

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Coenzymbereitstellung in *Saccharomyces cerevisiae*  
zur Ganzzell-Biokatalyse**

**Andreas Knepper**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktor-Ingenieurs  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. med. Dr.-Ing. habil. Erich Wintermantel  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz  
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Eberhard Geiger

Die Dissertation wurde am 27.06.2007 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 06.09.2007 angenommen.



## Vorwort

Diese Arbeit entstand zwischen September 2003 und Juni 2007 am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Weuster-Botz. Die hervorragende Ausstattung des Lehrstuhls, die fachübergreifende Zusammenarbeit und ein erstklassiges Arbeitsklima waren bedeutende Eckpunkte in den vergangenen vier Jahren.

Im Einzelnen haben sehr viele Personen auf unterschiedliche Weise zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen ganz herzlich bedanken!

Bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Weuster-Botz für die Möglichkeit, an seinem Lehrstuhl zu promovieren. Sein Vertrauen und seine Unterstützung waren jederzeit spürbar. Die durch seinen außerordentlichen Führungsstil geschaffene Atmosphäre des persönlichen Kontakts erfreute an jedem Tag. Die Ratschläge und Diskussionen waren sehr hilfreich.

Bei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) für die Teilfinanzierung dieses Projekts (AZ 13124).

Bei Herrn Dr. Wich (Consortium für elektrochemische Industrie) für die Bereitstellung des Stamms *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6.

Bei allen (ehemaligen) Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik – Irma Einsle, Vera Reimann, Markus Amann, Karl-Heinz Zacher, Norbert Werth, Georg Kojro, Dr.-Ing. Holger Pfründer, Dr. rer. nat. Jan Havel, Dr.-Ing. Maya Tiemeyer, Dr.-Ing. Robert Puskeiler, Dr.-Ing. Bettina Knorr, Dr. rer. nat. Helge Engelking, Juniorprof. Dr.-Ing. Ezequiel Franco-Lara, Dr.-Ing. Julia Hiller, Dr.-Ing. Dariusch Hekmat, Armin Tiemeyer, Andreas Kusterer, Dominik Maslak, Micheal Hofinger, Hannes Link, Andrea Vester, Kathrin Hölsch, Gabi Gebhardt, Tanja Kurzrock, Oytun Yavuz, Stefan Bräutigam, Michael Finke, Stefanie Brüning – für die wunderbare Zusammenarbeit, für Rat und Tat und für die schöne Zeit.

Bei allen meinen Studenten – Aikaterini Synadinou, Nikolaos Lempesis, Matthias Lesti, Matthias Klauke, Manuel Söldenwagner, Claudia Drexler, Brice Simon, Ming Su, Peter Riedlberger, Shiliang Huang, Eleftheria Polykarpou, Martina Schleicher, Stefanie Karrasch, Agnes Huber, Ferdinand Alte – für ihren Einsatz und die tatkräftige Unterstützung meines Projekts.

Bei meinem Bruder, meinen Eltern und Großeltern für die Unterstützung in allen Lebenslagen.

„Aus dem Gesagten folgt, daß es der Pyridinring des Co-Ferments ist, der bei der reversiblen Hydrierung – d. h. bei der Wirkung – den Wasserstoff aufnimmt.“

(Warburg *et al.*, 1935, S. 163)

„ (...), und dass wir in der Tat die einheitliche Co-Zymase in Händen haben.“

(von Euler *et al.*, 1935, S. I)



---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Einleitung .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2 Problemstellung und Zielsetzung .....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>3 Theoretischer Hintergrund.....</b>   | <b>7</b>  |
| 3.1 Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....  | 7         |
| 3.1.1 Biologische Grundlagen.....   | 7         |
| 3.1.2 Die Pyridindinucleotide $NAD^+/H$ und $NADP^+/H$ – Entdeckung und<br>Funktion .....   | 8         |
| 3.1.3 $NAD^+/H$ und $NADP^+/H$ im Stoffwechsel von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....  | 12        |
| 3.2 Biosynthese der Pyridindinucleotide in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....  | 17        |
| 3.2.1 Allgemeiner Überblick über verschiedene Synthesewege .....  | 17        |
| 3.2.2 Der Preiss-Handler-Weg.....   | 19        |
| 3.2.3 Die <i>de novo</i> Biosynthese.....   | 32        |
| 3.2.4 Einspeisung von Nicotinamid(derivate) .....   | 43        |
| 3.2.5 Aufnahme exogener Nicotinsäure .....  | 47        |
| 3.2.6 Abbau von $NAD^+$ .....   | 48        |
| 3.2.7 Biosynthese von $NADP^+/H$ .....  | 53        |
| 3.2.8 Zusammenfassende Betrachtung und Kompartimentierung der<br>$NAD(P)^+/H$ -Biosynthese in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..... | 59        |
| 3.2.9 Physiologische Zusammenhänge und Regulationsmechanismen .....   | 65        |
| 3.2.10 Offene Fragen .....  | 78        |
| 3.2.11 Biosynthese von ATP und Phosphoribosyl-Pyrophosphat .....  | 84        |
| 3.3 Mikrobielle Herstellung von Feinchemikalien .....   | 85        |
| 3.3.1 Asymmetrische Biosynthesen .....  | 85        |
| 3.3.2 Asymmetrische Reduktion mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> FasB His6 .....   | 88        |
| 3.3.3 Herstellung des Biokatalysators .....   | 90        |
| <b>4 Asymmetrische Synthese von S-CHBE mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> FasB His6 ....</b>                                       | <b>93</b> |
| 4.1 Einfluss des Erntezeitpunkts auf die Biotransformation .....  | 93        |
| 4.2 Wechselwirkungen zwischen intrazellulärem und extrazellulärem $NAD(P)^+$ .....  | 98        |
| 4.3 Biotransformation mit Coenzymzugabe .....   | 104       |
| 4.4 Zusammenfassung.....  | 107       |

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>5 Untersuchungen zur Anreicherung von NAD<sup>+</sup>/H in</b>                         |            |
| <b><i>Saccharomyces cerevisiae FasB His6</i>.....</b>                                     | <b>108</b> |
| 5.1 Darstellung der Ausgangssituation .....   | 108        |
| 5.2 Voruntersuchungen im Parallelansatz .....   | 111        |
| 5.2.1 Akkumulation von NaMN in wachsenden Kulturen.....                                   | 111        |
| 5.2.2 Akkumulation von NAD <sup>+</sup> /H in wachsenden Kulturen.....                    | 119        |
| 5.2.3 Kombination von Zusätzen.....   | 125        |
| 5.2.4 Zusätze zu Adenin und Nicotinsäure .....  | 130        |
| 5.2.5 Diskussion .....  | 133        |
| 5.2.6 Zusammenfassung.....  | 135        |
| 5.3 Reaktionstechnische Untersuchungen zur Anreicherung von NAD <sup>+</sup> /H.....      | 136        |
| 5.3.1 Referenzprozess .....   | 136        |
| 5.3.2 Einfluss einmaliger Glucosezugabe auf die Biosynthese von NAD <sup>+</sup> /H. .... | 145        |
| 5.3.3 Charakterisierung der Prozessphasen und NAD <sup>+</sup> /H-Bedarf.....             | 148        |
| 5.3.4 RQ-gesteuerter Prozess .....  | 154        |
| 5.3.5 Kontinuierliche Zugabe von Zusätzen .....   | 160        |
| 5.3.6 Diskussion und Herstellungsvorschrift.....  | 165        |
| 5.4 Zusammenfassung zur Anreicherung von NAD <sup>+</sup> /H in                           |            |
| <i>Saccharomyces cerevisiae FasB His6</i> .....   | 168        |
| <b>6 Untersuchungen zur Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H in</b>                        |            |
| <b><i>Saccharomyces cerevisiae FasB His6</i>.....</b>                                     | <b>170</b> |
| 6.1 Darstellung der Ausgangssituation .....   | 170        |
| 6.2 Mögliche Regulationsmechanismen .....   | 176        |
| 6.3 Reaktionstechnische Untersuchung der Anreicherung von NADP <sup>+</sup> /H.....       | 178        |
| 6.3.1 Referenzprozess .....   | 178        |
| 6.3.2 Einmalige Zugabe von Glucose und KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....              | 185        |
| 6.3.3 Kontinuierliche Zugabe von Zusätzen .....   | 190        |
| 6.3.4 Diskussion und Herstellungsverfahren.....   | 196        |
| 6.4 Zusammenfassung zur Anreicherung von NADP <sup>+</sup> /H.....                        | 198        |

---

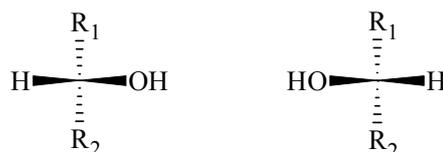
|  |            |
|--|------------|
| <b>7 Biotransformation mit angereicherten Zellen.....</b>  | <b>200</b> |
| 7.1 Einsatz $NAD^+$ /H-angereicherter Zellen .....   | 200        |
| 7.2 Einsatz $NADP^+$ /H-angereicherter Zellen .....  | 203        |
| 7.3 Zusammenfassung.....   | 207        |
| <b>8 Zusammenfassung und Ausblick.....</b>   | <b>208</b> |
| <b>9 Literaturverzeichnis.....</b>   | <b>212</b> |
| <b>10 Material und Methoden .....</b>  | <b>226</b> |
| 10.1 Mikroorganismus, Lösungen und Medien .....  | 226        |
| 10.1.1 Mikroorganismus .....   | 226        |
| 10.1.2 Lösungen.....   | 227        |
| 10.1.3 Medien.....   | 228        |
| 10.2 Durchführung.....   | 230        |
| 10.3 Analytische Methoden .....  | 235        |
| 10.3.1 Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse .....   | 235        |
| 10.3.2 Bestimmung der Optischen Dichte.....  | 236        |
| 10.3.3 Bestimmung des anteiligen Zellvolumens mittels Coulter Counter .....                              | 236        |
| 10.3.4 Bestimmung der Glucosekonzentration.....  | 236        |
| 10.3.5 Probenaufarbeitung und Zellaufschluss.....  | 237        |
| 10.3.6 Bestimmung intrazellulärer Metabolite und extrazellulärer Zusätze<br>mittels HPLC/MS.....         | 238        |
| 10.3.7 Bestimmung der Konzentrationen von Ethanol, Glycerin und Acetat<br>mittels HPLC .....             | 241        |
| 10.3.8 Bestimmung der Aktivität der Fettsäuresynthase .....  | 242        |
| 10.3.9 Extraktion der Biotransformationsansätze zur GC-Messung.....                                      | 243        |
| 10.3.10 Bestimmung der 4-Cl-ACE- und S/R-CHBE-Konzentration mittels<br>chiraler Gaschromatographie ..... | 244        |
| 10.3.11 Berechnungen .....   | 244        |
| <b>11 Anhang .....</b>   | <b>246</b> |
| 11.1 Symbole und Abkürzungen.....  | 246        |
| 11.2 Chemikalien und Geräte.....   | 248        |
| 11.3 Abbildungsverzeichnis.....  | 251        |



## 1 Einleitung

Eduard Buchner beobachtete, dass Enzyme auch außerhalb einer Zelle katalytisch aktiv sein können, und wurde dafür 1907 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Diese Entdeckung findet heutzutage breite Anwendung bei der industriellen Herstellung von Feinchemikalien, beispielsweise durch asymmetrische Biosynthese.

Bei der asymmetrischen Synthese werden Moleküle erzeugt, die sich aufgrund ihrer räumlichen Struktur wie Bild und Spiegelbild verhalten. Solche Isomere werden als Enantiomere bezeichnet, das Phänomen mit Chiralität. In Abbildung 1.1 sind am Beispiel eines chiralen Alkohols beide Enantiomere schematisch dargestellt.



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung beider Enantiomere eines chiralen Alkohols. Die Moleküle können nicht zur Deckung gebracht werden und verhalten sich wie Bild und Spiegelbild. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>: nicht dargestellte Reste der Molekülstruktur. R<sub>1</sub> ≠ R<sub>2</sub>.**

Enantiomere zeigen gleiches physikalisches und chemisches Verhalten, können sich jedoch in ihrer biochemischen Wirkung deutlich unterscheiden. Die pharmakologische Wirkung kann nur einem Enantiomer zugeschrieben werden, das andere kann unwirksam sein oder zu unerwünschten Wirkungen führen. Folglich darf als Wirkstoff nur ein Enantiomer eingesetzt werden.

Die nasschemischen Verfahren zur asymmetrischen Synthese laufen unter aggressiven Reaktionsbedingungen und verwenden toxische Übergangsmetalle als Katalysatoren. Die oftmals geringen Enantiomerenreinheiten erfordern folglich eine kostenintensive Aufreinigung des gewünschten Enantiomers. Bei biologischen Verfahren zur asymmetrischen Synthese kommen dagegen Enzyme oder ganze Zellen als Biokatalysatoren zum Einsatz. Die Reaktionen laufen unter physiologischen Bedingungen und führen meist zu enantiomerenreinen Produkten.

Über 88 % aller biokatalytischen Prozesse zielen auf chirale Produkte. Im Jahr 2000 waren 76 % der zugelassenen Wirkstoffe reine Enantiomere, während deren Anteil 1991 noch 21 % betrug. In diesem Wachstumsmarkt werden jährliche Einnahmesteigerungen um 8 % erwartet (Brommarius und Riebel, 2004).

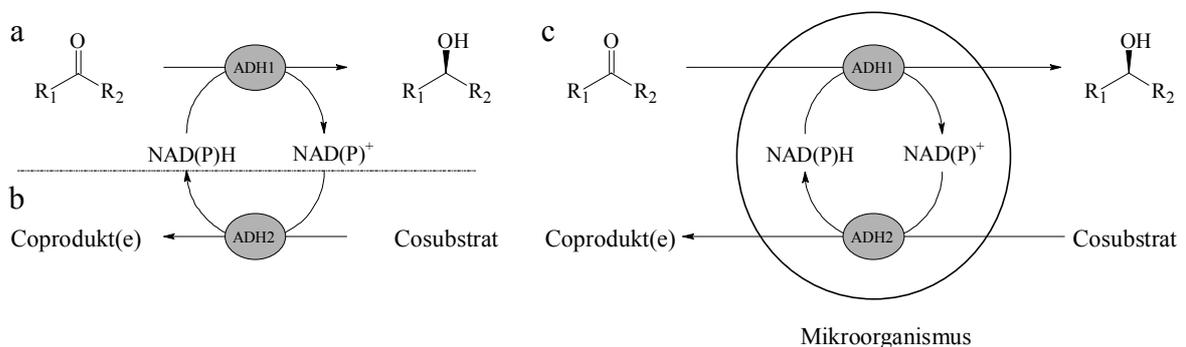
Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein attraktiver Biokatalysator, da sie ein breites Substratspektrum besitzt, eine Vielzahl von Reaktionen katalysieren kann und zu hohen Enantiomerenreinheiten führt. Enzyme wirken als Katalysatoren, indem sie die Aktivierungsenergie einer Reaktion senken und diese beschleunigen (Alberts *et al.*, 1999). Um jedoch katalytisch aktiv zu sein, benötigen viele Enzyme Nichtprotein-Moleküle (Löffler und Petrides, 2003). Diese Coenzyme sind niedermolekulare organische Verbindungen (Leistner und Breckle, 2000).

Die Geschichte der Coenzyme Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid(-Phosphat)  $\text{NAD(P)}^+$  und ihrer reduzierten Formen  $\text{NAD(P)H}$  begann vor mehr als 100 Jahren. 1936 wurde von Fritz Schlenk und von Hans von Euler die Summenformel  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{P}_2\text{O}_{14}$  für  $\text{NAD}^+$  vorgeschlagen, 14 Jahre später zeigten Kornberg und Pricer jr., dass in  $\text{NADP}^+$  die dritte Phosphatgruppe an den AMP-Rest gebunden ist.  $\text{NAD}^+$  kann Wasserstoff übertragen, indem der Pyridinring partiell hydriert wird (Warburg *et al.*, 1935). Die Coenzyme  $\text{NAD}^+/\text{H}$  und  $\text{NADP}^+/\text{H}$  sind als Elektronenüberträger an einer Vielzahl von Stoffwechselreaktionen beteiligt und daher von zentraler Bedeutung (Michal, 1999).

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Feinchemikalien können durch asymmetrische Biosynthesen hergestellt werden. Derartige Feinchemikalien können beispielsweise chirale Alkohole sein, die in Medikamenten die physiologisch wirksame Struktur darstellen.

Die asymmetrische Biosynthese eines chiralen Alkohols ist in Abbildung 2.1a veranschaulicht. Dabei reduziert eine isolierte Alkohol-Dehydrogenase (hier mit ADH1 bezeichnet) ein Keton stereoselektiv zu dem entsprechenden chiralen Alkohol. Die zur Reduktion benötigten Elektronen werden von dem Coenzym NADH oder NADPH (hier als NAD(P)H bezeichnet) geliefert. Substrat und Coenzym werden in einem stöchiometrischen Verhältnis umgesetzt. Da die Coenzyme aber teuer sind, ist eine derartige Prozessführung unökonomisch. Daher wird, wie in Abbildung 2.1a und b dargestellt, eine zweite isolierte Alkohol-Dehydrogenase (hier mit ADH2 bezeichnet) dem Reaktionsansatz zugegeben. Bei der Oxidation des Cosubstrates werden Elektronen auf das Coenzym  $\text{NAD}^+$  oder  $\text{NADP}^+$  übertragen, welches dadurch reduziert wird. Dieser Vorgang wird auch als Regenerierung des Coenzym bezeichnet, welches dadurch eine weitere Reaktion mit dem Substrat eingehen kann. In manchen Fällen kann  $\text{ADH1} = \text{ADH2}$  sein, wenn das eingesetzte Enzym auch die Regenerierungsreaktion katalysieren kann. Allerdings können bei der asymmetrischen Biokatalyse mit isolierten Enzymen die Kosten für die Enzyme und Coenzyme den Wert des Produkts überschreiten.



**Abbildung 2.1:** (a) Asymmetrische Biosynthese eines chiralen Alkohols mittels einer isolierten Alkohol-Dehydrogenase ADH1 mit (b) Coenzym-Regenerierung durch eine zweite isolierte Alkohol-Dehydrogenase ADH2. (c) Asymmetrische Biosynthese eines chiralen Alkohols mittels Ganzzell-Biokatalyse. Die Coenzym-Regenerierung erfolgt im Mikroorganismus.  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ : nicht dargestellte Reste der Molekülstruktur.  $\text{R}_1 \neq \text{R}_2$ .

Daher bietet die Verwendung ganzer Zellen als Biokatalysatoren eine attraktive Alternative. Bei der asymmetrischen Biosynthese hat der Ganzzellansatz den Vorteil, dass prinzipiell auch ein zelleigenes System zur Regenerierung des Coenzym genutzt werden kann. Die asymmetrische Biosynthese eines chiralen Alkohols mittels Ganzzell-Biokatalyse ist in Abbildung 2.1c dargestellt. Das in den Mikroorganismus aufgenommene Substrat wird in der Zelle enzymatisch reduziert (ADH1). Die zelleigenen Coenzyme fungieren dabei als Reduktionsmittel. Mit einem Cosubstrat (beispielsweise Glucose) kann das abreagierte Coenzym beispielsweise durch ein Enzym des natürlichen Stoffwechsels (hier allgemein mit ADH2 bezeichnet) reduziert werden und steht nach der Regenerierung für eine weitere Reaktion mit dem Substrat zur Verfügung. So fallen nur Kosten für den Biokatalysator und für das Cosubstrat an. Allerdings wird bei der Ganzzell-Biokatalyse oftmals festgestellt, dass die Coenzym-Konzentration während der Reaktion absinkt und damit nur eine geringe Halbwertszeit des Biokatalysators erreicht wird, bzw. die eingesetzten Zellen wegen zu niedriger Mengen an zellinternen Coenzymen nur geringe Produktbildungskapazitäten besitzen (Griffin *et al.*, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher am Beispiel der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 Strategien zur Herstellung Coenzym-angereicherter Ganzzell-Biokatalysatoren entwickelt werden. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein attraktiver Biokatalysator für asymmetrische Synthesen, da sie eine Vielzahl von Enzymen mit ADH-Aktivität exprimiert. Sie besticht durch hohe Enantiomerenreinheiten sowie durch ein breites Substratspektrum. Zusätzlich ist die Hefe frei verfügbar und billig. Zur weiteren Steigerung der Enantiomerenreinheiten der Wildtypstämme können entsprechende Enzyme überexprimiert werden. Ein solch rekombinanter Stamm ist die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6, die zur Steigerung der Enantiomerenreinheiten die  $\beta$ -Untereinheit der zelleigenen Fettsäuresynthase und zur Unterstützung der Coenzymregenerierung eine Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* überexprimiert.

---

Zur Erreichung dieser Zielsetzung waren die folgenden Arbeitspakete geplant:

- Zusammenfassung und Bewertung aller bisherigen Kenntnisse zur Biosynthese von  $\text{NAD}^+/\text{H}$  und  $\text{NADP}^+/\text{H}$  in *Saccharomyces cerevisiae*.
- Experimentelle Untersuchungen zur Aufnahme von extrazellulär vorgelegtem  $\text{NAD(P)}^+/\text{H}$  mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6.
- Reaktionstechnische Untersuchungen zur Anreicherung von  $\text{NAD}^+/\text{H}$  in *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 und Entwicklung geeigneter Strategien zur Herstellung  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -angereicherter Hefezellen.
- Reaktionstechnische Untersuchungen zur Anreicherung von  $\text{NADP}^+/\text{H}$  in *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 und Entwicklung geeigneter Strategien zur Herstellung  $\text{NADP}^+/\text{H}$ -angereicherter Hefezellen.
- Einsatz der Coenzym-angereicherten *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 Zellen in einer Ganzzell-Biotransformation zur asymmetrischen Synthese.



## **3 Theoretischer Hintergrund**

Der Mikroorganismus *Saccharomyces cerevisiae* wird in Kapitel 3.1 näher betrachtet, bevor in Kapitel 3.2 auf die Biosynthese von  $\text{NAD(P)}^+/\text{H}$  in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ausführlich eingegangen wird. Abschließend wird in Kapitel 3.3 die mikrobielle Herstellung von Feinchemikalien angesprochen.

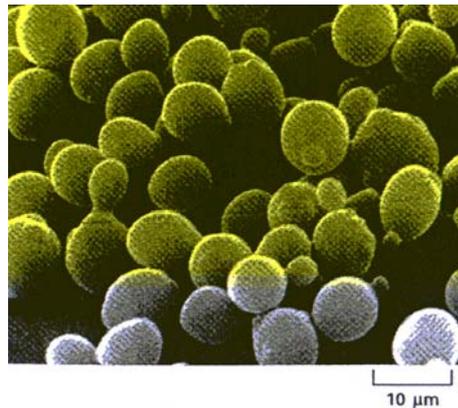
### **3.1 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

Dieses Kapitel soll einen allgemeinen Überblick über den Mikroorganismus *Saccharomyces cerevisiae* geben. Dieser wird zu Beginn in Kapitel 3.1.1 näher charakterisiert. Folgend werden in Kapitel 3.1.2 die Coenzyme  $\text{NAD}^+/\text{H}$  und  $\text{NADP}^+/\text{H}$  eingeführt. Ihr Vorkommen im Zellstoffwechsel wird in Kapitel 3.1.3 kurz angesprochen.

#### **3.1.1 Biologische Grundlagen**

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein einzelliger Eukaryot (Alberts *et al.*, 1999), der zu den Schlauchpilzen gehört. Die Fortpflanzung erfolgt durch Sprossung (Leistner und Breckle, 2000). Eine elektronenmikroskopische Aufnahme ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die eukaryotische Zelle ist gekennzeichnet durch Kompartimente und Organellen (Alberts *et al.*, 1999). Diese Grundstrukturen sind wichtig für die Durchführung geordneter Stoffwechselfvorgänge (Leistner und Breckle, 2000). *Saccharomyces cerevisiae* hat eine starre Zellwand, die das Cytosol umschließt. Das Cytosol ist reich an Molekülen, in ihm finden viele chemische Reaktionen statt. Im Zellkern ist die genetische Information in Form von Chromosomen gespeichert. Der Zellkern ist von zwei konzentrischen Membranen umgeben. In den Mitochondrien vollzieht sich die an die Oxidation von Nährstoffen gekoppelte Synthese von ATP. Die Mitochondrien sind längliche Organellen, die von zwei getrennten Membranen umgeben sind, und besitzen ihre eigene DNA (Alberts *et al.*, 1999). Nach der Endosymbiontenhypothese waren Mitochondrien vormals eigenständige Prokaryoten, die später in Eukaryoten aufgenommen wurden (Leistner und Breckle, 2000). Eine weitere Kompartimentierung beruht auf von einfachen Membranen

vom Cytosol abgetrennten Organellen, beispielsweise das endoplasmatische Reticulum und der Golgi-Apparat. Die Peroxisomen schaffen einen Raum, in dem Peroxide gebildet und abgebaut werden können (Alberts *et al.*, 1999). Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein fakultativ anaerober Mikroorganismus (Leistner und Breckle, 2000).



**Abbildung 3.1:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Saccharomyces cerevisiae* (Alberts *et al.*, 1999)

### 3.1.2 Die Pyridindinucleotide $\text{NAD}^+/\text{H}$ und $\text{NADP}^+/\text{H}$ – Entdeckung und Funktion

Die Geschichte der Pyridindinucleotide Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid(-Phosphat)  $\text{NAD(P)}^+$  und ihrer reduzierten Formen  $\text{NAD(P)H}$  ist mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eng verbunden und begann vor mehr als 100 Jahren. In diesem Zeitraum wurde  $\text{NAD}^+$  auch mit den Namen ‚Cozymase‘, ‚Codehydrogenase I‘ und ‚Diphosphopyridin-Nucleotid‘ bezeichnet; ‚Codehydrogenase II‘, ‚Co-Ferment‘ und ‚Triphosphopyridin-Nucleotid‘ waren gängige Namen für  $\text{NADP}^+$ .

Eduard Buchner beschrieb 1907, dass in Hefepresssaft Gärung stattfinden kann. Arthur Harden (1930) konnte zeigen, dass bei Reinigungsschritten eine labile Substanz verloren gehen kann, die eigentlich die enzymatische Reaktion unterstützt. Erste Strukturaufklärungen wurden u. a. von Hans von Euler unternommen. Für eine aufgereinigte Fraktion der Cozymase konnte die Zusammensetzung zu gleichen Teilen aus einem Zuckerrest, einer Purinbase und Phosphorsäure bestimmt werden. Diese Art der Kombination wurde als Nucleotid bezeichnet (von Euler, 1930), die Summenformel  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{P}_2\text{O}_{14}$  wurde sechs Jahre später vorgeschlagen. Die Cozymase besteht aus

Adenosinmonophosphat und Nicotinamidmononucleotid. Mögliche Strukturformeln werden diskutiert (Schlenk und von Euler, 1936).

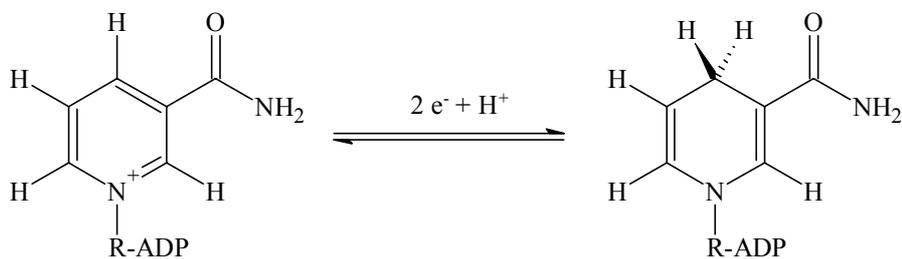
Für die Codehydrogenase I ( $\text{NAD}^+$ ) wurden bei der Elementaranalyse zwei Mol Phosphor pro Mol Codehydrogenase I bestimmt, entsprechend einem Phosphorgehalt von 9 % (von Euler und Schlenk, 1937). Dagegen wurde für das Co-Ferment ( $\text{NADP}^+$ ) ein Phosphorgehalt von 12 % entsprechend drei Mol Phosphor pro Mol Co-Ferment bestimmt (Warburg *et al.*, 1935). Der Unterschied wird in einem Molekül Phosphorsäure gesehen (Vestin, 1937). Ragnar Vestin konnte 1937 erstmals die enzymatische Umwandlung von  $\text{NAD}^+$  in  $\text{NADP}^+$  beschreiben und nahm an, dass zwischen  $\text{NAD}^+$  (Codehydrogenase I) mit einem Phosphatdonor und  $\text{NADP}^+$  (Codehydrogenase II) ein Gleichgewicht bestünde. Die enzymatische Synthese von  $\text{NAD}^+$  war die erste Reaktion, bei der beobachtet wurde, dass ATP in ein Dinucleotid eingebaut wurde (Kornberg, 1950a). Kornberg und Pricer jr. konnten 1950 zeigen, dass in  $\text{NADP}^+$  die dritte Phosphatgruppe an den AMP-Rest gebunden und dass  $\text{NADP}^+$  ein Dinucleotid bestehend aus Nicotinamidmononucleotid und aus Adenosin-2,5-Phosphat ist (AMP: Adenosin-2-Phosphat).

Vier Personen, die an der Erforschung der Coenzyme  $\text{NAD(P)}^+/\text{H}$  beteiligt waren, erhielten den Nobelpreis. Arthur Harden und Hans von Euler wurden 1929 zusammen u. a. für ihre Arbeiten zu der Erforschung von  $\text{NAD}^+/\text{H}$  ausgezeichnet.

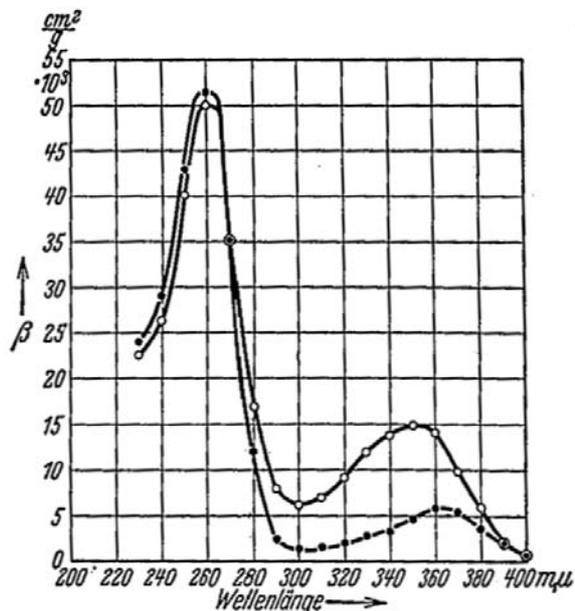
**Tabelle 3.1: An der Entdeckung von  $\text{NAD(P)}^+/\text{H}$  beteiligte Nobelpreisträger**

| Jahr | Bereich             | Person          | Fachgebiet  |
|------|---------------------|-----------------|---|
| 1929 | Chemie              | Arthur Harden   | The function of phosphate in alcoholic fermentation |
| 1929 | Chemie              | Hans von Euler  | Fermentation of sugars and fermentative enzymes     |
| 1931 | Physiologie/Medizin | Otto Warburg    | The oxygen-transferring ferment of respiration      |
| 1959 | Physiologie/Medizin | Arthur Kornberg | The biological synthesis of deoxyribonucleic acid   |

Das Co-Ferment kann Wasserstoff übertragen, indem der Pyridinring partiell hydriert wird (Warburg *et al.*, 1935). Die Energieübertragung in Form von Elektronen wird von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  in der Zelle übernommen. Ein Molekül  $\text{NAD}^+$  (oder  $\text{NADP}^+$ ) kann zwei Elektronen und ein Proton (formal ein Hydrid-Ion) aufnehmen und wird dabei zu  $\text{NADH}$  (bzw.  $\text{NADPH}$ ) reduziert (Alberts *et al.*, 1999). Ein weiteres Proton wird vom Substrat freigesetzt (Michal, 1999). Diese Elektronenübertragung ist schematisch in Abbildung 3.2 gezeigt.



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung der Elektronenübertragung der Pyridindinucleotide am Beispiel von  $\text{NAD}^+$ . -R-ADP: ADP-Ribose.



**Abb. 2.** Ultraviolettspektrum des nicht hydrierten und durch Hexosemonophosphorsäure hydrierten Co-Ferments. (Lösungsmittel 0,2% Natriumbicarbonat.)  
 ● = Nicht hydriertes Co-Ferment,  
 ○ = durch Hexosemonophosphorsäure hydriertes Co-Ferment.

**Abbildung 3.3:** Änderung des Absorptionsspektrums von  $\text{NAD}^+$  bei der Reduktion (Warburg *et al.*, 1935). Wellenlänge in nm.  $\beta$ : Absorption.

NAD<sup>+</sup> absorbiert bei 260 nm. Nach der Reduktion kann eine zweite Bande bei 345 nm erkannt werden (Warburg *et al.*, 1935). Dieser Zusammenhang findet häufig bei photometrischen Bestimmungen Anwendung (Löffler und Petrides, 2003) und ist in Abbildung 3.3 graphisch dargestellt.

Das Hydrid-Ion wird gerne abgegeben, da der oxidierte Nicotinamidring energetisch stabiler ist. Daher ist die Elektronenübertragung effizient. Die zusätzliche Phosphatgruppe des NADP<sup>+</sup> ist weit von der Stelle der Elektronenanlagerung entfernt und beeinflusst diese nicht. Sie bringt chemisch keinen großen Unterschied. Allerdings ändert sie die Struktur derart, dass ein Enzym nur einen der beiden Elektronenüberträger binden kann. Somit können die Elektronen von NADH auf andere Substrate übertragen werden wie die von NADPH. Zwei verschiedene Gruppen von Enzymen können also bedient werden, die sich in ihrer Funktion im Stoffwechsel unterscheiden. NADPH liefert in anabolen Reaktionen die Elektronen, die in energiereiche Biomoleküle eingebaut werden. NADH dagegen tritt bei katabolen Reaktionen zur Synthese von ATP auf (Alberts *et al.*, 1999). Innerhalb der Redox-Paare werden jedoch unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse zwischen der oxidierten und reduzierten Form eingestellt. Für das Redox-Paar NAD<sup>+</sup>/NADH kann dieses Verhältnis zwischen 200 und 1000 liegen, für NADP<sup>+</sup>/NADPH bei 0,01. Aufgrund der Coenzympezifität und der einzelnen Substratkonzentrationen kommt es nicht zu einem Ausgleich dieser Redox-Verhältnisse. NAD<sup>+</sup>/H und NADP<sup>+</sup>/H sind als Elektronenüberträger an einer Vielzahl von Stoffwechselreaktionen beteiligt und daher von zentraler Bedeutung (Michal, 1999).

Die chemische Stabilität der Coenzyme wurde ausführlich untersucht. Die reduzierte Form der Coenzyme (NADH oder NADPH) ist im basischen Bereich stabil, die oxidierte (NAD<sup>+</sup> oder NADP<sup>+</sup>) im sauren Bereich. Bei neutralem *pH* werden alle Formen als stabil betrachtet. Für NADH und NADPH wurde bei *pH* 7,0 in einem 0,1 M Phosphatpuffer bei 25 °C eine Halbwertszeit von 27 bzw. 13 Stunden bestimmt. Weiterführende Informationen können Peters (1998), Oppenheimer (1994), Richard *et al.* (1993) oder Chenault und Whitesides (1987) entnommen werden.

**3.1.3 NAD<sup>+</sup>/H und NADP<sup>+</sup>/H im Stoffwechsel von *Saccharomyces cerevisiae***

Dieses Kapitel soll einen kurzen Überblick über das Auftreten der Coenzyme NAD<sup>+</sup>/H und NADP<sup>+</sup>/H im Stoffwechsel einer Zelle geben. Entsprechend dem hauptsächlichlichen Vorkommen von NAD<sup>+</sup>/H im Katabolismus, wird zuerst der Abbau von Glucose zusammengefasst, bevor noch kurz auf das Vorkommen von NADPH im Anabolismus eingegangen wird. Da der Metabolismus einer eukaryotischen Zelle sehr komplex ist (Rehm und Reed, 1993), sollen an dieser Stelle nur allgemeine Prinzipien dargestellt werden. Für tiefgehendere Betrachtungen des Stoffwechsels von *Saccharomyces cerevisiae* kann u. a. auf Artikel von Bakker *et al.* (2001), Bruinenberg *et al.* (1983) und auf weitere dieser Arbeitsgruppe sowie auf Rehm und Reed (1993), Richard (2003) oder Flores *et al.* (2000) verwiesen werden. Der Zentralstoffwechsel der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kann aus Abbildung 3.4 entnommen werden.

Die Glykolyse ist der erste Schritt des Glucoseabbaus (Alberts *et al.*, 1999) und findet im Cytosol statt. Dagegen erfolgen die Pyruvatdecarboxylierung, der Zitronensäurezyklus und die Atmungskette in den Mitochondrien (Leistner und Breckle, 2000).

Aus einem Molekül Glucose entstehen bei der Glykolyse nach zehn Stufen zwei Moleküle Pyruvat (Brenztraubensäure), 2 Moleküle ATP und 2 Moleküle NADH. Vom Cytosol aus wandert das Pyruvat in die Mitochondrien (Alberts *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu der äußeren Mitochondrienmembran ist die innere praktisch undurchlässig. Nur kleine, ungeladene Moleküle können die innere Membran passieren. Für den teilweise erforderlichen Stofftransport über die innere mitochondriale Membran können Transportsysteme existieren (Löffler und Petrides, 2003). Der Austausch von Reduktionsäquivalenten über die innere Mitochondrienmembran kann mit Hilfe von Redox-Transportsystemen vollzogen werden (Bakker *et al.*, 2001). In den Mitochondrien wird Pyruvat anschließend decarboxyliert, ein Molekül NADH entsteht dabei (Leistner und Breckle, 2000). Der verbleibende C<sub>2</sub>-Körper (eine Acetylgruppe) ergibt zusammen mit dem Überträger Coenzym A (CoA) das Acetyl-CoA (Alberts *et al.*, 1999).

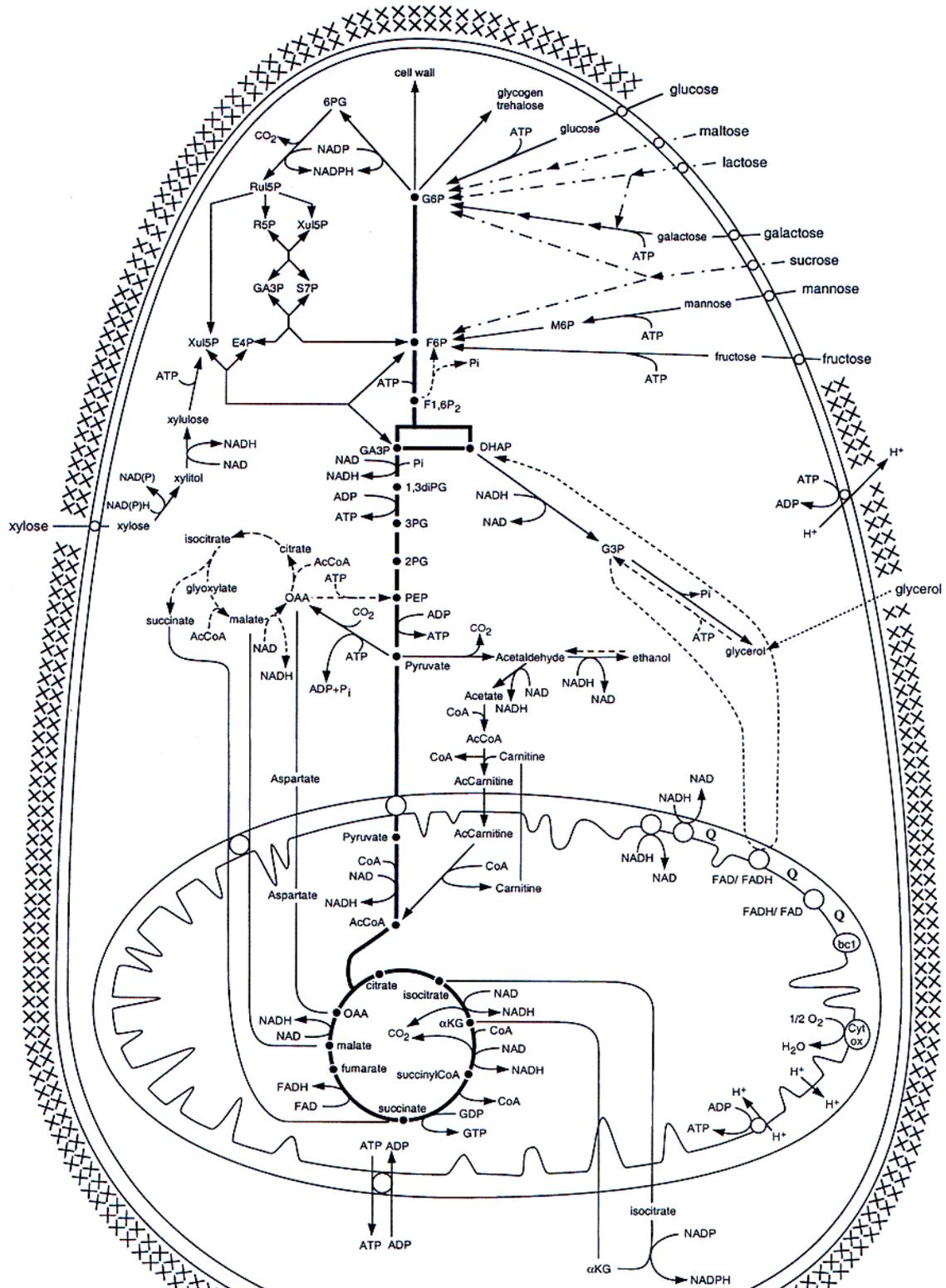


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des Zentralstoffwechsels von *Saccharomyces cerevisiae* (Flores et al., 2000)

Der zweite Schritt des Glucoseabbaus ist der Zitronensäurezyklus. Dieser vollzieht sich ebenfalls in den Mitochondrien. Von Acetyl-CoA wird die Acetyl-Gruppe auf Oxaloacetat, ein Intermediat des Zitronensäurezyklus, übertragen. Es entsteht Zitronensäure. Durch acht Reaktionen wird Zitronensäure schrittweise oxidiert, wobei durch Decarboxylierung letztlich wieder Oxaloacetat entsteht, auf das für einen neuen Durchlauf wieder eine Acetylgruppe von Acetyl-CoA übertragen werden kann. Aus einer Acetyl-Gruppe entstehen drei NADH-Moleküle (Alberts *et al.*, 1999).

Da eine Zelle nur über eine bestimmte Menge an Coenzymen verfügt, welche beim Glucoseabbau reduziert werden, müssen diese oxidiert werden, um weiterhin alle Stoffwechselaktivitäten zu erhalten. Je nach Sauerstoffverfügbarkeit gibt es verschiedene Möglichkeiten, die Coenzyme zu oxidieren (Leistner und Breckle, 2000).

Unter aeroben Bedingungen kann NADH anschließend an der Elektronentransportkette, die sich innerhalb der inneren Mitochondrienmembran befindet, oxidiert werden. Die Elektronen werden auf Sauerstoff übertragen, dabei entsteht zusätzlich ATP durch Phosphorylierung von ADP (Alberts *et al.*, 1999). Pro Mol NADH können drei Mol ATP aus drei Mol ADP gebildet werden (Leistner und Breckle, 2000). Das in der Glykolyse gebildete NADH kann auch zu der Phosphorylierung von ADP zu ATP beitragen. Das dabei gebildete  $\text{NAD}^+$  kann wieder in der Glykolyse eingesetzt werden (Alberts *et al.*, 1999).

Unter anaeroben Bedingungen kann keine oxidative Phosphorylierung stattfinden, weil Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor fehlt. Cytosolisches NADH kann also nicht an der Atmungskette regeneriert werden. Daher werden die Elektronen auf Metabolite des Stoffwechsels übertragen und Ethanol entsteht. Pro Mol Glucose können nur 2 Mol ATP gebildet werden (Leistner und Breckle, 2000). Auch unter aeroben Bedingungen kann bei Hefen beobachtet werden, dass sie anaeroben Metabolismus betreiben, wobei aus Glucose Ethanol gebildet wird. Dieser Überschußmetabolismus (auch Crabtree-Effekt genannt) ist durch eine Inhibierung der Atmung bei Glucosekonzentrationen über  $0,15 \text{ g L}^{-1}$  verursacht. Nur wenn die Glucosekonzentration unter  $0,15 \text{ g L}^{-1}$  und die Wachstumsrate unter  $0,22 \text{ h}^{-1}$  liegen, wird kein Ethanol unter aeroben Bedingungen gebildet. Der Zellertrag liegt dann

bei dem Maximum von 0,5 Gramm Biotrockenmasse pro Gramm Glucose (Rehm und Reed, 1993). Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 3.5 graphisch zusammengefasst.

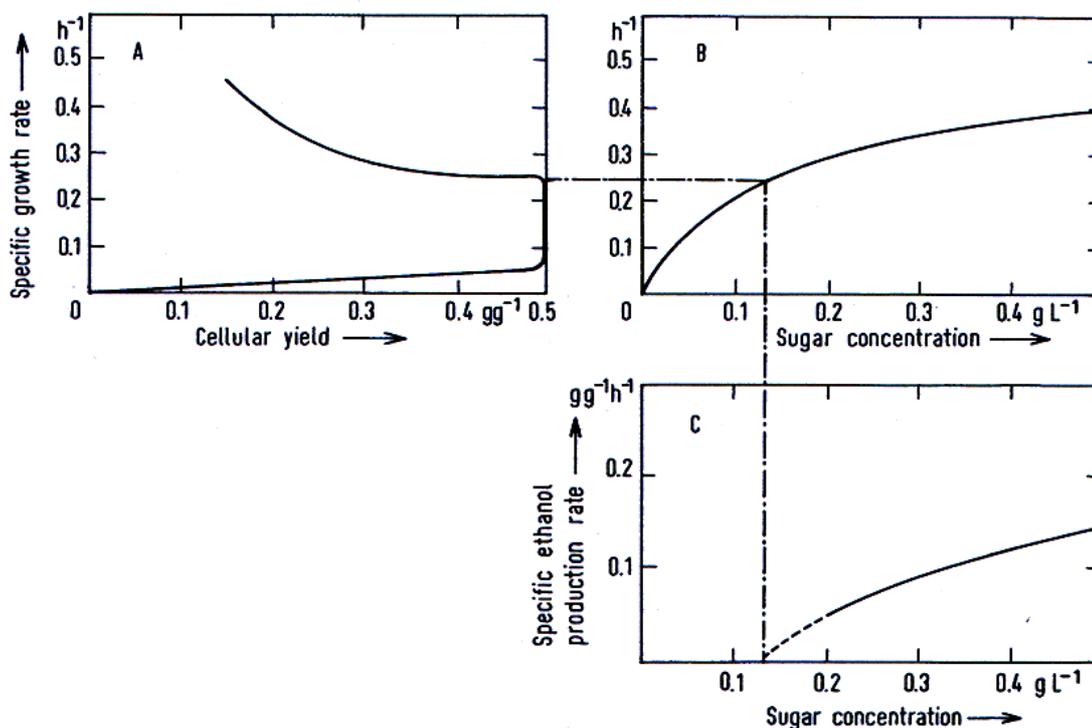


Abbildung 3.5: Einfluss der Glucosekonzentration auf die spezifische Ethanolbildungsrate, auf die spezifische Wachstumsrate und auf den Zellertrag (Rehm und Reed, 1993)

Beim aeroben Abbau der Glucose können also pro Mol Glucose zwei Mol NADH in der Glycolyse, zwei Mol NADH bei der Pyruvatdecarboxylierung und sechs Mol NADH im Zitronensäurezyklus, also insgesamt 10 Mol NADH pro Mol Glucose, entstehen.

