

Fraktionierung der stabilen Kohlenstoffisotope in der
Steroid-Biosynthese durch 3-Hydroxy-3-methylglutaryl
Coenzym A Reduktase

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Svena Lüdke

aus Köln

Köln 2008

Berichterstatter: Prof. Dr. Dietmar Schomburg
Prof. Dr. Hans-Günther Schmalz
Prof. Dr. Wilhelm Schänzer

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Oktober 2008

Zusammenfassung

Stabile Kohlenstoffisotope zeigen in natürlichen Materialien eine nicht-statistische Verteilung. Vergleicht man die Isotopenverhältnisse unterschiedlicher chemischer Verbindungen, können Aussagen über Stoffquellen und Biosynthesewege getroffen werden. Die Isotopenverhältnisse hängen von biosynthetischen Prozessen ab, die eine $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Fraktionierung verursachen können.

Im Falle der Lipide beobachtet man typischerweise eine deutliche ^{13}C -Anreicherung gegenüber dem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis der gesamten Biomasse eines Organismus. Allerdings zeigen die humane Steroidhormone, die eine Untergruppe der Lipide darstellen, nur eine geringe ^{13}C -Anreicherung gegenüber der Biomasse. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zum Verständnis dieses speziellen Phänomens beizutragen.

Im Metabolismus kann ein kinetischer Isotopeneffekt nur eine Isotopenfraktionierung verursachen, wenn eine unvollständige Umsetzung des Substrats stattfindet oder sich der Biosyntheseweg verzweigt. Daher wurde hier eine Enzymreaktion betrachtet, die als der limitierende Schritt des Mevalonatbiosynthesewegs, aus dem unter anderem die Steroide hervorgehen, gilt.

Die katalytische Domäne der humanen 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A Reduktase (HMGR) wurde bakteriell exprimiert und gereinigt. Während der enzymatischen Umsetzung des eingesetzten Substrats wurden in bestimmten Zeitabständen Proben aus der Reaktionslösung entnommen. Aus den Proben wurde das Reaktionsprodukt isoliert und mittels Gaschromatographie-gekoppelter Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie analysiert. Für die Abhängigkeit zwischen dem Isotopenverhältnis und dem Zeitpunkt der Probennahme wurde in dieser Arbeit ein mathematisches Modell entwickelt und eine Kurvenanpassung an die Mess-

werte durchgeführt. Für die *in vitro* HMGR-Reaktion ergab sich ein durchschnittlicher Fraktionierungsfaktor $^{12}k/^{13}k$ von 1,0031 mit einer Standardabweichung von 0,0004 für alle Kohlenstoffatome im analysierten Produktmolekül. Der mögliche Einfluss der HMGR-Reaktion auf das Isotopenverhältnis der Steroide wird diskutiert.

Abstract

Stable carbon isotope ratios exhibit non-statistical distributions in natural compounds. The interpretation of differences in isotope patterns permits the elucidation of biosyntheses and origin assignments of natural compounds. Isotope ratios depend on biosynthetic processes that may cause $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ fractionation.

Lipids are typically strongly depleted in ^{13}C versus other classes of biological compounds of the same organism. However, steroid hormones form a subgroup of lipids. But in contrast to other lipids, human steroid hormones are only slightly ^{13}C -depleted compared to biomass. The present work may contribute to the understanding of this phenomenon.

Kinetic isotope effects in metabolism can only become effective in connection with incomplete turnover of the substrate or branching of the biosynthetic pathway. Hence, the limiting enzyme reaction of the mevalonic pathway, which leads to the formation of steroids, was investigated here.

The catalytic domain of human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) was bacterially expressed and purified. During the course of the enzyme reaction, samples were removed from the reaction mixture. The reaction product was isolated from the samples and analysed by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. A model describing the dependence of the isotopic ratio and the time of sample taking was developed in this work and fitted to the data. An average fractionation factor $^{12}k/^{13}k$ of 1.0031 with a standard deviation of 0.0004 was estimated for all carbon atoms contained in the product molecule. The possible effect of the reaction of HMGR on the isotopic ratio of steroids was discussed. The possible effect of the reaction of HMGR on the isotopic ratio of steroids was discussed.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Grundlagen	5
2.1. Stabile Isotope	5
2.1.1. Definitionen und Einheiten	6
2.1.2. Physikalische und chemische Eigenschaften	8
2.1.3. Isotopen-Analytik	11
2.1.4. Anwendung der Isotopen-Analytik	13
2.1.5. Geschlossene Systeme	15
2.1.6. Fließgleichgewichte	18
2.2. Metabolismus	22
2.2.1. Regulation des Mevalonatbiosynthesewegs	24
2.2.2. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A Reduktase	26
2.2.3. Steroidhormone	32
3. Ergebnisse	37
3.1. Darstellung des Enzyms und Durchführung der Enzymreaktion	39
3.1.1. Expression und Reinigung	39
3.1.2. Aktivität und Pravastatin-Inhibition	42
3.1.3. Probennahme während der Enzymreaktion	43
3.2. Kohlenstoff-Isotopenverhältnis von Mevalonat	43
3.2.1. Lactonisierung	43
3.2.2. Festphasenextraktion von Mevalonolacton	45
3.2.3. Messung der Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse	47

3.3.	Isotopischer Anreicherungsfaktor der Enzymreaktion	48
3.3.1.	Betrachtung des Datensatzes	48
3.3.2.	Isotopischer Fraktionierungsfaktor und Anreicherungsfaktor	54
3.3.3.	Auswirkung des Anreicherungsfaktors auf die Steroidhormone	56
4.	Diskussion	59
4.1.	Bedeutung des inaktiven Expressionsprodukts	59
4.2.	Aufarbeitungs- und Messmethode	61
4.2.1.	Einfluss der Lactonisierung auf das Isotopenverhältnis . . .	61
4.2.2.	Gerätedrift bei der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie	63
4.2.3.	Vergleich von Mittelwert-Methode und Kurvenanpassung	65
4.3.	Einfluss der Isotopenfraktionierung auf die Steroidhormone	69
5.	Material und Methoden	73
5.1.	Bakterien-Techniken	73
5.1.1.	Bakterienstämme und Nährmedien	73
5.1.2.	Bakterienkultivierung	74
5.1.3.	Lagerung von Bakterienstämmen	75
5.1.4.	Rekultivierung gefriergetrockneter Stämme	76
5.1.5.	Herstellung chemokompetenter Stämme	76
5.1.6.	Hitzeschock-Transformation	77
5.2.	DNA-Techniken	77
5.2.1.	Präparation von Plasmid-DNA	77
5.2.2.	Polymerase-Kettenreaktion	81
5.2.3.	Mutagenese	82
5.2.4.	Restriktion und Ligation	83
5.2.5.	Klenow Fill-in Reaktion	85
5.2.6.	Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion	85
5.2.7.	Sequenzierung	86
5.3.	Expressionsvektoren	88
5.3.1.	Plasmid p02-RZPD	88

5.3.2. Plasmid pA1-ATCC	91
5.4. Protein-Techniken	94
5.4.1. Expression in <i>Escherichia coli</i>	94
5.4.2. Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie	94
5.4.3. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	96
5.4.4. Stabilisierung der Enzymlösung	97
5.4.5. Polyacrylamid Gelelektrophorese	97
5.4.6. Enzymreaktion mit Probennahme	98
5.5. Probenvorbereitung und Massenspektrometrie	101
5.5.1. Lactonisierung und Festphasenextraktion	101
5.5.2. Gaschromatographie-Massenspektrometrie	103
5.5.3. Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie	103
5.6. Datenanalyse	107
5.6.1. Berechnung der Reaktionslaufzahl	107
5.6.2. Berechnung des isotopischen Fraktionierungsfaktors	108
5.6.3. Computergestützte Datenanalyse	112
A. Anhang	121
A.1. Herleitung der Kurvengleichung	121
A.2. Probenliste	124
Abbildungsverzeichnis	129
Tabellenverzeichnis	131
Literaturverzeichnis	133

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bis-Tris	bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
bp	(Nuklein-)Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)
C	Cytosin
CoA	Coenzym A
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
et al.	und andere (lat.: et alii)
G	Guanin
GC-C-IRMS	Gaschromatographie-gekoppelte Isotopenverhältnis Massenspektrometrie (engl.: gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry)
GC-MS	Gaschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie
griech.	griechisch
HDL	High density lipoprotein (engl.)
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A
HMGR	3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A Reduktase
HMGS	3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A Synthase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

IRMS	Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (engl. isotope ratio mass spectrometry)
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
lat.	lateinisch
LB	Lysogeny Broth (auch als Luria-Bertani-Medium bekannt)
LBamp	LB-Flüssigmedium mit Ampicillin
LDL	Low density lipoprotein (engl.)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Midiprep	Plasmid-Präparation im mittleren Maßstab
Miniprep	Plasmid-Präparation im kleinen Maßstab
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (engl.: messenger)
MS	Massenspektrometrie
MVL	Mevalonolacton
NADP(H)	β -Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduziert)
NCBI	National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl. polyacrylamide gel electrophoresis)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PDB	Pee Dee Belemnite (Standardmaterial)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecylsulfate)
SPE	Festphasenextraktion (engl.: solid phase extraction)
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	TRIS-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

tRNA	transfer-RNA
U	Einheiten (engl.: units)
VPDB	Vienna (auch: Virtual) Pee Dee Belemnite (Standardmaterial)
w/v	1% w/v entspricht 1 g/100 mL

1. Einleitung

Natürliche Isotopensignaturen können dazu verwendet werden, Ursprung und Synthesewege von Biomolekülen zu verfolgen. Viele chemische und physikalische Prozesse bewirken eine signifikante Isotopenfraktionierung, was sich generell in einer An- oder Abreicherung des schwereren Isotops auswirkt. Zum Beispiel enthalten Pflanzen weniger ^{13}C als die Atmosphäre, in der Kohlenstoff als CO_2 vorliegt. Der Grund dafür ist die Diskriminierung von ^{13}C in Diffusionsprozessen und in enzymatischen Reaktionen, die bei der CO_2 -Fixierung stattfinden. Die daraus folgende Fraktionierung kann sowohl während zeitlich begrenzter oder kinetischer Prozesse, als auch bei Fließgleichgewichten auftreten [Lajtha 1994].

Im eukariontischen Metabolismus wird die beobachtete ^{13}C -Abreicherung von Lipiden gegenüber anderen Klassen biologischer Verbindungen auf den kinetischen Isotopeneffekt während der Decarboxylierung von Pyruvat zurückgeführt. Das dabei entstehende Produkt Acetyl-CoA wird entweder im Citratzyklus abgebaut, oder dient als Kohlenstoffquelle in der Biosynthese der Lipide. Aufgrund ihrer Schlüsselposition als unumgänglicher Schritt der Lipidsynthese, wirkt sich der Isotopeneffekt der Pyruvat Dehydrogenase auf die Isotopensignatur der im Syntheseweg folgenden Metaboliten aus [Melzer 1987]. Tatsächlich findet man aber innerhalb der Lipide wiederum Substanzgruppen, deren Isotopensignaturen sich signifikant unterscheiden. So weicht die Gruppe der humanen Steroidhormone hinsichtlich ihrer Isotopenzusammensetzung deutlich von den übrigen Lipiden ab. Daher wird eine zusätzliche Ursache außer dem Isotopeneffekt der Pyruvat Dehydrogenase angenommen [Flenker 2008b].

Auf der Suche nach den Einflussfaktoren auf die Isotopensignatur der Steroidhormone steht die Reaktion der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A Reduktase

(HMGR) im Zentrum des Interesses. Sie wirkt im Metabolismus nach der Verzweigungsstelle von Mevalonat- und Fettsäurebiosyntheseweg. Ein Hauptprodukt des Mevalonatbiosynthesewegs ist Cholesterin. HMGR katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterinbiosynthese und unterliegt einer starken Feedbackregulation. Cholesterin wiederum ist ein Vorläufermolekül der Steroidhormone.

Kenntnisse über den menschlichen Anabolismus, zu dem der Mevalonatbiosyntheseweg gehört, sind auch für das Gebiet der Dopinganalytik von grundlegender Bedeutung. Steroidhormone, besonders das anabol wirkende Testosteron, werden im Sport seit ihrer synthetischen Verfügbarkeit in den 1950er Jahren als Dopingmittel verwendet. Ihr Missbrauch kann seit 1974 nachgewiesen werden [Ward 1975]. Der Nachweis basiert auf der Detektion von Testosteron (T) und seinem 17- β -Stereoisomer Epitestosteron (E). Urinär werden beide Steriode im Konzentrationsverhältnis von etwa 1:1 ausgeschieden [Donike 1983]. Bei einer künstlichen Testosterongabe erhöht sich der T/E-Quotient und wird ab einem Wert von einschließlich vier als Hinweis auf Doping interpretiert [WADA Laboratory Committee 2004].

Um einen Dopingverdacht zu bestätigen, sind weitere Untersuchungen vorgeschrieben. Eine praktizierte Methode ist die Herkunftsbestimmung des Testosterons mittels Kohlenstoff-Isotopen-Verhältnis-Massenspektrometrie (IRMS). Sie beruht darauf, dass körpereigenes T gegenüber dem synthetischen ^{13}C -abgereichert ist, da letzteres aus dem Steroidgerüst eines Pflanzenvorläufers hergestellt wird. Bei diesem Nachweis wird die Isotopensignatur des verdächtigen Steroidhormons mit der einer körpereigenen Referenzsubstanz aus einem parallelen Stoffwechselweg verglichen. Die Referenzsubstanz wird so gewählt, dass sie nicht durch körpereigene Prozesse aus dem zugeführten Dopingmittel entstanden sein kann. Eine signifikante Abreicherung der Vergleichssubstanz gegenüber der verdächtigen Substanz gilt als Verdachtsbestätigung.

Allerdings hat sich zum Beispiel gezeigt, dass körpereigene Steroidhormone von Frauen stärker ^{13}C -abgereichert sind, wenn sie orale Kontrazeptiva einnehmen [Flenker 2008b]. Als mögliche Ursache wird eine Feedbackregulation des Enzyms HMGR durch Sterine vermutet, denn die kontrazeptiv wirkenden Östrogene und

Gestagene beeinflussen die körpereigene Produktion von Steroidhormonen. Die Untersuchung eines mutmaßlichen Isotopeneffekts der HMGR-Reaktion kann auch zur Erklärung dieses Phänomens beitragen.

Generell ist die Aufklärung von Einflussfaktoren auf das Stabilisotopenverhältnis in Steroidhormonen eine wichtige Basis für die Dopinganalytik. Um Messergebnisse richtig interpretieren zu können, müssen die Ursachen bekannt sein, die zur Ausbildung der Isotopenverhältnisse führen. Eine Ursache kann der kinetische Isotopeneffekt derjenigen Reaktion sein, die für die Steroidbiosynthese geschwindigkeitsbestimmend ist.

In der vorliegenden Arbeit wird daher die HMGR-Reaktion *in vitro* untersucht. Dazu wird das Enzym exprimiert, seine Reaktion unter möglichst physiologischen Bedingungen durchgeführt und der isotopische Anreicherungsfaktor aus der Isotopensignatur des Reaktionsprodukts mittels Kohlenstoff-IRMS bestimmt.

2. Grundlagen

2.1. Stabile Isotope

Die Isotope eines Elements sind Atome mit gleicher Kernladung, aber unterschiedlichen Massenzahlen. Sie besetzen den gleichen Platz im Periodensystem der Elemente, woraus sich ihr Name ableitet: isos (griech.) - gleich, topos (griech.) - Platz (nach Frederick Soddy, englischer Physikochemiker (1877-1956) [Holleman 1985]). Als Beispiel sei das Element Kohlenstoff genannt, welches in dieser Arbeit eine zentrale Rolle spielt. Seine natürlichen Isotope sind in Tabelle 2.1 zusammengestellt. Darüber hinaus sind synthetische Radioisotope von Kohlenstoff bekannt.

$^{12}_6\text{C}$ und $^{13}_6\text{C}$ sind stabil, während $^{14}_6\text{C}$ instabil ist. In dieser Arbeit werden nur die stabilen Kohlenstoffisotope betrachtet.

Isotop	relative Häufigkeit	Nukleonen	Elektronen	Anmerkung
$^{12}_6\text{C}$	98,89 %	6p + 6n	6e	stabil
$^{13}_6\text{C}$	1,11 %	6p + 7n	6e	stabil
$^{14}_6\text{C}$	(16 Zerfälle je 1g C pro Minute)	6p + 8n	6e	radioaktiv, $t_{1/2} = 5760 \text{ a}$

Tabelle 2.1.: Natürliche Isotope des Kohlenstoffs. p: Protonen; n: Neutronen; e: Elektronen. Daten aus [Holleman 1985]

2.1.1. Definitionen und Einheiten

Das Verhältnis der stabilen Kohlenstoffisotope in einer Probe wird als der Quotient aus dem absoluten Vorkommen des schwereren Isotops und dem absoluten Vorkommen des leichteren Isotops angegeben.

$$^{13}R = \frac{[^{13}\text{C}]}{[^{12}\text{C}]} \quad (2.1)$$

Typischerweise enthalten Proben einen geringen Anteil an ^{13}C . Um die signifikanten Nachkommastellen des ^{13}R -Werts hervorzuheben, wird ^{13}R bevorzugt in Promille (‰) angegeben. Misst man beispielsweise eine Kohlenstoffquelle mit der natürlichen relativen Häufigkeit des ^{13}C -Isotops von 1,11%, so beträgt die absolute Isotopensignatur ^{13}R etwa 0,0112, was einem Wert von 11,2 ‰ entspricht.

Die Messungen von Isotopensignaturen unterliegen Problemen, wie Probenheterogenität, tagesabhängige Schwankungen des Massenspektrometers sowie Variationen in der Probenaufarbeitung [Hayes 1982]. In der Praxis misst man daher eine Standardprobe mit bekanntem Isotopenverhältnis unter praktisch identischen Bedingungen kurz vor oder kurz nach der eigentlichen Probe. Die Isotopensignatur der Probe wird dann als Abweichung von der Signatur des Standards in der sogenannten δ -Notation angegeben. Alle Literaturwerte von Isotopensignaturen beziehen sich auf primäre Standards. Der Standard für Kohlenstoff ist ein jurassisches Fossil, Pee Dee Belemnite (PDB) [Craig 1953]. Mittlerweile wurde das ursprünglichen Standardmaterial PDB verbraucht und durch VPDB ersetzt. Bei VPDB handelt es sich gleichfalls um ein Carbonat, von dem allerdings große Mengen existieren. Definitionsgemäß besitzt es einen Wert von +1,95 ‰ gegenüber dem Nullpunkt der Skala [Gonfiantini 1995]. Die Skala wurde so gewählt, dass sich Messungen gegen PDB und VPDB möglichst wenig unterscheiden.

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \left[\frac{^{13}R_{\text{Probe}}}{^{13}R_{\text{PDB}}} - 1 \right] \times 1000 \quad (2.2)$$

Proben, die einen höheren Anteil des schweren Isotops enthalten als andere, wer-

den als angereichert und schwerer bezeichnet. Solche mit einem geringeren Anteil des schweren Isotops nennt man abgereichert und leichter. Viele chemische und physikalische Prozesse zeigen signifikante Isotopenfraktionierung, was sich generell als An- oder Abreicherung des schwereren Isotops auswirkt. Zum Beispiel enthalten Pflanzen weniger ^{13}C als atmosphärisches CO_2 , weil sowohl der Diffusionsprozess von CO_2 als auch die enzymatischen Reaktionen das schwere $^{13}\text{CO}_2$ diskriminieren [O'Leary 1981]. Diese Fraktionierung kann zum einen während zeitabhängiger oder kinetischer Prozesse auftreten, zum anderen auch bei Fließgleichgewichten.

Ein Isotopeneffekt kann als Fraktionierungsfaktor α ausgedrückt werden. Für Gleichgewichtsreaktionen ist er definiert als das Verhältnis der Signaturen von Substrat und Produkt.

$$\alpha = \frac{R_{\text{Substrat}}}{R_{\text{Produkt}}} \quad (2.3)$$

Demgegenüber wird die Fraktionierung während einer unidirektionalen kinetischen Reaktion, als Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten k^{12} und k^{13} für die Reaktion von Molekülen mit dem jeweiligen Kohlenstoffisotop ausgedrückt.

$$\alpha = \frac{k^{12}}{k^{13}} \quad (2.4)$$

Die Isotopendiskriminierung drückt sich als Unterschied der Isotopensignaturen verschiedener Substanzen aus. Diese $\Delta\delta$ -Werte, werden häufig nur mit Δ in der Einheit Promille bezeichnet.

$$\Delta_{S/P}(\text{‰}) = \frac{\delta_S - \delta_P}{1 + \delta_P/1000} \quad (2.5)$$

Anders als die Signatur δ , die zu einer einzelnen Verbindung gehört, vergleicht die Diskriminierung Δ die Isotopen zweier Verbindungen. Da der Nenner nah bei Eins liegt, vereinfachen viele Autoren die Definition zur Differenz der δ -Werte von Substrat und Produkt [Lajtha 1994]:

$$\Delta_{S/P} = \delta_S - \delta_P \quad (2.6)$$

Der isotopische Anreicherungsfaktor ε in Promille wird verwendet, um den Einfluss eines Isotopeneffekts auf den δ -Wert eines Produkts zu formulieren. Wenn das Substrat in einer Reaktion nicht limitierend ist, drückt sich der maximale Isotopeneffekt im Produkt aus und es gilt $\Delta \approx \varepsilon$ [Lajtha 1994].

$$\varepsilon(\text{‰}) = (\alpha - 1) \times 1000 \quad (2.7)$$

2.1.2. Physikalische und chemische Eigenschaften

Aufgrund ihrer elektrischen Ausstattung können Isotope identische Positionen im Molekül besetzen. Ihr Verhalten in chemischen Reaktionen kann sich jedoch in Abhängigkeit von ihrer individuellen Kernmasse unterscheiden. Diese Unterschiede beruhen auf den unterschiedlichen Nullpunktsenergien E_0 der Bindungen. Die Nullpunktsenergie hängt über die Eigenfrequenz ν_0 von der reduzierten Masse μ der beteiligten Atome ab.

$$E_0 = \frac{1}{2} h \nu_0 \quad ; \quad \nu_0 = \frac{1}{2\pi} \left(\frac{k}{\mu} \right)^{\frac{1}{2}} \quad ; \quad \mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$$

Dabei ist h das Planck'sche Wirkungsquantum und k die Federkonstante der Bindung. Eine größere Kernmasse der beteiligten Atome führt also zu einer geringeren Nullpunktsenergie.

Das Morse-Potential in Abbildung 2.1 beschreibt den Verlauf der potentiellen Energie einer Molekülbindung als Funktion des Kernabstands. Im dargestellten Beispiel ist ein Kohlenstoffatom an der Molekülbindung beteiligt. Das Molekül schwingt je nach Isotopenbesetzung mit unterschiedlichen Nullpunktsenergien.

Um eine Bindung zu spalten, muss ein bestimmter Energiebetrag, die Dissoziationsenergie, zugeführt werden. Diese Energie muss ausreichend groß sein, um die Distanz von dem Energieniveau, auf dem das Molekül schwingt, bis zum Rand des Potentialtopfs zu überwinden. Wegen der unterschiedlichen Nullpunktsenergien E_0 ergibt sich also ein entsprechend höherer Energiebetrag für die Dissoziationsenergie D_0 von Bindungen zwischen schwereren Isotopen.

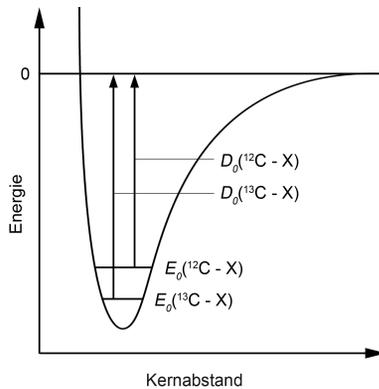


Abbildung 2.1.: Das Morse-Potential beschreibt den Verlauf der potentielle Energie einer Molekülbindung als Funktion des Kernabstands. Der Austausch von Kohlenstoffisotopen führt zu unterschiedlichen Nullpunktsenergien. D_0 : Dissoziationsenergie; E_0 : Nullpunktsenergie. Abbildung angelehnt an [Holleman 1985].

Isotope in enzymkatalysierten Reaktionen

Abbildung 2.2 zeigt anhand eines Reaktionsprofils den Unterschied zwischen der Reaktion von Substrat S' , welches das leichtere Isotop enthält, und der Reaktion von S'' , in dem das schwerere Isotop an der zu spaltenden Bindung beteiligt ist. Um den Übergangszustand S^\ddagger einnehmen zu können, muss eine bestimmte Aktivierungsenergie ΔE_{akt} zugeführt werden. Diese ist für S'' größer, denn der Grundzustand besitzt eine niedrigere freie Energie als der Grundzustand von S' .

Enzyme verringern die Energiebarriere, indem sie mit dem Substrat einen aktivierten Komplex $[S - E]^\ddagger$ bilden. Dadurch erhält die Reaktion ein flacheres Profil und der Übergangszustand wird durch eine niedrigere Energiezufuhr erreicht, als bei einer ohne Enzym ablaufenden Reaktion.

Die ungleiche Reaktionsrate von S' und S'' wird als Isotopendiskriminierung bezeichnet. Der Effekt der Diskriminierung ist eine Abreicherung von schweren Isotopen im Produkt und dementsprechend eine Anreicherung im Substrat. Bei

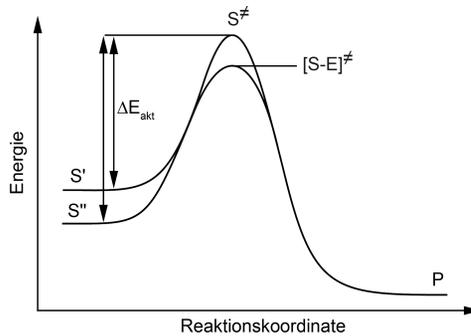


Abbildung 2.2.: Die Reaktionsprofile für Substrate mit unterschiedlichen Isotopen unterscheiden sich. S', S'': Substrate, in denen das leichtere, bzw. das schwerere Isotop an der dissoziierenden Bindung beteiligt ist; ΔE_{akt} : Aktivierungsenergie; S[‡]: Übergangszustand am Maximum der Potentialkurve; [S-E][‡]: Übergangszustand des Enzym-Substrat-Komplexes; P: Produkt. Abbildung angelehnt an [Atkins 1990, Stryer 1991].

Enzymreaktionen ist wegen der niedrigeren Energiebarriere eine geringere Isotopen-diskriminierung zu erwarten, als bei nicht-enzymkatalysierten Reaktionen.

Primäre und sekundäre Isotopeneffekte

Generell unterscheidet man zwischen primären und sekundären Isotopeneffekten. Atome, die an einer Bindung beteiligt sind, die gebildet oder gebrochen wird, sind von primären kinetischen Isotopeneffekten betroffen. Dabei reagieren die schwereren Isotope fast immer langsamer, was einem sogenannten „normalen“ Isotopeneffekt entspricht [Cleland 1982].

Sekundäre Isotopeneffekte betreffen die Atome, welche nicht direkt an der Bildung oder der Spaltung von Bindungen beteiligt sind, sondern sich in Nachbarschaft zum reagierenden Atom befinden. Je nach Entfernung des Atoms vom Reaktionszentrum werden sie als α - oder β -sekundäre Isotopeneffekte bezeichnet.

2.1.3. Isotopen-Analytik

Die Messung der Häufigkeitsverhältnisse von stabilen Kohlenstoffisotopen ist mit Hilfe der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) möglich. Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Messtechnik. Die Zusammenstellung der Komponenten und die Modifikationen des ursprünglichen Aufbaus wurden von Flenker et al. durchgeführt und beschrieben [Flenker 2007].

Vor der Messung im Massenspektrometer werden die Moleküle einer Probe zu Gasen verbrannt. Wenn Kohlenstoffisotope analysiert werden sollen, wird das Molekül zu CO_2 oxidiert. Die Verbrennung findet in einer Aluminium-Keramik-Kapillare statt, die einen Kupfer-, einen Nickel- und einen Platin-Draht enthält. Unter Platin-katalyse bildet sich mit Sauerstoff Kupfer(II)- und Nickel(II)-oxid. In Anwesenheit der Oxide wird das Probenmolekül vollständig zu CO_2 umgesetzt. Nach jeder Probe wird das System mit hochreinem Sauerstoff regeneriert. Nach der Verbrennung wird entstandenes Wasser in einer Kühlfalle ausgefroren [Cawley 2008].

Die Gasmoleküle werden durch das Verfahren der Elektronenstoßionisation ionisiert. Senkrecht zum Molekülstrom der Probe wird dabei ein Elektronenstrahl von einer Glühkathode in Richtung einer Anode beschleunigt. Bei einem Zusammenstoß von Molekül und Elektron kommt es zu verschiedenen Prozessen, von denen die Bildung positiver Molekülionen der wichtigste ist: $\text{AB} \rightarrow \text{AB}^+ + \text{e}^-$. Die Molekülionen werden dann durch ein Magnetfeld entsprechend des Verhältnisses m/z von Masse zu Ladung fokussiert und detektiert.

Bei der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) steht nicht die Identifizierung von Molekülionen im Vordergrund, sondern die Ermittlung ihrer relativen Häufigkeiten innerhalb einer Probe. Daher wird in der IRMS üblicherweise nicht über einen Massenbereich gescannt, sondern die relevanten Ionenstrahlen simultan registriert. Ein dafür geeignetes Kollektorsystem besteht aus mehreren fixierten Faraday-Bechern. Abbildung 2.3 zeigt schematisch die Optik des verwendeten Systems.

Um einzelne Verbindungen einer Probe vor der IRMS-Analyse voneinander zu

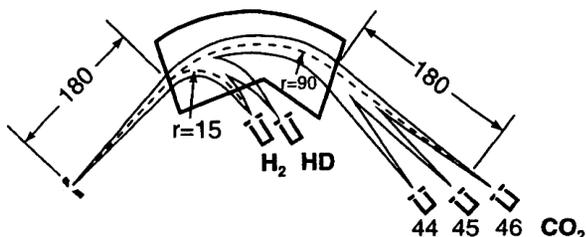


Abbildung 2.3.: Optik des Finnigan Delta^{plus} Isotopen Massenspektrometers. Abbildung aus [Platzner 1997].

trennen, wird ein Gaschromatograph (GC) mit einem Kaltaufgabesystem vorge­schaltet. Das Verfahren hält die Analyten im Einspritzblock bei relativ niedrigen Temperaturen zurück, während das leichter flüchtige Lösungsmittel evaporisiert und vor der GC-Säule durch ein Splitventil abgezogen wird. Daraus folgt zum einen eine lösungsmittelfreie Chromatographie und zum anderen ein verringertes Totvolumen, da weniger Verbindungsstücke benötigt werden. Dadurch verbessert sich bei der chromatographischen Trennung die Peakform der Analyten [Flenker 2007].

Bei der Analyse von stabilen Kohlenstoffisotopen werden CO_2 -Moleküle mit den m/z -Werten 44, 45 und 46 detektiert. Die unterschiedlichen Spezies sind in Tabelle 2.2 zusammengestellt. Die Gasmoleküle mit gleichem m/z -Wert können im Massenspektrometer nicht unterschieden werden.

Das $^{13}C/^{12}C$ -Verhältnis wird nach der Messung aus dem m/z -Verhältnis 45/44 berechnet. Die Häufigkeit gemessener Moleküle mit m/z 45 wird um den Anteil der $^{12}C^{16}O^{17}O$ -Spezies korrigiert. Die Häufigkeit von ^{17}O wird aus dem Verhältnis 46/44 berechnet und von der Häufigkeit von m/z 45 abgezogen, woraus sich dann die ^{13}C -Häufigkeit ergibt. Dazu wird ein festes Verhältnis von ^{18}O zu ^{17}O angenommen [Santrock 1985].

m/z	CO ₂ -Spezies
44	¹² C ¹⁶ O ¹⁶ O
45	¹³ C ¹⁶ O ¹⁶ O, ¹² C ¹⁶ O ¹⁷ O
46	¹² C ¹⁶ O ¹⁸ O, ¹² C ¹⁷ O ¹⁷ O, ¹³ C ¹⁶ O ¹⁷ O

Tabelle 2.2.: CO₂-Spezies mit unterschiedlichen Isotopen. Die Spezies mit gleichem m/z-Wert können im Massenspektrometer nicht unterschieden werden.

2.1.4. Anwendung der Isotopen-Analytik

In der Isotopenanalytik findet man zwei grundsätzliche Ansätze: den Substanz-basierenden und den Reaktions-basierenden Ansatz [Hayes 2001]. Der Substanz-basierende Ansatz betrachtet Substanzquellen und Stoffwechselwege, während der Reaktions-basierende Ansatz die Aufklärung von Reaktionsmechanismen zum Ziel hat. Abbildung 2.4 zeigt ein Schema der unterschiedlichen Ansätze und ihrer Ziele.

Beim Substanz-basierenden Ansatz kann die Isotopensignatur wie eine zusätzliche chemische Informationen verwendet werden [Brenna 2001]. In Ökologie, Geologie und Forensik werden Isotopensignaturen als Herkunftsindikatoren von Materialien genutzt. Geht man von einem einheitlichen Substrat aus, ist es in bestimmten Fällen möglich, unterschiedliche Umsetzungsprozesse anhand der unterschiedlichen Isotopenverhältnisse von Produkten auf ihre Entstehung zu schließen. So können zum Beispiel Materialien biotischen und abiotischen Ursprungs anhand ihrer Isotopenzusammensetzung unterschieden werden [Ehleringer 1986]. Demgegenüber kann man auf unterschiedliche Stoffquellen schließen, wenn Substanzen, die identische Stoffwechselwege durchlaufen haben, unterschiedliche Isotopensignaturen aufweisen. In der Doping-Analytik basiert beispielsweise der Nachweis eines Missbrauchs von Steroidhormonen auf einer solchen Herkunftsanalyse [Becchi 1994].

Beim Reaktions-basierenden Ansatz werden chemische Reaktionen untersucht, die eine Isotopendiskriminierung verursachen. In der Chemie und Biochemie werden Isotopeneffekte dazu verwendet, Reaktionsmechanismen *in vitro* aufzuklären [Cleland 1982]. Zum Beispiel kann die Größenordnung der Diskriminierung einen Hinweis geben, ob der geschwindigkeitsbestimmende Schritt einer Enzymreaktion

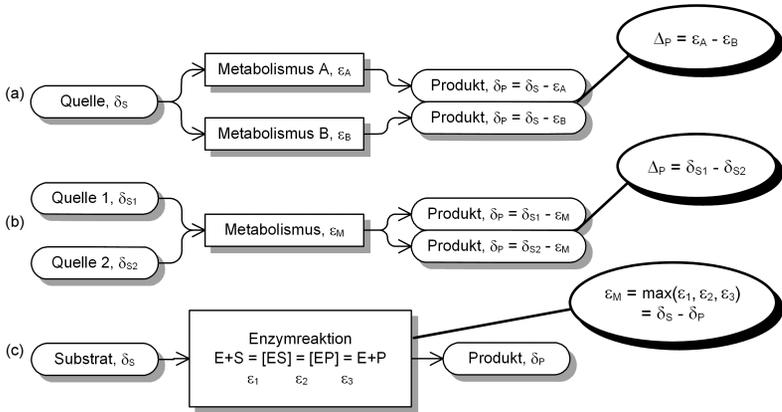


Abbildung 2.4.: Anwendungen der Isotopen-Analytik. Substanz-basierender Ansatz: Isotopenverhältnisse von Substanzen werden mit den Zielen (a) Unterscheidung von Stoffwechselwegen und (b) Unterscheidung von Quellen untersucht. Reaktions-basierender Ansatz: Die Messung von Isotopenfraktionierung durch eine bestimmte Reaktion dient (c) zur Aufklärung von Reaktionsmechanismen. $\max(\epsilon\dots)$: der größte ϵ -Wert entspricht der beobachteten Fraktionierung.

eine Decarboxylierung ist oder von der Dissoziierung eines Enzym-Komplexes abhängt [Jordan 1978].

Beide Ansätze, der Substanz-basierende sowie der Reaktions-basierende, ergänzen sich gegenseitig und ihre Ergebnisse müssen konsistent sein [Hayes 2001]. Um Vorgänge im Metabolismus vorhersagen zu können, reichen diese Informationsquellen jedoch nicht aus. Zusätzlich muss die Struktur des metabolischen Netzwerks bekannt sein, damit Einflüsse von Fließgleichgewichten berücksichtigt werden können. Außerdem können Substanzen voneinander abweichende Isotopensignaturen entwickeln, wenn ihre Entstehung in unterschiedlichen Kompartimenten eines Organismus stattfindet.

