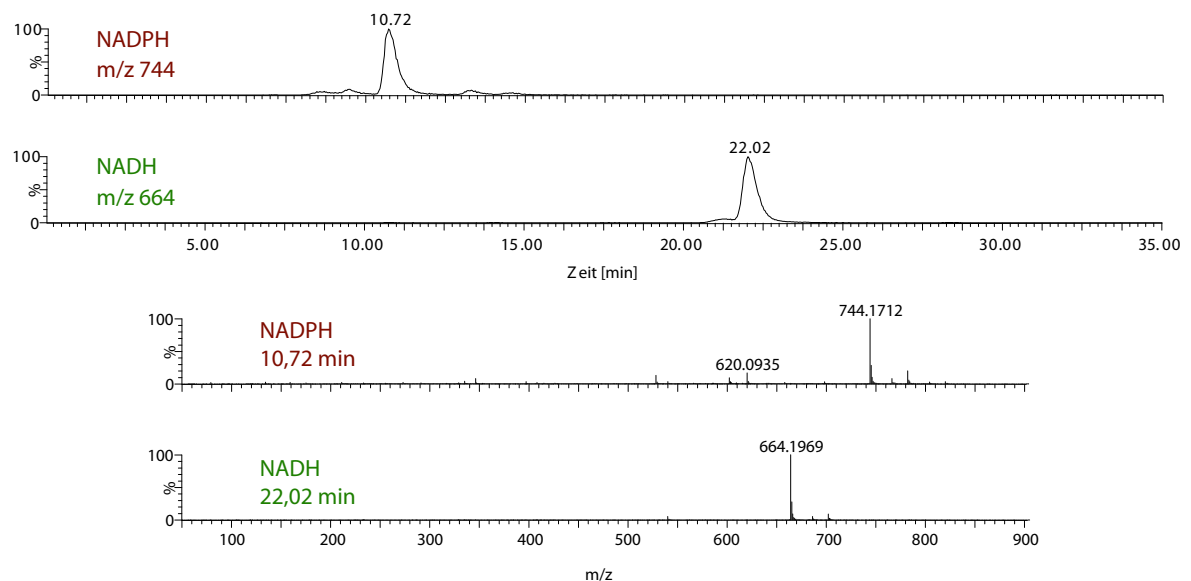


Abbildung 4.7: Chromatogramme und Spektren von NADPH und NADH

In Abbildung 4.7 sieht man die Peaks und die Massenspektren von NADPH und NADH.

$m/z$  744 und  $m/z$  664 entsprechen dabei ihren Molekülmassen minus einem Proton. Die Messungen mit MS haben gezeigt, dass die Zuordnung der Peaks, insbesondere jene der Isomere, korrekt war.

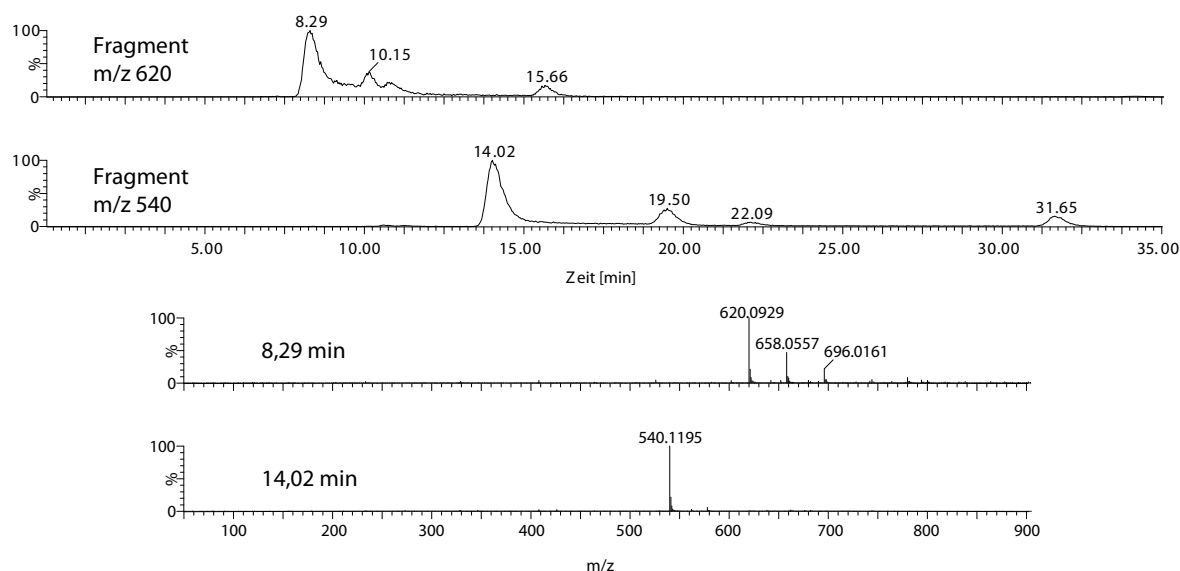


Abbildung 4.8: Chromatogramme und Spektren von Peaks bei  $m/z$  540 und  $m/z$  620

In Abbildung 4.8 sind Peaks bei den spezifischen Massenzahlen  $m/z$  540 und  $m/z$  620 dargestellt. Diese beiden Massen sind auch in den Spektren von NAD-CN und NADP-CN zu finden und sind auf eine Fragmentierung zurückzuführen, bei der Nicotinamid abgespalten wird. Wie man in den Chromatogrammen aber sieht, eluieren diese Moleküle ohne Nicotinamid auch schon vor den Analyten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass durch die Derivatisierung bei einem Teil von  $\text{NAD(P)}^+$  das Nicotinamid abgespalten wird.

### 4.1.3 Stabilität

Zum Überprüfen der Stabilität der Dinukleotide wurde eine Probe mit den vier Analyten hergestellt und mit der  $\text{CN}^-$ -Lösung derivatisiert. Anschließend wurde sie auf mehrere Vials verteilt (1:2 verdünnt mit 0,2 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ ). Die Vials wurden nun bei 5 °C im Autosampler, bei -20 °C und bei -80 °C im Tiefkühler gelagert. Das Vial im Autosampler wurde sofort und über die darauf folgenden Tage mehrmals gemessen, um festzustellen, ob und wann die Konzentration von  $\text{NAD(P)(H)}$  abnimmt. In der folgenden Abbildung ist gut zu sehen, dass sich die Werte nach 84 h ca. halbieren. Die Proben sind somit ca. 68 h stabil. In der Literatur wird eine Stabilität von ca. 72 h angegeben. Man sieht bei den Werten, die mit dem UV/Vis-Detektor gemessen wurden, weniger Schwankungen, als bei jenen, die mit dem Fluoreszenzdetektor analysiert wurden. Der Grund dafür dürfte in

einer defekten Durchflusszelle des Fluoreszenzdetektors zum Zeitpunkt der Messung gelegen sein. Dadurch traten Flussschwankungen innerhalb des Detektors auf, was geringe Unregelmäßigkeiten bei den Messwerten zur Folge hatte. Die Proben, die bei  $-20\text{ °C}$  bzw.  $-80\text{ °C}$  gelagert wurden, brachten keine signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen im Vergleich zu den Proben, die im Autosampler gelagert wurden. Nach drei Tagen waren die Proben für quantitative Analysen nicht mehr nutzbar.

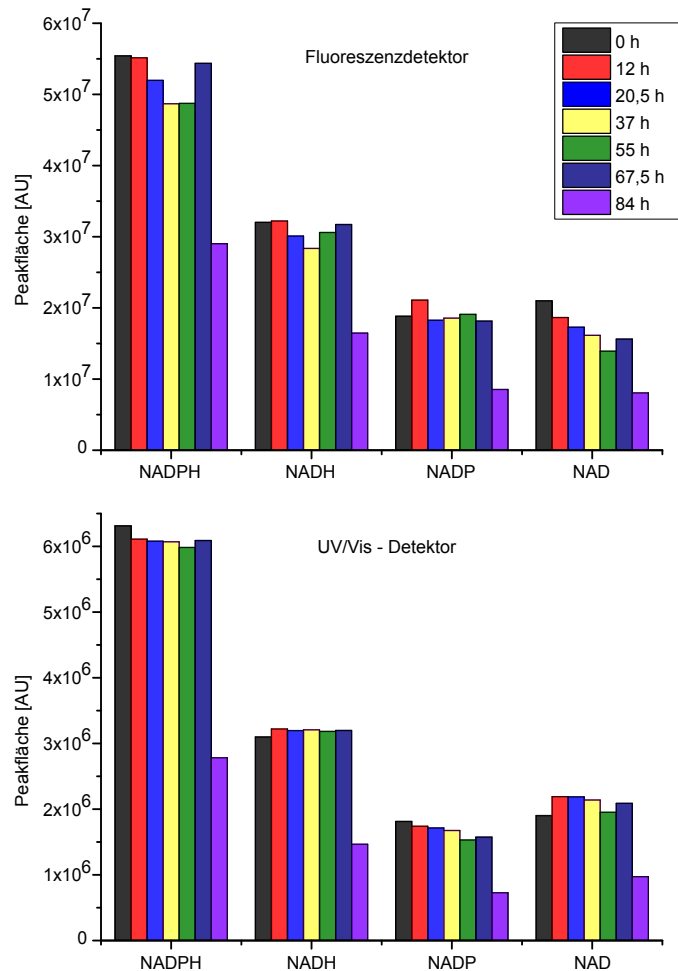


Abbildung 4.9: Stabilität von NAD(P)(H)

#### 4.1.4 Quantifizierung

Die Herstellung der Standards für die Kalibrationsgeraden ist in Abschnitt 3.4.4 (Seite 22) beschrieben. Es ist wichtig, dass die Werte der Realproben innerhalb der Kalibrationsgeraden liegen. Deshalb sind je nach Bedarf die Konzentrationen der Ausgangslösung zu erhöhen. Nach der Messung der Standards wurden die erhaltenen Peaks integriert und

Kalibrationsgeraden konnten dargestellt werden. Abbildung 4.10 zeigt die Kalibrationsgeraden von NAD(P)(H).

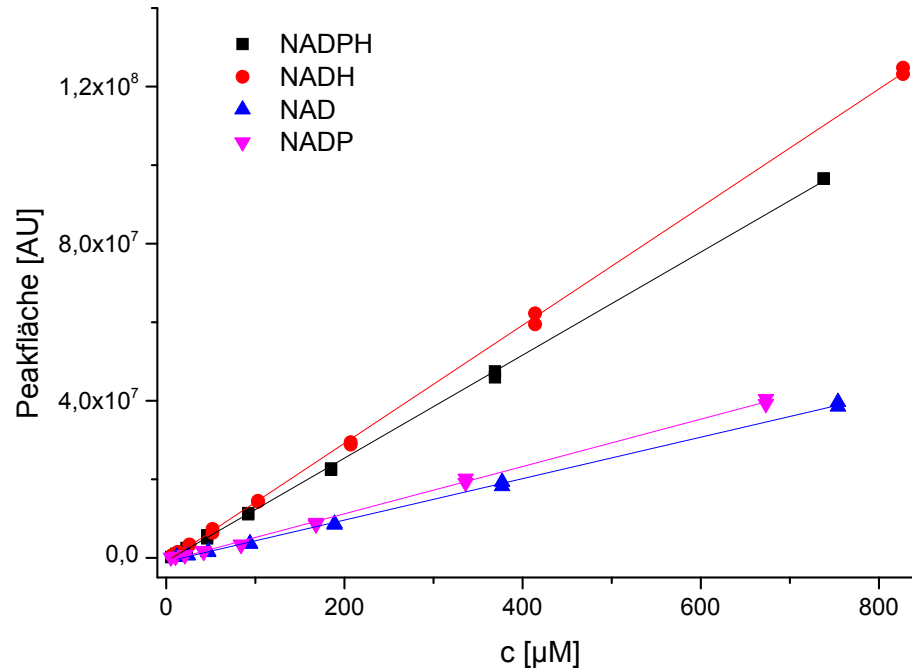


Abbildung 4.10: Kalibrationsgeraden von NAD(P)(H)

Anhand der Standards aus der Verdünnungsreihe konnten auch die Detektionslimits der Analyten festgestellt werden, wie in Tabelle 4.3 zu sehen ist.

Tabelle 4.3: Detektionslimit von NAD(P)(H)

	m [ng]
NADPH	21,5
NADH	21,5
NADP <sup>+</sup>	39,1
NAD <sup>+</sup>	39,1

#### 4.1.5 Entwicklung der Extraktion von NAD(P)(H) aus Hefezellen

Zu Beginn stellte sich die Frage, wie viele Zellen für den Aufschluss verwendet werden sollen. In Anlehnung an die Methode der Lipidextraktion des eigenen Labors wurden in den ersten Versuchen  $10^9$  Zellen für die Extraktion von NAD(P)(H) verwendet. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit Glaskugeln (Sporty et al., 2008). Für die ersten Proben wurde der Merckenschlager Homogenisator eingesetzt. Später wurde der Multi-Reax Schüttler bei 4 °C für die Routine-Durchführung benutzt. Wie in der Publikation von



Klaidman et al. erfolgte der Zellaufschluss in Anwesenheit des Derivatisierungsreagenzes. Nach dem Aufschluss und anschließender Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Danach erfolgte die Extraktion der Analyten mit Chloroform. Die wässrige Phase wurde durch einen Nylon-Filter filtriert und konnte anschließend mit HPLC gemessen werden. Diesen so erhaltenen Proben wurden teilweise vor bzw. während der Extraktion Standards zugefügt, um zu sehen, ob sich das Ergebnis durch den unterschiedlichen Zeitpunkt der Zugabe ändert und um die Analyten im Chromatogramm zu erkennen.