Der Respirationskoeffizient (RQ) gibt das Verhältnis von gebildetem Kohlendioxid zu aufgenommenem Sauerstoff an. Bei der vollständigen Veratmung von Glucose zu Kohlendioxid und Wasser beträgt der Wert 1,0. Werte größer 1,0 ergeben sich in Phasen des Überschussmetabolismus bei der aeroben Bildung von Ethanol. Werte unter 1,0 zeigen die aerobe Verstoffwechslung von Ethanol und Acetat an (Engelking, 2004).

---

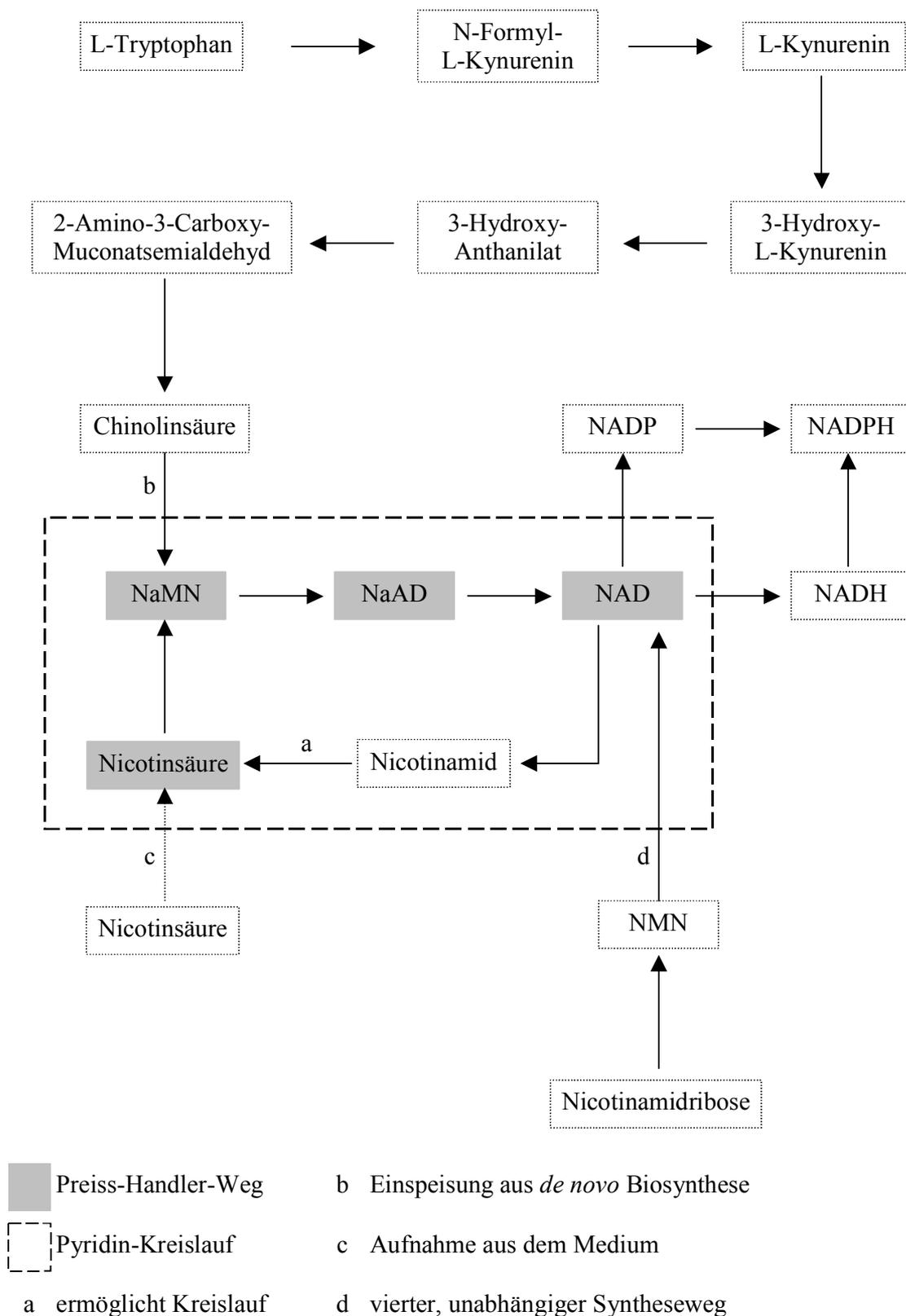
NADPH ist Elektronendonator bei der Fettsäuresynthese (Leistner und Breckle, 2000) sowie bei der Aminosäuresynthese und Biomassebildung (Bruinenberg *et al.*, 1983). Im Pentosephosphatweg wird  $\text{NADP}^+$  bei der direkten Oxidation und Decarboxylierung von Glucose regeneriert. Für die Nucleotidsynthese wichtige Pentosen werden hier gebildet (Löffler und Petrides, 2003). Pro Glucosemolekül können zwei Moleküle  $\text{NADP}^+$  reduziert werden (Michal, 1999). Der Fluss durch den Pentosephosphatweg kann von der Stickstoffquelle abhängen (Bruinenberg *et al.*, 1983). Zusätzlich kann  $\text{NADP}^+$  über eine  $\text{NADP}^+$ -abhängige Isocitrat-Dehydrogenase regeneriert werden. Ausgehend von einer konstanten  $\text{NADP}^+/\text{H}$ -Konzentration kann bestimmt werden, dass beim Aufbau von Biomasse aus Glucose und Nitrat viermal so viel Reduktionsäquivalente benötigt werden wie beim Wachstum auf Glucose und Ammonium. Um diese zusätzlichen Elektronen zur Verfügung zu stellen, muss folglich mehr Glucose über den Pentosephosphatweg verstoffwechselt werden (Bruinenberg *et al.*, 1983).

### 3.2 Biosynthese der Pyridindinucleotide in *Saccharomyces cerevisiae*

In diesem Kapitel wird die Biosynthese von  $\text{NAD}^+/\text{H}$  und  $\text{NADP}^+/\text{H}$  dargestellt sowie auf die physiologische Bedeutung dieser Coenzyme und auf Regulationsmechanismen eingegangen. In Kapitel 3.2.1 wird zuerst ein allgemeiner Überblick gegeben, dann werden die Wege zur Biosynthese von  $\text{NAD}^+/\text{H}$  über den Preiss-Handler-Weg in Kapitel 3.2.2, über die *de novo* Biosynthese in Kapitel 3.2.3, über die Einspeisung von Nicotinamid(derivate) sowie über die Aufnahme exogener Nicotinsäure in Kapitel 3.2.4 bzw. 3.2.5 ausführlich beschrieben. Nach der Darstellung der Abbauprodukte von  $\text{NAD}^+$  in Kapitel 3.2.6 wird in Kapitel 3.2.7 auf die Biosynthese von  $\text{NADP}^+/\text{H}$  eingegangen bevor abschließend die Kompartimentierung der  $\text{NAD(P)}^+/\text{H}$ -Biosynthese in Kapitel 3.2.8 angesprochen sowie physiologische Zusammenhänge und Regulationsmechanismen in Kapitel 3.2.9 erläutert werden. Offene Fragen sind in Kapitel 3.2.10 zusammengefasst. Die Biosynthese von ATP und Phosphoribosyl-Pyrophosphat ist in Kapitel 3.2.11 kurz angesprochen.

#### 3.2.1 Allgemeiner Überblick über verschiedene Synthesewege

Aufgrund der Komplexität der Biosynthese von  $\text{NAD}^+/\text{H}$  und  $\text{NADP}^+/\text{H}$  sollen vorab einige Zusammenhänge erläutert werden. Das Netzwerk der beteiligten Reaktionen ist in Abbildung 3.6 zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass es sich bei der Netto-Synthese von  $\text{NAD}^+$  um das Zusammenspiel von abbauenden und aufbauenden Reaktionen handelt. Der nach Jack Preiss und Philip Handler benannte Teil der  $\text{NAD}^+$ -Biosynthese (in Abbildung 3.6 grau unterlegt) umfasst die drei Schritte von Nicotinsäure (Na) über Nicotinsäuremononucleotid (NaMN) und Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid (NaAD) zu Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid ( $\text{NAD}^+$ ). Bei NaMN laufen der Preiss-Handler-Weg und *de novo* Biosynthese zusammen, die letzten beiden Schritte zu  $\text{NAD}^+$  sind identisch. Die *de novo* Biosynthese (b in Abbildung 3.6) beginnt bei der Aminosäure L-Tryptophan (Trp) und verläuft über sechs enzymatische und eine nicht-enzymatische Teilreaktion(en). Als Zwischenprodukte treten N-Formyl-L-Kynurenin (N-Kyn), L-Kynurenin (Kyn), 3-Hydroxy-L-Kynurenin (3OH-Kyn), 3-Hydroxy-Anthranilat (3OH-A), 2-Amino-3-Carboxy-Muconatsemialdehyd (2A-3C-Ald) und Chinolinsäure (Qa) auf.



**Abbildung 3.6: Vereinfachte Darstellung der vier NAD<sup>+</sup>-Biosynthesewege in *Saccharomyces cerevisiae*.** NaMN: Nicotinsäuremononucleotid. NaAD: Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid. NAD<sup>+</sup>: Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid. NADH: reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid. NADP<sup>+</sup>: Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat. NADPH: reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat. NMN: Nicotinamidmononucleotid.

Nicotinamid-Ribose (NR) kann über Nicotinamidmononucleotid (NMN) direkt zu  $\text{NAD}^+$  verarbeitet werden (d in Abbildung 3.6). Nicotinamid (N) kann in Form von Nicotinsäure in den Preiss-Handler-Weg eingespeist werden (a in Abbildung 3.6), die auch aus dem Medium aufgenommen werden kann (c in Abbildung 3.6). Da beim Abbau von  $\text{NAD}^+$  Nicotinamid entsteht, ist  $\text{NAD}^+$  ein Intermediat des Kreislaufs  $\text{NAD}^+ - \text{Nm} - \text{Na} - \text{NaMN} - \text{NaAD} - \text{NAD}^+$  (gestrichelter Rahmen in Abbildung 3.6), der zusätzlichen Einspeisungen und Entnahmen, u. a. zur Biosynthese von  $\text{NADP}^+/\text{H}$ , unterliegen kann.

### 3.2.2 Der Preiss-Handler-Weg

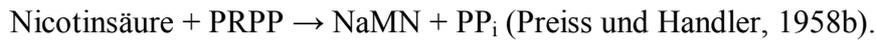
Als Preiss-Handler-Weg wird die Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  ausgehend von Nicotinsäure bezeichnet. Als Substrate/Produkte treten Nicotinsäure (Na), Nicotinsäuremononucleotid (NaMN), Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid (NaAD) und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid ( $\text{NAD}^+$ ) auf. Im Folgenden wird auf die beteiligten Enzyme

- Nicotinsäure-Phosphoribosyl-Transferase Npt1p,
- NaMN/NMN-Adenylyl-Transferase 1,2 Nma1p, Nma2p und
- Glutamin-abhängige  $\text{NAD}^+$ -Synthetase Qns1p näher eingegangen.

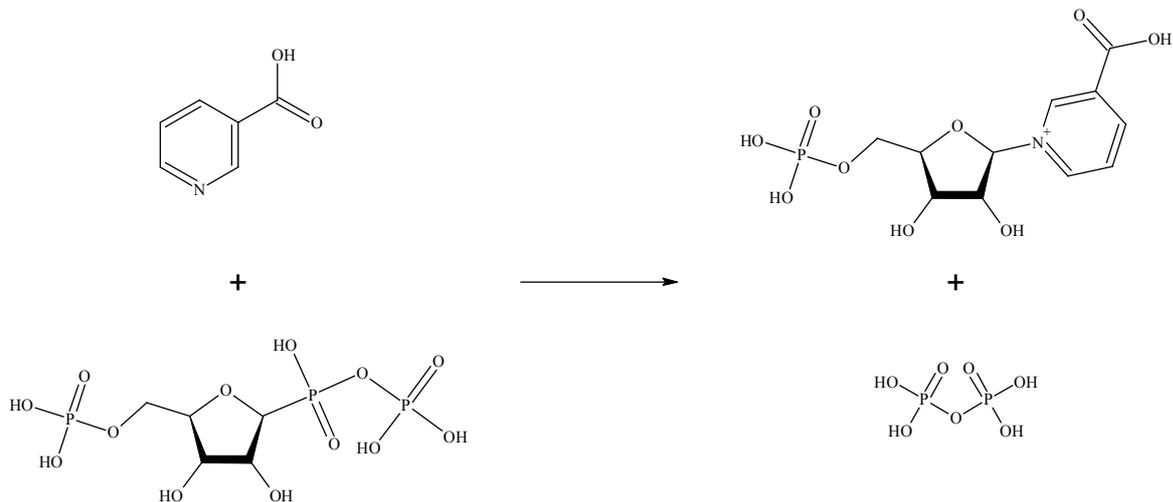
Preiss und Handler (1958a) postulierten, dass auch in der Hefe die Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  aus Nicotinsäure über die Zwischenstufen NaMN und NaAD geht und erwarteten, dass diese drei Reaktionen nacheinander stattfinden. Diese Vermutung wurde bestätigt, indem Hefeautolysat mit Nicotinsäure, PRPP, Glutamin, ATP und  $\text{Mg}^{2+}$  versetzt und auf Zunahme der  $\text{NAD}^+$ -Konzentration untersucht wurde. Letztere zeigte eine geringe Zunahme, welche jedoch ausblieb, wenn jeweils eines der genannten Substrate von der Untersuchung ausgeschlossen wurde. NaMN und NaAD konnten als Zwischenprodukte der  $\text{NAD}^+$ -Biosynthese in Hefeautolysat identifiziert und nachgewiesen werden (Preiss und Handler, 1958b).

### Nicotinsäure-Phosphoribosyl-Transferase Npt1p

Preiss und Handler (1958a) vermuteten, dass auch in der Hefe die Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  aus Nicotinsäure über die Zwischenstufen NaMN geht, welches als Zwischenprodukt der  $\text{NAD}^+$ -Biosynthese in Hefeautolysat identifiziert und nachgewiesen werden konnte. Für diese Reaktion wurde folgende Gleichung in Hefe vorgeschlagen:



Die Biosynthese von Nicotinsäuremononucleotid ist in Abbildung 3.7 in Strukturformeln dargestellt.



**Abbildung 3.7: Biosynthese von Nicotinsäuremononucleotid in Strukturformeln. Diese Reaktion ist der erste Schritt im Preiss-Handler-Weg und wird von der Nicotinsäure-Phosphoribosyl-Transferase (Npt1p) katalysiert.**

Die Nicotinsäure-Phosphoribosyl-Transferase wurde von vielen Arbeitsgruppen (Preiss und Handler, 1958b; Honjo *et al.*, 1966; Ogasawara und Gholson, 1966; Kosaka *et al.*, 1971; Kosaka *et al.*, 1977; Hanna *et al.*, 1983) (teilweise) gereinigt und charakterisiert. Ergebnisse dieser Studien sind im Folgenden zusammengefasst:

Zu Beginn der Reaktion müssen ATP (Preiss und Handler, 1958b; Ogasawara und Gholson, 1966; Kosaka *et al.*, 1971) und  $\text{Mg}^{2+}$  (Preiss und Handler, 1958b; Kosaka *et al.*, 1971) sowie die Substrate Nicotinsäure und PRPP vorliegen (Preiss und Handler, 1958b). Die Verwendung von Nicotinamid an Stelle von Nicotinsäure wird als unwahrscheinlich

betrachtet (Preiss und Handler, 1958a) und konnte experimentell belegt werden (Preiss und Handler, 1958b). Jedoch wurde bei diesen Arbeiten wohl die Deamidase-Aktivität zerstört, die Nicotinamid in Nicotinsäure überführt und so in die NAD<sup>+</sup>-Biosynthese einspeist (Sundaram *et al.*, 1960).

Pro Mol gebildetes Nicotinsäuremononucleotid wird ein Mol ATP verbraucht (Honjo *et al.*, 1966). Weder ADP noch anorganisches Phosphat werden gebildet, wenn eines der beiden Substrate Phosphoribosyl-Pyrophosphat und Nicotinsäure nicht verfügbar sind. ATP kann durch die Purinnucleosidtriphosphate ITP oder GTP bei nahezu gleichbleibender Aktivität ersetzt werden. Die Aktivität sinkt um zwei Drittel, wenn ATP durch die Pyrimidinnucleosidtriphosphate CTP oder UTP substituiert wird (Kosaka *et al.*, 1971). Im Gegensatz dazu wird in einer früheren Studie beschrieben, dass UTP, CTP, ADP oder GTP von dem Enzym nicht akzeptiert werden und es spezifisch für ATP ist (Honjo *et al.*, 1966). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit sowie die Affinität von Nicotinsäure zu dem Enzym nehmen mit höherer ATP-Konzentration zu (Nakamura *et al.*, 1964). Hinsichtlich der Substrate wurde festgestellt, dass Ribose-5-Phosphat PRPP nicht ersetzen kann. Weder Chinolinsäure oder Nicotinamid noch andere Pyrimidine oder Purine können statt Nicotinsäure umgesetzt werden (Honjo *et al.*, 1966).

Die Reaktion erscheint irreversibel (Honjo *et al.*, 1966; Kosaka *et al.*, 1971), da die Rate der Rückreaktion um drei Zehnerpotenzen geringer ist als die Rate der Hinreaktion (Kosaka *et al.*, 1971). Für eine irreversible Reaktion spricht auch die Spaltung von ATP (Hanna *et al.*, 1983), durch welche das Gleichgewicht auf die Seite der Mononucleotid-Bildung verschoben wird (Kosaka *et al.*, 1977). Möglicherweise wird ATP zur Bildung einer energiereichen Bindung zwischen der Ribose und dem Stickstoff der Nicotinsäure gebraucht (Honjo *et al.*, 1966). Oder die Steigerung der katalytischen Aktivität durch ATP könnte durch eine verbesserte Stabilisierung des Übergangszustands erklärt werden (Chappie *et al.*, 2005).

Für das gereinigte Enzym wurden  $K_m$  für ATP, PRPP und Nicotinsäure zu 70  $\mu$ M, 24 mM und 23  $\mu$ M bestimmt (Hanna *et al.*, 1983). Mit dem teilweise gereinigten Enzym wurden zuvor  $K_m$  von 120  $\mu$ M, 7,7  $\mu$ M und 1,85  $\mu$ M für ATP, PRPP und Nicotinsäure bestimmt (Honjo *et al.*, 1966).

Eine thermische Denaturierung kann in steigender Reihenfolge durch Nicotinsäure, ATP oder GTP, durch MgPRPP sowie durch ATP und  $Mg^{2+}$  zusammen reduziert werden (Kosaka *et al.*, 1971).

PRPP und durch  $Mg^{2+}$  komplexiertes PRPP führen zu keinem Unterschied in der Enzymaktivität. Nicht komplexiertes PRPP führt nur zu einer Reaktion, wenn das Enzym zuvor durch  $Mg^{2+}$  komplexiert wurde (Kosaka *et al.*, 1977). Aufgrund der Messungen ist davon auszugehen, dass ein ATP- $Mg^{2+}$ -Komplex an das Enzym angelagert wird. Die Aktivität kann durch Kaliumphosphat bis zur Fällung von  $Mg^{2+}$  als  $MgHPO_4$  gesteigert werden. Ohne Substrate kann das Enzym in einer phosphorylierten Form vorliegen, die ATP-Spaltung erfolgt erst, wenn beide Substrate am Enzym vorliegen (Kosaka *et al.*, 1971).

Ein Überschuß an PRPP und ATP führt bei Abwesenheit von Metallionen zu einer Inhibierung. Eine Erklärung für diese Beobachtung steht noch aus (Kosaka *et al.*, 1977).

Ein Überschuss an ATP kann die Enzymaktivität inhibieren oder durch Komplexbildung die Verfügbarkeit von  $Mg^{2+}$  reduzieren (Kosaka *et al.*, 1971).

Hinsichtlich des Reaktionsmechanismus gibt es teilweise unterschiedliche Auffassungen.

Es ist nicht anzunehmen, dass die Reaktion über Substrat-ATP-Intermediate geht (Honjo *et al.*, 1966). Nachdem ATP an eine bestimmte Stelle der Nicotinsäure-Phosphoribosyl-Transferase bindet (Kosaka *et al.*, 1971; Kosaka *et al.*, 1977; Hanna *et al.*, 1983), erfolgt entweder dort deren Phosphorylierung und die Freisetzung von ADP (Hanna *et al.*, 1983) oder die Substrate PRPP und Nicotinsäure können in beliebiger Reihenfolge binden. ADP wird erst abgegeben, nachdem alle Substrate am Enzym gebunden sind (Kosaka *et al.*, 1977). Dagegen sollen an einem zweiten aktiven Zentrum PRPP und Nicotinsäure nacheinander an das phosphorylierte Enzym angelagert werden. Dabei entstehen die Produkte  $PP_i$  und Nicotinsäuremononucleotid, das Enzym wird dephosphoryliert. Die drei Produkte werden dann in zwei Stufen abgegeben, zuerst  $NaMN$  und PRPP zufällig, zuletzt die Phosphatgruppe (Hanna *et al.*, 1983).

ATP, Nicotinsäure und Phosphoribosyl-Pyrophosphat können wahrscheinlich einzeln an das Enzym binden (Kosaka *et al.*, 1971). Da die jeweiligen Zentren auch  $PP_i$  binden können, kann es so zur Inhibierung kommen (Hanna *et al.*, 1983).

Das Molekulargewicht wurde mittels Gelfiltration zu 43 kDa bestimmt (Kosaka *et al.*, 1971). Mittels SDS-PAGE wurde eine Molmasse von 45 kDa bestimmt (Hanna *et al.*, 1983). Unter der Berücksichtigung der Ergebnisse von Kosaka *et al.* (1971) handelt es sich bei der Nicotinsäure-Phosphoribosyl-Transferase wohl um ein Monomer mit einer Molmasse von  $44 \pm 2$  kDa (Hanna *et al.*, 1983). Im Gegensatz dazu wurde mittels Röntgenkristallographie ein Heterotetramer bestimmt, in dem sich die vier Monomere geringfügig in der Länge der jeweiligen Aminosäuresequenz, jedoch aber nicht in der Struktur unterscheiden. Aus den 430 Aminosäuren lässt sich eine Molmasse von 49 kDa berechnen. In jedem Monomer ist ein Phosphatrest gebunden, der die Bindestelle der 5'-Phosphatgruppe von PRPP markiert und damit ein Teil des aktiven Zentrums ist. Die ATP-Bindestelle befindet sich am C-terminalen Ende, welches mit der Umgebung in Kontakt stehen und seine Konformation ändern kann (Chappie *et al.*, 2005). Die Nicotinsäure-Phosphoribosyl-Transferase kann im Zellkern (Anderson *et al.*, 2002; Sandmeier *et al.*, 2002; Huh *et al.*, 2003) und im Cytosol lokalisiert werden (Huh *et al.*, 2003).

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zeigt unter anaeroben Wachstumsbedingungen eine Auxotrophie für Nicotinsäure. Dem Gen *NPT1* kommt dabei eine wesentliche Rolle zu, da unter diesen Bedingungen eine funktionsfähige Nicotinsäure-Phosphoribosyl-Transferase-Aktivität überlebensnotwendig ist. Innerhalb der *de novo* Biosynthese ist Sauerstoff an drei Schritten beteiligt. Folglich kann unter anaeroben Bedingungen  $\text{NAD}^+$  nur synthetisiert werden, wenn Nicotinsäure durch die Nicotinsäure-Phosphoribosyl-Transferase eingebaut werden kann (Panozzo *et al.*, 2002).

Das Enzym Nicotinsäure-Phosphoribosyl-Transferase Npt1p kann Mechanismen zur Erhöhung der Lebensdauer auslösen. Diese Information wird durch die  $\text{NAD}^+$ -abhängige Protein-Deacetylase Sir2p übertragen (Anderson *et al.*, 2002). Die Versorgung mit  $\text{NAD}^+$  aus dem Pyridin-Kreislauf wird von *NPT1* übernommen (Smith *et al.*, 2000).

### NaMN/NMN-Adenylyl-Transferase 1,2 Nma1p, Nma2p

Zwischen der Beschreibung einer NaMN/NMN-Adenylyl-Transferase-Aktivität (Kornberg, 1948) und der Entdeckung eines zweiten Isoenzymes (Emanuelli *et al.*, 1999) sind 51 Jahre vergangen. Daher erfolgt in diesem Kapitel die Darstellung weitestgehend chronologisch.

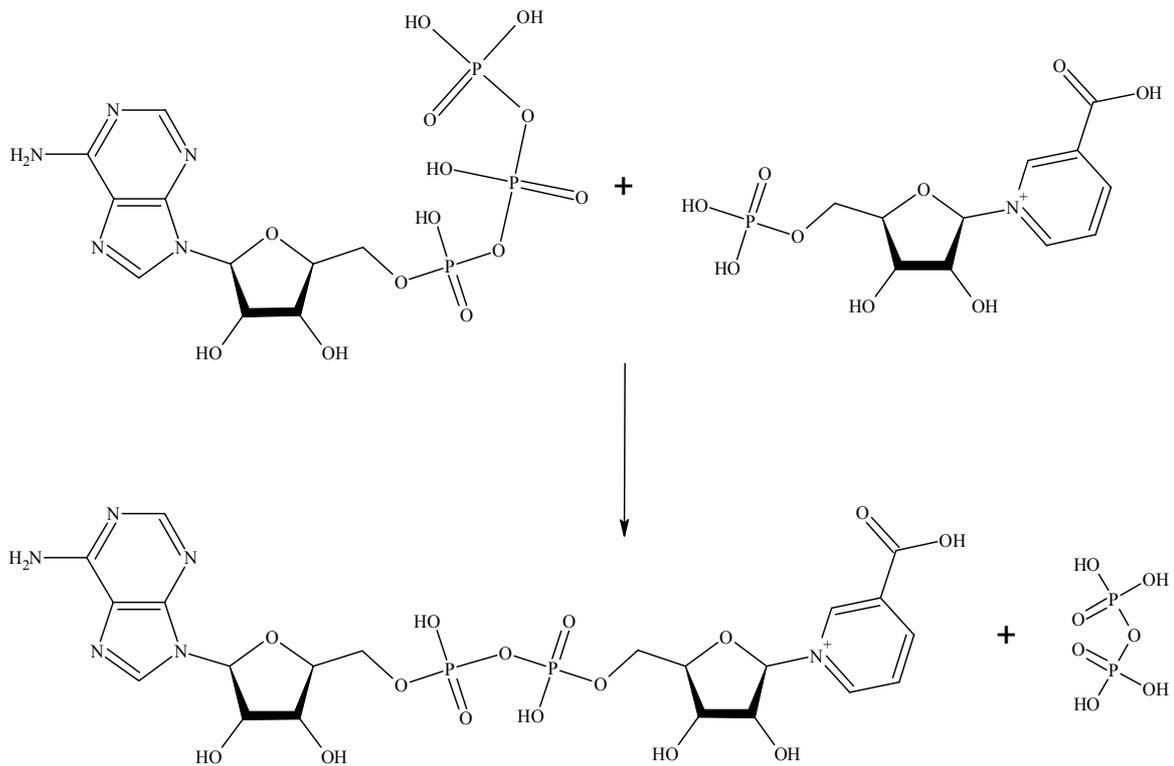
Eine NaMN/NMN-Adenylyl-Transferase-Aktivität wurde in Bierhefe erstmals für ein Enzym beschrieben, das aus Autolysat gereinigt wurde. Das Enzym katalysiert die Reaktion  $\text{NMN} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{NAD} + \text{PP}_i$  (Kornberg, 1948). Das chemische Gleichgewicht wird ausgehend von NAD und  $\text{PP}_i$  sowie ausgehend von NMN und ATP erreicht (Kornberg, 1948; Kornberg, 1950a).

Wahrscheinlich ist auch in der Hefe Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid eine Zwischenstufe bei der Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  aus Nicotinsäure (Preiss und Handler, 1958a). NaMN und NaAD konnten als Zwischenprodukte der  $\text{NAD}^+$ -Biosynthese in Hefeautolysat identifiziert und nachgewiesen werden (Preiss und Handler, 1958b). Für den zweiten Schritt der Biosynthese in Hefe wird folgende Reaktionsgleichung vorgeschlagen:

$\text{NaMN} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{NaAD} + \text{PP}_i$  (Preiss und Handler, 1958b). Dies war die erste Reaktion, bei der beobachtet wurde, dass ATP in ein Dinucleotid eingebaut wurde (Kornberg, 1950a). Die Dinucleotid-Bildung ist in Abbildung 3.8 in Strukturformeln dargestellt.

Die enzymatischen Eigenschaften einer Nicotinsäure-/Nicotinamidmononucleotid-Adenylyl-Transferase wurden von drei Arbeitsgruppen untersucht und werden im Folgenden beschrieben:

Die Rückreaktion verläuft auch mit reduziertem  $\text{NAD}^+$  (Kornberg, 1948; Kornberg, 1950a), das reduzierte Mononucleotid kann auch zur Hinreaktion eingesetzt werden. Folgende Gleichung wird formuliert:  $\text{NMNH}_2 + \text{ATP} \leftrightarrow \text{NADH}_2 + \text{PP}_i$ . Die Abbauraten von  $\text{NAD}^+$  ist dabei dreimal so groß wie die von NADH (Kornberg, 1950a).



**Abbildung 3.8: Enzymatische Umsetzung von Nicotinsäuremononucleotid (NaMN) zu Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid (NaAD) als zweiter Schritt im Preiss-Handler-Weg. Diese Reaktion wird von einer NaMN/NMN-Adenylyl-Transferase (Nma1p, Nma2p) katalysiert.**

Die Kondensation findet nicht statt, wenn ATP durch AMP oder ADP ersetzt wird (Kornberg, 1948; Kornberg, 1950a). Auch kann ATP nicht durch andere Nucleosidtriphosphate (wie ITP, GTP, UTP, CTP oder TTP) ersetzt werden. Nur mit dATP konnte eine Reaktion beobachtet werden, wobei die Reaktionsrate um ein Drittel niedriger war (Dahmen *et al.*, 1967). Nicotinamidribose kann nicht für NMN substituieren (Kornberg, 1948; Kornberg, 1950a).

Mg<sup>2+</sup> ist essentiell für die Reaktion (Kornberg, 1950a; Dahmen *et al.*, 1967) und kann nicht durch Mn<sup>2+</sup> ersetzt werden. Ein weiterer Bedarf an Cofaktoren oder Coenzymen konnte nicht festgestellt werden. Nur geringe inhibierende Wirkung konnte für Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> und Cu<sup>2+</sup> beobachtet werden (Kornberg, 1950a).

ATP wird durch die Pyrophosphorolyse-Aktivität der Nicotinsäure-/Nicotinamidmononucleotid-Adenylyl-Transferase jeweils aus PP<sub>i</sub> und dem zweiten Substrat NaAD (Preiss und Handler, 1958b; Dahmen *et al.*, 1967) oder NAD<sup>+</sup> (Kornberg, 1950a; Dahmen *et al.*,

1967) freigesetzt. Ohne  $Mg^{2+}$  und NaAD oder  $NAD^+$  kommt es zu keiner Reaktion. Die relativen Raten für die Bildung von ATP liegen für die Substrate  $NAD^+$  und NaAD bei 1,00 und 0,77 (Dahmen *et al.*, 1967).  $NADP^+$  wird dagegen nicht hydrolysiert (Kornberg, 1948).

Wie von Kornberg (1948; 1950a) für NMN und von Preiss und Handler (1958b) für NaMN schon beschrieben, bestätigen die Beobachtungen, dass im Zellextrakt von Hefe das selbe Enzym die Reaktion von ATP mit (a) NMN zu  $NAD^+$  sowie mit (b) NaMN zu NaAD katalysieren kann. Nach diesen Angaben kann die NaMN/NMN-Adenylyl-Transferase die Pyrophosphorolyse und die Kondensation katalysieren, sowie NMN und NaMN umsetzen. Die Substratakzeptanz ist unter den vier genannten ausgeglichen. Die Rate der NaAD-Bildung ist zweimal größer als die Rate der  $NAD^+$ -Bildung. Zur Induktion der Pyrophosphorolyse scheint der Adeninteil der Dinucleotide verantwortlich zu sein, was auch bei der Kondensation durch die Spezifizierung auf Adenin(-homologe)-Nucleosidtriphosphate zum Ausdruck kommt (Dahmen *et al.*, 1967).

Da *Saccharomyces cerevisiae* eine aktive Nicotinamid-Deamidase besitzt, würde Nicotinamid über Nicotinsäure in den Preiss-Handler-Weg eingeschleust werden (Sundaram *et al.*, 1960). Der hier beobachteten NMN-Adenylyl-Transferase-Aktivität könnte also *in vivo* keine so große Bedeutung zukommen sondern in den *in vitro* Experimenten eher die Folge einer mangelnden Substratspezifizierung sein. Eine Besonderheit ist, dass eine Nicotinsäure-/Nicotinamidmononucleotid-Adenylyl-Transferase an allen drei  $NAD^+$ -Synthesewegen beteiligt ist, ausgehend von Nicotinsäure, von Chinolinsäure oder von Nicotinamid (Dahmen *et al.*, 1967) in Form von Nicotinamidribose (Bieganowski und Brenner, 2004). Sie ist Teil der  $NAD^+$ -Biosynthese über den *de novo* Weg innerhalb des Pyridin-Kreislaufs (Ruggieri *et al.*, 1988).

Eine NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase wurde aus Bäckerhefe isoliert (Natalini *et al.*, 1986) oder rekombinant hergestellt (Emanuelli *et al.*, 1999) und charakterisiert. Der *orf YLR328w* wurde als das Gen der NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert (Emanuelli *et al.*, 1999).

Für das native Enzym wurden Molmassen von ungefähr 200 kDa (Natalini *et al.*, 1986) und 195 kDa bestimmt (Emanuelli *et al.*, 1999). Mittels SDS-PAGE wurde eine Molmasse von 50 kDa (Natalini *et al.*, 1986) und 48 kDa ermittelt, die wiederum mit der aus der Aminosäuresequenz berechneten übereinstimmte (Emanuelli *et al.*, 1999). Bei dem nativen Enzym handelt es sich um ein Homotetramer (Natalini *et al.*, 1986; Emanuelli *et al.*, 1999), dessen Untereinheiten nicht durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Zusätzlich enthält diese NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase 2 % (w/w) Kohlenhydrate, 2 mol/mol (Gesamt)Phosphat, 1 mol/mol Adenin(derivate) (Natalini *et al.*, 1986).

Für die enzymatische Reaktion sind zweiwertige Metallionen unumgänglich. Die optimale Aktivität wird mit 5 mM  $\text{Ni}^{2+}$  erreicht. Es wird nur Adenosintriphosphat als Substrat akzeptiert. Schwermetallionen reduzieren die Aktivität.  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen sind am wirkungsvollsten, bei einer Konzentration von nur 0,05 mM kommt die Reaktion zum Erliegen (Emanuelli *et al.*, 1999). Die  $K_m$  für ATP, NMN und NaMN liegen bei 0,11 mM, 0,19 mM und 5,0 mM. Die Kondensationsreaktion wird durch Pyrophosphat inhibiert. Da der  $K_m$  für NaMN um eine Zehnerpotenz höher ist als für NMN, ist anzunehmen, dass der Weg über NMN direkt zu  $\text{NAD}^+$  der bevorzugte ist (Natalini *et al.*, 1986). Mechanismen der Regulierung sind bisher noch weitestgehend unbekannt (Emanuelli *et al.*, 1999).

Das Enzym zeichnet sich durch einen hohen Anteil an hydrophoben Bereichen aus, was auf eine Membranbindung deuten könnte. An dem N-Terminus sind auffallend viele Histidin-Reste zu finden. Hier könnte eine Metallbindungsstelle sein (Emanuelli *et al.*, 1999).

Bei einer Datenbanksuche ist der *orf YGR010w* aufgefallen (Emanuelli *et al.*, 1999), der ein Protein bestehend aus 395 Aminosäuren kodiert. Dieses stimmt mit 72 % der Aminosäuren der bekannten NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase überein (Emanuelli *et al.*, 1999; Emanuelli *et al.*, 2003). Mittels SDS-PAGE wurde die Molmasse des rekombinanten Proteins von 46 kDa bestimmt (Emanuelli *et al.*, 2003). Für die Rückreaktion bevorzugt die NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase-2 NaAD dreimal mehr als  $\text{NAD}^+$ . Die  $K_m$  für ATP und  $\text{PP}_i$  sind bei der Nma2p für die Dinucleotidbildung höher als bei der Nma1p, was unterschiedliche physiologische Funktionen/Aufgaben implizieren/ermöglichen würde (Emanuelli *et al.*, 2003).

Der *orf YLR0328* wurde mit *NMA1* bezeichnet, der *orf YGR010* mit *NMA2*. Die Proteine Nma1p und Nma2p können miteinander sowie jeweils untereinander möglicherweise als Dimer oder Oligomer auftreten. Jedes Protein kann die Funktion des anderen übernehmen, beide können mit der Erhöhung der Lebensdauer in Verbindung gebracht werden (Anderson *et al.*, 2002).

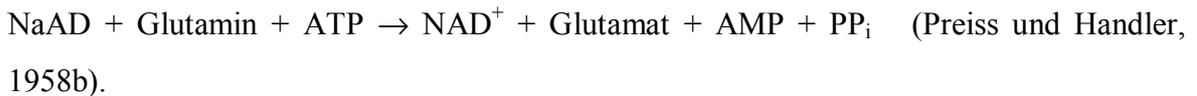
Eine NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase-Aktivität wurde im Zellkern bestimmt (Ruggieri *et al.*, 1988). Nma2p befindet sich im Zellkern (Anderson *et al.*, 2002) und ist dort aufgrund der Hydrophobizität an die innere Kernmembran gebunden (Emanuelli *et al.*, 2003), wurde aber auch als cytosolisches Enzym beschrieben (Huh *et al.*, 2003). In einer Studie konnte der Wirkungsort der Nma1p nicht bestimmt werden (Anderson *et al.*, 2002), in einer anderen wird eine Lokalisierung im Zellkern und im Cytoplasma angegeben (Huh *et al.*, 2003).

Der Kohlenhydratgehalt der NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase (Natalini *et al.*, 1986) ist vornehmlich auf Pentosen zurückzuführen, was auf ein poly-(ADP-Ribosyl)iertes Protein vermuten lässt. Gestützt wird diese These einerseits durch den Aufenthalts-/Wirkungsort Kern der Poly-(ADP-ribosyl)-Polymerase sowie der NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase und andererseits durch eine möglicherweise regulatorische Funktion der Modifikation, da beide Enzyme den Fluss durch die NAD<sup>+</sup>-Biosynthese mitbestimmen. Die Daten der letzten Studie deuten allerdings nur auf eine Mono-(ADP-Ribosyl)ierung hin, die aber auch durch die Aufreinigung entstanden sein könnte. Durch ein anderes Verfahren der Aufreinigung sollte die Identifikation der poly-(ADP-Ribosyl)ierten NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase ermöglicht werden. Mittels Gelfiltration wurde eine Molmasse von 200 kDa bestimmt. Durch genauere Analyse wurden Fraktionen erkannt, die drei bis vier Mol Adeninderivate pro Mol Enzym enthielten, jedoch keine katalytische Aktivität zeigten. Es wird angenommen, dass in diesen Fällen die NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase durch Poly-(ADP-Ribosyl)ierung inaktiviert wurde (Ruggieri *et al.*, 1988).

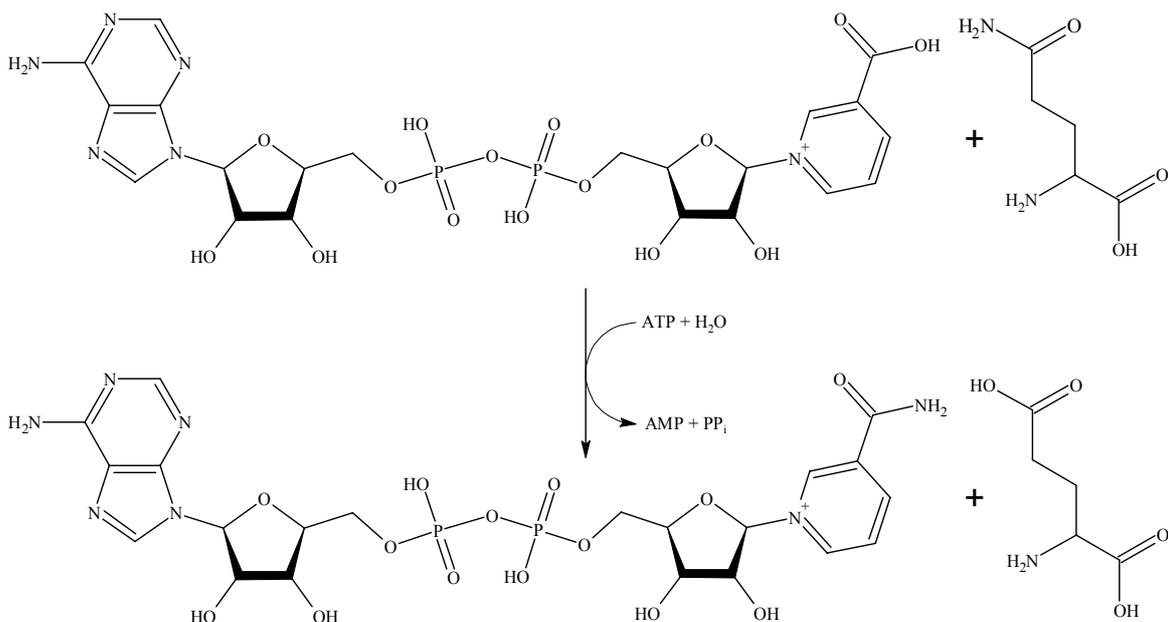
Sofern es keine andersartige Regulierung gibt, wird die Enzymaktivität über die Konzentration des Substrates NMN geregelt (Kornberg, 1950).

**Glutamin-abhängige NAD<sup>+</sup>-Synthetase Qns1p**

Es wurde vermutet, dass auch in der Hefe Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid zu NAD<sup>+</sup> amidiert wird (Preiss und Handler, 1958a). NaAD konnte als Zwischenprodukt der NAD<sup>+</sup>-Biosynthese in Hefeautolysat identifiziert und nachgewiesen werden. Für den dritten Reaktionsschritt wird in Hefe folgende Gleichung vorgeschlagen:



Die Amidierung von Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid ist in Abbildung 3.9 in Strukturformeln dargestellt.



**Abbildung 3.9:** Der dritte und letzte Schritt im Preiss-Handler-Weg ist die Amidierung von Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid (NaAD) zu Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD<sup>+</sup>), der von der Glutamin-abhängigen NAD<sup>+</sup>-Synthetase (Qns1p) durchgeführt wird.

Die kinetischen Untersuchungen wurden mit einem teilweise gereinigten Enzym (Preiss und Handler, 1958b) und mit einem gereinigten Enzym (Yu und Dietrich, 1972) durchgeführt und sind im Folgenden zusammengefasst.

Zu einer erfolgreichen Amidierung müssen Mg<sup>2+</sup> (Preiss und Handler, 1958b; Yu und Dietrich, 1972), NaAD, Glutamin und ATP vorliegen (Preiss und Handler, 1958b).

$Mg^{2+}$  kann auf Kosten von geringerer Aktivität durch  $Co^{2+}$  ersetzt werden kann. Ohne ein zweiwertiges Kation oder in Anwesenheit von  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  wurde keine Aktivität beobachtet (Yu und Dietrich, 1972).

Glutamat kann Glutamin nicht ersetzen. Als alternativer Amidgruppendonator kann  $NH_4Cl$  (Preiss und Handler, 1958b) oder Ammoniak fungieren. L-Asparagin als  $NH_2$ -Donor ist wirkungslos (Yu und Dietrich, 1972).  $K^+$  kann die Aktivität steigern (Preiss und Handler, 1958b). Im Gegensatz dazu ist das gereinigte Enzym nur aktiv, wenn bei L-Glutamin als  $NH_2$ -Donor die Reaktion unter Anwesenheit von  $K^+$  verläuft. Mit  $NH_4Cl$  als  $NH_2$ -Donor kann  $NH_4^+$  für  $K^+$  substituieren und ermöglicht so die Reaktion (Yu und Dietrich, 1972). Da das *pH*-Optimum beim Einsatz von  $NH_4Cl$  im basischen Bereich liegt, ist anzunehmen, dass  $NH_3$  das eigentliche Substrat ist. Ein  $K_m$  von 1,4 mM wurde für  $NH_3$  abgeschätzt. Der  $K_m$  für Glutamin wurde mit 3,5 mM bestimmt. Da ein  $K_m$  von 1,4 mM für  $NH_3$  eine 100-fache  $NH_4Cl$ -Konzentration erfordert, könnte unter physiologischen Bedingungen die intrazelluläre  $NH_3$ -Konzentration für eine Amidierung von NaAD nicht ausreichen (Preiss und Handler, 1958b). *In vivo* ist die  $NAD^+$ -Synthetase ausschließlich Glutamin-abhängig (Bieganowski *et al.*, 2003).

Unter optimalen Reaktionsbedingungen kann die Enzymaktivität durch Schwermetallionen, darunter  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$  und  $Cd^{2+}$ , drastisch gesenkt bzw. ausgesetzt werden.  $Sr^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$  zeigen keine inhibierende Wirkung (Yu und Dietrich, 1972).

Untersuchungen zur Substratspezifizierung zeigten, dass ATP unbedingt vorhanden sein muss und es nicht durch andere Triphosphatnucleoside ersetzt werden kann. NaMN wird nicht amidiert (Yu und Dietrich, 1972).

Glutamin wird nur deamidiert, wenn die  $NH_2$ -Gruppe auf NaAD übertragen werden kann. Das Enzym besitzt keine Glutaminase-Aktivität (Preiss und Handler, 1958b). Auch wenn bei der Amidierung von NaAD ATP hydrolysiert wird, besitzt die  $NAD^+$ -Synthetase mit L-Glutamin als einziges Substrat keine ATPase-Aktivität, mit NaAD als einziges Substrat nur eine geringe (Yu und Dietrich, 1972). Bei einem Adeninmangel scheint die Amidierung von NaAD eher betroffen zu sein als die Verstoffwechslung von Nicotinsäure (Rose, 1960).