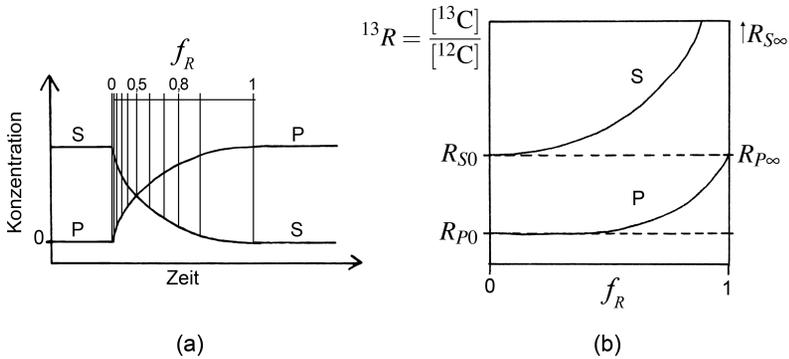


Abbildung 2.5.: Isotopenfraktionierung in einer unidirektionalen Reaktion $S \rightarrow P$ in einem geschlossenen System. (a) Konzentrationen von Substrat S und Produkt P. Die Reaktionslaufzahl f_R ermöglicht eine zeitunabhängige Beschreibung des Reaktionsverlaufs. (b) Abhängigkeit des Isotopenverhältnisses ^{13}R von der Reaktionslaufzahl f_R .

2.1.5. Geschlossene Systeme

In der vorliegenden Arbeit wurde die Isotopendiskriminierung einer Enzymreaktion *in vitro*, also in einem geschlossenen Reaktionssystem, untersucht. Dieser Abschnitt erläutert die für ein solches Reaktionssystem geltenden mathematischen Beziehungen, die für die Interpretation der gemessenen Isotopenverhältnisse von Bedeutung sind.

Der Fortschritt einer unidirektionalen Reaktion $S \rightarrow P$ im geschlossenen Reaktionssystem kann zeitunabhängig anhand der Reaktionslaufzahl ausgedrückt werden. Die Reaktionslaufzahl f_R nimmt Werte von Null bis Eins an (Abb. 2.5-a). Die Anfangskonzentration des Substrats $[S]_0$ entspricht der Endkonzentration des Produkts $[P]_\infty$. Für die Substratkonzentration zur Zeit t gilt:

$$[S]_t = [S]_0 - [P]_t = [P]_\infty - [P]_t \quad (2.8)$$

Die Reaktionslaufzahl f_R ergibt sich aus den Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer zur Zeit t :

$$f_R = \frac{[P]_t}{[S]_t + [P]_t} = \frac{[P]_t}{[P]_\infty} \quad (2.9)$$

Der Wert $f_R = 0$ entspricht dem Zustand zu Beginn der Reaktion, wenn das Substrat in seiner Anfangskonzentration vorliegt und sich noch kein Produkt gebildet hat. Bei $f_R = 0,5$ liegen Substrat und Produkt im Verhältnis 1:1 vor. Bei $f_R = 1$ ist S vollständig zu P abreagiert und das Produkt liegt seinerseits in der Anfangskonzentration des Substrats vor.

Wenn die Reaktion mit Isotopendiskriminierung einhergeht, ändert sich das Isotopenverhältnis von Substrat S und Produkt P wie in Abbildung 2.5-b dargestellt. Zu Beginn der Reaktion werden zuerst die leichten Substratmoleküle S' umgesetzt. So reichert sich mit wachsender Reaktionslaufzahl schweres S'' im Substrat an und R_S wächst. Der Wert $R_{S\infty}$ ist unbestimmt, da nach vollständigem Ablauf der Reaktion S' = 0 gilt.

Das Isotopenverhältnis des Produkts kann erst gemessen werden, wenn die Reaktion um einen infinitesimalen Betrag von f_R fortgeschritten ist und sich Produkt gebildet hat. Der Startwert R_{P0} ist gegenüber R_{S0} um den Betrag des Fraktionierungsfaktors α abgereichert und ändert sich nur kaum bis $f_R \approx 0,15$ [O'Leary 1980]. Der Wert $R_{P\infty}$ nach vollständiger Umsetzung entspricht dem des Ausgangsmaterials R_{S0} .

Der Fraktionierungsfaktor kann in erster Näherung bestimmt werden, indem das Isotopenverhältnis des Produkts zuerst bei kleinen f_R -Werten zwischen 0 und 0,15 und dann nach vollständigem Ablauf der Reaktion gemessen wird:

$$\alpha = \frac{R_{P\infty}}{R_{P0}} \quad (2.10)$$

Betrachtet man nur die Produktseite einer Reaktion, so gehorcht die Beziehung zwischen dem Fraktionierungsfaktor α , der Reaktionslaufzahl f_R , dem Isotopenver-

hältnis des Produkts R_t zu einem Zeitpunkt t und nach vollständiger Umsetzung R_∞ der folgenden Gleichung [Tong 1957]:

$$\alpha = \frac{\log [1 - f_R \cdot (\frac{R_\infty + 1}{R_t + 1})]}{\log [1 - f_R \cdot \frac{R_t}{R_\infty} \cdot (\frac{R_\infty + 1}{R_t + 1})]} \quad (2.11)$$

Da die maximal zu erwartende Differenz zwischen R_t und R_∞ in der Größenordnung von 4×10^{-5} liegt und somit sehr klein gegenüber 1 ist, lässt sich die Gleichung vereinfachen [O'Leary 1980]:

$$\alpha = \frac{\log [1 - f_R]}{\log [1 - f_R \cdot \frac{R_t}{R_\infty}]} \quad (2.12)$$

Aus den Geschwindigkeitsgleichungen für die konkurrierenden Isotope lässt sich ein Ausdruck für das Isotopenverhältnis R_t des Produkts in Abhängigkeit von der Reaktionslaufzahl f_R ableiten. Der Fraktionierungsfaktor α sowie das Isotopenverhältnis R_∞ des Produkts nach vollständiger Reaktion gehen als Konstanten in die Gleichung ein [Lüdke 2008].

$$R_t = \frac{1 - \exp(\log(1 - f_R)/\alpha)}{f_R} \cdot R_\infty \quad (2.13)$$

Die Gleichung ist unter den folgenden zwei Annahmen gültig: Erstens ist der Umsatz von ^{13}C gegenüber dem Umsatz von ^{12}C aufgrund ihrer relativen Häufigkeiten sehr klein und wird daher vernachlässigt. Zweitens wird angenommen, dass die Unterschiede der Reaktionslaufzahlen für die Reaktionen der unterschiedlichen Isotope nur innerhalb der praktischen Messschwankungen voneinander abweichen und daher als gleich angenommen werden können. Die ausführliche Herleitung der Gleichung kann im Anhang A.1 eingesehen werden.

2.1.6. Fließgleichgewichte

Anders als in dem abgeschlossenen Reaktionssystem eines *in vitro*-Experiments existieren in biologischen Systemen Fließgleichgewichte. In einem Fließgleichgewicht bildet sich ein Substrat mit der gleichen Geschwindigkeit neu, wie es zum Produkt abreagiert. Gleichzeitig reagiert das Produkt mit derselben Geschwindigkeit weiter, wie es gebildet wird. Anders als im geschlossenen System reagiert ein Substrat im Fließgleichgewicht also nicht vollständig zum Produkt ab, sondern die Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer bleiben konstant.

Es sei explizit darauf hingewiesen, dass *in vitro*-Experimente nur die Messung von Isotopeneffekten im Zusammenhang mit einer bestimmten Reaktion ermöglichen. Die Auswirkung eines solchen Effekts in einem metabolischen Netzwerk hängt jedoch nicht allein von der betrachteten Reaktion ab, sondern auch von der Vorreaktion, der Folgereaktion und von sich verzweigenden Stoffströmen vor und nach der betrachteten Reaktion. Der folgende Abschnitt erläutert daher einige Grundlagen für die Interpretation von Isotopeneffekten in metabolischen Netzwerken, in denen Fließgleichgewichte vorherrschen.

Folgereaktionen

Zunächst soll der Fall einer einfachen Folgereaktion betrachtet werden. Der isotopische Anreicherungsfaktor ϵ , eine Reaktionskonstante, wirkt sich im Fließgleichgewicht direkt auf die Isotopensignatur des Substrats aus, wie das folgende Beispiel erläutert. Abbildung 2.6 behandelt die zweistufige Reaktion von A über B nach C. Die Isotopensignatur von A sei $\delta_A = 0 \text{ ‰}$. Der isotopische Anreicherungsfaktor von $\epsilon_{AB} = 0$ sagt aus, dass in dieser Stufe keine Isotopendiskriminierung stattfindet. Der Teil der Moleküle A, der gerade zu B reagiert, besitzt die Isotopensignatur δ_{AB} . Es soll die Entwicklung des Systems betrachtet werden, wobei zu Anfang ausschließlich ein unerschöpfliches Reservoir A vorliegt und noch keine Folgeprodukte gebildet worden sind. Nach einiger Zeit stellt sich ein Fließgleichgewicht ein.

Betrachtet man die Entwicklung von δ_B mit der Zeit, so fällt auf, dass sich δ_B trotz der nicht-diskriminierenden Reaktion von δ_A entfernt und im Fließgleichgewicht

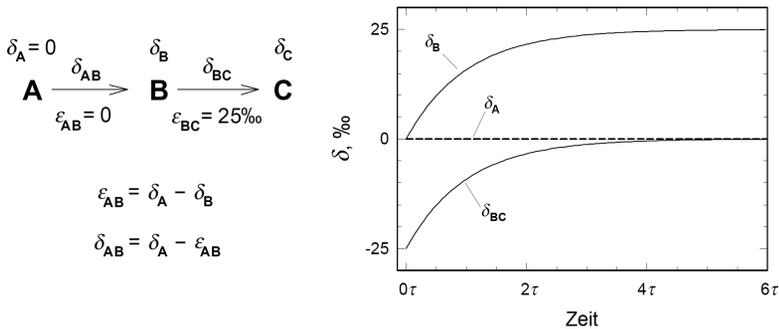


Abbildung 2.6.: Isotopenfraktionierung durch eine Folgereaktion. Für den Anreicherungsfaktor ε_{AB} der Reaktion von A nach B gilt $\varepsilon_{AB} = 0$, was einer Reaktion ohne Isotopeneffekt entspricht. Dennoch können sich im Fließgleichgewicht die Isotopensignaturen von A und B unterscheiden, wenn die Folgereaktion eine Anreicherung von B verursacht; wie hier um $\varepsilon_{BC} = 25\%$. Diagramm aus [Hayes 2001].

bei $\delta_B = 25\%$ stabilisiert. Ursache dafür ist die Diskriminierung der Folgereaktion mit $\varepsilon_{BC} = 25\%$. Der gerade reagierende Teil der Moleküle B besitzt eine Isotopensignatur von $\delta_{BC} = -25\%$, weil er der Diskriminierung durch ε_{BC} unterliegt. Dadurch reichern sich jedoch schwere Moleküle im Substanzpool B an und seine Isotopensignatur δ_B steigt. Gleichzeitig steigt auch δ_{BC} , denn die gerade reagierenden Moleküle stammen aus B. Im Fließgleichgewicht sind die Stoffströme zu und von einem Substanzpool ausgeglichen. Gleiches gilt für die Isotopensignatur dieser Stoffströme. Folglich steigt die Isotopensignatur des Abstroms von B bis sie der des Zustroms, hier 0% , entspricht: $\delta_{BC} = \delta_{AB} = 0$. Erst wenn sich dieses Gleichgewicht eingestellt hat, bleibt δ_B konstant. Im Fließgleichgewicht ist B um den Betrag des Anreicherungs-faktors der Folgereaktion zu C schwerer als A.

Verzweigungspunkte

Die Zwischenprodukte in Biosynthesewegen werden oft durch unterschiedliche Enzyme weiterverarbeitet. Dadurch entsteht ein Verzweigungspunkt im Metabolismus

und es entspringen zwei alternative Stoffwechselwege. Ein Beispiel dafür ist der Mevalonatbiosyntheseweg, der ebenso wie der Fettsäurebiosyntheseweg von Acetyl-CoA ausgeht. Der Mevalonatbiosyntheseweg wiederum bildet als Hauptprodukt Cholesterin, verzweigt aber zuvor zu den nicht-steroiden Produkten.

Die Isotopensignatur einer Substanz an einem Verzweigungspunkt hängt nicht nur von den Anreicherungsfaktoren der Folgereaktionen ab, sondern auch von dem Anteil f_φ des Stoffstroms, der zu dem jeweiligen Metabolit abfließt (nicht zu verwechseln mit der Reaktionslaufzahl f_R). Das Beispiel in Abbildung 2.7 knüpft an die zuvor behandelte Reaktion an. Bei Verbindung C verzweigt sich der Stoffstrom φ_{BC} (Einheit z.B. in Mol/Zeit) in die Ströme φ_{CD} und φ_{CE} . Im Fließgleichgewicht muss der Zustrom zu C gleich der Abströme sein: $\varphi_{BC} = \varphi_{CD} + \varphi_{CE}$. Der Anteil des Abstroms, der Richtung D fließt, ist $f_{CD} = \varphi_{CD}/\varphi_{BC}$, außerdem gilt $f_{CD} + f_{CE} = 1$.

Um die Abhängigkeit der Isotopensignatur δ_C von der Aufteilung des Abstroms, repräsentiert durch f_{CD} , festzustellen, werden die Extremwerte von f_{CD} betrachtet. Wenn $f_{CD} = 0$ ist, fließt der volle Abstrom nach E und δ_C nimmt, wie im vorigen Abschnitt gezeigt, im Fließgleichgewicht den Wert des Anreicherungsfaktor $\varepsilon_{CE} = 35 \text{ ‰}$ an. Analog gilt für die Situation $f_{CD} = 1$, dass der volle Abstrom nach D fließt und δ_C den Wert von ε_{CD} annimmt, nämlich 15 ‰ . Verbindet man beide Punkte, so erhält man zu jedem f_{CD} einen zugehörigen Wert δ_C . Die Gerade durchläuft den Wert 25 ‰ von δ_B . Aus dem Beispiel geht hervor, dass ein Intermediat C an einem Verzweigungspunkt, gegenüber seinem Vorläufer B sowohl an- als auch abgereichert sein kann.

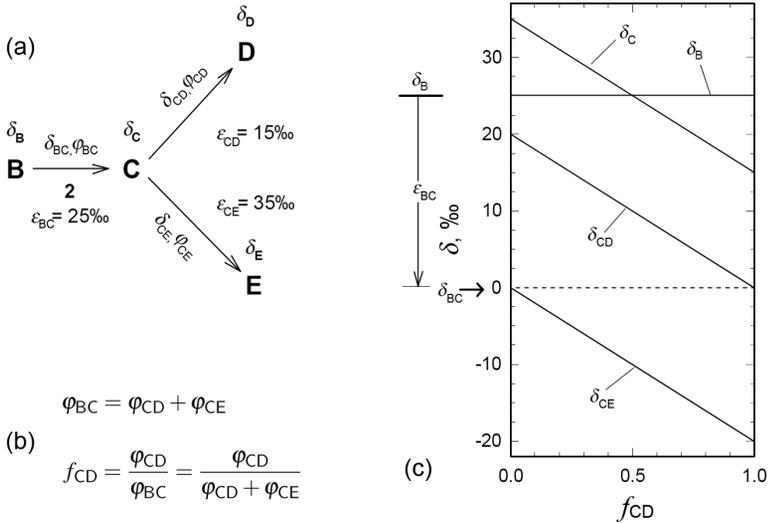


Abbildung 2.7.: Isotopenfraktionierung am Verzweigungspunkt von Stoffwechselwegen. Das Isotopenverhältnis des Intermediats C hängt von der Aufteilung des zufließenden Stoffstroms φ_{BC} auf die abfließenden Stoffströme φ_{CD} und φ_{CE} ab. (a) Der von B kommende Stoffstrom verzweigt sich an C zu D und E. ϵ_{XY} : isotopischer Anreicherungs faktor der Reaktion von X zu Y; δ_X : Isotopenverhältnis der Verbindung X; δ_{XY} : Isotopenverhältnis der aktuell abreagierenden Verbindung X; φ_{XY} : Stoffstrom XY. (b) Bilanzgleichung der Stoffströme und Fraktionierungsfaktor f_{CD} am Verzweigungspunkt. (c) Das Isotopenverhältnis von B ist $\delta_B = 25\text{‰}$. Durch den Anreicherungs faktor $\epsilon_{BC} = 25\text{‰}$ besitzen die aktuell reagierenden Moleküle B ein Isotopenverhältnis von $\delta_B = 0\text{‰}$. Verbindung C kann gegenüber ihrem Vorläufer B sowohl an- als auch abgereichert sein, je nachdem in welchem Verhältnis f_{CD} der Stoffstrom verzweigt, auf den nach C die unterschiedlichen Anreicherungs faktoren ϵ_{CD} und ϵ_{CE} einwirken. Diagramm aus [Hayes 2001].

2.2. Metabolismus

Im Metabolismus spielt der Acetyl-Baustein als Zwischenprodukt eine bedeutende Rolle [Lehninger 1994]. In Form von Acetyl-CoA verbindet er den Katabolismus mit dem Anabolismus, indem er durch den Abbau von Nahrungsstoffen gebildet wird und als Vorstufe für die Biosynthese verschiedener Produkte dient. Zusätzlich fließt er in den energieliefernden Citratzyklus ein.

Abbildung 2.8 zeigt ein Schema des menschlichen Metabolismus. Um die Darstellung übersichtlich zu halten, werden Zirkelschlüsse (z.B. der Wiedereintritt von *de novo* synthetisierten Fettsäuren in die β -Oxidation) und Parallelwege (z.B. neben Acetyl-CoA über Acetoacetyl-CoA) nicht dargestellt.

Die Nahrungsbestandteile werden im Katabolismus abgebaut. Der Weg aus dem Glucose-Abbau führt über Pyruvat, das zu Acetyl-CoA und CO_2 oxidiert wird. Die Reaktion wird von dem Pyruvat Dehydrogenase-Komplex katalysiert. Proteine werden zu Aminosäuren abgebaut, die entweder für die Proteinbiosynthese oder zur Energieerzeugung verwendet werden. Sie können nicht gespeichert werden. Überschüsse fließen als α -Ketosäuren in den Citratzyklus oder die Gluconeogenese ein. Fettsäuren werden in mehreren Zyklen der vierstufigen β -Oxidation abgebaut, wobei jeweils ein Acetyl-CoA Molekül abgespalten wird.

Im Anabolismus bilden sich aus Acetyl-CoA die Lipide. Die Biosynthese von Lipiden unterteilt sich in Mevalonatbiosyntheseweg und Fettsäurebiosynthese. Die Schlüsselenzyme 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA Reduktase (HMGR) und Acetyl-CoA Carboxylase werden beide durch eine Proteinkinase reguliert, die durch ADP oder AMP stimuliert wird [Goldstein 1990]. Mangelt es der Zelle an ATP, das zu ADP oder AMP verbraucht wurde, werden beide Stoffwechselwege gedrosselt und Acetyl-CoA wird im Citratzyklus zur ATP-Synthese verwendet.

In der Fettsäurebiosynthese entstehen die langkettigen Triglyceride, deren Funktionen die Speicherung von Energie, die Polsterung lebenswichtiger Organe und die Wärmeisolation in Form von Fettgewebe sind. Sie werden in Lipoproteinen gespeichert und transportiert. Die Phospholipide sind ein weiteres Produkt dieses

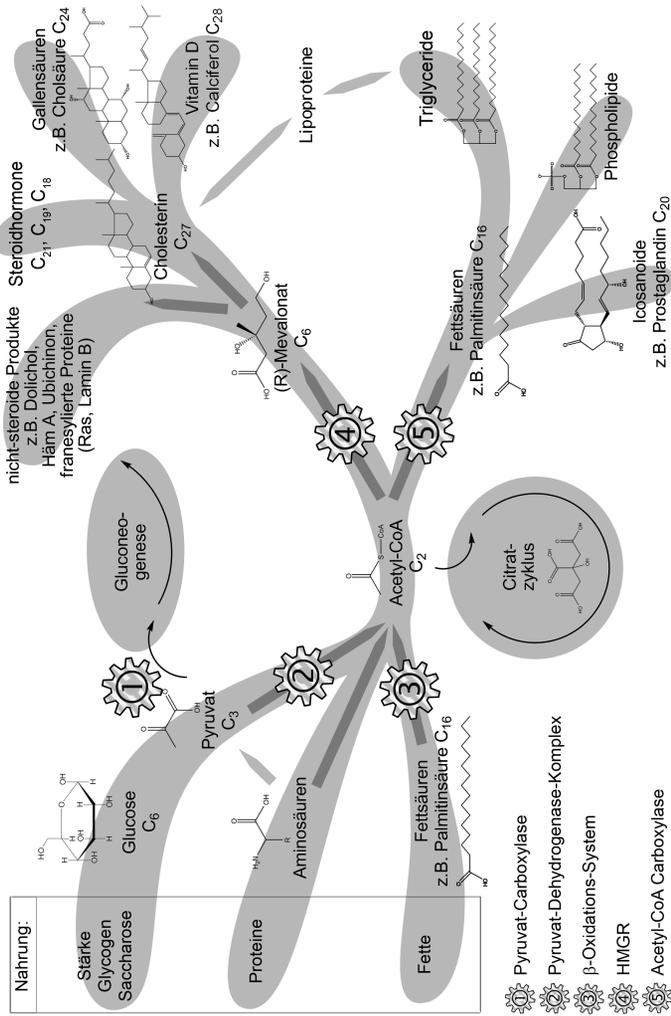


Abbildung 2.8: Übersicht über den humanen Metabolismus. Der Katabolismus konvergiert gegen Acetyl-CoA und divergiert von dort aus zu den Endprodukten des Anabolismus. Um die Darstellung übersichtlich zu halten, wurden Zirkelschlüsse und Parallelwege ausgelassen. HMGR: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A Reduktase.

Stoffwechselwegs. Sie stellen neben Steroiden mengenmäßig etwa die Hälfte der biologischen Membranen dar [Lehninger 1994].

Im Mevalonatbiosyntheseweg entsteht Cholesterin als Hauptprodukt. Dieses wird unter anderem in Lipoproteinen gespeichert und transportiert, in Form von Gallensäure für die Fettverdauung verwendet und ist ein Vorläufer der Steroidhormone. Aus einem weiteren Zweig dieses Stoffwechselwegs gehen nicht-steroidale Produkte hervor, die beispielsweise Elektronen-Carrier (Ubichinon) oder die Seitenketten für lichtabsorbierende Farbstoffe (Häm A) bilden [Goldstein 1990].

2.2.1. Regulation des Mevalonatbiosynthesewegs

Für menschliche Zellen existieren zwei Cholesterinquellen. Zum einen können sie Cholesterin über den Mevalonatbiosyntheseweg *de novo* synthetisieren. Zum anderen gelangt in Lipoproteinen gespeichertes Cholesterin durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle. Die Regulation des Mevalonatbiosynthesewegs muss das Zusammenspiel von Aufnahme und Synthese koordinieren.

Unter den Produkten des Mevalonatbiosynthesewegs gibt es drei bekannte Regulatoren, nämlich die Substanzklasse der Sterine mit Cholesterin, die Gruppe der nicht-steroiden Produkte und schließlich das Zwischenprodukt Mevalonat. Abbildung 2.9 zeigt ein Schema des Stoffwechselwegs mit den Regulatoren und ihren Wirkungszielen.

Die Sterine gelten als Hauptprodukte dieses Stoffwechselwegs. Sie wirken regulierend auf eine Vielzahl von Zielen und spielen daher eine wichtige Rolle. Ein Wirkungsmechanismus ist dabei die aktive Unterdrückung der Transkription der beiden Enzyme HMG-CoA Synthase (HMGS) und HMG-CoA Reduktase (HMGR), sowie des LDL-Rezeptors. Die Gene der drei Wirkungsziele werden von einer Region flankiert, die als Sterin-reguliertes Element SRE-1 bekannt ist. SRE-1 wirkt in Verbindung mit einem Aktivatorprotein (SRE-bindendes Protein, SREBP) als Verstärkersequenz für die Transkription von HMGS und dem LDL-Rezeptor, solange keine Sterine anwesend sind [Ikonen 2008]. Beim HMGR-Gen scheint demgegenüber die Transkription aktiv unterdrückt zu werden, wenn die Anwesenheit von Sterinen auf

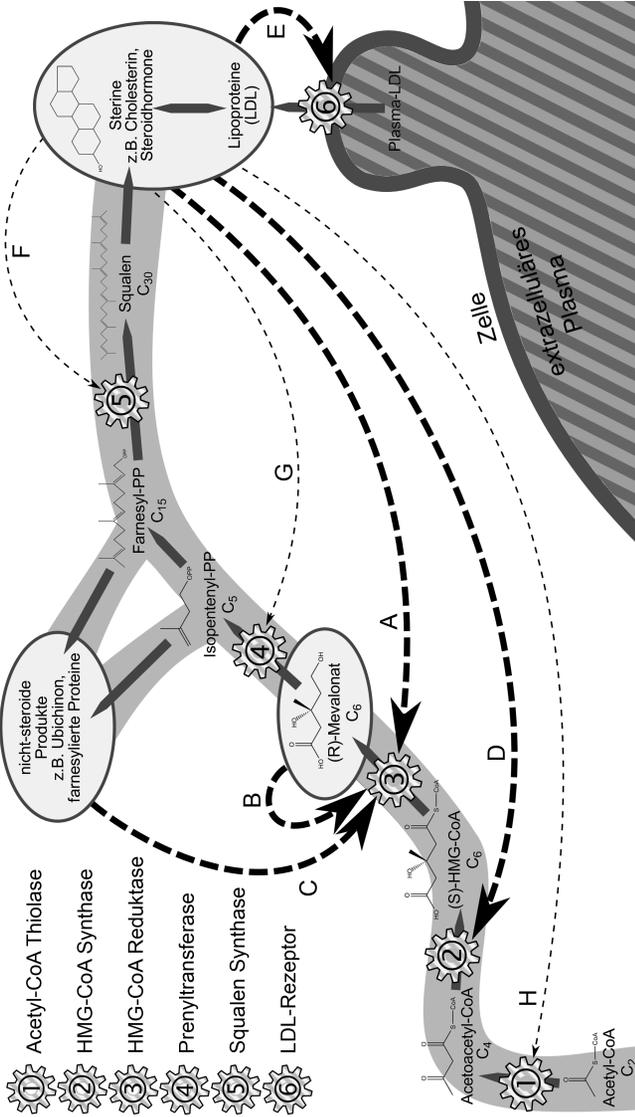


Abbildung 2-9: Regulation des Mevalonatbiosynthesewegs. Das Schlüsselenzym HMG-CoA Reduktase (HMGR) wird von allen drei Regulationsfaktoren beeinflusst: Sterine (A), Mevalonat (B), nicht-steroidale Produkte (C). Intrazelluläre Sterine hemmen außerdem die HMG-CoA Synthase (D) und den LDL-Rezeptor (E). Effekte auf drei weitere Schlüsselenzyme sind bekannt (F-H).

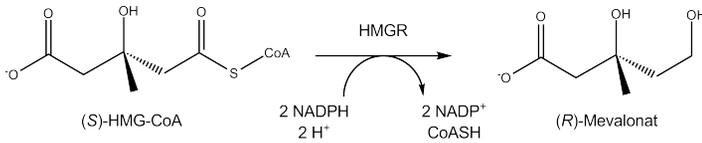


Abbildung 2.10.: Die Reaktion der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A Reduktase (HMGR) entspricht formal einer Hydrolyse der CoA-Thioesterbindung und zweifacher Reduktion zum primären Alkohol.

das SRE-1 wirkt [Goldstein 1990]. Andere Enzyme des Mevalonatbiosynthesewegs unterliegen ebenfalls einer negativen Feedback-Hemmung durch Sterine, darunter Acetoacetyl-CoA Thiolase, Prenyltransferase und Squalen-Synthase.

Im Mevalonatbiosyntheseweg unterscheidet man den steroiden und den nicht-steroiden Stoffwechselweg. Beide verlaufen parallel, bis der steroiden Weg mit der Squalen Synthase beginnt, während der nicht-steroiden Weg zuvor bei Isopentenyl-PP sowie Farnesyl-PP abzweigt (vergleiche Abb. 2.9). Die Enzyme des nicht-steroiden Stoffwechselwegs besitzen generell eine höhere Affinität zu Mevalonat-Derivaten als die Enzyme des Sterin-Stoffwechselwegs [Brown 1980]. Daher wird Mevalonat, wenn es limitiert ist, vorzugsweise im nicht-steroiden Stoffwechsel verarbeitet. Dadurch führt die Drosselung des gesamten Mevalonatbiosynthesewegs zunächst zu einer viel stärkeren Abnahme von Sterinen als zur Abnahme von nicht-steroiden Produkten. Eine weitere Stufe der Drosselung wird durch ein Überangebot dieser nicht-steroiden Produkte erreicht. Farnesylierte Proteine wirken hemmend auf die Mevalonatsynthese, indem sie den Abbau der HMGR fördern [Goldstein 1990]. Schließlich hemmt auch ein Überschuss des direkten Produkts Mevalonat die HMGR-Reaktion.

2.2.2. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A Reduktase

Die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A Reduktase (HMGR) besetzt eine Schlüsselposition im Mevalonatbiosyntheseweg. Sie katalysiert die Reaktion von HMG-CoA zu Mevalonat, die formal einer Hydrolyse der CoA-

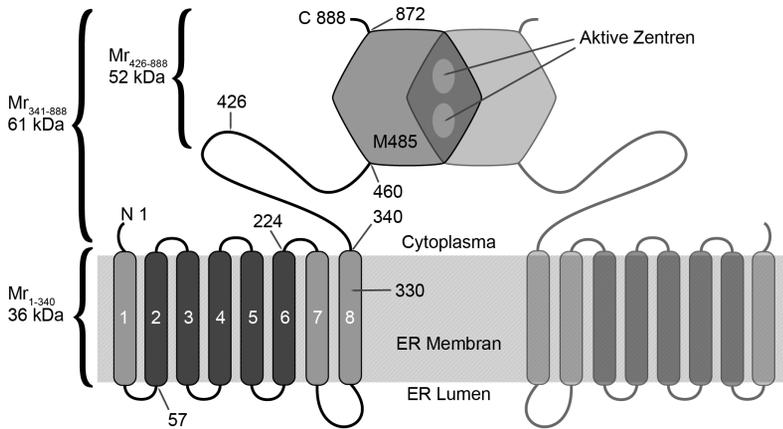


Abbildung 2.11.: Struktur der HMGR. Aminosäuren 57-224: Sterin-sensitive Domäne (SSD) [Brown 1999]. Aminosäure 330: Schnittstelle der Cysteinprotease [Moriyama 1998]. Linkerregion: 340-460, katalytische Region: 461-872 [Istvan 2000]. Molekulargewichte: Transmembranregion 36 kDa, lösliche Region 61 kDa [Moriyama 1998]; Expression von 426-888 liefert ein 52 kDa Fragment [Istvan 2000].

Thiolesterbindung und einer zweifachen Reduktion zum primären Alkohol entspricht (Abb. 2.10).

Unter den bekannten Enzymen gehört HMGR zu denen, die am stärksten reguliert sind [Goldstein 1990]. Die Regulation findet sowohl auf genetischer als auch auf metabolischer Ebene statt und schließt Transkription, Translation, Phosphorylierung, reversible Deaktivierung und Degradation ein.

Struktur

Die humane HMGR ist ein membranständiges Protein des endoplasmatischen Retikulums (ER) mit einem Molekulargewicht von 97 kDa. Sein lipophiler Membrananker ist über eine flexible Linkerregion mit dem hydrophilen katalytischen Teil verbunden, der in das Cytoplasma ragt (Abb. 2.11).

Das Enzym liegt in seiner aktiven Form als Dimer vor. An der Grenzfläche zwischen den beiden Monomeren bildet der Komplex zwei katalytische Zentren aus [Istvan 2000].

Der lipophile Anker durchquert die ER-Membran mit acht Segmenten (engl.: Spans). Span-2 bis Span-6 bilden die Sterin-sensitive Domäne. Diese besitzt etwa 25% Sequenzidentität mit Membranregionen anderer Proteine, die von Cholesterin beeinflusst werden [Brown 1999]. Der Abbau der HMGR wird durch eine membranständige Cysteinprotease eingeleitet, die das Enzym in Span-8 spaltet, wodurch die katalytische Region von der Membran dissoziiert [Moriyama 1998].

Katalyse

Die Struktur des katalytischen Zentrums wurde von Istvan et al. mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt [Istvan 2000]. Die Strukturdaten sind in der *Protein Data Bank*¹ unter 1DQA zu finden. Abbildung 2.12 zeigt die Positionen der an der Reaktion beteiligten Aminosäurereste, sowie die Lage von Mevalonat und NADPH. Zum aktiven Zentrum tragen zwei Monomere (α und β) mit jeweils zwei Aminosäureresten bei.

Die Gesamtreaktion gliedert sich in drei formale Teilreaktionen. In der Mitte des aktiven Zentrums trägt Lysin K691 eine positive Ladung. Diese stabilisiert bei der ersten Hydridübertragung die negative Ladung am Sauerstoffatom von Mevaldyl-CoA, dem ersten Zwischenprodukt. Im zweiten Schritt wird die Thiolesterbindung gespalten. Dabei fungiert Histidin H866 als Protonendonator für das entstehende Thiolanion. Diese Protonierung verhindert eine Rückreaktion, wodurch die Gesamtreaktion an dieser Stelle irreversibel wird [Frimpong 1994]. Eine weitere Hydridübertragung im dritten Schritt geht mit der Protonierung der Hydroxygruppe von Mevalonat einher. Aspartat D767 erhöht den pK_a -Wert des benachbarten Glutamats E559, das dadurch protoniert vorliegt und das Proton für Mevaldehyd liefert. Generell ist D767 wichtig für die Katalyse, weil seine Seitenkette in der Nähe von Aspartat D559 positioniert ist und es auch ionische Wechselwirkungen

¹Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org>

mit K691 einget, wodurch die Lysinseitenkette im aktiven Zentrum stabilisiert wird [Istvan 2000].

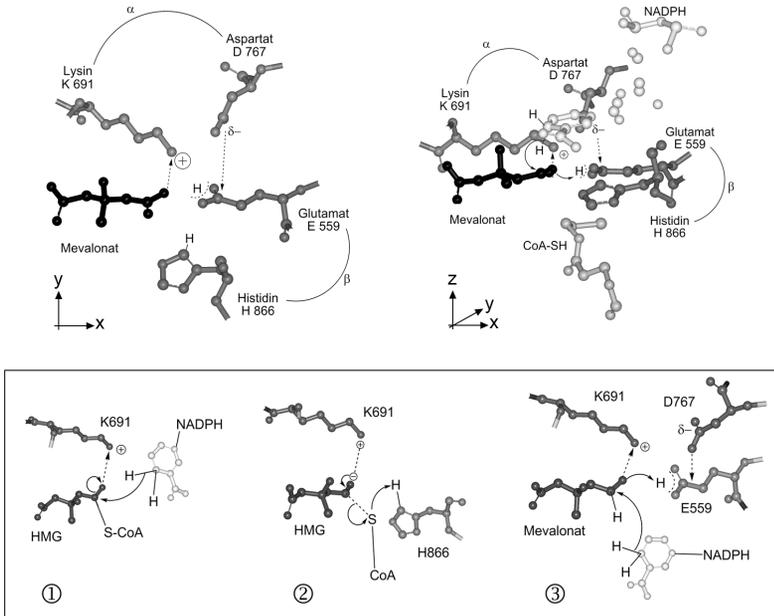


Abbildung 2.12.: Katalytisches Zentrum der HMGR. Oben: Positionen von Mevalonat und NADPH, sowie der Aminosäureseitenketten in der Kristallstruktur 1DQA (*Protein Data Bank*) [Istvan 2000]. Unten: Die drei Teilschritte der Enzymreaktion. (1) Reduktion von 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA zu Mevaldehyl-CoA; (2) Zerfall des Mevaldehyl-CoA zu Mevaldehyd und CoA-SH; (3) Reduktion von Mevaldehyd zu Mevalonat.

Regulation

HMGR gehört zu den am stärksten regulierten Enzymen in der Natur. Wird dieses Enzym in Kulturzellen mit Hilfe eines wirksamen Inhibitors vollständig blockiert, beobachtet man einen 200-fachen Anstieg der HMGR-Konzentration innerhalb weniger Stunden. Der Anstieg beruht auf der Multiplikation von Effekten auf drei verschiedenen Ebenen: Induktion der Transkription des HMGR-Gens, Erhöhung der Translationsrate und Reduzierung der Abbaurrate des Enzyms [Goldstein 1990].