Die Messung der Realproben brachte allerdings keine Aufschlüsse. Die Analyten konnten bei mehreren unterschiedlichen Ansätzen (u. a. auch bei Aufkonzentrierung der Extrakte) nicht detektiert werden. Stellvertretend für die anderen Analyten wurde deshalb berechnet, wie viel NADH ungefähr in einer Zelle bzw. in  $10^9$  Zellen vorhanden ist. Dafür wurde eine NADH-Konzentration von 1 mM (Sporty et al.) und das Zellvolumen von 50 fl (gemessen mit CASY<sup>®</sup>) herangezogen. Der resultierende Wert wurde mit der Menge (100 nmol) des zur Realprobe pipettierten Standards verglichen, da dieser detektiert werden konnte. Nach Berechnung der theoretischen Menge an NADH in der Zelle stellte sich heraus, dass  $10^9$  Zellen zu wenig waren, um diese zu detektieren. Deshalb wurde die aufzuschließende Zellmenge auf  $10^{10}$  erhöht.

Des Weiteren traten, wie schon beschrieben, Probleme mit der HPLC-Säule auf. Der Grund dafür wurde in der Extraktion mit Chloroform und den dadurch noch enthaltenen Proteinen vermutet, da diese nur noch schwer von der Säule zu entfernen waren. Deshalb wurde die Extraktion in weiterer Folge mit Methanol/Chloroform durchgeführt. Aufgrund der größeren Zellmenge wurden die verwendeten Lösungsmittelvolumina erhöht (bis zu 7 ml). Dadurch waren die Konzentrationen von NAD(P)(H) nach der Extraktion zu gering, um sie zu detektieren. Infolgedessen wurden die Extrakte mit Speed Vac aufkonzentriert. Dieser Schritt ist zeitaufwändig, deshalb wurde versucht, den wässrigen Anteil im Lösungsmittel so gering wie möglich zu halten. Der Aufschluss wurde mit 2 ml Derivatisierungsreagenz sowie 2 ml Methanol durchgeführt. Außerdem wurde auch das Gesamtvolumen nach der Extraktion reduziert, weshalb nach dem Aufschluss nur noch 1 ml Methanol zugegeben wurde. Dadurch konnte der Speed Vac Schritt verkürzt werden, wobei er mit ca. 6 h noch immer lange dauerte. Nach der Einengung des Extraktes wurde der Rückstand in 150  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen und gevortext. Anschließend wurde er durch einen Nylon-Filter filtriert, um im Extrakt enthaltene RNA und DNA zu entfernen. Danach wurde die Probe in ein Vial pipettiert, mit der gleichen Menge an Laufmittel A verdünnt und gemessen.

Zur Übersicht ist in Abbildung 4.11 ein Arbeitsschema für die Extraktion dargestellt.

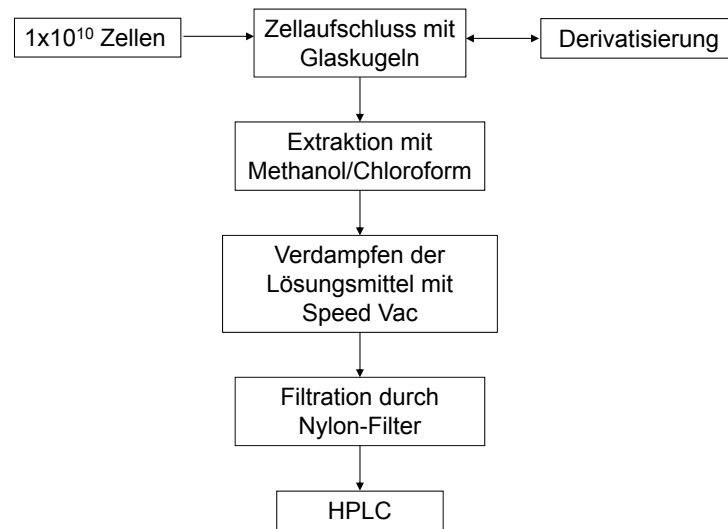


Abbildung 4.11: Arbeitsschema zur Extraktion von NAD(P)(H) aus Hefezellen

Es wurden verschiedene KOH-Konzentrationen zwischen 60 mM und 200 mM in der Cyanid-Lösung getestet, um die optimale Menge für die Methode zu finden. Für die Messungen wurden Realproben mit zugesetzten Standards verwendet. Bei einer Konzentration von 160 und 200 mM KOH waren nur die Peaks von NADPH und NADH zu sehen. Bei 120 mM wurden auch die NAD-CN-Peaks detektiert. Bei den beiden restlichen KOH-Konzentrationen (60 und 90 mM) waren die Peaks von allen Analyten gut sichtbar, NADPH und NADH waren jedoch bei 60 mM etwas schwächer. Deshalb wurde die verwendete KOH-Konzentration im Derivatisierungsreagenz von 60 mM (wie in der Publikation von Klaidman et al.) auf 90 mM erhöht.

Mit der so optimierten Durchführung der Extraktion wurden einige Realproben analysiert. Ein Chromatogramm solcher Analysen wird in folgender Abbildung als Beispiel dargestellt.

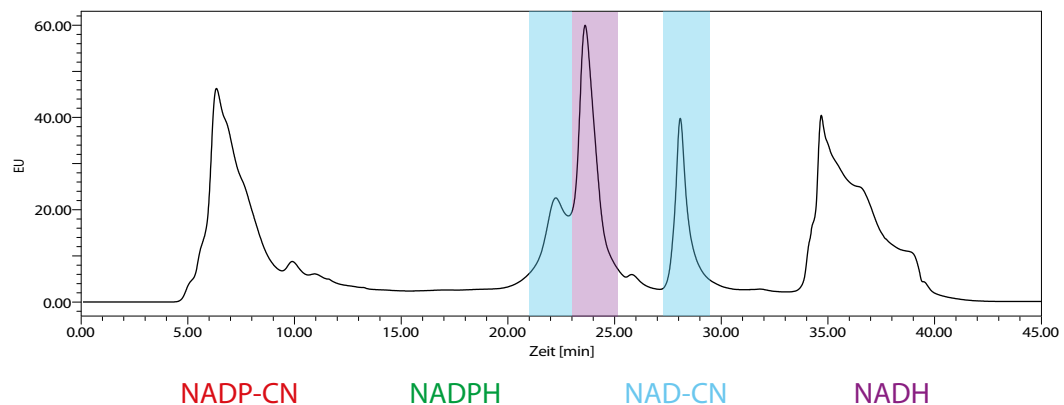


Abbildung 4.12: Chromatogramm einer Realprobe, behandelt mit  $\text{CN}^-$

Das gezeigte Chromatogramm stammt von einer Realprobe, die wie in Abschnitt 3.4 (Seite 19) beschrieben für die Analyse vorbereitet und mit den angegebenen Bedingungen gemessen wurde. Es sind nur die Peaks der Analyten NAD-CN und NADH zu sehen. Der Peak zu Beginn der Messung stammt nicht von NADP-CN bzw. NADPH, sondern dürfte eine Substanz aus der Matrix der Realprobe sein. Änderungen bezüglich des Volumens der  $\text{CN}^-$ -Lösung bzw. des Zeitpunkts der Zugabe brachten keine Verbesserungen. Es wurde vor und während des Zellaufschlusses bzw. der Extraktion ein NADPH-Standard zur Probe pipettiert, um zu sehen, ob dieser bei der Messung detektiert wird oder ob er unter den verwendeten Bedingungen während der Probenvorbereitung zersetzt wird. Dies war nicht der Fall und das zugesetzte NADPH konnte einwandfrei detektiert werden. Das gezeigte Ergebnis lässt den Schluss zu, dass in der Hefezelle weniger phosphorylierte Dinukleotide enthalten sind. Aus diesem Grund sind mit der verwendeten Methode und den beschriebenen Bedingungen zwar  $\text{NAD}^+$  und NADH aus Realproben detektierbar,  $\text{NADP}^+$  und NADPH hingegen nicht.

Daher wurde statt der  $\text{CN}^-$ -Lösung eine 200 mM KOH-Lösung für die Extraktion verwendet, um zu überprüfen, ob bei diesen basischen Bedingungen NADPH detektiert werden kann. Wie das folgende Chromatogramm zeigt, sind die oxidierten Dinukleotide wie erwartet nicht detektiert worden. Der NADPH-Peak ist nur leicht zu sehen und fällt leider mit dem großen Peak zusammen, der zu Beginn erscheint. Ansonsten könnte er sicher zu quantitativen Zwecken verwendet werden. Wenn auch nicht einwandfrei, so beweist dieser NADPH-Peak jedoch, dass die Methode grundsätzlich funktioniert. Der Grund, warum NADPH mit KOH detektiert werden kann und mit  $\text{CN}^-$  nicht, dürfte an den basischeren und damit stabileren Bedingungen liegen. Bei der Analyse mit  $\text{CN}^-$  dürfte aufgrund der geringeren KOH-Konzentration im Derivatisierungsreagenz (90 mM) ein Teil vom NADPH oxidiert bzw. sich zersetzen. Damit dürfte die NADPH-Menge unter das Detektionslimit fallen.

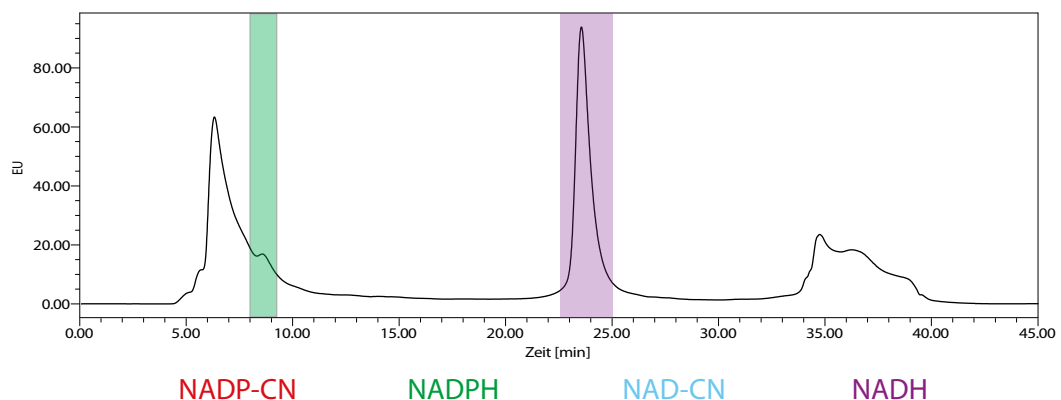


Abbildung 4.13: Chromatogramm einer Realprobe, behandelt mit KOH

Die Analyse von  $\text{NADP}^+$  aus Hefezellen funktionierte mit beiden beschriebenen Bedingungen nicht. Einerseits fällt  $\text{NADP}^+$ -CN1 mit dem großen Peak bei ca. 6,5 min zusammen, andererseits ist Peak 2 leider zu breit und dadurch bei geringen Mengen nicht detektierbar. Es wäre eine Möglichkeit, die ganze Probenvorbereitung bei sauren Bedingungen durchzuführen und festzustellen, wie sich  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  verhalten.

Zusammenfassend ist an dieser Stelle zu sagen, dass die Methode grundsätzlich funktioniert, speziell für die Analyse aus Hefezellen allerdings Schwierigkeiten bereitet, da die phosphorylierten Analyten eine zu geringe Konzentration aufweisen.  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  sind durch die Analyse mit Cyanid detektierbar und können quantifiziert werden.  $\text{NADPH}$  kann nur mit  $\text{KOH}$  und nur qualitativ analysiert werden.  $\text{NADP}^+$  ist aus Hefezellen aufgrund der geringen Konzentration mit dieser Methode bei den genannten Bedingungen nicht zu detektieren.

#### 4.1.6 Ergebnisse der Analyse von $\text{NAD(P)(H)}$ aus Hefezellen

Für die Analyse aus verschiedenen Hefestämmen wurden die Proben mit beiden Varianten ( $\text{KOH}$ ,  $\text{CN}^-$ ) vorbereitet. Es ist allerdings zu sagen, dass sich zu diesem Zeitpunkt die Methode zwar zur qualitativen Analyse eignete, aber für die quantitative Analyse noch nicht ausgereift genug war. Da die Arbeit aber zu einem Schluss kommen sollte, wurde die Methode trotzdem bei der Analyse aus unterschiedlichen Hefestämmen angewendet.

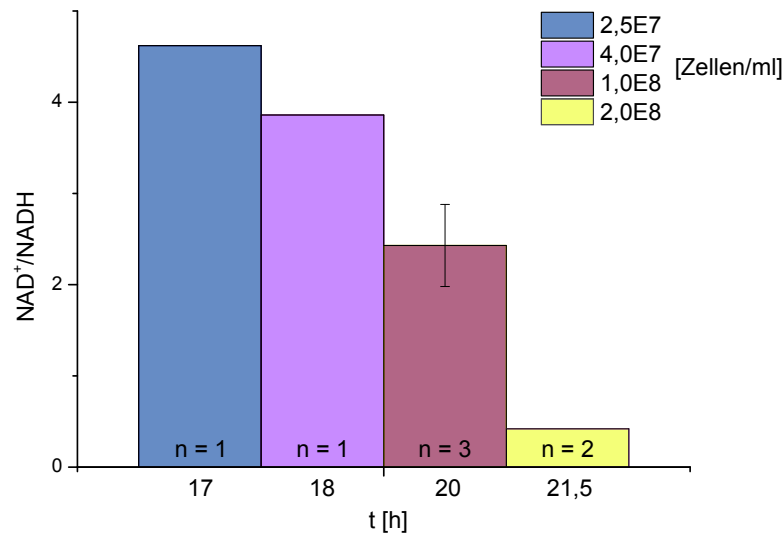
##### Zellernte zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Wachstums

Bei diesem Experiment wurde der Hefewildtyp BY4741 in Minimalmedium gezüchtet. Die Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Wachstums geerntet. Begonnen wurde dabei in der logarithmischen Phase bei  $2,5 \times 10^7$  Zellen/ml. Der letzte Zeitpunkt der Entnahme war in der stationären Phase bei einer Zellzahl von ca.  $2 \times 10^8$  Zellen/ml.