Für ein gebildetes  $NAD^+$ -Molekül wird ein Glutamin-Molekül hydrolysiert, um ein Molekül  $NH_3$  der Amidierung zu Verfügung zu stellen (Bieganowski *et al.*, 2003). In

Anwesenheit aller Substrate wird bei der Reaktion ATP stöchiometrisch zu der Menge an gebildetem  $\text{NAD}^+$  hydrolysiert (Preiss und Handler, 1958b; Yu und Dietrich, 1972). Für den Reaktionsmechanismus wird angenommen, dass ein Substrat in aktivierter Form am Enzym gebunden vorliegt, bevor die Amidierung erfolgt (Yu und Dietrich, 1972).

Die  $\text{NAD}^+$ -Synthetase besteht aus relativ vielen hydrophoben Aminosäuren. Dieses Enzym hat ein Molekulargewicht von ungefähr 630 kDa und ist aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt. Für die Untereinheiten wurde ein Molekulargewicht von je 65 und 80 kDa bestimmt. (Yu und Dietrich, 1972). Die  $\text{NAD}^+$ -Synthetase ist wahrscheinlich ein Homodimer oder Homomultimer (Suda *et al.*, 2003). Die Funktionalität ist nur gewährt, wenn ein aktives Zentrum für die  $\text{NAD}^+$ -Synthetase-Aktivität sowie eines für eine Glutamin-Amidotransferase-(GAT)-Aktivität in der selben Untereinheit vorhanden ist. Dabei ist davon auszugehen, dass  $\text{NH}_3$  nicht zwischen den Untereinheiten, sondern nur innerhalb einer Untereinheit transportiert wird. An einem hypothetischen Model wurde gezeigt, dass innerhalb einer Untereinheit die Aminosäuresequenz einen Transportkanal zwischen dem aktiven Zentrum für die GAT-Aktivität und dem aktiven Zentrum für die  $\text{NAD}^+$ -Synthetase-Aktivität festlegt. Dieser Transportkanal ist ungefähr 46 Å (1 Å entspricht  $10^{-10}$  m) lang und könnte das Ammoniak-Molekül vor den Einflüssen des umgebenden Solvents schützen und so die Reaktion mit NaAD-AMP gewährleisten. Es besteht ein Informationsaustausch zwischen dem aktiven Zentrum für die  $\text{NAD}^+$ -Synthetase-Aktivität und für die GAT-Aktivität, denn eine NaAD-Anlagerung als  $\text{NH}_3$ -akzeptierendes Molekül erhöht die Glutaminase-Aktivität um den Faktor 25 (Bieganowski *et al.*, 2003).

Der *orf* *YHR074/QNS1* kodiert in *Saccharomyces cerevisiae* die  $\text{NAD}^+$ -Synthetase (Anderson *et al.*, 2002), die sich im Zellkern und im Cytosol befindet (Huh *et al.*, 2003; Suda *et al.*, 2003). Ein intaktes *QNS1*-Gen ist überlebensnotwendig (Bieganowski *et al.*, 2003; Suda *et al.*, 2003).

Unter Mitverwendung der *in vitro* gemessenen Daten wird bestimmt, dass eine ruhende Hefezelle mehr als die 30-fache  $\text{NAD}^+$ -Synthetase-Menge besitzt, die nötig wäre, um die intrazelluläre  $\text{NAD}^+$ -Konzentration aufrecht zu erhalten. Daher wird vermutet, dass die

NAD<sup>+</sup>-Synthetase *in vivo* keiner Regulation unterworfen ist, sondern ihre Aktivität vielmehr durch die Substratkonzentrationen bestimmt wird (Yu und Dietrich, 1972).

### 3.2.3 Die *de novo* Biosynthese

Bei NaMN mündet die *de novo* Biosynthese in den Preiss-Handler-Weg, welche dann wie o. g. zu NAD<sup>+</sup> weitergeführt wird. Die *de novo* Biosynthese beginnt bei der Aminosäure L-Tryptophan (Trp) und verläuft über sechs enzymatische und eine nicht-enzymatische Teilreaktion(en). Als Zwischenprodukte treten N-Formyl-L-Kynurenin (N-Kyn), L-Kynurenin (Kyn), 3-Hydroxy-L-Kynurenin (3OH-Kyn), 3-Hydroxy-Anthranilat (3OH-A), 2-Amino-3-Carboxy-Muconatsemialdehyd (2A-3C-Ald) und Chinolinsäure (Qa) auf. Im Folgenden wird auf die sechs beteiligten Enzyme

- L-Tryptophan-2,3-Dioxygenase Bna2p,
- N-Formyl-L-Kynurenin-Formamidase Bna3p,
- L-Kynurenin-3-Monooxygenase Bna4p,
- 3-Hydroxy-L-Kynureninase Bna5p,
- 3-Hydroxyanthranilat-3,4-Dioxygenase Bna1p und
- Chinolinsäure-Phosphoribosyl-Transferase Bna6p ausführlich eingegangen.

Im Vergleich zu den Enzymen des Preiss-Handler-Weges fällt auf, dass die Enzyme der *de novo* Biosynthese weit weniger intensiv untersucht wurden.

#### L-Tryptophan-2,3-Dioxygenase Bna2p

Die L-Tryptophan-2,3-Dioxygenase katalysiert den ersten Schritt der *de novo* Biosynthese.

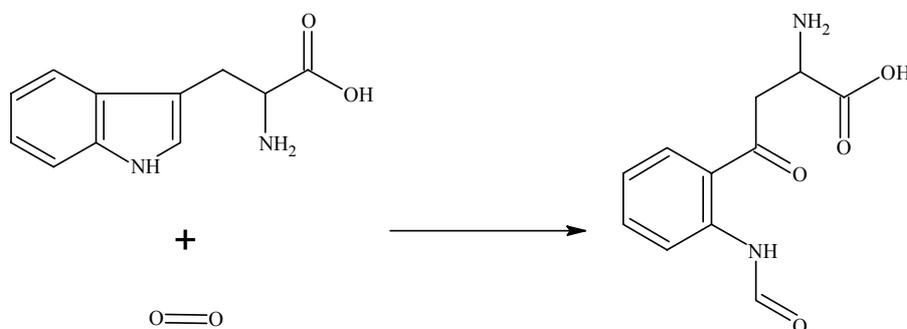
Die Existenz des *de novo* Synthesewegs in Hefe wurde erstmals von Ahmad und Moat (1965) durch Bildung von Nicotinsäure aus Tryptophan beschrieben. Die Aminosäure L-Tryptophan konnte als ein Ausgangspunkt der Biosynthese von Nicotinsäure in

*Saccharomyces cerevisiae* bestätigt werden (Ahmad und Moat, 1966). Die Ausschleusung von Nicotinsäure kann mit der Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  zusammenhängen (Rose, 1960).

Jedoch war im Zellextrakt von *Saccharomyces cerevisiae* der Aktivitätsnachweis der Tryptophan-2,3-Dioxygenase nicht möglich (Ahmad und Moat, 1966). Iwamoto *et al.* (1995) reinigten ein Enzym teilweise, das den Pyrrolring der Aminosäure Tryptophan öffnen kann, und beschrieben eine Tryptophan-2,3-Dioxygenase-Aktivität.

Die native Tryptophan-2,3-Dioxygenase könnte aus vier identischen Untereinheiten mit einer Molmasse von jeweils 38 kDa aufgebaut sein. Es wird angenommen, dass mindestens eine Häm-Gruppe am aktiven Zentrum der Tryptophan-2,3-Dioxygenase vorliegt. Die Aktivität der Tryptophan-2,3-Dioxygenase kann *in vivo* durch Zugabe von  $1 \text{ g L}^{-1}$  Tryptophan um den Faktor drei gesteigert werden. In *in vitro* Ansätzen steigert L-Tryptophan die Stabilität des Enzyms. Bevorzugt wird L-Tryptophan umgesetzt, D-Tryptophan als Substrat reduziert die Aktivität um den Faktor sieben (Iwamoto *et al.*, 1995).

Die katalytische Reaktion der L-Tryptophan-2,3-Dioxygenase ist in Abbildung 3.10 in Strukturformeln veranschaulicht.



**Abbildung 3.10:** Katalytische Reaktion der L-Tryptophan-2,3-Dioxygenase (Bna2p) in Strukturformeln als ersten Schritt der *de novo* Biosynthese. Es entsteht N-Formyl-L-Kynurenin.

Eine Unterversorgung der Zelle mit Tryptophan scheint nicht möglich zu sein, da die Tryptophan-Biosynthese auf ein unter normalen Bedingungen nicht ausgeschöpftes Reservepotential zurückgreifen kann. Eine Tryptophanlimitierung kann auch nicht durch die Anzucht mit allen Aminosäuren außer Tryptophan herbeigeführt werden (Miozzari *et al.*, 1978).

In aeroben Kulturen wird Tryptophan nur sehr langsam abgebaut (Shetty und Gaertner, 1973). Im Gegensatz dazu stellen Kradolfer *et al.* (1982) fest, dass Tryptophan in *Saccharomyces cerevisiae* durchaus schnell abgebaut werden kann.

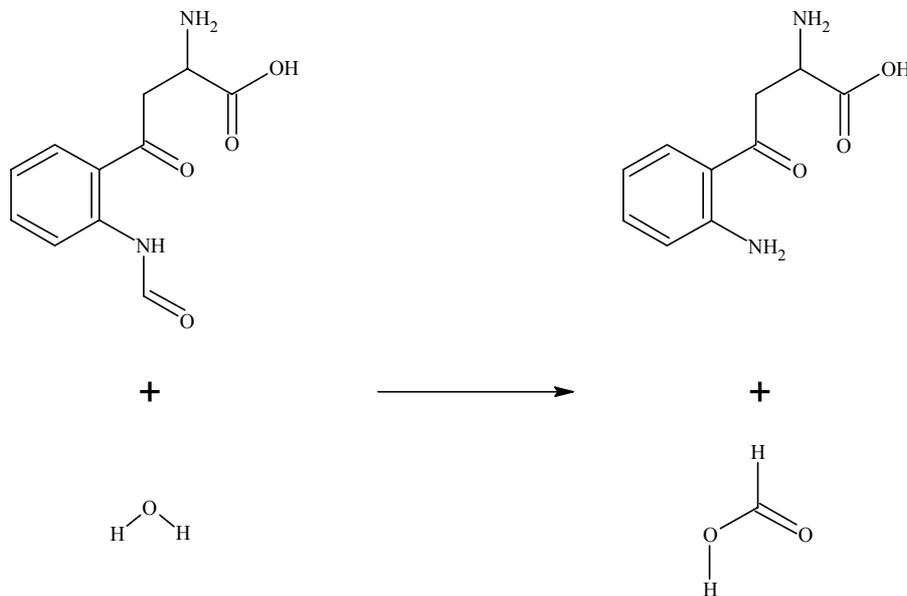
*Saccharomyces cerevisiae* hat keine Kynureninase-Aktivität, die Anthranilat erzeugt (Shetty und Gaertner, 1973). Der Tryptophan-Anthranilat-Kreislauf scheint in *Saccharomyces cerevisiae* nicht zu existieren (Heilmann und Lingens, 1968b; Shetty und Gaertner, 1973). Jedoch ist der Abbau von Tryptophan zu 3-Hydroxyanthranilat nicht der Hauptabbauweg (Shetty und Gaertner, 1973). In *Saccharomyces cerevisiae* wird Tryptophan hauptsächlich zu Tryptophol abgebaut (Heilmann und Lingens, 1968b; Kradolfer *et al.*, 1982). Dazu werden 70 % des Tryptophans im ersten Abbauschritt de-oder transaminiert (Kradolfer *et al.*, 1982). Obwohl die Tryptophol-bildenden Enzyme durch Tryptophan induzierbar sind, scheint der Abbau von Tryptophan zu Tryptophol nicht in Zusammenhang mit der Nicotinsäure-Bildung zu stehen (Heilmann und Lingens, 1968b).

Das Gen *YJR078w* kodiert in *Saccharomyces cerevisiae* das Enzym L-Tryptophan-2,3-Dioxygenase. Die Funktion wurde biochemisch bestätigt. Nach der Identifikation wurde es mit *BNA2* (von ‚biosynthesis of nicotinic acid‘ (Kucharczyk *et al.*, 1998)) benannt. Funktionseinschränkungen führen zu vermindertem Zellwachstum (Panozzo *et al.*, 2002).

### **N-Formyl-L-Kynurenin-Formamidase Bna3p**

Aufgrund der Umsetzung von Formylkynurenin zu Kynurenin in Zellextrakt von *Saccharomyces cerevisiae* wird auf die Anwesenheit der N-Formyl-L-Kynurenin-Formamidase geschlossen. Das Enzym kann weder durch Zugabe von Tryptophan noch von Formylkynurenin zu *Saccharomyces cerevisiae* Kulturen induziert werden (Ahmad und Moat, 1966).

Die Biosynthese von L-Kynurenin ist in Abbildung 3.11 in Strukturformeln dargestellt.



**Abbildung 3.11:** Der zweite Schritt der *de novo* Biosynthese ist die Darstellung von L-Kynurenin. Diese Reaktion wird von der N-Formyl-L-Kynurenin-Formamidase (Bna3p) durchgeführt.

Für die Formamidase der Hefe wird ein mittels Gelfiltration bestimmtes Molekulargewicht von 58,5 kDa angegeben. Es könnte sich dabei um ein Homodimer handeln (Moore und Sullivan, 1975). Für die Formamidase aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde eine Molmasse von 56 kDa bestimmt (Bode und Birnbaum, 1979). Diese Daten decken sich mit denen von Moore und Sullivan (1975) für eine nicht näher beschriebene ‚Hefe‘. Im Gegensatz zu anderen Hefen besitzt *Saccharomyces cerevisiae* kein zweites Isoenzym (Bode und Birnbaum, 1979).

Das Gen *YJL060w* kodiert in *Saccharomyces cerevisiae* das Enzym N-Formyl-L-Kynurenin-Formamidase. Nach der Identifikation wurde es mit *BNA3* benannt. Die Funktion wurde biochemisch bestätigt (Panozzo *et al.*, 2002). Da Funktionseinbußen das Zellwachstum nicht einschränken, könnte die Funktion auch von einem anderen Enzym übernommen werden (Panozzo *et al.*, 2002; Bedalov *et al.*, 2003).

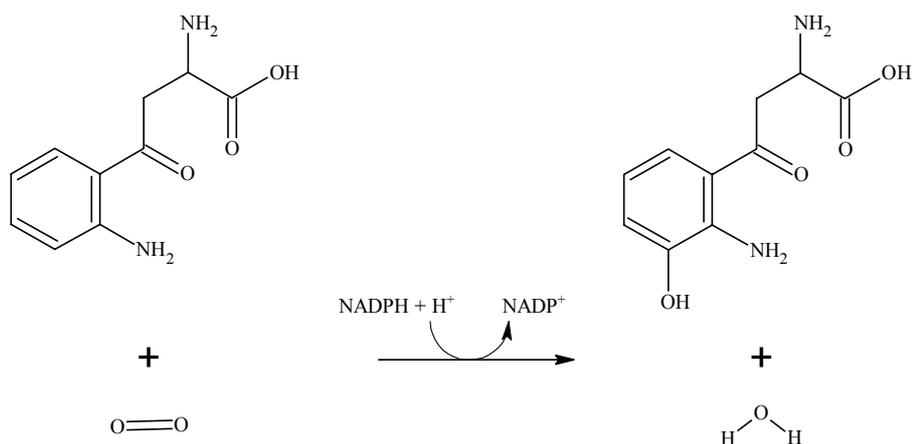
Die N-Formyl-L-Kynurenin-Formamidase ist in den Mitochondrien und im Cytosol zu finden (Huh *et al.*, 2003).

### L-Kynurenin-3-Monooxygenase Bna4p

Die L-Kynurenin-3-Monooxygenase-Aktivität ist in Mitochondrien von aerob gewachsenen *Saccharomyces cerevisiae* Kulturen nachzuweisen (Schott und Staudinger, 1971), wobei die äußere Membran der Mitochondrien die L-Kynurenin-3-Monooxygenase enthält (Bandlow, 1972).

Die Monooxygenase-Aktivität erfordert Sauerstoff und NADPH zur Reaktion. Das entstehende Produkt ist 3-Hydroxykynurenin. Die  $K_m$  liegen bei aerober und anaerober Anzucht der Zellen in vergleichbaren Bereichen für NADPH bei 16 bzw. 17  $\mu\text{M}$  und für L-Kynurenin bei 40 bzw. 45  $\mu\text{M}$ . Ein Enzym aus aeroben Kulturen zeigt eine zehnfach höhere spezifische Aktivität als ein Enzym aus anaeroben Kulturen, was auf eine Induktion durch Sauerstoff schließen lässt (Schott und Staudinger, 1971). Die mit isolierten Mitochondrien bestimmte Hydroxylierungs-Aktivität ist gering und kann nicht durch FMN oder FAD gesteigert werden (Bandlow, 1972). *Saccharomyces cerevisiae* hat keine Kynureninase-Aktivität, die Anthranilat erzeugt (Shetty und Gaertner, 1973).

Die Hydroxylierung von L-Kynurenin ist in Abbildung 3.12 in Strukturformeln dargestellt.



**Abbildung 3.12:** Der dritte Schritt der *de novo* Biosynthese wird von der L-Kynurenin-3-Monooxygenase (Bna4p) katalysiert. Es entsteht 3-Hydroxy-Kynurenin.

Neben der Verzehnfachung der Aktivität der L-Kynurenin-3-Monooxygenase unter aeroben Bedingungen ist auch eine Steigerung der NAD<sup>+</sup>-Biosynthese-Leistung in der selben Größenordnung festzustellen. Möglicherweise ist das Enzym an der Regelung der

Biosynthese beteiligt und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar (Schott und Staudinger, 1971).

Das Gen *YBL098w* kodiert in *Saccharomyces cerevisiae* das Enzym L-Kynurenin-3-Monooxygenase. Die Funktion wurde biochemisch bestätigt. Nach der Identifikation wurde es mit *BNA4* benannt. Funktionseinschränkungen führen zu vermindertem Zellwachstum (Panozzo *et al.*, 2002).

### **3-Hydroxy-L-Kynureninase Bna5p**

Ein Abbauprodukt von L-Tryptophan, 3-Hydroxyanthranilat, reichert sich nur schleppend im Medium an (Shetty und Gaertner, 1973). Eine geringe Konzentration von 3-Hydroxyanthranilat wurde beobachtet, was für ein Zwischenprodukt der NAD<sup>+</sup>-Biosynthese spricht (Kradolfer *et al.*, 1982). Der Abbau von Tryptophan zu 3-Hydroxyanthranilat scheint nicht der Hauptabbauweg zu sein (Shetty und Gaertner, 1973).

Für die 3-Hydroxy-L-Kynureninase, die im Cytosol und im Zellkern agiert (Huh *et al.*, 2003), wurde eine Molmasse von 67 kDa bestimmt (Schott und Krause, 1979).

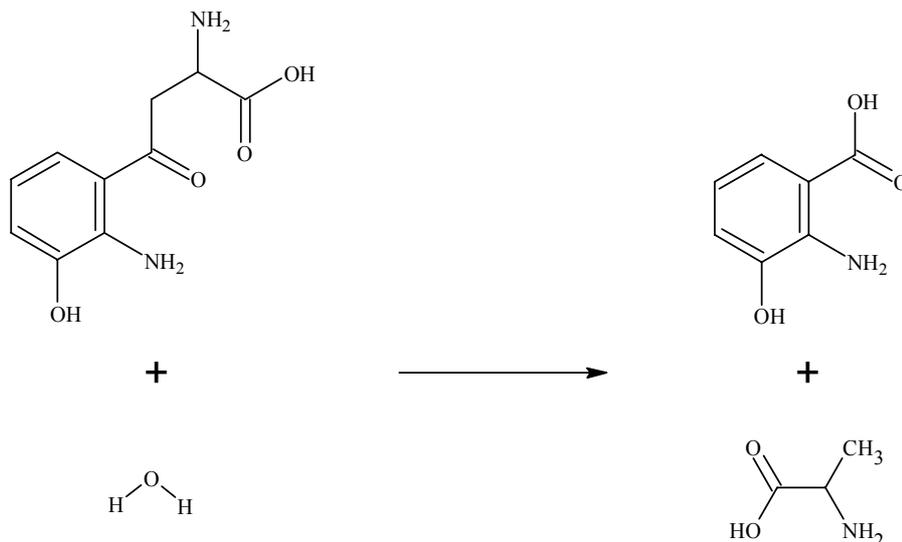
Kinetische Untersuchungen wurden mit einem teilweise gereinigten Enzym (Shetty und Gaertner, 1973) und mit einem gereinigten Enzym (Schott und Krause, 1979) durchgeführt.

Mit dem teilweise gereinigten Enzym wurde ein  $K_m$  für 3-Hydroxy-L-Kynurenin von 6,7  $\mu\text{M}$  bestimmt, für L-Kynurenin ein Wert von 540  $\mu\text{M}$  (Shetty und Gaertner, 1973). Für das gereinigte Enzym wurde ein  $K_m$  für 3-Hydroxy-L-Kynurenin von 3  $\mu\text{M}$  und für L-Kynurenin von 80  $\mu\text{M}$  bestimmt (Schott und Krause, 1979). Die Substratspezifisierung liegt eindeutig bei 3-Hydroxy-L-Kynurenin. Mit beiden Substraten wird die gleiche Maximalgeschwindigkeit erzielt (Shetty und Gaertner, 1973). Im Gegensatz dazu liegt die maximale Reaktionsgeschwindigkeit mit dem gereinigten Enzym für 3-Hydroxy-L-Kynurenin sechsmal höher als mit L-Kynurenin (Schott und Krause, 1979). Pyridoxalphosphat kann *in vitro* die Reaktionsgeschwindigkeit steigern (Shetty und Gaertner, 1973). Pyridoxalphosphat könnte als Coenzym der 3-Hydroxykynureninase

wirken, eine Inhibierung von Pyridoxalphosphat reduziert die Reaktionsgeschwindigkeit. Das Reaktionsprodukt 3-Hydroxyanthranilat kann die Hydrolyse inhibieren, was physiologisch einen Schutzmechanismus bedeuten könnte (Schott und Krause, 1979).

Zwischen Enzymen aus aeroben und anaeroben Kulturen ist kein Unterschied in der Hydrolyse-Aktivität zu beobachten. Die 3-Hydroxy-L-Kynureninase scheint konstitutiv exprimiert zu werden, Tryptophan hat keine induzierende Wirkung auf diese Enzymaktivität (Shetty und Gaertner, 1973). In Abbildung 3.13 ist die Biosynthese von 3-Hydroxy-Anthranilat gezeigt.

L-Kynurenin inhibiert die Reaktion von 3-Hydroxy-L-Kynurenin nur leicht, im umgekehrten Fall ist eine starke Inhibierung auszumachen. Bei gleicher Substratkonzentration und unter Berücksichtigung der Intensität der gegenseitigen Inhibierung verläuft *in vitro* die Bildung von 3-Hydroxyanthranilat 160-mal schneller als die Bildung von Anthranilat. Unter Berücksichtigung der cytosolischen Konzentrationen von L-Kynurenin (ca. 5,55  $\mu\text{M}$ ) und von 3-Hydroxy-L-Kynurenin (ca. 0,35  $\mu\text{M}$ ) in *Saccharomyces cerevisiae* entspräche das einer zehnfach schnelleren Umsetzung von 3-Hydroxy-L-Kynurenin *in vivo* (Schott und Krause, 1979).



**Abbildung 3.13: Biosynthese von 3-Hydroxy-Anthranilat als vierten Schritt der *de novo* Biosynthese. Diese Reaktion wird von dem Enzym 3-Hydroxy-L-Kynureninase (Bna5p) katalysiert.**

Das Gen *YLR231c* kodiert in *Saccharomyces cerevisiae* das Enzym 3-Hydroxy-L-Kynureninase. Die Funktion wurde biochemisch bestätigt. Nach der Identifikation wurde es mit *BNA5* benannt. Funktionseinschränkungen führen zu vermindertem Zellwachstum (Panozzo *et al.*, 2002).

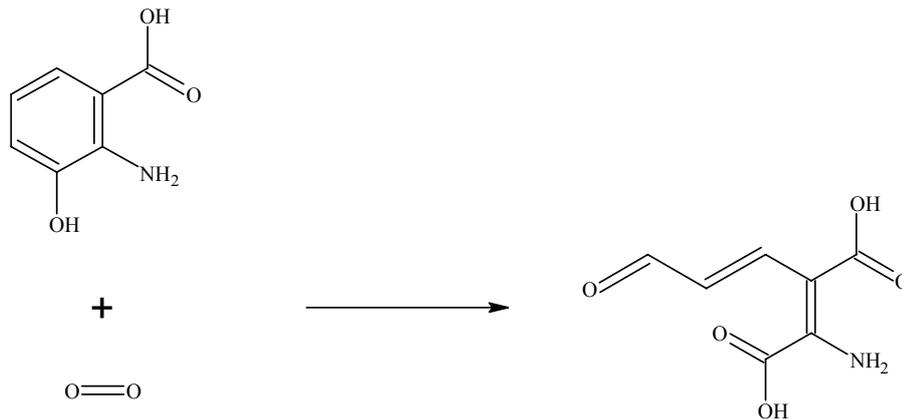
### **3-Hydroxyanthranilat-3,4-Dioxygenase Bna1p**

Der Einbau von Radioisotopen in Nicotinsäure ließ auf 3-Hydroxyanthranilat als Zwischenprodukt der Biosynthese von Nicotinsäure in *Saccharomyces cerevisiae* schließen (Ahmad und Moat, 1966). Die 3-Hydroxyanthranilat-3,4-Dioxygenase wurde erstmals von Lingens und Heilmann (1967) aus *Saccharomyces cerevisiae* aufkonzentriert und charakterisiert.

Das Enzym verliert sehr schnell an Aktivität, die jedoch durch  $\text{Fe}^{2+}$  wiederhergestellt werden kann. Für das Substrat 3-Hydroxyanthranilat wurde ein  $K_m$  von 18  $\mu\text{M}$  bestimmt (Lingens und Heilmann, 1967; Heilmann und Lingens, 1968a), der in Zellextrakt bei 19,2  $\mu\text{M}$  lag (Kucharczyk *et al.*, 1998). Das Substrat kann die Reaktion inhibieren. Die Verfügbarkeit von Sauerstoff hat keinen Einfluß auf die Enzymaktivität (Lingens und Heilmann, 1967; Heilmann und Lingens, 1968a). Zur katalytischen Aktivität werden  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen benötigt. Eine Oxidation der enzymgebunden Eisenionen führt zu einem reversiblen Verlust der Aktivität. Eine Hemmung der Enzymaktivität tritt mit Substratanalogen sowie mit Komplexbildnern auf (Heilmann und Lingens, 1968a). Die Aktivität scheint weder durch Vorstufen von  $\text{NAD}^+$  wie Nicotinsäure, Chinolinsäure oder Nicotinamid noch durch  $\text{NAD}^+$  selbst beeinflusst zu sein (Lingens und Heilmann, 1967). Auch reprimieren die selben Stoffe die 3-Hydroxy-Antranilat-3,4-Dioxygenase in Kulturen nicht (Heilmann und Lingens, 1968a). Tryptophan führt zu keiner Induktion des Enzyms (Lingens und Heilmann, 1967; Heilmann und Lingens, 1968a). Folglich wird eine konstitutive Expression angenommen (Lingens und Heilmann, 1967; Heilmann und Lingens, 1968b). Da bei den Untersuchungen nur geringe Umsätze von 3-Hydroxyanthranilat zu Chinolinsäure und Nicotinsäure beobachtet wurden, könnte dieses Enzym einen ratenbestimmenden Schritt durchführen und somit an der Regelung der  $\text{NAD}^+$ -Biosynthese

in Hefen beteiligt sein (Ahmad und Moat, 1966), wobei eine Akkumulation von  $\text{NAD}^+$  oder Nicotinsäure ausgeschlossen werden könnte (Heilmann und Lingens, 1968b).

Die Reaktion der 3-Hydroxyantranilat-3,4-Dioxygenase ist in Abbildung 3.14 gezeigt.



**Abbildung 3.14: Reaktion der 3-Hydroxyantranilat-3,4-Dioxygenase (Bna1p) zur Synthese von 2-Amino-3-Carboxy-Muconatsemialdehyd. Dies ist der fünfte Schritt der *de novo* Biosynthese.**

Bei der Gelfiltration bildet das Enzym ein Homodimer. Die Bindefläche zwischen den beiden Monomeren ist sehr hydrophob und entspricht jeweils 30 % der solvatisierbaren Oberfläche. Das Enzym enthält zwei  $\text{Ni}^{2+}$  je Monomer (Li *et al.*, 2006).

Jeweils ein  $\text{Ni}^{2+}$  befindet sich im aktiven Zentrum eines Monomers. Es ist sechsfach koordiniert, wobei zwei Wassermoleküle, zwei Histidinreste und einer Carboxyl-Gruppe als Liganden fungieren. Von der Seite der Wassermoleküle kann molekularer Sauerstoff binden. Im aktiven Zentrum findet die Öffnung des aromatischen Rings statt. Eine weitere Metallbindestelle dient der Stabilisierung des Monomers und ist nicht an der katalytischen Umsetzung beteiligt. Vier Aminosäurereste bilden an einem Ende des Monomers die Metallbindestelle aus, das divalente Kation ist vierfach koordiniert.  $\text{Ni}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{2+}$  müssen nicht den natürlichen Ionen entsprechen, sie können auch erst bei der Aufreinigung in das Molekül gelangt sein. Zu den physiologisch bedeutenden Ionen sind keine Daten bekannt (Li *et al.*, 2006).

Zur Reaktion wird folgender Mechanismus vorgeschlagen: Das Substrat 3-Hydroxyanthranilat bindet an  $\text{Fe}^{2+}$  im aktiven Zentrum. Im nächsten Schritt bindet zuerst molekularer Sauerstoff als Ligand an  $\text{Fe}^{2+}$ , dann wird eine weitere Bindung zu 3-Hydroxyanthranilat ausgebildet. Aus einem Siebenerring als Intermediat bildet sich dann das Produkt 2-Amino-3-Carboxy-Muconatsemialdehyd und verlässt das aktive Zentrum (Li *et al.*, 2006).

### Spontane Zyklisierung

Der sechste Schritt der *de novo* Biosynthese verläuft nicht-enzymatisch. Bei einer spontanen Zyklisierung kann der Stickstoff der Amino-Gruppe im 2-Amino-3-Carboxy-Muconatsemialdehyd in einen Sechsering eingebaut werden. Es entsteht ein Pyridin-Derivat, die Chinolinsäure. Diese Reaktion ist in Abbildung 3.15 in Strukturformeln wiedergegeben.

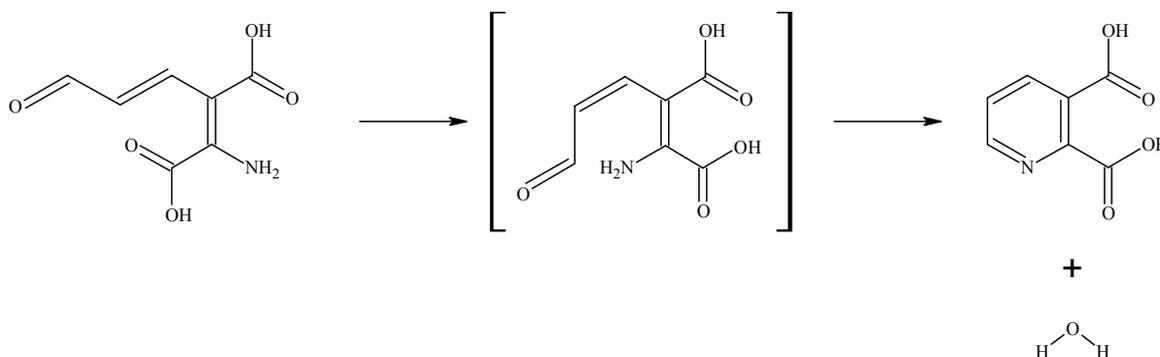


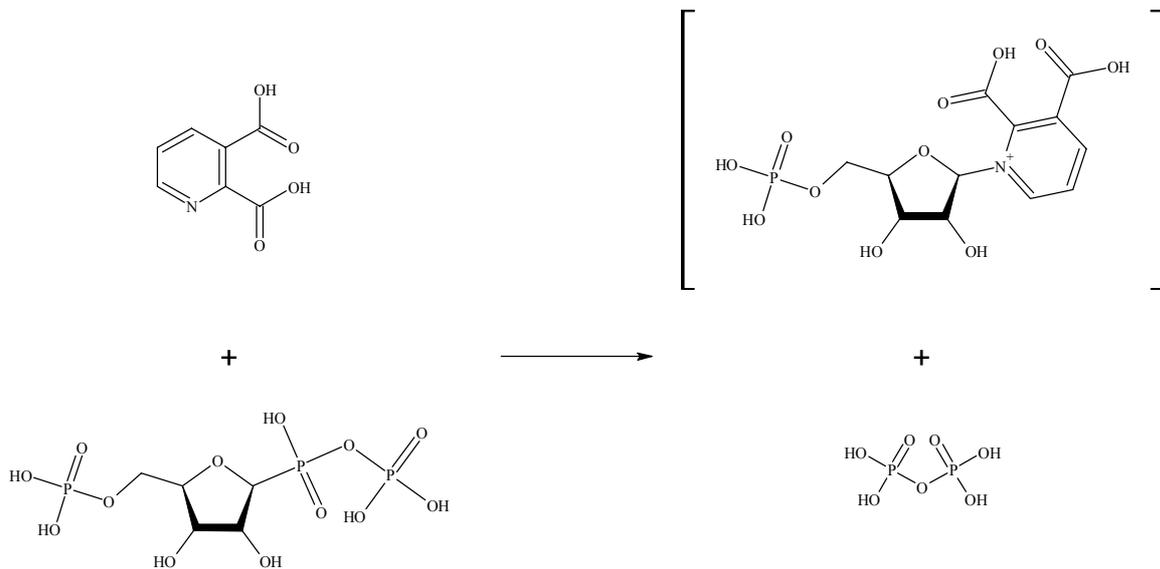
Abbildung 3.15: Der sechste Schritt der *de novo* Biosynthese ist eine spontane Zyklisierung des 2-Amino-3-Carboxy-Muconatsemialdehyds zur Chinolinsäure. Der Stickstoff der Amino-Gruppe wird dabei in den Sechsering eingebaut.

### Chinolinsäure-Phosphoribosyl-Transferase Bna6p

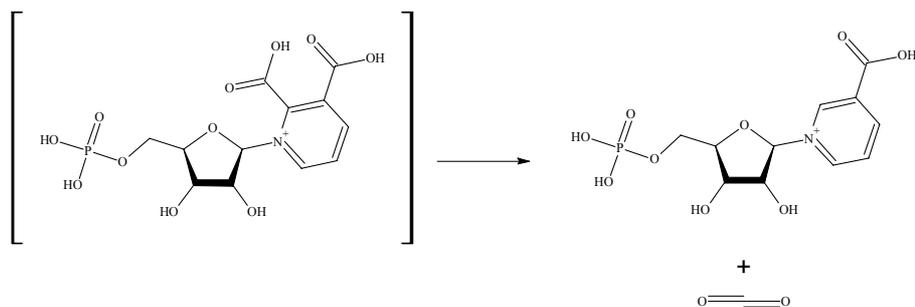
Die Chinolinsäure konnte als eine mögliche Zwischenstufe der Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  in Hefe herausgearbeitet (Ahmad und Moat, 1965) und in Zellextrakt von *Saccharomyces cerevisiae* bestätigt werden (Ahmad und Moat, 1966). Die Synthese von Nicotinsäure aus Chinolinsäure ist PRPP-abhängig (Ahmad und Moat, 1965). Es ist nicht relevant, ob die

Organismen zuvor unter aeroben oder anaeroben Bedingungen angezogen wurden. Da Chinolinsäure unter aeroben wie auch unter anaeroben Bedingungen die Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  ermöglicht, scheint sie die gemeinsame Vorstufe in den beiden möglichen Biosynthesewegen zu sein (Ahmad und Moat, 1966).

Die Chinolinsäure-Phosphoribosyl-Transferase katalysiert eine zweistufige Reaktion. Zuerst wird aus Chinolinsäure und PRPP das Chinolinsäuremononucleotid synthetisiert, das durch eine anschließende Decarboxylierung in Nicotinsäuremononucleotid überführt wird. Diese beiden Reaktionen sind in Strukturformeln in Abbildung 3.16 und Abbildung 3.17 zusammengefasst.



**Abbildung 3.16:** Synthese des Chinolinsäuremononucleotids als siebten Schritt der *de novo* Biosynthese. Diese Reaktion wird von der Chinolinsäure-Phosphoribosyl-Transferase durchgeführt.



**Abbildung 3.17:** Decarboxylierung des Chinolinsäuremononucleotids als achten Schritt der *de novo* Biosynthese. Diese Reaktion wird von der Chinolinsäure-Phosphoribosyl-Transferase durchgeführt. Es entsteht das Nicotinsäuremononucleotid.

Das Enzym Chinolinsäure-Phosphoribosyl-Transferase ist im Zellkern und im Cytoplasma zu finden (Huh *et al.*, 2003) und wird von dem Gen *YFR047c* kodiert. Die Funktion wurde biochemisch bestätigt. Nach der Identifikation wurde es mit *BNA6* benannt. Funktionseinschränkungen führen zu vermindertem Zellwachstum (Panozzo *et al.*, 2002).

Das Produkt von Bna6p, Nicotinsäure-Mononucleotid, kann wie in Kapitel 3.2.2 erläutert zu NAD<sup>+</sup> umgebaut werden.

### 3.2.4 Einspeisung von Nicotinamid(derivate)

In *Saccharomyces cerevisiae* gibt es zwei Möglichkeiten, Nicotinamid bzw. ein Nicotinamidderivat in die Biosynthese von NAD<sup>+</sup> einzuspeisen. Zum einen kann Nicotinamid durch die Nicotinamid-Deamidase (Pnc1p) als Nicotinsäure in den Preiss-Handler-Weg eingeschleust werden. Zum anderen bietet die Nicotinamidribose-Kinase (NrK1p) die Möglichkeit, aus Nicotinamidribose NMN zu synthetisieren, welches dann über eine NaMN-/NMN-Adenyly-Transferase direkt zu NAD<sup>+</sup> umgebaut werden kann. Die beiden genannten Enzyme werden in diesem Kapitel näher betrachtet.

#### Nicotinamid-Deamidase Pnc1p

In Zellextrakt von *Saccharomyces cerevisiae* ist eine Nicotinamid-Deamidase-Aktivität nachzuweisen (Oka, 1954; Sundaram *et al.*, 1960). Nicotinamid kann über Nicotinsäure wieder in den Aufbau von NAD<sup>+</sup> über den Preiss-Handler-Weg zurückgeführt werden (Sundaram *et al.*, 1960; Yan und Sloan, 1987; Ghislain *et al.*, 2002). Die Nicotinamid-Deamidase kann in den Peroxisomen (Anderson *et al.*, 2003; Huh *et al.*, 2003), im Zellkern und im Cytosol und gefunden werden (Anderson *et al.*, 2003).

Bei dem gereinigten Enzym handelt es sich um ein Polypeptid mit einer Molmasse von 26 kDa (Ghislain *et al.*, 2002) bzw. 34 kDa (Yan und Sloan, 1987). Diese Werte stimmen mit der jeweils zuvor bestimmten theoretischen Masse des Polypeptids (Ghislain *et al.*, 2002) aus der Aminosäurezusammensetzung überein. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass dieses

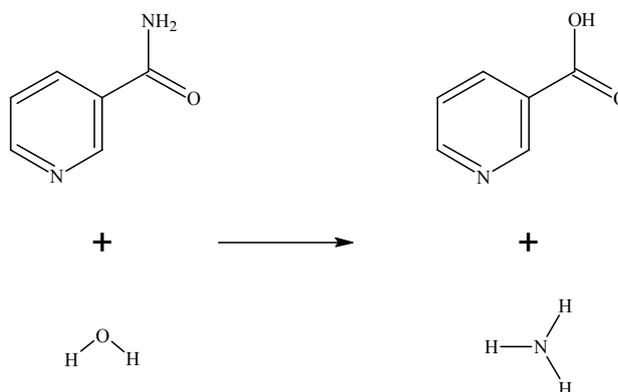
aktive Protein unter anderen Bedingungen ein Teil eines aktiven Oligomers ist (Yan und Sloan, 1987). Über einen Vergleich der Aminosäuresequenz konnte der *ofr YGL037C* als das Gen für die Nicotinamid-Deamidase identifiziert werden, was durch eine funktionale Studie belegt werden konnte. Das Gen tritt im Folgenden unter der Bezeichnung *PNC1* auf (Ghislain *et al.*, 2002).

Exogenes Nicotinamid wird von *Saccharomyces cerevisiae* Kulturen sehr schnell deamidiert. Es reichert sich Nicotinsäure im Medium an (Sundaram *et al.*, 1960). Durch die Nicotinamid-Deamidase-Aktivität wird aus Nicotinamid Ammoniak freigesetzt (Oka, 1954). Zur Deamidierung ist *in vitro* kein Amin-Akzeptor notwendig. Aus Kinetikdaten wurde ein  $K_m$  von 33  $\mu\text{M}$  für Nicotinamid bestimmt, was auf einen relativ stabilen Enzym-Substrat-Komplex hindeutet (Yan und Sloan, 1987). Die Aktivität eines teilweise gereinigten Enzyms wird steigend von  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  über  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Hg}^{2+}$  inhibiert.  $\text{Mn}^{2+}$  zeigte keine inhibierende Wirkung (Oka, 1954).

Aus den berechneten Kurven der Reaktionsgeschwindigkeit kann man herauslesen, dass am aktiven Zentrum mindestens ein protonierter Aminosäure-Rest vorliegen muss. Dabei könnte es sich um einen Lysinrest oder um eine N-terminale Amino-Gruppe handeln, die in der Nähe der Carbonyl-Gruppe des im aktiven Zentrum gebundenen Nicotinamids liegt. Der Lysinrest könnte an der Ausbildung eines tetraederförmigen Zwischenprodukts beteiligt sein und der Amin-haltigen Abgangsgruppe ein Proton beisteuern. Nach der Nicotinsäure-Bildung könnte der Lysinrest mit der Carboxyl-Gruppe eine Ionenpaar-Bindung eingehen (Yan und Sloan, 1987).

Möglicherweise regelt der Zellwachstumsstatus die Funktion von Pnc1p. Mit zunehmender Zellzahl nimmt auch die Aktivität zu (Ghislain *et al.*, 2002). Neben der Bereitstellung von Nicotinsäure für die Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  hat das Gen *PNC1* bei der Bewältigung von Hitzestress oder Nährstofflimitierung eine weitreichende Bedeutung. Unter Glucoselimitierung steigt invers zur Glucosekonzentration die Expression von *PNC1* (Anderson *et al.*, 2003).

Die Deamidierung von Nicotinamid ist in Abbildung 3.18 in Strukturformeln dargestellt.



**Abbildung 3.18: Deamidierung von Nicotinamid. Nicotinsäure kann in den Preiss-Handler-Weg eingespeist werden und schließt so den Kreislauf zwischen  $\text{NAD}^+$ -Auf- und Abbau. Diese Reaktion wird von der Nicotinamid-Deamidase (Pnc1p) durchgeführt.**

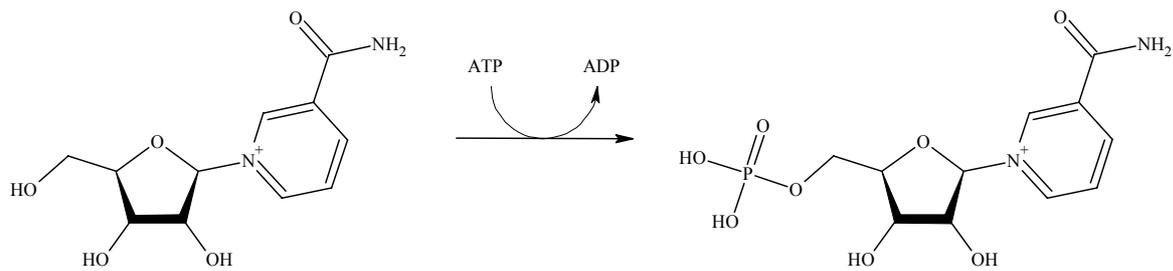
Über die Aktivität der Nicotinamid-Deamidase könnte man Aufschluß über die relativen Konzentrationen von Nicotinsäure- und Nicotinamidmononucleotid in *Saccharomyces cerevisiae* und über die physiologische Bedeutung beider Substrate (Yan und Sloan, 1987) hinsichtlich der Nicotinsäure-/Nicotinamidmononucleotid-Adenyly-Transferase gewinnen (Natalini *et al.*, 1986). Sofern man ADP-Ribose-bildende Enzyme in der Hefe findet, würde einerseits diese These bestärkt werden und andererseits würde das auf das Vorkommen von ADP-Ribose in der Zellregulierung hindeuten (Yan und Sloan, 1987).

### Nicotinamidribose-Kinase NrK1p

Wie bisher von Bakterien bekannt, ist Nicotinamidribose auch in Eukaryoten eine Zwischenprodukt, aus dem über einen weiteren Weg  $\text{NAD}^+$  synthetisiert werden kann. Das Vorhandensein einer Nicotinamidribose-Kinase-Aktivität wurde biochemisch bestätigt. Durch Screening-Experimente wurde der *orf YNL129W* als Gen der Nicotinamidribose-Kinase bestimmt, genetisch und biochemisch in der Funktion belegt und mit *NRK1* bezeichnet (Bieganowski und Brenner, 2004). Die Nicotinamidribose-Kinase befindet sich im Cytosol (Huh *et al.*, 2003).

Damit ist ein vierter Syntheseweg identifiziert und bestätigt worden, welcher unabhängig von der  $\text{NAD}$ -Synthetase Qns1p (Gen: *QNS1*) ist. Dieser Weg führt im Gegensatz zu den

anderen drei von Nicotinamidribose über NMN zu  $\text{NAD}^+$ . Ermöglicht wird das durch eine spezifische Nicotinamidribose-Kinase-Aktivität. Diese Erweiterung der  $\text{NAD}^+$ -Synthesewege unterstreicht die zweifache Spezifizierung der NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferasen (Bieganowski und Brenner, 2004). Die Reaktion der Nicotinamidribose-Kinase ist in Abbildung 3.19 gezeigt.



**Abbildung 3.19: Biosynthese von Nicotinamidmononucleotid. Mittels der Nicotinamidribose-Kinase (NrK1p) kann ein Nicotinamid-Derivat auf einem von allen anderen Synthesen unabhängigen Weg in die Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  eingespeist werden.**

Kürzlich wurde ein fünfter Syntheseweg ausgehend von Nicotinamidribose über NaMN zu  $\text{NAD}^+$  beschrieben (Belenky *et al.*, 2007).