Die Transkription von HMGR wird ähnlich wie die von HMGS und dem LDL-Rezeptor in Abwesenheit von Sterinen verstärkt. Dabei spielt die Sterinkonzentration in der ER-Membran eine Rolle. Über eine Wirkungskaskade, an der verschiedene Proteine beteiligt sind, wird schließlich die Transkription des HMGR-Gens stimuliert [Brown 1999, Feramisco 2004].

Auch die Translation der HMGR wird reguliert. In Kulturzellen entsteht eine Vielzahl von Splicingvarianten der HMGR-mRNA als Antwort auf den Mangel an Produkten des Mevalonatbiosynthesewegs [Reynolds 1985]. Die Funktion der unterschiedlichen HMGR-Varianten ist noch nicht bekannt. Es wird vermutet, dass sich so HMGR-Transkripte bilden, die durch Isopentenyl-tRNA reguliert werden, einem Endprodukt des Mevalonatbiosynthesewegs [Reynolds 1985]. Durch Splicing können auch unterschiedliche Signalsequenzen für den Transport eines Proteins exprimiert werden. Diese Annahme bezüglich HMGR wird dadurch unterstützt, dass eine 90-kDa-Variante des Enzyms gefunden wurde, die nur in Peroxisomen vorkommt [Engfelt 1998].

Mit dem Abbau von HMGR werden Produkte aus dem nicht-steroiden Zweig des Stoffwechselwegs in Verbindung gebracht. Farnesol scheint beispielsweise an der Induzierung einer Fehlfaltung des Enzyms beteiligt zu sein und dadurch seinen Abbau zu fördern [Shearer 2005]. Einer weiteren Theorie nach sind ER-membranständige farnesylierte Cysteinproteasen für den Abbau von HMGR verantwortlich [Moriyama 1998]. Ihr Angriffsziel ist Span-8 der Transmembranregion, eine Stelle, die beim aktiven HMGR-Dimer vor einem proteolytischen Angriff ge-

schützt ist. Schließlich gibt es Hinweise, dass Oxysterine zusammen mit Farnesol den Abbau besonders unterstützen [Gardner 2001].

Die reversible Inaktivierung der HMGR erfolgt durch Phosphorylierung an Serin S872, was die Affinität des Enzyms für NADPH senkt [Istvan 2000]. Die Modifikation wird von der AMP-aktivierten Proteinkinase und von HMG-CoA Phosphorylase katalysiert. Die AMP-aktivierte Proteinkinase phosphoryliert auch die Acetyl-CoA Carboxylase, das erste Enzym der Fettsäurebiosynthese. Die Kinase spielt eine zentrale Rolle im Lipidmetabolismus, indem sie die Schlüsselenzyme der Konkurrenzwege zum ATP-Aufbau im Citratzyklus hemmt. Herrscht in der Zelle ATP-Bedarf, so liegt es vermehrt in Form von AMP und ADP vor, was wiederum zur Aktivierung der Proteinkinase führt. Dadurch werden sowohl Mevalonat-, als auch Fettsäurebiosynthese gehemmt und Acetyl-CoA fließt verstärkt in den Citratzyklus. Im Citratzyklus wird AMP wieder in den ATP-Kreislauf zurückgeführt und die Aktivierung der Kinase unterbleibt.

Statine

Statine sind Inhibitoren der HMGR und wurden im Rahmen dieser Arbeit dazu verwendet, die HMGR-Reaktion zu bestimmten Zeitpunkten gezielt anzuhalten. Als Arzneimittel werden sie zur Behandlung von familiärer Hypercholesterinämie und zur Vorbeugung von koronarer Herzkrankheit und Herzinfarkt eingesetzt. Ihre Anwendung stützt sich auf die kontrovers diskutierte Lipid-Hypothese, die einen Zusammenhang zwischen erhöhten LDL-Cholesterinkonzentrationen und der Bildung von arteriosklerotischen Plaques postuliert [Steinberg 2006, Volk 2007].

Compactin und Mevinolin (später Lovastatin genannt) wurden in der Mitte der 1970er Jahre in der Nährlösung von verschiedenen Pilzkulturen entdeckt. Weitere Statine aus diesen beiden natürlichen Vorläufern sind Simvastatin und Pravastatin. Alle weiteren HMGR Inhibitoren, wie Fluvastatin, Atorvastatin, Rosuvastatin und Cerivastatin, sind totalsynthetische Produkte. Die pharmakologische Wirkung der Statine beruht auf der Blockierung des Mevalonatbiosynthesewegs. In Folge dessen werden die Enzyme dieses Stoffwechselwegs und der LDL-Rezeptor vermehrt

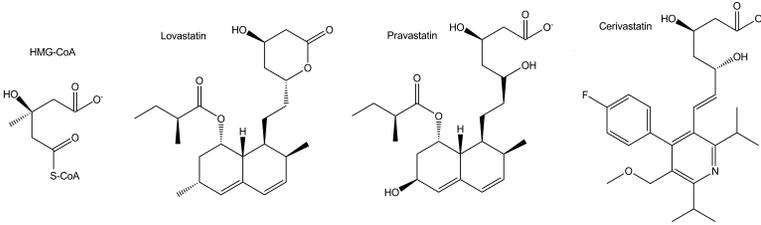


Abbildung 2.13.: Das Substrat HMG-CoA und Inhibitoren der HMGR: Lovastatin, Pravastatin und Cerivastatin. Letzteres ist als Auslöser von Rhabdomyolyse bekannt und wurde 2001 vom Markt genommen [Tobert 2003].

bereitgestellt. HMGR wird weiter durch das Statin blockiert, so dass die *de novo*-Cholesterinsynthese ausbleibt. Über die erhöhte Anzahl an LDL-Rezeptoren wird mehr Plasma-LDL in die Zellen aufgenommen, was den LDL-Spiegel im Plasma senkt.

In HMGR besetzen die Statine die Bindungstasche für den HMG-Rest und teilweise für den CoA-Rest. Dadurch wird der Zugang für HMG-CoA blockiert [Istvan 2001]. In Abbildung 2.13 ist das Substrat HMG-CoA im Vergleich mit einer Auswahl verschiedener Statine dargestellt.

2.2.3. Steroidhormone

Steroidhormone und ihr Vorläufer Cholesterin gehören zu den Sterinen (steroid bedeutet sterinähnlich). In der Dopinganalytik spielen Steroidhormone eine besondere Rolle, da viele von ihnen anabol wirken, also das Muskelwachstum fördern. Ihre Isotopenverhältnisse werden bei einem Dopingverdacht routinemäßig gemessen, um ihre Herkunft zu bestimmen. Die Isotopenfraktionierung der HMGR beeinflusst vermutlich aufgrund der Schlüsselstellung des Enzyms diese Isotopenverhältnisse [Flenker 2008b].

Dieser Abschnitt gibt einen Überblick über die Nomenklatur der Steroide und die Biosynthese eines ausgewählten Steroidhormons. Im Rahmen der Dopinganalytik werden die urinär ausgeschiedenen Steroidhormone zum einen quantifiziert, zum

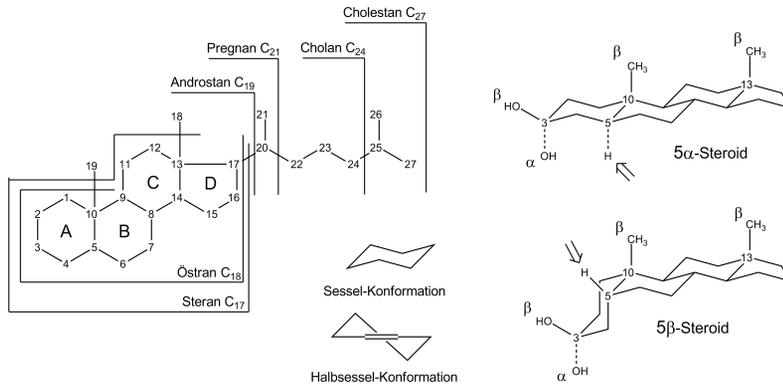


Abbildung 2.14.: Nomenklatur der Steroide. Die aufgeführten Grundformen kommen nicht natürlich vor, sondern tragen stets Substituenten. Die α/β -Nomenklatur richtet sich nach der Methylgruppe an C-10: Reste auf ihrer Seite sind β -ständig, auf der Gegenseite α -ständig. Eine Doppelbindung zwingt den Sechsring in eine Halbsessel-Konformation.

anderen werden ihre Isotopenverhältnisse gemessen. Durch Kombination solcher Daten sind Aussagen bezüglich der Isotopenfraktionierung in verschiedenen Geweben möglich. Diese Aussagen sind die Basis für eine spätere Diskussion der Isotopenfraktionierung durch die HMGR-Reaktion.

Nomenklatur

Durch partielle oder vollständige Abspaltung der Seitenkette und der Substituenten ergeben sich aus dem Cholestan-Gerüst des Cholesterins verschiedene Klassen von Steroiden. Abbildung 2.14 zeigt die Grundformen Cholestan (C_{27}), Cholan (C_{24}), Pregnan (C_{21}), Androstan (C_{19}), Östran (C_{18}) und Steran (C_{17}). Die aufgeführten Grundformen kommen nicht natürlich vor, sondern tragen stets Substituenten.

Alle Klassen besitzen das Steran-Grundgerüst, das formal aus drei kondensierten Sechsringen und einem Fünfring besteht. Die Ringe A und B sind entweder *cis*- oder *trans*-verknüpft, die Ringe B und C sind stets *trans*-ständig, und die Ringe C und D

besitzen in den Steroidhormonen *trans*-Konfiguration, können in anderen Steroiden aber auch *cis*-ständig sein [Beyer 1988]. Die *cis/trans*-Nomenklatur der Substituenten bezieht sich auf die Methylgruppe am Atom C-10. Sämtliche Substituenten, die sich mit ihr auf der „Vorderseite“ des Moleküls befinden, werden als β -ständig, die auf der „Rückseite“ als α -ständig bezeichnet. In natürlichen Sterinen befindet sich an C-3 eine Keto- oder Hydroxygruppe, die ihrerseits α -, oder β -konfiguriert sein kann. Tritt eine Doppelbindung im Ring auf, so nimmt er statt der Sessel- eine Halbsesselkonformation an. Bei Östrogenen ist Ring A aromatisch.

Biosynthese von Progesteron

Steroide werden hauptsächlich in den Gonaden und der Nebennierenrinde aus Cholesterin gebildet. Das Cholesterin stammt zum einen aus der *de novo*-Synthese in der Zelle, zum anderen aus Plasma-LDL, das in die Zelle aufgenommen wird [Goldstein 1990]. In Plasma-LDL kann sowohl Nahrung-Cholesterin transportiert werden, als auch zuvor *de novo*-synthetisiertes, körpereigenes Cholesterin. Zum relativen Beitrag der beiden Cholesterin-Quellen der Steroidhormon-Biosynthese findet man unterschiedliche, teilweise kontroverse, Angaben in der Literatur. Allgemein scheint das Verhältnis stark von der Art und dem Ausmaß der Stimulation, die eine Produktion von Steroiden auslöst, sowie dem jeweiligen Gewebe abzuhängen [Rommerts 2004].

Beispielsweise stammen Progesteron und seine Metabolite in ovulierenden Frauen etwa zu gleichen Teilen aus Plasma-Cholesterin und aus innerhalb des Corpus Luteum *de novo* gebildeten Cholesterin. Demgegenüber werden die Steroidhormone der Nebennierenrinde praktisch ausschließlich aus Plasma-Cholesterin produziert [Bolte 1974]. Die *de novo*-Synthese spielt generell innerhalb der endokrinen Drüsen, zu denen die Nebennierenrinde gehört, häufig nur eine untergeordnete Rolle. Vielmehr greifen diese Drüsenzellen auf Plasma-LDL aus der Leber zurück [Träger 1977].

Für die Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit ist die Messung der Isotopenverhältnisse des Progesterons besonders interessant. Dieses Steroidhormon wird

bei Frauen in großen Mengen von 20 bis 40 mg pro Tag in der zweiten Phase des Menstruationszyklus im Corpus Luteum gebildet [Träger 1977]. Die Einnahme synthetischer Gestagene, die in oralen Kontrazeptiva enthalten sind, unterbinden die Entstehung des Corpus Luteum und damit die Progesteronproduktion in diesem Gewebe.

Folglich entspricht die Isotopie des Progesterons von Frauen, die orale Kontrazeptiva einnehmen, der Isotopie des aus Plasma-Cholesterin gebildeten Progesterons. Bei Frauen, die nicht unter dem Einfluss solcher Präparate stehen, tragen beide Cholesterinquellen zur Bildung von Progesteron bei. Das unter diesen Umständen gemessene Isotopenverhältnis, muss also zum einen auf die Bildungsrate in den unterschiedlichen Geweben, zum anderen auf den jeweiligen Beitrag der unterschiedlichen Quellen zum als Vorläufer verwendeten Gesamt-Cholesterin im Corpus Luteum bezogen werden.

Da Steroidhormone nicht gespeichert werden, kann ihre Ausscheidungsrate als ein Maß für ihre Bildungsrate gelten. Eine Untersuchung der mit Probandinnen, die in zwei aufeinanderfolgenden Menstruationszyklen einmal mit und einmal ohne die Anwendung von oralen Kontrazeptiva Urinproben sammelten, ermittelte die durchschnittlichen Ausscheidungsraten verschiedener Steroidhormone [Mareck-Engelke 1997]. Unter anderem wurde glucuronidiertes Pregnandiol als Metabolit des Progesterons untersucht. Unter Einfluss der Präparate wurden durchschnittlich $15,5 \mu\text{g}$ Pregnandiol pro Stunde ausgeschieden, während ohne die Einnahme $39,0 \mu\text{g}$ pro Stunde nachweisbar waren.

Eine Messung der Isotopenverhältnisse zeigte, dass Progesteron unter dem Einfluss von oralen Kontrazeptiva um $-0,7 \text{‰}$ ^{13}C -abgereichert war [Flenker 2008b]. In Abbildung 2.15 wurden die erläuterten Fakten und Zusammenhänge in einem Schema zusammengefasst.

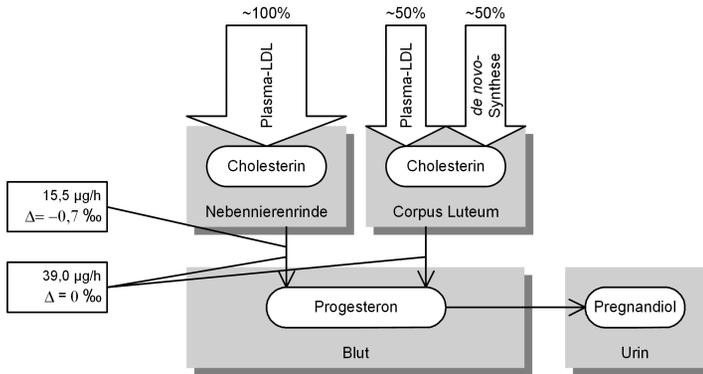


Abbildung 2.15.: Beitrag der beiden unterschiedlichen Cholesterinquellen an den beiden Hauptsyntheseorten von Progesteron: Nebennierenrinde und Corpus Luteum. Die Einnahme von Gestagen-Präparaten zur Kontrazeption unterbindet die Bildung eines Corpus Luteums. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die durchschnittlichen Ausscheidungsraten (Pregnanndiol), die unter Einnahme beziehungsweise ohne die Einnahme von oralen Kontrazeptiva gemessen wurden [Mareck-Engelke 1997]. Ihr Verhältnis kann als Maß für das Verhältnis der Bildungsraten gelten. Steroide, die unter Einfluss von oralen Kontrazeptiva ausgeschieden werden, sind relativ zu ihrem Isotopenverhältnis ohne Kontrazeptiva um $-0,7 \text{‰}$ ^{13}C -angereichert [Flenker 2008b].

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, den isotopischen Anreicherungsfaktor ϵ_{HMGR} für Kohlenstoff in der Enzymreaktion der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A Reduktase (HMGR) zu bestimmen. Einen Überblick über das praktische Vorgehen gibt Abbildung 3.1.

Ausgehend von dem humanen HMGR-Gen in Form von cDNA, wurde das Enzym zunächst bakteriell exprimiert und aufgereinigt. Anschließend wurde die Enzymreaktion *in vitro* durchgeführt. Das Fortschreiten der Reaktion wurde spektrophotometrisch anhand des NADPH-Abbaus verfolgt. Zu unterschiedlichen Zeiten wurden Proben des Produktgemischs genommen und in diesen die Enzymreaktion mit Pravastatin gestoppt. Aus den Spektrophotometerdaten wurde die Reaktionslaufzahl f_R ermittelt. Mevalonat, das Produkt der Enzymreaktion, wurde zu Mevalonolacton (MVL) lactonisiert und als solches mittels Festphasenextraktion weitestgehend isoliert. Das Kohlenstoff-Isotopenverhältnis ^{13}R von MVL wurde mit Hilfe der Gaschromatographie-gekoppelten Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie gemessen (GC-C-IRMS). Um den isotopischen Anreicherungsfaktor ϵ_{HMGR} zu bestimmen, wurde die Beziehung zwischen ^{13}R und f_R ausgewertet.

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der einzelnen Schritte vorgestellt. Eine ausführliche Beschreibung der eingesetzten Methoden befindet sich in Kapitel 5.

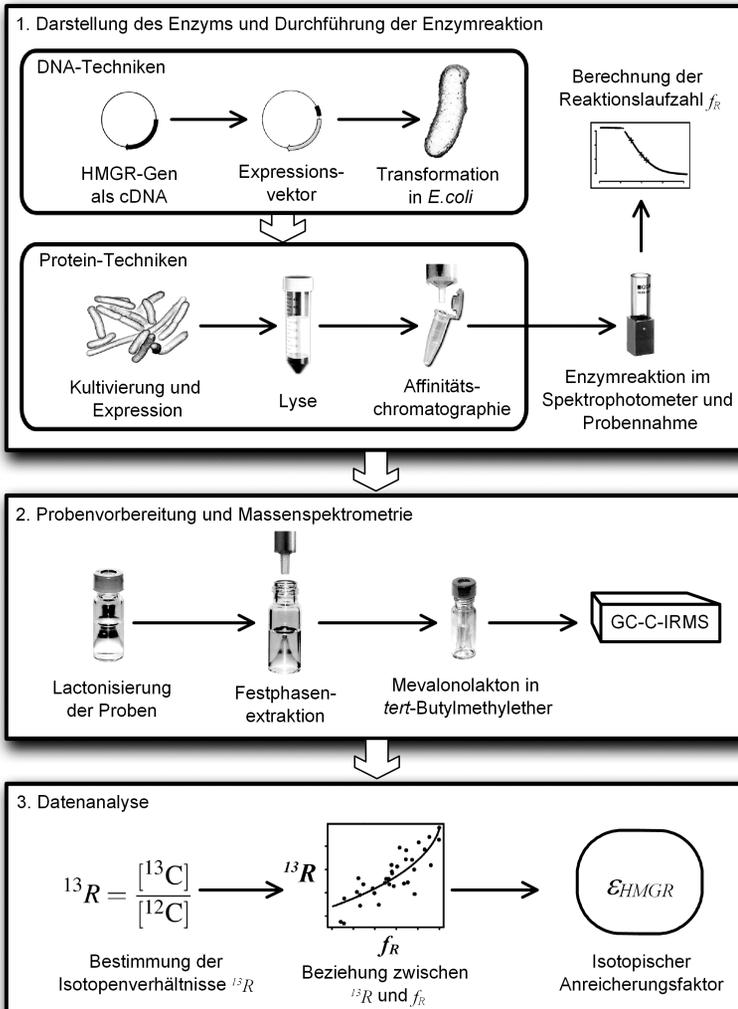


Abbildung 3.1.: Übersicht über das praktische Vorgehen bei der Bestimmung des isotopischen Anreicherungsfaktors ϵ_{HMGR} für die HMGR-Enzymreaktion. *E.coli*: Bakterium *Escherichia coli*; GC-C-IRMS: Gaschromatographie-gekoppelte Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie.

```

BC033692, 426 SSVLVTQEPEIELPREPRPNEECLQLGNAEKGAKFLSDAEIQLVNAKHIPAYKLETLM
1DQA,      5 SSVLVTQEPEIELPREPRPNEECLQLGNAEKGAKFLSDAEIQLVNAKHIPAYKLETLI
          *****

BC033692, 486 ETHERGVSI RRQLLSKKLSEPSLQYLPYRDYNSL-----
1DQA,      65 ETHERGVSI RRQLLSKKLSEPSLQYLPYRDYNSLVMGACCENVIGMPIVGVAGPLC
          *****

BC033692, 522 -----LGGASSRVLADGMTRGPVVRPRACDSA EV
1DQA,      125 LDEKEFQVPMATTEGCLVASTNRGCRAI LGGASSRVLADGMTRGPVVRPRACDSA EV
          *****

```

Abbildung 3.2.: Ausschnitt aus dem Alignment der Aminosäuresequenzen von HMGR_{RZPD} (BC033692¹) und HMGR_{ATCC} (1DQA²). In der oberen Sequenz fehlen 53 Aminosäuren. Das Alignment wurde mit dem online verfügbaren Programm „SIM“ erstellt (<http://www.expasy.ch/tools/sim-prot.html>).

3.1. Darstellung des Enzyms und Durchführung der Enzymreaktion

3.1.1. Expression und Reinigung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Expressionsvektoren verwendet. Nachdem das Expressionsprodukt HMGR_{RZPD} des ersten Vektors p02-RZPD keine Aktivität in der Enzymreaktion zeigte, wurde seine Aminosäuresequenz (BC033692¹) mit der des Enzyms verglichen, dessen Struktur von Istvan et al. aufgeklärt worden war (1DQA²) [Istvan 2000]. Dabei stellte sich heraus, dass in der Mitte des Proteins eine Sequenz von 53 Aminosäuren fehlte (Abb. 3.2). Laut Istvan et al. tragen die Aminosäureseitenketten aus dieser Sequenz zur Bindung von Substrat- und Cosubstrat bei. Das Enzym ist demnach ohne diesen Teil nicht funktionsfähig, was hier experimentell bestätigt wurde.

Expression und Reinigung von p02-RZPD lieferte ein Protein von 45,6 kDa, was der Molekularmasse von HMGR_{RZPD} entsprach, die anhand der Aminosäuresequenz berechnet worden war (Abb. 3.3). Eine weitere Bande bei 37,5 kDa geht auf eine Expression zurück, die von dem internen Startcodon M485 ausgeht. Man findet

¹National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

²Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org>

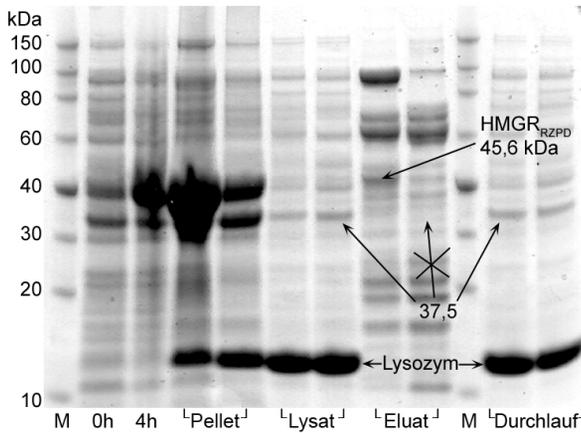


Abbildung 3.3.: SDS-Gel der Aufreinigung des Proteins aus p02-RZPD. M: Marker; 0h, 4h: Zeitpunkt der Probennahme nach Induzierung der Expression; Pellet: unlösliche Bestandteile der Bakterienzellen; Lysat: löslicher Bakterieninhalt; Eluat: von der Affinitätschromatographiesäule zurückgehaltene Proteine mit His-Tag (und Verunreinigungen); Durchlauf: nicht von der Säule zurückgehaltene Proteine.

sie im Lysat und im Durchlauf, aber nicht im Eluat. Das stimmt mit der Annahme überein, dass durch den internen Expressionsstart kein His-Tag am N-Terminus fusioniert wurde. Dadurch besitzt das Protein keine Affinität zur verwendeten Ni-NTA-Säule und wird von dieser also nicht bis zur Elution zurückgehalten.

Bei einem zweiten Versuch, ein aktives Enzym mit vollständiger Sequenz herzustellen, wurde ein weiteres HMGR-Gen, diesmal von dem bei Istvan et al. angegebenen Lieferanten, American Type Culture Collection (ATCC), bezogen. Um die Gene direkt miteinander vergleichen zu können, wurden sie in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit einem identischen Satz aus sense- und antisense-Primern amplifiziert und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 3.4). Dabei zeigte sich der Größenunterschied von 159 Basenpaaren, die für 53 Aminosäuren

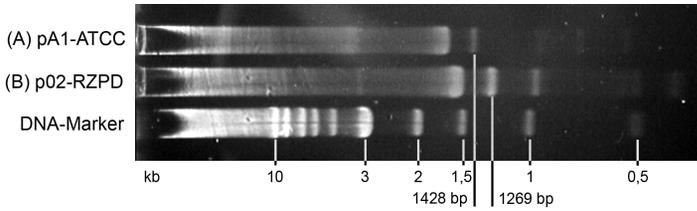


Abbildung 3.4.: Vergleich der PCR-Produkte aus den Vektoren (A) pA1-ATCC und (B) p02-RZPD. Das amplifizierte Fragment aus p02-RZPD ist 159 Basenpaare (bp) kürzer als das aus pA1-ATCC. ($1428\text{bp} - 1269\text{bp} = 159$)

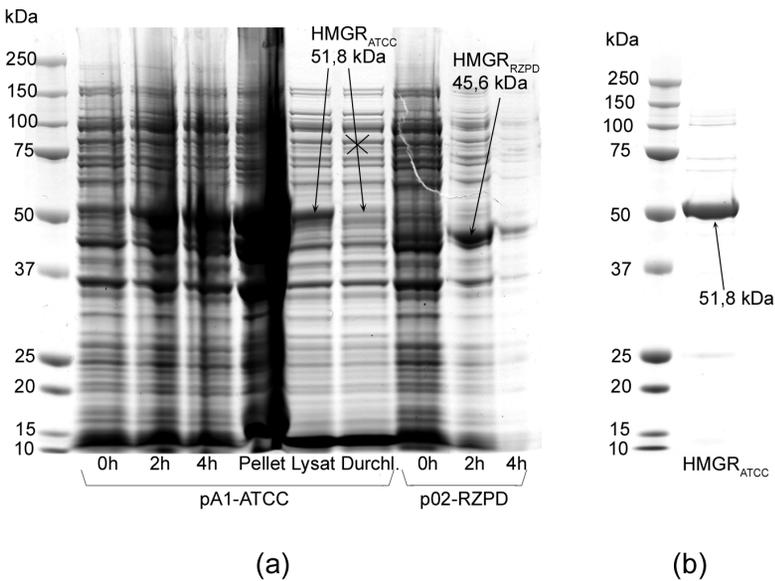


Abbildung 3.5.: SDS-Gele. (a) Expressions- und Reinigungsproben von HMGR_{ATCC} aus dem Vektor pA1-ATCC und HMGR_{RZPD} aus dem Vektor p02-RZPD. (b) Qualitätskontrolle: Stabilisierte Enzymlösung HMGR_{ATCC}. Das Enzym liegt gekühlt und denaturiert hauptsächlich als Monomer von 51,8 kDa vor. 0-4h: Zeitpunkt der Probenahme nach Induzierung der Expression; Pellet: unlösliche Bestandteile der Bakterienzellen; Lysat: löslicher Bakterieninhalt; Durchlauf: nicht von der Säule zurückgehaltene Proteine.

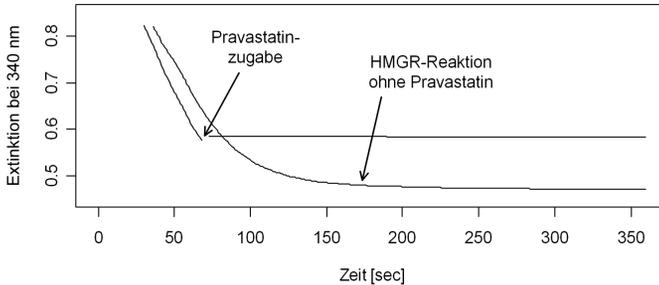


Abbildung 3.6.: Umsatzkurve der HMGR-katalysierten Reaktion: $\text{HMG-CoA} + 2 \text{NADPH} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{Mevalonat} + 2 \text{NAD}^+ + \text{CoA}$. Gemessen wird die Extinktion von NADPH bei 340 nm. Pravastatin blockiert das Enzym und stoppt dadurch die Reaktion.

kodieren. Das theoretische Ergebnis des Alignments wurde dadurch experimentell bestätigt.

Aus dem Expressionsvektor pA1-ATCC mit der vollständigen Sequenz konnte schließlich das aktive Enzym $\text{HMGR}_{\text{ATCC}}$ exprimiert werden (Abb. 3.5-a). Die Konzentration der gereinigten, stabilisierten Enzymlösung wurde mit 22,7 mg/mL bestimmt. In der Enzymlösung ist neben dem Monomer von 51,8 kDa eine weitere schwache Proteinbande bei etwa 100 kDa zu erkennen, die ein Hinweis auf das 103,6 kDa große Dimer sein kann (Abb. 3.5-b). HMGR-Dimere dissoziieren bei Temperaturen unter 4°C [Mayer 1988]. Die Enzymlösung wurde aus einem gekühlten Vorratsgefäß entnommen und anschließend durch den Elektrophoresepuffer denaturiert, was erklären könnte, warum auf dem Gel fast ausschließlich die Bande des Monomers zu erkennen ist.

3.1.2. Aktivität und Pravastatin-Inhibition

Die konzentrierte und stabilisierte Enzymlösung zeigte unter Anwesenheit von NADPH und HMG-CoA katalytische Aktivität. Die Enzymreaktion ($\text{HMG-CoA} +$

2 NADPH + 2 H⁺ → Mevalonat + 2 NAD⁺ + CoA) wurde im Spektrophotometer anhand des NADPH-Abbaus verfolgt.

Um Proben der Reaktion mit verschiedenen Reaktionslaufzahlen zu erhalten, wurde das Enzym mit dem spezifischen Inhibitor Pravastatin blockiert und dadurch die Reaktion gestoppt. Abbildung 3.6 zeigt das Diagramm einer typischen Abbaukurve. Bei Pravastatinzugabe wird die Reaktion vollständig unterbunden, wie die zweite Kurve zeigt.

3.1.3. Probennahme während der Enzymreaktion

Das Ziel der Probennahme war es, die Reaktion zu fixieren, sobald sie um einen vorgegebenen Anteil der Gesamtreaktion fortgeschritten war. Die einzelnen Proben entsprachen damit dem Stadium der Reaktion zu einer bestimmten Reaktionslaufzahl. Später sollte das Isotopenverhältnis des Reaktionsprodukts Mevalonat gemessen und seine Abhängigkeit von der Reaktionslaufzahl festgestellt werden. Die Probennahme ist in Abschnitt 5.4.6 des Methodenteils beschrieben (Seite 98).

Insgesamt wurden 131 Proben hergestellt. Weitere 29 dienten als Testproben für die im Folgenden beschriebenen Aufarbeitungsmethoden. Die Probennahme verteilte sich auf 6 Experimente, in denen jeweils bis zu 14 Enzymreaktionen angesetzt wurden. Aus jeder Enzymreaktion gingen 2 bis 3 Proben hervor. Eine vollständige Liste aller Proben befindet sich im Anhang A.2.

3.2. Kohlenstoff-Isotopenverhältnis von Mevalonat

3.2.1. Lactonisierung

Mevalonat, das Produkt der Enzymreaktion, musste für die Gaschromatographie (GC) in ein Molekül überführt werden, das sich in einem organischen Lösungsmittel löste. Mevalonat ist das Anion der Mevalonsäure, die als Hydroxysäure in Gegenwart von katalytischen Mengen an Mineralsäure eine intramolekulare Lactonisierung durchläuft [Vollhardt 1987]. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt dabei auf

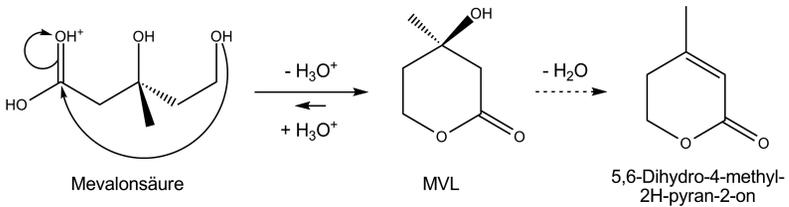


Abbildung 3.7.: Lactonisierung von Mevalonat zu Mevalonolacton (MVL) unter Säurekatalyse. Manche der Gaschromatogramme und Massenspektren von lactonisierten Proben enthielten Hinweise auf das dehydratisierte Lacton (rechts).

der Seite des Mevalonolacton (MVL), das unter anderem in Methanol und *tert*-Butylmethylether (TBME) löslich ist.

Abbildung 3.7 zeigt die Lactonisierungsreaktion zu MVL. Es wurden mehrere Testproben unter den beschriebenen Bedingungen der Probennahme hergestellt und wie in Abschnitt 5.5.1 beschrieben lactonisiert (Seite 101). Das Ergebnis der Lactonisierung wurde mittels GC-MS überprüft. Dazu wurde das Lacton aus der wässrigen Lösung in eine methanolische Lösung überführt. Diese Extraktion wird im folgenden Abschnitt näher erläutert.

Ein Beispiel für das GC-Chromatogramm einer Testprobe zeigt Abbildung 3.8. In einem Zeitfenster von mehr als ein halbe Minute vor dem MVL-Peak und mehr als eine Minute danach wurden keine anderen Substanzen gefunden. Die verwendete GC-Säule wurde auch bei der späteren GC-C-IRMS-Analyse, dort aber unter leicht veränderten chromatographischen Bedingungen, eingesetzt. Je nach Reaktionslaufzahl einer Probe variierte die Intensität des MVL-Peaks, was jedoch später durch die Aufnahme in angepassten Lösungsmittelvolumina ausgeglichen werden konnte.

Ein weiterer mehr oder weniger intensiver Peak wurde massenspektrometrisch als 5,6-Dihydro-4-methyl-2H-pyran-2-on identifiziert. Diese Substanz kann in Folge der Lactonisierung durch Dehydratisierung von MVL entstanden sein. Es wurde beobachtet, dass sie deutlicher in methanolischer Lösung auftrat. Wurden die Proben zügig getrocknet und in TBME überführt, konnte die Substanz nicht mehr gefunden

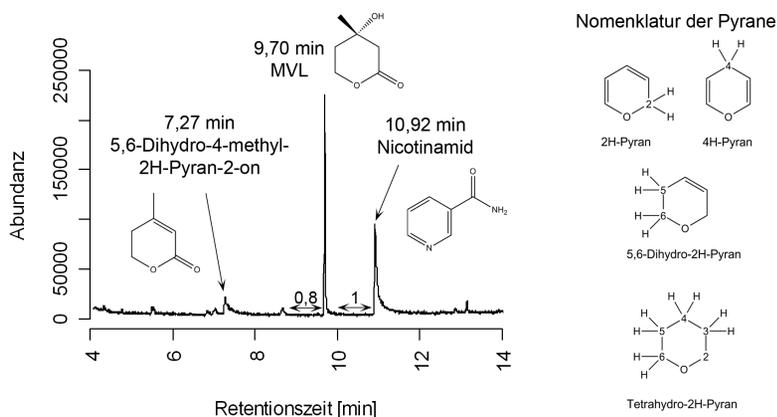


Abbildung 3.8.: Chromatogramm des Gesamtionenstroms einer lactonisierten Probe mit der Reaktionslaufzahl $f_R = 0,84$. Neben Mevalonolacton (MVL) ist ein Peak für den Nicotinamid-Teil von NADPH oder NADP⁺ zu sehen. In manchen Proben konnte 5,6-Dihydro-4-methyl-2H-pyran-2-on identifiziert werden.

werden. In den Chromatogrammen, die im Zuge der IRMS-Analyse aufgezeichnet wurden, trat der Peak in Folge der verbesserten Handhabung der Proben nicht auf.

3.2.2. Festphasenextraktion von Mevalonolacton

Mevalonolacton (MVL) wurde aus der wässrigen Lösung durch Adsorption an einer Festphase entfernt und anschließend mit Methanol von dem Sorbens eluiert. Material und Durchführung werden in Abschnitt 5.5.1 vorgestellt (Seite 101).