Die Werte in Abbildung 4.14 und Tabelle 4.4 beziehen sich auf das Zellnassgewicht, das vor dem Zellaufschluss bestimmt wurde, und stammen von der Analyse mit Cyanid und der Detektion mit dem Fluoreszenzdetektor. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Änderung in der Konzentration von  $\text{NAD}^+$  sowie im Verhältnis  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . Beide Werte nehmen im Verlauf des Wachstums ab. In Abbildung 4.14 ist das Verhältnis  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  zu den unterschiedlichen Zeitpunkten des Wachstums dargestellt.

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Analyse von NAD(H) im Hefewildtyp zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums, bezogen auf das Nassgewicht

t [h]	Zellzahl [Zellen/ml]	NADH [nmol/g Zellen]	NAD <sup>+</sup> [nmol/g Zellen]	NAD <sup>+</sup> /NADH
17	2,5x10 <sup>7</sup>	55,2	255,4	4,62
18	4,0x10 <sup>7</sup>	45,5	175,8	3,86
20	1,0x10 <sup>8</sup>	48,2	113,3	2,35
20	1,0x10 <sup>8</sup>	32,6	95,2	2,92
20	1,0x10 <sup>8</sup>	36,2	73,2	2,02
21,5	2,0x10 <sup>8</sup>	85,4	55,7	0,65
21,5	2,0x10 <sup>8</sup>	47,3	9,0	0,19

Abbildung 4.14: Verhältnis NAD<sup>+</sup>/NADH zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums

Proben, die in Anwesenheit von KOH für die Analyse vorbereitet wurden, zeigten in den Ergebnissen der NADH-Menge eine Tendenz zu höheren Werten, wobei diese in der gleichen Größenordnung wie bei der Analyse mit CN<sup>-</sup> lagen. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass die reduzierten Spezies bei höheren KOH-Konzentrationen und pH-Werten stabiler sind und somit während der Probenvorbereitung weniger Verlust auftritt. Allerdings sollten für diese Arbeit möglichst alle vier Analyten gemeinsam gemessen werden. Daher stellte die in der CN<sup>-</sup>-Lösung verwendete KOH-Konzentration von 90 mM einen guten Kompromiss dar. NADPH wurde nur in wenigen Proben detektiert, aber mit den erhaltenen Peaks konnte eine quantitative Auswertung nicht durchgeführt werden. In weiterer Folge wurden die Hefezellen in der spätlogarithmischen Phase bei einer Zellzahl von 1x10<sup>8</sup> Zellen/ml geerntet. Einerseits liegt in der logarithmischen Phase genug NAD<sup>+</sup> zur Analyse vor. Andererseits muss man für eine Menge von 10<sup>10</sup> Zellen nur 100 ml an Zellsuspension ernten, im Gegensatz zu 400 ml bei einer Zellzahl von 2,5x10<sup>7</sup> Zellen/ml, was eine

Routine-Durchführung erleichtert.

### Vergleich der gemessenen Werte mit der Literatur

In der Literatur sind die Mengen der Metaboliten in der Zelle meist in  $\mu\text{mol/g DW}$  angegeben und beziehen sich somit auf das Trockengewicht der analysierten Zellen. Für diese Arbeit wurde allerdings nur das Nassgewicht der Zellen bestimmt. Das theoretische Trockengewicht einer Hefezelle beträgt  $1,5 \times 10^{-11} \text{ g} \cdot 10^{10}$  Zellen entsprechen also 0,15 g. Die gemessenen Mengen wurden auf diesen Wert bezogen, um sie trotzdem mit jenen aus der Literatur vergleichen zu können (siehe Tabelle 4.5). In Tabelle 4.6 sind die intrazellulären Konzentrationen von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  sowie das intrazelluläre Verhältnis  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  aus der Literatur angegeben.

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Analyse von  $\text{NAD(H)}$  im Hefewildtyp zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums, bezogen auf theoretisches Trockengewicht

t [h]	Zellzahl [Zellen/ml]	NADH [ $\mu\text{mol/g DW}$ ]	$\text{NAD}^+$ [ $\mu\text{mol/g DW}$ ]	$\text{NAD}^+/\text{NADH}$
17	$2,5 \times 10^7$	0,37	1,70	4,62
18	$4,0 \times 10^7$	0,31	1,20	3,86
20	$1,0 \times 10^8$	0,29	0,69	2,35
20	$1,0 \times 10^8$	0,20	0,59	2,92
20	$1,0 \times 10^8$	0,26	0,48	2,02
21,5	$2,0 \times 10^8$	0,41	0,27	0,65
21,5	$2,0 \times 10^8$	0,28	0,04	0,19

Tabelle 4.6: Werte aus der Literatur, bezogen auf das Trockengewicht

Referenz	NADH [ $\mu\text{mol/g DW}$ ]	$\text{NAD}^+$ [ $\mu\text{mol/g DW}$ ]	$\text{NAD}^+/\text{NADH}$
Moreira dos Santos et al. 2004	0,31	2,00	6,45
Heux et al. 2006	0,36	2,70	7,50
Canelas et al. 2008	0,96	6,80	7,50
Anderson et al. 2002	/	/	2,80
Lange et al. 2001	0,39	2,40	6,15

### Ergebnisse der Analyse aus verschiedenen Hefestämmen

Die  $\text{NAD(P)(H)}$ -Konzentrationen wurden aus den Hefestämmen *ald6 $\Delta$*  und BY4741(ZWF1) sowie den jeweiligen Kontrollstämmen BY4741 und BY4741(EV) analysiert. Bei der Mutante *ald6 $\Delta$*  fehlt das Enzym Ald6p, das die Reaktion Acetaldehyd zu Acetat katalysiert, bei der ein Molekül  $\text{NADPH}$  freigesetzt wird. Deshalb ist im Vergleich zum Wildtyp eine

niedrigere NADPH-Konzentration zu erwarten. Bei der *ZWF1*-überexprimierenden Hefe ist die Synthese des Enzyms Zwf1p erhöht, das den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Pentosephosphatwegs katalysiert, bei dem NADPH gebildet wird. Dadurch ist eine höhere NADPH-Konzentration zu erwarten. Verglichen wird BY4741(ZWF1) mit dem Stamm BY4741(EV), in den der entsprechende leere Vektor transformiert wurde. Die Stämme wurden in Minimalmedium gezüchtet und anschließend mit  $\text{CN}^-$  und mit KOH aufgeschlossen. Sie wurden in einer Dreifachbestimmung analysiert, wobei diese nicht direkt hintereinander sondern in unterschiedlichen Messreihen vorbereitet und gemessen wurden. Für die Induktion der Überexpression von Zwf1p sollte  $\text{Cu}^{2+}$  dem Medium extra zugefügt werden. Dies wurde in diesem Versuch allerdings verabsäumt.

Tabelle 4.7: Ergebnisse der Analyse von NAD(H) aus den Hefestämmen *ald6Δ*, BY4741, BY4741(ZWF1) und BY4741(EV)

Hefestamm	NADH [nmol/g Zellen]	NAD <sup>+</sup> [nmol/g Zellen]	NAD <sup>+</sup> /NADH
BY4741	48,2	113,3	2,3
BY4741	32,6	95,2	2,9
BY4741	36,2	73,2	2,0
<i>ald6Δ</i>	42,7	55,6	1,3
<i>ald6Δ</i>	49,0	159,7	3,3
<i>ald6Δ</i>	54,6	65,8	1,2
BY4741(EV)	37,5	111,0	3,0
BY4741(EV)	15,2	117,5	7,7
BY4741(EV)	56,1	123,7	2,2
BY4741(ZWF1)	33,0	48,8	1,5
BY4741(ZWF1)	11,6	101,6	8,8
BY4741(ZWF1)	28,8	75,3	2,6

Jeweils der zweite angegebene Wert der Dreifachbestimmung eines Stammes weist zum Teil große Unterschiede im Vergleich zu den anderen Werten auf. Da die Proben, die diese Unterschiede zeigen, alle in der gleichen Messreihe analysiert wurden, lässt dies auf einen Einfluss der Analysendurchführung oder des Messvorgangs auf die Ergebnisse schließen.

## 4.2 Analyse von Aminosäuren

### 4.2.1 Qualitative Analyse

Um die Aminosäuren mit GC-MS messen zu können, müssen sie vorher derivatisiert werden. Abbildung 4.15 zeigt die Reaktionsgleichung der Derivatisierung, die für diese Arbeit verwendet wurde (Villas-Bóas et al., 2003).

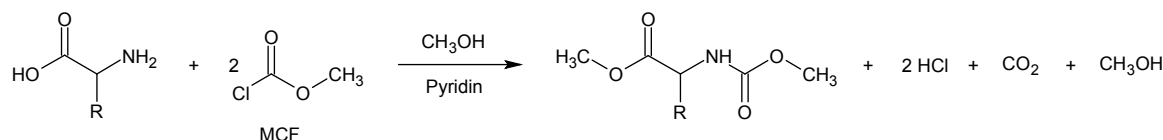


Abbildung 4.15: Reaktionsgleichung der Derivatisierung von Aminosäuren

Die Aminosäuren reagieren mit Methylchloroformiat (MCF) zu derivatisierten Produkten, die flüchtig genug sind, um mit GC-MS gemessen zu werden. Sowohl die Carboxyl-, als auch die Amino-Gruppe der Aminosäuren reagieren mit MCF, allerdings auf unterschiedliche Weise. Die Carboxylgruppe bildet zuerst ein gemischtes Anhydrid mit MCF, wobei Cl<sup>-</sup> abgespalten wird. Anschließend bindet Methanol an das 1. Carbonyl der Aminosäure. Der Rest spaltet ab und bildet dabei CO<sub>2</sub> und MeOH. Die Aminogruppe bindet unter Abspaltung von Cl<sup>-</sup> an das Carbonyl von MCF. Die Methyl-Gruppen an der derivatisierten Aminosäure stammen somit von unterschiedlichen Molekülen (Methanol, MCF). Außerdem reagieren auch OH-, SH- und NH<sub>2</sub>-Gruppen der Seitenketten mit dem Derivatisierungsreagenz. Pyridin fungiert als Katalysator und ist verantwortlich für die Decarboxylierung des gemischten Anhydrids (Husek, 1991). Um die Decarboxylierung zu erleichtern wird außerdem NaHCO<sub>3</sub> zugesetzt (Citová et al., 2006).

Zu Beginn wurde eine einzelne Aminosäure herangezogen, um festzustellen, ob die Methode funktioniert bzw. optimiert werden muss. Es wurden folgende Änderungen eingeführt, um die Durchführung der Derivatisierung zu vereinfachen:

Anstatt die organische Phase mit der Zugabe von Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zu trocknen, wurde 1 ml Hexan zugegeben, um die derivatisierten Analyten im Chloroform in die obere Phase zu bringen. Damit wurde das Abheben der organischen Phase vereinfacht. Die Proben wurden auch nicht gefriergetrocknet und anschließend in NaOH gelöst. Stattdessen wurden zu 200 μl Probe 200 μl 1 % NaOH gegeben. Für die Messung mit GC-MS wurde das Standardprogramm des Labors verwendet (siehe Abschnitt 3.3.3, Seite 18).

Nach der Optimierung der Methode wurde jede der 20 Aminosäuren einzeln gemessen. Dadurch konnten die spezifischen Retentionszeiten und Massenzahlen der derivatisierten Aminosäuren bestimmt werden (siehe Tabelle 4.8).



In Abbildung 4.16 sind das Chromatogramm und das Massenspektrum von Methionin dargestellt.  $m/z$  221 entspricht dem Molekülpeak und  $m/z$  147 wurde als charakteristische Massenzahl festgelegt. Anmerkung: Die Unterschiede in den Retentionszeiten zwischen der Abbildung und der Tabelle sind auf eine Kürzung der GC-Säule zurückzuführen.