### 3.2.5 Aufnahme exogener Nicotinsäure

Neben der Einspeisung zellinterner  $\text{NAD}^+$ -Komponenten kann auch extrazelluläre Nicotinsäure der Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  zugeführt werden.

#### Nicotinsäure-Transporter Tna1p

Das Gen *YGR260w* kodiert in *Saccharomyces cerevisiae* eine Nicotinsäure-Permease. Es wurde in *TNAI* (von: ‚transporter of nicotinic acid‘) umbenannt. Die extrazelluläre Nicotinsäure-Konzentration bestimmt die Transkription von *TNAI* (Llorente und Dujon, 2000). Die Expression von *TNAI* nimmt bei geringer Nicotinsäure-Konzentration zu (Llorente und Dujon, 2000; Klebl *et al.*, 2000). Das Protein Tna1p ist nicht nur ein Sensor, sondern ermöglicht, dass Nicotinsäure die Plasmamembran passieren kann (Llorente und Dujon, 2000). Dabei wird eine aktive Transport-Funktion angenommen (Klebl *et al.*, 2000). Als Aufenthaltsort werden das endoplasmatische Reticulum (Huh *et al.*, 2003) sowie die Mitochondrien angegeben (Sickmann *et al.*, 2003).

*TNAI* ist das erste Gen, das durch Nicotinsäure geregelt wird. Die Änderung der Transkription ist spezifisch für Nicotinsäure. Möglicherweise ist die Carboxylgruppe für die Aufnahme verantwortlich (Llorente und Dujon, 2000). Neben Nicotinsäure kann auch die strukturähnliche *p*-Aminobenzoessäure die Expressionsrate von *TNAI* bestimmen. Allerdings wird nur Nicotinsäure aufgenommen (Klebl *et al.*, 2000).

Die Transportfunktion kann nur durch hohe Nicotinsäurekonzentrationen unterbunden werden (Klebl *et al.*, 2000). Bei hohen Nicotinsäure-Konzentrationen könnten andere Aufnahmemechanismen zum Tragen kommen, möglicherweise durch Diffusion oder durch eine Permease mit einer geringen Affinität zu Nicotinsäure (Llorente und Dujon, 2000). *iso*-Nicotinsäure, Nicotinamid oder *p*-Aminobenzoessäure sind als Inhibitor wirkungslos (Klebl *et al.*, 2000).

Die Aufnahme von Nicotinsäure aus dem Medium folgt einer Michaelis-Menten-Kinetik. Tna1p zeigt eine hohe Affinität zu Nicotinsäure. Der  $K_m$  von Nicotinsäure liegt bei  $1,7 \mu\text{M}$

(Llorente und Dujon, 2000) bzw. bei 2  $\mu\text{M}$  (Klebl *et al.*, 2000). In einem Stamm ohne Transporter ist nahezu keine Aufnahme von Nicotinsäure zu verfolgen (Llorente und Dujon, 2000).

### 3.2.6 Abbau von $\text{NAD}^+$

In diesem Kapitel sollen Reaktionen betrachtet werden, bei denen  $\text{NAD}^+$  den Coenzym-Charakter verliert. Allen Reaktionen gemeinsam ist die Freisetzung von Nicotinamid, das über die Nicotinamid-Deamidase (Kapitel 3.2.4) in Form der Nicotinsäure wieder der Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  über den Preiss-Handler-Weg verfügbar gemacht werden kann.  $\text{NAD}^+$  ist also ein Intermediat des Kreislaufs  $\text{NAD}^+ - \text{N} - \text{Na} - \text{NaMN} - \text{NaAD} - \text{NAD}^+$ . Aus  $\text{NAD}^+$  können die Enzyme

- Mono-(ADP-Ribosyl)-Transferase Sir2p,
- $\text{NAD}^+$ -abhängige Deacetylase Sir2p,
- $\text{NAD}^+$ -abhängige Deacetylase Hst1p und
- $\text{NAD}^+$ -abhängige Deacetylase Hst2p

Nicotinamid freisetzen. In erster Linie sind diese Enzyme an regulatorischen Prozessen beteiligt, indem über posttranslatorische Modifikation von Proteinen deren Aktivität beeinflusst wird. Dabei unterscheidet man die Übertragung von ADP-Ribose von  $\text{NAD}^+$  auf ein Protein von der Proteindeacetylierung, bei der O-Acetyl-ADP-Ribose entsteht. Eine ausführlichere Beschreibung dieser Enzyme ist Inhalt dieses Kapitels.

#### **Mono-(ADP-Ribosyl)-Transferase Sir2p**

Ob eine Mono-/Poly-(ADP-Ribosyl)ierung in *Saccharomyces cerevisiae* auftritt, ist bisher noch nicht umfassend aufgeklärt worden (Faraone-Mennella *et al.*, 2005). Die Begriffe Mono- und Poly-(ADP-Ribosyl)ierung werden teilweise überlappend verwendet.

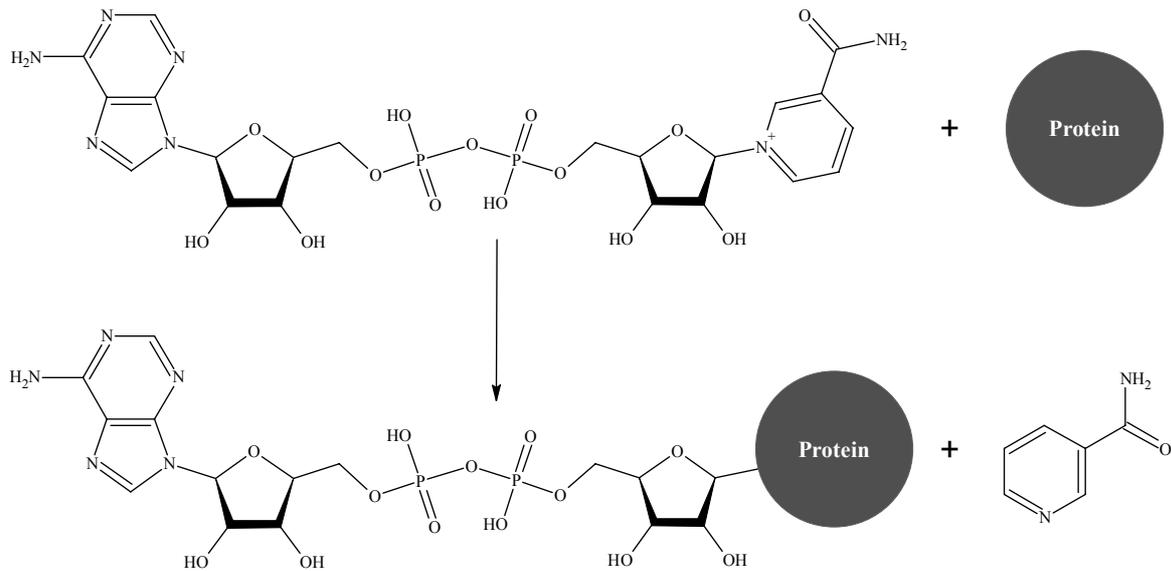
Bei der Identifikation einer NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase wurde festgestellt, dass das Enzym 2 % (w/w) Kohlenhydrate, 2 mol/mol (Gesamt)Phosphat, 1 mol/mol Adenin(derivate) enthält (Natalini *et al.*, 1986). Dieser Kohlenhydratgehalt ist vornehmlich auf Pentosen zurückzuführen (Ruggieri *et al.*, 1988) und deutet auf eine MONO-(ADP-RIBOSYL)IERUNG hin (Ruggieri *et al.*, 1988; Collinge und Althaus, 1994), die aber auch durch die Aufreinigung entstanden sein könnte (Ruggieri *et al.*, 1988).

Faraone-Mennella *et al.* (2005) identifizierten und charakterisierten ein Protein mit einer (ADP-Ribosyl)ierungs-Aktivität. Das (ADP-Ribosyl)ierende Enzym in Hefe besitzt eine Molmasse zwischen 80 und 90 kDa. Das (ADP-Ribosyl)ierende Enzym wird durch Nicotinamid nicht inhibiert und ist DNA-unabhängig. Die Bildung von (ADP-Ribosyl)-Oligomeren kann nicht ausgeschlossen werden. Im Zellkern kommen als ADP-Ribose-Akzeptoren hauptsächlich kleine Proteine mit einer Molmasse zwischen 40 und 100 kDa in Frage, die durchaus stabil sind.

Auf diesen Beobachtungen aufbauend sind die Autoren der Überzeugung, dass es (ADP-Ribosyl)ierungs-Aktivitäten in Hefe gibt (Faraone-Mennella *et al.*, 2005). In einer anderen Studie beschreiben Gulyamova *et al.* (2001) (ADP-Ribosyl)ierte Proteine im Kern von *Saccharomyces cerevisiae*. Für die Mono-(ADP-Ribosyl)ierung der NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase (Ruggieri *et al.*, 1988; Collinge und Althaus, 1994) spricht auch, dass die Molmasse der NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase mit der eines Hauptakzeptorproteins von ca. 50 kDa übereinstimmt (Faraone-Mennella *et al.*, 2005).

Bei Untersuchungen des Proteins Sir2p aus *Saccharomyces cerevisiae* kann beobachtet werden, dass Sir2p *in vitro* unter der Verwendung von NAD<sup>+</sup> Histone und sich selbst verändern kann. Dies ist auf eine Mono-(ADP-Ribosyl)-Transferase-Aktivität zurückzuführen. Die Automodifizierung deutet *in vivo* auf eine Mono-(ADP-Ribosyl)ierung hin. Mittels SDS-PAGE wurde für das selbstmodifizierte GST-Sir2p-Protein eine Molmasse von 90 kDa ermittelt (Tanny *et al.*, 1999). Sir2p agiert im Kern der Hefen (Smith *et al.*, 2000).

Die Übertragung eines ADP-Ribose-Moleküls auf ein Protein durch Sir2p ist schematisch in Abbildung 3.20 wiedergegeben.



**Abbildung 3.20: Modifikation eines Proteins durch (ADP-Ribosyl)ierung.** Diese Reaktion kann von der Mono-(ADP-Ribosyl)-Transferase Sir2p durchgeführt werden. Das freigesetzte Nicotinamid kann als Nicotinsäure wieder in den Preiss-Handler-Weg eingespeist werden.

In der Zelle kommen als ADP-Ribose-Akzeptoren Histone, andere Sirtuine und Sir2p selbst in Frage. Bei *in vitro* Untersuchungen wurde festgestellt, dass Histone die Selbst-Modifizierungs-Aktivität von Sir2p stimulieren. Da ADP-Ribose *in vitro* auf Histone übertragen werden kann, könnten sie auch *in vivo* Akzeptoren einer Mono-(ADP-Ribosyl)ierungs-Aktivität von Sir2p sein. Die Automodifizierung wurde auch *in vivo* festgestellt. Welche Rolle der Selbstmodifikation *in vivo* zukommt und ob Histone *in vivo* Akzeptorproteine darstellen, muss noch erarbeitet werden (Tanny *et al.*, 1999).

Zwischen den bekannten Mono-(ADP-Ribosyl)-Transferasen und Sir2p konnten keine offensichtlichen Sequenzübereinstimmungen gefunden werden. Es handelt sich wohl um eine eigene Klasse von Enzymen (Tanny *et al.*, 1999).

Da die Mono-(ADP-Ribosyl)ierung der NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase (Natalini *et al.*, 1986; Ruggieri *et al.*, 1988; Collinge und Althaus, 1994) bei der Proteinreinigung entstanden sein könnte, sollte ein anderes Verfahren der Aufreinigung die Identifikation einer POLY-(ADP-RIBOSYL)IERTEN NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase ermöglichen. Für das gereinigte Protein wurde mittels Gelfiltration eine Molmasse von 200 kDa bestimmt. Durch genauere Analyse wurden Fraktionen erkannt, die drei bis vier Mol Adeninderivate

pro Mol Enzym enthielten, jedoch keine katalytische Aktivität zeigten. Es wird angenommen, dass in diesen Fällen die NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase durch Poly-(ADP-Ribosyl)ierung inaktiviert wurde (Ruggieri *et al.*, 1988).

Die Expression einer heterologen Poly-(ADP-Ribosyl)-Polymerase in *Saccharomyces cerevisiae* führte *in vitro* zu einer Inhibierung der Poly-(ADP-Ribosyl)-Polymerase-Aktivität durch die NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase. Die inhibierende Wirkung nimmt mit der Konzentration der NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase zu. Eine Poly-(ADP-ribosyl)ierung der NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase konnte in diesem Reaktionsansatz nicht gefunden werden. Es wird angenommen, dass ein stabiler Enzym-Enzym-Komplex zum Abbruch der Reaktion führt, der Verbrauch eines benötigten Reaktionspartners kann ausgeschlossen werden. Möglicherweise kann die Reaktion nur mit einem homologen Enzym stattfinden (Ruggieri *et al.*, 1990).

Die Mono-(ADP-Ribosyl)-Transferasen und Poly-(ADP-Ribosyl)-Polymerasen mögen in Hefe von den bekannten Vertretern strukturell verschieden sein, ihre Funktionalität ist aber bewiesen (Faraone-Mennella *et al.*, 2005).

### **NAD<sup>+</sup>-abhängige Deacetylase Sir2p**

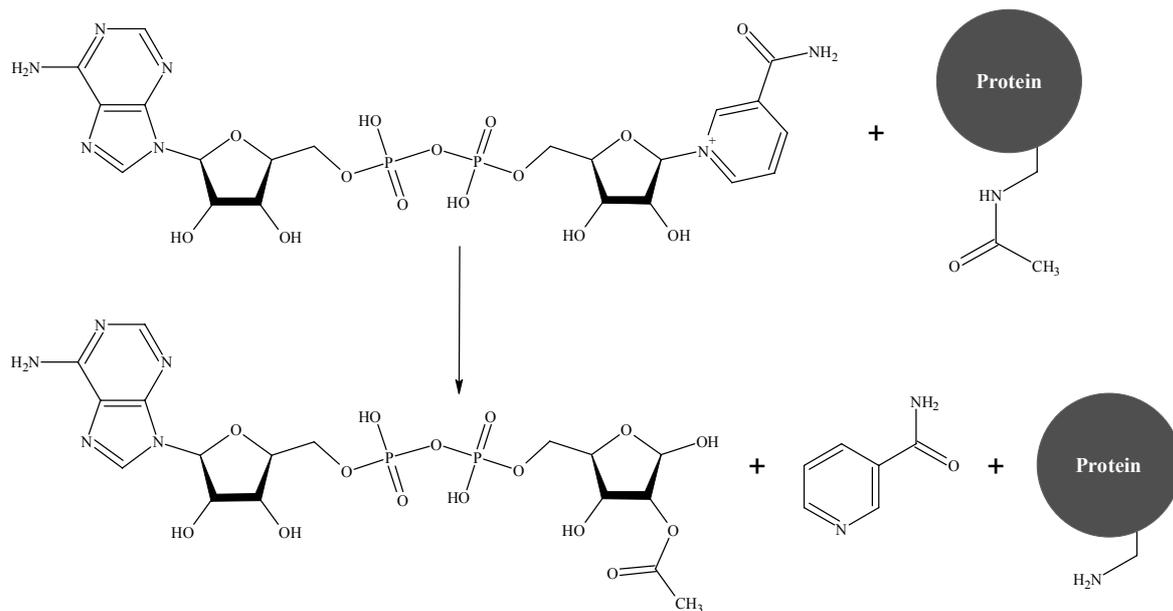
Wie von Tanny *et al.* (1999) gezeigt, besitzt Sir2p eine Mono-(ADP-Ribosyl)-Transferase-Aktivität. Diese ist jedoch unspezifisch und nur schwach ausgeprägt. Sie kann von der Histon-Deacetylase-(HDA)-Aktivität zumindest teilweise unterschieden werden. Jedoch müssen Histone *in vivo* nicht zwangsläufig das einzige Ziel der HDA-Aktivität der Sirtuine in Hefe sein. Es konnte auch *in vivo* die Funktion von Sir2p als NAD-abhängiges Enzym geklärt/bestätigt werden (Smith *et al.*, 2000).

Als Wirkungsort von Sir2p wird der Zellkern (Bedalov *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2000) oder die Peripherie des Zellkerns angegeben (Huh *et al.*, 2003).

Mit einem rekombinanten Proteinen wurde ein  $K_m$  für NAD<sup>+</sup> von 29,7  $\mu$ M ermittelt (Bedalov *et al.*, 2003). Die NAD<sup>+</sup>-abhängige Histon-Deacetylase Sir2p überträgt Signale

zur Erhöhung der Lebensdauer. Bei diesen Prozessen kommt es allerdings nicht zu einer Erhöhung der  $\text{NAD}^+$ -Konzentration oder zu einer Verschiebung des Redoxzustands (Anderson *et al.*, 2002).

Die Deacetylierung eines Proteins ist in Abbildung 3.21 schematisch wiedergegeben.



**Abbildung 3.21: Schematische Darstellung der Proteindeacetylierung. Diese Reaktion kann von einer  $\text{NAD}^+$ -abhängigen Protein-Deacetylase (z. B. Sir2p) katalysiert werden. Es entstehen 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose und Nicotinamid, welches als Nicotinsäure wieder in den Preiss-Handler-Weg eingespeist werden kann.**

### $\text{NAD}^+$ -abhängige Deacetylase Hst1p

Ein zu Sir2p homologes Protein, Hst1p (von: ‚homologue of SIR two‘), zeigt eine  $\text{NAD}^+$ -abhängige Deacetylase-Aktivität. Hst1p fungiert als zellulärer Sensor der  $\text{NAD}^+$ -Konzentration. Mit einem rekombinanten Protein wurde ein  $K_m$  für  $\text{NAD}^+$  von 94,2  $\mu\text{M}$  ermittelt (Bedalov *et al.*, 2003). Die Reaktion von Hst1p kann Abbildung 3.21 entnommen werden.

Hst1p kommt im Zellkern (Bedalov *et al.*, 2003; Huh *et al.*, 2003) und auch im Cytosol vor (Huh *et al.*, 2003).

### NAD<sup>+</sup>-abhängige Deacetylase Hst2p

Da Hst2p im Cytoplasma agiert (Smith *et al.*, 2000; Bedalov *et al.*, 2003; Huh *et al.*, 2003), könnte es Histone von verschiedenen Proteine deacetylieren (Smith *et al.*, 2000). Mit einem rekombinanten Protein wurde ein  $K_m$  für NAD<sup>+</sup> von 15,0  $\mu$ M ermittelt (Bedalov *et al.*, 2003). Die Reaktion von Hst2p ist schematisch in Abbildung 3.21 dargestellt.

### 3.2.7 Biosynthese von NADP<sup>+</sup>/H

Bei der Biosynthese von NADP<sup>+</sup>/H wird zwar auch NAD<sup>+</sup> verbraucht, die Funktion als Elektronenüberträger bleibt jedoch erhalten. Die Phosphorylierung von NAD<sup>+</sup> ist die einzige Möglichkeit, NADP<sup>+</sup> zu synthetisieren. In *Saccharomyces cerevisiae* konnten die

- cytosolische NADH-Kinase Utr1p, die
- cytosolische NADH-Kinase Yef1p und die
- mitochondriale NADH-Kinase Pos5p

identifiziert werden. Da in der früheren Literatur NAD(H)-Kinasen beschrieben wurden, den identifizierten Kinasen jedoch nicht zugeordnet wurden, werden deren Beschreibungen in Kapitel 3.2.10 aufgeführt. Hier wird auf die drei identifizierten NADH-Kinasen in *Saccharomyces cerevisiae* eingegangen.

Die Bezeichnung NAD<sup>+</sup>-Kinase meint, dass diese Kinase nur NAD<sup>+</sup> umsetzen kann. Eine NADH-Kinase kann sowohl NAD<sup>+</sup> als auch NADH als Substrat akzeptieren (Shi *et al.*, 2005).

### Cytosolische NADH-Kinase Utr1p

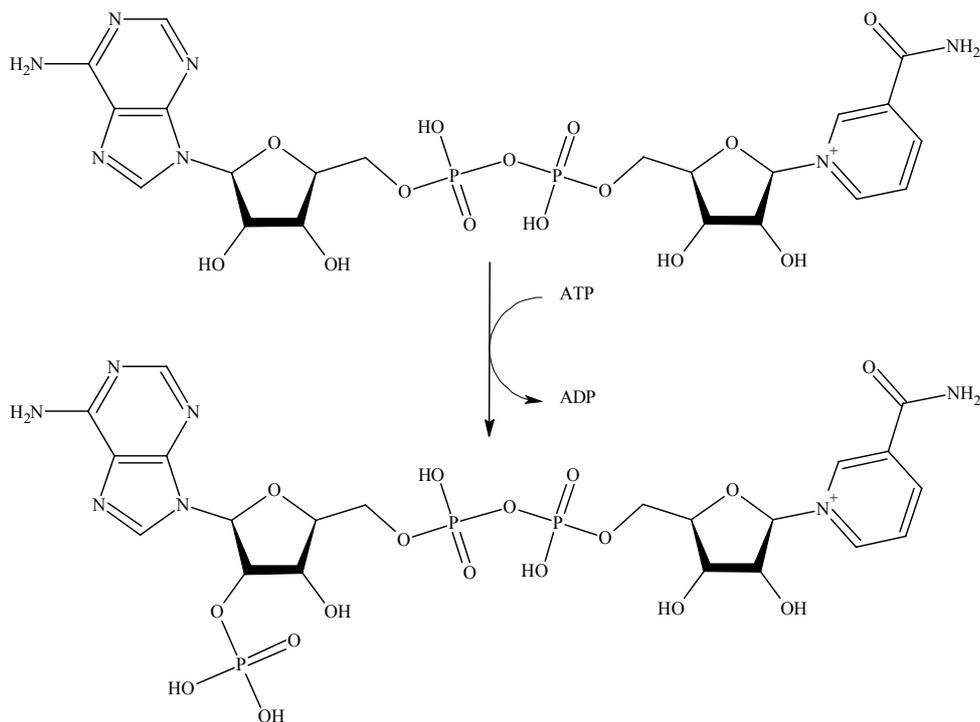
Bei der Analyse eines Genombereichs in *Saccharomyces cerevisiae* wurde u. a. ein Transkript entdeckt, dem keine Funktion zugeordnet werden konnte. Dieses Transkript wurde mit *UTR1* (von: ‚unidentified trascripts‘) bezeichnet (Barry *et al.*, 1987). Später

wurde herausgefunden, dass Utr1p ein Teil des Ferrireduktase-Systems in *Saccharomyces cerevisiae* darstellt (Lesuisse *et al.*, 1996). Kawai *et al.* (2001) klonen *UTR1* und zeigten an dem rekombinanten Protein, dass Utr1p NAD<sup>+</sup>-Kinase-Aktivität zeigt.

Das Protein Utr1p besteht aus 530 Aminosäuren, für die zusammen eine molare Masse von 59,4 kDa berechnet werden kann (Lesuisse *et al.*, 1996). Für das rekombinante Protein wurde mittels SDS-PAGE eine Molmasse von 60 kDa bestimmt. Da durch Gelfiltration eine Molmasse von 360 kDa bestimmt wurde, besteht die NAD<sup>+</sup>-Kinase aus sechs identischen Utr1p-Untereinheiten (Kawai *et al.*, 2001). Bezüglich der Beschreibungen von Tseng *et al.* (1979) kann nicht ausgeschlossen werden, dass Utr1p *in vivo* modifiziert wird, da ein rekombinant hergestelltes Protein mit einem aufgereinigten Protein verglichen wird (Kawai *et al.*, 2001).

ATP erwies sich als der effektivste Phosphatgruppendonator (Kawai *et al.*, 2001; Bieganowski *et al.*, 2006), mit CTP, dATP und TTP fiel die Aktivität auf 67 %, 39 % bzw. 6 % verglichen mit ATP (Kawai *et al.*, 2001). In einer anderen Studie wird bestimmt, dass die Aktivität mit dATP oder dCTP bis auf ein Drittel absinkt. Ungefähr ein Zehntel der Aktivität mit ATP wird mit dGTP, GTP und CTP gemessen (Bieganowski *et al.*, 2006). Andere Nucleosidtriphosphate, ADP, AMP, anorganische (Poly)Phosphate sowie phosphorylierte Metabolite (z. B. Glucose-6-Phosphat) gaben keine Phosphatgruppe ab (Kawai *et al.*, 2001).

Für ATP und NAD<sup>+</sup> wurde jeweils ein K<sub>m</sub> von 0,6 mM und 0,5 mM bestimmt. Mit NADH wurde keine Aktivität beobachtet (Kawai *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu stellten Shi *et al.* (2005) fest, das Utr1p sowohl NAD<sup>+</sup> als auch NADH umsetzen kann. Der K<sub>m</sub> für die NADH-Phosphorylierung liegt bei 3,9 mM. Dieser Wert ist höher (Shi *et al.*, 2005) als der K<sub>m</sub> für NAD<sup>+</sup>, der zu 0,5 mM bestimmt wurde (Kawai *et al.*, 2001). Utr1p zeigt eine 50-fach höhere Aktivität mit NAD<sup>+</sup> verglichen mit NADH (Bieganowski *et al.*, 2006). Die NADH-Kinase Utr1p setzt in erster Linie NAD<sup>+</sup> zu NADP<sup>+</sup> um (Bieganowski *et al.*, 2006; Li und Shi, 2006). Die Reaktion der NADH-Kinase ist in Abbildung 3.22 dargestellt.



**Abbildung 3.22: Phosphorylierung von NAD<sup>+</sup>.** Diese Reaktion kann von einer NADH-Kinase (z. B. Utr1p) katalysiert werden und findet hauptsächlich im Cytosol statt.

Für die Aktivität sind zweiwertige Metallionen essentiell. Bezogen auf Mg<sup>2+</sup> steigt die Aktivität mit Zn<sup>2+</sup> und Mn<sup>2+</sup>, mit Ca<sup>2+</sup> sinkt sie. Die Phosphorylierung wird neben NADH und NADP<sup>+</sup> am effektivsten durch NADPH inhibiert. Möglicherweise ist die NAD<sup>+</sup>-Kinase auch in die Regelung des Ferrireduktase-Systems eingebunden (Kawai *et al.*, 2001).

Obwohl Utr1p im Cytosol aktiv ist (Lesuisse *et al.*, 1996; Bieganowski *et al.*, 2006), konnte die intrazelluläre Verteilung nicht geklärt werden (Shi *et al.*, 2005; Li und Shi, 2006). In einer anderen Untersuchung wurden der Zellkern und das Cytosol als Aufenthaltsort der NADH-Kinase Utr1p bestimmt (Huh *et al.*, 2003).

Utr1p wird in Verbindung mit dem Wachstum in eisenarmem Medium gebracht (Shi *et al.*, 2005). Utr1p kann zum Wachstum unter anaeroben Bedingungen beitragen und vor Schädigungen durch höhere Umgebungstemperatur zu schützen (Li und Shi, 2006).

Ein Mangel an cytosolischem NADPH, das in erster Linie durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*ZWF1*) bereitgestellt wird, kann zu einer Methionin-Auxotrophie führen (Outten und Culotta, 2003).

In einem *UTR1*-defekten Stamm konnten keine Einschränkung der Physiologie beobachtet werden (Barry *et al.*, 1987). Auch konnten keine weiteren physiologischen Funktionen von Utr1p ermittelt werden (Shianna *et al.*, 2006).

### Cytosolische NADH-Kinase Yef1p

Das Protein Yel041wp wird in Yef1p umbenannt. Das Gen *YEF1* codiert ein Protein, das aus 496 Aminosäuren aufgebaut ist. Daraus errechnet sich eine Molmasse von 55,9 kDa (Shi *et al.*, 2005). Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen zwischen Yef1p und Utr1p ist größer als zwischen Yef1p und Pos5p (Bieganowski *et al.*, 2006). Für das rekombinant exprimierte und gereinigte Protein wurde mittels SDS-PAGE eine Molmasse von 60 kDa bestimmt. Da mittels Gelfiltration eine Molmasse von ca. 480 kDa bestimmt wurde, ist dieses Multimer aus acht identischen Yef1p-Untereinheiten aufgebaut (Shi *et al.*, 2005).

Yef1p zeigt NADH-Kinase-Aktivität, dh. es kann sowohl  $\text{NAD}^+$  als auch NADH umgesetzt werden (Shi *et al.*, 2005). Anorganische (Poly)Phosphate und phosphorylierte Metabolite (z. B. Phosphoenolpyruvat) können ATP als Phosphatgruppendonor nicht ersetzen. Andere Nucleosidtriphosphate können an der Reaktion teilnehmen, führen jedoch zu einer reduzierten Aktivität. Für dATP wurden 91 %, für CTP 43 %, für UTP 14 %, für GTP 13 % und für TTP 6 % der Aktivität mit ATP gemessen (Shi *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse können bestätigt werden (Bieganowski *et al.*, 2006). Für  $\text{NAD}^+$  wurde ein  $K_m$  von 1,9 mM bestimmt, für ATP 0,17 mM. Für das Substrat NADH wurde ein  $K_m$  von 2,0 mM bestimmt (Shi *et al.*, 2005). Die Aktivität ist mit NADH um den Faktor drei niedriger als mit  $\text{NAD}^+$  (Bieganowski *et al.*, 2006). Die Kinase Yef1p bevorzugt  $\text{NAD}^+$  als Phosphatgruppenakzeptor (Bieganowski *et al.*, 2006; Li und Shi, 2006) und zeigt (im Vergleich zu Utr1p) nur eine geringe Aktivität (Bieganowski *et al.*, 2006). Zur Phosphorylierung von  $\text{NAD}^+$  sind zweiwertige Metallionen erforderlich. Die Aktivität

sinkt von  $Mg^{2+}$  über  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  zu  $Ca^{2+}$ . Mit anderen zweiwertigen Metallionen wie  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  oder  $Zn^{2+}$  sowie mit den einwertigen Metallionen Natrium und  $Li^+$  fand keine katalytische Reaktion statt. Das Enzym wurde weder durch Zwischenstufen der Biosynthese (Qa, Na, NaMN, NaAD) oder  $NADP^+$  inhibiert, eine leichte Inhibierung bewirkten NADH und NADPH. Regulationsmechanismen konnten nicht gefunden werden (Shi *et al.*, 2005). Die Reaktion der NADH-Kinase Yef1p entspricht der von Utr1p und kann Abbildung 3.22 entnommen werden.

Die Lokalisierung von Yef1p wurde untersucht, konnte aber nicht geklärt werden (Shi *et al.*, 2005; Li und Shi, 2006). Diese Beobachtungen deuten auf eine geringe Expression dieser Kinase hin (Li und Shi, 2006). Die *in vivo* Aktivität von Yef1p ist fraglich. Auf jeden Fall reicht sie nicht aus, um einen Ausfall von Pos5p und Utr1p zu kompensieren. Eine funktionale NADH-Kinase ist überlebensnotwendig (Shianna *et al.*, 2006). Eine Lokalisierung in den Mitochondrien wird als unwahrscheinlich betrachtet (Shi *et al.*, 2005). Yef1p ist ein cytosolisches Enzym (Bieganowski *et al.*, 2006).

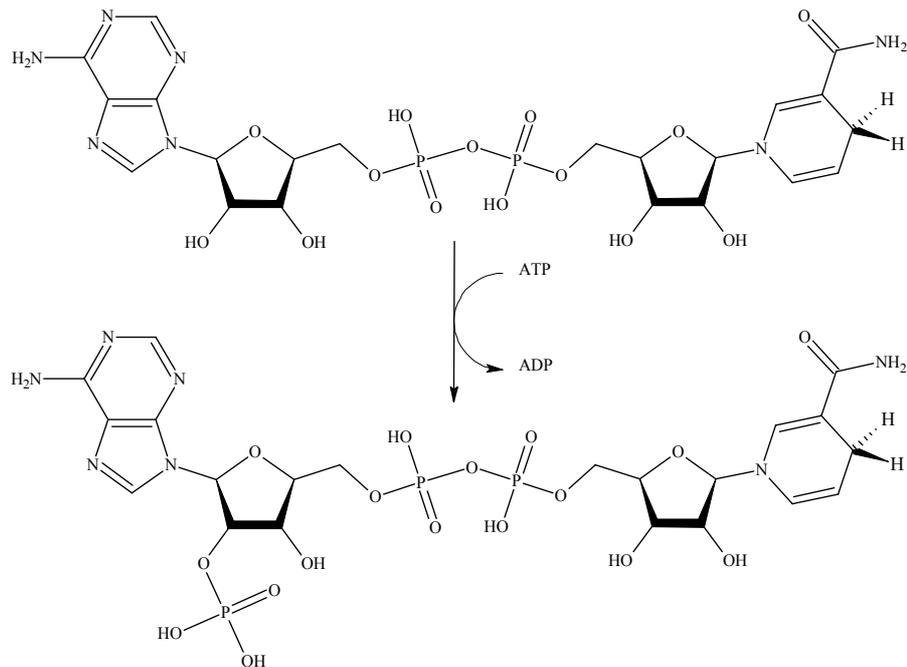
Obwohl *YEF1* eine aktive NADH-Kinase kodiert (Shi *et al.*, 2005), kann Yef1p keine physiologische Funktion zugeordnet werden (Shianna *et al.*, 2006). Möglicherweise kann Yef1p dazu beitragen, die Zelle teilweise vor Schädigungen durch höhere Umgebungstemperatur und vor Fehlfunktionen der Mitochondrien zu schützen (Li und Shi, 2006).

### Mitochondriale NADH-Kinase Pos5p

Bei der Suche nach Genen, die an der Abwehr von oxidativem Stress beteiligt sind, wurde u. a. *POS5* (von: ‚peroxide sensitivity‘) identifiziert (Krems *et al.*, 1995). In *Saccharomyces cerevisiae* kodiert *POS5* eine NADH-Kinase (Outten und Culotta, 2003), die in den Mitochondrien zu finden ist (Outten und Culotta, 2003; Strand *et al.*, 2003; Huh *et al.*, 2003). Aus der Aminosäuresequenz berechnet sich eine Molmasse von 46,3 kDa (Outten und Culotta, 2003). Die ersten 17 Aminosäuren am N-terminalen Ende könnten eine Zielsequenz darstellen, die den Transport über die mitochondriale Membran ermöglicht (Strand *et al.*, 2003). Dabei könnte es sich um die Kinase handeln, die Iwahashi

*et al.* (1989) beschrieben haben (Strand *et al.*, 2003). Die Aminosäuresequenz von Pos5p zeigt deutliche Ähnlichkeiten mit der von Utr1p (Lesuisse *et al.*, 1996).

Die Biosynthese von NADPH ist in Abbildung 3.23 wiedergegeben.



**Abbildung 3.23: Biosynthese von NADPH durch Phosphorylierung von NADH. Diese Reaktion wird von der NADH-Kinase Pos5p durchgeführt und findet ausschließlich in den Mitochondrien statt.**

Das rekombinant exprimierte Protein zeigt mit ATP als Phosphatdonor eine 50-fach höhere Affinität zu NADH als zu  $\text{NAD}^+$ . Die Aktivität lag bei  $6 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{g}^{-1}$  Pos5p (Outten und Culotta, 2003). Dagegen beschreiben Strand *et al.* (2003), dass NADH zweimal so effektiv ist wie  $\text{NAD}^+$  und eine spezifische Aktivität von mehr als  $300 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  Pos5p erreicht wird. Die Unterschiede werden darauf zurückgeführt, dass Outten und Culotta (2003) vor der rekombinanten Expression die Zielsequenz nicht entfernt haben. Die resultierende pre-Pos5p-Kinase zeigte eine niedrigere Aktivität als die native Pos5p-Kinase. Weitere Unterschiede können in der Versuchsanalytik liegen (Strand *et al.*, 2003). Es bleibt festzuhalten, dass NADH das favorisierte Substrat ist (Outten und Culotta, 2003; Strand *et al.*, 2003). Pos5p ist in den Mitochondrien die bedeutendste NADH-Kinase (Outten und Culotta, 2003).

Ein Mangel an mitochondrialem NADPH, das in erster Linie durch Pos5p bereitgestellt wird, kann zu einer Arginin-Auxotrophie führen (Outten und Culotta, 2003).

Pos5p ist an der Abwehr von oxidativem Stress und damit an der Funktionsgewährung der Atmungskette beteiligt (Outten und Culotta, 2003; Strand *et al.*, 2003). Möglicherweise fungiert Pos5p als Sauerstoffsensor in der Zelle (Shianna *et al.*, 2006). Pos5p wird in Verbindung mit der Abwehr von Schädigungen durch erhöhte Umgebungstemperatur (Shi *et al.*, 2005) sowie durch Hyperosmolarität gebracht (Krems *et al.*, 1995).

### 3.2.8 Zusammenfassende Betrachtung und Kompartimentierung der NAD(P)<sup>+</sup>/H-Biosynthese in *Saccharomyces cerevisiae*

Als abschließende Betrachtung der Biosynthese von NAD(P)<sup>+</sup>/H in *Saccharomyces cerevisiae* soll in den folgenden Abbildungen ein Gesamtüberblick gegeben werden. Dabei wird einerseits in Abbildung 3.24 das Synthesenetzwerk in Strukturformeln dargestellt und andererseits in Abbildung 3.25 auf die Kompartimentierung der Biosynthese eingegangen. Ausführliche Informationen zu den Graphiken können den in Tabelle 3.2 dargestellten Kapiteln in dieser Arbeit und den in Tabelle 3.3 zusammengefassten Quellen entnommen werden.

Abbildung 3.24 gibt einen Überblick über das Netzwerk der NAD(P)<sup>+</sup>/H-Biosynthese in *Saccharomyces cerevisiae*. Weiterführende Informationen und Erklärungen können Tabelle 3.2 entnommen werden.

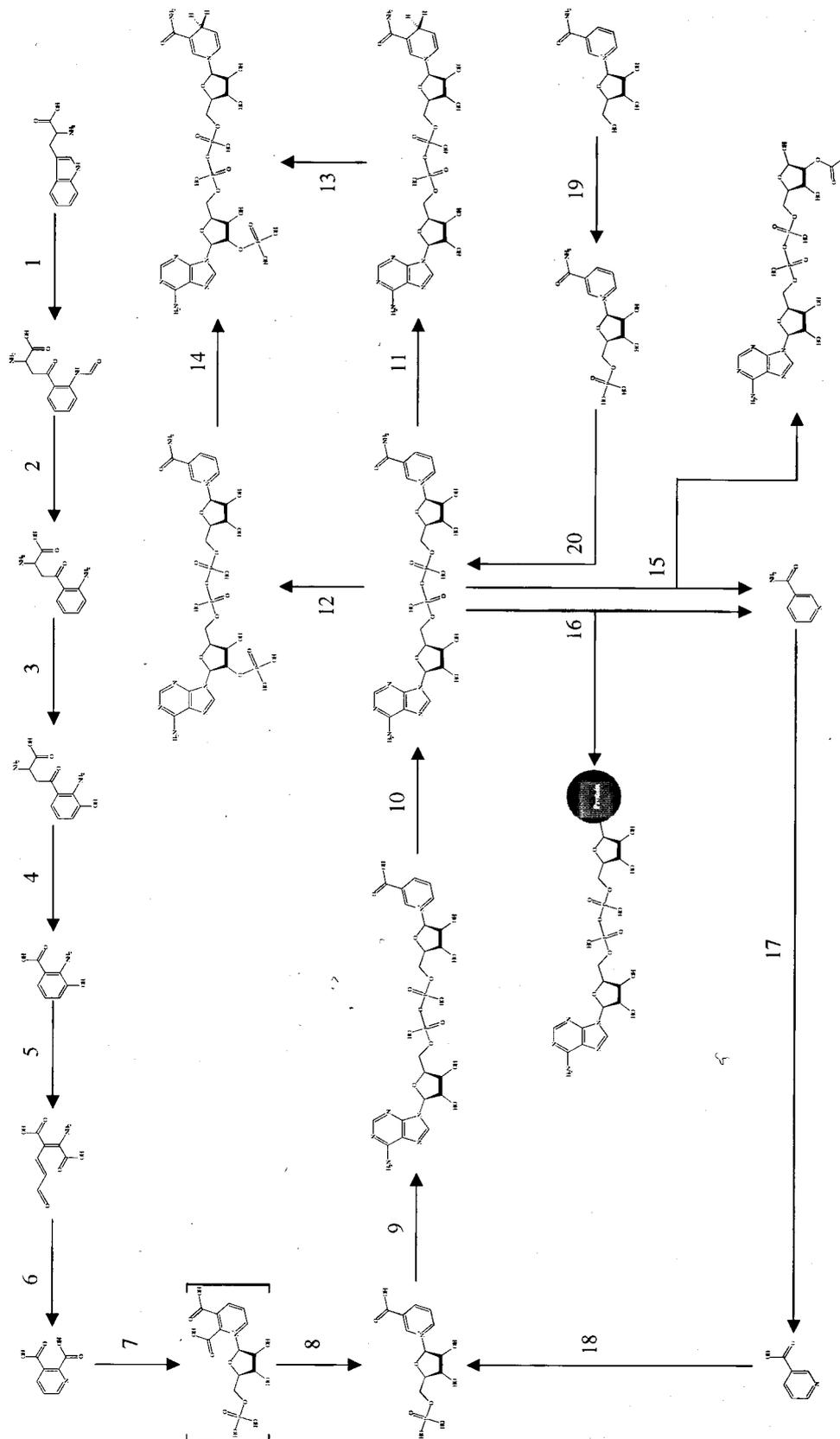


Abbildung 3.24: Übersicht über das NAD(P)<sup>+</sup>/H-Biosynthesenetzwerk in *Saccharomyces cerevisiae* in Strukturformeln. Weiterführende Informationen zu den einzelnen Reaktionsschritten sowie zu den beteiligten Enzymen können Tabelle 3.2 entnommen werden.

**Tabelle 3.2: Erläuterungen zu Abbildung 3.24. Ausführliche Informationen zu den einzelnen Enzymen und Syntheseschritten können den angegebenen Kapiteln und den darin genannten Quellen entnommen werden. Bez.: Bezeichnung.**

| Schritt | Enzym  | Bez.    | Reaktion                | Kapitel |
|---------|--|---------|-------------------------|---------|
| 1       | L-Tryprophan-2,3-Dioxygenase                   | Bna2p   | Ringöffnung             | 3.2.3   |
| 2       | N-Formyl-L-Kynureninformamidase                | Bna3p   | Seitenkettenverkürzung  | 3.2.3   |
| 3       | L-Kynurenin-3-Monooxygenase                    | Bna4p   | Hydroxylierung          | 3.2.3   |
| 4       | 3-Hydroxy-Kynureninase                         | Bna5p   | Seitenkettenverkürzung  | 3.2.3   |
| 5       | 3-Hydroxy-Anthranilat-3,4-Dioxygenase          | Bna1p   | Ringöffnung             | 3.2.3   |
| 6       |  |         | spontate Zyklisierung   | 3.2.3   |
| 7       | Chinolinsäure-Phosphoribosyl-Transferase       | Bna6p   | Nucleotidbildung        | 3.2.3   |
| 8       | Chinolinsäure-Phosphoribosyl-Transferase       | Bna6p   | Decarboxylierung        | 3.2.3   |
| 9       | NaMN/NMN-Adenylyl-Transferase                  | Nma1/2p | Dinucleotidbildung      | 3.2.2   |
| 10      | NAD <sup>+</sup> -Synthetase                   | Qns1p   | Amidierung              | 3.2.2   |
| 11      | Dehydrogenase                                  |         | Reduktion               |         |
| 12      | cytosolische NADH-Kinase                       | Utr1p   | Phosphorylierung        | 3.2.7   |
| 13      | mitochondriale NADH-Kinase                     | Pos5p   | Phosphorylierung        | 3.2.7   |
| 14      | Dehydrogenase                                  |         | Reduktion               |         |
| 15      | NAD <sup>+</sup> -abhängige Protein-Decatylase | Hst1p   | Bildung von Nicotinamid | 3.2.6   |
| 16      | Mono-(ADP-Ribosyl)-Transferase                 | Sir2p   | Bildung von Nicotinamid | 3.2.6   |
| 17      | Nicotinamid-Deamidase                          | Pnc1p   | Deamidierung            | 3.2.4   |
| 18      | Nicotinsäure-Phosphoribosyl-Transferase        | Npt1p   | Nucleotidbildung        | 3.2.2   |
| 19      | Nicotinamidribose-Kinase                       | Nrk1p   | Nucleotidbildung        | 3.2.4   |
| 20      | NaMN/NMN-Adenylyl-Transferase                  | Nma1/2p | Dinucleotidbildung      | 3.2.2   |

Die Kompartimentierung der Biosynthese von NAD(P)<sup>+</sup>/H in *Saccharomyces cerevisiae* ist in Abbildung 3.25 zusammengefasst. Weiterführende Informationen können den in Tabelle 3.3 zusammengefassten Quellen sowie den in Tabelle 3.2 dargestellten Kapitel dieser Schrift entnommen werden.

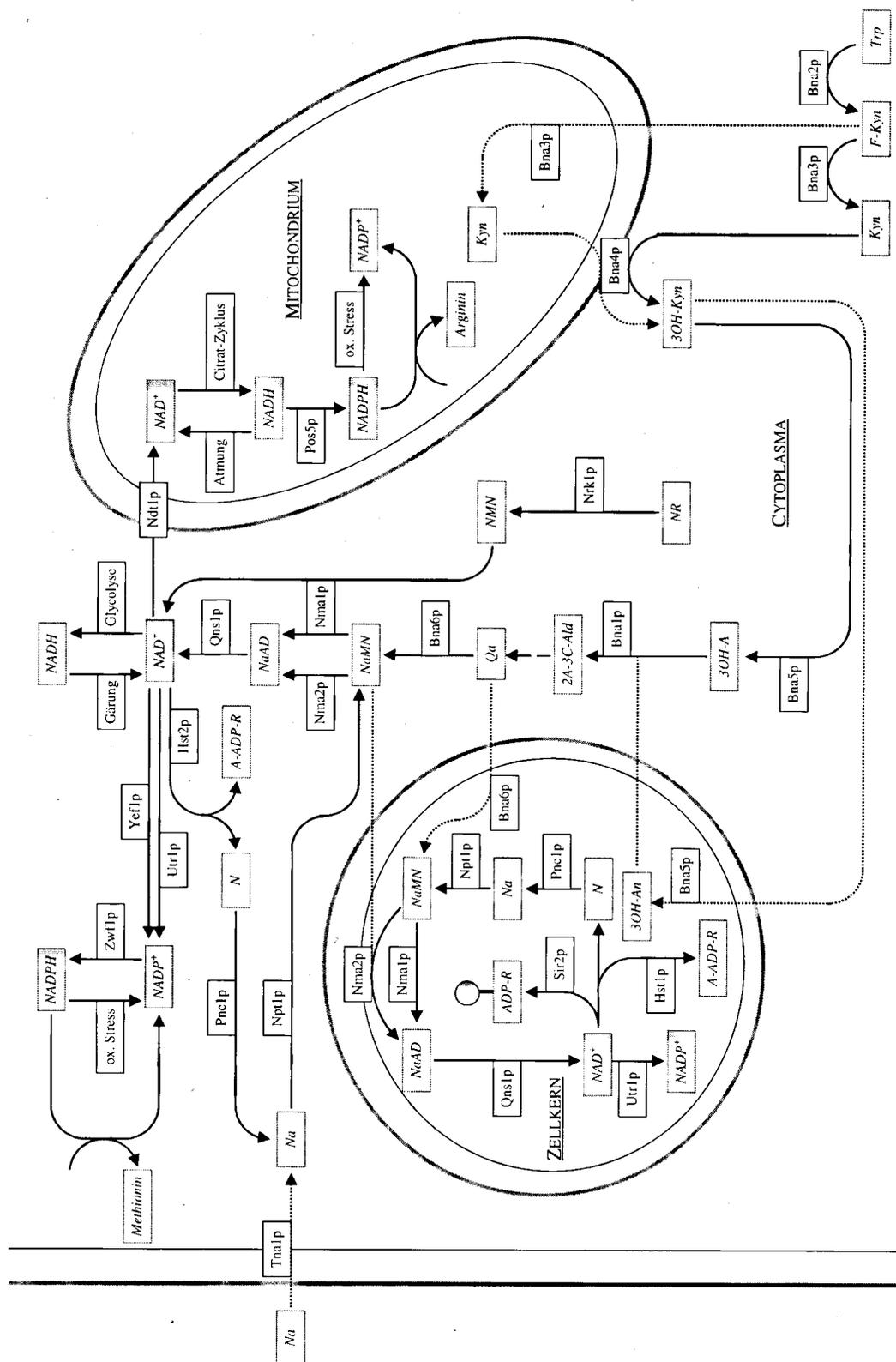


Abbildung 3.25: Schematische Darstellung der Kompartimentierung der Biosynthese von NAD(P)<sup>+</sup>/H in *Saccharomyces cerevisiae*. Weiterführende Informationen zur Lokalisierung der beteiligten Enzyme sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Informationen zu den Reaktionsschritten können Tabelle 3.2 und Abbildung 3.24 entnommen werden.