Die Durchführung der Festphasenextraktion wurde mit einer wässrigen Testlösung erprobt. Die Testlösung war der Lösung der Enzymreaktion nachempfunden und wurde ebenfalls mit Phosphatpuffer stabilisiert. Jede Testprobe enthielt $32,5 \mu\text{g}$ MVL, also eine um den Faktor 10^4 größere Menge als eine Probe aus der Enzymreaktion. Bei den Testproben zeigte sich, dass das Säulenbett der verwendeten Fertigsäulen in der Lage war, die eingesetzte Menge MVL vollständig zu adsorbieren. Durch Waschen mit $0,1 \text{ M HCl}$ und mit Wasser desorbierte es nicht, wohl aber in

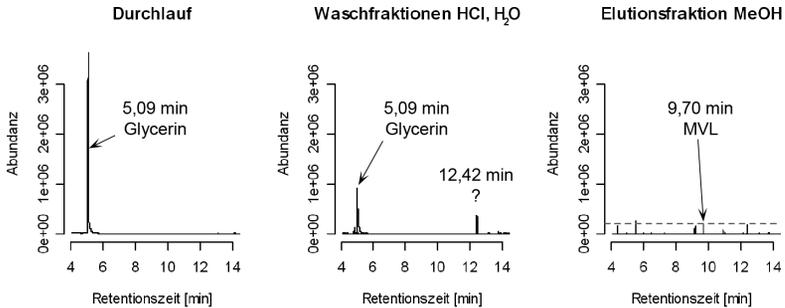


Abbildung 3.9.: Fraktionen der Festphasenextraktion einer Testprobe aus einer Enzymreaktion. Links und Mitte: Die Festphase adsorbiert Glycerin nicht. Mitte: unidentifizierte Verunreinigung aus dem Festphasenmaterial bei 12,42 Minuten. Rechts: die durchbrochene Linie markiert die Intensität des MVL-Peaks.

Folge eines Waschgangs mit 15% Methanol, wie es von Saini et al. durchgeführt worden war [Saini 2006]. Um Verluste zu vermeiden, wurde der Methanol-Waschschritt fortan ausgelassen. Die Analyten wurden mit einem Methanol-Volumen von 500 μL , das dem einfachen Fassungsvermögen des Sorbens entsprach, vollständig eluiert.

Kontaminationen aus dem Festphasenmaterial wurden ebenfalls mit der reinen MVL-Lösung untersucht. Unter den gewählten Bedingungen wurden mehrere kleine Peaks zwischen 4,5 und 9 Minuten, sowie ein größerer bei 12,42 Minuten und zwei weitere bei 13,15 und 13,74 Minuten aufgezeichnet. Die Chromatographie der Verunreinigungen wurden später bei der Plazierung der Referenzgaspeaks für die IRMS-Analyse berücksichtigt.

Ein deutlicher Glycerin-Peak wurde in Testproben aus einer Enzymreaktion beobachtet. Glycerin stammt aus der stabilisierten Enzymlösung. Wie die Serie der Chromatogramme in Abbildung 3.9 zeigt, verlässt Glycerin bereits mit dem Durchlauf und spätestens mit den beiden Waschgängen das Sorbens.

In den Testproben aus der Enzymreaktion wurde außerdem Nicotinamid gefunden (Abb. 3.8). Diese Substanz leitet sich von dem Cosubstrat NADPH oder dem

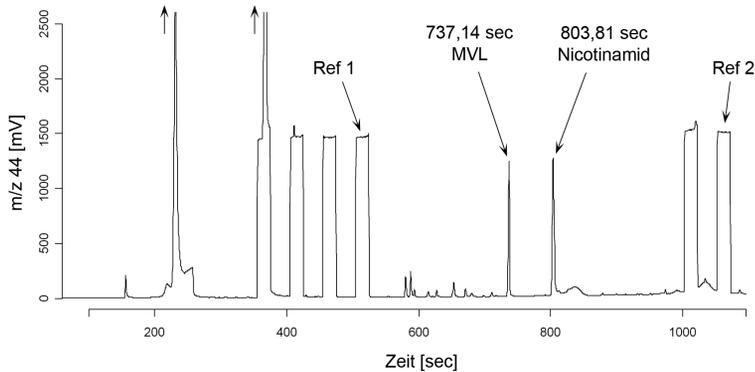


Abbildung 3.10.: Chromatogramm aus der IRMS-Analyse. Für diese Probe wurde eine Reaktionslaufzahl von $f_R = 0,125$ berechnet. Ref 1 und 2: für die Kalibrierung der Messung verwendete Referenzgaspeaks.

Coprodukt NADP^+ ab. Die Extraktionsmethode eignet sich also gegebenenfalls auch für die Isolierung beider oder einer dieser Cofaktoren.

3.2.3. Messung der Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse

Die Proben wurden für die GC-C-IRMS in individuell bestimmten Lösungsmittelvolumina aufgenommen, um vergleichbare MVL-Konzentrationen zu erhalten. Abbildung 3.10 zeigt das Chromatogramm einer typischen Probe, für die eine Reaktionslaufzahl von $f_R = 0,125$ berechnet wurde. Proben mit kleinerer Reaktionslaufzahl enthielten verhältnismäßig weniger MVL. Dadurch fielen die Kontaminationen stärker ins Gewicht, als bei Proben mit hoher Reaktionslaufzahl. Das abgebildete Chromatogramm ist demnach eines der stärker verunreinigten und zeigt dennoch einen sauberen MVL-Peak. Die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Messwerte wurden anhand jeweils eines unkontaminierten Referenzgaspeaks vor und nach dem MVL-Peak berechnet.

Von den 131 IRMS-Messungen der in Enzymreaktionen hergestellten Proben konnten 127 ausgewertet werden. Vier Proben waren entweder stark verunreinigt

oder sie enthielten zu wenig MVL für eine zuverlässige Messung. Eine vollständige Liste der gemessenen Isotopenverhältnisse befindet sich im Anhang A.2.

3.3. Isotopischer Anreicherungsfaktor der Enzymreaktion

Der Fraktionierungsfaktor der Enzymreaktion *in vitro*, also in einem geschlossenen Reaktionssystem, wurde in dieser Arbeit nach der sogenannten kompetitiven Methode bestimmt [Cleland 1982]. Diese beruht auf der Messung des Isotopenverhältnisses R_f von Produktproben und der zugehörigen Reaktionslaufzahl f_R . Außerdem muss ein Wert für das Isotopenverhältnis R_∞ des Produkts nach vollständiger Umsetzung bestimmt werden. Letzteres entspricht dem Isotopenverhältnis des Anfangsmaterials und ist daher konstant.

Im Bereich zwischen den Reaktionslaufzahlen 0,1 bis 1 wurden in verschiedenen Experimenten repräsentative Stichproben aus dem Reaktionsgemisch genommen und die Werte R_f und f_R bestimmt. Durch Kombination der Einzelmessungen konnte der Fraktionierungsfaktor α geschätzt werden. Der isotopische Anreicherungsfaktor ε ergibt sich dann aus dem Fraktionierungsfaktor α nach der Beziehung: $\varepsilon[\text{‰}] = (\alpha - 1) \times 1000$.

3.3.1. Betrachtung des Datensatzes

Der 127 Elemente starke Datensatz, in den sechs Einzelerperimente eingingen, wurde auf systematische Fehler untersucht. Beim Vergleich der sechs Experimente untereinander wurde ein Trend gefunden, der offenbar von der chronologischen Reihenfolge der Experimente abhing. Im Schnitt wurden von Experiment zu Experiment größere Werte für das Isotopenverhältnis der Proben gemessen. Der Trend war unabhängig von der Verteilung der Reaktionslaufzahlen innerhalb eines Experiments, wie die beiden Boxplots in Abbildung 3.11 zeigen. Eine Häufung von hohen Reaktionszahlen in einem Experiment hätte die Verschiebung zu schwereren Messwerten erklärt. Tatsächlich schwankten aber die Mediane der Reaktionslaufzahlen

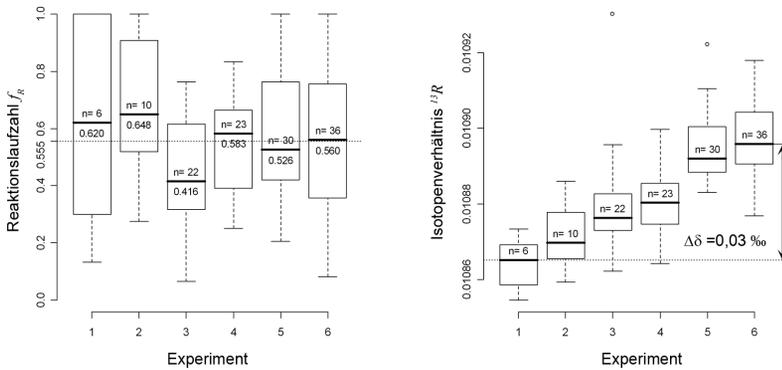


Abbildung 3.11.: Vergleich der sechs Experimente. Obwohl die Mediane der Reaktionslaufzahlen unregelmäßig um 0,555 schwanken (links), driften die gemessenen Isotopenverhältnisse in der chronologischen Reihe der Experimente um insgesamt 0,03 ‰ zu schwereren Werten (rechts).

ungleichmäßig um 0,555, während sich die Isotopenverhältnisse gleichförmig in eine Richtung veränderten.

Zwischen dem ersten und dem letzten Experiment lag ein Zeitraum von 81 Tagen, in dem eine Änderung der gemessenen Isotopenverhältnisse um $\Delta\delta = +0,03\text{‰}$ beobachtet wurde. Die möglichen Ursachen dieser Verschiebung werden später in Abschnitt 4.2.2 diskutiert (Seite 63).

Innerhalb eines Experiments wurden die Proben in randomisierter Reihenfolge gemessen, so dass der Trend nur die Lage der Punktwolke bezüglich der Ordinate sowie die Streuung der Messpunkte beeinflusste. Die absolute Beziehung zwischen den Isotopenverhältnissen und der Reaktionslaufzahl blieb durch die Randomisierung von diesem Trend unbeeinflusst. Um jedoch alle Experimente gemeinsam betrachten zu können, hätte die Streuung der Punkte eine Zufallsverteilung aufweisen müssen. Die beobachtete Abweichung war jedoch gerichtet, wodurch die Kombination und gemeinsame Auswertung aller Punkte aus verschiedenen Experimenten nicht gerechtfertigt werden konnte. Daher wurde anhand verschiedener Kriterien das beste Experiment identifiziert und als Grundlage für weitere Berechnungen verwendet.

Die Auswahlkriterien gründeten zum einen auf Bewertung der praktischen Durchführung, zum anderen auf der Bewertung der statistischen Qualität der Daten aus den einzelnen Experimenten und werden im Folgenden erläutert.

Die praktische Durchführung der Experimente veränderte sich mit jedem Experiment leicht, was mit der zunehmenden Erfahrung des Experimentators zusammenhing. So verringerte sich beispielsweise der Zeitabstand zwischen der Aufarbeitung zweier Proben, wodurch alle Proben ähnlicheren Bedingungen ausgesetzt waren. Zudem nahm die Gleichförmigkeit der praktischen Tätigkeiten zu, zum Beispiel die Reihenfolge der durchgeführten Schritte bei der Probennahme oder der Festphasenextraktion. Auch dadurch wurden die Proben von späteren Experimenten homogener hinsichtlich der äußeren Einflüsse, die möglicherweise in das Ergebnis eingingen. Aufgrund dieser Betrachtungen wurde Exp-6 als das beste Experiment erachtet, da es als letztes durchgeführt worden war und dadurch alle praktischen Belange am weitesten ausgereift waren.

Die statistischen Erwägungen betrafen den Umfang und die Verteilung der Stichprobe, sowie den Informationsgehalt der Punktgruppe bezüglich ihrer Beschreibung durch ein bekanntes Modell. Die Berücksichtigung des Umfangs der Stichprobe spricht für Exp-6 mit den meisten Datenpunkten. Ebenso weist Exp-6 die breiteste und gleichmäßigste Verteilung der Reaktionslaufzahlen zwischen $f_R = 0$ und $f_R = 1$ auf. So sind in Exp-4 zum Beispiel nur Reaktionslaufzahlen zwischen 0.2 und 0.8 gemessen worden, Exp-5 enthält unverhältnismäßig viele Messungen bei $f_R = 1$, während in Exp-3 keine Messung über $f_R = 0.8$ existiert. Die Verteilung der Stichprobe spricht also ebenfalls für die Verwendung von Exp-6.

Für die Beziehung zwischen dem Isotopenverhältnis und der Reaktionslaufzahl in einem geschlossenen System wurde im Rahmen dieser Arbeit die folgende Gleichung entwickelt. Ihre Herleitung ist in Anhang A.1 dargestellt.

$$R_f = \frac{1 - \exp(\log(1 - f_R)/\alpha)}{f_R} \cdot R_\infty \quad (2.13)$$

Dabei ist R_f das Isotopenverhältnis des Reaktionsprodukts, f_R die Reaktionslaufzahl,

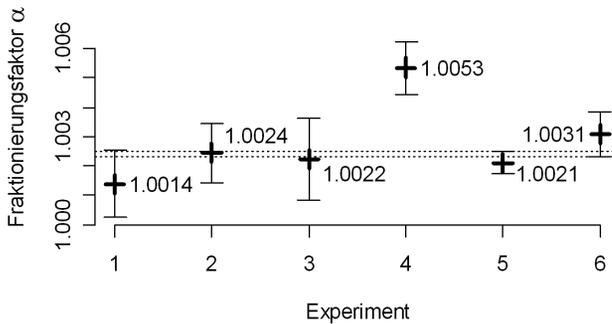


Abbildung 3.12.: Vergleich der Fraktionierungsfaktoren der sechs Experimente. Außer Experiment 4 liefern alle Experimente innerhalb des 95%-Konfidenzintervalls übereinstimmende Werte für den Fraktionierungsfaktor α . Der Bereich der Übereinstimmung liegt zwischen den durchbrochenen Linien.

R_∞ das Isotopenverhältnis nach vollständiger Umsetzung und α der isotopische Fraktionierungsfaktor.

Mit Hilfe dieser Gleichung wurde ein drittes Entscheidungskriterium gebildet. Es bezog sich auf die Qualität, mit der ein Experiment die theoretische Beziehung zwischen dem Isotopenverhältnis und der Reaktionslaufzahl wiedergab. Dieses Vorgehen setzte voraus, dass das Experiment, welches der theoretischen Beziehung am besten entsprach, die geringsten Störeinflüsse zeigte und daher die wahrscheinlichsten Parameter lieferte.

An die Datenpunkte jedes Experiments wurde, wie in Abschnitt 5.6.2 beschrieben, eine Kurve angepasst (Seite 108). Ein gemeinsames Diagramm dieser Kurven zeigt Abbildung 3.13. Alle Experimente, außer Exp-4, lieferten innerhalb der Fehlergrenzen übereinstimmende Werte für den Fraktionierungsfaktor, wie Abbildung 3.12 zeigt. Die starke Abweichung von Exp-4 ließ sich nicht einfach erklären und wird später diskutiert (Abschnitt 4.2.1, Seite 61).

Für die angepassten Kurven wurde das Akaike Information Criterion (AIC) berechnet. Die Werte sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Dabei zeigte sich, dass die

Punktgruppe von Exp-6 am besten durch die vorausgesetzte Beziehung beschrieben wurde, da sich für diese Anpassung das niedrigste AIC ergab.

Aufgrund der verwendeten Auswahlkriterien wurde für die folgenden Berechnungen Experiment Exp-6 gewählt.

Experiment	AIC
Exp-1	-128
Exp-2	-215
Exp-3	-408
Exp-4	-512
Exp-5	-601
Exp-6	-721

Tabelle 3.1.: Akaike Information Criterion (AIC). Das AIC wurde hier für die Anpassung des selben Modells an unterschiedliche Punktgruppen berechnet. Für die Interpretation gilt: „je kleiner desto besser“ [Pinheiro 2000].

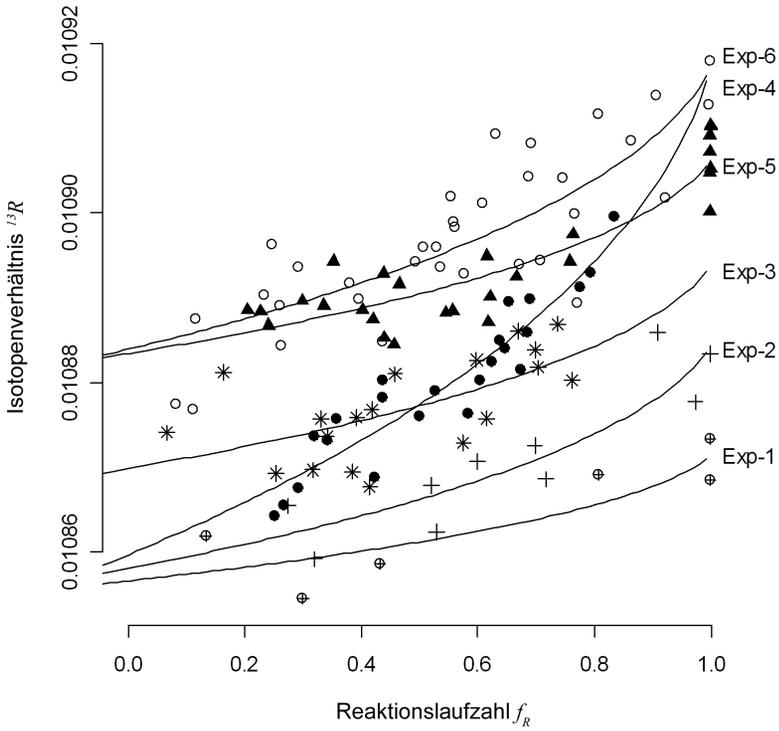


Abbildung 3.13.: Kurvenanpassung an die Punktwolken der sechs Experimente Exp-1 bis 6. Die Experimente zeigen einen systematischen Trend zu größeren Isotopenverhältnissen.

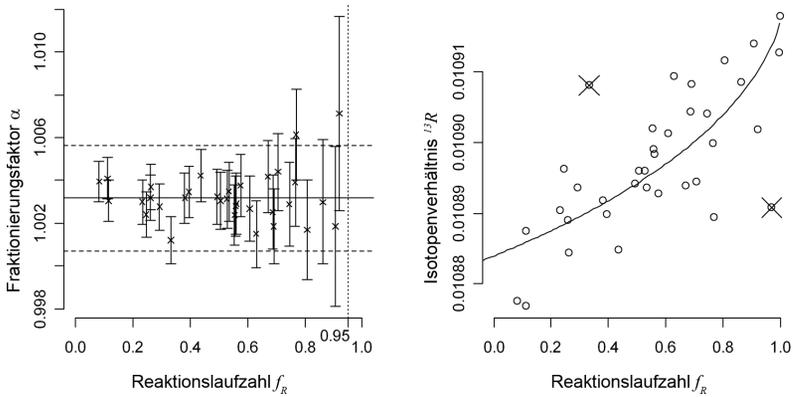


Abbildung 3.14: Berechnung des isotopischen Fraktionierungsfaktors α mit Hilfe der Mittelwert-Methode (links) und der Kurvenanpassung mit Ausreisseranalyse (rechts).

3.3.2. Isotopischer Fraktionierungsfaktor und Anreicherungsfaktor

Der isotopische Fraktionierungsfaktor wurde nach zwei verschiedenen Methoden, wie in Abschnitt 5.6.2 beschrieben, bestimmt (Seite 108). Als Datenbasis dienen die 36 Messungen aus Experiment Exp-6. Bei der Mittelwert-Methode wurden die Datenpunkte entfernt, deren Reaktionslaufzahlen zwischen 0,95 und 1 lagen. Dadurch reduzierte sich der Datensatz auf 33 Elemente. Im Zuge der Ausreisseranalyse bei der Methode mit Kurvenanpassung wurden 2 Datenpunkte ausgeschlossen, 34 gingen in die Berechnung ein. Abbildung 3.14 zeigt links das Diagramm für die Mittelwert-Methode, rechts für die Kurvenanpassung. Die Werte für den nach den beiden Methoden berechneten Fraktionierungsfaktor sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Der isotopische Anreicherungsfaktor ε wurde schließlich aus dem isotopischen Fraktionierungsfaktor α berechnet, der mittels Kurvenanpassung bestimmt worden

	Mittelwert-Methode	Kurvenanpassung
α	1,0032	1,0031
Std.fehler	$\pm 3 \times 10^{-4}$	$\pm 4 \times 10^{-4}$
95%-Konf	$\pm 2 \times 10^{-3}$	$\pm 8 \times 10^{-4}$

Tabelle 3.2.: Ergebniswerte und Fehlerintervalle für den isotopischen Fraktionierungsfaktor α . (Std.fehler: Standardfehler; Konf: Konfidenzintervall).

war; $\varepsilon = (\alpha - 1) \times 1000$. Die Favorisierung dieser Methode wird in der Diskussion in Abschnitt 4.2.3 begründet (Seite 65).

Da das MVL-Molekül vollständig zu CO_2 umgewandelt worden war, konnte nur der Mittelwert der Abreicherung aller im Molekül enthaltenen Kohlenstoffatome bestimmt werden. Der Gesamtwert für die Abreicherung in der HMGR-Reaktion wurde durch Multiplikation des Mittelwerts (3,1 ‰) mit der Anzahl (6) der Kohlenstoffatome im MVL-Molekül berechnet. Tabelle 3.3 enthält die Ergebnisse.

	ε [‰]	Std.fehler	95%-Konf
Mittelwert	3,1	$\pm 0,4$	$\pm 0,8$
Gesamtwert	18,6	$\pm 2,4$	$\pm 4,8$

Tabelle 3.3.: Ergebniswert und Fehlerintervalle für den isotopischen Anreicherungsfaktor ε der HMGR-Reaktion. Mittelwert: ε verteilt auf alle sechs Kohlenstoffatome im analysierten Molekül. Gesamtwert: Summe der Mittelwerte für alle sechs Kohlenstoffatome im analysierten Molekül. Der Wert ε wurde durch Kurvenanpassung mit der Datenbasis Exp-6 (n=34) bestimmt. (Std.fehler: Standardfehler; Konf: Konfidenzintervall)

3.3.3. Auswirkung des Anreicherungsfaktors auf die Steroidhormone

Bei der IRMS-Analyse wurde das gesamte MVL-Molekül zu CO₂ verbrannt und das Isotopenverhältnis ¹³C/¹²C des Gases gemessen. Der berechnete isotopische Anreicherungsfaktor ϵ musste daher als Mittelwert betrachtet werden, der sich auf alle Kohlenstoffatome im MVL-Molekül bezog.

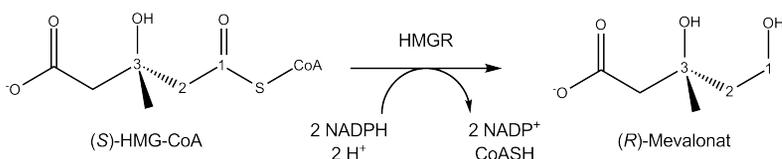


Abbildung 3.15.: Enzymreaktion der HMGR. Die Nummerierung der C-Atome in Substrat und Produkt bezieht sich auf die Nachbarschaft zur Thioesterbindung, die im Verlauf der Reaktion gespalten wird.

Abbildung 3.15 zeigt die Reaktion der HMGR. Das im Substrat an Coenzym A gebundene Kohlenstoffatom wird als C-1 bezeichnet, die benachbarten als C-2 und C-3. Bei der Spaltung der Bindung zu Coenzym A ist ein primärer Isotopeneffekt an C-1 zu erwarten. C-2 und C-3 können von α -, beziehungsweise β -sekundären Isotopeneffekten betroffen sein. Um die Größenordnung des im Mevalonatbiosyntheseweg weitergegebenen Isotopeneffekts einschätzen zu können, wurden zwei extreme Verteilungen des Gesamteffekts auf die Kohlenstoffatome C-1 bis C-3 betrachtet.

Im ersten Fall wurde angenommen, dass ausschließlich ein primärer Isotopeneffekt an C-1 auftrat. Durch Multiplikation des isotopischen Anreicherungsfaktors für das ganze MVL-Molekül mit der Anzahl der Kohlenstoffatome im Molekül, ergab sich der maximal an C-1 erwartete Isotopeneffekt.

Im zweiten Fall wurde angenommen, dass neben dem primären Isotopeneffekt an

C-1 auch noch ein α -sekundärer Isotopeneffekt an C-2 und ein β -sekundärer Effekt an C-3 das gemessene Isotopenverhältnis beeinflussten. Allen drei Effekten wurde der gleiche Wert unterstellt, was als grobe Vereinfachung zu verstehen ist, jedoch die Bestimmung eines maximalen Grenzwerts für die zu erwartende ^{13}C -Abreicherung an C-3 ermöglicht.

Anhand dieser beiden extremen Verteilungen konnte die Übertragung der von HMGR bewirkten Isotopendiskriminierung auf Cholesterin und weiter auf die Steroidhormone bestimmt werden. In Tabelle 3.4 sind die maximal zu erwartenden Isotopeneffekte aufgeführt. Abbildung 3.16 zeigt, an welchen Positionen die Kohlenstoffatome C-1 bis C-3 der Mevalonatmoleküle in Steroiden zu finden sind.

Isotopeneffekt betrifft	Δ [‰]	Std.fehler	95%-Konf
Mevalonolacton (MVL)	3,1 ^(a)	$\pm 0,4$	$\pm 0,8$
C-1 in MVL	18,6 ^(b)	$\pm 2,4$	$\pm 4,8$
C-1, C-2, C-3 in MVL	6,2 ^(c)	$\pm 1,2$	$\pm 2,4$
Cholesterin C ₂₇	4,1 ^(b,c)	$\pm 0,5$	$\pm 1,1$
Pregnan C ₂₁	4,4 ^(b,c)	$\pm 0,6$	$\pm 1,1$
Androstan C ₁₉	4,6 ^(c) / 4,9 ^(b)	$\pm 0,6$ / 0,6	$\pm 1,2$ / 1,3

Tabelle 3.4.: Maximal zu erwartende Isotopendiskriminierung der HMGR-Reaktion relativ zum Substrat HMG-CoA und ihre Fortpflanzung im Mevalonatbiosyntheseweg. (a) Die Diskriminierung wurde durch Messung von Mevalonolacton (MVL) bestimmt und entspricht dem isotopischen Anreicherungsfaktor ϵ als Mittelwert für alle Kohlenstoffatome. (b) Annahme: ausschließlich primärer Isotopeneffekt an C-1. (c) Annahme: drei gleichstarke Isotopeneffekte an C-1 bis C-3. (Std.fehler: Standardfehler; Konf: Konfidenzintervall)

Der Mevalonatbiosyntheseweg kombiniert insgesamt sechs Mevalonatmoleküle mit der betrachteten Atomgruppe C-1 bis C-3 zu Cholesterin. Eine IRMS-Analyse des Cholesterinmoleküls würde demnach eine Abreicherung von $18,6 \times 6/27 = 4,1$ ‰ für den C₂₇-Körper von Cholesterin ergeben, die auf die HMGR-Reaktion zurückzuführen ist. Pregnane enthalten fünf Mevalonatmoleküle mit C-1 bis C-3

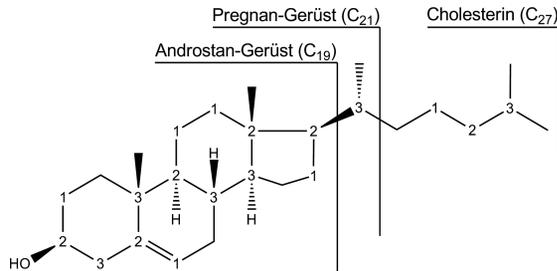


Abbildung 3.16.: Positionen der Kohlenstoffatome C–1 bis C–3 aus dem Mevalonat-Molekül im Cholesteringerüst. Cholesterin enthält sechsmal die Gruppen der Atome C–1 bis C–3, in Pregnanen ist diese Gruppe fünfmal integriert. Androstane enthalten fünfmal C–1 und C–2, aber nur viermal C–3.

und würden eine Abreicherung von $18.6 \times 5/21 = 4,4 \text{ ‰}$ zeigen. Demgegenüber enthalten Androstane fünf Kohlenstoffatome der Positionen C–1 und C–2, jedoch nur vier C–3 Atome. Unter Berücksichtigung der beiden extremen Verteilungen wurde die Abreicherung auf $(18.6 \times 5 - 18.6/3)/19 = 4,6 \text{ ‰}$ bis $18.6 \times 5/19 = 4,9 \text{ ‰}$ eingegrenzt.

4. Diskussion

4.1. Bedeutung des inaktiven Expressionsprodukts

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine nicht aktive 46 kDa-Variante der katalytischen Domäne des Enzyms 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A Reduktase (HMGR) hergestellt. Im Gegensatz zur aktiven 52 kDa-Variante fehlte der 46 kDa-Variante eine zusammenhängende Sequenz aus 53 Aminosäuren. Erstaunlicherweise war das unvollständige Gen in Form eines „ready-to-use“-Expressionsvektors vertrieben worden. Das Gen wurde mit dem Namen des Enzyms benannt, was nahe legte, aus dem gelieferten Vektor könne ein aktives Enzym exprimiert werden. Weiterführende Hinweise, dass es sich gegebenenfalls um eine besondere Variante handeln könnte, wurden nicht gegeben.

Die cDNA der kürzeren Variante war im Rahmen des „National Institutes of Health Mammalian Gene Collection Program“ zusammen mit weiteren 15.000 humanen und Maus-Genen sequenziert und im Jahr 2002 veröffentlicht worden [Collins 2002]. Einen Hinweis auf die Existenz der beiden Varianten lieferte die online-Datenbank „UniProtKB/Swiss-Prot“¹, welche die beiden Isoformen als alternative Splicingvarianten aufführte. Dabei entspricht die kürzere Variante der Isoform-2 (ID P04035-2) und wird von einer Notiz begleitet, dass keine experimentelle Bestätigung dieser Isoform verfügbar sei.

Ausgehend von der Annahme, dass es sich bei Isoform-2 um eine natürliche Splicingvariante der HMGR handelt, soll im Folgenden ihre mögliche Bedeutung diskutiert werden.

¹<http://www.expasy.org/uniprot/P04035>

Die Isoform-2 der HMGR könnte als ein Faktor für die Down-Regulation des Mevalonatbiosynthesewegs fungieren. Wie in Kapitel 2.2.2 erläutert, befindet sich das katalytische Zentrum des Enzyms inmitten eines Dimers (Seite 26). Ein Heterodimer aus der 46 kDa-Variante der katalytischen Domäne und der 52 kDa-Variante wäre nicht katalytisch aktiv. Also würde eine Expression von Isoform-2 zusammen mit der anschließenden Heterodimerisierung von Isoform-1 mit Isoform-2 einen Teil der bereits vorhandenen aktiven HMGR-Moleküle deaktivieren. Da beide Isoformen identische Transmembrandomänen besitzen, wäre Span-8 wie im aktiven Homodimer der Isoform-1 gegen proteolytische Angriffe geschützt. Der Abbau von HMGR würde durch den Ersatz eines Isoform-1 Monomers durch ein Isoform-2 Monomer demnach nicht beschleunigt. Der Mechanismus wäre ein weiteres Beispiel für die Regulation der HMGR-Translation. Eine Voraussetzung für diese Hypothese ist jedoch, dass sich tatsächlich Heterodimere aus beiden Isoformen bilden können, was noch zu beweisen wäre.

Gegen diesen mutmaßlichen Mechanismus spricht, dass bisher nur von Splicingvarianten im Zusammenhang mit Sterinmangel, nicht bei Sterinüberangebot in der Zelle, berichtet worden ist [Reynolds 1985]. Zudem wurde die veröffentlichte Isoform-2 in weißen Blutzellen² gefunden, während die von Istvan et al. charakterisierte Isoform-1 aus fötalem Nebennierengewebe³ stammt [Istvan 2000]. Es könnte sich daher auch um eine gewebeabhängige Variante der HMGR handeln. Dass HMGR-Splicingvarianten zumindest kompartimentabhängig auftreten können, wurde bereits bei der Untersuchung von Peroxisomen beobachtet [Engfelt 1998].

Schließlich kann eine Variante des Enzyms, die bezüglich der bekannten HMGR-Reaktion inaktiv ist, möglicherweise in anderer Weise regulatorisch wirken. Ein solches Verhalten zeigt zum Beispiel die inaktive Variante UVE-1 der E2-Ubiquitin-konjugierten Enzyme, die in einer bestimmten Phase der Zellreifung gebildet wird und den Differenzierungsprozess mitbestimmt [Sancho 1998].

Die Untersuchung der Funktion einer inaktiven HMGR-Variante überstiege je-

²<http://mgc.nci.nih.gov/Reagents>; IMAGE Id: 5212903

³<http://www.lgcpromochem-atcc.com>; ATCC Number: 57042

doch die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit und beschränkt sich hier auf die Aufzählung der Ansatzmöglichkeiten.

4.2. Aufarbeitungs- und Messmethode

4.2.1. Einfluss der Lactonisierung auf das Isotopenverhältnis

Die Isotopendiskriminierung der HMGR-Reaktion wurde in dieser Arbeit anhand der Isotopensignatur des Reaktionsprodukts Mevalonat untersucht. Das Produktmolekül wurde dazu lactonisiert. Prinzipiell kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei dieser Reaktion ein Isotopeneffekt auftritt. Die gemessene Isotopendiskriminierung wäre dann sowohl auf die Enzymreaktion, als auch auf die Lactonisierung zurückzuführen.

Um das Ergebnis der Messungen interpretieren zu können, wird im Folgenden der mögliche Einfluss eines zusätzlichen Isotopeneffekts betrachtet. Wie Abbildung 4.1 zeigt, betrifft der primäre kinetische Isotopeneffekt (KIE) der Enzymreaktion eine andere Position im Molekül als der primäre KIE der Lactonisierung. Zwar resultiert der KIE der Lactonisierung in einer ^{13}C -An- oder Abreicherung des Mevalonolactons, diese ist jedoch unabhängig von dem KIE der Enzymreaktion und betrifft dadurch alle Proben gleichermaßen. In die Berechnung des Isotopeneffekts der Enzymreaktion gehen keine absoluten Isotopenverhältnisse ein, sondern nur relative Unterschiede zwischen den Proben mit verschiedenen Reaktionslaufzahlen. Der Einfluss eines primären KIE bei der Lactonisierung beeinflusste den berechneten Wert für den KIE der HMGR-Reaktion also nicht.

Ein möglicher α -sekundärer Kohlenstoff-KIE bei der Lactonisierung betrifft allerdings das Kohlenstoffatom C-1, dessen Isotopensignatur auch von dem primären KIE der Enzymreaktion beeinflusst wird. Da in den Proben bereits eine unterschiedliche Besetzung mit Kohlenstoffisotopen an C-1 vorliegt, verändert der zweite KIE bei der Lactonisierung jede Probe unterschiedlich, nämlich entsprechend ihrer Isotopensignatur an C-1. Der zweite KIE hängt also indirekt von der Reakti-

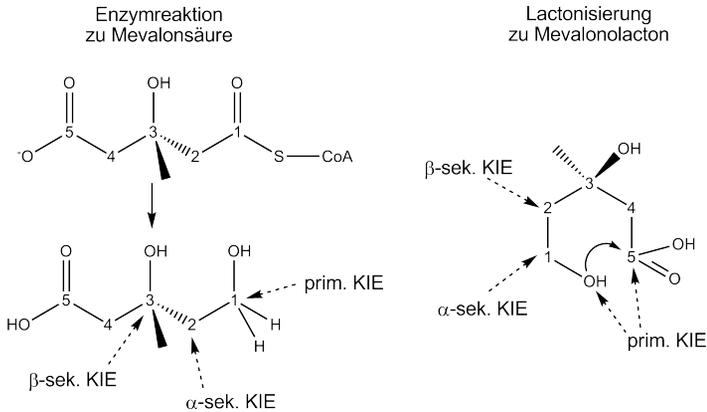


Abbildung 4.1.: Einfluss verschiedener kinetischer Isotopeneffekte (KIE) auf die Kohlenstoffatome in Mevalonat und in Mevalonolacton. Der primäre Isotopeneffekt der Enzymreaktion betrifft das mit C-1 bezeichnete Kohlenstoffatom. Bei der Lactonisierung betrifft ein primärer Isotopeneffekt C-5, ein sekundärer wirkt wiederum an C-1.

onslaufzahl ab und beeinflusst dadurch den berechneten Fraktionierungsfaktor für die Enzymreaktion.

Der Einfluss eines sekundären KIE durch die Laktonisierung wurde in der vorliegenden Arbeit als Störfaktor in Kauf genommen. Durch Bestimmung des tatsächlichen Werts dieses zusätzlichen KIEs, kann der hier berechneten KIE der HMGR-Reaktion gegebenenfalls präzisiert werden.