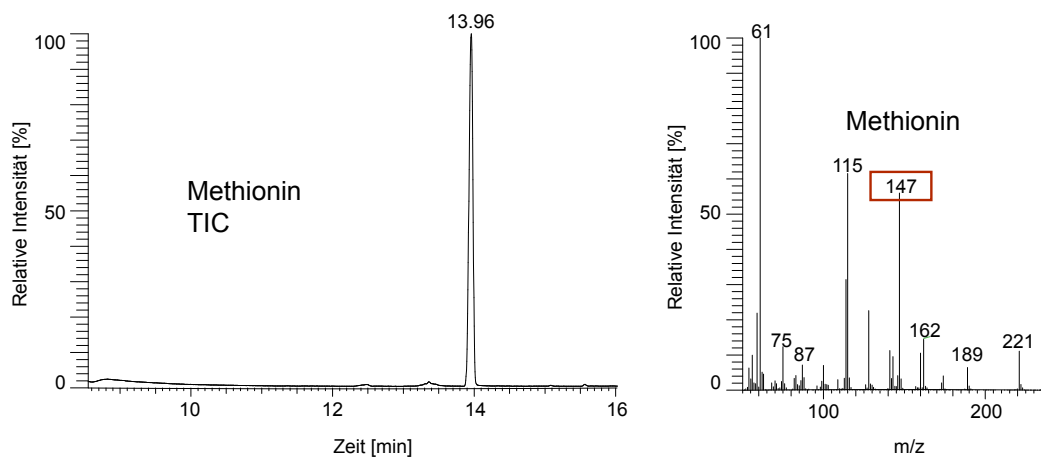


Abbildung 4.16: Chromatogramm und Massenspektrum vom derivatisierten Methionin

Tabelle 4.8: Retentionszeiten und charakteristische Massenzahlen der Aminosäuren

Aminosäure	Retentionszeit [min]	charakteristisches Fragment [m/z]
Glycin	9,37	88
Alanin	9,39	102
Valin	10,69	130
Leucin	11,42	144
Isoleucin	11,56	144
Prolin	11,89	128
Asparaginsäure	12,39	160
Asparagin	12,39	160
Serin	12,88	100
Threonin	12,88	114
Glutaminsäure	13,23	174
Glutamin	13,23	174
Methionin	13,38	147
Cystein	13,94	192
Phenylalanin	14,13	162
Lysin	15,69	142
Histidin	16,08	210
Tyrosin	16,70	121
Tryptophan	18,08	130

Anmerkungen zu einigen Aminosäuren:

### Glutaminsäure

Das Massenspektrum der derivatisierten Glutaminsäure zeigt, dass diese als Pyroglutaminsäure vorliegt bzw. durch die Derivatisierung in diese umgewandelt wird. Diese Beobachtung wird auch in der Publikation von Kaspar et al. bestätigt (Kaspar et al., 2009).

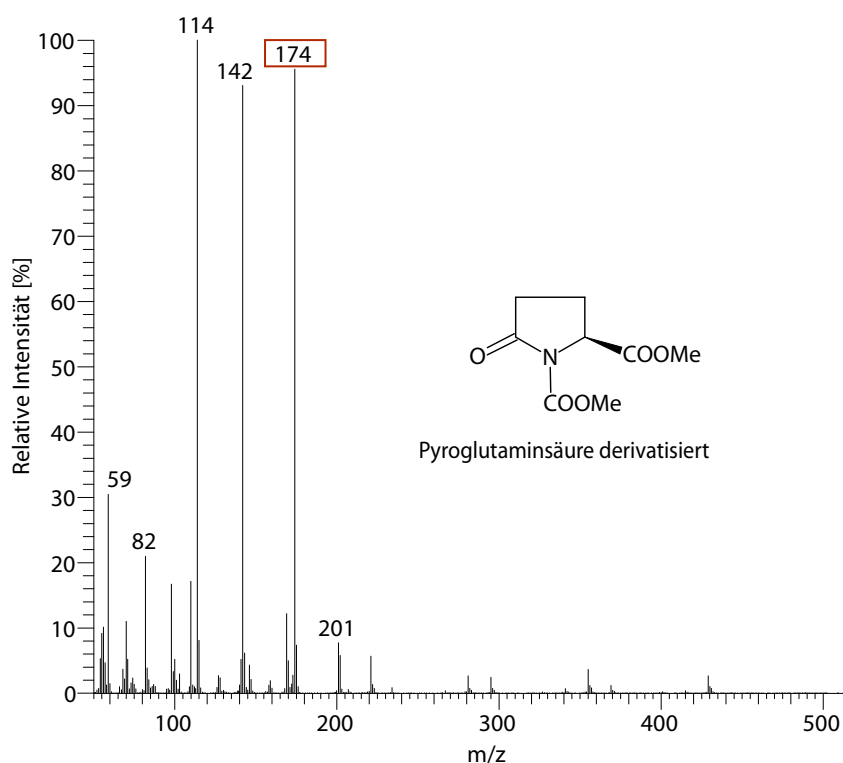


Abbildung 4.17: Massenspektrum der derivatisierten Glutaminsäure

### Glutamin bzw. Asparagin

Glutamin und Glutaminsäure eluieren zeitgleich und ihre Massenspektren sind ident, was darauf schließen lässt, dass sich zumindest unter den angewandten Reaktionsbedingungen Glutamin in Glutaminsäure umwandelt (Zampolli et al., 2007).

Das Gleiche ist auch bei Asparagin bzw. Asparaginsäure zu beobachten.

### Histidin

Die Analyse von Histidin hat zu Beginn der Arbeit gut funktioniert, allerdings konnte das derivatisierte Histidin nach kurzer Zeit nicht mehr detektiert werden. Auch mit der Verwendung höherer Konzentrationen (bis zu 100 mM) konnte kein Ergebnis erzielt werden. Bei den letzten Messungen der Realproben für diese Arbeit konnte man jedoch den Peak von Histidin erahnen, deshalb darf angenommen werden, dass die Derivatisierung

weiterhin funktioniert, aber die Sensitivität des GC-MS für die Messung von Histidin zu niedrig geworden ist.

### Serin, Threonin

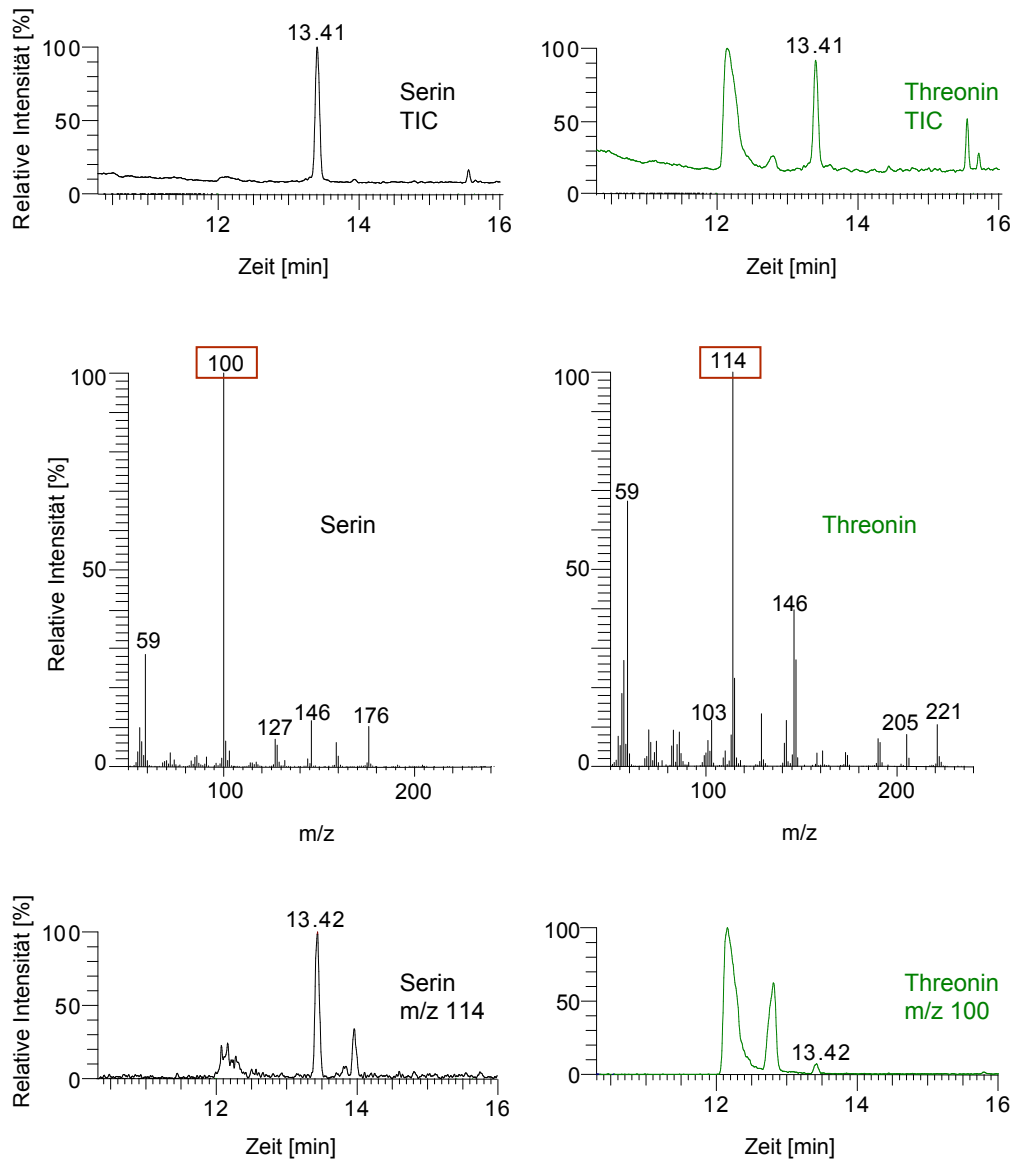


Abbildung 4.18: Chromatogramme und Spektren von Serin und Threonin

Serin und Threonin eluieren zur gleichen Zeit (13,41 min). Die für die beiden Aminosäuren spezifischen Massenzahlen (Serin: m/z 100, Threonin: m/z 114) kommen jedoch im jeweils anderen Massenspektrum vor, wie in Abbildung 4.18 zu sehen ist. Deshalb wurden zur Analyse Massenzahlen verwendet, die bei der jeweils anderen Aminosäure nicht enthalten sind (Serin: m/z 127, Threonin: m/z 142). Da diese aber eine geringe Intensität aufweisen, war die Detektion von geringeren Konzentrationen nicht möglich, was die Darstellung einer Kalibrationsgerade schwierig machte.

Aus diesem Grund wurden schlussendlich wieder die Massenzahlen von detektierten Fragmenten mit der höchsten Intensität für die Quantifizierung verwendet. Es muss allerdings beachtet werden, dass mit diesen sowohl Serin als auch Threonin quantifiziert werden.

### Arginin

Mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode konnten bis auf Arginin alle Aminosäuren analysiert werden. Grund dafür dürfte die zu geringe Reaktivität der Guanidinogruppe unter den gewählten Reaktionsbedingungen sein (Zampolli et al., 2007).

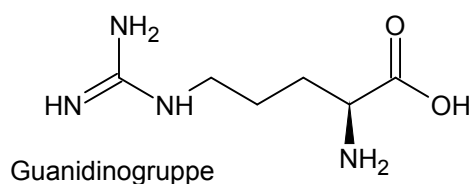


Abbildung 4.19: Struktur von Arginin

## 4.2.2 Quantitative Analyse

Für die quantitative Analyse wurde zu Beginn mit dem Aminosäurestock (siehe Tabelle 3.3) als Ausgangslösung gearbeitet. Später wurden eigene Aminosäurelösungen hergestellt (siehe Tabelle 3.6). Um die geeigneten Konzentrationen für die Kalibrationsgeraden zu finden, wurden verschiedene Verdünnungen des Stocks in Wasser analysiert. Mit den passenden Verdünnungsfaktoren (siehe Abschnitt 3.3.4, Seite 18) wurde der Stock mit Minimalmedium (ohne Aminosäuren) verdünnt. Da im Medium Moleküle wie z. B. Zucker enthalten sind, die aufgrund von COOH- und NH<sub>2</sub>-Gruppen auch mit MCF reagieren, fallen die Intensitäten der Proben in Medium etwas geringer aus als jene in Wasser. Ansonsten brachte dies aber keine weiteren Probleme, da genug MCF hinzugefügt wurde.

### Kalibrationsgeraden

Die Standards für die Kalibrationsgeraden wurden, wie in Abschnitt 3.3.4 (Seite 18) beschrieben, hergestellt, derivatisiert und gemessen. Für die meisten Aminosäuren konnten lineare Kalibrationsgeraden erstellt werden. Als Beispiel dafür sind in Abbildung 4.20 jene von Asparaginsäure, Glutaminsäure, Methionin und Phenylalanin zu sehen.

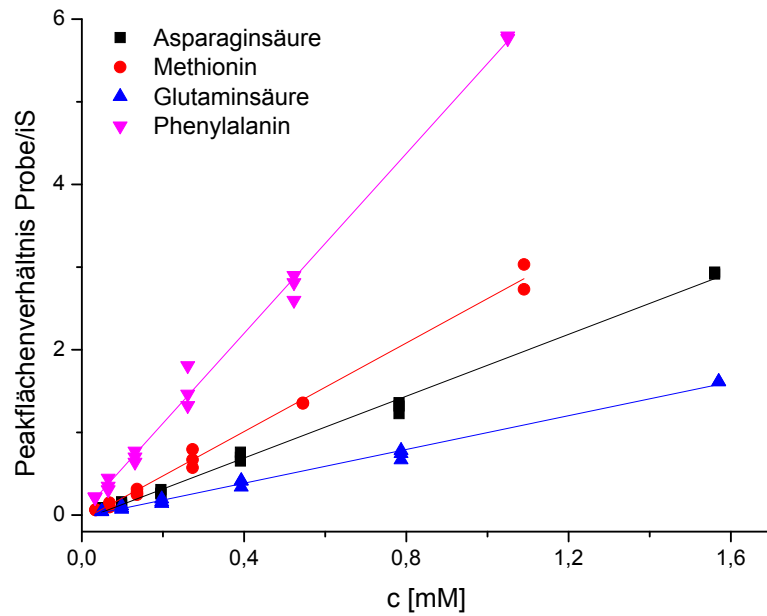


Abbildung 4.20: Kalibrationsgeraden von Asparaginsäure, Glutaminsäure, Methionin und Phenylalanin

Bei der Darstellung der Kalibrationsgeraden der verschiedenen Aminosäuren traten bei Lysin, Tyrosin und Tryptophan Probleme auf, da diese nicht linear waren, sondern die Werte jeweils eine Kurve bildeten (siehe Abbildung 4.21). Durch Exkludieren einiger Werte im oberen und unteren Konzentrationsbereich kann zwar ein linearer Abschnitt erhalten werden, allerdings ist dieser sehr klein. Dadurch war es schwierig, die genannten Aminosäuren in den Proben zu quantifizieren. Zur Ergebnisbewertung wurde daher nur das Verhältnis der Peakflächen von Probe zu internem Standard herangezogen.