Tabelle 3.3: Erläuterungen zu Abbildung 3.25. Ausführliche Informationen zur Lokalisierung der beteiligten Enzyme sind hier aufgelistet. Informationen zu den einzelnen Enzymen und Syntheseschritten können den angegebenen Kapiteln und den darin genannten Quellen in Tabelle 3.2 entnommen werden.

| Bezeichnung | Enzym                                    | Quelle   | Lokalisierung                            |
|-------------|--|--|--|
| Bna2p       | L-Tryptophan-2,3-Dioxygenase             |  |  |
| Bna3p       | N-Formyl-L-Kynureninformamidase          | Huh <i>et al.</i> , 2003                                 | Cytosol, Mitochondrien                   |
| Bna4p       | L-Kynurenin-3-Monooxygenase              | Schott und Staudinger, 1971                              | Mitochondrien                            |
|             |  | Bandlow, 1972  | in der äußeren Membran der Mitochondrien |
| Bna5p       | 3-Hydroxy-Kynureninase                   | Huh <i>et al.</i> , 2003                                 | Cytosol, Zellkern                        |
| Bna1p       | 3-Hydroxy-Anthranilat-3,4-Dioxygenase    | Sandmeier <i>et al.</i> , 2002                           | überall, hauptsächlich im Cytosol        |
| Bna6p       | Chinolinsäure-Phosphoribosyl-Transferase | Huh <i>et al.</i> , 2003                                 | Cytosol, Zellkern                        |
| Nma1p       | NaMN/NMN-Adenylyl-Transferase            | Huh <i>et al.</i> , 2003                                 | Cytosol, Zellkern                        |
| Nma2p       | NaMN/NMN-Adenylyl-Transferase            | Anderson <i>et al.</i> , 2002                            | Zellkern                                 |
|             |  | Emanuelli <i>et al.</i> , 2003                           | an der inneren Zellkernmembran           |
|             |  | Huh <i>et al.</i> , 2003                                 | Cytosol, Zellkern                        |
| Qns1p       | NAD-Synthetase                           | Huh <i>et al.</i> , 2003; Suda <i>et al.</i> , 2003      | Cytosol, Zellkern                        |
| Utr1p       | NADH-Kinase                              | Huh <i>et al.</i> , 2003                                 | Cytosol, Zellkern                        |
| Yef1p       | NADH-Kinase                              | Bieganowski <i>et al.</i> , 2006                         | Cytosol                                  |
| Ndt1p       | NAD <sup>+</sup> -Transporter            | Bieganowski <i>et al.</i> , 2006                         | Cytosol                                  |
| Pos5p       | NADH-Kinase                              | Todisco <i>et al.</i> , 2006                             | Mitochondrien                            |
|             |  | Outten und Culotta <i>et al.</i> , 2003                  | Mitochondrien                            |
| Hst1p       | NAD-abhängige Protein-Decarboxylase      | Strand <i>et al.</i> , 2003                              | Mitochondrien                            |
|             |  | Bedalov <i>et al.</i> , 2003                             | Zellkern                                 |
| Hst2p       | NAD-abhängige Protein-Decarboxylase      | Huh <i>et al.</i> , 2003                                 | Cytosol, Zellkern                        |
|             |  | Smith <i>et al.</i> , 2000; Bedalov <i>et al.</i> , 2003 | Cytosol                                  |

**Tabelle 3.3 (Fortsetzung): Erläuterungen zu Abbildung 3.25. Ausführliche Informationen zur Lokalisierung der beteiligten Enzyme sind hier aufgelistet. Informationen zu den einzelnen Enzymen und Syntheseschritten können den angegebenen Kapiteln und den darin genannten Quellen in Tabelle 3.2 entnommen werden.**

|       |  |   |   |
|-------|--|---|---|
| Sir2p | Mono-(ADP-Ribosyl)-Transferase;<br>NAD-abhängige Protein-Decarboxylase | Smith <i>et al.</i> , 2000; Bedalov <i>et al.</i> , 2003<br>Huh <i>et al.</i> , 2003  | Zellkern<br>in der Peripherie des Zellkern              |
| Pnc1p | Nicotinamid-Deamidase  | Huh <i>et al.</i> , 2003  | Peroxisomen   |
| Npt1p | Nicotinsäure-Phosphoribosyl-Transferase                                | Anderson <i>et al.</i> , 2003<br>Huh <i>et al.</i> , 2003                             | Peroxisomen, Zellkern, Cytosol<br>Zellkern, Cytosol     |
| Nrk1p | Nicotinamidribose-Kinase   | Anderson <i>et al.</i> , 2002   | Zellkern  |
| Tna1p | Nicotinsäure-Transporter   | Huh <i>et al.</i> , 2003<br>Huh <i>et al.</i> , 2003<br>Sickmann <i>et al.</i> , 2003 | Cytosol<br>endoplasmatisches Reticulum<br>Mitochondrien |

Qns1p

NMN



Enzym bzw. enzymkatalysierte Reaktion

Metabolit

Protein

intrazellulärer Stofffluss

möglicher Stofffluss

*Trp*: Tryptophan. *F-Kyn*: N-Formyl-L-Kynurenin. *Kyn*: L-Kynurenin. *3OH-Kyn*: 3-Hydroxy-Kynurenin. *3OH-A*: 3-Hydroxy-Anthranilat. *2A-3C-Ald*: 2-Amino-3-Carboxy-Muconatsemialdehyd. *Qa*: Chinolinsäure. *NaMN*: Nicotinsäuremononucleotid. *NaAD*: Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid. *NAD*: Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid. *NADH*: reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid. *NADP*: Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat. *A-ADP-R*: Acetyl-ADP-reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat. *A-ADP-R*: Acetyl-ADP-Ribose. *N*: Nicotinamid. *Na*: Nicotinsäure. *ADP-R*: ADP-Ribose. *NR*: Nicotinamidribose. *NMN*: Nicotinamidmononucleotid.

### 3.2.9 Physiologische Zusammenhänge und Regulationsmechanismen

In den vorangegangenen Kapiteln sind zu den einzelnen Enzymen schon Mechanismen der Regulation angesprochen worden. Im Folgenden sollen Mechanismen zur Bewältigung ungünstiger Umweltbedingungen aufgezeigt werden, die in (in)direktem Zusammenhang mit der intrazellulären  $\text{NAD(P)}^+/\text{H}$ -Konzentration stehen und einen Einblick in die komplexe Regulation der Biosynthese sowie in physiologische Zusammenhänge geben können. Dabei ist die Abwehr von oxidativem Stress mit NADPH verknüpft. Mechanismen, in die  $\text{NAD}^+$  eingebunden ist, können zur Verlängerung der Replikationsdauer führen. Abschließend werden noch weitere Zusammenhänge angesprochen. Die in diesem Kapitel dargestellten Zusammenhänge sind schematisch in Abbildung 3.26 zusammengefasst. Kurze Erklärungen sind Tabelle 3.4 zu entnehmen.

Die Zelle reagiert aktiv auf Umwelteinflüsse wie beispielsweise Nährstofflimitierung oder moderaten Stress, indem Gene entsprechend reguliert werden. Die makroskopische Folge kann die Verlängerung des Replikationszyklus und damit Erhöhung der Lebensdauer sein (Anderson *et al.*, 2003). Diese Umwelteinflüsse bedeuten Stress für die Zelle, der u. a. durch Hyperosmolarität, erhöhte Temperatur, ROS (oxidativer Stress), Metallionen oder Nährstoffmangel verursacht werden kann.

Bei vielen Mechanismen der STRESSABWEHR kommt den NADH-Kinasen eine besondere Bedeutung zu.

Die cytosolische NADH-Kinase Utr1p wird in Verbindung mit dem Wachstum in eisenarmem Medium gebracht (Shi *et al.*, 2005), kann der Zelle teilweise fermentatives Wachstum ermöglichen und diese vor Schädigungen durch höhere Umgebungstemperatur schützen (Li und Shi, 2006). Die Phosphorylierung wird neben NADH und NADP am effektivsten durch NADPH inhibiert. Möglicherweise ist Utr1p auch in die Regelung des Ferrireduktase-Systems eingebunden (Kawai *et al.*, 2001).

Obwohl *YEF1* eine aktive NADH-Kinase kodiert (Shi *et al.*, 2005), kann Yef1p keine physiologische Funktion zugeordnet werden. Eine Deletion führt zu keinen auffälligen Änderungen in den Expressionsraten anderer Gene im Vergleich zu einem Wildtyp (Shianna *et al.*, 2006). Möglicherweise kann Yef1p dazu beitragen, die Zelle teilweise vor

Schädigungen durch höhere Umgebungstemperatur und vor Fehlfunktionen der Mitochondrien zu schützen (Li und Shi, 2006). Da die Aktivität von Utr1p durch NADH, NADP und NADPH inhibiert wird (Kawai *et al.*, 2001), diese Metabolite jedoch so gut wie keinen Einfluß auf Yef1p haben, wird von verschiedenen Regelungsmechanismen für Utr1p und Yef1p ausgegangen (Shi *et al.*, 2005). Obwohl Yef1p und Utr1p vergleichbare Aktivitäten mit NADH als Substrat zeigen, ist die Aktivität von Utr1p mit  $\text{NAD}^+$  16 mal höher als die von Yef1p. Daraus ist zu schließen, dass Yef1p nur einen geringen Beitrag zu der *in vivo* Versorgung mit  $\text{NAD}^+$  und NADH leistet (Bieganowski *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zu den anderen NADH-Kinasen in *Saccharomyces cerevisiae* ist nur Pos5p durch Bereitstellung von NADPH an der Abwehr von oxidativem Stress in den Mitochondrien (Outten und Culotta, 2003) u. a. durch den Schutz der Proteine vor Oxidation (Strand *et al.*, 2003) und damit an der Funktionsgewährung der Atmungskette beteiligt. Keine andere Quelle für reduziertes  $\text{NADP}^+$  kann diese Funktion ersetzen (Outten und Culotta, 2003). Möglicherweise fungiert Pos5p als Sauerstoffsensor in der Zelle (Shianna *et al.*, 2006) und scheint ein Schalter in der Abwehr von oxidativem Stress sowie von Vergiftung durch Metallionen zu sein. Bei der Inkubation in  $\text{Cu}^{2+}$ -haltigem Medium kann die Transkription von *POS5* um den Faktor 3,4 ansteigen (Strand *et al.*, 2003). Pos5p wird auch in Verbindung mit der Abwehr von Schädigungen durch erhöhte Umgebungstemperatur gebracht (Shi *et al.*, 2005). Die ersten 17 Aminosäuren am N-terminalen Ende könnten eine Erkennungssequenz für den Transport über die mitochondriale Membran darstellen (Strand *et al.*, 2003).

Weitere Einblicke in die physiologische Rolle von Pos5p konnten durch die Deletion des *POS5*-Gens gewonnen werden. Diese führt zu einer erheblichen Änderung der Genexpression verglichen mit dem Wildtyp. Es wurden 369 Gene identifiziert, die einer mehr als zweifachen Änderung der Expressionsrate unterlagen.  $\Delta\text{pos5}$  führt zu einer Erhöhung der Expressionsraten der Gene für den Eisentransport und führt zu Änderungen in der Synthese der FeS-Cluster. Die Veränderung führt auch zu einer Veränderung der Struktur der Zellwand. Gene, die bei einem aeroben Wachstum aktiv sind, werden runterreguliert und im Gegenzug dazu werden Gene, die bei anaerobem Wachstum aktiv sind, raufreguliert. Ohne Pos5p scheint die Zelle von einem aeroben Zustand in einen anaeroben Zustand zu wechseln. Zusätzlich wurden Gene, die Enzyme der Elektronentransportkette sowie Enzyme zur Abwehr von oxidativem Stress kodieren, in

ihrer Expression herunterregelt. Letztere können zu mehr Sauerstoffradikalen führen und somit zu einer verstärkten Schädigung der Mitochondrien (Shianna *et al.*, 2006).

Es gibt keinen Hinweis auf eine Interaktion von Calmodulin und einer NAD(H)-Kinase (weder Utr1p, Pos5p noch Yef1p). Die Regelung einer NADH-Kinase-Aktivität scheint nicht in Zusammenhang mit Calmodulin zu stehen (Zelter *et al.*, 2004).

Ein Mangel an cytosolischem NADPH, das in erster Linie aus der Reduktion von  $\text{NADP}^+$  durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*ZWF1*) bereitgestellt wird, kann zu einer Methionin-Auxotrophie führen. Ein Mangel an mitochondrialem NADPH, das in erster Linie aus der Phosphorylierung von NADH durch Pos5p bereitgestellt wird, kann zu einer Arginin-Auxotrophie führen (Outten und Culotta, 2003). Daraus kann man folgern, dass die Bereitstellung von NADPH in den Mitochondrien und im Cytosol auf voneinander getrennten Wegen läuft (Outten und Culotta, 2003; Bieganowski *et al.*, 2006; Li und Shi, 2006). Zwischen dem Cytosol inklusive Zellkern und Mitochondrien erfolgt kein Austausch von  $\text{NADP}^+$  oder NADPH (Bieganowski *et al.*, 2006).

Daher haben sich in den Mitochondrien vom Cytosol unabhängige Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress entwickelt. Das Reduktionsmittel wird am Einsatzort synthetisiert: Die NADH-Kinase Pos5p phosphoryliert in den Mitochondrien NADH, das zuvor im Zitronensäurezyklus gebildet wurde. Da der Beitrag der anderen beiden Kinasen zur  $\text{NADP}^+$ - oder NADPH-Synthese in den Mitochondrien gering ist, ist hier Pos5p wohl die bedeutendste NADH-Kinase. Zur Abwehr des oxidativen Stress wird NADPH von entsprechenden Enzymen oxidiert, das entstandene  $\text{NADP}^+$  könnte über eine  $\text{NADP}^+$ -Phosphatase in Form von  $\text{NAD}^+$  der Reduktion im Zitronensäurezyklus wieder zu Verfügung gestellt werden (Outten und Culotta, 2003). Durch eine mögliche  $\text{NADP}^+$ -Phosphatase-Aktivität (Bernofsky und Utter, 1968) wäre der Kreislauf geschlossen. Möglicherweise bevorzugt Pos5p NADH als Substrat aufgrund der Verfügbarkeit unter der Annahme, dass in den Mitochondrien (Outten und Culotta, 2003) wie in den Zellen ungefähr die Hälfte des  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Pools in reduzierter Form vorliegt und der  $\text{NADP}^+/\text{H}$ -Pool um mehr als den Faktor zehn geringer ist (Ting *et al.*, 1977). In den Mitochondrien wurde für  $\text{NAD}^+/\text{H}$  eine Konzentration von  $2,71 \pm 0,61 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ mt-Protein}$  und für  $\text{NADP}^+/\text{H}$  eine Konzentration von  $0,43 \pm 0,18 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ mt-Protein}$  bestimmt. Diese

(niedrige)  $\text{NADP}^+/\text{H}$ -Konzentration könnte für bestimmte Reaktionen schon geschwindigkeitsbestimmend sein (Bernofsky und Utter, 1968).

Im Cytosol dagegen könnte eine  $\text{NAD}^+$ -Kinase die Phosphorylierung übernehmen, die Reduktion erfolgt im Pentosephosphatweg. Zur Abwehr des oxidativen Stress wird  $\text{NADPH}$  von entsprechenden Enzymen oxidiert, das entstandene  $\text{NADP}^+$  kann im Pentosephosphatweg wieder reduziert werden (Outten und Culotta, 2003).

Bei Funktionsstörungen einer der Kinasen Utr1p oder Pos5p wird die andere überlebenswichtig (Bieganowski *et al.*, 2006). Funktionsstörungen von Utr1p in Verbindung mit dem Wachstum in Eisen-armem Medium können teilweise durch die beiden anderen Kinasen Pos5p und Yef1p übernommen werden (Shi *et al.*, 2005). Es wird angenommen, dass Pos5p auf dem Weg in die Mitochondrien oder schon davor im Cytosol Aktivität zeigt und so teilweise die Funktion von Utr1p übernimmt (Bieganowski *et al.*, 2006).

Unter bestimmten Bedingungen kann Utr1p mit Yef1p zum Erhalt der mitochondrialen Funktion beitragen (Shi *et al.*, 2005), obwohl nur eine geringe Expression beider Kinasen angenommen wird (Li und Shi, 2006). Dieser Fall tritt aber nur auf, wenn keine Pos5p-Aktivität vorhanden ist (Shi *et al.*, 2005). Möglicherweise kann cytosolisches  $\text{NADPH}$  (Shi *et al.*, 2005) oder  $\text{NADP}^+$  (Li und Shi, 2006) über ein noch unbekanntes Transporterprotein, welches sich in der inneren Mitochondrienmembran befindet, eingeschleust werden (Shi *et al.*, 2005; Li und Shi, 2006). Funktionseinbußen von Pos5p hinsichtlich Temperaturstress könnten von Utr1p und Yef1p abgefangen werden (Shi *et al.*, 2005; Li und Shi, 2006), wobei Yef1p effektiver zu sein scheint als Utr1p (Li und Shi, 2006).

$\text{NAD}^+$ -abhängige Enzymaktivitäten können zu posttranslatorischen Proteinmodifikationen sowie zu einer VERLÄNGERUNG DER LEBENSDAUER führen.

Sir2p hat eine Mono-(ADP-Ribosyl)ierungs-Aktivität. Die physiologische Bedeutung der Modifizierung von Proteinen ist das Stilllegen von Genen. *In vitro* kann Sir2p sich selbst und Histone durch Übertragung einer ADP-Ribose-Einheit von  $\text{NAD}^+$  modifizieren. Die Automodifizierung wurde auch *in vivo* festgestellt. Welche Rolle der Selbstmodifikation *in vivo* zukommt und ob Histone *in vivo* Akzeptorproteine darstellen, muß noch erarbeitet

werden (Tanny *et al.*, 1999). Möglicherweise wurde eine NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase in Mono-/Poly-(ADP-Ribosyl)iertem Zustand beschrieben (Ruggieri *et al.*, 1988) gemäß der Annahme, dass ADP-Ribose in der Zellregulierung auftritt (Yan und Sloan, 1987).

*In vitro* zeigt Sir2p eine NAD<sup>+</sup>-abhängige Histon-Deacetylierungs-(HDA)-Aktivität (Smith *et al.*, 2000), die Mechanismen zur Erhöhung der Lebensdauer übertragen kann. Bei diesen Prozessen kommt es allerdings nicht zu einer Erhöhung der NAD<sup>+</sup>-Konzentration oder zu einer Verschiebung des Redoxzustands (Anderson *et al.*, 2002). Dabei müssen Histone *in vivo* nicht zwangsläufig das Ziel der HDA-Aktivität der Sirtuine in Hefe sein, möglicherweise gibt es noch andere Akzeptorproteine neben den Histonen (Smith *et al.*, 2000). Wie von Tanny *et al.* (1999) gezeigt, besitzt Sir2p auch eine Mono (ADP-Ribosyl)-Transferase-Aktivität. Diese ist jedoch unspezifisch und nur schwach ausgeprägt. Die beiden Aktivitäten können zumindest teilweise voneinander unterschieden werden (Smith *et al.*, 2000). Ein zu Sir2p homologes Protein, Hst1p, zeigt eine NAD<sup>+</sup>-abhängige Deacetylase-Aktivität. Hst1p fungiert als zellulärer Sensor der NAD<sup>+</sup>-Konzentration (Bedalov *et al.*, 2003).

Da durch NAD<sup>+</sup>-abhängige Histondeacetylasen, (ADP-Ribosyl)-Transferasen und andere NAD<sup>+</sup>-abbauende Enzyme NAD<sup>+</sup> verbraucht wird und dabei Nicotinamid entsteht, ist anzunehmen, dass ein Kreislauf erforderlich ist, um die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>-Konzentration zu halten. Diese Aufgabe wird von *NPT1* übernommen. Aufgrund von Homologien zwischen *orfs* im Bakterien- und im Hefegenom wird ein Schema für die Funktion und Position der einzelnen Enzyme für die Hefe vorgeschlagen (Smith *et al.*, 2000). Die Schwankungen in der NAD<sup>+</sup>-Konzentration scheinen die gesamten Zellabläufe zu beeinflussen (Ruggieri *et al.*, 1988). Dabei ist auffällig, dass die allgemeine Physiologie (u. a. das Zellwachstum) mit geringeren NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen noch aufrechterhalten werden kann (Smith *et al.*, 2000), bei denen die Stilllegung von Genen schon negativ beeinträchtigt ist (Tanny *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000). Da einerseits Sir2p NAD<sup>+</sup> abbaut, sich aber andererseits die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>-Konzentration nicht ändert, könnte der Fluss durch den NAD<sup>+</sup>-Biosyntheseweg ausgehend von Nicotinamid erhöht sein (Anderson *et al.*, 2002). Mechanismen zur Erhaltung/Einstellung der NAD<sup>+</sup>-Konzentration in der Zelle sind von großer Bedeutung (v.a. bei Stressreaktionen, wenn viel NAD<sup>+</sup> verbraucht wird), da die

intrazelluläre Konzentration (und damit auch die Verfügbarkeit) ein Ergebnis von laufendem Abbau und Aufbau ist (Bedalov *et al.*, 2003).

Die globale Aufgabe von Sir2p und Homologen könnte die Überwachung und Regulierung der Energieversorgung ( $\text{NAD}^+$ -Konzentration hängt von der ATP-Konzentration ab) sowie des Redox-Zustands (Verschiebung des Verhältnisses  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ) in einer Zelle sein (Smith *et al.*, 2000). Sir2p und Hst1p regulieren unterschiedliche Gene. Sir2p reprimiert *BNA4 in vivo*. In der Zelle unterbindet Hst1p auf der Transkriptionsebene die Biosynthese von  $\text{NAD}^+$ , wenn dieses ausreichend vorhanden ist. Hst1p fungiert als zellulärer Sensor der  $\text{NAD}^+$ -Konzentration. Das Protein hat eine geringe Affinität zu  $\text{NAD}^+$  (Bedalov *et al.*, 2003).

Kommt es zum Funktionsausfall von *NPT1* im Pyridin-Kreislauf, kann man in den Zellen eine Erhöhung der Transkription der Gene des *de novo* Wegs (*BNA2*, *BNA4*, *BNA5*, *BNA1*, *BNA6*) mit Ausnahme von *BNA3* sowie die Erhöhung der Transkription eines Nicotinsäuretransporters *TNA1* feststellen. Mit dieser Reaktion soll die eine Verminderung der  $\text{NAD}^+$ -Konzentration verhindert und weiterschreitende Synthese ermöglicht werden. Hier wird eine Rückkopplung vermutet, die das  $\text{NAD}^+$ -Niveau überwacht. Über eine einfache Rückkopplung bestimmt die  $\text{NAD}^+$ -Konzentration die Aktivität von Hst1p, welche wiederum die Transkription der *de novo* Gene bestimmt. Allerdings scheint diese Rückkopplung nur mit den Genen des *de novo* Weges in Verbindung zu stehen. Eine Erhöhung der Transkription der Gene des Recycling-Wegs blieb aus. Mit dieser Rückkopplungsschleife ist als einziges Hst1p unter den  $\text{NAD}^+$ -abhängige Histon-Deacetylase (zusätzlich noch Sir2p, Hst2p, Hst3p, Hst4p) in Verbindung zu bringen. Die Regelung kann von keinem anderen Protein übernommen werden. Hst1p befindet sich konsitutiv an den Promotoren der Gene der  $\text{NAD}^+$ -Biosynthese und regelt dort den Grad der Expression (Bedalov *et al.*, 2003).

Ein Mangel an Nicotinsäure im Medium führt zu einer Erhöhung der Transkription des Nicotinsäuretransporters *TNA1* (Llorente und Dujon, 2000; Klebl *et al.*, 2000; Bedalov *et al.*, 2003), während andere Gene des Pyridin-Kreislaufs von dieser Bedingung weitgehend unberührt bleiben (Bedalov *et al.*, 2003).

Die mit rekombinanten Proteinen ermittelten  $K_m$  für  $NAD^+$  ergaben bei Hst2p 15,0  $\mu M$ , bei Sir2p 29,7  $\mu M$  und bei Hst1p 94,2  $\mu M$ . Da Hst1p den höchsten  $K_m$  hat, wird ein Rückgang der  $NAD^+$ -Konzentration zuerst bei Hst1p zu einer Reduzierung der Aktivität führen. Da damit aber eine Reduzierung der Repression der *BNA*-Gene einhergeht, kommt es folglich zu einer Steigerung der  $NAD^+$ -Biosynthese. Die geringe Affinität von Hst1p zu  $NAD^+$  belegt die Vermutung, dass Hst1p als  $NAD^+$ -Sensor und Regulator in der Zelle fungiert. Denn so ist sichergestellt, dass die Biosynthese anluft und der Pool wieder aufgefüllt wird, bevor andere  $NAD^+$ -abhängige Reaktionen davon betroffen sind. Die Gene, die unter der Kontrolle von Sir2p und Hst2p sind, werden erst bei noch geringeren  $NAD^+$ -Konzentrationen aktiviert. Ist ausreichend  $NAD^+$  in der Zelle vorhanden, werden sowohl die Gene des *de novo* Weges als auch des Nicotinsuretransporters *TNA1* reprimiert, die Gene des Pyridin-Kreislaufs bleiben konstitutiv exprimiert (Bedalov *et al.*, 2003).

Es wird angenommen, dass Pnc1p Sir2p aktiviert, indem durch die eigene Aktivität der Sir2p-Inhibitor Nicotinamid abgebaut wird. Ein Regelungseinfluss über die Bildung von Nicotinsäure und indirekt damit  $NAD^+$  ist unwahrscheinlich, da in nahrstofflimitierten Zellen keine erhohnten  $NAD^+$ -Konzentrationen oder  $NAD^+/NADH$ -Verhältnisse beobachtet wurden (Anderson *et al.*, 2003).

Die Lokalisierung der Nicotinamid-Deamidase (Pnc1p) (Anderson *et al.*, 2003), der Nicotinsäure-Phosphoribosyl-Transferase (Npt1p) (Anderson *et al.*, 2002), der NaMN-/NMN-Adenyly-Transferase (Nma2p) (Ruggieri *et al.*, 1988; Anderson *et al.*, 2002) und der  $NAD^+$ -Synthetase (Qns1p) im Zellkern (Suda *et al.*, 2003) ist ein Hinweis, dass  $NAD^+$  im Zellkern aus Nicotinamid wiedergewonnen wird. Wenn der Aufbau am Ort des Abbaus stattfindet, könnte das eine schnellere Genstilllegung und zusätzlich Mechanismen in Abhängigkeit der  $NAD^+$ -Konzentration im Zellkern ermöglichen (Anderson *et al.*, 2002).

Die Gene *PNC1* (Anderson *et al.*, 2002), *NPT1* (Smith *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2002), *NMA1* und *NMA2* (Anderson *et al.*, 2002) können mit der Verlängerung des Replikationszyklus und damit Erhöhung der Lebensdauer in Verbindung gebracht werden (Anderson *et al.*, 2002), weil sie den Fluss durch den  $NAD^+$ -Biosyntheseweg ausgehend von Nicotinamid bestimmen (Anderson *et al.*, 2002) und für den Nachschub für das bei der Deacetylierung verbrauchte  $NAD^+$  sorgen, um die intrazelluläre  $NAD^+$ -Konzentration zu

erhalten (Smith *et al.*, 2000). Die Gene *NMA1* und *NMA2* könnten sich in ihrer Funktionsweise überlappen (Anderson *et al.*, 2002). Die  $K_m$  für ATP und  $PP_i$  sind bei Nma2p für die Dinucleotidbildung höher als bei Nma1p, was unterschiedliche physiologische Funktionen/Aufgaben implizieren/ermöglichen würde: unter normalen Bedingungen könnte die  $NAD^+$ -Versorgung von Nma1p übernommen werden. Unter anderen Bedingungen, wenn der Fluss durch den  $NAD^+$ -Biosyntheseweg sprunghaft ansteigt, erreicht die Aktivität von Nma1p ihre Sättigung, jedoch kann die Aktivität von Nma2p noch über einen wesentlich weiteren Konzentrationsbereich geregelt werden (Emanuelli *et al.*, 2003). Das Gen *QNS1* scheint nicht mit der Erhöhung der Lebensdauer in Verbindung zu stehen (Anderson *et al.*, 2002). Da eine ruhende Hefezelle mehr als die 30-fache  $NAD^+$ -Synthetase-Menge besitzt, die nötig wäre, um die intrazelluläre  $NAD^+$ -Konzentration aufrecht zu erhalten, ist die  $NAD^+$ -Synthetase *in vivo* wohl keiner Regulation unterworfen. Ihre Aktivität wird vielmehr durch die vorhandenen Substratkonzentrationen bestimmt (Yu und Dietrich, 1972). Eine Erklärung dafür könnte eine eingeschränkte Substratverfügbarkeit sein (Anderson *et al.*, 2002), denn nur einer der vier Synthesewege ist unabhängig von der  $NAD^+$ -Synthetase Qns1p und von NaAD. Dieser führt im Gegensatz zu den anderen drei von Nicotinamidribose über NMN zu  $NAD^+$ . Ermöglicht wird das durch eine spezifische Nicotinamidribose-Kinase-Aktivität (Bieganowski und Brenner, 2004).

Den beiden Genen *NPT1* und *SIR1* kommt gleiche Bedeutung für die Stilllegung von rDNA zu. Eine Funktionsbeeinträchtigung in jeweils einem der beiden Gene/Genprodukte führt zu einer erhöhten Rekombination der rDNA. *NPT1* ist jedoch nicht für alle Arten der Genstilllegung essentiell (Smith *et al.*, 2000).

Neben der Bereitstellung von Nicotinsäure für die Biosynthese von  $NAD^+$  durch die Nicotinamid-Deamidase Pnc1p (Sundaram *et al.*, 1960; Anderson *et al.*, 2003) wäre ohne sie eine Replikationserhöhung durch moderaten Hitzestress oder Nährstofflimitierung nicht möglich. Dabei handelt es sich um eine Konsekutivreaktion, die von *PNC1* über *SIR2* geht (Anderson *et al.*, 2003).

3.2 Biosynthese der Pyridinucleotide in *Saccharomyces cerevisiae*

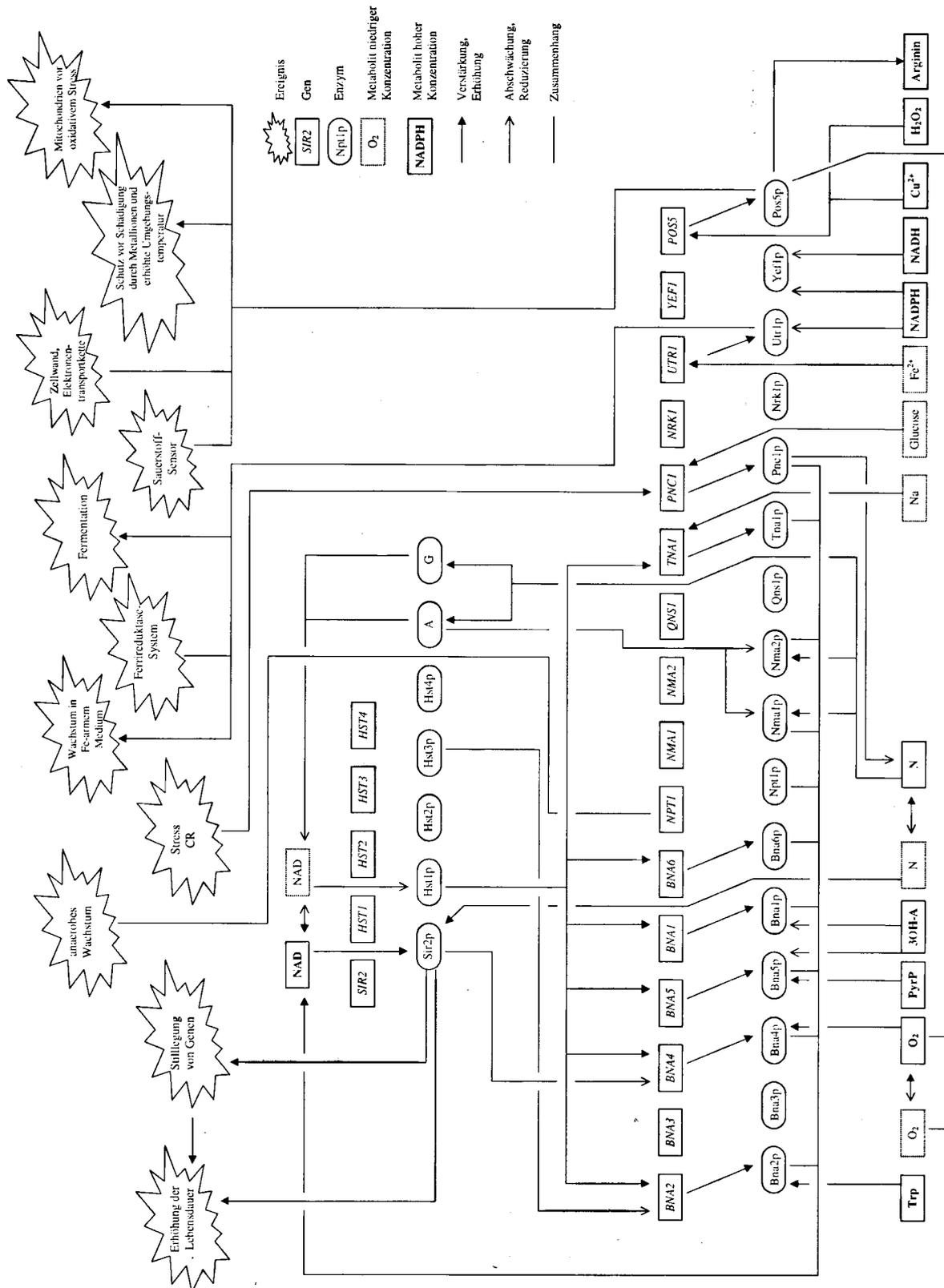


Abbildung 3.26: Schematische Darstellung physiologischer und regulatorischer Mechanismen, die in Zusammenhang mit der Biosynthese von NAD(P)<sup>+</sup>/H stehen. Kurze Erläuterungen der Zusammenhänge sind Tabelle 3.4 zu entnehmen, eine ausführliche Erläuterung ist Inhalt des Kapitels 3.2.9.

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der in Abbildung 3.26 dargestellten physiologischen und regulatorischen Mechanismen, die mit der Biosynthese von NAD(P)<sup>+</sup>/H in Verbindung stehen können. Ausführliche Informationen zu diesen Mechanismen können Kapitel 3.2.9 entnommen werden. Weiterführende Informationen zu den beteiligten Enzymen sind Kapitel 3.2.8 zu entnehmen.

| Bezeichnung | Quelle                         | physiologischer / regulatorischer Zusammenhang  |
|-------------|--------------------------------|---|
| Bna2p       | Iwamoto <i>et al.</i> , 1995   | Tryptophan steigert Aktivität von Bna2p   |
| Bna4p       | Schott und Staudinger, 1971    | Bna4p kann durch Sauerstoff induziert werden  |
| Bna5p       | Schott und Krause, 1979        | 3-Hydroxy-Anthranilat inhibiert Bna5p (Produktinhibierung)  |
| Bna1p       | Shetty und Gaertner, 1973      | Pyridoxalphosphat kann <i>in vitro</i> die Reaktionsgeschwindigkeit steigern  |
|             | Lingens und Heilmann, 1967     | 3-Hydroxy-Anthranilat inhibiert Bna1p (Substratinhibierung)   |
|             | Heilmann und Lingens, 1968a    | 3-Hydroxy-Anthranilat inhibiert Bna1p   |
| Nma1p       | Anderson <i>et al.</i> , 2002  | NMA / erhöht Fluß durch Recycling-Weg, dadurch wird Sir2p-Aktivität stimuliert: Verlängerung des Replikationszyklus               |
|             | Gulyamova <i>et al.</i> , 2001 | Nicotinamid steigert Aktivität einer NaMN-/MNM-Adenylyl-Transferase   |
| Nma2p       | Anderson <i>et al.</i> , 2002  | NMA2 erhöht Fluß durch Recycling-Weg, dadurch wird Sir2p-Aktivität stimuliert: Verlängerung des Replikationszyklus                |
|             | Gulyamova <i>et al.</i> , 2001 | Nicotinamid steigert Aktivität einer NaMN-/MNM-Adenylyl-Transferase   |
| Utr1p       | Kawai <i>et al.</i> , 2001     | Utr1p wird durch NADPH inhibiert und ist so möglicherweise an der Regelung des Ferrireduktase-Systems beteiligt                   |
|             | Shi <i>et al.</i> , 2005       | ermöglicht Wachstum in Fe-armem Medium  |
|             | Outten und Culotta, 2003       | Pos5p zur Abwehr des oxidativen Stress in den Mitochondrien   |
|             | Strand <i>et al.</i> , 2003    | Cu <sup>2+</sup> erhöht Transkription von <i>POSS</i> : Schutz vor Vergiftung durch Metallionen                                   |
| Pos5p       | Shi <i>et al.</i> , 2005       | Schutz vor Schädigung durch erhöhte Umgebungstemperatur   |
|             | Outten und Culotta, 2003       | Deletion führt zu Arginin-Auxotrophie   |
|             | Shianna <i>et al.</i> , 2006   | Pos5p könnte Sauerstoffsensoren sein; globaler Einfluß auf Transkription diverser Gene  |
| Yef1p       | Shi <i>et al.</i> , 2005       | leichte Inhibierung durch NADH und NADPH  |
| Hst1p       | Bedalov <i>et al.</i> , 2003   | Hst1p ist globaler Regulator der <i>de novo</i> Biosynthese: bei nicht ausreichender NAD-Konzentration wird Repression aufgehoben |
| Hst3p       | Bedalov <i>et al.</i> , 2003   | Hst3p reprimiert <i>BNA2</i>  |
| Sir2p       | Anderson <i>et al.</i> , 2003  | Pnc1p baut den Inhibitor von Sir2p, Nicotinamid, ab und steigert so dessen Aktivität: Verlängerung des Replikationszyklus         |
|             | Bedalov <i>et al.</i> , 2003   | Sir2p reprimiert <i>BNA4</i>  |

**Tabelle 3.4 (Fortsetzung): Zusammenfassung der in Abbildung 3.26 dargestellten physiologischen und regulatorischen Mechanismen, die mit der Biosynthese von NAD(P)<sup>+</sup>/H in Verbindung stehen können. Ausführliche Informationen zu diesen Mechanismen können Kapitel 3.2.9 entnommen werden. Weiterführende Informationen zu den beteiligten Enzymen sind Kapitel 3.2.8 zu entnehmen.**

|       |                                |   |
|-------|--------------------------------|---|
| Pnc1p | Anderson <i>et al.</i> , 2003  | Pnc1p baut den Inhibitor von Sir2p, Nicotinamid, ab und steigert so dessen Aktivität: Verlängerung des Replikationszyklus |
|       | Anderson <i>et al.</i> , 2002  | <i>PNC1</i> erhöht Fluß durch Recycling-Weg, dadurch wird Sir2p-Aktivität stimuliert: Verlängerung des Replikationszyklus |
|       | Anderson <i>et al.</i> , 2003  | unter Glucoselimitierung steigt invers zur Glucosekonzentration die Expression von <i>PNC1</i>                            |
| Npt1p | Anderson <i>et al.</i> , 2002  | <i>NPT1</i> erhöht Fluß durch Recycling-Weg, dadurch wird Sir2p-Aktivität stimuliert: Verlängerung des Replikationszyklus |
|       | Smith <i>et al.</i> , 2006     | Npt1p liefert Nachschub an NAD, das bei Gensillegung laufend verbraucht wird  |
| Tna1p | Llorente und Dujon, 2000       | wenig Nicotinsäure steigert Transkription der Permease, Nicotinsäure regelt Gen <i>TNA1</i>                               |
|       | Klebl <i>et al.</i> , 2000     | wenig Nicotinsäure steigert Transkription des Transporters, Nicotinsäure regelt Gen <i>TNA1</i>                           |
| A     | Bedalov <i>et al.</i> , 2003   | geringste Nicotinsäure-Konzentrationen im Medium aktivieren <i>TNA1</i>   |
| G     | Gulyamova <i>et al.</i> , 2001 | Nicotinamid steigert Aktivität einer (ADP-Ribosyl)-Transferase  |
|       | Gulyamova <i>et al.</i> , 2001 | Nicotinamid steigert Aktivität einer NAD-Glycohydrolase   |

Neben der direkten Stressbewältigung (NADPH) und der indirekten (über Situine) sind WEITERE ZUSAMMENHÄNGE in Verbindung mit  $\text{NAD}^+$  in *Saccharomyces cerevisiae* bekannt.

Da *Saccharomyces cerevisiae* eine aktive Nicotinamid-Deamidase besitzt, würde Nicotinamid über Nicotinsäure in den Preiss-Handler-Weg eingeschleust werden (Sundaram *et al.*, 1960). Obwohl der zehnfach höhere  $K_m$  für NaMN als für NMN für ein Vorkommen von NMN im Pyridin-Kreislauf sprechen würde (Natalini *et al.*, 1986), könnte der beobachteten NMNATase-Aktivität *in vivo* keine so große Bedeutung zukommen, sondern in den *in vitro* Experimenten eher die Folge einer mangelnden Substratspezifisierung sein (Dahmen *et al.*, 1967). Über die Aktivität der Nicotinamid-Deamidase könnte man Aufschluß über die relativen Konzentrationen von Nicotinsäure- und Nicotinamidmononucleotid in *Saccharomyces cerevisiae* und über die physiologische Bedeutung beider Substrate (Yan und Sloan, 1987) hinsichtlich der Nicotinsäure-/Nicotinamidmononucleotid-Adenylyl-Transferase gewinnen (Natalini *et al.*, 1986). Eine Besonderheit ist, dass eine Nicotinsäure-/Nicotinamid-Adenylyl-Transferase an allen drei  $\text{NAD}^+$ -Synthesewegen beteiligt ist, ausgehend von Nicotinsäure, von Chinolinsäure oder von Nicotinamid (Dahmen *et al.*, 1967) in Form von Nicotinamidribose (Bieganowski und Brenner, 2004). Der Reaktionsmechanismus und die Regulierung der Nma1p sind bisher noch weitestgehend unbekannt (Emanuelli *et al.*, 1999). Die Enzymaktivität könnte über die Konzentration des Substrates NMN geregelt sein (Kornberg, 1950).

Aufgrund der Spaltung von ATP ist die Reaktion der Npt1p irreversibel (Hanna *et al.*, 1983). Von physiologischer Bedeutung könnte die Verknüpfung der Mononucleotid-Bildung mit der ATP-Spaltung sein, da dadurch das Gleichgewicht auf die Seite der Mononucleotid-Bildung verschoben wird (Kosaka *et al.*, 1977). Zusätzlich wird berichtet, dass Npt1p auch die Dephosphorylierung von NaMN zu Nicotinsäure-Ribose katalysieren kann. Das Umschalten zwischen den beiden Aktivitäten bewirkt ATP durch eine Konformationsänderung des Proteins. Diese führt zu einem Wechsel von der NaMNase-Aktivität (Dephosphorylierung) zu der NaPRTase-Aktivität (Mononucleotid-Bildung). Durch die Änderung der enzymkatalysierten Reaktion kann die Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  aus Nicotinsäure und/oder Tryptophan bestimmt werden. Folgende zwei Fälle kann man unterscheiden: Zur Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  werden Tryptophan, Chinolinsäure,

Nicotinsäure und Nicotinsäure-Ribose herangezogen, wenn ausreichend ATP vorhanden ist. Ist die Konzentration von ATP gering, wird einerseits kein NaMN zu NAD umgebaut und andererseits das aus Tryptophan, Chinolinsäure und Nicotinsäure-Ribose (möglicherweise) entstehende NaMN zu Nicotinsäure abgebaut (Nakamura *et al.*, 1964).

Unter Glucoselimitierung steigt invers zur Glucosekonzentration die Expression von *PNC1*, die Konzentration an Pnc1p nimmt zu. Zusätzlich steigt die Aktivität der Nicotinamid-Deamidase (Anderson *et al.*, 2003). Möglicherweise regelt der Zellwachstumsstatus die Funktion von Pnc1p. Mit zunehmender Zellzahl nimmt auch die Aktivität zu. Zusätzlich ist zu beobachten, dass während des exponentiellen Wachstums die Aktivität nicht so hoch ist, denn unter diesen Bedingungen scheint das Nicotinsäuremononucleotid hauptsächlich über den *de novo* Weg beginnend bei Tryptophan synthetisiert zu werden. In der stationären Phase wird  $\text{NAD}^+$  aus Nicotinsäuremononucleotid gebildet, das aus dem Preiss-Handler-Weg stammt. Dazu muss aber das beim  $\text{NAD}^+$ -Abbau entstandene Nicotinamid in Form der Nicotinsäure rückgeführt werden. Kann eine Deamidierung nicht stattfinden, sinkt die intrazelluläre  $\text{NAD}^+$ -Konzentration. Die Deamidase-Aktivität kann man aber auch über Hyperosmolarität steigern, wobei *PNC1* nicht für das Wachstum unter hyperosmotischen Bedingungen erforderlich ist (Ghislain *et al.*, 2002).