Die Abweichungen der für die einzelnen Experimente berechneten Fraktionierungsfaktoren kann als ein Hinweis auf den Einfluss der Lactonisierung interpretiert werden. Während die Enzymreaktion sorgfältig auf 37°C temperiert wurde, fand die Lactonisierung bei Raumtemperatur statt, die an den Versuchstagen um eine Temperatur von etwa 23°C schwankte. Der Faktor Temperatur beeinflusst sowohl die Gleichgewichtslage der Laktonisierung, als auch den KIE dieser Reaktion. Die starke Abweichung des Fraktionierungsfaktors aus Exp-4 kann mit den unterschiedlichen Temperaturbedingungen zusammenhängen, die bei der Durchführung des

Versuchs herrschten (Abschnitt 3.3.1, Seite 48). Um diesen Einfluss genauer abschätzen zu können, empfehlen sich weitere Experimente unter stärker kontrollierten Temperaturbedingungen.

Allgemein führt eine Temperaturerhöhung zur Reduzierung eines KIEs. Es könnte daher für zukünftige Experimente hilfreich sein, nötige Folgereaktionen bei höheren Temperaturen durchzuführen. Jedoch ist zu bedenken, dass dadurch auch die Bildung von Nebenprodukten gefördert werden kann, im Falle der betrachteten Lactonisierung zum Beispiel das Dehydratisierungsprodukt 5,6-Dihydro-4-methyl-2H-pyran-2-on, beschrieben in Abschnitt 3.2 (Seite 43).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Lactonisierung nach der Enzymreaktion das gemessene Isotopenverhältnis des Mevalonolactons beeinflussen und dadurch den Wert der Isotopendiskriminierung, die auf die Enzymreaktion zurückzuführen ist, verändern kann. Nach einer genaueren Aufklärung dieses Einflusses ist gegebenenfalls eine Korrektur des hier bestimmten Isotopeneffekts für die HMGR-Reaktion angebracht.

4.2.2. Gerätedrift bei der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie

Bei der Betrachtung des Datensatzes war aufgefallen, dass die Isotopenverhältnisse aus den sechs berücksichtigten Experimenten einem nicht zufälligen Trend unterlagen (Abschnitt 3.3.1, Seite 48). Durch die Randomisierung der Messungen beeinflusste der Trend nicht die Auswertbarkeit der einzelnen Experimente. Wohl aber verhinderte er die Kombination von Messpunkten aus verschiedenen Experimenten, woraus sich eine größere Stichprobe ergeben hätte. Daher wäre es hilfreich, seine Ursache zu kennen, um ihn bei zukünftigen Experimenten ausschließen zu können.

Bei der Suche nach der Ursache des Trends wurden zunächst Unterschiede in der Isotopensignatur der Ausgangsmaterialien überprüft. Beim Zerfall der Substrate, würde sich vermutlich eine ^{13}C -Anreicherung der zurückbleibenden Moleküle beobachten lassen, was dem Trend auf den ersten Blick entsprach. Allerdings konnte

keine Auswirkung von verschiedenen Chargenwechseln sowohl der Substrate HMG-CoA und NADPH, als auch des Enzyms, als auch des verwendeten Reaktionspuffers gefunden werden. Auch schien weder das Alter der Chargen, noch die Gefrier-Tau-Zyklen, welche die Substrate durchliefen, eine Rolle zu spielen.

Die Ursache der Verschiebung zu im Median schwereren Isotopenverhältnissen wurde daher im Messprozess der IRMS vermutet. Da nur die Unterschiede der Isotopensiganturen der gemessenen Proben von Bedeutung waren, wurden die Proben ohne den Zusatz eines internen Standards, der die absolute Bestimmung der Isotopensignatur erlaubt hätte, gemessen. Die Kalibrierung der Messungen erfolgte ausschließlich anhand der Referenzgaspeaks. Eine Änderung der Isotopenzusammensetzung des Referenzgases würde also zu einer Verschiebung der Kalibrierung und schließlich der gemessenen Werte führen. Allerdings reichert das Referenzgas eher ^{13}C -haltiges CO_2 an, wird also schwerer, da die leichteren Gasmoleküle in einer CO_2 -Flasche schneller aus der flüssigen in die Gasphase übergehen und ausströmen. Ein dadurch bedingter Trend müsste also genau entgegengesetzt dem tatsächlich beobachteten Trend verlaufen, denn kalibriert an einem schwereren Gas würden die gemessenen Isotopenverhältnisse leichter erscheinen. Die Ursache für den Trend lag also vermutlich nicht beim verwendeten Referenzgas.

Nachdem alle Ursachen, die mit dem speziellen Problem dieser Arbeit zu tun hatten, ausgeschlossen worden waren, wurde der Trend einer für die Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie bekannten Gerätedrift zugeschrieben. Zwischen dem ersten und dem letzten Experiment lagen 81 Tage und die Verschiebung der Isotopenverhältnisse betrug für die Mediane $0,03\text{ ‰}$. Eine Gerätedrift von unter $0,5\text{ ‰}$ innerhalb dieses Zeitraums, sowohl zu schwereren als auch zu leichteren Isotopenwerten, ist bei IRMS-Messungen nicht ungewöhnlich [Flenker 2008a]. Sie wird üblicherweise auf veränderliche klimatische Bedingungen im Messraum und das Alter des Verbrennungssofens zurückgeführt, kann aber auch durch Veränderungen des Referenzgases beeinflusst werden. Die Verwendung eines internen Standards mit bekannter Isotopensignatur, an dem die Messungen absolut kalibriert werden können, ist eine Möglichkeit, die Messwerte von der Gerätedrift abzukoppeln.

4.2.3. Vergleich von Mittelwert-Methode und Kurvenanpassung

Der isotopische Fraktionierungsfaktor α wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe zweier unterschiedlicher Methoden berechnet, die hier vereinfacht „Mittelwert-Methode“ beziehungsweise „Kurvenanpassung“ genannt werden.

In der Literatur werden Fraktionierungsfaktoren üblicherweise aus Messungen des Isotopenverhältnisses von Produktproben mit Reaktionslaufzahlen unter 0,5 berechnet [Tong 1957, O’Leary 1980, Melzer 1987, Melzer 1988]. Außerdem ist die genaue Bestimmung von R_∞ notwendig, was dem Isotopenverhältnis des Produkts nach vollständiger Umsetzung entspricht. Die Messwerte werden in eine Gleichung für den Fraktionierungsfaktor α als Funktion von den Isotopenverhältnissen R_t und R_∞ , sowie der Reaktionslaufzahl f_R eingesetzt. Wie Abbildung 2.5-b (Seite 15) zeigt, ändert sich das Isotopenverhältnis des Produkts für Reaktionslaufzahlen bis 0,5 nur geringfügig. Daher ergeben sich nur geringe Unterschiede zwischen den berechneten Werten für α , selbst wenn die Reaktionslaufzahl mit deutlichen Fehlern behaftet ist. Durch Mittelwertbildung wird dann ein Schätzwert für α bestimmt.

Dieses in der Literatur praktisch ausschließlich verwendete Verfahren erfordert die präzise Bestimmung von R_∞ . Während in den genannten Studien R_∞ offenbar mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden konnte, zeigte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit, dass diese Bestimmung mit großen Unsicherheiten behaftet war. Zum einen bedingt die Beziehung zwischen R_t und f_R , dass sich das Isotopenverhältnis des Produkts zum Ende der Reaktion am stärksten ändert. Dadurch führt selbst ein geringer Fehler bei der Bestimmung des Endes einer Reaktion zu deutlich unterschiedlichen Messwerten für R_t . Das Ende der Umsetzung wurde anhand der sich langsamer ändernden Extinktion der Reaktionslösung bestimmt. In diese Messung gehen aber sowohl der Verbrauch des Cosubstrats NADPH durch die Enzymreaktion, als auch der nicht-enzymabhängige Zerfall von NADPH ein [Wu 1986]. Um das Reaktionsende während des Experiments zu bestimmen, musste nach Augenmaß zwischen enzymatischem und nicht-enzymatischem Abbau unterschieden werden, was typischerweise nicht zuverlässig gelang.

Eine weitere Schwierigkeit bestand darin, dass das Substrat nur als Racemat

(*R,S*)-HMG-CoA erhältlich war. Da HMGR stereospezifisch nur (*S*)-HMG-CoA verarbeitet, aber beide Stereoisomere im aktiven Zentrum binden, kann die Anwesenheit von (*R*)-HMG-CoA zu einer kompetitiven Hemmung des Enzyms führen [Bischoff 1995]. Vermutlich nahm infolge dessen die Reaktionsgeschwindigkeit zum Ende der Reaktion zusätzlich stark ab, so dass der Enzym-abhängige Zerfall nur noch wenig zum Abfall der Extinktionskurve beitrug und so die Bestimmung des Reaktionsendes zusätzlich erschwert wurde.

Um das Problem, R_∞ experimentell bestimmen zu müssen, zu umgehen, wurde eine repräsentative Stichprobe der Isotopenverhältnisse R_i mit Reaktionslaufzahlen von 0,1 bis 1 erstellt. Aus dieser Stichprobe konnten dann beide unbekannt Parameter, sowohl α als auch R_∞ , geschätzt werden. So entwickelte sich die Mittelwert-Methode, die in Abschnitt 5.6.2 ausführlich beschrieben wird (Seite 108). Sie beruht auf der Berechnung von Fraktionierungsfaktoren α_i für jedes Wertepaar der Stichprobe. Der Parameter R_∞ wird dabei solange variiert, bis die Einzelwerte α_i unabhängig von ihrer Reaktionslaufzahl um den gewichteten Mittelwert α streuen.

Bei der Mittelwert-Methode ergaben sich extrem große Fehlerintervalle und große Residuen für diejenigen α_i -Werte, die aus Messpunkten mit einer Reaktionslaufzahl von $f_R \geq 0,95$ berechnet wurden. Im Fall des Experiments Exp-6 fielen 10,3% aller Messpunkte in diesen Bereich. Ihre Residuen trugen aber mit 86,6% zu der Summe aller Residuen bei. Abbildung 5.8 (Seite 110) illustriert diese Verhältnisse. Die Aussagekraft der Messwerte mit $f_R \geq 0,95$ wurde als sehr gering betrachtet, da diese Messwerte überproportional stark zur Gesamtstreuung beitrugen. Daher wurde ein Grenzwert von $f_R = 0,95$ festgelegt und nur die Messwerte mit $f_R < 0,95$ in der Mittelwert-Methode berücksichtigt.

Es ist zu betonen, dass die Mittelwert-Methode ein heuristisches Verfahren darstellt. Sowohl die Ermittlung eines passenden Werts für R_∞ , als auch die Zusammenfassung der verschiedenen Lösungen α_i zu einem Mittelwert und schließlich die Beschränkung des Datensatzes auf Werte mit $f_R < 0,95$ beruhten auf deskriptiv-statistischen Betrachtungen. Die Parameter α und R_∞ wurden dabei nicht direkt aus den Rohdaten berechnet, sondern über den Umweg der Berechnung verschiedener Werte α_i . Es war nicht auszuschließen, dass die Mehrstufigkeit des Verfahrens un-

erwartete Fehler hervorrief. Trotz der Plausibilität der Einzelschritte enthielt das Ergebnis möglicherweise größere Fehler, als aus den berechneten Konfidenzintervallen hervorging. Darum wurde nach einem zusätzlichen einstufigen Lösungsweg gesucht.

Für die Beziehung zwischen f_R und R_t wurde ein mathematisches Modell entwickelt. Damit war es möglich, die Parameter α und R_∞ unmittelbar durch Anpassung des Modells an die Rohdaten zu bestimmen. Das Verfahren wurde im Rahmen dieser Arbeit in Abgrenzung zur „Mittelwert-Methode“ kurz als „Kurvenanpassung“ bezeichnet. Die Herleitung der Kurvengleichung stützt sich auf die Geschwindigkeitsgleichungen für die Molekülspezies mit unterschiedlichen Isotopen und auf Massenbilanzen. Zwei vereinfachende Näherungen wurden angewendet, welche zum einen die Geschwindigkeitskonstanten, zum anderen die Reaktionslaufzahlen für die Moleküle mit unterschiedlichen Isotopen betrafen. Im Anhang A.1 ist die Herleitung ausführlich dargestellt.

Die Kurvenanpassung lieferte die beiden Schätzwerte α und R_∞ und die zugehörigen Fehlerintervalle. Der Fehler für R_∞ lag im Bereich des üblichen Messfehlers für Isotopenverhältnisse, nämlich 10^{-6} [Flenker 2008b]. Die Residuen zeigten eine zufällige Streuung und keine systematische Abhängigkeit von f_R . Solche Betrachtungen führten zu dem Schluss, dass der Datensatz angemessen durch das Modell beschrieben wurde.

Es sei darauf hingewiesen, dass in Diagrammen, welche die Ergebnisse einer Kurvenregression darstellen, die Rohdaten ohne Fehlerbalken aufgetragen werden. Die Unbestimmtheit der Kurven-Parameter hängt von der Streuung der Datenpunkte und den Eigenschaften des verwendeten Modells ab. Darum wäre es unangebracht, die heuristisch geschätzten Messfehler in das Diagramm aufzunehmen und folglich mit der Kurvenanpassung in Verbindung zu bringen.

Ein weiterer Hinweis betrifft den Standardfehler des Fraktionierungsfaktors α . Oft werden bei der Bewertung von Fehlerintervallen prozentuale Fehler berechnet. Diese Praxis ist im Falle von α irreführend, denn es ergäbe sich für den hier angegebenen Wert $\alpha = 1,0031 \pm 4 \times 10^{-4}$ ein Fehler von unter 0,05%. Da es sich bei α bereits um einen relativen Wert handelt, nämlich um das Verhältnis der bei-

den Geschwindigkeitskonstanten $^{12}k/^{13}k$, ist die Berechnung eines prozentualen Fehlers, der sich auf die absolute Größe von α bezieht, nicht angebracht. Zudem entspräche die Abwesenheit einer isotopischen Fraktionierung einem Wert von $\alpha = 1$ und nicht von $\alpha = 0$, was fälschlich bei der prozentualen Berechnung vorausgesetzt wird. Es ist allenfalls zulässig, einen prozentualen Fehler für den isotopischen Anreicherungsfaktor $\varepsilon = \alpha - 1$ zu berechnen, was in diesem Falle einen Fehler von $\pm 4 \times 10^{-4} / (1,0031 - 1) \cdot 100 = \pm 12,9\%$ ergeben würde. Aufgrund der geschilderten Missverständlichkeit wird jedoch die Angabe eines absoluten Fehlers bevorzugt.

Prinzipiell gelten diese Betrachtungen auch für den Schätzwert von R_∞ und sein Fehlerintervall. Der Ursprung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Achse ist beliebig wählbar und wird konventionell mit dem Isotopenverhältnis eines Standards gleichgesetzt [Craig 1953]. Dieses liegt wegen des natürlichen ^{13}C -Vorkommens von etwa 1,1% bei einem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis im Bereich von 0,011. Typische natürliche Variationen liegen in der Größenordnung von einigen Promille im Verhältnis zum Standard. Ein Promille bezogen auf das Isotopenverhältnis entspricht dann $0,011/1000 = 1,1 \times 10^{-5}$. Eine Unsicherheit von 10^{-6} für R_∞ betrifft also die erste Dezimalstelle des Werts. Tatsächlich ist dieser Fehler praktisch identisch mit der bekannten Messpräzision eines GC-C-IRMS Systems, wofür die Faustregel „besser als 0,3 Promille“ gilt [Flenker 2008b].

In einem abschließenden Vergleich von Mittelwert-Methode und Kurvenanpassung sei zunächst darauf hingewiesen, dass mit beiden Methoden fast identische Werte für den Fraktionierungsfaktor α berechnet wurden: 1,0032 und 1,0031 (Ergebnistabelle 3.2, Seite 55). Da beide Methoden unterschiedliche Lösungsansätze verfolgen, kann das als eine gegenseitige Bestätigung ausgelegt werden. Während die Mittelwert-Methode auf einer in der Literatur etablierten Gleichung aufbaut, wurde für die Kurvenanpassung eigens eine Gleichung aufgestellt. Das mehrstufige Rechenverfahren der Mittelwert-Methode mit der Gefahr, dadurch unerwartete Fehler zu produzieren, steht der einstufigen Kurvenanpassung an die Rohdaten gegenüber. Allein dieser Unterschied spricht für die bevorzugte Verwendung der Kurvenanpassung, denn dabei hängen die Fehler von weitestgehend bekannten

Faktoren ab. Obwohl die Methoden unterschiedliche Strategien zur Ausreisserbeseitigung anwenden, ergeben sich praktisch gleiche Standardfehler. Bei der Mittelwert-Methode werden kurzerhand Werte mit $f_R \geq 0,95$ vernachlässigt, bei der Kurvenanpassung beruht der Ausschluss von Werten auf ihrem unverhältnismäßig großen Abstand zur angepassten Kurve. Anders als die Standardfehler unterscheiden sich die berechneten 95%-Konfidenzintervalle der Werte hingegen deutlich. Bei der Mittelwert-Methode ist das 95%-Konfidenzintervall für α mehr als doppelt so groß, wie bei der Kurvenanpassung. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass bei der Mittelwert-Methode alle Werte unterhalb von $f_R = 0,95$ in die Berechnung eingingen. Wie die Kurvenanpassung zeigt, scheinen in diesem Bereich Ausreisser vorzukommen, die insgesamt zu einer stärkeren Streuung der Werte und dadurch zu einem größeren Konfidenzintervall beitragen.

Für die Berechnung des isotopischen Anreicherungsfaktors ϵ wurde schließlich der Wert α aus der Kurvenanpassung verwendet. Diese Entscheidung beruhte auf der Annahme, dass die direkte Berechnung eines Parameters aus Rohdaten mit Hilfe eines mathematisch begründeten Modells, einer heuristischen Methode überlegen war. Dennoch war der Einsatz der Mittelwert-Methode ein wertvolles Kriterium für die Bewertung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Kurvenanpassung. Die fast identischen Ergebnisse beider Methoden rechtfertigen die Kurvenanpassung neben der Mittelwert-Methode. Neben anderen bereits ausgeführten Kriterien ist das geringere 95%-Konfidenzintervall für α aus der Kurvenanpassung ein objektiver Hinweis auf die Überlegenheit dieser Methode.

4.3. Einfluss der Isotopenfraktionierung auf die Steroidhormone

Die Isotopenfraktionierung durch die HMGR-Reaktion wirkt sich auf die Isotopenverhältnisse der Produkte des Mevalonatbiosynthesewegs aus. Zu diesen Produkten gehören Cholesterin und die daraus entstehenden Steroidhormone. In diesem Abschnitt wird zunächst die Auswirkung der HMGR-Isotopenfraktionierung auf die

in der Dopinganalytik untersuchten Steroide betrachtet. Anschließend wird das Phänomen der ^{13}C -Abreicherung der Steroide unter dem Einfluss von kontrazeptiv wirkenden Gestagen-Präparaten behandelt. Zuletzt wird das Ergebnis mit bereits bekannten Isotopensignaturen von Substanzen im menschlichen Metabolismus in Zusammenhang gebracht.

Da im Metabolismus nur eine Fraktionierung auftreten kann, wenn ein Substratangebot nicht vollständig umgesetzt wird, sind es die limitierenden Reaktionen, die eine messbare Isotopenfraktionierung verursachen [Schmidt 2003]. Die HMGR-Reaktion gilt als limitierender Schritt der Cholesterinbiosynthese und kann daher die Isotopensignatur von Cholesterin und den Steroidhormonen beeinflussen.

Wenn die HMGR-Reaktion limitierend wirkt und ein ausreichendes Substratangebot vorliegt, bewirkt sie die größtmögliche ^{13}C -Abreicherung ihres Produkts Mevalonat. Wie stark dieser Effekt an die im Stoffwechselweg folgenden Produkten weitergegeben wird, hängt von einer Reihe von Faktoren ab [Hayes 2001]. Unter anderem spielt vermutlich die im Mevalonatbiosyntheseweg vorkommende Verzweigung des Stoffstroms zu alternativen Stoffwechselwegen eine Rolle. Da die zusätzlichen Einflussfaktoren bisher nicht bestimmt worden sind, ist eine Aussage über den tatsächlichen Einfluss der HMGR auf die Isotopie von Cholesterin und den Steroidhormonen aktuell nicht möglich.

Zumindest konnte der maximal zu erwartende Einfluss der HMGR-Isotopenfraktionierung in dieser Arbeit beziffert werden. Demnach zeigen *de novo* synthetisiertes Cholesterin und die daraus gebildeten Steroidhormone eine maximale Abreicherung zwischen 4 und 5 ‰ gegenüber dem Substrat der HMGR-Reaktion.

Für die verschiedenen Klassen von Steroiden ergeben sich dabei unterschiedliche Werte. Abhängig von der tatsächliche Größe des β -sekundären Isotopeneffekts der HMGR-Reaktion ergibt sich eine Differenz zwischen Pregnanen (P) und Androstanen (A) von $\Delta^{13}\text{C}(\text{P} - \text{A}) = -0,2$ bis $-0,5$ ‰. Bezieht man den gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert auf die Anzahl der Kohlenstoffatome der genannten Verbindungen, beträgt der Unterschied bis zu 0,05 ‰. Dieser Unterschied zwischen zwei nah verwandten Substanzen beruht dabei allein auf der Abspaltung einer Seitenkette. Dadurch verlieren die Androstane zwei Atompositionen, die entweder nicht oder

nur in geringem Maß durch den HMGR-Isotopeneffekt beeinflusst worden sind. Da $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Substanzen üblicherweise als Mittelwerte angegeben werden, ergibt sich insgesamt eine ^{13}C -Anreicherung der Androstane gegenüber den Pregnanen.

Die Betrachtung zeigt, wie Informationen über die metabolische Herkunft von Substanzen die Interpretation von isotopischen Verteilungsmustern unterstützen können. Betrachtet man im beschriebenen Fall die Umsetzung von Pregnanen zu Androstanen, bewirkt der Verlust von weniger stark ^{13}C -abgereicherten Atompositionen bereits eine Änderung der durchschnittlichen Isotopensignatur. Diese Änderung ist unabhängig von einem möglichen kinetischen Isotopeneffekt der Reaktion. Nur wenn berücksichtigt wird, dass bereits in einer Vorläuferreaktion bestimmte Atompositionen an- oder abgereichert worden sein können, wird die Ursache des gemessenen Unterschieds der Isotopensignaturen von Substrat und Produkt deutlich.

Während in den vorigen Absätzen die Isotopenfraktionierung der HMGR dazu diene, Aussagen über die Isotopien von Stoffwechselprodukten zu treffen, wird sie in den Folgenden dazu verwendet, Zusammenhänge im Metabolismus zu erklären.

Abschnitt 2.2.3 führt einige Untersuchungsergebnisse auf, die im Zusammenhang mit der Einnahme oraler Kontrazeptiva stehen (Seite 34). Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass Progesteron aus im Corpus Luteum *de novo* synthetisiertem Cholesterin offenbar gegenüber dem Progesteron aus dem Plasma-Cholesterin ^{13}C -angereichert, also schwerer, ist. Aus dem Isotopeneffekt der HMGR-Reaktion würde jedoch eine ^{13}C -Abreicherung des *de novo* synthetisierten Cholesterins resultieren, die sich auf das Folgeprodukt Progesteron übertragen würde. Eine Anreicherung von schweren Isotopen deutet auf eine Folgereaktion mit Isotopeneffekt hin.

Demnach dient das im normalen Menstruationszyklus in großen Mengen im Corpus Luteum gebildete Progesteron möglicherweise nicht ausschließlich als Botenstoff, sondern fließt auch in erheblichem Maße in die Synthese der anderen Steroidhormone. Aufgrund des großen Angebots an Progesteron wirken dann die Folgereaktionen limitierend und verursachen eine Anreicherung schwerer Progesteronmoleküle.

Durch den Vergleich der für Steroide berechneten maximal zu erwartenden ^{13}C -Abreicherung mit typischen relativen Isotopenverhältnissen anderer Molekülgrup-

pen, lassen sich Schlüsse hinsichtlich der Limitierung von Stoffwechselwegen im humanen Metabolismus ziehen.

Lipide zeigen eine ^{13}C -Abreicherung von etwa 7 ‰ relativ zur Biomasse des Organismus [De Niro 1977, Monson 1982]. Als Ursache für diese Abreicherung wurde die Reaktion der Pyruvat Dehydrogenase erachtet, die bei der Bildung von Acetat limitierend wirkt [Melzer 1987]. Diese Abreicherung gilt jedoch nicht homogen für alle Lipide. Freie Fettsäuren erscheinen deutlich abgereichert mit etwa 8 ‰ gegenüber der Biomasse, während Steroide nur leicht abgereicherte Werte von etwa 1 ‰ aufweisen [Flenker 2008b]. Der Isotopeneffekt der Pyruvat Dehydrogenase scheint also von zusätzlichen Effekte überlagert zu werden, was die limitierende Funktion dieser Reaktion, zumindest für die Steroide unter den Lipiden, ausschließt. Auch die HMGR-Reaktion, die eine ^{13}C -Abreicherung der Steroide von 4 bis 5 ‰ gegenüber den freien Fettsäuren verursachen würde, scheint die Steroidbiosynthese nicht limitierend zu beeinflussen.

In dieser Arbeit wurde die Isotopenfraktionierung der HMGR-Reaktion *in vitro* ermittelt. Um den tatsächlichen Einfluss der HMGR-Reaktion *in vivo* auf die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Steroiden zu bestimmen, sind weitere Untersuchungen nötig. Zum Beispiel können Unrinproben von Patienten, die eine Statin-Therapie beginnen oder absetzen, aufschlussreich sein. Da Statine das Enzym HMGR hemmen, unterbinden sie dadurch die *de novo*-Synthese von Cholesterin. So wäre der Vergleich der Isotopenverhältnisse von *de novo* synthetisierten Steroiden, die ohne Statin-Anwendung entstehen, und Steroiden aus Plasma-LDL, die unter Statin-Hemmung gebildet werden, möglich.

5. Material und Methoden

5.1. Bakterien-Techniken

5.1.1. Bakterienstämme und Nährmedien

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5 α verwendet [Grant 1990]. Die Proteinexpression fand in *Escherichia coli* BL21(DE3) Zellen statt [Studier 1990]. Alle verwendeten Plasmide trugen ein Antibiotikumresistenz-Gen gegen Ampicillin, so dass Zellen, die das Plasmid aufgenommen hatten, durch Ampicillin im Nährmedium selektiert wurden. Die Ampicillin-Stammlösung wurde wässrig mit der Konzentration von 150 mg/mL angesetzt, steril filtriert, in 1,5 mL-Volumina aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die Bakterienkultivierung wurden das Flüssigmedium Lysogeny Broth (LB) verwendet [Bertani 1951]. Dazu wurden 10 g Pepton aus Casein (Roth, Karlsruhe), 5 g Hefeextrakt (Roth, Karlsruhe) und 10 g NaCl (Merck, Darmstadt) in 800 mL Wasser gelöst. Die Lösung wurde mit 5 M Natronlauge auf pH 7,0 titriert und das Volumen mit Wasser auf 1 L erweitert. Anschließend wurde das Medium durch Autoklavieren sterilisiert.

LB-Flüssigmedium mit Ampicillin (LBamp) wurde unmittelbar vor der Verwendung mit einer Konzentration von 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin hergestellt. Dazu wurde pro 1 mL LB-Medium 1 μL der 1000-fach höher konzentrierten Ampicillin-Stammlösung zugegeben.

Zu Herstellung von LBamp-Agarplatten wurde 500 mL LB-Flüssigmedium mit 9 g Agar-Agar (Roth, Karlsruhe) versetzt und in einer 1 L-Flasche autoklaviert. Nach

dem Abkühlen des Mediums auf 50 °C wurden 500 µL der Ampicillin-Stammlösung zugegeben. Die LBamp-Platten wurden bei 4 °C gelagert. Für die Herstellung von chemokompetenten Bakterien wurden LB-Agarplatten ohne Ampicillin hergestellt.

5.1.2. Bakterienkultivierung

Alle Arbeiten mit Bakterienkulturen fanden unter einer Sterilbank mit autoklavierten Medien und Glasgeräten sowie sterilen Einwegmaterialien statt. Zur Desinfektion von Pipetten und Gefäßen, die auch außerhalb der Sterilbank verwendet wurden, und nach der Arbeit an der Sterilbank wurde mit 3-%igem Korsolin oder Ethanol durch 10-minütiges Einwirken desinfiziert.

Zelldichtebestimmung

Die Bakterienkulturen inkubierten im Flüssigmedium bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase. Dieser Zeitpunkt wurde über die optische Dichte OD₆₀₀ der Kultur bestimmt, die photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen werden kann. Bei den mit dem verwendeten Spektrophotometer (Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, Bucks, Großbritannien) erstellten Wachstumskurven lag dieser Wert zwischen OD₆₀₀ 0,6 und 0,8.

Agarplatten

Um monoklonale Zellstämme zu züchten, wurden 100 µL Flüssigkultur mit einer optischen Dichte OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,8 auf LB-Agarplatten, oder für selektives Wachstum von Bakterien mit Ampicillinresistenz auf LBamp-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten inkubierten bei 37 °C über Nacht oder länger bis Kulturen sichtbar wurden im Heizschrank.

Mini-Plasmid-Präparation

Für Plasmid-Präparationen im kleinen Maßstab (Miniprep) wurden monoklonale Bakterienkolonien von einer Agarplatte jeweils in ein 50 mL-Falcongefäß mit

5 mL LBamp-Flüssigmedium überführt. Um Kolonien zu picken, wurden Einweg-Pipettenspitzen verwendet, die im Medium verblieben. Die Ansätze inkubierten über Nacht bei 37°C und 220 rpm im Schüttelinkubator.

Midi-Plasmid-Präparation

Bakterienkulturen für Plasmid-Präparationen im mittleren Maßstab (Midiprep) wurden in zwei Schritten angesetzt. In einem 50 mL-Falcongefäß mit 10 mL LBamp-Flüssigmedium wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt. Dazu wurde das Medium mit einer monoklonalen Bakterienkolonie, wie für die Miniprep beschrieben, oder mit 1 mL einer Flüssigkultur angeimpft. Die Vorkultur inkubierte 8 Stunden bei 37°C und 220 rpm im Schüttelinkubator. Die Hauptkultur wurde in einem 500 mL-Erlenmeyerkolben mit Schikane angesetzt. Dazu wurden 100 mL LBamp-Flüssigmedium mit 10 mL Vorkultur inokuliert. Die Hauptkultur inkubierte über Nacht bei 37°C und 220 rpm im Schüttelinkubator.

Proteinexpression

Bakterienkulturen für die Proteinexpression wurden in zwei Schritten angesetzt. Zunächst wurde eine Vorkultur in einem 50 mL-Falcongefäß mit 10 mL LBamp-Flüssigmedium hergestellt. Dazu wurde das Medium mit dem Abstrich einer Agarplatte angeimpft. Die Vorkultur inkubierte über Nacht bei 37°C und 220 rpm im Schüttelinkubator. Für die Expressionskultur wurden 300 mL LBamp-Flüssigmedium in einem 1 L-Erlenmeyerkolben mit 10 mL Vorkultur angeimpft. Die Expressionskultur inkubierte bei 37°C und 220 rpm im Schüttelinkubator bis zu einer optischen Dichte OD_{600} von 0,8. Die optische Dichte OD_{600} wurde stündlich anhand einer 700 μ L-Probe der Kultur überprüft.

5.1.3. Lagerung von Bakterienstämmen

Bakterienkulturen wurden dauerhaft in 50%-igen Glycerinlösungen gelagert. Dazu wurden Flüssigkulturen bis zum Ende ihrer exponentiellen Wachstumsphase gezüchtet. Jeweils 300 μ L LB-Medium/Glycerin (1:1, v/v) wurden in 2 mL-Cryoröhrchen

mit Schraubverschluß autoklaviert. Die Röhrcchen wurden mit 700 μL der Bakterienkultur befüllt und bei -80°C gelagert. Zur kurzzeitigen Lagerung wurden Flüssigkulturen auf Agarplatten ausgestrichen und kultiviert. Die Inkubation bei 37°C dauerte über Nacht oder bis sich vereinzelt Kolonien zeigten. Die Platten wurden anschließend bei 4°C gelagert und dienten bis zu vier Wochen lang zum Animpfen weiterer Kultivierungsansätze.

5.1.4. Reaktivierung gefriergetrockneter Stämme

Der Stamm *Escherichia coli* Nr. 57042 von ATCC wurde als Trockenkultur geliefert. Das Lyophilisat wurde in 300 μL LB aufgenommen und auf zwei 50 mL-Falcongefäß mit je 5 mL LBamp aufgeteilt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator wurde eine 2000-fache Verdünnung der Kultur hergestellt und auf einer LBamp-Agarplatte wie bereits beschrieben kultiviert.

5.1.5. Herstellung chemokompetenter Stämme

Chemokompetente *Escherichia coli* Zellen wurden mit der Calciumchloridmethode hergestellt [Inoue 1990]. Dazu wurden Vor- und Hauptkultur wie für die Midiprep beschrieben, jedoch ohne Ampicillin, angesetzt. Die Hauptkultur inkubierte bis der OD_{600} -Wert bei 0,6 lag. Die Zellen wurden in 50 mL-Falcongefäßen durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 4000 rpm und 8°C geerntet. Jedes Pellet aus 50 mL Bakterienkultur wurde in 12,5 mL eiskalter 0,1 M Calciumchloridlösung resuspendiert. Die Suspension inkubierte 45 Minuten auf Eis und wurde dann bei 4000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Diesmal wurden die Pellets in 2 mL steriler, eiskalter 0,1 M Calciumchloridlösung mit 15 % Glycerin resuspendiert. Das Volumen wurde in 100 μL -Aliquoten auf 1,5 mL-Eppendorfgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.1.6. Hitzeschock-Transformation

Die chemokompetenten Bakterienstämme wurden im Hitzeschockverfahren transformiert. Dabei wurden 100 μL der Zellsuspension auf Eis aufgetaut und mit 2 μL einer Plasmid-DNA-Lösung oder 5 μL eines Ligationsansatzes versetzt. Während der Aufnahme der Fremd-DNA in die Bakterienzellen ruhte der Ansatz 30 Minuten auf Eis. Durch den anschließenden Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden im Heizblock wurde der Abbau von Fremd-DNA gehemmt. Nach dem Hitzeschock ruhte die Zellsuspension für zwei Minuten auf Eis, wurde dann mit 900 μL LB-Medium verdünnt und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde für vier Minuten bei 5000 rpm (Centrifuge 5417c, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde unter der Sterilbank bis auf etwa 150 μL abgegossen. In diesem Volumen wurde das Pellet resuspendiert und auf einer LBamp-Agarplatte mit einem sterilen Glasstab ausgestrichen.

5.2. DNA-Techniken

Für alle Arbeiten mit DNA wurde doppelt destilliertes Reinstwasser (Seralpur DELTA UV, USF Seral, Ransbach-Baumbach) verwendet. Für Ansätze, die zur Lagerung bestimmt waren, wurde dieses Wasser zusätzlich autoklaviert.

5.2.1. Präparation von Plasmid-DNA

Bei der Mini-Präparation (Miniprep) wurden aus 2 mL Bakterienkultur 40 μL Plasmid-Lösung gewonnen. Die DNA-Konzentration war ausreichend für die Verwendung in folgenden Methoden: Enzymtechniken, analytische Agarosegele, Polymerase-Kettenreaktion, Sequenzierung. Vorratslösungen von monoklonaler Plasmid-DNA wurden durch Midi-Präparation (Midiprep) gewonnen. Dabei wurden aus 100 mL Bakterienkultur 100 μL Plasmid-DNA in TE Puffer gewonnen. Die DNA-Konzentration wurde im Spektrophotometer bestimmt und lag typischerweise zwischen 0,5 und 1,5 mg/mL. Die Miniprep dauerte etwa eine Stunde und war damit

weniger zeitaufwändig als eine Midiprep, die vier bis fünf Stunden beanspruchte. Ein weiterer Unterschied der Prozeduren bestand in ihrer Kapazität. In beiden Fällen begrenzte das Fassungsvermögen der verwendeten Zentrifugen die Anzahl der Kulturen, die gleichzeitig in einer Prozedur bearbeitet werden konnten. Mit den verfügbaren Zentrifugen (20 Halterungen, bzw. 6 Halterungen) bot sich die Bearbeitung von bis zu 20 Ansätzen für Mini- und bis zu 3 Ansätze für Midipreps an.

Mini-Plasmid-Präparation

Die Mini-Präparationen wurden mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I (Peglab Biotechnologie, Erlangen) oder mit dem Plasmid DNA Purification NuclepSpin Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach den jeweiligen Herstellerprotokollen durchgeführt. Abweichend von den Protokollen wurde im letzten Schritt zweimal mit je 20 μL sterilem Wasser eluiert. Nach der Aufgabe des Wassers auf die Säulenmatrix wurde jeweils eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und erst dann zentrifugiert. Plasmid-DNA, die mit dem Peglab E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I aufgereinigt wurde, kann den Herstellerangaben zufolge in TE-Puffer oder in sterilem, deionisiertem Wasser für mehrere Jahre bei -20°C aufbewahrt werden.