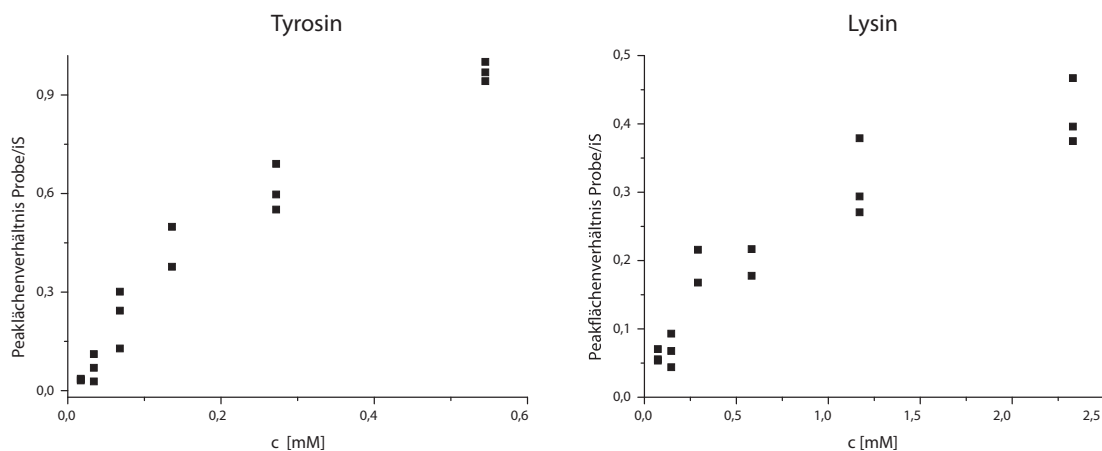


Abbildung 4.21: Kalibrationskurven von Tyrosin und Lysin

## Detektionslimit

Die Detektionslimits wurden anhand der Verdünnungsreihe für die Kalibrationsgeraden bestimmt. Zusätzlich wurden noch extra Verdünnungen rund um den kritischen Wert hergestellt. Um festzulegen, welche Konzentration noch oberhalb des Limits liegt und welche dieses bereits unterschreitet, wurde die „signal to noise ratio“ als Anhaltspunkt herangezogen. Bei einem Wert über 10 wurde der Peak noch als detektierbar erachtet.

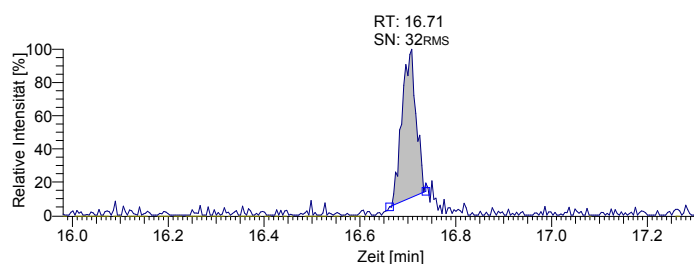


Abbildung 4.22: Bestimmung der „signal to noise ratio“ eines Peaks

Des Weiteren wurde das Massenspektrum einer Aminosäurenkonzentration nahe des Detektionslimits mit jenem einer höheren Konzentration verglichen.

In Tabelle 4.9 sind die mit der angewandten Methode ermittelten Detektionslimits der Aminosäuren aufgelistet.

Tabelle 4.9: Detektionslimits der Aminosäuren

Aminosäure	m [ng]
Asparaginsäure	4,0
Glutaminsäure	7,4
Leucin	4,6
Lysin	21,3
Methionin	29,1
Phenylalanin	10,7
Serin	31,5
Threonin	33,3
Thryptophan	31,6
Tyrosin	6,2
Valin	5,9

Die Messung der Realproben der ersten Wachstumskurve zeigte, dass bei einigen Aminosäuren die Konzentration unter dem Detektionslimit lag. Deshalb wurden die Proben nach der Derivatisierung aufkonzentriert. Dazu wurde 1 ml der organischen Phase nach der Zugabe von 1 ml n-Hexan in ein Glasvial überführt und mit einem N<sub>2</sub>-Strom abgeblasen. Der Rückstand wurde in 50 µl n-Hexan resuspendiert. Dies entspricht einer 20-fachen

Erhöhung der Konzentration. Die Proben und Standards wurden ab diesem Zeitpunkt nur noch auf diese Weise für die GC-MS-Messung vorbereitet. Damit konnten die meisten Konzentrationen der Aminosäuren in den Realproben bestimmt werden.

### Interner Standard

Zu Beginn wurde wie in der Publikation von Villas-Bôas et al. EDTA als interner Standard (iS) verwendet. Die Intensität des Peaks wurde aber kontinuierlich immer schlechter, bis er gar nicht mehr zu sehen war. Grund dafür dürfte vor allem der Abbau des MCF, aber auch die Sensitivitätsverringern vom GC-MS gewesen sein (siehe Diskussion, Seite 56). Bei einem weiteren Messversuch zum Schluss dieser Arbeit konnte eine höhere Konzentration an EDTA schwach detektiert werden. Allerdings wurde zu diesem Zeitpunkt schon ein anderer iS verwendet, der einwandfrei funktionierte. Als weitere interne Standards wurden Cystein (bzw. eine andere sich nicht im Stock befindliche Aminosäure) und Zitronensäure in Betracht gezogen. Allerdings werden beide Moleküle im Laufe des Wachstums einer Zelle ins Medium sezerniert und stellen damit keine Option dar. Schließlich wurde mit der Fettsäure C17:0 ein geeigneter interner Standard gefunden. Zwar enthält diese im Gegensatz zu EDTA nur ein Äquivalent, welches derivatisiert wird, Aminosäuren hingegen mindestens 2-3. Allerdings hat die Fettsäure als iS durchgehend bei allen Messungen einwandfrei funktioniert. Die verwendete Konzentration betrug  $500 \mu\text{M}$ .

Tabelle 4.10: charakteristische Parameter des iS

	<b>Retentionszeit</b> <b>[min]</b>	<b>detektiertes Fragment</b> <b>[m/z]</b>
C17:0	15,65	74

### 4.2.3 Analyse von Realproben

Um den Verlauf der Aminosäurekonzentrationen während des Wachstums der Hefezellen zu analysieren, wurden Realproben hergestellt. Dafür wurde Minimalmedium mit dem Hefewildtyp BY4741 und einer Zellzahl von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml beimpft. Während des Wachstums wurden nun stündlich Proben entnommen und abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Analyse bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Nach 13 h bei einer Zellzahl von ca.  $2,2 \times 10^8$  Zellen/ml erreichten die Zellen die stationäre Phase und die Probenentnahme wurde beendet. Die Realproben wurden nun wie schon vorher beschrieben derivatisiert und gemessen. Die Analyse wurde in einer Vierfachbestimmung durchgeführt, wobei aufgrund ihrer geringeren Konzentration zuerst die zum Schluss entnommenen Proben gemessen wurden. Die Wachstumskurve zu den analysierten Realproben ist in folgender Abbildung dargestellt.

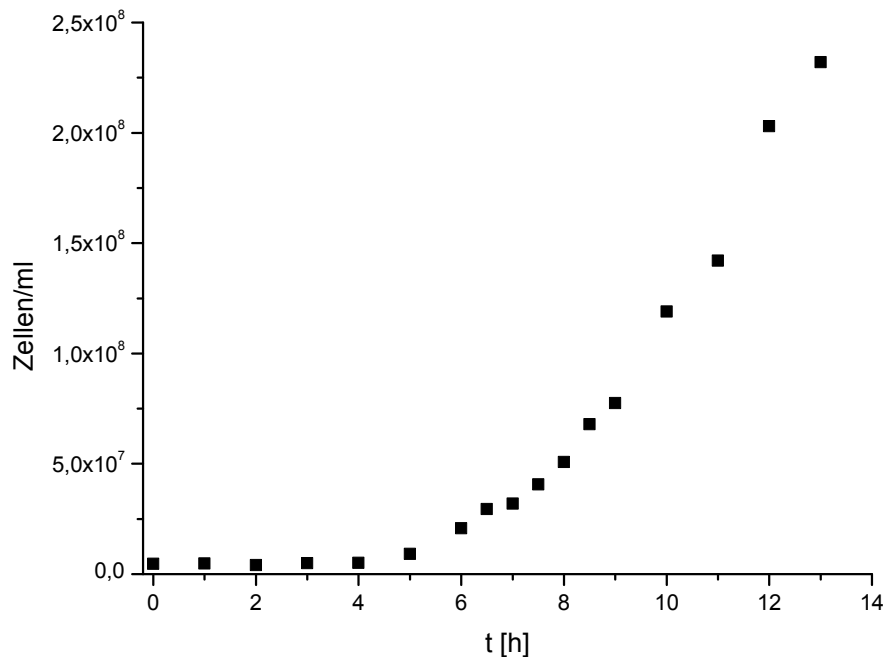


Abbildung 4.23: Wachstumskurve von Hefewildtyp inkubiert in Minimalmedium

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der Analyse der Realproben dargestellt. Wie bereits in Abschnitt 4.2.1 (Seite 40) beschrieben, konnten von den 13 sich im Aminosäurestock befindlichen Aminosäuren Arginin und Histidin nicht gemessen bzw. detektiert werden. Von den restlichen 11 Aminosäuren konnten mit Lysin, Tyrosin und Tryptophan drei Aminosäuren nicht quantifiziert werden. Abbildung 4.24 stellt deshalb den Verlauf der Peakflächenverhältnisse von Probe zu iS dieser drei Analyten dar. Während Lysin und Tyrosin mit der Zeit abnehmen, verändern sich die Werte von Tryptophan über den Verlauf des Wachstums kaum. Es ist allerdings zu beachten, dass die Fehlerbalken und somit die Standardabweichungen bei Tryptophan sehr groß sind.

Die restlichen Aminosäuren konnten quantifiziert werden. Ihr Verlauf während des Wachstums ist ab Abbildung 4.25 dargestellt.



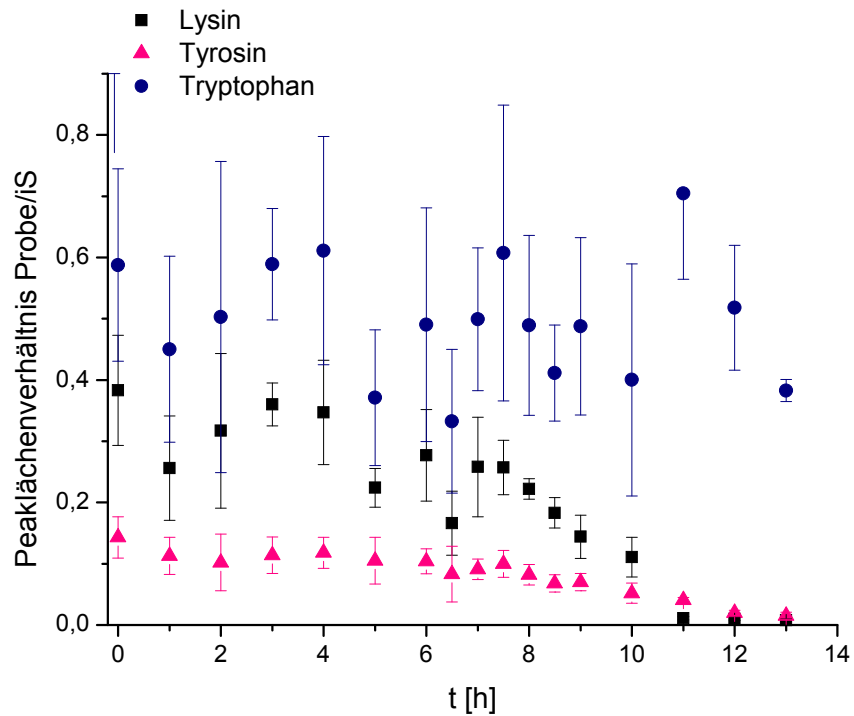


Abbildung 4.24: Verlauf des Peakflächenverhältnisses Probe/iS von Lysin, Tyrosin und Tryptophan im Kulturmedium während des Hefewachstums