Die Nicotinamid-Deamidase kann im Zellkern, im Cytosol und in den Peroxisomen gefunden werden. Es gibt Hinweise, dass der Wirkungsort der Nicotinamid-Deamidase in Abhängigkeit der Stressbedingungen geregelt wird. Unter Aminosäurelimitierung und osmotischem Stress befindet sich die Nicotinamid-Deamidase hauptsächlich in den Peroxisomen. Es wird angenommen, dass das Enzym über einen Transporter in die Peroxisomen gelangen kann (Anderson *et al.*, 2003). Da die Nicotinamidase auch außerhalb des Zellkerns gefunden werden kann, ist eine Regulierung von weiteren Proteinen neben Sir2p nicht auszuschließen. In Frage kämen die Sir2p-Homologen Hst1p bis Hst4p (Anderson *et al.*, 2003).

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zeigt unter anaeroben Wachstumsbedingungen eine Auxotrophie für Nicotinsäure. Dem Gen *NPT1* kommt dabei eine wesentliche Rolle zu, da unter diesen Bedingungen eine funktionsfähige Nicotinsäure-Phosphoribosyl-Transferase-

Aktivität überlebensnotwendig ist. Innerhalb der *de novo* Biosynthese ist Sauerstoff an drei Schritten beteiligt. Folglich kann unter anaeroben Bedingungen  $\text{NAD}^+$  nur synthetisiert werden, wenn Nicotinsäure durch Npt1p eingebaut werden kann (Panozzo *et al.*, 2002).

### 3.2.10 Offene Fragen

Aus den vorangegangenen Kapiteln konnte man an einigen Stellen erkennen, dass die verfügbaren Informationen zu Aspekten der  $\text{NAD}^+$ /H-Biosynthese teilweise widersprüchlich bzw. unvollständig vorhanden sind. Aufgrund der Vielschichtigkeit der Biosynthese, der möglichen Regelungsmechanismen und der möglichen physiologischen Zusammenhänge bleiben zu dem derzeitigen Stand der Erkenntnisse Fragen offen. Diese betreffen einerseits NAD(H)-Kinasen, zu denen viele Informationen vorhanden sind, aber den drei identifizierten Proteinen nicht eindeutig zugeordnet werden können. Ein weiterer Punkt ist die Frage nach der Existenz und Notwendigkeit von Transportmechanismen über die Membrane der Organellen, um das Bild der Kompartimentierung der  $\text{NAD(P)}^+$ /H-Biosynthese zu vervollständigen. Hinzukommen noch Fragen nach weiteren Synthesewegen und deren Bedeutung hinsichtlich möglicher Auxotrophien. Diese und weitere Punkte sollen in diesem Kapitel angesprochen werden.

### Nicht zuzuordnende NAD(H)-Kinasen

Da Literaturdaten nicht den drei identifizierten NADH-Kinasen Utr1p (im Cytosol), Yellp (im Cytosol) und Pos5p (in den Mitochondrien) eindeutig zugeordnet werden können, erfolgt hier eine Auflistung nach dem angegebenen Wirkungsort. Es wurden Kinasen im Zellextrakt (Kornberg, 1950b; Apps, 1970), im Cytosol (Apps, 1970; Tseng *et al.*, 1979; Iwahashi *et al.*, 1989), in den Mikrosomen (Iwahashi *et al.*, 1989) und in den Mitochondrien (Bernofsky und Utter, 1968; Apps, 1970; Griffiths und Bernofsky, 1970a, 1970b; Griffiths und Bernofsky, 1972; Iwahashi *et al.*, 1989; Iwahashi und Nakamura, 1989) beschrieben.

Mindestens drei Kinasen können in *Saccharomyces cerevisiae* unterschieden werden. In der Hefe ist die Regelung der NADP(H)-Biosynthese offensichtlich sehr komplex (Apps, 1970).

Mit einem aus ZELLEXTRAKT teilweise gereinigten Enzym kann NADP<sup>+</sup> direkt aus NAD<sup>+</sup> und ATP durch Phosphorylierung nach folgender Gleichung erzeugt werden: ATP + NAD<sup>+</sup> → ADP + NADP<sup>+</sup>. Ohne ATP oder NAD<sup>+</sup> erfolgt keine NADP<sup>+</sup>-Synthese. Der Umsatz erfolgt stöchiometrisch. Die Substrate können nicht durch ADP oder NMN ersetzt werden. Jedoch wird NADH<sub>2</sub> zu NADPH<sub>2</sub> umgesetzt. Bei sehr geringen Konzentrationen steigert Mn<sup>2+</sup> die Reaktionsgeschwindigkeit deutlicher als Mg<sup>2+</sup>, das im Gegenzug bei höheren Konzentrationen nicht inhibiert und zu höheren Reaktionsgeschwindigkeiten führt (Kornberg, 1950b). Die Kinase aus dem Autolysat entspricht der Kinase aus dem Cytosol (Apps, 1970).

Eine CYTOSOLISCHE Kinase wurde aus Hefe gereinigt und charakterisiert. Mittels SDS-PAGE wurde ein Protein mit einer Molmasse von 31 kDa bestimmt. Da das native Enzym eine Molmasse von 124 kDa hat, besteht es aus vier (fast) identischen Untereinheiten. Für die Phosphorylierung wurde der K<sub>m</sub> für NAD<sup>+</sup> und für ATP zu 0,68 und 2,3 mM bestimmt. Aus der Bestimmung der kinetischen Daten kann auf einen sequentiellen Reaktionsmechanismus geschlossen werden. Eine theoretische Herleitung zeigt, dass die Aktivität der NAD<sup>+</sup>-spezifischen Kinase mehr als ausreichend ist, um den Bedarf der Zelle zu decken. Die Frage, ob und wie eine Regulierung stattfindet, ist offen. Möglicherweise könnten *in vivo* Modulatoren eine Rolle spielen (Tseng *et al.*, 1979).

Eine cytosolische Kinase bevorzugt NAD<sup>+</sup> und wird durch NADH inhibiert. Für dieses Enzym wurde ein K<sub>m</sub> für NAD<sup>+</sup> von 0,32 mM und für ATP von 0,58 mM bestimmt. Es kann durch Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und Mn<sup>2+</sup> aktiviert werden, wobei Mn<sup>2+</sup> bei geringeren Konzentrationen zu einer größeren Steigerung führt als Mg<sup>2+</sup>, das aber bei höheren Konzentrationen nicht inhibierend wirkt (Apps, 1970).

Es wurde eine NAD<sup>+</sup>-spezifische Kinase identifiziert, die gleichermaßen im Cytosol und in den MICROSOMEN zu finden ist. Es wurde zum ersten Mal dargestellt, dass eine NAD<sup>+</sup>-

spezifische Kinase-Aktivität auch in den Microsomen zu beobachten ist. Unklar ist noch, ob die cytosolische und die microsomale Kinase Isoenzyme sind (Iwahashi *et al.*, 1989).

*S. cerevisiae* ist der einzige Organismus, der eine NADH-Kinase in den MITOCHONDRIEN besitzt (Apps, 1970). In der Suspension der Mitochondrienproteine kann mit  $\text{NAD}^+$  und NADH eine Kinase-Aktivität festgestellt werden, bei der NADH als Substrat bevorzugt wird (Bernofsky und Utter, 1968). Die Spezifizierung auf NADH ging bei der Aufreinigung verloren, so dass NADH und  $\text{NAD}^+$  gleich schnell umgesetzt wurden. Durch Zugabe von Natriumacetat konnte die Substratspezififizierung selektiv wieder hergestellt werden (Griffiths und Bernofsky, 1970a). Die Enzymaktivität kann durch Zugabe unlöslicher Bestandteile der Mitochondrien in Relation zur zugegebenen Menge gesteigert werden. Noch deutlicher ist die Aktivitätssteigerung bei der Zugabe von Natriumacetat ausgeprägt. Dies wird auf Wechselwirkungen mit dem Carboxylat-Anion zurückgeführt. Dieser aktivierende Effekt tritt nur auf, wenn NADH als Substrat eingesetzt wird. Es wird angenommen, dass Natriumacetat oder ein Bestandteil des Mitochondriensediments einen Effektor ersetzen kann, der die Spezifizierung auf NADH als Substrat verursacht. Möglicherweise geht dieser Effektor bei der Aufreinigung verloren. Diese Beobachtungen deuten auf eine *in vivo* Regelung hin (Griffiths und Bernofsky, 1970b). Das gereinigte Enzym setzt NADH 5,5 mal schneller um als  $\text{NAD}^+$  (Griffiths und Bernofsky, 1970a). Diese Beobachtungen stehen nicht im Widerspruch zu Apps (1970), da hier nur eine Aktivierung der NADH-spezifischen Kinase beschrieben wird (Griffiths und Bernofsky, 1970b).

Die eine Kinase in den Mitochondrien bevorzugt  $\text{NAD}^+$ . Für dieses Enzym wurde ein  $K_m$  für  $\text{NAD}^+$  von 2,13 mM und für ATP von 1,60 mM bestimmt. Die andere Kinase bevorzugt NADH. Für sie wurde ein  $K_m$  für NADH von 52  $\mu\text{M}$  und für ATP von 0,25 mM bestimmt. Beide Enzymaktivitäten können durch  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  aktiviert werden, wobei  $\text{Mn}^{2+}$  bei geringeren Konzentrationen zu einer größeren Steigerung führt als  $\text{Mg}^{2+}$ , das aber bei höheren Konzentrationen nicht inhibierend wirkt (Apps, 1970).

Die von Bernofsky und Utter (1968) beschriebene Kinase wurde teilweise gereinigt und charakterisiert. Das bevorzugte Substrat ist eindeutig NADH, das zu NADPH umgesetzt wird. Diese Daten deuten nicht auf eine  $\text{NAD}^+$ -Kinase-Aktivität in den Mitochondrien hin.

Hinsichtlich des Phosphatgruppendonors kann mit steigender Aktivität GTP, UTP ITP, CTP und ATP eingesetzt werden. Letzteres kann nicht durch ADP oder AMP ersetzt werden. Bei sehr geringen Konzentrationen steigert  $Mn^{2+}$  die Reaktionsgeschwindigkeit deutlicher als  $Mg^{2+}$ , das im Gegenzug bei höheren Konzentrationen nicht inhibiert und zu höheren Reaktionsgeschwindigkeiten führt. Für NADH wurde ein  $K_m$  von 42  $\mu M$  bestimmt, für ATP und  $Mg^{2+}$  jeweils ein  $K_m$  von 1,0 mM (Griffiths und Bernofsky, 1972).

Eine NADH-spezifische Kinase ist in der inneren Mitochondrienmembran so verankert, dass sie im Zwischenmembranraum ihre katalytische Wirkung entfalten kann, wird aber von Gen(en) des Zellkerns kodiert (Iwahashi und Nakamura, 1989). Das gereinigte Protein einer ergab auf einem nativen Gel eine Bande, der eine weitere vorausging. Da dieses Protein keine Aktivität zeigte, wurde es als Fragment der NADH-spezifischen Kinase gedeutet. Die Kinase hat eine Molmasse von 160 kDa, eine Zusammensetzung aus mindestens zwei Untereinheiten verschiedener Größe wird angenommen. Sie phosphoryliert mit  $Mg^{2+}$  als Cofaktor nur NADH, als Phosphatgruppendonator ist ATP mehr als 50 mal effektiver als ADP. Für ATP wurde ein  $K_m$  von 2,1 mM bestimmt, für NADH ein Wert von 105  $\mu M$ . Es wird angenommen, dass am aktiven Zentrum eine SH-Gruppe vorliegt. Zusätzlich wurde aus der Matrix der Mitochondrien ein Aktivator isoliert, der die Aktivität um den Faktor 2,0 bis 2,5 steigert, dessen physiologische Bedeutung jedoch unklar ist. Die katalytische Aktivität wird mit dem Vorhandensein eines Cystein- und eines Tyrosin-Restes in Verbindung gebracht (Iwahashi *et al.*, 1989).

Möglicherweise gibt es noch eine vierte Kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, die im Cytosol  $NADP^+$  und in den Mitochondrien  $NADP^+$  und  $NADPH$  bildet (Shi *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Shi *et al.* (2005) ist ein Trippelmutant nicht lebensfähig. Es wurden keine Hinweise auf die Existenz einer vierten NAD(H)-Kinase gefunden (Bieganowski *et al.*, 2006).

Die hier beschriebenen Kinasen lassen sich einerseits nur schwer den drei identifizierten Kinasen zuordnen und erfordern u. a. die Frage, ob der von Iwahashi *et al.* (1989) beschriebene Aktivator und/oder der von Griffiths und Bernofsky (1970b) beschriebene Effektor Calmodulin sein kann, welches die  $NAD^+$ -Kinase höherer Organismen aktivieren

kann (Epel *et al.*, 1981), jedoch in *Saccharomyces cerevisiae* diese nicht als Zielproteine hat (Zelter *et al.*, 2004).

### **Intrazellulärer Transport über Organellmembrane**

NAD<sup>+</sup> und NADH können in beide Richtungen die innere Membran der Mitochondrien nicht passieren. NAD<sup>+</sup> kann in den Mitochondrien nur bis in den Zwischenmembranspalt vordringen. In der Matrix der Mitochondrien wurde eine Alkoholdehydrogenase identifiziert, die über ein mögliches Acetaldehyd-Ethanol-Shuttle (gekoppelter Transport von Acetaldehyd und/oder Ethanol je nach Redox-Status des Kompartiments, Metabolite diffundieren über Membran) zum Ausgleich der NAD<sup>+</sup>/H-Pools im Cytosol und in den Mitochondrien beitragen könnte (von Jagow und Klingenberg, 1970). In diesem Zusammenhang wurde kürzlich ein Transportprotein (Ndt1p) identifiziert, durch welches NAD<sup>+</sup> in die Mitochondrien gelangen kann (Todisco *et al.*, 2006).

### **Weitere Informationen im Zusammenhang mit der NAD(P)<sup>+</sup>/H-Biosynthese in *Saccharomyces cerevisiae***

Im Folgenden sind noch weitere Informationen zusammengestellt, die nur schwer in einem Zusammenhang dargestellt werden können.

Es gibt keine Transhydrogenase-Aktivität über die Membran der Mitochondrien (von Jagow und Klingenberg, 1970). Griffiths und Bernofsky (1972) beschreiben bei der Aufreinigung einer NADH-Kinase aus Mitochondrien eine Transhydrogenase-Aktivität.

Für den Abbau von NAD<sup>+</sup> ist eine NAD<sup>+</sup>-Nucleosidase verantwortlich. Deren Aktivität nimmt mit der Länge der Gefrierlagerung ab (Bernofsky, 1969).

Im Rahmen der Untersuchungen zu einer mitochondrialen NADH-Kinase wird auch eine mitochondriale NADP<sup>+</sup>-Phosphatase-Aktivität beschrieben. Die Abbauraten von NADP<sup>+</sup>

und NADPH sind vergleichbar mit den Raten der Phosphorylierung. Das reduzierte Dinucleotid ist das bevorzugte Substrat (Bernofsky und Utter, 1968).

Bei der Untersuchung der Biosynthese von Nicotinsäure ausgehend von den radioaktiv markierten Aminosäuren L-Tryptophan, L-Aspartat und L-Glutamat wurde festgestellt, dass unter anaeroben Bedingungen nur geringe Mengen an L-Tryptophan in Nicotinsäure umgewandelt werden. Unter diesen Bedingungen wurden bedeutendere Mengen an L-Aspartat und L-Glutamat in der synthetisierten Nicotinsäure gefunden. Diese Beobachtungen deuten auf einen alternativen Syntheseweg unter anaeroben Bedingungen hin. Je nach Sauerstoffverfügbarkeit scheinen die beiden Synthesewege der Nicotinsäure zum Tragen zu kommen. Da unter aeroben Bedingungen nur wenig L-Aspartat und L-Glutamat in Nicotinsäure wiedergefunden wird, scheint dieser Weg nicht benutzt zu werden, wenn Sauerstoff zu Verfügung steht. Unter anaeroben Bedingungen scheint der aus Bakterien bekannte Weg jedoch aktiv zu sein (Ahmad und Moat, 1966). Unter anaeroben Bedingungen wird zehnmal mehr Nicotinsäure aus Asparaginsäure aufgebaut wie unter aeroben Bedingungen. Trotzdem ist unter diesen Bedingungen die Nicotinsäurekonzentration in aeroben Kulturen wesentlich größer als in anaeroben Kulturen. Allerdings reichen die unter anaeroben Bedingungen synthetisierten Mengen nicht aus, um ein Wachstum zu ermöglichen (Heilmann und Lingens, 1968b).

Für die NaPRTase wird auch beschrieben, dass sie neben der Synthese von NaMN aus Nicotinsäure und PRPP die Dephosphorylierung von NaMN zu Nicotinsäure-Ribose katalysieren kann. Für das Umschalten zwischen den beiden Aktivitäten ist ATP verantwortlich. Mit einem teilweise gereinigten Enzym wurden Untersuchungen zur Substratspezifisierung durchgeführt. Mit NaMN als Substrat erfolgt ausschließlich die stöchiometrische Dephosphorylierung zu Nicotinsäure-Ribose und  $P_i$ . Diese Aktivität kann durch ATP inhibiert werden. Weder Deoxy- noch andere Ribonucleotide kamen als alternatives Substrat in Frage (Nakamura *et al.*, 1964). Mit einem aus Hefe gereinigten Enzym konnte die Mononucleotid-Bildung bestätigt werden. Allerdings katalysiert dieses Enzym die Dephosphorylierung von NaMN nicht. In Hefe handelt es sich doch eher um zwei verschiedene Proteine. Eine hier aufgereinigte NaMNase (Dephosphorylierung) zeigte keine Inhibierung durch ATP. Demnach deuten diese Daten nicht auf eine

Regulierung der  $\text{NAD}^+$ -Biosynthese durch eine ATP-abhängige Verschiebung einer Enzymaktivität hin (Ogasawara und Gholson, 1966).

### **3.2.11 Biosynthese von ATP und Phosphoribosyl-Pyrophosphat**

An dieser Stelle soll die Biosynthese von ATP und Phosphoribosyl-Pyrophosphat kurz angesprochen werden.

ADP kann entstehen, indem durch eine Adenylat-Kinase eine Phosphatgruppe von ATP auf ein AMP-Molekül übertragen wird. Letzteres kann aus der Reaktion von PRPP mit Adenin hervorgegangen sein, welche durch eine Adenin-Phosphoribosyl-Transferase katalysiert wird. Die Bildung von ATP kann auf zwei Wegen erfolgen. Entweder wird eine Phosphatgruppe eines energiereichen Metabolits auf ADP übertragen, oder es erfolgt die Phosphorylierung über die ATP-Synthase in der Atmungskette (Michal, 1999).

Ribose-5-Phosphat tritt im Pentosephosphat weg auf und entsteht dort über mehrere Stufen aus Glucose-6-Phosphat. 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat ist eine aktivierte Form der Ribose, die von einer Ribosephosphat-Pyrophospho-Kinase synthetisiert werden kann. Als zweites Substrat dient ATP (Michal, 1999).

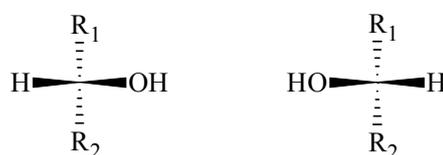
### 3.3 Mikrobielle Herstellung von Feinchemikalien

In diesem Kapitel wird die Verwendung von Mikroorganismen als Biokatalysatoren zur Herstellung von Feinchemikalien erläutert. Dazu wird in Kapitel 3.3.1 die asymmetrische Biosynthese kurz dargestellt, bevor in Kapitel 3.3.2 auf die asymmetrische Reduktion mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 eingegangen wird. Abschließend wird die Herstellung von Biokatalysatoren in Kapitel 3.3.3 erläutert.

#### 3.3.1 Asymmetrische Biosynthesen

Im Rahmen dieser Arbeit können hier nur grundlegende Zusammenhänge aufgezeigt werden. Die mikrobielle Herstellung von Feinchemikalien ist in der Literatur ausführlich beschrieben. Weiterführende Informationen können u. a. aus Hummel und Kula (1989), Peters (1998), Bertau und Bürli (2000), Griffin *et al.* (2001), Brommarius und Riebel (2004), Engelking (2004) und Pfründer (2005) entnommen werden.

Viele Feinchemikalien, beispielsweise Vorstufen von pharmazeutischen Wirkstoffen, sind chirale Alkohole und können durch asymmetrische Synthesen hergestellt werden. Die Chiralität ist eine Form der Isomerie. Diese Isomere, sog. Enantiomere, können aufgrund ihrer räumlichen Struktur nicht zur Deckung gebracht werden und verhalten sich wie Bild und Spiegelbild (Abbildung 3.27).

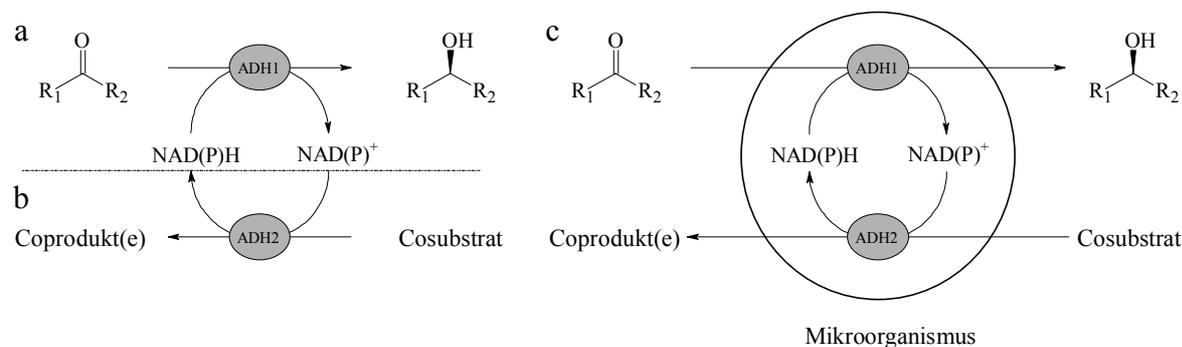


**Abbildung 3.27: Schematische Darstellung zweier Enantiomere. Die Moleküle können nicht zur Deckung gebracht werden und verhalten sich wie Bild und Spiegelbild. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>: nicht dargestellte Reste der Molekülstruktur. R<sub>1</sub> ≠ R<sub>2</sub>.**

Chirale Alkohole können durch Reduktion prochiraler Ketone gewonnen werden. Nasschemische Verfahren zur asymmetrischen Synthese bringen den Nachteil toxischer

Übergangsmetalle als Katalysatoren, aggressiver Reaktionsbedingungen und niedriger Enantiomerenreinheiten. Daher entstehen hohe Kosten bei der Reinigung des gewünschten Enantiomers.

Dagegen bieten biologische Verfahren zur asymmetrischen Synthese den Vorteil hoher Enantiomerenreinheiten. Diese Verfahren werden unter milden Reaktionsbedingungen durchgeführt. Als Biokatalysatoren kommen Enzyme, Oxidoreduktasen, zum Einsatz. Diese Redoxreaktionen beruhen auf der enzymatischen Reduktion eines Ketons zu einem chiralen Alkohol, wobei Coenzyme als Reduktionsmittel fungieren. Eine derartige Redoxreaktion ist in Abbildung 3.28a schematisch dargestellt.

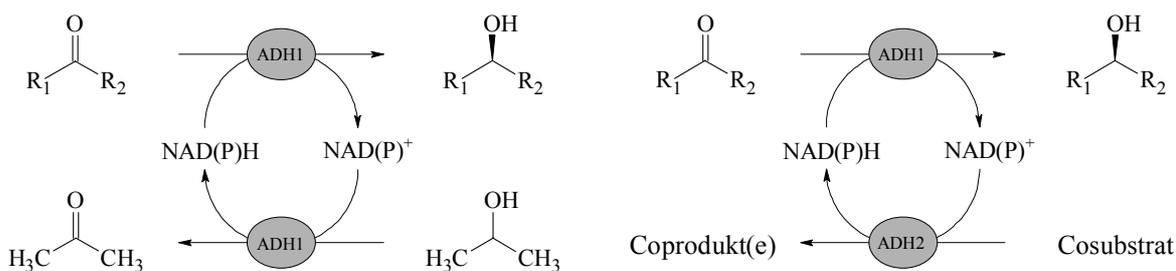


**Abbildung 3.28: Schematische Darstellung einer enzymatischen Redoxreaktion zur asymmetrischen Synthese eines chiralen Alkohols. (a) Enzymatische Reduktion eines Ketons durch eine Alkoholdehydrogenase (ADH1). (b) Regeneration des Coenzym durch enzymatische Oxidation eines Cosubstrats (ADH2). (c) Verwendung ganzer Zellen zur asymmetrischen Biosynthese eines chiralen Alkohols.  $R_1$ ,  $R_2$ : nicht dargestellte Reste der Molekülstruktur.  $R_1 \neq R_2$ .**

Wie in Abbildung 3.28a dargestellt, überträgt eine Alkohol-Dehydrogenase (hier allgemein mit ADH1 bezeichnet) Elektronen von einem Coenzym auf ein Keton. Ein chiraler Alkohol entsteht. Da allerdings der stöchiometrische Einsatz des Coenzym einen derartigen Prozess unökonomisch macht, wird das Coenzym regeneriert (Abbildung 3.28b). In diesem Fall bedeutet Regenerierung die Reduktion des Coenzym  $NAD^+$  oder  $NADP^+$ . Dazu wird dem Ansatz ein zweites Enzym zugegeben (hier mit ADH2 bezeichnet), welches die Oxidation eines Cosubstrates katalysiert. Nach der Regenerierung kann das Coenzym mit einem weiteren Substratmolekül reagieren (Abbildung 3.28a und b). Die Vorteile der Verwendung isolierter Enzyme als Biokatalysatoren liegen im Ausschluss von Nebenreaktionen, im ungehinderten Stofftransport, in hohen Umsätzen

und in einer einfachen Produktaufarbeitung. Jedoch können die Kosten für die isolierten Enzyme und für die Coenzyme den Wert des Produktes überschreiten.

Eine kostengünstige Alternative stellt die Verwendung ganzer Zellen zur asymmetrischen Biosynthese dar, da die zelleigenen Coenzyme genutzt werden können (Abbildung 3.28c). Das Edukt wird in die Zelle aufgenommen und enzymatisch reduziert. Die abreagierten Coenzyme  $\text{NAD(P)}^+$  können durch Enzyme des natürlichen Stoffwechsels regeneriert werden. Problematisch bei der Ganzzell-Biokatalyse ist die Gewährleistung einer bestimmten katalytischen Aktivität verschiedener Chargen oder der Stofftransport über die Zellmembran. Jedoch ist die Ganzzell-Biokatalyse deutlich bevorzugt, wenn zusätzlich Coenzyme eingesetzt werden müssen.



**Abbildung 3.29:** Schematische Darstellung der Coenzym-Regenerierung unter Verwendung von (a) einem und (b) zwei Enzymen.  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ : nicht dargestellte Reste der Molekülstruktur.  $\text{R}_1 \neq \text{R}_2$ .

In Ansätzen mit isolierten Enzymen oder ganzen Zellen können zwei Arten der enzymatischen Coenzym-Regenerierung unterschieden werden. Diese sind in Abbildung 3.29 schematisch dargestellt. Bei dem in Abbildung 3.29a gezeigten Ansatz werden Produktbildung und Regenerierung von dem selben Enzym (hier mit ADH1 bezeichnet) durchgeführt. Nach Starten der Reaktion kann diese nur bis zum Erreichen des gemeinsamen chemischen Gleichgewichts durchgeführt werden. Dagegen katalysieren bei dem in Abbildung 3.29b dargestellten Ansatz zwei verschiedene Enzyme die Produktbildung (ADH1) und Regenerierung (ADH2). Durch geeignete Kombination der entsprechenden Enzyme kann die Lage des Gleichgewichts bestimmt werden. Allerdings müssen bei diesem Ansatz die Eigenschaften beider Enzyme hinsichtlich Temperatur-, *pH*-Optimum bzw. Aktivität übereinstimmen. Durch das zweite Enzym entstehen zusätzliche Kosten.

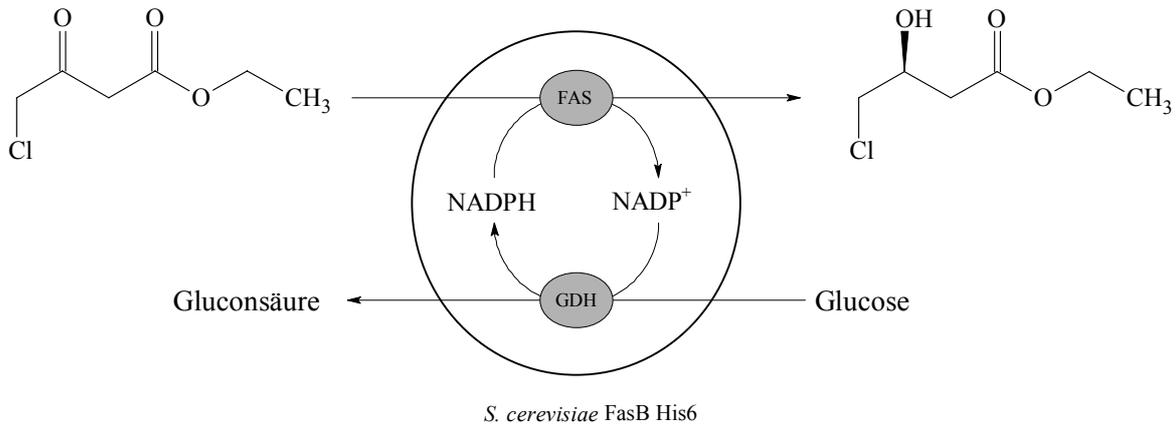
Der Begriff ‚Biotransformation‘ beschreibt die Überführung eines bestimmten Substrates in ein Zielprodukt mithilfe von Enzymen oder ruhenden Zellen.

### **3.3.2 Asymmetrische Reduktion mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6**

Die Verwendung der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in der Back-, Bier- und Weinindustrie ist bekannt, teilweise auch bei der Gewinnung von Bioethanol. Allerdings findet sie auch bei der Herstellung chiraler Pharmazeutika Anwendung (Bertau und Bürli, 2000). Sie besticht durch hohe Enantiomeren- oder Diastereomerenreinheiten sowie durch ein breites Substratspektrum (Peters, 1998). Die Hefe ist frei verfügbar, billig und kann verschiedenartige stereoselektive Transformationen katalysieren (Bertau und Bürli, 2000).

Die rekombinante Hefe *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 ist ein *Saccharomyces cerevisiae* CM3260 Stamm, der konstitutiv die  $\beta$ -Untereinheit der zelleigenen Fettsäuresynthase (*FAS1*) (Wenz *et al.*, 2001) unter der Kontrolle des Promotors der Alkohol-Dehydrogenase (*ADHI*) überexprimiert (Engelking *et al.*, 2006). Aufgrund einer Autoregulation wird die  $\alpha$ -Untereinheit der Fettsäuresynthase (*FAS2*) ebenfalls überexprimiert (Wenz *et al.*, 2001). Die Fettsäuresynthase (FAS) zeigt mit NADH als Coenzym ein Viertel der Aktivität im Vergleich zu NADPH (Lynen *et al.*, 1964). Zur Verbesserung der NADPH-Regenerierung wird zusätzlich die Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* unter der Kontrolle des Promotors der Phosphoglyceratkinase (*PGK*) überexprimiert. Durch die Transformation mit dem Bluescript Vektor erfolgt eine Integration beider Gene in das Hefegenom (Engelking *et al.*, 2006).

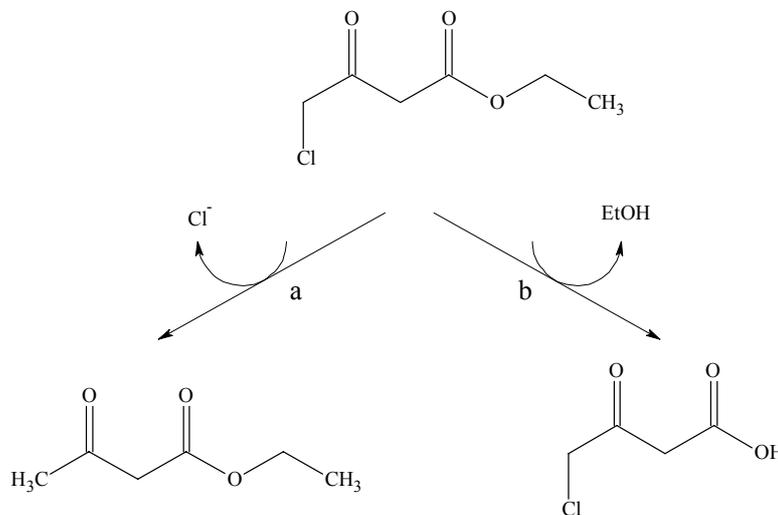
Mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 können stereoselektiv  $\beta$ -Ketoester reduziert werden. Als Beispielreaktion soll die Reduktion von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester (4-Cl-ACE) zu (S)-4-Chlor-3-Hydroxy-Buttersäureethylester (S-CHBE) betrachtet werden. S-CHBE ist eine Molekülgruppe, die in Statinen vorkommt. Die Reduktion wird von der  $\beta$ -Untereinheit der zelleigenen Fettsäuresynthase (*FAS1*) durchgeführt (Engelking, 2004). In Abbildung 3.30 ist die enantioselective Reduktion von 4-Cl-ACE zu S-CHBE dargestellt.



**Abbildung 3.30: Enantioselektive Reduktion von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester (4-Cl-ACE) zu (S)-4-Chlor-3-Hydroxy-Buttersäureethylester (S-CHBE) mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 (nach Engelking (2004))**

Mit der Fettsäuresynthase wird für 4-Cl-ACE ein  $K_m$  von 1,8 mM (Shieh *et al.*, 1985) und für NADPH ein  $K_m$  von 0,07 mM angegeben (Lynen, 1969). Der Enantiomerenüberschuss beträgt über 97 % (Shieh *et al.*, 1985). Die volumetrische Aktivität liegt bei  $200 \text{ U L}^{-1}$ . Für die Glucose-Dehydrogenase wird eine volumetrische Aktivität von knapp  $300 \text{ U L}^{-1}$  angegeben (Engelking, 2004).

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kann 4-Cl-ACE auch das Substrat anderer Enzyme sein. Solche Nebenreaktionen können, wie in Abbildung 3.31 zu sehen, (a) eine Dehalogenierung oder (b) eine Hydrolyse betreffen (Engelking, 2004).



**Abbildung 3.31: (a) Dehalogenierung oder (b) Hydrolyse von 4-Cl-ACE in *Saccharomyces cerevisiae* (Engelking, 2004)**

### 3.3.3 Herstellung des Biokatalysators

Zur Herstellung eines Biokatalysators können Satz- oder Zulaufverfahren angewendet werden.

Ein SATZVERFAHREN ist dadurch gekennzeichnet, dass zu Beginn der Kultivierung das Medium mit allen Nährstoffen versetzt vorliegt und kein weiterer konvektiver Stoffaustausch erfolgt, mit Ausnahme von CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub>. Es wird mit wenigen Mikroorganismen angeimpft, welche mehrere Wachstumsphasen durchlaufen. Das Wachstum kann durch Limitierungen der vorgelegten Nährstoffe oder durch inhibierende Stoffwechselprodukte zum Ende kommen.

Die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  ist in Abhängigkeit der Biotrockenmassekonzentration  $c_x$  definiert als:

$$\mu \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_x}{dt}$$

In Abbildung 3.32 sind die charakteristischen Wachstumsphasen einer Satzkultivierung dargestellt. In der ersten Phase, der Adaptionphase (I), erfolgt die Anpassung an das neue Medium. Eine Zunahme der Biomasse ist nicht zu beobachten. Diese setzt erst in der folgenden Übergangsphase (II) ein. Die Wachstumsrate  $\mu$  nimmt von  $\mu = 0$  zu. In der exponentiellen Phase (III) wird die maximale Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu = \mu_{\max}$  erreicht. In dieser Phase nimmt die Biomassekonzentration exponentiell zu. Sind im Medium nicht mehr genügend Nährstoffe vorhanden oder kommt es zu einer Inhibierung durch gebildete Nebenprodukte, geht das Wachstum zurück. Während der Substratlimitierungsphase (IV) sinkt die Wachstumsgeschwindigkeit wieder bis die stationäre Phase (V) erreicht wird. Während der stationären Phase bleibt die Biomassekonzentration konstant. Wachstum und Absterben stehen im Gleichgewicht. Daher ist die Wachstumsrate  $\mu$  von außen betrachtet gleich 0. Nach einer gewissen Zeit sterben mehr Zellen ab als gebildet werden, und die Biomassekonzentration nimmt ab. In dieser Absterbephase (VI) fällt die Wachstumsrate auf Werte kleiner null.

Wenn in einem Satzverfahren beispielsweise Glucose vorgelegt wurde, kann es nach dem Aufbrauchen der Glucose zu einer Diauxie kommen. Das heißt, es werden anschließend die aus der Glucose entstandenen Nebenprodukte wie zum Beispiel Ethanol, Glycerin und organischen Säuren oder weitere Substrate aus dem Medium verstoffwechselt. In diesem Fall geht das Wachstum in die stationäre Phase über und setzt kurz darauf wieder ein. Die stationäre Phase entspricht dann der Adaptionsphase für das zweite Substrat. Die oben beschriebenen Wachstumsphasen können wieder durchlaufen werden.

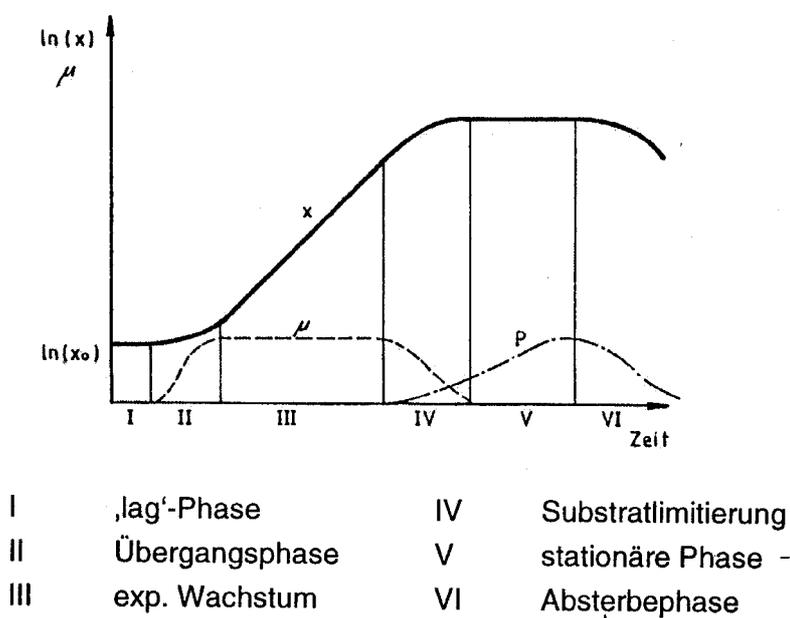


Abbildung 3.32: Schematische Darstellung der charakteristischen Wachstumsphasen einer Satzaktivierung

Bei einem ZULAUFVERFAHREN wird ein Satzprozess durch eine Nährstoffzudosierung erweitert. In der Regel wird mit dem Zulauf begonnen, nachdem das während der Satzphase vorgelegte limitierende Substrat aufgebraucht ist. In der Zulaufphase wird dieses nachdosiert. Die Zudosierung kann konstant, linear oder exponentiell erfolgen. Durch Unterbinden eines Überschußmetabolismus kann die zudosierte Kohlenstoffquelle effektiver genutzt werden. Es werden weniger Nebenprodukte gebildet und höhere Zelldichten als im Satzverfahren können erreicht werden. Zulaufverfahren kommen häufig zum Einsatz, wenn das Zielprodukt einer Katabolit-Repression unterliegt.

Der Begriff ‚Katabolit-Repression‘ beschreibt die Inhibierung der Enzymexpression zur Verstoffwechslung einer bestimmten Kohlenstoffquelle aufgrund der Verstoffwechslung

einer attraktiveren Kohlenstoffquelle, die schneller abgebaut wird. Dadurch kommt es zu einer sequentiellen Verstoffwechslung mehrerer gleichzeitig vorliegender Kohlenstoffquellen. Ist Glucose als Kohlenstoffquelle verfügbar, exprimiert die Hefe beispielsweise keine Enzyme zum Abbau von Disacchariden. Die Expression der für die Atmung verantwortlichen Enzyme ist vermindert (Rehm und Reed, 1993).

Für einen ‚idealen‘ Rührkesselreaktor wird angenommen, dass die Konzentrationen aller Reaktionskomponenten, die physikalischen Eigenschaften der Reaktionsmischung und die Reaktionsgeschwindigkeiten räumlich konstant sind.

## 4 Asymmetrische Synthese von S-CHBE mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6

Dieses Kapitel dient der Charakterisierung des Biokatalysators *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 während einer Biotransformation. Als Beispielreaktion dient die Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE in einem einphasigen wässrigen Ansatz. In diesem Zusammenhang werden vorab in Kapitel 4.1 der Einfluss des Erntezeitpunkts des Biokatalysators sowie in Kapitel 4.2 die Wechselwirkungen zwischen extrazellulären und intrazellulären Coenzymen betrachtet. In Kapitel 4.3 wird die Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE mit Coenzymzugabe behandelt. In jedem Unterkapitel werden zuerst die Ergebnisse dargestellt und im Anschluss diskutiert. Kapitel 4.4 gibt abschließend eine Zusammenfassung.

### 4.1 Einfluss des Erntezeitpunkts auf die Biotransformation

Da der Zustand des eingesetzten Biokatalysators seine Eignung zur Biotransformation bestimmen kann, soll in diesem Kapitel der Einfluss des Erntezeitpunktes des Biokatalysators bei der Zellanzucht auf die Ergebnisse der Biotransformation untersucht werden. Dabei stehen Produktkonzentration und Enantiomerenüberschuss (ee: enantiomeric excess) als Zielgrößen im Vordergrund. Dazu werden zu verschiedenen Zeiten während Kultivierungen Proben genommen und mit diesen Zellen Biotransformationen durchgeführt. Es wurden Kultivierungen im Satz- und im Zulaufbetrieb untersucht. Die erzielten Ergebnisse sind beispielhaft für eine Satzkultivierung in Abbildung 4.1 und für eine Zulaufkultivierung in Abbildung 4.2 zusammengefasst.

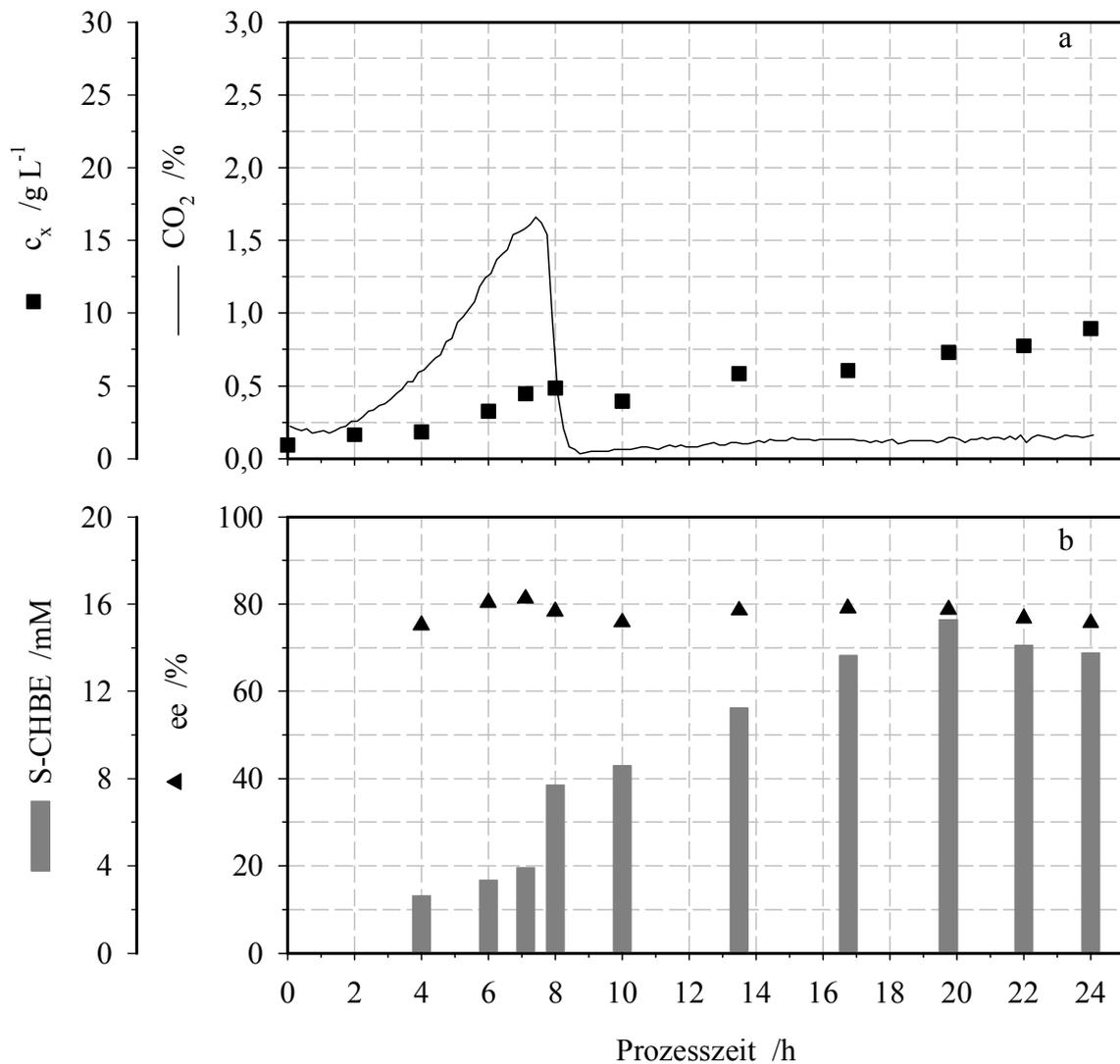


Abbildung 4.1: Einfluss des Erntezeitpunkts auf die Biotransformation. (a) Zellwachstum (Quadrate) in einem Satzverfahren. (b) Produktbildung (graue Balken) und ee (Dreiecke) von ausgewählten Proben bei der Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE. Eine Biotrockenmassekonzentration von  $10 g L^{-1}$  wurde in einem einphasigen Ansatz mit  $19,6 mM$  4-Cl-ACE eingesetzt; Umsetzungsdauer: 16 Stunden.