Midi-Plasmid-Präparation

Midi-Präparationen mit dem Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) wurden nach einem angepassten Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Bakterienkultur wurde in Aliquots von 50 mL bei 6.000 rcf und 8°C für 15 Minuten pelletiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde auf dem Vortexschüttler mit 2 mL Puffer P1 mit RNase A resuspendiert. Die Suspension wurde mit 2 mL Puffer P2 versetzt und durch Invertieren des Gefäßes gemischt. Während der folgenden 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur fand die alkalische Zelllyse statt. Anschließend wurden 2 mL des auf Eis gekühlten Puffers P3 zugegeben, durch Invertieren gemischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es entstand ein weißer Niederschlag, der genomische DNA, Proteine, Zellmaterial und Kalium Dodecylsulfat enthielt.

Für die Folgeschritte wurden je zwei Ansätze aus 50 mL Bakterienkultur vereinigt, so dass nun mit 100 mL Kultur pro Gefäß gerechnet wurde. Der weiße Niederschlag wurde mit maximaler Umdrehungszahl (hier 18.514 rcf) für 30 Minuten bei 8 °C pelletiert. Während der Zentrifugation wurden die Adsorptionssäulen Qiagen-tip100 über einem Abfallgefäß aufgestellt. Die Säulen wurden mit je 4 mL Puffer QBT equilibriert. Der Überstand der Zentrifugation wurde ohne Filter auf die Säule gegeben, der Niederschlag blieb am Zentrifugationsgefäß hängen. Nachdem der Überstand abgelaufen war, wurde das Säulenbett einmal mit 10 mL Puffer QC gewaschen. Die adsorbierte Plasmid-DNA wurde mit 5 mL Puffer QF eluiert und in einem Gefäß gesammelt, in dem 4 mL Isopropanol vorlagen. Die Isopropanol-fällung wurde 30 Minuten inkubiert und der entstandene Niederschlag wurde 45 Minuten bei 8 °C mit maximaler Umdrehungszahl pelletiert. Das Pellet wurde durch Resuspendieren in 2 mL Ethanol gewaschen und in 2 mL-Gefäße überführt, die mit höherer Geschwindigkeit zentrifugiert werden konnten. Durch Zentrifugation mit maximaler Umdrehungszahl (hier 20.817 rcf) für 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde erneut ein Pellet gebildet. Der Ethanolüberstand wurde verworfen und das Pellet im Brutschrank etwa 20 Minuten lang bei 37 °C getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 50 bis 100 µL TE-Puffer gelöst und in ein steriles Gefäße überführt. Die Lösung wurde bei –20 °C gelagert und ist laut Hersteller für mehrere Jahre stabil.

P1 (Resuspendierungs-Puffer)

50 mM Tris, pH 8,0 mit HCl
10 mM EDTA
Zugabe von 100 µg/ml RNase A

P2 (Lysis-Puffer)

200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)

P3 (Neutralisierungs-Puffer)

3,0 M Kaliumacetat
pH 5,5

QBT (Äquilibrierungs-Puffer)

750 mM NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15% Isopropanol (v/v);
0,15% Triton® X-100 (v/v)

QC (Wasch-Puffer)

1.0 M NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15% Isopropanol (v/v)

QF (Elutions-Puffer)

1,25 M NaCl
50 mM Tris, pH 8,5
15% Isopropanol (v/v)

TE (Puffer für die Lagerung)

10 mM Tris, pH 8,0 mit HCl
1 mM EDTA

Konzentration und Reinheitsgrad der DNA-Präparation

Um die Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung zu bestimmen, wurde die Extinktion der geeignet verdünnten Lösung bei 260 nm und 280 nm gemessen. Eine A_{260} -Einheit entspricht dabei einer DNA-Konzentration von $50 \mu\text{g/mL}$. Für Midi-Präparationen bewährte sich ein Verdünnungsfaktor (VF) von 100. Es wurden $6 \mu\text{L}$ der DNA-Lösung mit $594 \mu\text{L H}_2\text{O}$ in eine 1 mL-Quarzküvette pipettiert. Als Referenz diente eine mit Wasser gefüllte Quarzküvette. Die verdünnte DNA-Lösung wurde bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die DNA-Konzentration [DNA] berechnet sich wie folgt:

$$[\text{DNA}] \mu\text{g/mL} = A_{260} \times 50 \times \text{VF}$$

Das A_{260}/A_{280} -Verhältnis reiner Nucleinsäuren liegt bei 2,0, das von reinem Protein bei 0,6. Ein A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 1,8 bis 2,0 entspricht deshalb einer DNA-Reinheit von 90% bis 100% [Mülhardt 2003].

Alternativ wurde der ungefähre Ertrag und die Qualität der erhaltenen Plasmid-DNA durch Agarosegelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung bestimmt. Dieses Verfahren bot sich für Mini-Präparationen an, da sie meistens durch enzymatischen Verdau analysiert und zur Visualisierung der Bruchstücke ohnehin auf ein Agarosegel aufgetragen wurden.

5.2.2. Polymerase-Kettenreaktion

DNA-Fragmente wurden durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert [Mullis 1986, Saiki 1988]. Verwendete Primer waren etwa 30 Basen lang und enthielten nicht mehr als drei gleiche Basen nacheinander, um Fehlhybridisierungen und Leserasterfehler (frameshifts) zu vermeiden. Die Schmelztemperatur der jeweiligen Primer wurde aus dem Datenblatt des Herstellers übernommen und lagen zwischen 60 und 80°C. Um eine gute Bindung und Elongation zu erhalten, befanden sich am 3'-Ende der Primer G oder C.

Die Konzentration der als Primer verwendeten Oligo-Nucleotide (Sigma Genosys, Steinheim) wurden mit Wasser auf 100 μM eingestellt. Für die verwendete *VentR* DNA-Polymerase (NEB, Frankfurt a. M.) wurde eine Elongationszeit von etwa einer Minute pro 1000 Basenpaare (bp) angenommen. Als Template diente DNA aus Mini- oder Midi-Präparationen.

PCR-Ansatz 50 μ L (Reagenzien von NEB, Frankfurt a. M.)

36 μ L Template, verdünnt:

a) 10 μ L Miniprep + 26 μ L Wasser

b) 1 μ L Midiprep + 35 μ L Wasser

1 μ L Primer sense, 100 μ M

1 μ L Primer antisense, 100 μ M

4 μ L dNTP-Lösung, 10 mM je Nucleotid

2 μ L MgSO₄, 100 mM

5 μ L Thermopol-Puffer, 10-fach

1 μ L *Vent*R DNA Polymerase, 2000 U/mL

PCR-Programm (Gerät: Mastercycler von Eppendorf, Hamburg)

Deckeltemperatur [LID] 105 °C

1. Initiale Denaturierung 95 °C 2:00 min
2. Denaturierung 95 °C 0:45 min
3. Annealing (Schmelztemperatur der Primer) 0:30 min
4. Elongation 72 °C (1 min pro 1000 bp)
5. 35 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4 [GOTO 2 REP 35]
6. Finale Elongation 72 °C 10 min
7. Kühlen [HOLD] 10 °C

5.2.3. Mutagenese

Restriktionsschnittstellen und gezielte Punktmutationen wurden durch PCR unter Verwendung spezieller Primer eingeführt. Die um 30 Nukleinbasen langen Primer besaßen einen homologen Bereich am 3'-Ende von mindestens acht Nucleotiden, weiter Richtung 5'-Ende folgten eine oder mehrere Mutationen. Die PCR wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Anschließend folgte eine Reinigung durch Ethanol-fällung. Um eine hohe Ausbeute an mutierten Klonen zu erzielen, sollte möglichst wenig der Template-DNA in die Bakterienzellen gelangen. Darum wurde

die parentale methylierte Plasmid DNA durch Restriktion mit *DpnI* abgebaut, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA schneidet.

Ethanol­fällung

- 50 μL PCR-Produkt
- 5 μL Natriumacetat 3 M, pH 5,2
- 125 μL Ethanol, reinst

1. Ansatz 15 min bei Raumtemperatur ruhen lassen
2. Ansatz 15 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
3. Überstand abpipettieren
4. Pellet für 30 min bei 37°C trocknen
5. Pellet in 17 μL Wasser aufnehmen

DpnI-Restriktion 20 μL , 37°C, 1 h (Reagenzien von NEB, Frankfurt a. M.)

- 17 μL DNA-Lösung aus Ethanol­fällung
- 2 μL Puffer NEB 4, 10-fach
- 1 μL *DpnI* Restriktionsendonuclease, 20.000 U/ml

5.2.4. Restriktion und Ligation

Restriktion

Restriktionsendonukleasen spalten DNA spezifisch an Restriktionsschnittstellen. Die Enzyme werden in einer Pufferlösung mit 50% Glycerin und Stabilisierungszusätzen wie EDTA, DTT, Triton X-100 und BSA geliefert und bei -20°C gelagert. Während der Entnahme von Enzym aus dem Vorratsgefäß wurde dieses im Eisbad gekühlt. Mit dem Enzym wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer und gegebenenfalls eine BSA-Lösung geliefert. Optimale Inkubationszeit und Temperatur wurden dem Herstellerprotokoll entnommen. Manche Enzyme ließen sich durch ein bestimmtes Temperaturprogramm deaktivieren.

Zu analytischen Zwecken wurden 0,5 bis 1 μg DNA mit einer Einheit Restriktionsendonuklease in einem Gesamtvolumen von 10 bis 20 μL für ein bis zwei Stunden verdaut. Die Bruchstücke wurden durch Agarosegelelektrophorese visualisiert. In präparativen Ansätzen wurden bis zu 10 μL DNA in einem Volumen von 40 μL verdaut. Der Verdau einer Mini-Präparation wurde in einem Volumen von 20 μL angesetzt.

Restriktions-Ansatz 20 μL für Miniprep-Lösungen (Reagenzien von NEB, Frankfurt a. M.)

- 5 μL Miniprep-Lösung
- 2 μL Reaktionspuffer (je nach Enzym) 10-fach konzentriert
- 2 μL BSA-Lösung 10-fach (erforderlich je nach Enzym)
- 10 μL Wasser (ohne BSA: 12 μL)
- 1 μL Restriktionsendonuklease

Ligation

Die Ligation von linearisierten, gereinigten Plasmiden und DNA-Fragmenten mit komplementären Enden erfolgte mit der T4 DNA-Ligase (Roche, Mannheim). Die Menge der eingesetzten Fragmente stand im umgekehrten Verhältnis zu ihrer Länge. Die Ligationstemperatur wurde nach einer Faustformel ermittelt, in der ausgehend von 0°C für Blunt-Ends pro überhängendes Nucleotid 4°C addiert wurden. Beispielsweise wurde ein zweifacher Überhang bei $2 \times 4^\circ\text{C} = 8^\circ\text{C}$ ligiert. Ligationen fanden je nach Temperatur auf Eis, im Kühlschrank, im Wasserbad oder im PCR-Gerät statt und dauerten 4 Stunden.

Ligations-Ansatz 20 μL (Reagenzien von Roche, Mannheim)

- 17 μL DNA-Fragmente
- 2 μL T4 DNA-Ligase Puffer 10-fach
- 1 μL T4 DNA-Ligase

5.2.5. Klenow Fill-in Reaktion

Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *Escherichia coli* zeigt eine 5'-3'-Polymerase-Aktivität und eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität. Mit Hilfe des Enzyms können aus Sticky Ends mit überhängenden Basen glatte Blunt Ends geschnitten (3'-Überhang), beziehungsweise aufgefüllt (5'-Überhang), werden.

Die Polymerisierung eines zweifachen 5'-Überhangs zum Blunt End wurde 15 Minuten lang bei 25 °C im Heizblock durchgeführt. Der 40 µL-Ansatz wurde mit NEB 4 gepuffert und enthielt 10 µg DNA aus einer vorangegangenen Restriktion. Außerdem wurden 2 µL Klenow-Polymerase und 4 µL dNTP-Lösung 33 µM verwendet (Reagenzien von NEB, Frankfurt a. M.). Anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen auf 75 °C für 30 Minuten deaktiviert.

5.2.6. Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion

Die Reinheit und Konzentration von DNA-Präparationen wurde durch elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in 1%-igen Agarosegelen überprüft [Sambrook 1989]. Die Agarose für die Gele wurde jeweils frisch angesetzt, in einem Microwellengerät aufgeköcht und in Gelschlitten gegossen.

TAE-Puffer

- 40 mM Tris, pH 7,4
- 20 mM Eisessig
- 1 mM EDTA

Agarosegel 1%-ig

- 0,6 g Agarose (Roth, Karlsruhe)
- 60 mL TAE-Puffer

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit Ladepuffer versetzt. Für ein Probenvolumen von 20 µL wurde typischerweise nur 1 µL des 10-fach konzentrierten Ladepuffers verwendet. Für die Bestimmung der Fragmentgröße

wurden 8 μL 1 kb-Marker aufgetragen, der DNA-Fragmente von 0,5 bis 10 kb (Kilobasenpaaren) enthielt. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 90 V für ein bis zwei Stunden durchgeführt. Die Färbung der Banden im Gel erfolgte im Ethidiumbromidbad (10 mg/mL) innerhalb von 10 bis 20 Minuten. Zur Visualisierung der Banden wurde das Gel mit einem Kamerasystem (LTF-Labortechnik, Wasserburg) mit UV-Durchlichteinheit betrachtet. Das Bild konnte ausgedruckt oder digital gespeichert werden.

Ladepuffer für Agarosegelelektrophorese, 10-fach

- 0,25% Bromphenolblau
- 0,25% Xylencyanol FF
- 30% (w/v) Glycerin

1 kb-Marker, 100 μL

- 20 μL 1 kb-DNA-Leiter (NEB, Frankfurt a. M.)
- 70 μL TE-Puffer (5.2.1)
- 10 μL Ladepuffer für Agarosegelelektrophorese, 10-fach

Bestimmte DNA-Fragmente wurden aus präparativen Agarosegelen extrahiert. Dazu wurden Gelblöcke mit dem gewünschten Fragment mit einem Skalpell auf dem UV-Tisch ausgeschnitten. Aus den Blöcken wurde die DNA mit dem E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) nach Herstellerangaben gewonnen.

5.2.7. Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. und wurde am Cologne Center for Genomics (Universität zu Köln, Institute für Genetik, Köln) mit dem ABI 3730 DNA Analyzer (Perking Elmer Applied Biosystems, Freiburg) durchgeführt [Sanger 1977]. Die Vorbereitung der Template-DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Perking Elmer Applied Biosystems, Freiburg). Die Template Konzentration

von PCR-Fragmenten sollte zwischen 1 und 50 ng liegen. Midipreps wurden entsprechend mit Wasser auf 50 ng pro 15 μL verdünnt und eingesetzt. Von Minipreps wurden 3 μL in 12 μL Wasser verwendet. Zur Auswertung der Sequenzdaten diente die freie Software Chomas Lite 2.01 (Technelysium, Tewantin, Australia). Mit der Methode konnten Sequenzlängen von 500 bis 800 Basen bestimmt werden.

Sequenzierungs-Ansatz 20 μL (Reagenzien von Perking Elmer Applied Biosystems, Freiburg)

15 μL Template, verdünnt:

- a) 3 μL Miniprep + 12 μL Wasser
- b) 15 μL Midiprep, 50 ng/15 μL

1 μL Primer, 50 μM

3 μL BigDye v1.1 Puffer 5X

1 μL BigDye v1.1 Mix

Sequenzierungs-Programm (Gerät: Mastercycler von Eppendorf, Hamburg)

Deckeltemperatur [LID] 105 °C

1. Initiale Denaturierung 95 °C 0:30 min
2. Denaturierung 95 °C 0:10 min
3. Annealing 50 °C 0:05 min
4. Elongation 60 °C 4:00 min
5. 25 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4 [GOTO 2 REP 25]
6. Kühlen [HOLD] 10 °C

5.3. Expressionsvektoren

Für die Expression wurde das T7-Promotorsystem und der Organismus *Escherichia coli* BL21(DE3) gewählt. Für die anschließende Isolierung des Enzyms wurde ein N-terminaler His-Tag eingeführt.

Humane HMGR besitzt eine Transmembrandomäne, die über eine bewegliche Linker-Region mit der katalytischen Domäne verbunden ist. Die hydrophobe Transmembrandomäne kann bei der bakteriellen Expression die Löslichkeit des Enzyms im Cytoplasma des Bakteriums ungünstig beeinflussen. Die Aktivität der katalytischen Domäne wird jedoch nicht durch die Transmembrandomäne beeinflusst [Istvan 2000]. Daher wurde die entsprechende Sequenz vor der Expression aus dem Gen entfernt.

5.3.1. Plasmid p02-RZPD

Ein Expressionsvektor mit der Gen für humane HMGR wurde beim Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD¹, Berlin) bestellt. Geliefert wurde eine Lösung von 2 μg gereinigter DNA in 25 μL Puffer. Der Vektor enthielt den OmicsLink ORF Expression Clone EX-Z0529 mit der Zielsequenz BC033692² im Vektor pReceiver-B01 (GeneCopoeia, Germantown, Maryland). N-terminal schloss sich an den Open Reading Frame mit dem menschlichen Gen eine Sequenz für einen His-Tag an, mittels dessen das Protein nach der Expression aufgereinigt werden konnte. Der Vektor war für die Expression in *Escherichia coli* optimiert und enthielt einen T7-Promotor für die induzierte Expression und ein Ampicillin-Resistenzgen, für die selektive Kultivierung der transformierten Bakterienzellen.

Abbildung 5.1 zeigt eine vereinfachte Vektorkarte des insgesamt 7315 bp langen, ringförmigen Plasmids. Die Klonierungsstrategie sah vor, die Transmembrandomäne zwischen *Bst*BI(122) und *Sca*I(1283) zu entfernen. Für beide Restrikti-

¹Die RZPD GmbH wurde zum 31.07.2007 aufgelöst.

Der Service wird von ImaGenes, Berlin, fortgeführt.

²National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

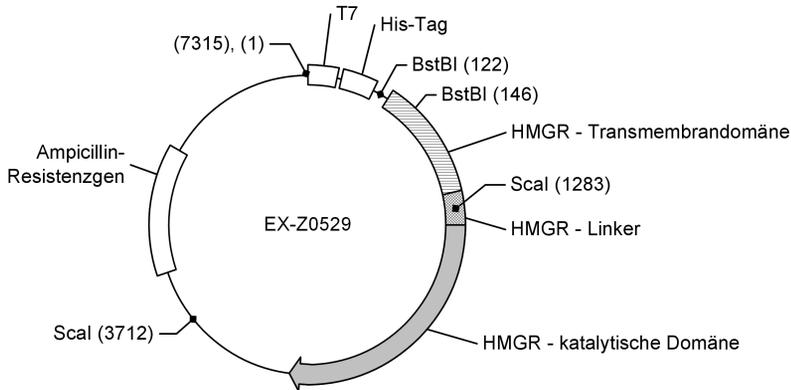


Abbildung 5.1.: Expressionsvektor EX-Z0529 mit T7-Promotor, His-Tag, Ampicillin-Resistenzgen, HMGR-Gen mit Transmembrandomäne, Linkerregion und katalytischer Domäne. Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *BstBI* und *ScaI* sind markiert.

onsenzyme existieren jeweils zwei Schnittstellen auf dem Plasmid. Die zweite *BstBI*-Schnittstelle liegt innerhalb des zu entfernenden Bereichs und konnte daher vernachlässigt werden. Nach der Restriktion mit *BstBI* wurde der 5'-Überhang mit der Klenow-Reaktion zum Blunt End aufgefüllt. Anschließend wurde eine partielle *ScaI*-Restriktion durchgeführt. Im dazu verwendeten Puffer NEB 4 (NEB, Frankfurt a. M.) besaß *ScaI* nur 25% seiner optimalen Aktivität, so dass innerhalb einer Stunde bei 37 °C die Plasmide zum großen Teil nur an einer der beiden Schnittstellen gespalten wurden. Anschließend wurde das gewünschte Fragment von 6026 bp durch ein präparatives Agarosegel isoliert und aus dem Gel extrahiert. Eine Ligation des aufgefüllten *BstBI*(122)-Überhangs mit der glatten *ScaI*(1283)-Schnittstelle lieferte wieder ein ringförmiges Plasmid. Wie in Tabelle 5.1 dargestellt, ergänzten sich die Schnittstellen zu einem Basentriplett, wodurch das Leseraster erhalten blieb. Der Vektor wurde durch Sequenzierung auf die Abwesenheit unerwünschter Mutationen oder Deletionen überprüft.

Method	Sequenz	Position
Restriktion mit <i>Bst</i> BI	5'-GTT CGA ACC-3' 3'-CAA GC A TGG-5'	122
Klenow-Polymerisation	5'-GTT CG -3' 3'-CAA GC -5'	124
Restriktion mit <i>Sca</i> I	5'-A TG A CTG-3' 3'-T CA T GAC-5'	1283
Ligation der Schnittstellen	5'-GTT CG A TGA-3' 3'-CAA GC T GAC-5'	124, 1283

Tabelle 5.1.: Klonierungsstrategie für den Expressionsvektor p02-RZPD. Der Vektor wird um das Stück zwischen den Schnittstellen *Bst*BI und *Sca*I verkürzt. *Bst*BI produziert einen zweifachen Basenüberhang, der mit Klenow-Polymerase zum blunt End aufgefüllt wird. Die Ligation der Schnittstellen erhält das Leseraster. Position: Nummer des Nukleotids vor der senkrechten Markierung in der Sequenz bezogen auf den 5'-Strang des Ursprungsvektors.

***Bst*BI-Restriktion in 30 μ L (Reagenzien von NEB, Frankfurt a. M.)**

24 μ L DNA, 10 μ g

3 μ L Puffer NEB 4, 10-fach

3 μ L *Bst*BI

Der Ansatz inkubierte über Nacht bei 65°C. Zur Überprüfung des Ergebnisses wurden 3 μ L des Ansatzes auf Agarosegel aufgetragen.

***Klenow*-Reaktion in 40 μ L (Reagenzien von NEB, Frankfurt a. M.)**

27 μ L *Bst*BI-Ansatz (in Puffer NEB 4)

5,7 μ L Wasser

1,3 μ L Puffer NEB 4, 10-fach

4 μ L dNTP-Lösung, 33 μ M

2 μ L Klenow

Der Ansatz inkubierte 15 Minuten bei 25°C. Die Klenow-Deaktivierung erfolgte bei 75°C für 30 Minuten.

***ScaI*-Restriktion in 42 μL (Reagenzien von NEB, Frankfurt a. M.)**

40 μL Klenow-Ansatz (in Puffer NEB 4)

2 μL *ScaI*

Der Ansatz inkubierte 1 Stunde bei 37°C. Anschließend wurde das gesuchte 6026 bp-Fragment durch Agarosegelelektrophorese und Gel-extraktion isoliert.

Ligation des 6026 bp-Fragments in 15 μL

(Reagenzien von Roche, Mannheim)

12,5 μL 6026 bp-Fragment aus Gelextraktion

1,5 μL Ligase-Puffer, 10-fach

1 μL T4-DNA-Ligase

Der Ansatz inkubierte 2 Stunden bei 23°C und weitere 2 Stunden bei 4°C. Anschließend wurde der Vektor in *Escherichia coli* DH5 α transformiert.

5.3.2. Plasmid pA1-ATCC

Ein Plasmid mit dem Gen für humane HMGR wurde bei der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia) unter der Produktnummer 57042 bestellt. Die Lieferung enthielt eine gefriergetrocknete *Escherichia coli* Kultur, die den Vektor pcDV1 mit dem humanen HMGR-Gen BC024180 (NCBI) trug. Da es sich bei dem Vektor nicht um einen Expressionsvektor handelte, wurde das für die katalytische Domäne des Enzyms kodierende Fragment (Aminosäuren 420-888 [Istvan 2000]) durch PCR amplifiziert, und anschließend in einen Expressionsvektor eingesetzt. Dabei wurden an den Enden des 1428 bp langen DNA-Fragments Restriktionsschnittstellen für *Afl*III und *Bam*HI durch entsprechend modifizierte Primer eingeführt. Das Fragment wurde zwischen die *Nco*I und *Bam*HI Schnittstellen des Expressionsvektors pNHis [Chatterjee 2005] eingesetzt, wie in Abbildung 5.2 gezeigt. Der pNHis-Vektor trägt eine T7-Promotor Erkennungssequenz und eine His-Tag Sequenz, die nach der Insertion stromaufwärts des HMGR-Gens liegen.

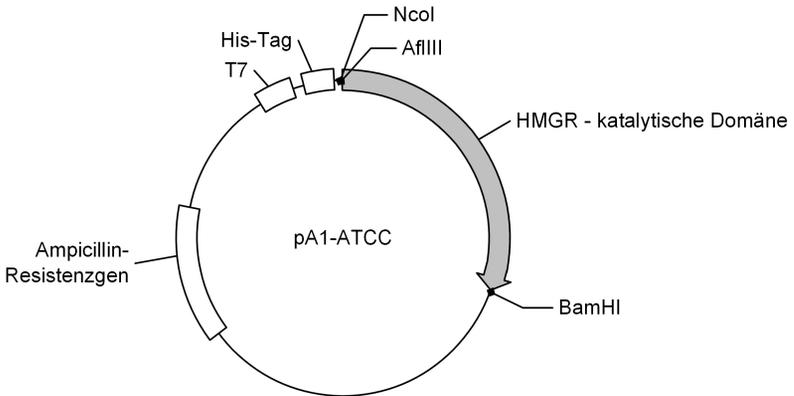


Abbildung 5.2.: Expressionsvektor pA1-ATCC. Er besteht aus dem pNHis-Vektor mit T7-Promotor, His-Tag und Ampicillin-Resistenzgen, sowie dem Fragment, das für die katalytische Domäne der HMGR kodiert. Beide Fragmente wurden durch Ligation miteinander verbunden. Die ligierten Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *NcoI*, *AflIII* und *BamHI* sind markiert.

Außerdem ermöglicht das Ampicillin-Resistenzgen auf pNHis die selektive Kultivierung von transformierten Bakterienzellen. Wie aus Tabelle 5.2 zu entnehmen ist, konnten sich Insert und pNHis nur in einer Orientierung miteinander verbinden, wodurch eine Fehlordnung der Fragmente ausgeschlossen werden konnte. Die Abwesenheit unerwünschter Mutationen oder Deletionen im Vektor wurde durch Sequenzierung überprüft. Das Plasmid wurde in *Escherichia coli* DH5 α amplifiziert.

Das HMGR-Gen besitzt ein internes Startcodon für die Translation, das zur Expression unvollständiger HMGR-Moleküle führen kann [Mayer 1988]. Um dies zu vermeiden, wurde M485 zu I485 mutiert. Die enzymatische Aktivität der M485I-Mutante unterscheidet sich laut Istvan et al. nicht von der des Wildtyp-Proteins [Istvan 2000].

Primer für PCR-Amplifikation und Mutagenese (Sigma Genosys, Steinheim), mutierte Basen in Kleinbuchstaben

Start sense:

5'-C TCC TCC TTA CTC GAc Atg TCA TCA GTA CTG-3'

Ende antisense:

5'-CA GAA CTG TCG GGA TCC TCA GGC TGT CTT C-3'

MutA sense:

5'-G TTG GAA ACT CTG ATt GAA ACT CAT GAG C-3'

MutB antisense:

5'-G CTC ATG AGT TTC aAT CAG AGT TTC CAA C-3'

Method	Schnittstelle	Sequenz
Restriktion	<i>AflIII</i> , <i>BamHI</i>	5'-GA C ATG TCA-(PCRf)-TGA G GA TCC CGA-3' 3'-CTG TAC AGT-(PCRf)-ACT CCT AG G GCT-5'
Restriktion	<i>NcoI</i>	5'(pNHis)-AC C ATG G-3' 3'(pNHis)-TGG TAC C-5'
Restriktion	<i>BamHI</i>	5'-G GA TCC-(pNHis)3' 3'-CCT AG G-(pNHis)5'
Ligation	<i>NcoI</i> , <i>AflIII</i>	5'(pNHis)-AC C ATG TCA-(PCRf)3' 3'(pNHis)-TGG TAC AGT-(PCRf)5'
Ligation	<i>BamHI</i>	5'(PCRf)-TGA G GA TCC-(pNHis)3' 3'(PCRf)-ACT CCT AG G-(pNHis)5'

Tabelle 5.2.: Klonierungsstrategie für den Expressionsvektor pA1-ATCC. Das Fragment für die katalytische Domäne der HMGR wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen *AflIII* und *BamHI* geschnitten. Der Expressionsvektor pNHis wurde mit *NcoI* und *BamHI* geschnitten. Die Ligation der Schnittstellen ist nur in einer Orientierung möglich und erhält das Leseraster. PCRf: PCR-Fragment.

5.4. Protein-Techniken

5.4.1. Expression in *Escherichia coli*

Für die Expression des Fusionsproteins, bestehend aus der katalytischen Domäne und dem His-Tag, wurde der entsprechende Vektor in *Escherichia coli* BL(DE3) transformiert. Der Bakterienstamm wurde wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben in 300 mL Medium kultiviert (Seite 75). Die Expression des Enzyms wurde durch Zugabe von 300 μL 1 M IPTG-Lösung, was einer Endkonzentration im Kulturmedium von 1 mM entsprach, induziert. Die Expression erfolgte innerhalb von 4 Stunden bei 25 °C und 150 rpm auf dem Flachbettschüttler [Carbonell 2005]. Die Zellen wurden durch 10-minütige Zentrifugation in mehreren 50 mL-Falcontubes bei 6000 rcf und 8 °C geerntet. Die Falcontubes wurden jeweils zweimal befüllt und der Überstand zwischen den Läufen abgegossen. Dadurch befanden sich anschließend Pellets von jeweils 100 mL Bakterienkultur in den Gefäßen. Die Ernte wurde bei –80 °C gelagert und war so mindestens ein Jahr lang haltbar.

5.4.2. Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Zur Reinigung des Fusionsproteins, bestehend aus katalytischer Domäne und Polyhistidin-Sequenz, wurde Ni-NTA Agarose verwendet (Qiagen, Hilden). In diesem Material sind Nickel-Ionen über eine Nitrilotriacetat Matrix an Sepharose CL-6B immobilisiert. Zwei benachbarte Histidinreste des His-Tags bilden mit Nickel-Ionen einen zweizähligen Metallchelate-Komplex. Durch die gezielte Wahl von pH-Wert und Imidazol-Konzentration in den diversen verwendeten Puffern, kann das Enzym am Ni-NTA Harz immobilisiert oder davon gelöst werden.

Die Aufreinigung wurde nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers durchgeführt [Qiagen GmbH 2003]. Zunächst wurden 2 mL der Ni-NTA Matrix pro 100 mL Bakterienkultur zweimal mit Lysispuffer gewaschen und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert. Die Bakterienzellpellets wurden in Lysispuffer resuspendiert. Pro 100 mL-Fraktion wurden 10 mL Lysispuffer verwendet. Für den

Lysozymaufschluss wurden pro 100 mL Kultur 0,01 g Lysozym (Merck, Darmstadt) eingewogen. Der Lysozymansatz wurde gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurde er alle 10 Minuten erneut gemischt. Im anschließenden Ultraschallaufschluss wurde die auf Eis gekühlte Zellsuspension dreimal für je 15 Sekunden mit einem Ultraschallstab bei etwa 48% der Maximalstärke behandelt. Zwischen den einzelnen Behandlungen lagen Pausen von je 1 Minute. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 15.000 rcf für 10 Minuten bei 8 °C pelletiert. Von dem Lysat wurden 20 µL abgenommen und mit 10 µL SDS-Auftragspuffer (Seite 98) versetzt und als Lysat-Probe bis zur Weiterverarbeitung bei –20 °C gelagert.

Das Lysat wurde durch einen Faltenfilter in einen Erlenmeyerkolben überführt und mit 2 mL equilibrierter Ni-NTA Matrix pro 100 mL Kultur versetzt. Mit einem Rührfisch rührte der Ansatz mindestens 90 Minuten im Kühlraum bei 4 °C. Vom Pellet wurde eine Probe genommen. Dazu wurde das Pellet in dem nach dem Dekantieren zurückbleibenden Volumen des Lysats so gut wie möglich resuspendiert. Von der Suspension wurden 10 µL pipettiert und mit 20 µL SDS-Auftragspuffer (Seite 98) versetzt und als Pellet-Probe bis zur Weiterverarbeitung bei –20 °C gelagert.

Der Ni-NTA-Ansatz wurde in eine 14 mL-Einwegsäule (Macherey-Nagel, Düren) überführt, der Überstand lief durch. Die Säule wurde mit etwa 20 mL Lysispuffer gespült bis die OD₂₈₀ des Durchlaufs weniger als 0,01 betrug. Anschließend wurde das Säulenbett mit 10 mL Waschpuffer gewaschen und die Waschfraktionen in 2 mL-Eppendorfgefäßen gesammelt. Das Protein wurde mit 10 mL Elutionspuffer eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden wie die Waschfraktionen gesammelt.

Lysispuffer (Qiagen, Hilden)

50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0 mit NaOH

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

Waschpuffer (Qiagen, Hilden)

50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0 mit NaOH
300 mM NaCl
20 mM Imidazol

Elutionspuffer (Qiagen, Hilden)

50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0 mit NaOH
300 mM NaCl
250 mM Imidazol

5.4.3. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von Enzymlösungen wurde nach der Methode von Bradford bestimmt [Bradford 1976]. Sie beruht auf der unspezifischen Färbung von Proteinen durch Coomassie-Brillant-Blau G-250, die in saurer Lösung im Spektrophotometer bei 595 nm gegen eine proteinfreie Referenzlösung gemessen werden kann.

Für die Messung einer 100-fach verdünnten Proteinlösung wurden 792 μL Wasser und 200 μL vorgefertigte Protein Assay-Reagenz (Bio-Rad, München) in eine Einwegküvette pipettiert. Von der Proteinprobe wurden 8 μL zugegeben und der Ansatz durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Eine Referenzküvette wurde mit 800 μL Wasser und 200 μL Protein Assay-Reagenz gefüllt. Die Ansätze inkubierten für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde bei 595 nm der Nullpunkt des Spektrophotometers mit der Referenzlösung eingestellt und die optische Dichte OD₅₉₅ der Probe gemessen.

Die Berechnung der Proteinkonzentration beruhte auf einer zuvor angefertigten Eichgerade, bei der die optische Dichte einer Lösung gegen ihre Proteinkonzentration aufgetragen wurde. Die Konzentration unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde aus der Beziehung $\text{OD}_{595} = a + b \cdot [\text{Protein}]$ abgeleitet.

$$\text{Proteinkonzentration in g/mL} = \frac{\text{OD}_{595} - a}{b} \times \text{VF}$$

5.4.4. Stabilisierung der Enzymlösung

Die beiden konzentriertesten Elutionsfraktionen, typischerweise die zweite und dritte, wurden vereinigt. Um sie für die Lagerung bei -20°C vorzubereiten, wurde die Lösung in Edwards-Puffer [Edwards 1979] umgepuffert und mit 10% (v/v) Glycerin versetzt.

In eine Amicon Ultra 30.000 MW- Zentrifugeneinheit von Millipore wurden 4 mL Elutionsfraktionen, 0,5 mL Wasser und 1,5 mL 4-fach konzentrierter Edwards-Puffer pipettiert. Die Zentrifugation wurde für 20 Minuten bei 4000 rcf und 4°C durchgeführt. Dabei wurde das Volumen auf etwa 1 mL reduziert. Die Lösung wurde mit 1-fach konzentriertem Edwards-Puffer erneut auf 6 mL erweitert und unter den angegebenen Bedingungen zentrifugiert.

Der gepufferten Enzymlösung wurden 10% (v/v) Glycerin zugegeben. Die Lösung wurde in Aliquoten von 200 μL bei -20°C gelagert und blieb so mindestens ein halbes Jahr lang stabil.

Edwards-Puffer, 1-fach

200 mM KCl

160 mM K_2HPO_4 , pH 6,8 mit HCl

4 mM EDTA

10 mM DTT

5.4.5. Polyacrylamid Gelelektrophorese

Der Verlauf der Expression und die Qualität der Elutionsfraktionen wurde durch Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) überprüft. Dabei werden die Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS) beladen, wodurch ihre Eigenladung überdeckt wird. Die Auftrennung im elektrischen Feld beruht dann auf der relativen Größe der Proteinmoleküle.

Für die SDS-PAGE wurden die Fertiggele NuPAGE 10% Bis-Tris (Invitrogen, Carlsbad, California) verwendet. Die Elektrophorese folgte dem Protokoll des Herstellers unter denaturierenden Bedingungen [Invitrogen life technologies 2003].