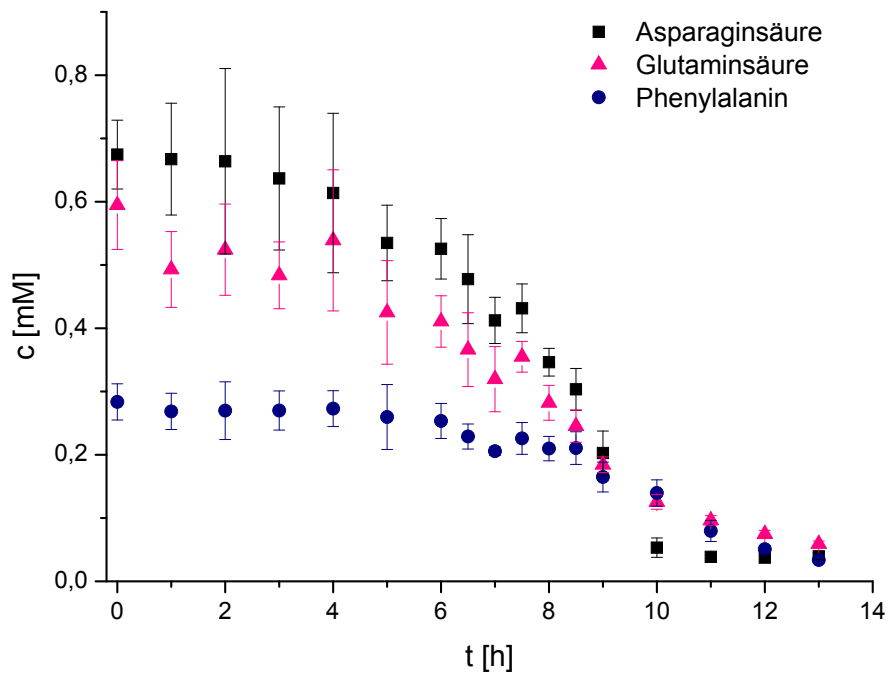


Abbildung 4.25: Verlauf der Konzentration von Asparaginsäure, Glutaminsäure und Phenylalanin im Kulturmedium während des Hefewachstums

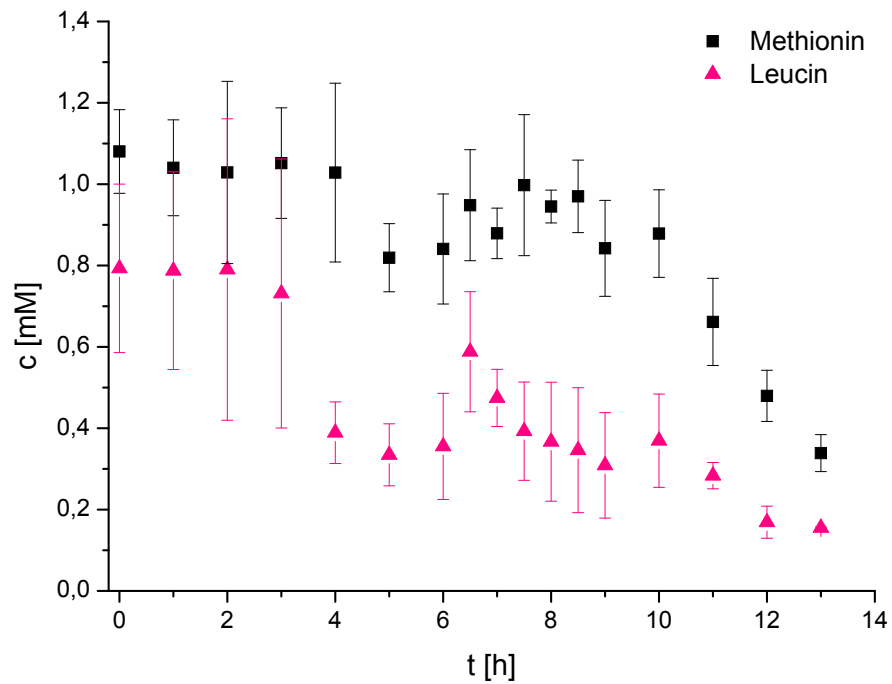


Abbildung 4.26: Verlauf der Konzentration von Leucin und Methionin im Kulturmedium während des Hefewachstums

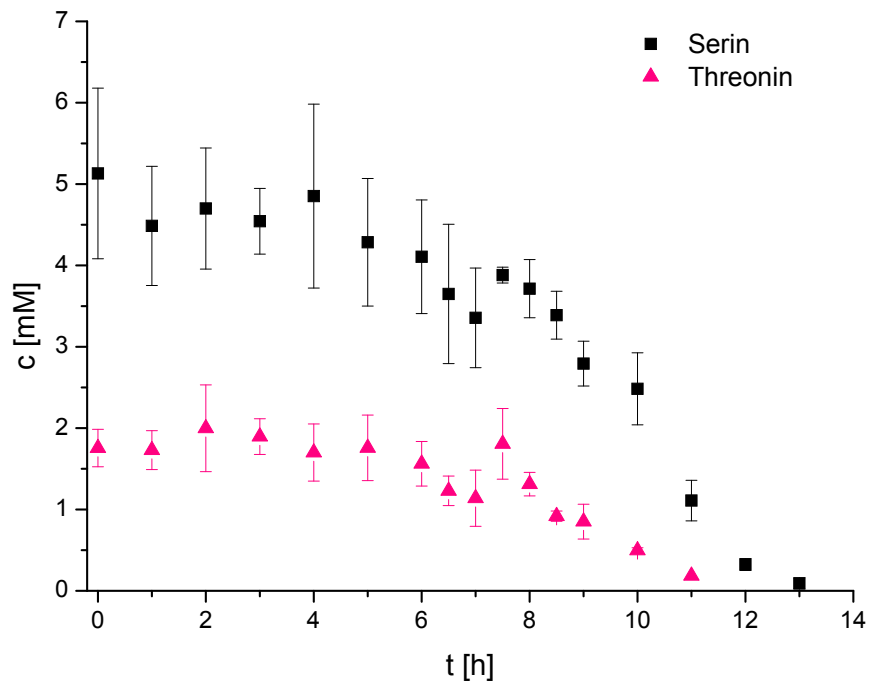


Abbildung 4.27: Verlauf der Konzentration von Serin und Threonin im Kulturmedium während des Hefewachstums

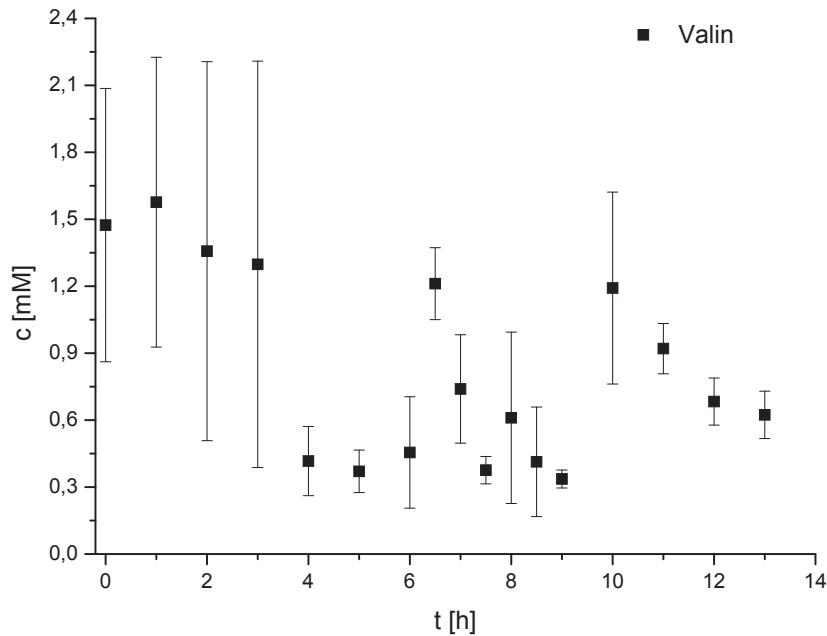


Abbildung 4.28: Verlauf der Konzentration von Valin im Kulturmedium während des Hefewachstums

Die Abbildungen zeigen, dass sieben Aminosäuren beim Erreichen der stationären Phase noch im Kulturmedium vorhanden und somit ausreichend supplementiert sind. Die Aminosäuren Asparaginsäure und Lysin sind hingegen schon bei 50-60 % der Endzell-dichte verbraucht und stehen damit den Zellen für das weitere Wachstum nicht mehr zur Verfügung. Die Endzell-dichte entspricht dabei der Zellzahl, die beim Erreichen der stationären Phase im Kulturmedium vorhanden ist. Threonin ist bei ca. 80 % der Endzell-dichte vollständig von den Zellen aufgenommen worden. Serin ist erst beim Erreichen der stationären Phase kaum mehr vorhanden.

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Methoden zu etablieren, um Aminosäuren im Kulturmedium und Pyridindinukleotide aus Hefezellen zu analysieren. Mit der etablierten GC-MS-Methode konnte gezeigt werden, dass vier Aminosäuren im Kulturmedium beim Erreichen der stationären Phase verbraucht sind. Die restlichen Aminosäuren waren hingegen in dieser Wachstumsphase noch vorhanden und somit ausreichend supplementiert.

Mit der verwendeten HPLC-Methode konnten nur  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  aus Hefezellen quantifiziert werden.  $\text{NADPH}$  konnte nur qualitativ analysiert werden. Es war nicht möglich,  $\text{NADP}^+$  aus Hefezellen zu detektieren.

### 5.1 Analyse von $\text{NAD(P)(H)}$

#### 5.1.1 Methodenentwicklung

Ziel dieser Arbeit war es, eine HPLC-Methode zu etablieren, mit der die Pyridindinukleotide  $\text{NAD(P)(H)}$  aus Hefezellen analysiert werden können. Die vier Moleküle sollten, wenn möglich, gemeinsam extrahiert und gemessen werden. In der Literatur existieren allerdings hauptsächlich Methoden, mit denen man nur je zwei der Analyten messen kann. Der Grund dafür ist die unterschiedliche Stabilität von oxidierten und reduzierten Dinukleotiden bei verschiedenen pH-Werten. Es wurde allerdings eine Publikation gefunden, in der eine HPLC-Methode für die Analyse aller vier Metaboliten beschrieben wird (Klaidman et al., 1995). Dabei werden die oxidierten Spezies mit Cyanid derivatisiert, wodurch diese wie die reduzierten Spezies unter basischen Bedingungen stabil sind. Des Weiteren weisen die Analyten dadurch auch eine Fluoreszenz auf, weshalb sie mit einem Fluoreszenzdetektor detektiert werden können.

Um die Analyt-Peaks zu trennen, wurde die HPLC-Methode ausgehend von den Bedingungen der Publikation entwickelt. Die größten Verbesserungen der Auftrennung wurden mit Änderungen der Säule, des Gradienten und des pH-Wertes vom Laufmittel erzielt. Mit Variation von Fluss und Säulentemperatur wurden hingegen kaum Unterschiede in den Retentionszeiten erreicht.

Durch die Derivatisierung der oxidierten Moleküle entstehen jeweils zwei Stereoisomere. Normalerweise ist eine chromatographische Auftrennung von Isomeren schwierig, hier

stellte dies allerdings kein Problem dar, da sie zu unterschiedlichen Retentionszeiten eluierten. Dieses Ergebnis wird auch in der Publikation von Klaidman et al. beschrieben. Trotzdem wurden die Peaks mit Massenspektrometrie überprüft. Die MS-Messungen bestätigten die Zuordnung der Peaks zu den Analyten. In den Chromatogrammen zeigten sich aber auch Peaks mit charakteristischen Massenzahlen, die auf eine Struktur ohne Nicotinamid hinweisen. Diese Moleküle eluierten jeweils vor den Analyten. Das könnte bedeuten, dass durch die Derivatisierung bei einem Teil von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  Nicotinamid abspaltet.

Nachdem die idealen Bedingungen für die Analyse von  $\text{NAD(P)(H)}$  gefunden wurden, konnten durch die Messung von Verdünnungsreihen Kalibrationsgeraden erstellt werden. Alle vier Dinukleotide wiesen Linearität im gemessenen Bereich auf. Des Weiteren wurde die Stabilität der Moleküle untersucht. Das Ergebnis mit ca. 68 h liegt im Bereich der in der Literatur beschriebenen Stabilität von 72 h.

Das Detektionslimit lag zwischen 21,5 und 39 ng für die vier Analyten, wobei die oxidierten Moleküle aufgrund der Derivatisierung und den daraus resultierenden Isomeren geringere Detektionslimits aufwiesen. In der Publikation von Klaidman et al. wird ein Detektionslimit von 10 ng beschrieben.

Nach der Etablierung der Methode für die Messung von Standards konnte mit der Bestimmung von  $\text{NAD(P)(H)}$ -Konzentrationen aus Hefezellen begonnen werden. Dafür musste die Durchführung der Extraktion der Analyten entwickelt und etabliert werden. Zu Beginn wurden auch hier die Bedingungen aus der Publikation verwendet. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit Glaskugeln. Die Zellmenge wurde von  $10^9$  auf  $10^{10}$  Zellen erhöht, da zuerst keine Analyten detektiert wurden. Durch die Extraktion mit Chloroform dürften die Proteine zum Teil nicht aus den Proben entfernt worden sein. Dadurch haben sie sich auf der HPLC-Säule festgesetzt und weitere Messungen unbrauchbar gemacht. Die Extraktion wurde in weiterer Folge mit Methanol/Chloroform durchgeführt, da dadurch mehr Proteine ausgefällt wurden. Danach wiesen die Proben ein großes Volumen auf, das verringert werden musste. Deshalb wurden die Lösungsmittel mit Speed Vac verdampft. Um diesen zeitaufwändigen Schritt so kurz wie möglich zu halten wurden unterschiedliche Mengen und Zusammensetzungen von Lösungsmitteln für die Extraktion ausprobiert. Schlussendlich wurde der Aufschluss in einem 50/50 (v/v) Methanol/Wasser-Gemisch durchgeführt. Der Nachteil des Speed Vac ist, dass es über keine Kühlung der Probe verfügt. Allerdings wird diese durch den Entzug der Verdampfungswärme des Lösungsmittels gewährleistet. Da dies aber ab einem geringen Restvolumen (ca.  $50 \mu\text{l}$ ) nicht mehr gegeben war und die Probe sich erwärmte, was eine Oxidation der reduzierten Moleküle begünstigen soll, wurde sie nicht bis zur Trockene eingedampft.