In Abbildung 4.1a ist der Verlauf der Biotrockenmassekonzentration in einem Satzverfahren dargestellt. Nach ungefähr acht Stunden sind  $32 g L^{-1}$  Glucose aus dem Medium umgesetzt (ohne Abbildung). In dieser Zeit steigt die Zellkonzentration von anfänglichen  $1 g L^{-1}$  auf knapp  $5 g L^{-1}$ . In den weiteren zwei Stunden ist ein leichter Rückgang der Biotrockenmassekonzentration zu verzeichnen, bevor diese bis zum Ende der Kultivierung bis auf  $9 g L^{-1}$  ansteigt. In Abbildung 4.1b sind für während der Kultivierung ausgewählte Proben der Enantiomerenüberschuss sowie die bei der

Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE nach 16 Stunden erzielte Produktkonzentration gezeigt. Bis zu der Probe nach 19,8 Stunden ist ein Anstieg der Produktkonzentration zu erkennen. Hier wird ein Maximum von 15,3 mM S-CHBE gemessen. Im Folgenden fallen die Produktkonzentrationen leicht auf Werte knapp unter 14,0 mM. Der Enantiomerenüberschuß bewegt sich bei allen Ansätzen um  $76 \pm 1 \%$ .

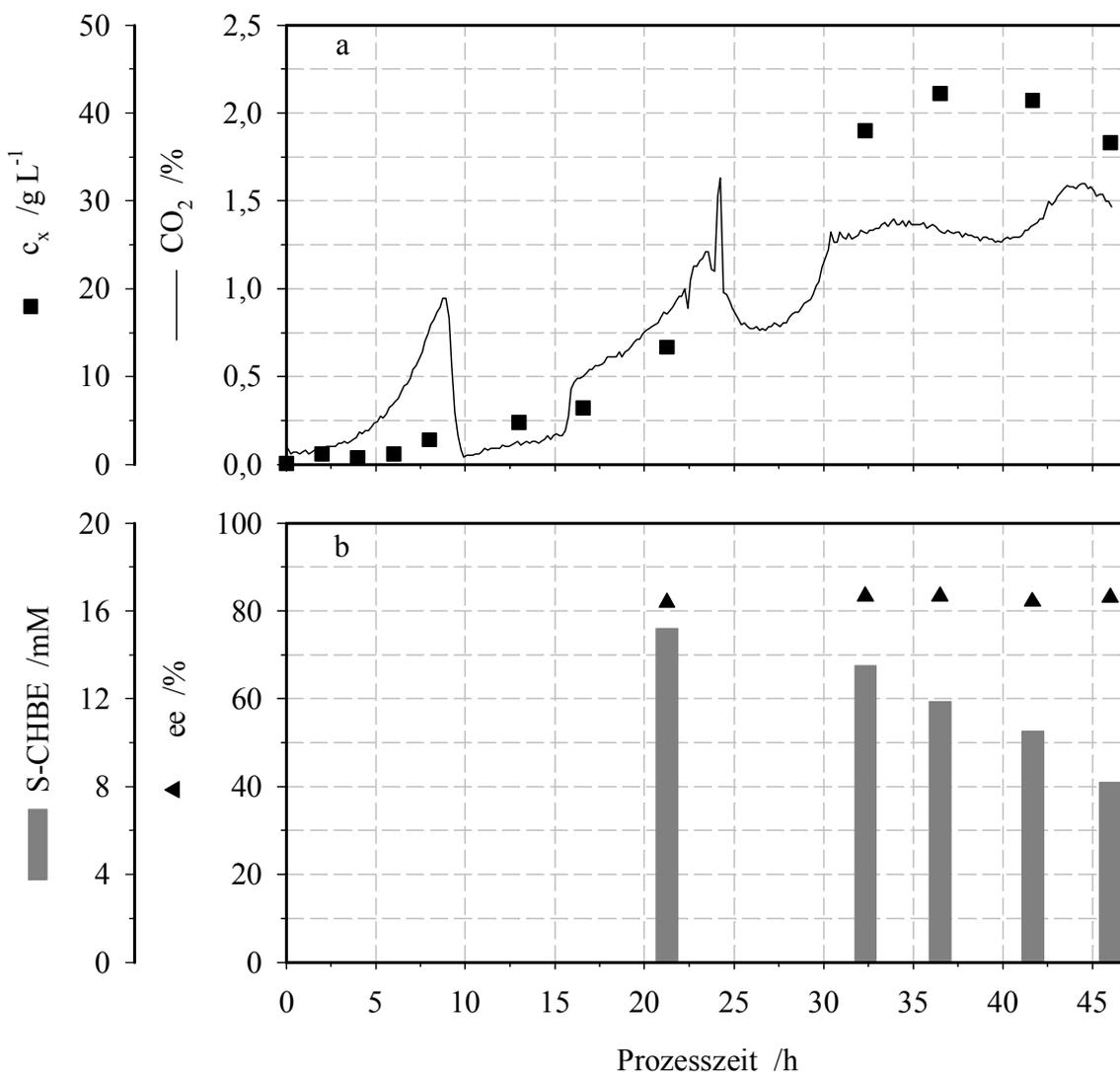


Abbildung 4.2: Einfluss des Erntezeitpunkts auf die Biotransformation. (a) Zellwachstum (Quadrate) in einem Zulaufverfahren nach Engelking (2004). Der linear ansteigende Zulauf wurde nach 10 Stunden gestartet und ab 42 Stunden konstant gehalten. (b) Produktbildung (graue Balken) und ee (Dreiecke) von ausgewählten Proben bei der Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE. Eine Biotrockenmassekonzentration von 10 g L<sup>-1</sup> wurde in einem einphasigen Ansatz mit 19,6 mM 4-Cl-ACE eingesetzt; Umsetzungsdauer: 16 Stunden.

Vergleichbare Untersuchungen wurden mit Proben durchgeführt, die zu unterschiedlichen Zeiten einer Kultivierung im Zulaufverfahren entnommen wurden. Der Verlauf der Kultivierung ist in Abbildung 4.2a dargestellt. Die zu  $14 \text{ g L}^{-1}$  vorgelegte Glucose ist nach neun Stunden nicht mehr zu detektieren. In dieser Zeit ist eine Zunahme der Biotrockenmassekonzentration von  $0,1$  auf  $2,8 \text{ g L}^{-1}$  zu verzeichnen. Nach zehn Stunden Kultivierungszeit beginnt der linear ansteigende Zulauf mit einer Glucosezudosierung von  $0,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Nach weiteren 26 Stunden ist die maximale Biotrockenmassekonzentration von  $42 \text{ g L}^{-1}$  erreicht. Nach 42 Stunden hat die Zulaufrate einen Wert von  $4,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und wird in den verbleibenden vier Stunden nicht mehr gesteigert. Bis 42 Stunden Kultivierungszeit bleibt die Biotrockenmassekonzentration annähernd konstant und fällt bis zum Ende der Kultivierung auf  $37 \text{ g L}^{-1}$  ab. Gegen Ende der Zulaufphase sind zeitweise Glucosekonzentrationen von  $1,6 \text{ g L}^{-1}$  zu bestimmen, ansonsten ist keine Glucose im Medium nachzuweisen. Mit den nach 21, 32, 36, 42 und 46 Stunden genommenen Proben wurden Biotransformationen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2b zusammengefasst. Von anfänglichen  $15,2 \text{ mM}$  S-CHBE sinkt die Produktkonzentration mit jeder weiteren Probe bis auf  $8,2 \text{ mM}$  ab. Der Enantiomerenüberschuß liegt bei allen untersuchten Proben bei Werten zwischen 80 und 84 %.

### *Diskussion*

Diese Untersuchungen sollen der Ermittlung eines geeigneten Erntezeitpunkts der für eine Biotransformation eingesetzten Biokatalysatoren dienen. Als Zielgrößen werden der Enantiomerenüberschuss sowie die Konzentration des Zielprodukts S-CHBE herangezogen. Aus Abbildung 4.1b und Abbildung 4.2b ist zu erkennen, dass die Kultivierungszeit einen Einfluss auf die bei der Biotransformation erzielte Produktkonzentration haben kann. Dabei unterschieden sich Satz- und Zulaufverfahren nicht. Die eingesetzte Substrat- und Zellkonzentration war in allen Ansätzen identisch. Jedoch sind Unterschiede im Verlauf der mit den verschiedenen Zellproben erzielten S-CHBE-Konzentrationen bei der Biotransformation zu erkennen. Im Satzbetrieb nimmt die Produktkonzentration mit der Kultivierungszeit zu und erreicht nach 20 Stunden ein Maximum von  $15,3 \text{ mM}$ . Ein ähnlicher Wert ( $15,2 \text{ mM}$ ) wird auch mit den aus einem Zulaufverfahren stammenden Zellen, die nach 21 Stunden geerntet wurden, erreicht. Proben, die zu einem späteren Zeitpunkt geerntet und untersucht wurden, zeigen in beiden Fällen eine reduzierte Produktkonzentration. Da die einzelnen Messpunkte nur

Momentaufnahmen zeigen, könnte für Zellen aus dem Zulaufverfahren ein Maximum durchaus in dem Bereich zwischen 21 und 32 Stunden Kultivierungszeit liegen.

Sofern Biokatalysatoren im Satzbetrieb angezogen werden sollen, bietet sich ein optimaler Erntezeitpunkt nach ca. 20 Stunden an. Ist eine Anzucht im Zulaufverfahren erwünscht, sollte ein Erntezeitpunkt zwischen 20 und 25 Stunden Kultivierungszeit in Erwägung gezogen werden. Zwar wurden auch in einem Satzverfahren mit CSL-Medium nach 24 Stunden Biotrockenmassekonzentrationen von  $20 \text{ g L}^{-1}$  erreicht, doch erreichten alle Ansätze mit aus Satzverfahren entnommenen Proben mittlere Enantiomerenüberschüsse von 76 %, welche um 6 % unter dem mittleren Enantiomerenüberschuß der Ansätze mit aus dem Zulaufverfahren entnommenen Proben liegen. Neben diesen Vorteilen wird ein Zulaufverfahren v. a. wegen der größeren Variabilität für künftige Untersuchungen bevorzugt.

## 4.2 Wechselwirkungen zwischen intrazellulärem und extrazellulärem NAD(P)<sup>+</sup>

In diesem Kapitel werden die Wechselwirkungen zwischen extrazellulär vorliegendem NAD<sup>+</sup> und/oder NADP<sup>+</sup> und der intrazellulären NAD(P)<sup>+</sup>-Konzentration unter den Bedingungen der Biotransformation vorerst ohne Substratzugabe betrachtet. Dazu wurde einer Zellsuspension in Phosphatpuffer entweder Puffer oder in Puffer gelöstes NAD<sup>+</sup> zugegeben. Die zeitlichen Verläufe der Wechselwirkungen zwischen extrazellulär vorliegendem NAD<sup>+</sup> und der intrazellulären NAD<sup>+</sup>-Konzentration sind in Abbildung 4.3 für die Verläufe der extrazellulären Konzentrationen und in Abbildung 4.4 für die Verläufe der intrazellulären Konzentrationen dargestellt.

In Abbildung 4.3a ist der Verlauf der im Puffer vorgelegtem NAD<sup>+</sup>-Konzentration im Vergleich zu einem Ansatz ohne Zugabe dargestellt. Zusätzlich sind in Abbildung 4.3b die Konzentrationsverläufe von Nicotinsäure jeweils im Phosphatpuffer der Ansätze mit bzw. ohne Coenzymzugabe gezeigt. Die NAD<sup>+</sup>- bzw. Pufferzugabe erfolgt in beiden Fällen zum Zeitpunkt null Stunden. Aus Abbildung 4.3a ist zu erkennen, dass in dem Ansatz mit reiner Pufferzugabe kein NAD<sup>+</sup> in dem Puffer zu detektieren ist. In dem anderen Ansatz ist vor der Zugabe auch kein NAD<sup>+</sup> zu detektieren, mit/nach der Zugabe von in Phosphatpuffer gelöstem NAD<sup>+</sup> ist ein deutlicher Konzentrationsanstieg zu erkennen. In den ersten 20 Minuten streuen die Werte etwas um Werte von 0,25 mM, bevor sie im weiteren Verlauf bis auf 0,05 mM nach einer Stunde fallen. In dem Ansatz ohne Zugabe sind zu keinem Zeitpunkt Konzentrationen von Nicotinsäure zu detektieren. In dem anderen Ansatz ist nach der NAD<sup>+</sup>-Zugabe Nicotinsäure in dem Puffer zu bestimmen. Diese erreicht die höchste Konzentration zum Zeitpunkt der Zugabe mit 0,25 mM. In den ersten zehn Minuten fällt diese Konzentration schnell auf Werte um 0,05 mM und klingt innerhalb weiterer zehn Minuten auf Werte unter 0,05 mM ab. Im weiteren Verlauf sind bis zum Ende der Untersuchung nur noch vernachlässigbar kleine Mengen an Nicotinsäure in dem Puffer zu messen. Wie in Abbildung 4.4 gezeigt, ist in den Zellen in keinem der Ansätze eine merkliche Änderung der NAD<sup>+</sup>- und/oder Nicotinsäurekonzentration vor bzw. nach der Puffer- oder NAD<sup>+</sup>-Zugabe sowie im weiteren Verlauf zu erkennen. Die intrazellulären NADH-Konzentrationen verhalten sich entsprechend (ohne Abbildung).

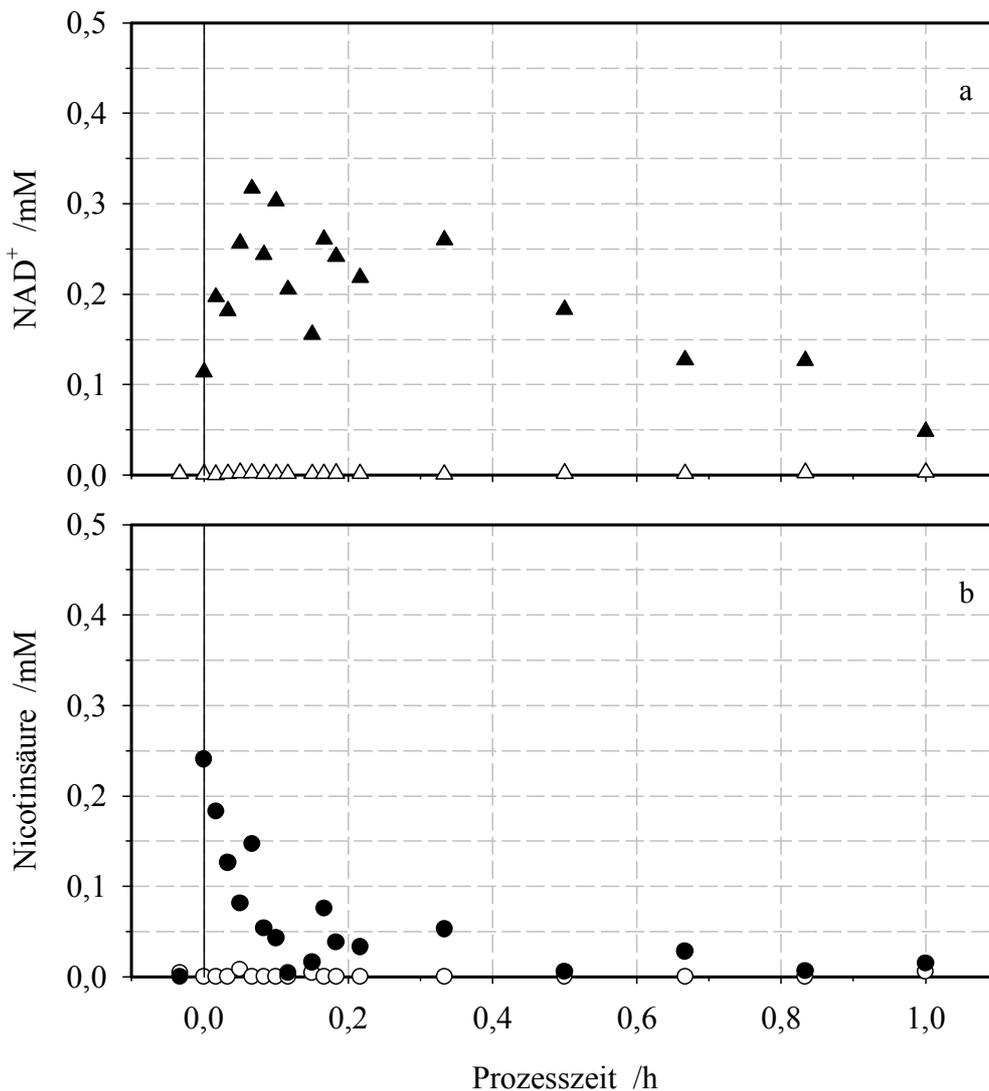
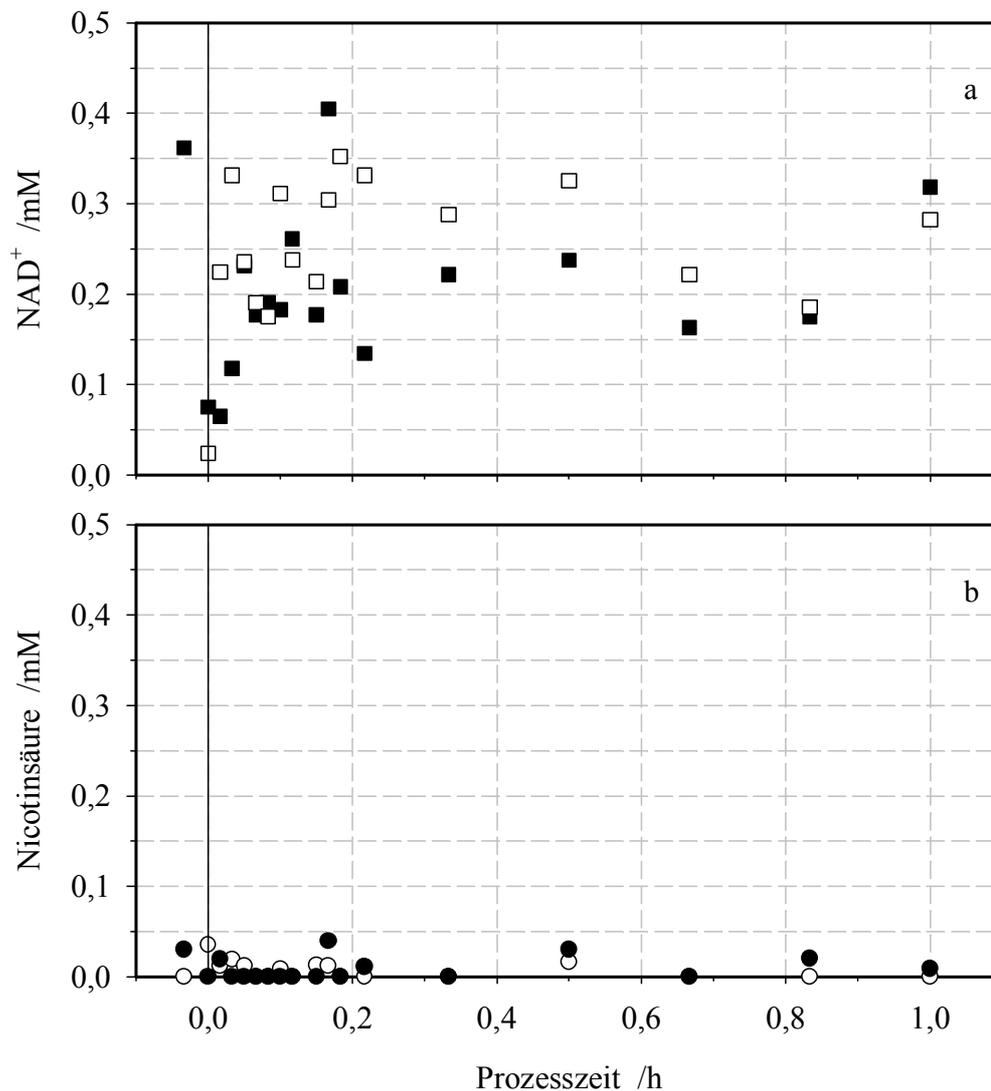


Abbildung 4.3: Verlauf der extrazellulären (a) NAD<sup>+</sup>- und (b) Nicotinsäurekonzentration für einen Ansatz, dem NAD<sup>+</sup> zugegeben wurden (geschlossene Symbole) im Vergleich zu einem Referenzansatz ohne Zugabe (offene Symbole). Die Zugabe erfolgte zu dem Zeitpunkt null Stunden. NAD<sup>+</sup>: Dreiecke. Nicotinsäure: Kreise.

### Diskussion

Beim Vergleich von Abbildung 4.3 mit Abbildung 4.4 ist auffällig, dass in keinem der Ansätze eine Änderung der intrazellulären NAD<sup>+</sup>-Konzentration innerhalb einer Stunde zu bemerken ist, obwohl in dem Ansatz mit NAD<sup>+</sup>-Zugabe die vorgelegte NAD<sup>+</sup>-Konzentration in der selben Zeit deutlich abnimmt. Mögliche Erklärungen für diese Beobachtungen sollen nachfolgend erörtert werden.



**Abbildung 4.4:** Verlauf der intrazellulären (a) NAD<sup>+</sup>- und (b) Nicotinsäurekonzentration für einen Ansatz, dem NAD<sup>+</sup> zugegeben wurden (geschlossene Symbole) im Vergleich zu einem Referenzansatz ohne Zugabe (offene Symbole). Die Zugabe erfolgte zu dem Zeitpunkt null Stunden. NAD<sup>+</sup>: Quadrate. Nicotinsäure: Kreise.

NAD<sup>+</sup> könnte mit dem Puffer wechselwirken und hydrolysiert werden. Dem widersprechen Literaturdaten, dass NAD<sup>+</sup> im sauren (Peters, 1998) bis neutralen Milieu stabil sein soll (Richard *et al.*, 1993), sowie die Beobachtung, dass die photometrische Bestimmung einer (eingefrorenen) wässrigen NAD<sup>+</sup>- und NADP<sup>+</sup>-Lösung über 20 Tage keinen Anlass zur Infragestellung der Stabilität von NAD<sup>+</sup> gab (ohne Abbildung).

Neben der chemischen Veränderung wäre auch eine biochemische Veränderung denkbar. Da mit abnehmendem NAD<sup>+</sup> im Puffer auch Nicotinsäure in dem Puffer zu detektieren ist, ist die Möglichkeit der enzymatischen Bildung von Nicotinsäure aus NAD<sup>+</sup> zu überprüfen. Wie in Kapitel 3.2.8 und Abbildung 3.24 ausgeführt, wäre dies über die Aktivität von beispielweise Sir2p und Pnc1p innerhalb des Pyridin-Kreislaufs möglich. In diesem Fall müssten jedoch die Enzymaktivitäten außerhalb der Zelle auftreten. Eine extrazelluläre NAD<sup>+</sup>-Glycohydrolase- und Nicotinamid-Deamidase-Aktivität könnten für die Bildung von Nicotinsäure aus NAD<sup>+</sup> verantwortlich sein. Dabei ist unklar, ob diese Enzyme in das umgebende Medium abgegeben werden, oder ob sie auf der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert sind. Eine NAD-Glycohydrolase-Aktivität wird von Gulyamova *et al.* (2001) im Zellkern beschrieben, ist aber keinem Gen zuzuordnen ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). Die Existenz einer Nicotinamid-Deamidase ist beschrieben (Oka, 1954; Sundaram *et al.*, 1960), jedoch werden die Peroxisomen (Anderson *et al.*, 2003; Huh *et al.*, 2003), der Zellkern und das Cytosol als Wirkungsort genannt (Anderson *et al.*, 2003). Die gesammelten Daten geben Anlass, die Existenz einer NAD<sup>+</sup>-Glycohydrolase- und Nicotinamid-Deamidase-Aktivität außerhalb der Zellmembran zu vermuten, eine molekularbiologische Untersuchung steht aus. Xu *et al.* (2000) charakterisieren in diesem Zusammenhang eine NADH-Pyrophosphatase in *S. cerevisiae*, die bevorzugt NADH zu NMNH und AMP umsetzt, mit deutlich geringerer Effizienz jedoch auch NAD<sup>+</sup> umsetzt. Die NADH-Pyrophosphatase wird mit dem NAD<sup>+</sup>-Abbau im Periplasma in Zusammenhang gebracht ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). Da mit der analytischen Methode NMN nicht detektiert werden kann, ist nicht abzuschätzen, ob obige Vermutung durch eine mögliche Aufnahme von NMN und oder den weiteren Abbau zu Nicotinamid oder Nicotinsäure entkräftet wird.

Dass solche Mechanismen in Mikroorganismen möglich sind, ist in der Literatur für Bakterien beschrieben. Gholson *et al.* (1969) schließen aus ihren Beobachtungen, dass exogenes NAD<sup>+</sup> von *Escherichia coli* nicht *per se* verwendet wird, sondern über den Pyridin-Kreislauf aufgenommen wird. Dazu stellen Hillyard *et al.* (1981) fest, dass *E. coli* verschiedene Enzymsätze für den Abbau von intrazellulärem und extrazellulärem NAD<sup>+</sup> besitzt. Beim Abbau von intrazellulärem NAD<sup>+</sup> kann dieses über NMN (Nicotinamidmononucleotid), NaMN (Nicotinsäuremononucleotid) und NaAD (Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid) wieder zu NAD<sup>+</sup> synthetisiert werden. Im Gegensatz dazu wird extrazelluläres NAD<sup>+</sup> zu einer Mischung von Nicotinamid und Nicotinsäure

abgebaut. Von den betreffenden Enzymen wird angenommen, dass sie sich in der Zellwand befinden und ihr aktives Zentrum außen haben. In dem Bakterium *Haemophilus influenzae* ist an der Aufnahme von NAD<sup>+</sup> eine NAD<sup>+</sup>-Nucleotidase beteiligt (Reidl *et al.*, 2000).

Das oben gezeigte Bild wird etwas durch die Schwankungen der intra- und extrazellulären NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen in den ersten 20 Minuten der Beobachtung getrübt. Der Anstieg der NAD<sup>+</sup>-Konzentration zwischen dem Zugabezeitpunkt und drei Minuten nach der Zugabe könnte darin begründet sein, dass zum Zeitpunkt der ersten Probenahme mit bzw. unmittelbar nach der NAD<sup>+</sup>-Zugabe die Verteilung noch nicht homogen war. Ansonsten könnten die Schwankungen auf die oben genannten Wechselwirkungen zwischen Organismus und NAD<sup>+</sup> zurückgeführt werden, wobei Nicotinsäure davon eher unberührt erscheint. Möglicherweise spielt auch das Probenahmeintervall eine Rolle. Innerhalb von einer Minute müssen zeitgleich zwei Proben genommen und verarbeitet werden, und eine Beeinträchtigung kann durch diese Umstände nicht ausgeschlossen werden. Letztlich kann den Schwankungen kein eindeutiger Grund zugeordnet werden. Da diese sich jedoch um einen Wert von 0,25 mM bewegen, ist eher mit durchführungsbedingten Gründen als mit biologischen Ursachen zu rechnen. Die Abreicherung von NAD<sup>+</sup> ist in den ersten 20 Minuten nicht so deutlich wie in den weiteren 40 Minuten. Die Abreicherung an sich wird durch die anfänglichen Schwankungen nicht in Frage gestellt. Extrazellulär und intrazellulär wurden zusätzlich ADP-Ribose, AMP, NaMN und NaAD untersucht. Bei diesen Metaboliten konnten entweder keine Unterschiede zwischen den Ansätzen mit oder ohne NAD-Zugabe erkannt werden, oder ein Messsignal war zu schwach zu einer Auswertung. Daher ist kein Hinweis auf einen möglichen Mechanismus aus den Daten abzuleiten.

Da es innerhalb einer Stunde zu keiner Änderung der intrazellulären NAD<sup>+</sup>-Konzentration kommt, ist die direkte Aufnahme von NAD<sup>+</sup> aus dem Medium unwahrscheinlich. Sollte es bei längerer Beobachtung doch zu einer Anreicherung kommen, würde dies eher auf eine Anreicherung durch Neusynthese hindeuten, was mit der Aufnahme/Verwendung kleinerer Moleküle (z. B. Nicotinsäure) in Verbindung gebracht werden kann. In diesem Zusammenhang wird am Beispiel des Bakteriums *Haemophilus influenzae* genannt, dass NAD<sup>+</sup> wohl aufgrund der hohen Polarität vor dem Passieren der Plasmamembran u. a. zu NMN hydrolysiert werden muss (Reidl *et al.*, 2000).

Ähnliche Beobachtungen wurden in mehreren, unabhängig durchgeführten Experimenten gemacht. Jedoch muss gesagt werden, dass seitens der Analytik nicht immer alle in Frage

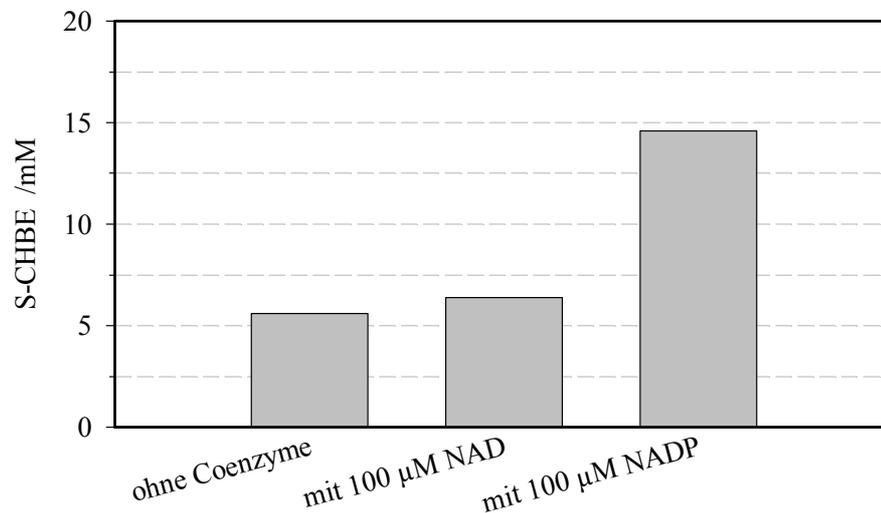
kommenden Metabolite detektiert und in die Betrachtung einbezogen werden konnten. Die Verläufe des intrazellulären und extrazellulären NAD<sup>+</sup> entsprechen sich jedoch bei allen Durchführungen. Natürlich muss bei dieser Betrachtung auch die Existenz eines nach Todisco *et al.* (2006) analogen Transmembrantransporters in der Plasmamembran hinterfragt werden. Sollte sich ein solch analoges Transporterprotein in der Zellmembran befinden, deuten die Daten auf eine geringe Aktivität hin bzw. auf Bedingungen, die eine mögliche Aktivität unterbinden.

Hinsichtlich einer Ganzzell-Biokatalyse ist unter Annahme der Impermeabilität der Plasmamembran für NAD<sup>+</sup> der Schutz der Zellmembran in jedem Einzelfall zu überprüfen. Eine intakte Zellmembran könnte unter Umständen dann der Aufnahme von NAD<sup>+</sup> aus dem Reaktionspuffer entgegenwirken. Möglicherweise könnte in diesen Fällen die Zugabe von Nicotinsäure oder Nicotinamid zu einer Steigerung der intrazellulären NAD<sup>+</sup>-Konzentration führen.

Eine ähnliche Aussage könnte auch für NADP<sup>+</sup> zutreffen. Beobachtungen, dass in einem Zeitraum von drei Stunden die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>- und NADP<sup>+</sup>-Konzentration unverändert blieb, obwohl es zu einem Abfall der NADP<sup>+</sup>-Konzentration kam, lassen vermuten, dass der zu beobachtende Anstieg der NAD<sup>+</sup>-Konzentration mit letzterem im Zusammenhang stehen kann. Der Reaktionslösung wurden NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup> zugegeben, erstere stieg über die eingestellte Konzentration an, letztere sank darunter. Somit wäre nach einer NADP<sup>+</sup>-Phosphatase-Aktivität im extrazellulären Raum zu suchen. Eine Phosphatase-Aktivität wurde in den Mitochondrien beschrieben (Bernofsky und Utter, 1968), aber bisher noch keinem Gen zugeordnet ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). Somit steht eine Lokalisierung noch aus. Letztlich geben die Daten aber einen Hinweis, dass auch NADP<sup>+</sup> nicht als ganzes Molekül in *S. cerevisiae* FasB His6 aufgenommen werden kann. Zur Aufnahme von NADP<sup>+</sup> besitzt das Bakterium *Haemophilus influenzae* die NADP<sup>+</sup>-spezifische Phosphatase e(P4) (Reidl *et al.*, 2000). Da diese Untersuchungen zur NAD(P)<sup>+</sup>-Aufnahme mit handelsüblicher Backhefe durchgeführt wurden, könnten o. g. Beobachtungen auch auf *S. cerevisiae* FasB His6 zutreffen.

### 4.3 Biotransformation mit Coenzymzugabe

Innerhalb der Erörterung der Bedeutung der Coenzyme für die Biotransformation und der Charakterisierung des Biokatalysators soll in diesem Kapitel auf die Biotransformation mit Coenzymzugabe eingegangen werden. Da die Coenzym-Konzentration während einer Biotransformation sinken (Griffin *et al.*, 2001) und die Coenzym-Zugabe die Halbwertszeit des Biokatalysators verlängern kann (Engelking, 2004), sollen der Einsatz von Coenzymen bei der Biotransformation näher untersucht werden. In Abbildung 4.5 ist der Einsatz von Coenzymen bei einer Biotransformation zusammengefasst.



**Abbildung 4.5:** Einfluss der Coenzymzugabe bei der Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE mittels *S. cerevisiae* FasB His6. In einem einphasigen Ansatz wurde eine Biotrockenmassekonzentration von 20 g L<sup>-1</sup> mit 100 mM 4-Cl-ACE für 19 Stunden inkubiert.

Aus Abbildung 4.5 ist zu sehen, dass in diesem Beispiel in einem rein wässrigen Ansatz ohne Coenzymzugabe eine S-CHBE-Konzentration von knapp 6 mM erzielt wird. Diese steigt leicht über 6 mM an, wenn zu dem Ansatz NAD<sup>+</sup> als Coenzym zugegeben wird. Ein deutlicher Anstieg der Produktkonzentration auf 14,6 mM ist zu verzeichnen, wenn NADP<sup>+</sup> als Coenzym dem Ansatz zugegeben wird.

### *Diskussion*

Für die stereoselektive Reduktion von 4-Cl-ACE zu S-CHBE ist die überexprimierte Fettsäuresynthase von *Saccharomyces cerevisiae* verantwortlich. Aus Abbildung 4.5 wird deutlich, dass nur  $\text{NADP}^+$  einen Effekt hat. Dies bestätigt die Präferenz der Fettsäuresynthase für  $\text{NADP}^+$  als Elektronenüberträger (Lynen *et al.*, 1964). Eine Steigerung der Produktkonzentrationen durch Zugabe von  $\text{NADP}^+$  konnte auch schon in anderen Arbeiten beobachtet werden (Engelking, 2004; Pfründer, 2005). Eine Verknüpfung der Steigerung der Produktkonzentration mit der  $\text{NADP}^+$ -Konzentration ist nicht von der Hand zu weisen.

Unter Berücksichtigung der in Kapitel 4.2 gemachten Beobachtungen und getroffenen Annahmen ist jedoch die Erklärung dieses Zusammenhangs erschwert. Sollte  $\text{NADP}^+$  außerhalb der Zelle zu  $\text{NAD}^+$  und u. a. weiter zu Nicotinsäure abgebaut und durch anschließende Neusynthese in der Zelle aus Nicotinsäure aufgebaut werden, wäre anzunehmen, dass zwischen dem Ansatz mit  $\text{NAD}^+$ -Zugabe und  $\text{NADP}^+$ -Zugabe kein zu großer Unterschied bestehen sollte. Des weiteren ist zu beobachten, dass die Zugabe von  $\text{NADP}^+$  zu einem zweiphasigen Biotransformationsansatz zu einer unmittelbaren Steigerung der  $\text{NADP}^+$ -Konzentration in der Zelle führt (ohne Abbildung). Die genannten Argumente stellen die Anwendbarkeit der im vorangegangenen Kapitel getroffenen Annahme in Frage.

Da allerdings diese Untersuchungen ohne Substratzugabe erfolgten, kann in diesem Unterschied eine Erklärung begründet sein. Der direkte Anstieg der  $\text{NADP}^+$ -Konzentration nach der Zugabe, sowie die Effektivität der  $\text{NADP}^+$ -Zugabe deuten auf einen unmittelbaren Einfluss hin. Dieser kann nur erfolgen, wenn  $\text{NADP}^+$  als ganzes Molekül die Zellmembran passieren kann. Dies hätte zur Folge, dass das Substrat die Membranintegrität angreift und reduziert. Dies wurde von Pfründer (2005) untersucht und bestätigt. Murata *et al.* (1981) behandelten die eingesetzten *S. cerevisiae* Zellen mit Toluol, um den Stofftransport über die Membran zu verbessern und ermöglichten so einen Austausch von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  zwischen Cytosol und Reaktionsmedium. Anhand der Beobachtungen ist anzunehmen, dass durch die Substratzugabe die Zellmembran angegriffen und permeabilisiert wird. Somit ist ein direktes Eindringen von  $\text{NADP}^+$  unter den Bedingungen der Biotransformation in die Zelle möglich. Bleibt die Zellmembran unbeschädigt, erscheint eine direkte Aufnahme wie in Kapitel 4.2 beschrieben erschwert.

Unter diesen Gesichtspunkten wäre in jedem Einzelfall abzuwägen, ob das Substrat zwar die Zellmembran angreifen und so aber die unmittelbare Wirkung der zugegebenen Coenzyme am Produktionsenzym verbessern kann, oder ob durch den Schutz der Membran vor Schädigungen durch Substrat oder organische Phase durch Verwendung beispielsweise ionischer Flüssigkeiten nicht der unmittelbare Effekt der zugegebenen Coenzyme eingeschränkt werden kann. Da der Einsatz ionischer Flüssigkeiten u. a. darauf abzielt, die Membran des Biokatalysators unbeschädigt zu erhalten (Pfründer, 2005), könnte sich in dem Fall, wenn dadurch auch kein schädigender Einfluss des Substrates zu erwarten ist, die Verwendung Coenzym-angereicherter Biokatalysatoren anbieten. Auf Untersuchungen zur Coenzym-Anreicherung in Biokatalysatoren wird in den folgenden Kapiteln 5 hinsichtlich  $\text{NAD}^+/\text{H}$  und in Kapitel 6 hinsichtlich  $\text{NADP}^+/\text{H}$  eingegangen.

#### 4.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel sollten die Eigenschaften des eingesetzten Beispielorganismus hinsichtlich der Biotransformation in Verbindung mit einem möglichen Coenzym-Einfluss erarbeitet werden. Die durchgeführten Untersuchungen geben Anlass zur Vermutung, dass unter den gewählten Bedingungen aktiv wachsende Hefen *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 am geeignetsten zur Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE erscheinen. Ein optimaler Erntezeitpunkt kann bestimmt werden. Eine  $\text{NADP}^+$ -Abhängigkeit der Fettsäuresynthase, des Produktionsenzym, konnte biochemisch veranschaulicht werden und wird bei der  $\text{NADP}^+$ -Zugabe zu der Biotransformation von 4-Cl-ACE mit *S. cerevisiae* FasB His6 durch Steigerung der Produktkonzentration deutlich. Mit der Zugabe geht ein unmittelbarer Anstieg der intrazellulären  $\text{NADP}^+$ -Konzentration einher. Die Permeabilität der Plasmamembran für  $\text{NADP}^+$  (und  $\text{NAD}^+$ ) kann durch das Substrat 4-Cl-ACE verursacht sein, da ohne dies die Zellmembran impermeabel für  $\text{NAD}^+$  und/oder  $\text{NADP}^+$  erscheint. Nach der Coenzym-Zugabe sinkt die Konzentration zwar im Reaktionspuffer (ohne Substrat), jedoch ist innerhalb einer Stunde keine Veränderung der intrazellulären  $\text{NAD(P)}^+/\text{H}$ -Konzentration zu verfolgen. Möglicherweise wird unter diesen Bedingungen  $\text{NAD}^+$  (oder  $\text{NADP}^+$ ) außerhalb der Zelle abgebaut, eines oder mehrere dieser Abbauprodukte über die Membran aufgenommen und in die Biosynthese von  $\text{NAD(P)}^+$  an der entsprechenden Stelle eingespeist. Eine mögliche Diskrepanz zwischen Produktsteigerung durch Unterstützung der Coenzym-Versorgung einerseits und Erhaltung der Zellintegrität auf der anderen Seite könnte durch den Einsatz von Biokatalysatoren umgangen werden, die zum Erntezeitpunkt eine erhöhte Coenzym-Konzentration in der Zelle aufweisen. Folglich soll die Möglichkeit einer Coenzym-Anreicherung in einem Biokatalysator hinsichtlich  $\text{NAD}^+/\text{H}$  in Kapitel 5 und hinsichtlich  $\text{NADP}^+/\text{H}$  in Kapitel 6 untersucht werden.

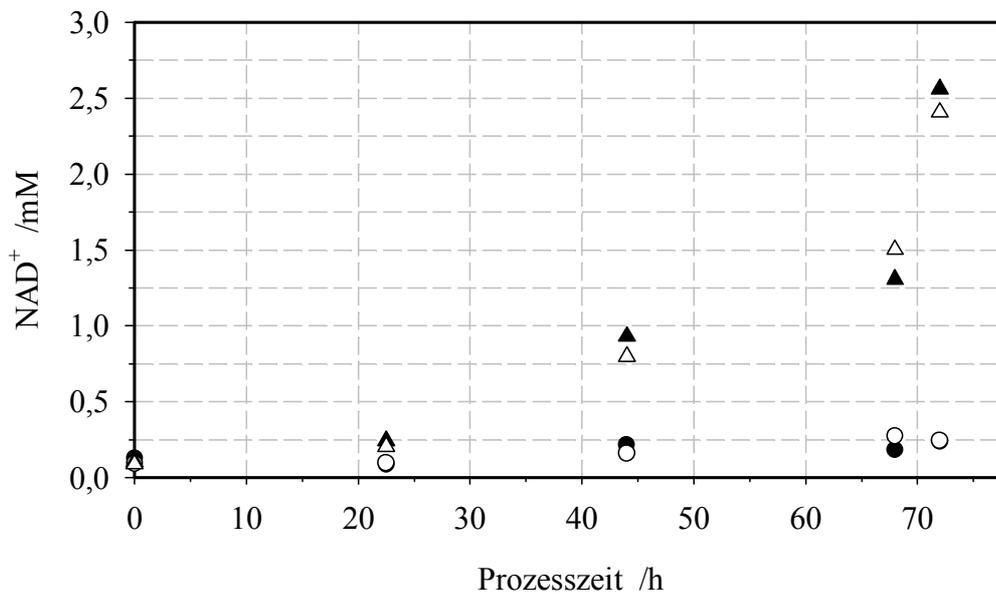
## **5 Untersuchungen zur Anreicherung von NAD<sup>+</sup>/H in *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6**

Aus den Untersuchungen im vorangegangenen Kapitel wurde mehrfach ein Zusammenhang zwischen Coenzymkonzentration im Biokatalysator und Produktbildung bei dessen Einsatz in einer Biotransformation sichtbar. Da Coenzym-angereicherte Biokatalysatoren möglicherweise zu einer Steigerung der Produktbildung beitragen können, soll zur Überprüfung dieser Hypothese im Vorfeld die Möglichkeit zur intrazellulären Anreicherung von Coenzymen untersucht werden. Dabei soll in diesem Kapitel erarbeitet werden, ob und wie eine Anreicherung mit NAD<sup>+</sup>/H erreicht werden kann. In Kapitel 5.1 wird die Ausgangssituation beschrieben, bevor in Kapitel 5.2 die NAD<sup>+</sup>/H-Anreicherung in wachsenden Zellen im Parallelansatz erörtert wird. Nach der reaktionstechnischen Untersuchung der NAD<sup>+</sup>/H-Anreicherung in Kapitel 5.3 gibt Kapitel 5.4 eine Zusammenfassung. Innerhalb jedes Unterkapitels werden jeweils zuerst die Ergebnisse dargestellt und im Anschluß diskutiert.

### **5.1 Darstellung der Ausgangssituation**

Die in diesem Kapitel beschriebenen Arbeiten basieren auf den Beobachtungen von Sakai *et al.* (1973b), die darstellen, dass die Zugabe von NAD<sup>+</sup>-Vorstufen zu einer Anreicherung von NAD<sup>+</sup> in ruhenden Zellen einer Backhefe führen kann.

Nach dem Protokoll von Sakai *et al.* (1973b) wurden die Untersuchungen mit kommerziell erhältlicher Backhefe (Wieninger Hefewerke) durchgeführt, als NAD<sup>+</sup>-Vorstufen kamen Adenin und Nicotinsäure zum Einsatz. Die Beobachtungen sind in Abbildung 5.1 zusammengestellt.



**Abbildung 5.1:** Einfluss der NAD<sup>+</sup>-Vorstufen Adenin und Nicotinsäure auf die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>-Konzentration ruhender Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*). Adenin wurde zu einer Konzentration von 3 g L<sup>-1</sup> und Nicotinsäure zu 6 g L<sup>-1</sup> vorgelegt. Der Volumenanteil der Zellen wurde aus der Biotrockenmassekonzentration berechnet. Der Referenzansatz ist mit Kreisen, der Untersuchungsansatz mit Dreiecken dargestellt. Jeder Ansatz wurde zweifach durchgeführt.

In Abbildung 5.1 ist der Einfluss der NAD<sup>+</sup>-Vorstufen Adenin und Nicotinsäure auf die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>-Konzentration ruhender Hefezellen *Saccharomyces cerevisiae* (Dreiecke) im Vergleich zu einem Referenzansatz ohne Zugabe (Kreise) dargestellt. Jeder Ansatz wurde zweifach durchgeführt. In beiden Fällen ist deutlich, dass die Doppelbestimmungen jeweils zu entsprechenden Werten führen. Weiterhin ist zu erkennen, dass mit zunehmender Inkubationszeit die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>-Konzentration in den Ansätzen mit Zusätzen im Vergleich zu den Referenzansätzen deutlich zunimmt. Während der 72 stündigen Inkubation ändert sich die NAD<sup>+</sup>-Konzentration in den Referenzansätzen von 0,11 mM vernachlässigbar auf 0,24 mM. In den Ansätzen mit Zusätzen werden ausgehend von 0,10 mM NAD<sup>+</sup> Endwerte von ca. 2,5 mM erreicht. Im Medium ist in keinem Ansatz NAD<sup>+</sup> zu detektieren. In den Ansätzen mit Zusätzen bleibt die Biotrockenmassekonzentration während des gesamten Verlaufs stabil auf Werten von ca. 165 g L<sup>-1</sup>. In den Referenzansätzen sind etwas größere Schwankungen der Biotrockenmassekonzentrationen um ca. 150 g L<sup>-1</sup> zu bemerken (ohne Abbildung).

*Diskussion*

Aus Abbildung 5.1 ist zu erkennen, dass im Medium vorgelegte NAD<sup>+</sup>-Vorstufen zu einer Anreicherung von NAD<sup>+</sup> in ruhender Bäckerhefe führen können. Es kann daraus gefolgert werden, dass die Bäckerhefe ein geeigneter Organismus zur Anreicherung von NAD<sup>+</sup> aus Vorstufen ist. Diese Beobachtungen bestätigen die von Sakai *et al.* (1973b) gemachten Beobachtungen. Desweiteren kann gefolgert werden, dass *Saccharomyces cerevisiae* ein geeigneter Organismus zur Untersuchung der Anreicherung von NAD<sup>+</sup>/H sein kann.