Nach der Elektrophorese wurde das Gel dreimal für je 5 Minuten in Wasser gespült. Um die Proteinbanden zu fixieren, wurde das Gel 10 Minuten in einem Gemisch aus Wasser mit 50% Methanol und 7% Eisessig geschwenkt. Anschließend wurde die Fixierlösung durch 10-minütiges waschen mit Wasser entfernt. Zum Färben der Proteinbanden wurde die Fertiglösung Rotiphorese Blau R (Roth, Karlsruhe) verwendet. Nach der 4-stündigen Färbephase wurde das Gel über Nacht in Wasser gespült.

SDS-Auflagspuffer (reduzierend), 3-fach

- 60 mM Tris, pH 8,0 mit HCl
- 5 mM EDTA
- 20% (v/v) β -Mercaptoethanol
- 10% (w/v) SDS
- 0,3% (w/v) Bromphenolblau

SDS-PAGE Lauffpuffer

- 50 mM MES
- 50 mM Tris, pH 7,3 mit HCl
- 1 mM EDTA
- 0,1% SDS

5.4.6. Enzymreaktion mit Probennahme

Die HMGR-Enzymreaktion fand in einem phosphatgepufferten Reaktionssystem mit NADPH (Sigma Aldrich, Schnellendorf) und (*R, S*)-HMG-CoA (Sigma Aldrich, Schnellendorf) bei pH 6,8 statt. In eine Quarz-Microküvette (Hellma, Müllheim) wurden 800 μ L dieses Ansatzes pipettiert und im heizbaren Probenhalter des Spektrophotometers (Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, Bucks, Großbritannien) auf 37°C vorgewärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms eingeleitet. Die Enzymmenge wurde so gewählt, dass das Substrat (*S*)-HMG-CoA in weniger als 15 Minuten vollständig umgesetzt werden konnte. Der fortschreitende

NADPH-Abbau im Zuge der Enzymreaktion wurde mit dem Spektrophotometer beobachtet.

Pro Reaktionsansatz wurden bis zu drei Proben von 250 μL entnommen und in eisgekühlte Glasgefäße überführt, in denen eine Pravastatin-Lösung (Sigma Aldrich, Schnelldorf) vorgelegt worden war. Bei einer Reaktionslaufzahl von unter 0,15 wurden Proben von 500 μL entnommen und mit entsprechend mehr Pravastatin abgestoppt. Die Probennahme unterteilte sich in sechs Schritte. Abbildung 5.3 zeigt die zeitliche Reihenfolge der einzelnen Schritte bezogen auf die Zeitachse der Enzymreaktion. Die ersten Zeilen einer typischen Tabelle, wie sie während eines Experiments verwendet wurde, zeigt Abbildung 5.4.

HMGR-Enzymreaktion, Gesamtvolumen vor Enzymzugabe 800 μL

160 mM Kaliumphosphat, pH 6,8

200 mM KCl

420 μM NADPH

311 μM (*R,S*)-HMG-CoA

2 μL HMGR (ca. 20 mg/mL)

Stoppen der Reaktion mit 9 μL Pravastatin 5 mM pro 250 μL Probe

Ablauf der Probennahme während der Enzymreaktion

0. Bestimmung von jeweils einer Zufallszahl von 10 bis 100 für jede geplante Probe mit der R-Funktion `sample` (Abschnitt 5.6.3). Die Zahlen repräsentieren die angestrebten Reaktionslaufzahlen in Prozent, zu denen aus der Reaktion eine Probe entnommen werden sollte.

1. Vorwärmen der gepufferten Lösung mit den beiden Substraten HMG-CoA und NADPH auf 37 °C und Bestimmung des Startwerts der Extinktion.

2. Berechnung des voraussichtlichen Endwerts der Extinktion (Absorbanz, A) anhand einer Kalibriergeraden: $A = 0.5530 + 5.078 \times 10^{-3} \times [\text{NADPH}]$ in μM . Pro Mol HMG-CoA reagieren zwei Mol NADPH. Bei vollständiger Reaktion wird das Doppelte der eingesetzten HMG-CoA-Konzentration an NADPH verbraucht.

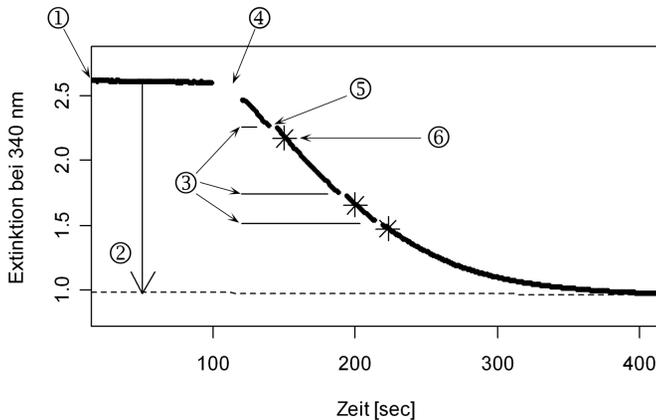


Abbildung 5.3.: Durchführung der Probennahme in sechs Einzelschritten: (1) Vorwärmen der Substratlösung; (2) Berechnung des erwarteten Endwerts der Extinktion; (3) Bestimmung der Extinktionswerte für die gewünschten Reaktionslaufzahlen; (4) Zugabe der Enzymlösung; (5) Entnahme einer Probe; (6) Pavastatinhemmung der Reaktion in der Probe.

3. Bestimmung der Extinktionswerte für die zuvor zufällig bestimmten Reaktionslaufzahlen: Der Extinktionswert für Start und Ende der Reaktion entspricht den prozentualen Reaktionslaufzahlen 0% beziehungsweise 100%. Der erwartete Extinktionswert für die Reaktionslaufzahlen wurden relativ zum gemessenen Startwert und dem berechneten Endwert bestimmt.
4. Zugabe der Enzymlösung: Die Deckelklappe des Spektrophotometers wurde kurz geöffnet und die Enzymlösung wurde zugegeben. Die dabei entstehenden unrelevanten Messwerte wurden später aus den Daten entfernt.
5. Entnahme einer Probe: Erneut wurde die Deckelklappe geöffnet, mit einer Messpipette eine Probe entnommen und die Klappe sofort wieder geschlossen.

		①	②		③	④	⑤		⑥		
			Diff(100) 1,5818			Enzym		Pr.vol		Prava	
t(Lauf)	Lauf	f _R %	A0	Diff(f _R)	A(f _R)	μL	VF	μL	t(Pr)	μL	ID
10	1	10	2,577	0,158	2,419	10	1:10	500	07:30	18	115
10		100	2,577	1,582	0,995	10	1:10	250	00:00	9	116
10	2	15	2,604	0,237	2,367	12	1:10	500	03:35	18	117
10		90	2,604	1,424	1,180	12	1:10	230	06:00	9	118
10	3	10	2,590	0,158	2,432	15	1:10	500	07:25	18	119
10		85	2,590	1,345	1,245	15	1:10	250	02:15	9	120
10	4	24	2,600	0,380	2,220	20	1:10	250	07:00	9	121
10		54	2,600	0,854	1,746	20	1:10	250	05:40	9	122
10		79	2,600	1,250	1,350	20	1:10	250	04:20	9	123

Abbildung 5.4.: Ausschnitt aus einer in der Praxis verwendeten Tabelle für die Probenahme. Der grau hinterlegte Bereich wurde während der Versuchsdurchführung ausgefüllt. Die Nummern über den Spalten beziehen sich auf die im Text beschriebenen Schritte. f_R%: Reaktionslaufzahl in %; A0: Startwert der Extinktion; Diff(100): erwartete Extinktionsdifferenz für die vollständige Umsetzung; Diff(f_R): erwartete Extinktionsdifferenz zwischen Start- und Endwert; A(f_R): erwartete Extinktion zur vorgegebenen Reaktionslaufzahl; VF: Verdünnungsfaktor der Enzymlösung; Pr.: Probe; Prava: Pravastatinlösung; Extinktion angegeben in Spektrophotometer-Einheiten.

6. Pravastatinhemmung der Reaktion in der Probe: Während der Verlauf der Extinktion weiter in der zurückbleibenden Lösung gemessen werden konnte, wurde die Probe in ein auf Eis gekühltes Glasgefäß mit Pravastatin überführt. Der genaue Zeitpunkt der Überführung wurde notiert, damit später die tatsächliche Reaktionslaufzahl für die jeweilige Probe berechnet werden konnte.

5.5. Probenvorbereitung und Massenspektrometrie

5.5.1. Lactonisierung und Festphasenextraktion

Um das zu analysierende Produkt der HMGR-Reaktion aus dem Reaktionsgemisch zu isolieren, wurde eine Festphasenextraktion (SPE) durchgeführt. Dazu wurde die Mevalonsäure zuerst zu Mevalonolacton lactonisiert. Das Volumen der Proben

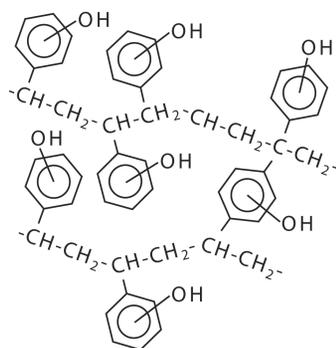


Abbildung 5.5.: Das Säulenmaterial der Einwegsäulen Isolute ENV+ 100 mg/ 3 ml ist ein hydroxyliertes Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer. Die stark unpolare Phase ist mit Wasser benetzbar. Abbildung aus den Produktinformationen des Herstellers Biotage, Grenzach-Wyhlen.

wurde durch Zugabe von 0.1 M HCl verdoppelt und der Ansatz 1 Stunde lang bei Raumtemperatur belassen.

Für die Festphasenextraktion wurden die Einwegsäulen Isolute ENV+ 100 mg/3 ml (Biotage, Grenzach-Wyhlen; ehemals Separtis) verwendet. Ihr Säulenmaterial ist ein hydroxyliertes Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer, eine stark hydrophobe Phase, die jedoch mit Wasser benetzbar ist (Abbildung 5.5). Die Durchführung der Extraktion folgte einer leicht modifizierten Beschreibung von Saini et al. [Saini 2006]. Die Proben wurden in randomisierter Reihenfolge bearbeitet.

SPE von Mevalonolacton mit Einwegsäulen Isolute ENV+

1. Vorbereiten der Säule: 3 mL Methanol, 1 mL Wasser
2. Auftragen der lactonisierten Probe
3. Spülen: 500 μ L 0,1 M HCl, 500 μ L Wasser
4. Trocknen des Säulenbetts
5. Eluieren: zweimal 500 μ L Methanol

Um das Säulenbett zu trocknen, wurde die Flüssigkeit durch leichten Überdruck heraus gepresst (dazu eignet sich beispielsweise eine 5 mL-Eppendorfpipette mit

gekürzter Spitze). Die Elution erfolgte mit zweimal 500 μL Methanol. Das erste Volumen Methanol benetzte das Säulenbett, das zweite eluierte die Analyten in ein Glasgefäß.

Die methanolische Lösung wurde im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Für die weitere Analyse wurden die Analyten in individuell bestimmten Volumina *tert*-Butylmethylether aufgenommen. Proben, die relativ zu Beginn der Enzymreaktion entnommen worden waren, enthielten weniger des zu analysierenden Produkts als später entnommene Proben. Die angepassten Lösungsmittelvolumina glichen die unterschiedlichen Analytenmengen aus und minimierten dadurch Konzentrationsunterschiede, welche die IRMS-Analyse ungünstig beeinflussen können [Leckrone 1998].

5.5.2. Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Zur Überprüfung der Festphasenextraktion und während der Methodenentwicklung wurden die extrahierten Substanzen mittels Gaschromatographie (GC) getrennt und durch Massenspektrometrie (MS) identifiziert. Für die GC wurde der Agilent Gaschromatograph 6890 (Agilent Technologies, Böblingen) mit der Säule Optima-1701 (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. An die GC war das Massenspektrometer Agilent 5973 N Mass Selective Detector (Agilent Technologies, Böblingen) gekoppelt. Die Parameter der GC-MS-Methode sind in Tabelle 5.3 aufgelistet.

5.5.3. Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie

Die stabilen Kohlenstoffisotopen von Mevalonolacton wurden mittels Gaschromatographie-gekoppelter Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (GC-C-IRMS) analysiert. Das GC-gekoppelte IR-Massenspektrometer wurde in stark modifizierter Form mit einem Kaltaufgabesystem (KAS) verwendet, wie von Flenker et al. beschrieben [Flenker 2007]. Abschnitt 2.1.3 dieser Arbeit beschreibt den Aufbau der verwendeten IRMS-Technik. Eine Übersicht über die Parameter der GC-C-IRMS-Methode mit KAS befindet sich in Tabelle 5.4. Die Proben wurden in randomisierter Reihenfolge gemessen.

Geräte für die Gaschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie	
MS-System	Agilent 5973 N Mass Selective Detector
GC-System	Agilent 6890 Series GC System
Trennsäule	Macherey-Nagel Optima-1701 Fused-Silica Kapillarsäule (Länge 30 m, Innendurchmesser 320 μm , Fimldicke 0,5 μm)
Parameter	
Einspritzblock	200 °C
Injektionsvolumen	1,0 μL
Splitverhältnis	1:10
Trägergas	Helium, 1,3 mL/min, konstanter Fluss
GC-Temperatur	Start: 100 °C; Rampe: 10 K/min; Ende: 250 °C
Transferline	300 °C
Quellentemperatur	230 °C
Multiplierspannung	1188,2 V
Ionisierung	EI (70 eV)

Tabelle 5.3.: Geräte und Parameter der Gaschromatographie-gekoppelten Massenspektrometrie (GC-MS) für die Substanz-Identifizierung.

Kaltaufgabesystem (KAS)

Um das Lösungsmittel vor der Gaschromatographie aus der Probe zu entfernen, wurde das Kaltaufgabesystem KAS-4 (Gerstel, Mülheim an der Ruhr) und eine zusätzliche Membran-Vakuumpumpe (N 86 KT.18, KNF Neuberger, Freiburg) verwendet. Das Lösungsmittel *tert*-Butylmethylether wurde bei einer Temperatur von 5 °C innerhalb einer Minute ausgeblendet. Der Spülfluss wurde auf 50 mL/min eingestellt, die Membranpumpe erzeugte ein Vakuum von $-0,1$ bar gegenüber dem Umgebungsdruck. Der Proben transfer auf die GC-Säule wurde innerhalb einer weiteren Minute bei 200 °C durchgeführt. Das Probenmaterial rekondensierte im Anfangsbereich der 35 °C kalten Säule. Anschließend wurde der Einspritzblock bei einer Temperatur von 300 °C und einem Heliumstrom von 100 mL/min gespült. Die Änderungsrate der Temperatur zwischen den unterschiedlichen Schritten betrug 10 K/s.

Geräte für die Gaschromatographie-gekoppelte Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie	
IRMS-System	Thermo Finnigan Delta ^{plus} XP Continuous Flow Stable Isotope Ratio Mass Spectrometer
Verbrennungs-Interface	Finnigan GC/C III Interface (Thermo Electron Corporation, Bremen)
GC-System	Agilent 6890 Series GC System
Trennsäule	Macherey-Nagel Optima-1701 (Länge 30 m, Innendurchmesser 320 μm , Filmdicke 0,5 μm)
Kaltaufgabesystem	Gerstel KAS-4
Membran-Vakuumpumpe	KNF Neuberger N 86 KT.18
Parameter für Kaltaufgabesystem	
Injektionsvolumen	8,0 μL
Vakuum	-0,1 bar
1) Lösungsmittelausblendung	1 min bei 5 °C, Heliumstrom 50 mL/min
2) Transfer auf GC	1 min bei 200 °C
3) Spülung Einspritzblock	300 °C, Helium, 100 mL/min
Parameter für Gaschromatographie	
Modus	Splitless
Trägergas	Helium, konstanter Fluss 1,8 mL/min
GC-Temperatur	Start 35 °C, 2 min; Rampe 1: 40 K/min bis 135 °C; Rampe 2: 10 K/min bis 250 °C
Parameter für Verbrennung	
Referenzgaspulse	350, 400, 450, 500, 1000, 1050 s
Oxidation	Cu/Ni/Pt, 940 °C
Wasserfalle	Aceton/Trockeneis, -80 °C
Parameter für Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie	
Ionisierung	EI (120-150 eV, 1,5 mA)
Software	Isodat NT 5.4

Tabelle 5.4.: Geräte und Parameter der Gaschromatographie-gekoppelten Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (GC-C-IRMS) mit Kaltaufgabesystem für die Bestimmung von Kohlenstoff Isotopenverhältnissen.

Gaschromatographie (GC)

Für die GC wurde der Agilent Gaschromatograph 6890 (Agilent Technologies, Böblingen) mit der Säule Optima-1701 (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die Säule besaß eine Länge von 30 m, einen Innendurchmesser von 320 μm und eine Filmdicke von 0,5 μm . Das Trägergas Helium wurde auf konstanten Fluß von 1,8 mL/min eingestellt. Die Anfangstemperatur von 35 °C wurde für 2 Minuten beibehalten. Es folgte eine Temperaturrampe von 40 K/min bis 135 °C, anschließend eine weitere von 10 K/min bis 250 °C.

Isotopenverhältnis Massenspektrometrie (IRMS)

Für die IRMS wurde ein Delta^{plus} XP (Thermo Electron, Bremen) verwendet. Vier Referenzgas-Peaks vor und drei nach den Retentionszeiten der Probenanalyten wurden erzeugt. Das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis der Analyten wurde mit der vom Hersteller bereitgestellten Software (Isodat NT 5.4, Thermo Finnigan MAT, Bremen) berechnet. Die Berechnung beinhaltete eine ^{17}O -Korrektur nach Santrock et al. [Santrock 1985].

Auswertung der Chromatogramme

Jeweils zwei unkontaminierte Referenzgaspeaks wurden verwendet um das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von Mevalonolacton zu berechnen. Das Referenzgas war über eine n-Alkan-Mischung gegen V-PDB [Gonfiantini 1995] kalibriert worden, welche die University of Indiana (Bloomington, Indiana, USA) zur Verfügung stellt [Schimmelmann 2004].

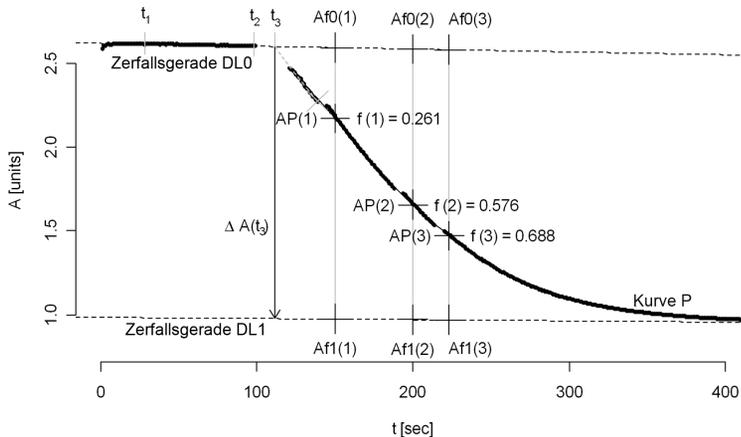


Abbildung 5.6.: Bestimmung der Reaktionslaufzahl f_R aus der spektrophotometrischen Extinktion (A) der Reaktionslösung. Erklärung im Text.

5.6. Datenanalyse

5.6.1. Berechnung der Reaktionslaufzahl

Die Reaktionslaufzahl f_R ist ein Maß für den Fortschritt einer Reaktion in Werten von Null bis Eins. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Enzymreaktionen mit einem Spektrophotometer überwacht und die gemessenen Extinktionswerte gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 5.6). Während der Probennahmen musste die Deckelklappe geöffnet werden. Die währenddessen aufgezeichneten Messpunkte wurden aus dem Diagramm entfernt. An die übrigen Messpunkte wurde zwischen dem Zeitpunkt der Enzymzugabe bis zum Ende der Messung eine Kurve P mittels kubischer Spline-Interpolation angepasst (Funktion `spline` [Chambers 1992b]).

Die gemessene NADPH-Abnahme wird als das Ergebnis zweier unterschiedlicher Ursachen angenommen. Diese sind der enzymunabhängige Zerfall und die Oxidation

im Zuge der Enzymreaktion. Um die Enzymreaktion getrennt behandeln zu können, wurden zwei Zerfallsgeraden konstruiert. Die Zerfallsgerade DL0 beschreibt die erwartete zeitabhängige Extinktion für $f_R = 0$ und wurde durch lineare Regression aus den Messpunkten vor der Enzymzugabe, zwischen t_1 und t_2 , ermittelt. Die Zerfallsgerade DL1 beschreibt Entsprechendes für $f_R = 1$. Für die Konstruktion von DL1 wurde die erwartete Extinktion am Punkt t_3 , dem Zeitpunkt der Enzymzugabe, aus der tatsächlich gemessenen Extinktion abzüglich der Extinktion, die der vollständigen Umsetzung der eingesetzten Menge (S)-HMG-CoA entspricht, ermittelt. Die Steigung von DL1 wurde als proportional zur Steigung von DL0 über den Extinktionsunterschied angenommen. Von der Kurve P kann die Extinktion AP zum Zeitpunkt einer Probennahme abgelesen werden. Die Reaktionslaufzahl ergibt sich aus dem Verhältnis der Extinktionsdifferenzen $f_R = (AP - Af_0)/(Af_1 - Af_0)$.

5.6.2. Berechnung des isotopischen Fraktionierungsfaktors

Als Datenbasis wurde eine repräsentative Anzahl an Messungen des Isotopenverhältnisses R_t des Produkts und der dazugehörigen Reaktionslaufzahl f_R verwendet. Aus den Daten wurde sowohl der isotopische Fraktionierungsfaktor α als auch das Isotopenverhältnis R_∞ des Produkts nach vollständiger Umsetzung extrahiert. Letzteres entspricht dem Isotopenverhältnis des Anfangsmaterials und ist daher konstant. Die Berechnung von α erfolgte nach zwei verschiedenen Methoden, die im Folgenden beschrieben werden.

Mittelwert-Methode

Bei dieser Methode wird ein Wert für R_∞ geschätzt, mit dem dann für jeden Datensatz (f_R, R_t) nach der Gleichung 2.11 (Seite 17) ein Einzelwert α_i berechnet wird. Durch Einsetzen des richtigen Werts für R_∞ ergibt sich theoretisch derselbe Fraktionierungsfaktor α_i für alle Wertepaare (f_R, R_t) . In der Praxis entstanden Abweichungen durch Messfehler in R_t und Unsicherheiten bei der Bestimmung von f_R . Daher wurde der fehlergewichtete Mittelwert aus den Einzelwerten α_i gebildet.

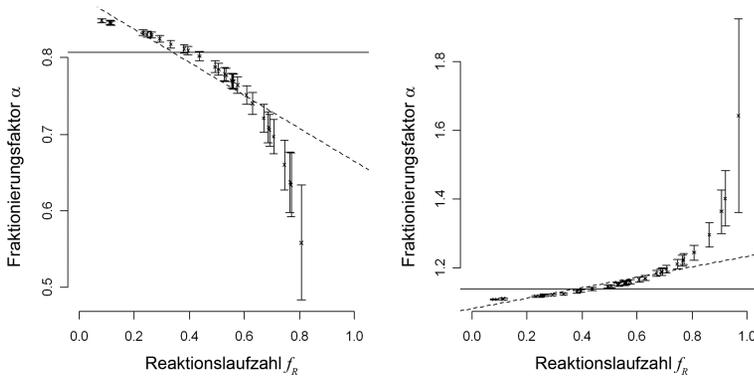


Abbildung 5.7.: Ermittlung eines Mittelwerts für den Fraktionierungsfaktor α aus den Einzelwerten α_i . Das Isotopenverhältnis des Anfangsmaterials R_∞ wird wiederholt geschätzt bis die Werte α_i unabhängig von der Reaktionslaufzahl f_R streuen. Durchgezogene Linie: gewichteter Mittelwert α ; durchbrochene Linie: gewichtete Regressionsgerade durch die Einzelwerte für α_i . Links: R_∞ wurde zu niedrig geschätzt; Rechts: R_∞ wurde zu hoch geschätzt.

Wurde R_∞ nicht korrekt angenommen, zeigten die Werte α_i eine systematische, f_R -abhängige Abweichung vom Mittelwert, wie Abbildung 5.7 illustriert.

In einem iterativen Verfahren wurde die Steigung einer gewichteten Regressionsgeraden durch die Punkte (f_{Ri}, α_i) bis zur Toleranz 1×10^{-10} gegen null optimiert. Dazu wurde der Funktion `optimize` [Brent 1973] ein Wertebereich für R_∞ übergeben, innerhalb dessen R_∞ solange variiert wurde, bis das Optimierungskriterium in der gewünschten Toleranzgrenze erreicht war. Die resultierende Geradengleichung lieferte als Achsenschnittpunkt den gewichteten Mittelwert und ein 95%-Konfidenzintervall für diesen Wert. Die Gewichtung erfolgte über den Term $1/\Delta\alpha_i$, der durch Fehlerfortpflanzung bestimmt wurde.

Für f_R wurde ein Fehler von $\Delta f_R = 3 \times 10^{-2}$ angenommen. Dieser Wert entspricht der maximalen Variation von f_R durch unterschiedliche Anpassung der Zerfallsgeraden. Der Fehler für $\Delta R_t = 7 \times 10^{-6}$ ist die Standardabweichung der

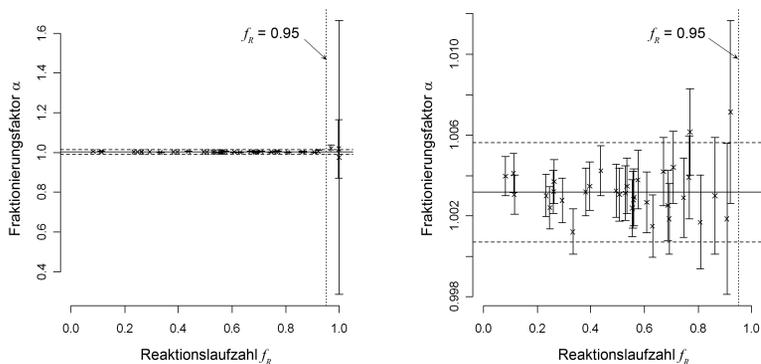


Abbildung 5.8: Berechnung von α als Mittelwert durch Anpassung von R_∞ . Der Wert α ergibt sich aus dem gewichteten Mittelwert der Einzelmessungen. Durchgezogene Linie: gewichteter Mittelwert; durchbrochene Linien: 95%-Konfidenzintervall des Mittelwerts. Links: alle Wertepaare; Rechts: nur Wertepaare mit $f_R < 0,95$.

Messwerte von der Regressionsgeraden R_t als Funktion von f_R . Der Fehler wurde dadurch absichtlich überschätzt, denn die Beziehung der beiden Größen lässt sich nur näherungsweise durch eine Geradengleichung beschreiben. Für den iterativ approximierten Wert R_∞ wird angenommen, dass er maximal mit demselben Fehler wie die Messwerte R_t behaftet ist: $\Delta R_\infty = \Delta R_t = 7 \times 10^{-6}$. Der Fehler für die Einzelwerte α_i wurde durch Gauß'sche Fehlerfortpflanzung aus den Fehlern Δf_R , ΔR_t und ΔR_∞ bestimmt.

Die Zunahme des Fehlers $\Delta \alpha_i$ mit wachsendem f_R resultiert aus der Funktionsgleichung für α , nicht aus der Annahme unterschiedlich großer Fehler für eine der Größen f_R , R_t oder R_∞ . Aufgrund der Abhängigkeit des Fehlers von der Reaktionslaufzahl wurden nur Wertepaare mit $f_R < 0,95$ in der Berechnung berücksichtigt. Abbildung 5.8 illustriert dieses Vorgehen.

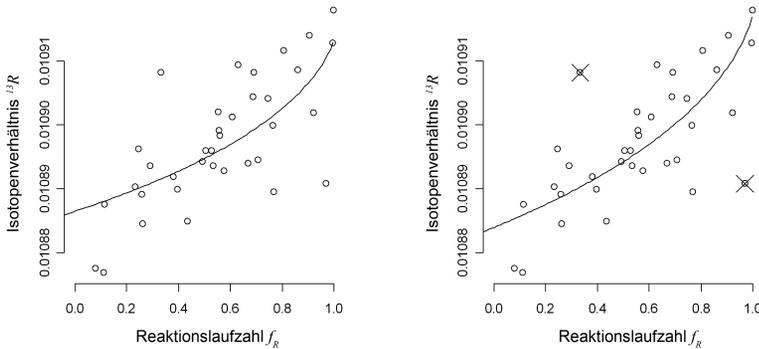


Abbildung 5.9.: Anpassung eines nichtlinearen Modells an die Punktwolke. Die Werte α und R_∞ ergeben sich als Parameter der Kurvengleichung. Die Diagramme zeigen die Lage der Kurve vor (links) und nach (rechts) der Entfernung von Ausreißern, die im rechten Diagramm als durchgestrichene Punkte dargestellt sind.

Kurvenanpassung

Bei dieser Methode wurden die Werte R_t gegen f_R in einem Diagramm aufgetragen. An die Punktwolke wurde eine Kurvengleichung nach der Methode kleinster Fehlerquadrate für nichtlineare Probleme angepasst (Funktion `nls` [Bates 1992]).

Das Modell der Kurvengleichung wurde im Rahmen dieser Arbeit aus den Geschwindigkeitsgleichungen für die stabilen Kohlenstoffisotope entwickelt. Die Herleitung ist im Anhang A.1 dargestellt. Es ergibt sich die folgende Gleichung für die Abhängigkeit zwischen R_t und f_R :

$$R_t = \frac{1 - \exp(\log(1 - f_R)/\alpha)}{f_R} \cdot R_\infty \quad (2.13)$$

Nach einer ersten Berechnung der Kurvenparameter wurde eine Ausreisseranalyse durchgeführt (Funktion `huber` [Analytical Methods Committee 2001]). Die Ausreisser wurden aus der Datenbasis entfernt und die Kurve erneut angepasst. Abbildung 5.9 zeigt eine angepasste Kurve vor und nach Entfernung der Ausreisser.

Beide Schätzwerte für α und R_∞ und die zugehörigen Konfidenzintervalle ergaben sich aus dem Anpassungs-Prozess.

5.6.3. Computergestützte Datenanalyse

Für die Datenanalyse wurde die Softwareumgebung R in der neusten Version verwendet [R Development Core Team 2007]. Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Funktionen.

Iterative Optimierung: Optimize

Der Aufruf `optimize` verwendet die Brent-Methode, um das Minimum einer Funktion zu bestimmen, ohne deren Ableitung zu kennen [Brent 1973]. Dabei erfolgt zunächst eine Parabel-Interpolation bis sich der Zielfunktionswert nicht weiter verringert. Danach wird die Methode des Goldenen Schnitts angewendet.

In dieser Arbeit wurde `optimize` dazu verwendet, die Steigung einer gewichteten Regressionsgeraden zu minimieren, so dass der Achsenabschnitt anschließend dem gewichteten Mittelwert der Datenpunkte entsprach. Die Variablen der Datenpunkte waren Reaktionslaufzahl f_R und Fraktionierungsfaktor α . Alpha wurde innerhalb der Funktion `opt.Rinf` aus dem Datensatz `mv1` mit den Variablen Reaktionslaufzahl `fR` und Isotopenverhältnis `R13` berechnet. Das Isotopenverhältnis nach vollständiger Umsetzung wird als `x` übergeben und von `optimize` bei jedem Aufruf verändert, bis das Minimalkriterium innerhalb der angegebenen Toleranzgrenze erreicht ist.

Datensatz

`mv1`

Werte des Datensatzes

ID: laufende Nummer der Probe

`fR`: Reaktionslaufzahl

`R13`: Isotopenverhältnis

Funktionen

`oleary`: Gleichung 2.12 (Seite 17)

`oleary2`: symbolische Ableitung von `oleary` mit `deriv` [Griewank 1991] für die Fehlermatrix

`opt.Rinf`: zu optimierende Funktion; mit der letzten Zeile wird die Geradensteigung zurückgegeben

`alpha.trend`: gewichtete Regressionsgerade; wird berechnet mit `lm` [Chambers 1992a]

Konstanten

`e.fR`: Fehler für Reaktionslaufzahl

`e.Rt`: Fehler für Isotopenverhältnis

`e.Rinf`: Fehler für Isotopenverhältnis nach vollständiger Umsetzung

`Rstart`: Obergrenze des Intervalls, in dem `Rinf` variiert werden soll

`Rende`: Untergrenze des Intervalls, in dem `Rinf` variiert werden soll

`tol`: Toleranzgrenze für das zu erreichende Minimum

Variablen

`alpha`: Faktionierungsfaktor

`ol.part`: Partielle numerische Ableitung von `oleary`

`n`: Dimension des Datensatzes

`E`: Fehlermatrix

`e.alpha`: Fehler für `alpha` berechnet nach Gauß'scher Fehlerfortpflanzung

`xmin`: Rückgabewert von `optimize`; wird solange wieder als `x` eingesetzt, bis das Minimum innerhalb der Toleranzgrenze erreicht ist.

Listing 5.1: Verwendung der R-Funktion `optimize` in der Mittelwert-Methode.

```

oleary <- function(fR,Rt,Rinf){ log(1-fR) / log( 1 - fR * Rt / Rinf)}
oleary2 <- deriv(
  y ~ log(1-fR) / log( 1 - fR * Rt / Rinf),
  c("fR","Rt","Rinf"),
  function(fR,Rt,Rinf){
    )
opt.Rinf <- function(fR, Rt, x){
  alpha <- oleary(fR, Rt, x)
  ol.part <- attr(oleary2(fR, Rt, x),"gradient")
  n <- dim(ol.part)[1]
  e.fR <- 3e-2
  e.Rt <- 7e-6
  e.Rinf <- e.Rt
  E <- matrix(c(rep(e.fR, n), rep(e.Rt, n), rep(e.Rinf, n)), ncol=3)
  e.alpha <- sqrt(apply((E*ol.part)^2, 1, sum))
  alpha.trend <- lm(alpha ~ fR, weights=1/alpha.e)
  abs(coef(alpha.trend)[2])
}
Rstart <- max(mv1$R13) - 6*max(mv1$R13)
Rende <- max(mv1$R13) + 6*max(mv1$R13)
xmin <- optimize( opt.Rinf, c(Rstart, Rende), tol=1E-10, fR = mv1$fR, Rt =
  mv1$R13 )

```

Methode kleinster Fehlerquadrate für nichtlineare Modelle: NLS

Die Funktion `nls` bestimmt Schätzwerte für die Parameter einer nichtlinearen Gleichung [Bates 1992]. Dazu wird der Funktion die Gleichung, ein Datensatz und die Startwerte für die zu approximierenden Parameter übergeben. Die Schätzung erfolgt nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate.

In dieser Arbeit wurde `nls` verwendet, um an die Punktwolke der Wertepaare aus Reaktionslaufzahl und Isotopenverhältnis eine Kurve anzupassen. Die Kurvengleichung `fRRtcurve` wurde im Rahmen dieser Arbeit erstellt. Ihre Herleitung wird im Anhang A.1 dargestellt.

Datensatz

```
mv1
```

Werte des Datensatzes

ID: laufende Nummer der Probe

fR: Reaktionslaufzahl

R13: Isotopenverhältnis

Funktionen

fRRtcurve: Kurvengleichung 2.13 (Seite 17)

Konstanten

start: Startwerte für die zu variierenden Parameter; hier alpha und Rinf

Variablen

alpha: Fraktionierungsfaktor

Rinf: Isotopenverhältnis des Produkts nach vollständiger Umsetzung

delt.alpha: Standardfehler des Parameters alpha

delt.Rinf: Standardfehler des Parameters Rinf

confint.alpha: 95%-Konfidenzintervall für den Parameter alpha

confint.Rinf: 95%-Konfidenzintervall für den Parameter Rinf

Ausreisseridentifikation: Huber

Mit der Huber-Methode lassen sich Ausreisser eines Datensatzes identifizieren. Dazu wird der Median $\hat{\mu}$ der Werte gebildet und die robuste Standardabweichung $\hat{\sigma}$ der Werte von diesem Median berechnet. Die robuste Standardabweichung $\hat{\sigma}$ ist definiert als der Median der Differenz zwischen den Werten und $\hat{\mu}$ multipliziert mit dem Faktor 1,5 [Analytical Methods Committee 2001]. Anschließend werden alle Werte, die außerhalb des Intervalls $\hat{\mu} \pm 1,5 \cdot \hat{\sigma}$ liegen, je nach ihrer Lage auf die ihnen am nächsten liegende Intervallgrenze gesetzt. Werte die innerhalb

Listing 5.2: Verwendung der R-Funktion `nls` bei der Kurvenanpassung.

```
fRRtcurve <- function(fR, alpha, Rinf){
  (1 - exp(log(1-fR)/alpha)) / fR * Rinf
}
fRRtcurve.nls <- nls(
  R13 ~ fRRtcurve(fR, alpha, Rinf),
  data=mv1,
  start=c(alpha=1.005, Rinf=min(R13))
)
alpha <- coef(fRRtcurve.nls)[1]
Rinf <- coef(fRRtcurve.nls)[2]
delt.alpha <- summary(fRRtcurve.nls)[10]$coef[3]
delt.Rinf <- summary(fRRtcurve.nls)[10]$coef[4]
confint.alpha <- abs(confint(fRRtcurve.nls)[1]-confint(fRRtcurve.nls)[3])/2
confint.Rinf <- abs(confint(fRRtcurve.nls)[2]-confint(fRRtcurve.nls)[4])/2
```

des Intervalls liegen, bleiben unverändert. Dieses Verfahren ist als Winsorisierung bekannt und säubert den Datensatz von Ausreißern, ohne den Stichprobenumfang zu verringern. Aus dem winsorisierten Datensatz wird der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung σ_x gebildet. Der Mittelwert ist nun der verbesserte Wert für $\hat{\mu}$. Der verbesserte Wert für die robuste Standardabweichung $\hat{\sigma}$ wird durch Multiplikation der neu berechneten Standardabweichung mit dem Faktor 1,134 berechnet [Analytical Methods Committee 2001]. Die Winsorisierung wird mit den jeweils verbesserten Werten wiederholt, bis der Prozess konvergiert.