Bei der Messung von Hefeextrakten konnten nur die Peaks von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  erhalten

werden. Die phosphorylierten Dinukleotide hingegen wurden nicht detektiert. Durch die Zugabe von einem NADPH-Standard vor dem Zellaufschluss konnte festgestellt werden, dass er detektiert und nicht während der Extraktion zersetzt wurde. Deshalb wurden die Hefezellen mit einer KOH-Lösung behandelt. Da die reduzierten Spezies in diesen basischeren Bedingungen stabiler sind, konnte NADPH nun detektiert werden. Allerdings war der Peak klein und fiel mit einem großen Störpeak zusammen, was eine Quantifizierung unmöglich machte.

In dieser Arbeit wurde also die beschriebene Methode mit zwei verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Einerseits mit der Cyanid-Lösung, um oxidierte Spezies zu derivatisieren und alle vier Analyten zu messen, andererseits mit basischen Bedingungen, um NADPH und NADH zu detektieren. NADP<sup>+</sup> konnte nicht detektiert werden, weil hier die Konzentration in den Hefezellen zu gering ist und durch die Derivatisierung auch noch auf zwei Peaks aufgeteilt wird. Es wäre eine Möglichkeit, mit sauren Bedingungen zu arbeiten, um die oxidierten Moleküle zu analysieren. Da sie dadurch stabiler sind und sich die Analytmenge nicht mehr auf zwei Peaks aufteilt, könnte dies ausreichen, um NADP<sup>+</sup> zu detektieren.

Die quantitative Analyse benötigt noch einige Verbesserungen. Dafür sollte die Extraktion der Dinukleotide optimiert werden, damit ihre Konzentration im Extrakt höher ist und ausreicht, um diese zu quantifizieren. Um zu gewährleisten, dass der Zellmetabolismus und somit die zahlreichen Enzyme, die NAD(P)(H) als Coenzym verwenden, inaktiviert werden, sollten die Zellen gequenchet werden. Dabei wird die benötigte Menge an Zellkultur in ein auf ca. -40 °C gekühltes Methanol/Wasser-Gemisch (60 % v/v) gegeben und danach abzentrifugiert (siehe z. B. Watanabe et al. 2007, Moreira dos Santos et al. 2004).

Bei der Quantifizierung der Dinukleotide aus Hefezellen ist zu beachten, dass bei der Durchführung der Extraktion ein Verlust an Volumen und dadurch auch an Analyten auftritt, die Standards hingegen einfach zusammen pipettiert werden. Des Weiteren werden die Proben beim Speed Vac-Schritt nicht bis zur vollständigen Trocknung eingeeengt. Geringe Unterschiede im Restvolumen des Rückstandes führen daher zu weiteren Ungenauigkeiten in der Quantifizierung. Deshalb sollten die Standards gleich wie die Proben behandelt werden, was allerdings ein großer Zeitaufwand und der Grund ist, warum dies bisher noch nicht durchgeführt wurde. Es sollte in der Zukunft aber zumindest einmal ausprobiert werden, um zu sehen, wie groß der Verlust der Analyten während der Probenvorbereitung wirklich ist.

### 5.1.2 Ergebnisse der Analyse aus Hefezellen

Die gemessenen Konzentrationen von NAD(H) aus Hefewildtyp wurden für den Vergleich mit Werten aus der Literatur auf das theoretische Trockengewicht bezogen (siehe Tabelle 4.5, Seite 38). In der Literatur (siehe Tabelle 4.6, Seite 38) sind durchaus unterschiedliche Werte bezüglich der intrazellulären Konzentrationen von NAD<sup>+</sup> und NADH bzw. ihrem Verhältnis in Hefezellen angegeben. Dies wird aber auch an den verschiedenen Bedingungen liegen, unter denen sie gemessen wurden. Grundsätzlich kann man aber sagen, dass die gemessenen Werte von NADH im gleichen Größenbereich wie in der Literatur lagen, die Mengen von NAD<sup>+</sup> und das Verhältnis NAD<sup>+</sup>/NADH jedoch darunter lagen. Je früher die Zellen geerntet wurden, also mit einer niedrigeren Zellzahl, desto besser stimmen die Werte mit jenen aus der Literatur überein. Ergebnisse von Zellen, die bei einer Zellzahl von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml geerntet wurden, sind ca. um den Faktor 3 niedriger als in der Literatur. Ein möglicher Grund für die höheren Konzentrationen in Zellen, die zu einem früheren Zeitpunkt des Wachstums geerntet wurden, könnte die Zellwand sein. Durch kürzeres Wachstum bilden die Zellen eine weniger stabile Zellwand aus, als jene, die erst zu einem späteren Zeitpunkt geerntet werden. Dadurch ist es leichter diese Zellen aufzuschließen. Es ist daher möglich, dass Zellen, die erst bei einer Zellzahl von  $2 \times 10^8$  Zellen/ml geerntet wurden, durch eine stabilere Zellwand bei dem verwendeten Aufschlussprozedere nicht vollständig aufgeschlossen wurden. Dadurch würden sich die geringeren Konzentrationen von NAD<sup>+</sup> und NADH erklären.

Die verschiedenen Hefestämme wurden zwar alle in einer Dreifachbestimmung analysiert, allerdings wich ein Wert jeweils stark von den anderen beiden ab (siehe Tabelle 4.7). Deshalb wurde dieser für die Ergebnisbewertung ausgeschlossen. Im Vergleich zum Hefewildtyp BY4741 geht bei der Mutante *ald6Δ* die Tendenz zu einer niedrigeren NAD<sup>+</sup>-Konzentration und auch das NAD<sup>+</sup>/NADH-Verhältnis ist etwas niedriger. Die Ergebnisse von NADH liegen bei beiden Stämmen im selben Größenbereich, wobei ein Wert (48,2 nmol/g Zellen) des Wildtyps zwischen die beiden der Mutante fällt. Deshalb sind weitere Messungen nötig, um die Richtigkeit dieser Zahlen beurteilen zu können. Es ist möglich, dass vermehrt NAD<sup>+</sup> durch die NAD-Kinase in NADP<sup>+</sup> umgewandelt wird und deshalb die NAD<sup>+</sup>-Konzentration niedriger ist. Durch mehr NADP<sup>+</sup> könnte über andere Reaktionen (z.B. der Pentosephosphatweg) mehr NADPH generiert werden und dadurch das fehlende NADPH aus der Reaktion Acetaldehyd zu Acetat ausgeglichen werden.

Auch beim Vergleich des Stamms BY4741(ZWF1) mit BY4741(EV) zeigt sich eine Tendenz zu niedrigeren NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen. Hier muss allerdings beachtet werden, dass aufgrund des nicht extra zugefügten Cu<sup>2+</sup> die Überexpression nicht induziert wurde. Trotzdem sollte eine leichte Überexpression des Gens und dadurch eine erhöhte Menge an Zwf1p vorliegen. Da deshalb im Vergleich zum Wildtyp mehr NADPH freigesetzt wird, könnte

die niedrigere  $\text{NAD}^+$ -Konzentration auch hier ein Hinweis sein, dass  $\text{NAD}^+$  vermehrt zu  $\text{NADP}^+$  umgewandelt wird.

## 5.2 Analyse von Aminosäuren

Im zweiten Teil der Arbeit sollte eine GC-MS-Methode für die Analyse von Aminosäuren im Medium etabliert werden. Die Durchführung aus der Publikation von Villas-Boas et al. musste nur geringfügig optimiert werden. Bis auf Arginin waren damit alle Aminosäuren messbar, jedoch wandelte sich zumindest unter den gegebenen Bedingungen durch die Derivatisierung Asparagin in Asparaginsäure und Glutamin in Glutaminsäure um. Für diese Arbeit war dies aber kein Problem, da im Medium nur Glutaminsäure und Asparaginsäure enthalten waren. Sollte man Interesse an der Analyse von Asparagin und Glutamin haben, müsste man die Bedingungen ändern. Serin und Threonin eluierten zur gleichen Zeit und auch ihre charakteristischen Massenzahlen kamen im jeweils anderen Spektrum vor. Es ist deshalb zu beachten, dass ein Teil der anderen Aminosäure jeweils mitquantifiziert wurde.

Die Detektionslimits lagen zwischen 4 und 33 ng und sind damit im Vergleich zur Literatur (13-540 ng, umgerechnet von mM) niedriger (Villas-Bôas et al., 2003). Ein Grund dafür ist die Aufkonzentrierung der Proben vor der Messung. Die Quantifizierung bereitete bei den drei Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Lysin Schwierigkeiten, da ihre Kalibrationskurven nicht linear waren. Die Ergebnisse wurden daher nur als Verhältnis der Peakfläche der Probe zu jenem des iS dargestellt.

Während der Arbeit traten einige generelle Probleme mit dem GC-MS-System bzw. dieser Methode auf. Trotz der Reinigung des Massenspektrometers und einer Kürzung der GC-Säule, konnte eine Sensitivitätsverringering des Systems nicht verhindert werden. Dennoch war es möglich, bis auf Histidin alle im Stock vorhandenen Aminosäuren auch in geringeren Konzentrationen zu analysieren. Des Weiteren baute nach einiger Zeit das Derivatisierungsreagenz ab, was sich an der abnehmenden Peakintensität im Chromatogramm und am weißen Niederschlag in der Flasche des Reagenzes bemerkbar machte. Deshalb wurde zwischenzeitlich die Zugabe von MCF von  $2 \times 20 \mu\text{l}$  auf  $3 \times 20 \mu\text{l}$  erhöht. Mit frischem MCF funktionierte die Analyse wieder einwandfrei.

Die etablierte Methode wurde für die Analyse vom Konzentrationsverlauf der Aminosäuren im Wachstumsmedium angewendet. Die Ergebnisse zeigten, dass bei den verwendeten Bedingungen und dem Medium sieben Aminosäuren auch in der stationären Phase noch im Medium vorhanden waren. Die Aminosäuren Asparaginsäure, Lysin, Threonin und Serin wurden noch während des Wachstums in der exponentiellen Phase aufgebraucht. Mit diesen Informationen ist es nun möglich die Aminosäurezusammensetzung des Me-



diums zu verändern, um das Wachstum der Zellen und damit die Bildung von Biomasse zu optimieren. Außerdem könnte man auch untersuchen, welche Auswirkungen die unterschiedlichen Aminosäurekonzentrationen im Medium auf die Lipidzusammensetzung der Zellen haben.

## Resümee

Es ist gelungen, eine Methode für die Quantifizierung von Aminosäuren im Kulturmedium zu etablieren. Außerdem konnten ihre Konzentrationen während des Wachstums von Hefezellen gemessen und ihr Verlauf dargestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren Asparaginsäure, Lysin, Threonin und Serin während des Wachstums vollständig verbraucht werden und somit möglicherweise limitierend für die Produktion von Biomasse sind. Eine Erhöhung der Konzentration dieser Aminosäuren in Kulturmedien wird daher empfohlen.

Die Analyse von allen vier Pyridindinukleotiden aus Hefezellen mit den beschriebenen Bedingungen war aufgrund der zu geringen Konzentration der phosphorylierten Dinukleotide nicht möglich. Allerdings konnten mit der HPLC-Methode  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  aus Hefezellen quantifiziert werden. Trotzdem gibt es sowohl in der Extraktion der Analyten als auch in der Quantifizierung die bereits erwähnten Verbesserungsmöglichkeiten (siehe Seite 54). Sollten diese nicht zum Erfolg führen und  $\text{NADP}^+$  weiterhin nicht detektiert werden können, müsste man auf eine getrennte Analyse von oxidierten und reduzierten Molekülen zurückgreifen, die in dieser Arbeit zum Teil schon ausgeführt wurde. Für die Analyse der phosphorylierten Dinukleotide aus Hefezellen könnten auch Enzym-Assays eine Möglichkeit sein.