In dieser Arbeit wurden mit der Huber-Methode die Ausreißer bei der Kurvenanpassung bestimmt. Dazu wurden die Residuen aus der Kurvenanpassung an die Funktion `huber` übergeben. Die Rückgabewerte der Funktion, `s` und `mu`, sind die verbesserte robuste Standardabweichung $\hat{\sigma}$ beziehungsweise der verbesserte Mittelwert $\hat{\mu}$ der letzten Iteration des Verfahrens. Mit Hilfe der Rückgabewerte wurden Datenpunkte, die außerhalb $\hat{\mu} \pm 2 \cdot \hat{\sigma}$ lagen als Ausreißer identifiziert und aus dem Datensatz entfernt. Setzt man eine Normalverteilung der Residuen voraus, entspricht $\hat{\mu} \pm 2 \cdot \hat{\sigma}$ dem 95%-Konfidenzintervall. Mit dem so behandelten Datensatz wurde erneut die Kurvenanpassung durchgeführt.

Datensätze

`mv1`: ursprünglicher Datensatz mit Ausreißern

`outlier`: enthält die Elemente des Datensatzes, die als Ausreißer identifiziert werden

`mv1.2`: Datensatz ohne Ausreißer

Werte der Datensätze

ID: laufende Nummer der Probe

fR: Reaktionslaufzahl

R13: Isotopenverhältnis

Resid: Residuen der Kurvenanpassung; wird als weitere Spalte in den Datensatz eingefügt

Funktionen

`fRRtcurve.nls`: Kurvengleichung 2.13 (Seite 17), siehe Funktion `nls`

Listing 5.3: Verwendung der R-Funktion `huber` für die Ausreißeranalyse.

```
hu <- huber(resid(fRRtcurve.nls))
mv1 <- cbind(mv1, Resid=resid(fRRtcurve.nls))
outlier <- subset(mv1, Resid > 2*hu$s | Resid < -2*hu$s )
mv1.2 <- subset(mv1, Resid <= 2*hu$s | Resid >= -2*hu$s )
```

Akaike Informationskriterium: AIC

Das Akaike Informationskriterium (AIC) wird üblicherweise verwendet, um verschiedene mathematische Modelle zu vergleichen, die auf denselben Datensatz angewendet werden [Pinheiro 2000]. In das AIC gehen die Anzahl der Parameter des Modells und die logarithmische Likelihood-Funktion ein. Die Likelihood-Funktion wiederum ermittelt die vertrauenswürdigsten Werte für die Parameter des übergebenen Modells [Brandt 1992]. Für die Interpretation des AIC gilt: je kleiner der Wert des AIC, desto besser ist das Modell.

Im Gegensatz zur ursprünglichen Aufgabe des AIC, unterschiedliche Modelle zu vergleichen, wurde es in dieser Arbeit eingesetzt, um verschiedene Datensätze zu vergleichen. Dafür wurde angenommen, dass die Datensätze alle durch dasselbe mathematische Modell beschrieben wurden, jedoch durch weitestgehend unbekannte Störeinflüsse mehr oder weniger stark davon abwichen. Der Datensatz mit den geringsten Störungen wurde anhand des kleinsten AIC identifiziert.

Datensätze

`mv1.Exp1` bis `mv1.Exp6`: Experimente 1 bis 6; ohne Ausreisser

Werte des Datensatzes

ID: laufende Nummer der Probe

fR: Reaktionslaufzahl

R13: Isotopenverhältnis

Exp: Identifier des entsprechenden Experiments

Funktionen

`fRRtcurve.nls.Exp1 - 6`: Kurvengleichung 2.13 (Seite 17),
siehe Funktion `nls`; angepasst an die Datensätze `mv1.Exp1` bis 6

Listing 5.4: Verwendung der R-Funktion `AIC` bei der Auswahl des besten Experiments.

```
AIC(fRRtcurve.nls.Exp1)
...
AIC(fRRtcurve.nls.Exp6)
```

Zufallszahlen: `sample`

Die Funktion `sample` zieht Zufallszahlen einer bestimmten Anzahl aus einer bestimmten Menge entweder mit oder ohne Zurücklegen.

Listing 5.5: Ziehung von `x` Zufallszahlen im Intervall 10 bis 100 mit `sample`.

```
sample(10:100, x, replace=FALSE)
```

Kubische Spline interpolation: `smooth.spline`

Die Funktion `smooth.spline` passt eine kubische geglättete Spline-Kurve an die übergebenen Daten an.

Datensätze

L01: Spektrophotometerdaten

Werte des Datensatzes

s: Zeit

A: Extinktion

Konstante

`spar`: Glättungsparameter

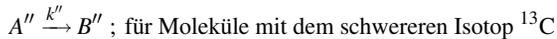
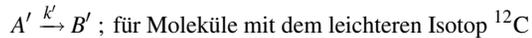
Listing 5.6: Anpassung einer kubischen Spline-Kurve mit `smooth.spline`.

```
smooth.spline(L01, spar=0.7)
```

A. Anhang

A.1. Herleitung der Kurvengleichung

Vorausgesetzt wird ein System aus unidirektionalen Reaktionen pseudoerster Ordnung der Form $A \rightarrow B$ mit der Geschwindigkeitskonstante k . Für Moleküle mit unterschiedlicher isotopischer Zusammensetzung an den Positionen, von denen die Reaktionsgeschwindigkeit abhängt, werden folgende Beziehungen aufgestellt:



Die Massenbilanz fordert $[A] = [A'] + [A'']$ und $[B] = [B'] + [B'']$. Das bedeutet, alle weiteren Beziehungen können auf die jeweiligen Isotope übertragen werden, indem A , B und k durch die entsprechenden Symbole ersetzt werden. Die Produktkonzentration $[B]$ nimmt in gleichem Maße zu, wie die Substratkonzentration abnimmt. Zum Zeitpunkt t gilt für die Produktkonzentration:

$$[B_t] = [A_0] - [A_t] \tag{A.1}$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist bei der Reaktion pseudoerster Ordnung nur von der Substratkonzentration abhängig:

$$d[A_t]/dt = -k \cdot [A_t]$$

$$[A_t]/[A_0] = \exp(-k \cdot t) \tag{A.2}$$

Die Gesamtgeschwindigkeit der Reaktion entspricht der Summe der Reaktionsgeschwindigkeiten für leichtere und schwerere Moleküle:

$$d[A_t]/dt = d[A'_t]/dt + d[A''_t]/dt$$

$$[A_t] \cdot k = [A'_t] \cdot k' + [A''_t] \cdot k''$$

Zu jedem beliebigen Zeitpunkt im Verlauf der Reaktion ist die absolute Häufigkeit von A' um den Faktor 10^2 größer als die von A'' . Daher wird näherungsweise angenommen, dass $[A''_t] \cdot k''$ klein ist gegenüber $[A'_t] \cdot k'$, und folglich vernachlässigt werden kann. Es folgt:

$$k = k' \quad ; \quad \text{gültig als Näherung} \quad (\text{A.3})$$

Die Reaktionslaufzahl f_R wird durch den Anteil an Produkt B, der während der Reaktion gebildet wird, bestimmt. Der Anteil wird über die Endkonzentration von B nach vollständiger Umsetzung normiert, die der Anfangskonzentration des Substrats $[A_0]$ gleicht.

$$f_R = [B_t]/[A_0] \quad (\text{A.4})$$

$$f_R = 1 - [A_t]/[A_0] \quad ; \quad \text{mit Gleichung A.1}$$

$$f_R = 1 - \exp(-k \cdot t) \quad ; \quad \text{mit Gleichung A.2} \quad (\text{A.5})$$

Durch Umformen erhält man einen Ausdruck für die Zeit t :

$$t = -\log(1 - f_R)/k$$

$$t = -\log(1 - f_R)/k' \quad ; \quad \text{gültig mit der Näherung A.3} \quad (\text{A.6})$$

Die Kombination der Gleichungen A.4, A.5 und A.6 liefert die Produktkonzentration:

$$[B_t] = (1 - \exp(-k \cdot (-\log(1 - f_R)/k'))) \cdot [A_0] \quad (\text{A.7})$$

Das Isotopenverhältnis des Produkts ist definiert als der Quotient aus den Konzentrationen der verschiedenen Produktmoleküle:

$$R_t = [B_t'']/[B_t'] \quad (\text{A.8})$$

Eine weitere Vereinfachung berücksichtigt, dass die Berechnung der Reaktionslaufzahl f_R in der Praxis fehlerbehaftet ist. Im Rahmen dieser Arbeit lag der für f_R angenommene Fehler in der Größenordnung von 10^{-2} . Bei der numerischen Schätzung mit einem angenommenen Wert von 1,003 für den Term k'/k'' zeigten sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Werten für f_R in der Größenordnung von 10^{-3} . Daher konnte näherungsweise angenommen werden:

$$f_R = f_R' = f_R'' ; \text{ gültig als Näherung} \quad (\text{A.9})$$

Die Anpassung von Gleichung A.7 für die beiden Isotope und Einsetzen in Gleichung A.8 liefert:

$$R_t = \frac{1 - \exp(-k'' \cdot (-\log(1 - f_R)/k'))}{1 - \exp(-k' \cdot (-\log(1 - f_R)/k'))} \cdot \frac{[A_0'']}{[A_0']} \quad (\text{A.10})$$

Der Quotient $[A_0'']/[A_0']$ ist ein Ausdruck für das Isotopenverhältnis des Produkts nach vollständiger Reaktion R_∞ . Die Geschwindigkeitskonstanten können ersetzt werden, indem man die Definition des isotopischen Fraktionierungsfaktors α anwendet: $\alpha = (k'/k'')$. Dadurch kann R_t als Funktion von f_R mit den beiden Parametern α und R_∞ ausgedrückt werden:

$$R_t = \frac{1 - \exp(\log(1 - f_R)/\alpha)}{f_R} \cdot R_\infty \quad (\text{2.13})$$

A.2. Probenliste

Tabelle A.1.: Experiment Exp-1

ID	Reaktionslaufzahl f_R	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis ^{13}R
1	0,300	0,0108545
2	0,999	0,0108685
3	0,133	0,0108619
4	0,433	0,0108586
5	0,807	0,0108692
6	0,999	0,0108734

Tabelle A.2.: Experiment Exp-2

ID	Reaktionslaufzahl f_R	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis ^{13}R
7	0,275	0,0108655
8	0,599	0,0108707
9	0,908	0,0108859
10	0,973	0,0108777
11	0,320	0,0108592
12	0,529	0,0108624
13	0,717	0,0108686
14	0,520	0,0108679
15	0,698	0,0108726
16	0,999	0,0108834

Tabelle A.3.: Experiment Exp-3

ID	Reaktionslaufzahl f_R	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis ^{13}R
17	0,189	0,0108622
18	0,418	0,0108768
19	0,575	0,0108729
20	0,163	0,0108812
21	0,385	0,0108695
22	0,415	0,0108677
23	0,066	0,0108741
24	0,611	0,0108957
25	0,703	0,0108818
26	0,331	0,0108757
27	0,615	0,0108758
28	0,737	0,0108869
29	0,341	0,0108737
30	0,598	0,0108827
31	0,762	0,0108803
34	0,699	0,0108839
35	0,188	0,0109302
36	0,316	0,0108697
37	0,458	0,0108810
38	0,254	0,0108693
39	0,392	0,0108759
40	0,669	0,0108861

Tabelle A.4.: Experiment Exp-4

ID	Reaktionslaufzahl f_R	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis ^{13}R
41	0,251	0,0108643
42	0,793	0,0108930
43	0,833	0,0108996
44	0,341	0,0108732
45	0,437	0,0108783
46	0,603	0,0108802
47	0,267	0,0108656
48	0,320	0,0108737
49	0,673	0,0108816
50	0,292	0,0108675
51	0,638	0,0108850
52	0,690	0,0108899
53	0,527	0,0108790
54	0,583	0,0108764
55	0,686	0,0108859
56	0,358	0,0108757
57	0,436	0,0108802
58	0,654	0,0108895
59	0,423	0,0108689
60	0,624	0,0108825
61	0,775	0,0108913
62	0,500	0,0108760
63	0,646	0,0108841

Tabelle A.5.: Experiment Exp-5

ID	Reaktionslaufzahl f_R	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis ^{13}R
79	0,999	0,0109053
80	0,999	0,0109104
81	0,999	0,0109102
82	0,456	0,0108845
83	0,621	0,0108901
85	0,227	0,0108884
86	0,420	0,0108875
87	0,438	0,0108929
88	0,352	0,0108943
89	0,501	0,0108830
90	0,666	0,0108925
91	0,336	0,0108891
92	0,439	0,0108853
93	0,545	0,0108883
94	0,402	0,0108886
95	0,500	0,0109221
96	0,758	0,0108943
97	0,241	0,0108868
98	0,465	0,0108916
99	0,618	0,0108872
100	0,507	0,0109003
101	0,557	0,0108885
102	0,616	0,0108949
103	0,205	0,0108886
104	0,299	0,0108897
105	0,763	0,0108975
107	0,998	0,0109048
108	0,998	0,0109092
109	0,998	0,0109002
110	0,998	0,0109072

Tabelle A.6.: Experiment Exp-6

ID	Reaktionslaufzahl f_R	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis ^{13}R
115	0,115	0,0108875
116	0,999	0,0109179
117	0,535	0,0108936
118	0,921	0,0109018
119	0,112	0,0108768
120	0,808	0,0109116
121	0,247	0,0108962
122	0,529	0,0108959
123	0,746	0,0109041
124	0,396	0,0108898
125	0,608	0,0109012
126	0,707	0,0108944
127	0,381	0,0108918
128	0,506	0,0108959
129	0,630	0,0109093
130	0,437	0,0108848
131	0,494	0,0108942
132	0,561	0,0108983
133	0,263	0,0108844
134	0,770	0,0108894
135	0,863	0,0109085
136	0,261	0,0108890
137	0,576	0,0108928
138	0,688	0,0109043
139	0,558	0,0108990
140	0,692	0,0109082
141	0,766	0,0108999
142	0,333	0,0109081
143	0,555	0,0109019
144	0,671	0,0108939
145	0,082	0,0108775
146	0,907	0,0109139
147	0,233	0,0108903
148	0,969	0,0108908
149	0,293	0,0108936
150	0,997	0,0109127

Abbildungsverzeichnis

2.1. Morse-Potential als Model für die potentielle Energie einer Molekülbindung	9
2.2. Reaktionsprofile für Substrate mit unterschiedlichen Isotopen . . .	10
2.3. Optik des Finnigan Delta ^{plus} Isotopen Massenspektrometers . . .	12
2.4. Anwendungen der Isotopen-Analytik	14
2.5. Isotopenfraktionierung in einem abgeschlossenen System	15
2.6. Isotopenfraktionierung einer Folgereaktion	19
2.7. Isotopenfraktionierung am Verzweigungspunkt von Stoffwechselwegen	21
2.8. Übersicht über den humanen Metabolismus	23
2.9. Regulation des Mevalonatbiosynthesewegs	25
2.10. Reaktion der HMGR	26
2.11. Struktur der HMGR	27
2.12. Katalytisches Zentrum der HMGR	29
2.13. Substrat und Inhibitoren der HMGR	32
2.14. Nomenklatur der Steroide	33
2.15. Biosyntheseorte des Progesteron	36
3.1. Übersicht über das Vorgehen bei der Bestimmung des isotopischen Anreicherungsfaktors	38
3.2. Alignment der beiden Isoformen des Enzyms	39
3.3. SDS-Gel der Proteinreinigung aus p02-RZPD	40
3.4. PCR-Produkte aus den Vektoren	41

3.5. SDS-Gele mit Proben aus Expression und Reinigung	41
3.6. Enzymreaktion unter Pravastatininhibition	42
3.7. Lactonisierung von Mevalonat zu Mevalonolacton	44
3.8. Chromatogramm einer lactonisierten Probe	45
3.9. Chromatogramm der Fraktionen der Festphasenextraktion	46
3.10. Chromatogramm vor der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie	47
3.11. Vergleich der sechs Experimente	49
3.12. Fraktionierungsfaktoren der sechs Experimente	51
3.13. Kurvenanpassung	53
3.14. Berechnung des isotopischen Fraktionierungsfaktors	54
3.15. Positionen der Kohlenstoffatome in der HMGR-Reaktion	56
3.16. Positionen der Mevalonat-Kohlenstoffatome im Cholesteringerüst	58
4.1. Primäre und sekundäre Isotopeneffekte bei der Lactonisierung . . .	62
5.1. Expressionsvektor EX-Z0529	89
5.2. Expressionsvektor pA1-ATCC	92
5.3. Durchführung der Probennahme	100
5.4. Tabelle für die Probennahme	101
5.5. Säulenmaterial der Einwegsäulen	102
5.6. Bestimmung der Reaktionslaufzahl	107
5.7. Variation von R_{∞}	109
5.8. Mittelwertmethode	110
5.9. Kurvenanpassung	111

Tabellenverzeichnis

2.1. Natürliche Isotope des Kohlenstoffs	5
2.2. CO ₂ -Spezies mit unterschiedlichen Isotopen	13
3.1. Akaike Information Criterion	52
3.2. Ergebniswerte für den isotopischen Fraktionierungsfaktor	55
3.3. Ergebniswert für den isotopischen Anreicherungsfaktor	55
3.4. Maximal zu erwartende Isotopendiskriminierung der HMGR-Reaktion	57
5.1. Klonierungsstrategie für den Expressionsvektor p02-RZPD	90
5.2. Klonierungsstrategie für den Expressionsvektor pA1-ATCC	93
5.3. Parameter der Gaschromatographie-gekoppelten Massenspektrometrie	104
5.4. Parameter der Gaschromatographie-gekoppelten Isotopenverhältnis- Massenspektrometrie	105
A.1. Experiment Exp-1	124
A.2. Experiment Exp-2	124
A.3. Experiment Exp-3	125
A.4. Experiment Exp-4	126
A.5. Experiment Exp-5	127
A.6. Experiment Exp-6	128

Literatur

- [Analytical Methods Committee 2001] Analytical Methods Committee, 2001. Robust statistics: a method of coping with outliers. Techn. Ber., Royal Society of Chemistry.
- [Atkins 1990] Atkins, P. W., 1990. Atkins / Physikalische Chemie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. ISBN 3-527-25913-9.
- [Bates 1992] Bates, D. M., Chambers, J. M., 1992. Nonlinear models. Chapter 10 of Statistical Models in S. Wadsworth & Brooks/Cole, Pacific Grove, California.
- [Becchi 1994] Becchi, M., Aguilera, R., Farizon, Y., Flament, M.-M., Casabianca, H., James, P., 1994. Gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport. *Rapid Commun Mass Spectrom* 8:304–308.
- [Bertani 1951] Bertani, G., 1951. Studies on lysogenesis. i. the mode of phage liberation by lysogenic *escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62:293–300. LB medium.
- [Beyer 1988] Beyer, H., 1988. Lehrbuch der Organischen Chemie. S. Hirzel Verlag, Stuttgart.
- [Bischoff 1995] Bischoff, K. M., Rodwell, V. W., 1995. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *haloferax volcanii*: purification, characterization, and expression in *escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178:19–23.
- [Bolte 1974] Bolte, E., Coudert, S., Lefebvre, Y., 1974. Steroid production from plasma cholesterol. ii. in vivo conversion of plasma cholesterol to ovarian pro-

- gesterone and adrenal c_{19} and c_{21} steroids in humans. *J. Clin. Endocr. Metab.* 38:394–400.
- [Bradford 1976] Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- [Brandt 1992] Brandt, S., 1992. Datenanalyse: Mit statistischen Methoden und Computerprogrammen. Bibliographisches Institut & Brockhaus, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich.
- [Brenna 2001] Brenna, J. T., 2001. Natural intramolecular isotope measurements in physiology: elements of the case for an effort toward high-precision position-specific isotope analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15:1252–1262.
- [Brent 1973] Brent, R. P., 1973. Algorithms for Minimization without Derivatives. Prentice-Hall, Englewood Cliffs New Jersey.
- [Brown 1980] Brown, M. S., Goldstein, J. L., 1980. Multivalent feedback regulation of the HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J. Lipid Res.* 21:505–517.
- [Brown 1999] Brown, M. S., Goldstein, J. L., 1999. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96:11041–11048.
- [Carbonell 2005] Carbonell, T., Freire, E., 2005. Binding thermodynamics of statins to hmg-coa reductase. *Biochemistry* 44:11741–11748.
- [Cawley 2008] Cawley, A. T., Flenker, U., 2008. The application of carbon isotope ratio mass spectrometry to doping control. *J. Mass Spectrom.* 43:854–864.
- [Chambers 1992a] Chambers, J. M., Hastie, T. J. (Hg.), 1992. Linear models. Chapter 4 of Statistical Models in S. Wadsworth & Brooks/Cole, Pacific Grove, California.

- [Chambers 1992b] Chambers, J. M., Hastie, T. J., 1992. *Statistical Models in S*. Wadsworth & Brooks/Cole Computer Science S.
- [Chatterjee 2005] Chatterjee, S., Schoepe, J., Lohmer, S., Schomburg, D., 2005. High level expression and single-step purification of hexahistidine-tagged l-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase making use of a versatile expression vector set. *Protein Expr. Purif.* 39:137–143.
- [Cleland 1982] Cleland, W. W., 1982. Use of isotope effects to elucidate enzyme mechanisms. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 13:385–428.
- [Collins 2002] Collins, F. S., 2002. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:16899–16903.
- [Craig 1953] Craig, H., 1953. The geochemistry of the stable carbon isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta* 3:53–92.
- [De Niro 1977] De Niro, M. J., Epstein, S., 1977. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science* 197:261–263.
- [Donike 1983] Donike, M., Bärwald, K.-R., Klostermann, K., Schänzer, W., Zimmermann, J., 1983. Nachweis von exogenem testosteron. In: H. Heck, W. Hollmann, H. Liesen, R. Rost (Hg.), *Sport: Leistung und Gesundheit*, S. 293–298. Deutscher Ärzte Verlag, Köln.
- [Edwards 1979] Edwards, P. A., Lemongello, D., Fogelman, A. M., 1979. Improved methods for the solubilization and assay of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase. *J. Lipid Res.* 20:40–46.
- [Ehleringer 1986] Ehleringer, J. R., Rundel, P. W., Nagy, K. A., 1986. Stable isotopes in physiological ecology and food web research. *Trends in Evolution and Ecology* 1:42–45.

- [Engfelt 1998] Engfelt, W. H., Masuda, K. R., Paton, V. G., Krisans, S. K., 1998. Splice donor site mutations in the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene cause a deficiency of the endoplasmatic reticulum 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase protein in ut2 cells. *J. Lipid Res.* 39:2182–2191.
- [Feramisco 2004] Feramisco, J. D., Goldstein, J. L., Brown, M. S., 2004. Membrane topology of humen Insig-1, a protein regulator of lipid synthesis. *J. Biol.Chem.* 279:8487–8496.
- [Flenker 2007] Flenker, U., Hebestreit, M., Piper, T., Hülsemann, F., Schänzer, W., 2007. Improved performance and maintenance in gas chromatography/isotope ratio mass spectrometry by precolumn solvent removal. *Anal. Chem.* 79:4162–4168.
- [Flenker 2008a] Flenker, U., 2008. Persönliche Mitteilung. Abteilung Isotopen-Massenspektrometrie, Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln, Am Sportpark Müngersdorf 6, 50933 Köln. U.flenker@biochem.dshs-koeln.de.
- [Flenker 2008b] Flenker, U., Güntner, U., Schänzer, W., 2008. ^{13}C -values of endogenous urinary steroids. *Steroids* 73:408–416.
- [Frimpong 1994] Frimpong, K., Rodwell, V. W., 1994. Catalysis by syrian hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase. *J. Biol. Chem.* 269:11478–11483.
- [Gardner 2001] Gardner, R. G., Shan, H., Matsuda, S. P. T., Hampton, R. Y., 2001. An oxysterol-derived positive signal for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa reductase degradation in yeast. *J. Biol.Chem.* 276:8681–8694.
- [Goldstein 1990] Goldstein, J. L., Brown, M. S., 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425–430.
- [Gonfiantini 1995] Gonfiantini, R., Stichler, W., Rozanski, K., 1995. Standards and intercomparison materials distributed by the International Atomic Energy

- Agency for stable isotope measurements. *In*: Reference and intercomparison materials for stable isotope of light elements, Nr. 825 in IAEA-TECDOC, S. 13–29. International Atomic Energy Agency, Vienna. Proceedings of a consultants meeting held in Vienna, 1–3 December 1993.
- [Grant 1990] Grant, S. G. N., Jessee, J., Bloom, F. R., Hanahan, D., 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4645–4649.
- [Griewank 1991] Griewank, A., Corliss, G. F., 1991. Automatic Differentiation of Algorithms: Theory, Implementation, and Application. SIAM proceedings, Philadelphia.
- [Hayes 1982] Hayes, J. M., 1982. Fractionation et al.: An introduction to isotopic measurements and terminology. *Spectra* 8:3–8.
- [Hayes 2001] Hayes, J. M., 2001. Fractionation of the isotopes of carbon and hydrogen in biosynthetic processes., Bd. 43, S. 225–277. Mineralogical Society of America, Washington DC.
- [Holleman 1985] Holleman, A. F., Wiberg, E., Wiberg, N., 1985. Holleman-Wiberg / Lehrbuch der Anorganischen Chemie. de Gruyter, Berlin, New York. ISBN 3-11-007511-3.
- [Ikonen 2008] Ikonen, E., 2008. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature* 9:125–138.
- [Inoue 1990] Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H., 1990. High efficiency transformation of *escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23–28.
- [Invitrogen life technologies 2003] Invitrogen life technologies, 2003. NuPAGE Technical Guide. General information and protocols for using the NuPAGE electrophoresis system. Carlsbad, California. URL <http://www.invitrogen.com>.

- [Istvan 2000] Istvan, E. S., Palnitkar, M., Buchanan, S. K., Deisenhofer, J., 2000. Crystal structure of the catalytic portion of human hmg-coa reductase: insight into regulation of activity and catalysis. *EMBO J.* 19:819–830.
- [Istvan 2001] Istvan, E. S., Deisenhofer, J., 2001. Structural mechanism for statins inhibition of hmg-coa reductase. *Science* 292:1160–1164.
- [Jordan 1978] Jordan, F., Kuo, D. J., Monse, E. U., 1978. Carbon konetic isotope effects pyruvate decarboxylation catalyzed by yeast pyruvate decarboxylase and models. *J. Am. Chem. Soc.* 100:2872–2878.
- [Lajtha 1994] Lajtha, K., Michener, R. H. (Hg.), 1994. Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science. Methods in Ecology. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- [Lüdke 2008] Lüdke, S. M., Flenker, U., Schänzer, W., Schomburg, D., 2008. Stable carbon isotope discrimination by human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase. *J. Lipid Res.* 49:2620–2626.
- [Leckrone 1998] Leckrone, K. J., Hayes, J. M., 1998. Water-induced errors in continous flow carbon isotope ratio mass spectrometry. *Anal Chem* 70:2737 – 2744.
- [Lehninger 1994] Lehninger, Nelson, Cox, 1994. Prinzipien der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford. ISBN 3-527-29381-7.
- [Mareck-Engelke 1997] Mareck-Engelke, U., Flenker, U., Schänzer, W., 1997. Stability of steroid profiles (6): The influence of oral contraceptives on steroid profiles. In: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke (Hg.), Recent advances in doping analysis (4). Proceedings of the 14th Cologne Workshop on Dope Analysis, 17th to 22nd March 1996, S. 139–157. Sport & Buch Strauß, Köln.
- [Mayer 1988] Mayer, R. J., 1988. Purification and properties of the catalytic domain of human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa reductase expressed in escherichia coli. *Arch. Biochem. Biophys.* 267:110–118.

- [Melzer 1987] Melzer, E., Schmidt, H.-L., 1987. Carbon isotope effects on the pyruvate dehydrogenase reaction and their importance for relative carbon-13 depletion in lipids. *J. Biol. Chem.* 262:8159–8164.
- [Melzer 1988] Melzer, E., Schmidt, H.-L., 1988. Carbon isotope effect on the decarboxylation of carboxylic acids - comparison of the lactate oxidase reaction and the degradation of pyruvate by H_2O_2 . *Biochem. J.* 252:913–915.
- [Mülhardt 2003] Mülhardt, C., 2003. Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- [Monson 1982] Monson, K. D., Hayes, L. M., 1982. Carbon isotopic fractionation in the biosynthesis of bacterial fatty acids. ozonolysis of unsaturated fatty acids as a means of determining the intramolecular distribution of carbon isotopes. *Geochim Cosmochim Acta* 46:139 – 149.
- [Moriyama 1998] Moriyama, T., Sather, S. K., McGee, T. P., Simoni, R. D., 1998. Degradation of HMG-CoA reductase *in vitro*. *J. Biol.Chem.* 273:22037–22043.
- [Mullis 1986] Mullis, K. B., Faldoma, F., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G. T., Erlich, H. A., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263–273.
- [O’Leary 1980] O’Leary, M. H., 1980. Determination of heavy-atom isotope effects on enzyme-catalysed reactions. *Meth. Enzymol.* 64:83–104.
- [O’Leary 1981] O’Leary, M. H., 1981. Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* 20:553–567.
- [Pinheiro 2000] Pinheiro, J. C., Bates, D. M., 2000. Mixed-Effects Models in S and S-PLUS. Statistics and Computing. Springer, New York, Berlin, Heidelberg.
- [Platzner 1997] Platzner, I., 1997. Modern isotope ratio mass spectrometry. John Wiley, Chichester, England. ISBN 0-471-97416-1.

- [Qiagen GmbH 2003] Qiagen GmbH, 2003. The QIAexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. Hilden, Germany. URL <http://www1.qiagen.com>.
- [R Development Core Team 2007] R Development Core Team, 2007. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>. ISBN 3-900051-07-0.
- [Reynolds 1985] Reynolds, G. A., Goldstein, J. L., Brown, M. S., 1985. Multiple mRNAs for 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase determined by multiple transcription initiation sites and intron splicing sites in the 5'-untranslated region. *J. Biol.Chem.* 260:10369–10377.
- [Rommerts 2004] Rommerts, F. F. G., 2004. Testosterone: an overview of biosynthesis, transport, metabolism and non-genomic actions, Kap. 1, S. 1–37. University Press, Cambridge, United Kingdom.
- [Saiki 1988] Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higushi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A., 1988. Primer directed enzymatic amplification of dna with a thermostable dna polymerase. *Science* 23:487–491.
- [Saini 2006] Saini, G. S., Wani, T. A., Gautam, A., Varshney, B., Ahmed, T., Rajan, K. S., Pillai, K. K., Paliwal, J. K., 2006. Validation of the lc-ms/ms method for the quantification of mevalonic acid in human plasma and determination of the matrix effect. *J. Lipid Res.* 47:2340–2345.
- [Sambrook 1989] Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: A laboratory manual.
- [Sancho 1998] Sancho, E., Viká, M. R., Sánchez-Pulido, L., Lozano, J. J., Paciucci, R., Nadal, M., Fox, M., Harvey, C., Bercovich, B., Loukili, N., Ciechanover, A., Lin, S. L., Sanz, F., Estivill, X., Valencia, A., Thomson, T. M., 1998. Role of UEV-1, an inactive variant of the E2 ubiquitin-conjugating enzymes, in vitro

- differentiation and cell cycle behavior of HT-29-M6 intestinal mucosecretory cells. *Mol. Cell. Biol.* 18:576–589.
- [Sanger 1977] Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463–5467.
- [Santrock 1985] Santrock, J., Studley, S. A., Hayes, J. M., 1985. Isotopic analyses based on the mass spectrum of carbon dioxide. *Anal. Chem.* 57:1444–1448.
- [Schimmelmann 2004] Schimmelmann, A., 2004. Hydrogen and carbon stable isotope (D/H, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) reference materials for organic compound-specific investigations. Techn. Ber.
- [Schmidt 2003] Schmidt, H.-L., 2003. Fundamentals and systematics of the non-statistical distribution of isotopes in natural compounds. *Naturwissenschaften* 90:537–552.
- [Shearer 2005] Shearer, A. G., Hampton, R. Y., 2005. Lipid-mediated, reversible misfolding of a sterol-sensing domain protein. *EMBO J.* 24:149–159.
- [Steinberg 2006] Steinberg, D., 2006. An interpretive history of the cholesterol controversy, part v: The discovery of the statins and the end of the controversy. *J. Lipid Res.* 47:1339–1351.
- [Stryer 1991] Stryer, L., 1991. Stryer / Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York. ISBN 3-527-25913-9.
- [Studier 1990] Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., Dubendorff, J. W., 1990. Use of T7 polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods. Enzymol.* .
- [Tobert 2003] Tobert, J. A., 2003. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:517–526.
- [Tong 1957] Tong, J. Y., Yankwich, P. E., 1957. Calculation of experimental isotope effects for pseudo first-order irreversible reactions. *J. Phys. Chem.* 61:540–543.

- [Träger 1977] Träger, L., 1977. Steroidhormone. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [Volk 2007] Volk, M. G., 2007. An examination of the evidence supporting the association of dietary cholesterol and saturated fats with serum cholesterol and development of coronary heart disease. *Altern. Med. Rev.* 12:228–245.
- [Vollhardt 1987] Vollhardt, K. P. C., 1987. Organic chemistry. W. H. Freeman and Company, New York.
- [WADA Laboratory Committee 2004] WADA Laboratory Committee, 2004. Reporting and Evaluation Guidance for Testosterone, Epitestosterone, T/E Ratio and Other Endogenous Steroids. World Anti Doping Agency, Montreal. URL http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/end_steroids_aug_04.pdf. WADA document TD2004EAAS.
- [Ward 1975] Ward, R. J., Shackleton, C. H. L., Lawson, A. M., 1975. Gas chromatographic - mass spectrometric methods for the detection and identification of anabolic steroid drugs. *Br J Sports Med* 9:93–97.
- [Wu 1986] Wu, J. T., Wu, L. H., Knight, J. A., 1986. Stability of NADPH: Effect of various factors on the kinetics of degradation. *Clin. Chem.* 32:314–319.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Schomburg bedanke ich mich für das meinem Thema entgegengebrachte Interesse, seine Bereitschaft, die Betreuung der Arbeit zu übernehmen und die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis die molekularbiologischen Laborarbeiten durchzuführen.

Herrn Prof. Schänzer danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des Themas und die Begutachtung dieser Arbeit.

Für die spontane Übernahme der formalen Betreuung möchte ich Herrn Prof. Schmalz herzlich danken.

Dr. Shivani Chatterjee und Jennifer Raaf bin ich dankbar für die Einführung in die molekularbiologischen Methoden und die moralische Unterstützung, als die Ergebnisse lange auf sich warten ließen.

Mein besonderer Dank gilt Ulrich Flenker für die Bereitschaft, sein Wissen und seine Ideen zu teilen.

Den zahlreichen Mitarbeitern beider Arbeitskreise, meinen Freunden, meinen Geschwistern und meinen Eltern bin ich dankbar für Hilfe, Freundschaft und Anteilnahme.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von der unten angegebenen Teilpublikation - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Dietmar Schomburg betreut worden.

Teilpublikation

Svena M. Lüdke, Ulrich Flenker, Wilhelm Schänzer, and Dietmar Schomburg. Stable carbon isotope discrimination by human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Lipid Res.* 2008 Dec; 49(12):2620-6. Epub 2008 Jul 30.

Köln, 14. August 2008