## 6 Anhang

Tabelle 6.1: Geräteliste

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
2475 Multiwellenlängen-Fluoreszenzdetektor	Waters
2489 UV/Vis-Detektor	Waters
Abblasvorrichtung Reacti-Vap <sup>TM</sup> III	PIERCE, Inc.
Alliance <sup>®</sup> HPLC, e2695-Trennmodul	Waters
Autoklav Systec V-150	Systec
Bi-Destille	GFL <sup>®</sup>
CASY <sup>®</sup> Model TTC Cell Counter and Analyzer	Schärfe System
Centrifuge 5810 R	Eppendorf
Glassperlen (0,4 - 0,6 mm)	Sartorius
Magnetrührer mit Heizplatte MR 3001	Heidolph
Merckenschlager Zellhomogenisator	B. Braun Biotech Inc.
Minizentrifuge MiniSpin plus	Eppendorf
Minizentrifuge mit Kühlung, Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Mikro-Zentrifugenfilter 800 $\mu$ l, Nylon-Membran 0,45 $\mu$ m	amchro
Multi Reax Schüttler	Heidolph
Präzisionswaage GP3202-0CE	Sartorius
Schüttelinkubator Multitron II	Infors
Speed Vac concentrator centrivac	Savant
Synapt <sup>®</sup> G1 Mass Spectrometry System	Waters
Trace DSQ Massenspektrometer	Thermo Scientific
Trace GC Ultra	Thermo Scientific
TriPlus Autosampler	Thermo Scientific
Vortex Mixer eurolab	Merck
<b>Säule</b>	
ACE C8, 3 $\mu$ m, 150 x 2,1 mm	ACE
LiChroCART <sup>®</sup> 125-4 LiChrospher <sup>®</sup> 100 RP-18 (5 $\mu$ m)	Merck
Zorbax Eclipse XDB-C8, 4,6 x 150 mm, 5 $\mu$ m	Agilent
<b>Software</b>	
Empower <sup>TM</sup> 2 (Empower Pro)	Waters
MassLynx <sup>TM</sup> 4.1	Waters
Xcalibur <sup>TM</sup> 1.4	Thermo Scientific

Tabelle 6.2: Chemikalienliste

<b>Chemikalie</b>	<b>Art.Nr.</b>	<b>Firma</b>
Adenin	A8626	Sigma-Aldrich
Ammoniumacetat		J.T.Baker
Bacto™ Hefeextrakt	212720	Becton, Dickinson & Co
Bacto™ Pepton	211820	Becton, Dickinson & Co
Bathophenanthrolindisulfonsäure -Dinatriumsalz Hydrat	B1375	Sigma-Aldrich
CASY® ton	43001	Innovatis
Chloroform Chromasolv®	34854	Sigma-Aldrich
Difco™ Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren	291940	Becton, Dickinson & Co
EDTA, Titriplex® III, Dinatriumsalz-Dihydrat	108418	Merck
Ethanol, absolut	100983	Merck
α-D(+)-Glucose Monohydrat	6887	Roth
H <sub>2</sub> O bidest.	hauseigen	IMB, Uni Graz
Inositol, myo-	I6652	Sigma-Aldrich
Kaliumcyanid	104967	Merck
Kaliumhydroxid	105033	Merck
L-Arginin	101542	Merck
L-Asparaginsäure	A93100	Sigma-Aldrich
L-Glutaminsäure	100291	Merck
L-Histidinmonohydrochlorid Monohydrat	104350	Merck
L-Leucin	L8000	Sigma-Aldrich
L-Lysinmonohydrochlorid	105700	Merck
L-Methionin	105707	Merck
L-Phenylalanin	P5482	Sigma-Aldrich
L-Serin	S4500	Sigma-Aldrich
L-Threonin	108411	Merck
L-Tryptophan	108374	Merck
L-Tyrosin	108371	Merck
L-Valin	V0500	Sigma-Aldrich
MES Hydrat	M2933	Sigma-Aldrich
Methanol (HPLC grade)	8045	J.T.Baker
Methylchlorformiat	M35304	Sigma-Aldrich
NAD, Lithiumsalz	93150020	Roche
NADH, Dinatriumsalz	AE12	Roth
NADH, Dinatriumsalz	83854658	Boehringer Mannheim
NADP, Dinatriumsalz	93140623	Roche
NADPH, Tetranatriumsalz	N6505	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat	106329	Merck
Natriumhydroxid	106498	Merck
n-Heptadecansäure, C17:0	H3500	Sigma-Aldrich
n-Hexan	7339	Roth
2-Propanol	AE73	Roth
Pyridin	82702	Fluka
Uracil	U0750	Sigma-Aldrich

# Abkürzungsverzeichnis

<b>AA</b>	Aminosäure ( <i>amio acid</i> )
<b>ACP</b>	Acyl-Carrier-Protein
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>AU</b>	willkürliche Einheit ( <i>arbitrary unit</i> )
<b>CDP-DAG</b>	Cytidindiphosphat-Diacylglycerol
<b>Cho</b>	Cholin
<b>CoA</b>	Coenzym A
<b>CRM</b>	<i>Charge Residue Model</i>
<b>CTP</b>	Cytidintriphosphat
<b>DAG</b>	Diacylglycerol
<b>DHAP</b>	Dihydroxyacetonphosphat
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DW</b>	Trockengewicht ( <i>dry weight</i> )
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>EI</b>	Elektronenstoßionisation
<b>ESI</b>	Elektrosprayionisation
<b>Etn</b>	Ethanolamin
<b>EU</b>	Emissionseinheit ( <i>emission unit</i> )
<b>EV</b>	leerer Vektor ( <i>empty vector</i> )
<b>FS</b>	Fettsäure-Synthase
<b>G3P</b>	Glycerol-3-Phosphat
<b>GC</b>	Gaschromatographie
<b>HPLC</b>	Hochleistungsflüssigchromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
<b>ID</b>	Innendurchmesser
<b>IEM</b>	<i>Ion Evaporation Model</i>
<b>iS</b>	interner Standard
<b>m/z</b>	Masse zu Ladungsverhältnis
<b>MCF</b>	Methylchlorformiat
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>MES</b>	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
<b>MS</b>	Massenspektrometrie

<b>NA</b>	Nicotinsäure ( <i>nicotinic acid</i> )
<b>NAAD</b>	Nicotinsäure-Adenin-Dinukleotid
<b>NAD</b>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
<b>NADK</b>	NAD-Kinase
<b>NADS</b>	NAD-Synthase
<b>NADH</b>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
<b>NADP</b>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, oxidierte Form
<b>NADPH</b>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduzierte Form
<b>Nam</b>	Nicotinamid
<b>NAMN</b>	Nicotinsäure-Mononukleotid
<b>N(A)MNAT</b>	Nam/NA-Mononukleotid-Adenylyltransferase
<b>NAPRT</b>	Nicotinsäure-Phosphoribosyltransferase
<b>NH<sub>4</sub>Ac</b>	Ammoniumacetat
<b>NMN</b>	Nicotinamid-Mononukleotid
<b>ONC</b>	Übernachtskultur ( <i>over night culture</i> )
<b>PA</b>	Phosphatidsäure ( <i>phosphatidic acid</i> )
<b>PC</b>	Phosphatidylcholin
<b>PE</b>	Phosphatidylethanolamin
<b>PI</b>	Phosphatidylinositol
<b>PL</b>	Phospholipid
<b>PS</b>	Phosphatidylserin
<b>QA</b>	Chinolinsäure ( <i>quinolinic acid</i> )
<b>QAPRT</b>	Chinolinat-Phosphoribosyltransferase
<b>qTOF</b>	Quadrupol-Flugzeitanalysator ( <i>quadrupole-time-of-flight</i> )
<b>RMS</b>	quadratischer Mittelwert ( <i>root mean square</i> )
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
<b>TAG</b>	Triacylglycerol
<b>TCA</b>	Trichloressigsäure ( <i>trichloroacetic acid</i> )
<b>TIC</b>	Totalionenstrom ( <i>total ion current</i> )
<b>TOF</b>	Flugzeitanalysator ( <i>time of flight</i> )
<b>YNB</b>	Hefe-Stickstoff-Basis ( <i>yeast nitrogen base</i> )
<b>YPD</b>	Vollmedium ( <i>yeast extract peptone dextrose</i> )

# Literaturverzeichnis

- Agledal, L., Niere, M., & Ziegler, M. (2010). The phosphate makes a difference: cellular functions of NADP. *Redox Report*, 15(1), 2–10.
- Anderson, R. M., Bitterman, K. J., Wood, J. G., Medvedik, O., Cohen, H., Lin, S. S., Manchester, J. K., Gordon, J. I., & Sinclair, D. A. (2002). Manipulation of a nuclear NAD<sup>+</sup> salvage pathway delays aging without altering steady-state NAD<sup>+</sup> levels. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18881–18890.
- Butcher, R. A. & Schreiber, S. L. (2004). Identification of Ald6p as the target of a class of small-molecule suppressors of FK506 and their use in network dissection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(21), 7868–7873.
- Canelas, A. B., van Gulik, W. M., & Heijnen, J. J. (2008). Determination of the cytosolic free NAD/NADH ratio in *Saccharomyces cerevisiae* under steady-state and highly dynamic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(4), 734–743.
- Citová, I., Sladkovský, R., & Solich, P. (2006). Analysis of phenolic acids as chloroformate derivatives using solid phase microextraction-gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 573-574, 231–241.
- Daum, G., Wagner, A., Czabany, T., & Athenstaedt, K. (2007). Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast. *Biochimie*, 89(2), 243–248.
- Engelking, L. R. (2004). *Textbook Of Veterinary Physiological Chemistry*. Teton New Media. ISBN: 1-89344142-3, 103.
- Henry, S. A., Kohlwein, S. D., & Carman, G. M. (2012). Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(2), 317–349.
- Hesse, M., Meier, H., & Zeeh, B. (2011). *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag. ISBN: 978-3-13-576108-4, 270-308.
- Heux, S., Cachon, R., & Dequin, S. (2006). Cofactor engineering in *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of a H<sub>2</sub>O-forming NADH oxidase and impact on redox metabolism. *Metabolic Engineering*, 8(4), 303–314.

- Horák, J. (1997). Yeast nutrient transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1331(1), 41–79.
- Hou, J., Lages, N. F., Oldiges, M., & Vemuri, G. N. (2009). Metabolic impact of redox cofactor perturbations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 11(4-5), 253–261.
- Husek, P. (1991). Rapid Derivatization and Gas-chromatographic Determination of Amino-acids. *Journal of Chromatography*, 552(1-2), 289–299.
- Kaltenböck, K. (2008). *Chromatographie für Einsteiger*. Wiley-VCH. ISBN: 978-3-527-32119-3, 129-136.
- Kaspar, H., Dettmer, K., Gronwald, W., & Oefner, P. J. (2009). Advances in amino acid analysis. *Analytical and Bioanalytical Chem*, 393(2), 445–452.
- Klaidman, L. K., Leung, A. C., & Adams, Jr, J. (1995). High-performance liquid chromatography analysis of oxidized and reduced pyridine dinucleotides in specific brain regions. *Analytical Biochemistry*, 228(2), 312–317.
- Lange, H. C., Eman, M., van Zuijlen, G., Visser, D., van Dam, J. C., Frank, J., de Mattos, M. J., & Heijnen, J. J. (2001). Improved rapid sampling for in vivo kinetics of intracellular metabolites in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 75(4), 406–415.
- Lowry, O. H., Passonneau, J. V., & Rock, M. K. (1961). The stability of pyridine nucleotides. *Journal of Biological Chemistry*, 236, 2756–2759.
- Magasanik, B. & Kaiser, C. A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 290(1-2), 1–18.
- Meaden, P. G., Dickinson, F. M., Mifsud, A., Tessier, W., Westwater, J., Bussey, H., & Midgley, M. (1997). The ALD6 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a cytosolic, Mg(2+)-activated acetaldehyde dehydrogenase. *Yeast*, 13(14), 1319–1327.
- Minard, K. I. & McAlister-Henn, L. (2005). Sources of NADPH in yeast vary with carbon source. *Journal of Biological Chemistry*, 280(48), 39890–39896.
- Moreira dos Santos, M., Raghevendran, V., Kötter, P., Olsson, L., & Nielsen, J. (2004). Manipulation of malic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing NADPH production capacity aerobically in different cellular compartments. *Metabolic Engineering*, 6(4), 352–363.

- Murray, D. B., Haynes, K., & Tomita, M. (2011). Redox regulation in respiring *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1810*(10), 945–958.
- Petersen, J. G., Kielland-Brandt, M. C., Nilsson-Tillgren, T., Bornaes, C., & Holmberg, S. (1988). Molecular genetics of serine and threonine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *119*(3), 527–534.
- Pollak, N., Dölle, C., & Ziegler, M. (2007). The power to reduce: pyridine nucleotides–small molecules with a multitude of functions. *Biochemical Journal*, *402*(2), 205–218.
- Rodrigues, F., Ludovico, P., & Leao, C. (2006). Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, 101–121.
- Schwedt, G. & Vogt, C. (2010). *Analytische Trennmethoden*. Wiley-VCH. ISBN: 978-3-527-32494-1, 179-203.
- Sporty, J. L., Kabir, M. M., Turteltaub, K. W., Ognibene, T., Lin, S.-J., & Bench, G. (2008). Single sample extraction protocol for the quantification of NAD and NADH redox states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Separation Science*, *31*(18), 3202–3211.
- Tehlivets, O., Scheuringer, K., & Kohlwein, S. D. (2007). Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1771*(3), 255–270.
- Villas-Bôas, S. G., Delicado, D. G., Akesson, M., & Nielsen, J. (2003). Simultaneous analysis of amino and nonamino organic acids as methyl chloroformate derivatives using gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, *322*(1), 134–138.
- Wagner, T. C. & Scott, M. D. (1994). Single extraction method for the spectrophotometric quantification of oxidized and reduced pyridine nucleotides in erythrocytes. *Anal Biochem*, *222*(2), 417–426.
- Watanabe, S., Abu Saleh, A., Pack, S. P., Annaluru, N., Kodaki, T., & Makino, K. (2007). Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein-engineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*. *Microbiology*, *153*(Pt 9), 3044–3054.
- Wilm, M. (2011). Principles of electrospray ionization. *Molecular & Cellular Proteomics*, *10*(7), M111.009407.
- Zampolli, M. G., Basaglia, G., Dondi, F., Sternberg, R., Szopa, C., & Pietrogrande, M. C. (2007). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of amino acid enantiomers as



methyl chloroformate derivatives: application to space analysis. *Journal of Chromatography A*, 1150(1-2), 162–172.