Aus den gleichartigen Doppelbestimmungen ist ersichtlich, dass die gewählten Aufarbeitungsschritte und Analysen (innerhalb einer Messung) zu reproduzierbaren Ergebnissen führen und zukünftig Anwendung finden können. Beim Vergleich der Ausgangskonzentrationen ist zu sagen, dass diese hier um den Faktor 3 bis 4 unter den von Sakai *et al.* (1973b) angegebenen liegen, die erzielten Endkonzentrationen entsprechen weniger als der Hälfte der von Sakai *et al.* (1973b) angegebenen Werte. In dem vorliegenden Fall ist nach 72 Stunden mindestens eine Verzwanzigfachung der intrazellulären NAD<sup>+</sup>-Konzentration eingetreten. Sakai *et al.* (1973b) geben eine Steigerung um den Faktor 15 an. Die Unterschiede in dem Ausmaß der Konzentrationssteigerung mögen in dem jeweils eingesetzten Backhefestamm sowie in dessen Lagerung liegen, können aber auch in der experimentellen Durchführung begründet sein. Im Rahmen dieser Untersuchungen ist aufgefallen, dass die Verfügbarkeit der Zusätze einen Einfluss auf die Anreicherung haben kann. Durch saure Aufnahme der Zusätze und anschließender *pH*-Einstellung konnte deren Lösung bewirkt und im weiteren Verlauf der Inkubation erhalten werden. Bei Sakai *et al.* (1973b) sind derartige Informationen nicht zu entnehmen. Da die Zusätze in Lösung vorliegen, ist eine Limitierung der Verfügbarkeit nicht anzunehmen. Andere mit der Änderung des Protokolls in Verbindung stehende Einflüsse können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* scheint ein geeigneter Organismus zur Erörterung der NAD<sup>+</sup>/H-Anreicherung zu sein. Es ist nun zu prüfen, ob dies auch auf wachsende *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 Kulturen übertragbar ist.

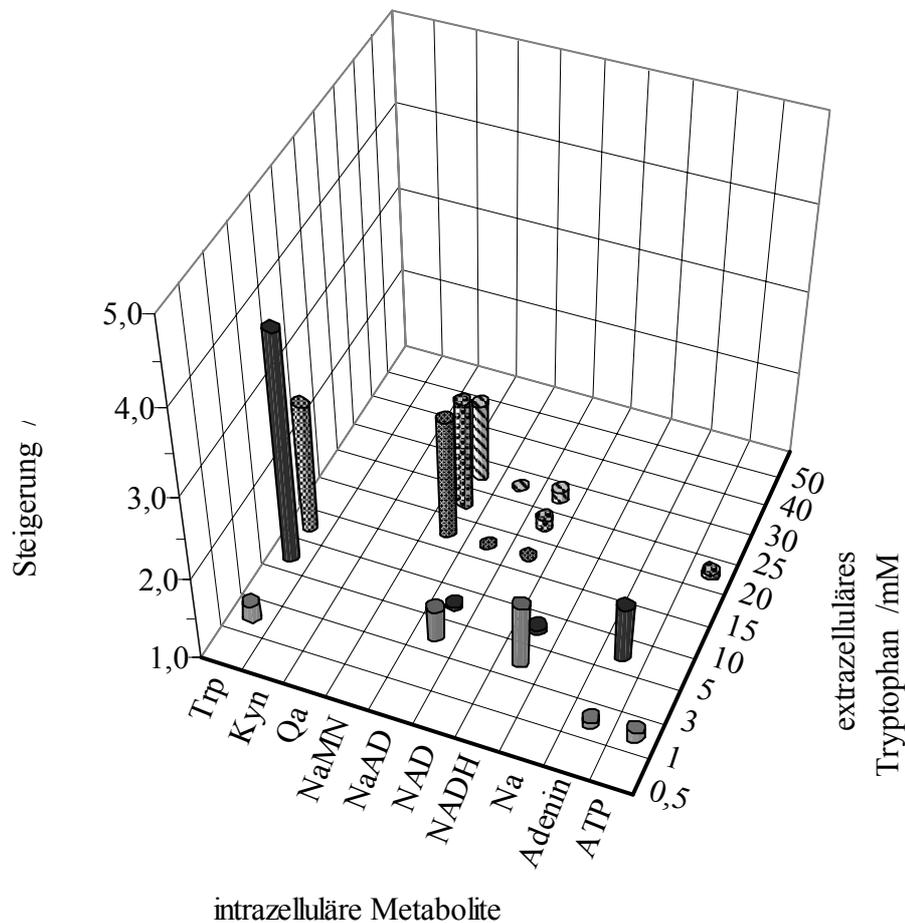
## 5.2 Voruntersuchungen im Parallelansatz

In diesem Kapitel soll überprüft werden, ob die Biosynthese von NAD<sup>+</sup>/H in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 auch während des Wachstums durch bestimmte Zusätze beeinflusst werden kann. Die Kultivierungen werden nach einem Protokoll von Engelking (2004) durchgeführt und dienen der Ermittlung geeigneter Substanzen. Zu unterscheiden ist zwischen Einzelzugaben und Kombinationen mehrerer Substanzen. Im Folgenden sind die Beobachtungen hinsichtlich der Auswirkung der Zugabe einer Substanz zum Nährmedium dargestellt und werden im Anschluß diskutiert. Die Auswahl der Zusätze richtete sich nach der kommerziellen Verfügbarkeit und nach ökonomischen Gesichtspunkten. Die Konzentrationsstufen wurden ausgehend von Sakai *et al.* (1973b) deutlich nach unten und geringfügig nach oben erweitert. Wenn die Sättigungsgrenze überschritten wurde, ist das in den Ausführungen angegeben.

### 5.2.1 Akkumulation von NaMN in wachsenden Kulturen

In diesem Abschnitt werden die Beobachtungen bei der Zugabe von Tryptophan, Chinolinsäure, Nicotinsäure und Nicotinamid in Abbildung 5.2 bis Abbildung 5.5 dargestellt und im Anschluss diskutiert.

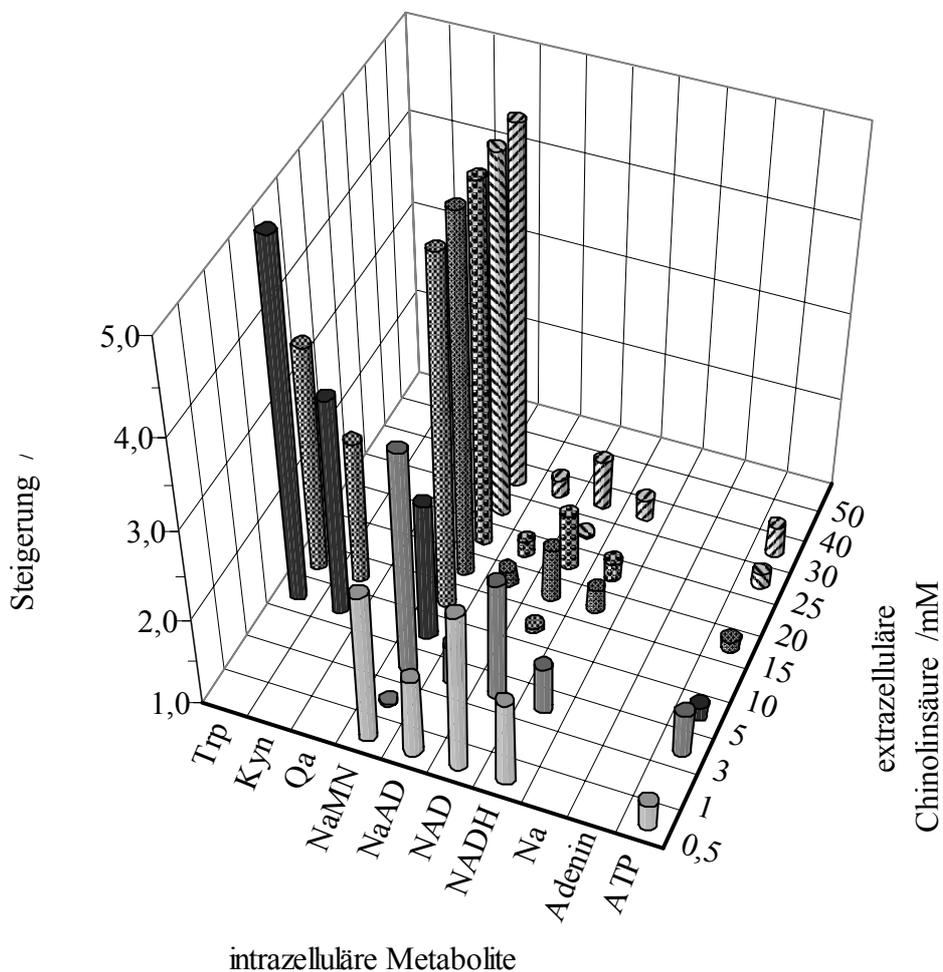
In Abbildung 5.2 ist der Effekt der Zugabe variierender TRYPTOPHAN-Konzentrationen auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup> und NADH als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Tryptophan graphisch zusammengefasst.



**Abbildung 5.2:** Einfluss variierender Tryptophan-Konzentrationen auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup> und NADH als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Tryptophan nach 72 Stunden Kultivierung. Auf der x-Achse sind Metabolite des Synthesewegs aufgezeigt, auf der y-Achse ist die Tryptophan-Konzentration im Medium beim Animpfen dargestellt. Der Effekt der Zugabe ist auf der z-Achse aufgetragen.

In Abbildung 5.2 ist zu erkennen, dass bei einer Konzentration von 5 und 10 mM Tryptophan eine deutliche Steigerung der intrazellulären Tryptophan-Konzentration festzustellen ist. Neben punktuellen Konzentrationssteigerungen von NaAD und NADH bei 3 mM Tryptophan fällt eine Verdopplung der NaMN-Konzentration bei Tryptophan-Konzentrationen zwischen 15 und 25 mM auf. Die Werte für NAD<sup>+</sup> sind weitestgehend unverändert. In allen Ansätzen liefern die Biomassekonzentrationen Werte im Bereich des Referenzansatzes zwischen 14 und 16 g L<sup>-1</sup>.

Bei der Zugabe von CHINOLINSÄURE in unterschiedlichen Konzentrationen ist zu beobachten, dass diese in den Untersuchungsansätzen zu keiner Änderung der Biotrockenmassekonzentrationen führt. Alle Werte bewegen sich in einem Bereich zwischen 14 und 16 g L<sup>-1</sup>. Die Auswirkung von Chinolinsäure auf die intrazellulären Konzentrationen von NAD<sup>+</sup> und NADH und anderer Zwischenprodukte ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Wiederum ist der Effekt von Chinolinsäure als Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Chinolinsäure aufgezeigt.

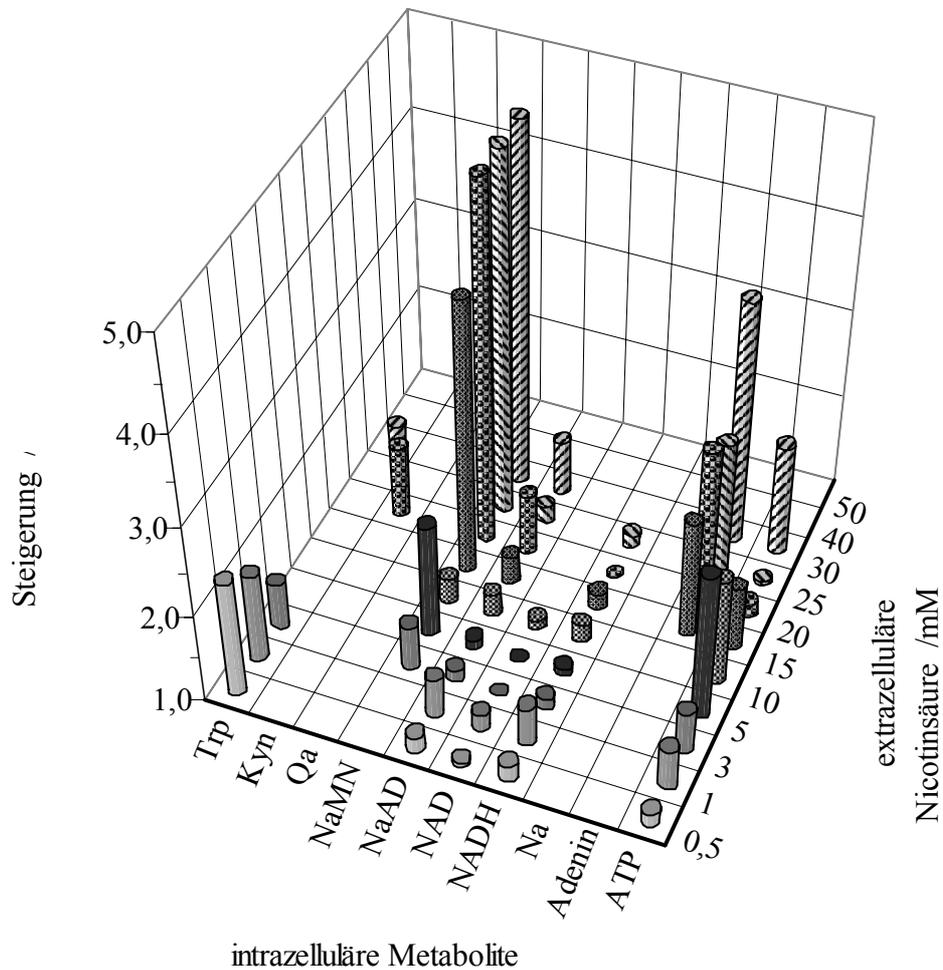


**Abbildung 5.3: Einfluss variierender Chinolinsäure-Konzentrationen auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup> und NADH als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Chinolinsäure nach 72 Stunden Kultivierung. Auf der x-Achse sind Metabolite des Synthesewegs aufgezeigt, auf der y-Achse ist die Chinolinsäure-Konzentration im Medium beim Animpfen dargestellt. Der Effekt der Zugabe ist auf der z-Achse aufgetragen.**

Bei der Zugabe von Chinolinsäure sind drei Bereiche auffällig. In einem Konzentrationsbereich über 5 mM ist zwischen den gemessenen NaMN-Konzentrationen und den Konzentrationen der Folgeprodukte ein sehr deutlicher Unterschied zu erkennen. Obwohl eine bis zu 16-fache NaMN-Konzentration in der Zelle vorliegt, bleiben die 1,5-fachen Steigerungen der Folgeprodukte weit zurück. In diesem Bereich kommt es zu einer deutlichen Akkumulation von NaMN. In einem Konzentrationsbereich bis 3 mM sind zwar auch deutlich erhöhte NaMN-Konzentrationen zu messen, in diesem Ausmaß erhöhte NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen sind jedoch nur in diesem Konzentrationsbereich zu erkennen. Bei den Konzentrationsstufen 5 und 10 mM Chinolinsäure sind zusätzlich zu einer NaMN-Akkumulation gesteigerte Konzentrationen von Tryptophan und Kynurenin zu messen. ATP tritt nur punktuell mit moderaten Konzentrationssteigerungen auf.

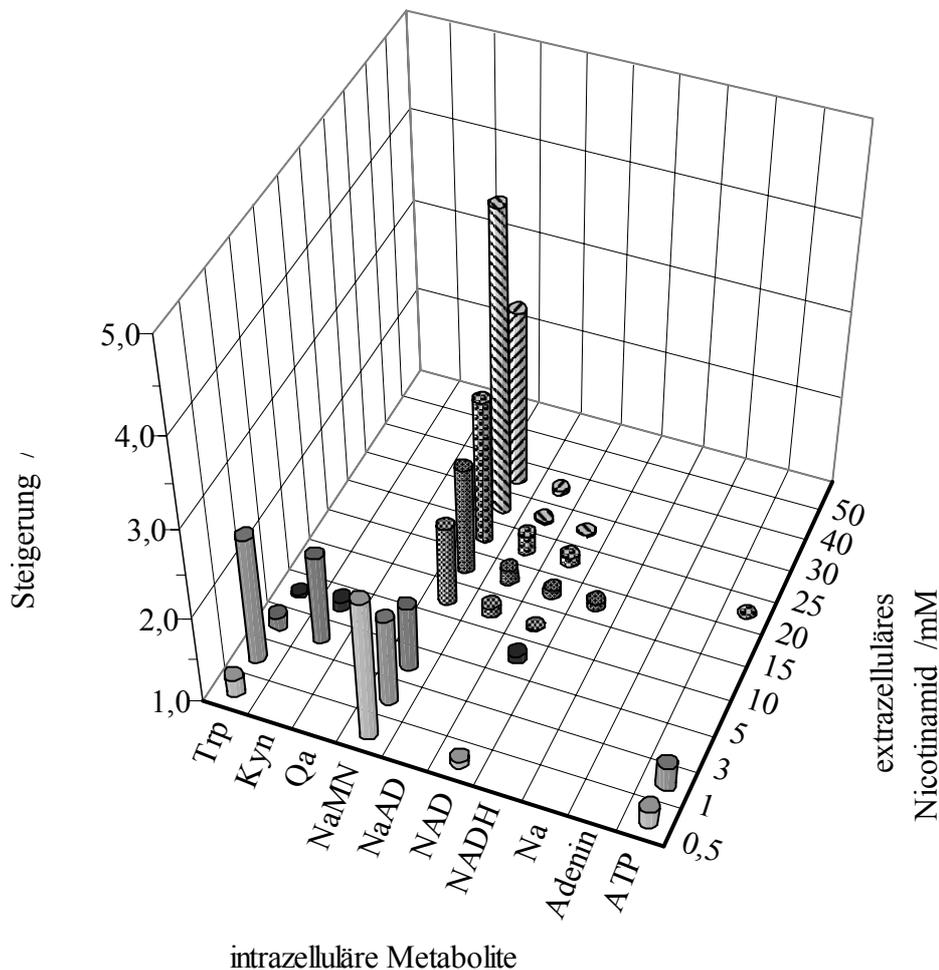
Der Einfluss verschiedener NICOTINSÄURE-Konzentrationen auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup> und NADH in *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 ist in Abbildung 5.4 wiedergegeben. Der Effekt von Nicotinsäure ist als Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Nicotinsäure dargestellt.

In Abbildung 5.4 kann der Einfluss der Nicotinsäure-Konzentration auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup> und NADH in zwei Bereichen beschrieben werden. In einem Konzentrationsbereich bis 1 mM können leichte Steigerungen von NaAD, NAD<sup>+</sup> und NADH ausgemacht werden. Eine Ansammlung von Tryptophan in der Zelle ist auszumachen, wohingegen die Konzentration von NaMN gegenüber der Referenz nicht erhöht ist.



**Abbildung 5.4:** Einfluss variierender Nicotinsäure-Konzentrationen auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup> und NADH als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Nicotinsäure nach 72 Stunden Kultivierung. Auf der x-Achse sind Metabolite des Synthesewegs aufgezeigt, auf der y-Achse ist die Nicotinsäure-Konzentration im Medium beim Animpfen dargestellt. Der Effekt der Zugabe ist auf der z-Achse aufgetragen.

In einem Konzentrationsbereich ab 15 mM Nicotinsäure im Medium fallen deutlich angestiegene NaMN-Konzentrationen in der Zelle auf. Nur das direkte Folgeprodukt NaAD sammelt sich in diesen Ansätzen noch leicht an, die Veränderungen der weiteren Produkte sind unauffällig. Im mittleren Konzentrationsbereich ist eine Verdoppelung der intrazellulären ATP-Konzentration zu verzeichnen, bei noch höheren Konzentrationen kann Adenin mindestens in doppelter Konzentration im Vergleich zum Referenzansatz gemessen werden. Die erzielten Biotrockenmassekonzentrationen liegen in allen Ansätzen in einem Bereich zwischen 14 und 16 g L<sup>-1</sup>.



**Abbildung 5.5:** Einfluss variierender Nicotinamid-Konzentrationen auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup> und NADH als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Nicotinamid nach 72 Stunden Kultivierung. Auf der x-Achse sind Metabolite des Synthesewegs aufgezeigt, auf der y-Achse ist die Nicotinamid-Konzentration im Medium beim Animpfen dargestellt. Der Effekt der Zugabe ist auf der z-Achse aufgetragen.

Bei der Vorlage steigender NICOTINAMID-Konzentrationen ist in den Absolutwerten der Biotrockenmassekonzentration keine wesentliche Änderung festzustellen, jedoch geht damit ein Anstieg des mittleren Zelldurchmessers von 4,7 auf 5,8 µm einher. Der Einfluss der Nicotinamid-Konzentration auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup> und NADH kann Abbildung 5.5 entnommen werden. Es ist zu sehen, dass die NAD<sup>+</sup>-Werte in den Ansätzen mit variierender Nicotinamid-Konzentration die des Referenzansatzes kaum übersteigen. Am auffälligsten ist die Ansammlung von NaMN in der Zelle, die fast unabhängig von der vorgelegten Nicotinamid-Konzentration auftritt. Bei geringen Nicotinamid-

Konzentrationen bis 3 mM fällt zusätzlich eine leichte Akkumulation von Tryptophan und Kynurenin auf. Die anderen Metabolite verhalten sich unauffällig.

### *Diskussion*

Bei der Untersuchung des Einflusses von Tryptophan, Chinolinsäure, Nicotinsäure und Nicotinamid auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup>/H ist allen vier Substanzen gemein, dass sie in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 unter den gewählten Bedingungen in erster Linie zu einer Akkumulation von NaMN in der Zelle führen. Mögliche Erklärungen für diese Beobachtungen sollen im Folgenden betrachtet werden.

Da in manchen Ansätzen des in Abbildung 5.2 veranschaulichten Versuchs auch erhöhte Tryptophan-Konzentrationen in der Zelle bestimmt werden konnten, ist anzunehmen, dass Moleküle aus dem Medium in die Zelle aufgenommen wurden. In wie weit das aufgenommene Tryptophan in den *de novo* Biosyntheseweg eingeschleust wird, könnte anhand von Daten für L-Kynurenin und Alanin bestimmt werden. Zwar konnte mit L-Kynurenin eine Kalibriergerade aufgenommen werden, jedoch ergaben die Messungen nur sehr selten Peaks, die aus dem Grundrauschen hervortraten. Mit der angewendeten Methode konnte Alanin aufgrund der geringen Masse nur unzureichend ionisiert werden. Somit entziehen sich diese beiden Metabolite einer Aussage über den Stofffluss zwischen Tryptophan und Chinolinsäure. Zur Aufnahme der Chinolinsäure liegen keine Daten vor. Da Nicotinamid mit der eingesetzten Messmethode nicht bestimmt werden kann, kann über die Aufnahme von Nicotinamid aus dem Medium nur spekuliert werden. In den Ansätzen mit Nicotinsäure-Konzentrationen über 5 mM ist diese auch in der Zelle nachzuweisen. Da Nicotinsäure in dem Referenzansatz nicht bestimmt werden konnte, konnten die Werte nicht in Abbildung 5.4 eingefügt werden. Ein Anstieg der intrazellulären Konzentration in Relation zu der im Medium vorgelegten Konzentration kann beobachtet werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass Nicotinsäure aus dem Medium in die Zelle gelangen und in die NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese eingespeist werden kann. Da neben Nicotinsäure auch Nicotinamid, Tryptophan und Chinolinsäure zu einer Akkumulation von NaMN führen, ist eine Aufnahme und eine Einspeisung dieser exogenen Substanzen in die Biosynthese von NAD<sup>+</sup>/H anzunehmen.

Alle vier Substanzen führen nicht nur zu einer Akkumulation von NaMN, das Nicotinsäure-Mononucleotid ist auch Bindeglied zwischen den beiden Synthesewegen, auf denen Tryptophan und Chinolinsäure einerseits und Nicotinamid und Nicotinsäure

andererseits in NAD<sup>+</sup>/H eingebaut werden können. Tryptophan wird in der *de novo* Biosynthese über Chinolinsäure in das Chinolinsäure-Mononucleotid eingebaut, welches anschließend zum Nicotinsäure-Mononucleotid decarboxyliert wird. Im Pyridin-Kreislauf kann Nicotinamid zu Nicotinsäure deamidiert werden und so über den Preiss-Handler-Weg in das Nicotinsäure-Mononucleotid eingebaut werden. Aufgrund dieser Daten ist nicht anzunehmen, dass die Art und Anzahl der Syntheseschritte sowie der Syntheseweg einen Einfluß auf die Akkumulation von NaMN haben. Für diese Vermutung spricht auch, dass ab NaMN die beiden o. g. Synthesewege identisch verlaufen.

Da im Vorfeld der Mononucleotid-Bildung keine Ursache für dessen Akkumulation gefunden werden kann, soll der darauf folgende Schritt, die Dinucleotid-Bildung, näher betrachtet werden, welche von einem der beiden Isoenzyme der NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase durchgeführt wird. Neben Nicotinsäure-Mononucleotid wird als zweites Substrat ATP benötigt. Es ist anzunehmen, dass die in die Biosynthese von NAD<sup>+</sup>/H eingespeisten Substanzen zu einem erhöhten Fluss durch den jeweiligen Syntheseweg führen. Dass dieser erhöhte Fluss bei der Dinucleotid-Bildung eingebremst und im weiteren Verlauf auf dem Referenzniveau verläuft, könnte an einem Mangel an ATP für diesen Syntheseschritt liegen. Da gelegentlich auch eine Akkumulation von ATP beobachtet werden kann, würde ein ATP-Mangel als Erklärung auszuschließen sein. Denkbar wäre auch, dass eine NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase in den Referenzansätzen schon mit maximaler Geschwindigkeit das Dinucleotid bildet und so die höhere Verfügbarkeit an Substrat nicht genutzt werden kann. Jedoch wird für eine NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase ein  $K_m$  für NaMN von 5,0 mM angegeben (Natalini *et al.*, 1986), eine intrazelluläre Konzentration, die in keinem der Ansätze erreicht wurde. Für die beiden Isoenzyme Nma1p und Nma2p wurde der  $K_m$  für NMN bestimmt (Emanuelli *et al.*, 2003). Die  $K_m$  für ATP von 0,11 mM für Nma1p und 1,4 mM für Nma2p (Emanuelli *et al.*, 2003) werden eher nur für Nma1p überschritten. Diesen Daten zufolge sollte eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Erhöhung der Substratkonzentration möglich sein, womit die NaMN-Akkumulation nicht erklärt werden kann. In diesem Fall wäre noch denkbar, dass NaMN, die zugegebenen und/oder weitere Substanzen die Enzymaktivität inhibieren oder nicht zu einer erhöhten Induktion der Expression einer NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase führen. Ein denkbarer ATP-Mangel steht im Widerspruch zu den  $K_m$  für ATP. Letztlich können mit den verfügbaren Daten die Beobachtungen auf biochemischer Ebene nicht erklärt werden.

5.2.2 Akkumulation von NAD<sup>+</sup>/H in wachsenden Kulturen

In den folgenden drei Experimenten wird der Einfluss von Adenin, Adenosin und Glutamin auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup>/H beschrieben. Zuerst werden die Ergebnisse dargestellt, bevor sie einzeln und im Vergleich diskutiert werden.

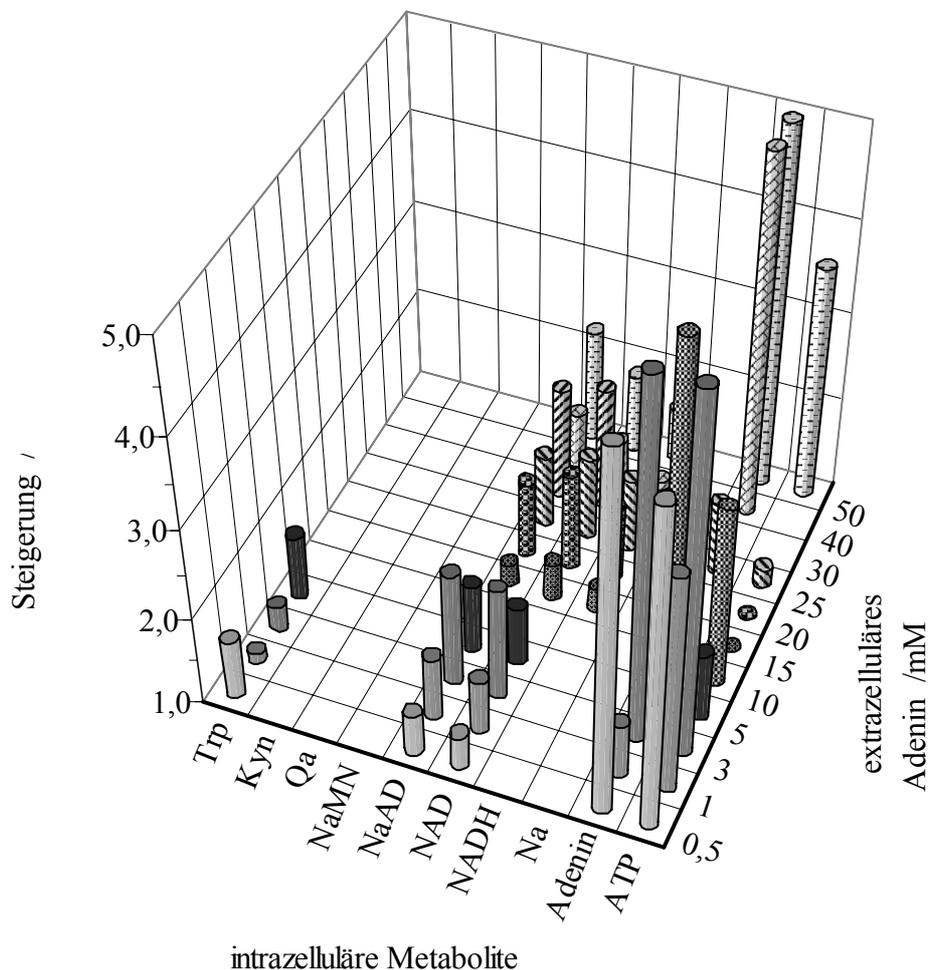
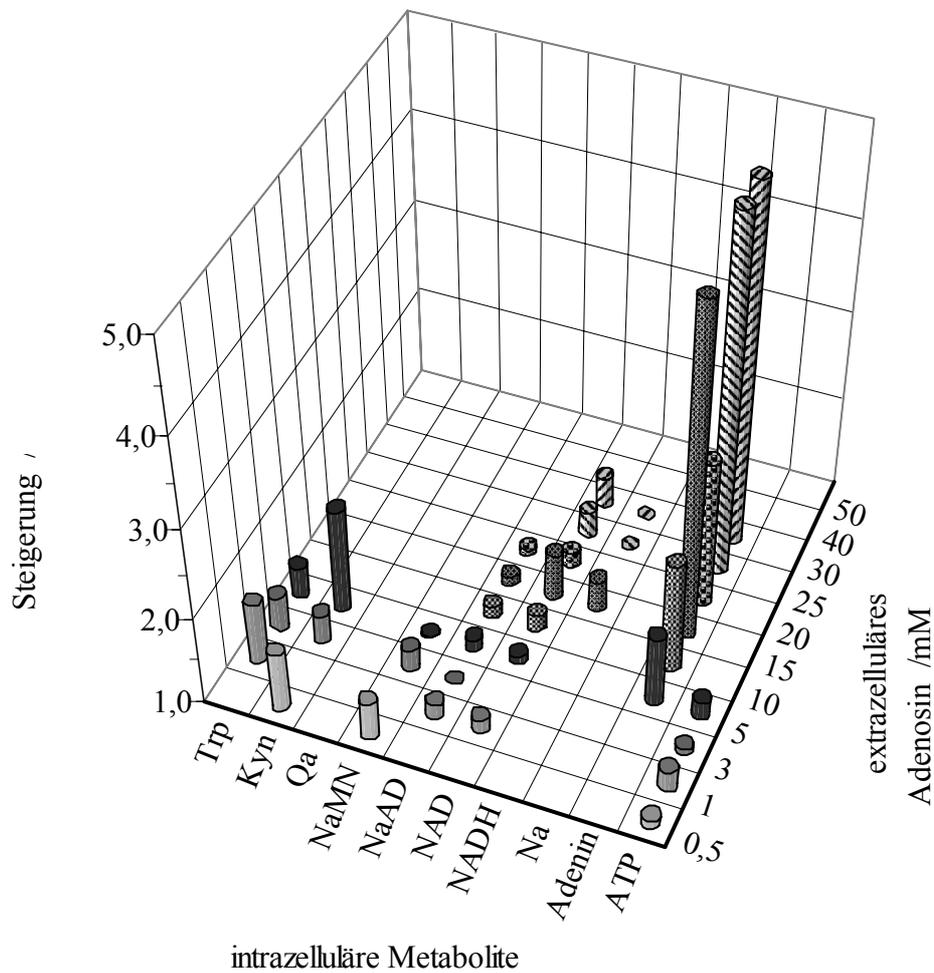


Abbildung 5.6: Einfluss variierender Adenin-Konzentrationen auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup> und NADH als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Adenin nach 72 Stunden Kultivierung. Auf der x-Achse sind Metabolite des Synthesewegs aufgezeigt, auf der y-Achse ist die Adenin-Konzentration im Medium beim Animpfen dargestellt. Der Effekt der Zugabe ist auf der z-Achse aufgetragen.

---

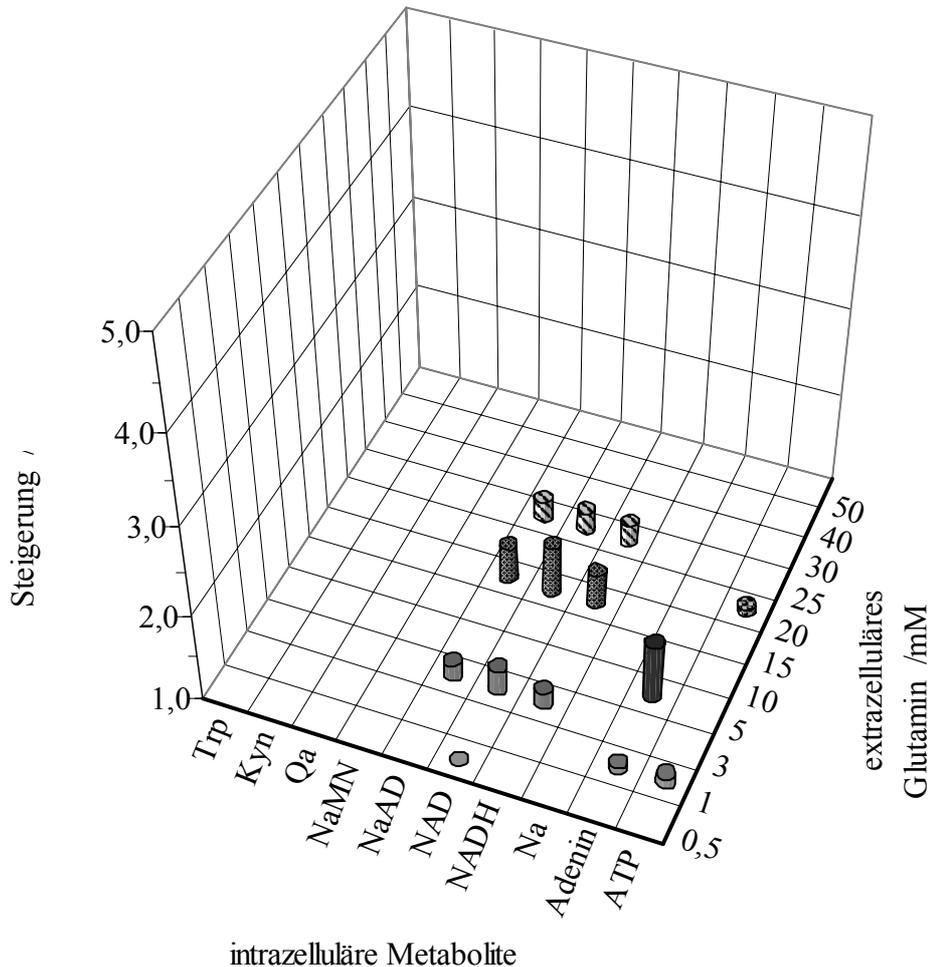
In Abbildung 5.6 ist der Einfluss steigender ADENIN-Konzentrationen auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup> und NADH veranschaulicht. Der Effekt der Zugabe ist als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Adenin ausgedrückt. Es kann erkannt werden, dass Adenin in fast allen Konzentrationsstufen zu einer Steigerung der NAD<sup>+</sup>- und NADH-Konzentration führen kann. NaAD, NAD<sup>+</sup> und NADH verzeichnen teilweise offensichtliche Anstiege. Es wird auch deutlich, dass es in keinem der Ansätze zu einer Akkumulation von NaMN kommt. Die zellinternen NaMN-Konzentrationen können bis auf 10 % des Referenzwertes sinken (ohne Abbildung). In den Zellen können gestiegene Adenin- und ATP-Konzentrationen ausgemacht werden. Ab einer vorgelegten Adeninkonzentration von 20 mM ist ein Anstieg der Biotrockenmassekonzentration über 16 g L<sup>-1</sup> hinaus zu beobachten.

Ein Einfluss verschiedener ADENOSIN-Konzentrationen auf die Biotrockenmassekonzentrationen der Ansätze ist nicht auszumachen. Der Einfluß variierender Adenosin-Konzentrationen auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup>/H ist in Abbildung 5.7 verdeutlicht. Es ist zu erkennen, dass durch Zugabe von Adenosin nur in Ausnahmen eine leichte Anreicherung von NaMN zu beobachten ist. In der Mehrzahl der Fälle führt Adenosin zu einer moderaten Steigerung der intrazellulären NaAD-, NAD<sup>+</sup>- und NADH-Konzentrationen.



**Abbildung 5.7:** Einfluss steigender Adenosin-Konzentrationen auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup> und NADH als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Adenosin nach 72 Stunden Kultivierung. Auf der x-Achse sind Metabolite des Synthesewegs aufgezeigt, auf der y-Achse ist die Adenosin-Konzentration im Medium beim Animpfen dargestellt. Der Effekt der Zugabe ist auf der z-Achse aufgetragen.

In dem Konzentrationsbereich bis 5 mM ist eine Akkumulation von Tryptophan und Kynurenin auffällig. Geringfügig gestiegene ATP-Konzentrationen im Vergleich zum Referenzansatz können neben deutlichen Konzentrationszunahmen von Adenin ab 5 mM vorgelegtem Adenosin erkannt werden.



**Abbildung 5.8:** Einfluss steigender Glutamin-Konzentrationen auf die Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Glutamin nach 72 Stunden Kultivierung. Auf der x-Achse sind Metabolite des Synthesewegs aufgezeigt, auf der y-Achse ist die Glutamin-Konzentration im Medium beim Animpfen dargestellt. Der Effekt der Zugabe ist auf der z-Achse aufgetragen.

Neben Adenin und Adenosin wurde GLUTAMIN als Zusatz zur Unterstützung der  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Biosynthese untersucht. Die Beobachtungen sind in Abbildung 5.8 zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass bei vereinzelter Glutamin-Konzentration eine bis zu 50 %-ige Steigerung der NaAD-,  $\text{NAD}^+$ - und  $\text{NADH}$ -Konzentration erfolgt. Eine Anreicherung von NaMN kann nicht ausgemacht werden. Für die betrachteten Metabolite sind in Einzelfällen moderate Steigerungen der Konzentration im Vergleich zu dem Referenzansatz zu sehen. Die erzielten Biotrockenmassekonzentrationen sind unabhängig von der Glutaminkonzentration und bewegen sich mit ca.  $15 \text{ g L}^{-1}$  im Bereich der Referenz.

### *Diskussion*

Die drei gezeigten Experimente mit der Zugabe von Adenin, Adenosin oder Glutamin verbindet, dass einerseits keine Akkumulation von NaMN und andererseits eine moderate NAD<sup>+</sup>/H-Steigerung zu verzeichnen ist. Mögliche Gründe für diese Beobachtungen sollen im Folgenden erörtert werden.

Bei dem in Abbildung 5.6 gezeigten Ansatz ist nach der Adenin-Zugabe dieses in den Zellen zu detektieren. Es ist anzunehmen, dass es aus dem Medium in die Zelle gelangt ist. Neben der ATP-Konzentration ist teilweise auch eine Verdoppelung der Adenosin-Konzentration auffällig. Eventuell könnte Adenin vermehrt in ATP eingebaut worden sein. Die somit gesteigerte Verfügbarkeit von ATP könnte insofern zu einer Steigerung der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration führen, als dass für das natürlich gebildete NaMN mehr Reaktionspartner zu Verfügung stehen. Aufgrund einer Streuung der Messwerte können die intrazellulär bestimmten ATP-Konzentrationen nicht mit den  $K_m$  der NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferasen in Zusammenhang gebracht werden, um mögliche Steigerungen der Enzymaktivität abschätzen zu können. Dass in diesen Ansätzen die NaMN-Konzentration unter die Referenzkonzentration fällt, bestärkt diese Vermutung. Hier wird erstmals deutlich, dass auch eine Limitierung der Amidierung von NaAD auftreten kann. Durch Zugabe von Adenin wird mehr NaAD gebildet, als im folgenden Schritt umgesetzt werden kann. Die Zunahme des Wachstums bei Adenin-Konzentrationen über 20 mM mag wie oben ausgeführt auf eine verbesserte energetische Versorgung der Zelle mit ATP zurückzuführen sein. Denkbar ist auch, dass Adenin als Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquelle dient und so eine mögliche Nährstofflimitierung hinauszögern kann. Auf der anderen Seite muss aber auch berücksichtigt werden, dass Adenin-Konzentrationen von 40 mM und mehr die Löslichkeitsgrenze überschreiten und so Adenin teilweise in Suspension vorliegt und daher die gravimetrische Biotrockenmassebestimmung verfälschen können.

Da es bei der Zugabe von Adenosin ebenfalls zu einer moderaten Akkumulation von NaAD und NAD<sup>+</sup>/H kommt und nur selten eine NaMN-Akkumulation zu beobachten ist, ist wohl die Rolle von Adenosin für die Biosynthese von NAD<sup>+</sup>/H vergleichbar mit der von Adenin. Obwohl auf Messwerte zur Adenosin-Aufnahme nicht zurückgegriffen werden kann, wird vermutet, dass auch Adenosin in Form von ATP als Reaktionspartner für NaMN zu Verfügung stehen kann. Im Vergleich zu Adenin scheint jedoch die Effektivität geringer zu sein, obwohl Adenosin als Nucleosid sich strukturell nur in einer

Phosphatgruppe von AMP und in drei Phosphatgruppen von ATP unterscheidet. Möglicherweise kann Adenosin nicht so effizient oder nicht als ganzes Molekül in die Zelle gelangen (nur der Adeninteil kann möglicherweise aufgenommen werden) und bedeutet so einen Mehraufwand für die Zelle. Auffällig ist, dass ab einer Adenosin-Konzentration von 5 mM im Medium zum Teil mehr als fünffache Adenin-Konzentrationen in der Zelle bestimmt werden können. Im Vergleich zu dem Ansatz mit Adenin-Zugabe kann nicht erklärt werden, warum das sich in der Zelle befindliche Adenin nicht in einer gesteigerten ATP-Konzentration niederschlägt. Die verbleibenden Adenin-, Ribose- und Adenosin-Konzentration im Medium könnten hier Aufschluß geben. Auf die Erhebung dieser Daten wurde allerdings verzichtet, da die Erarbeitung geeigneter Medienzusätze über der Aufklärung bestimmter Aufnahme- und Synthesewege stand. Für eine geringere Effektivität von Adenosin im Vergleich zu Adenin spricht auch, dass in diesem Fall das Wachstum von dem Zusatz unbeeinträchtigt blieb.

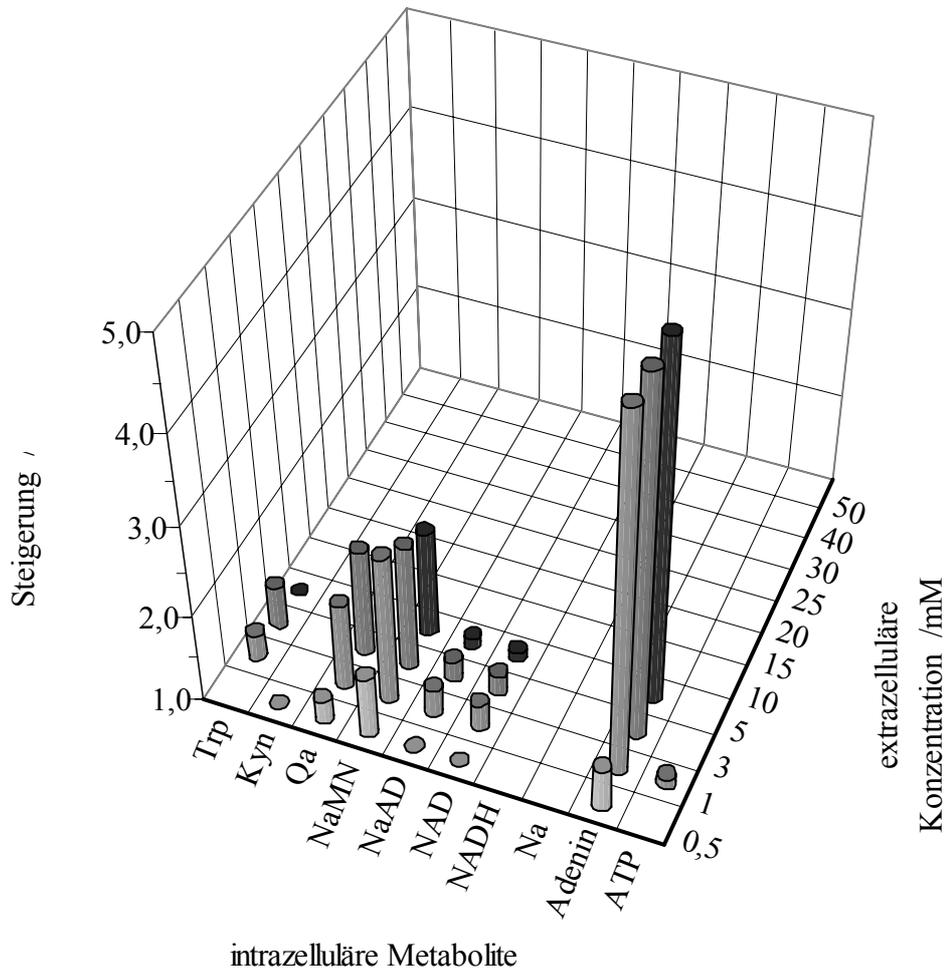
Bei der Zugabe von Glutamin ist nur eine geringe positive Wirkung auf die NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese auszumachen. Da NaMN nicht akkumuliert, jedoch aber NaAD und NAD<sup>+</sup>/H, scheint die Biosyntheseleistung durch Zugabe von Glutamin gesteigert zu sein. Diese Daten lassen vermuten, dass Glutamin die Amidierung von NaAD forciert und so zu einem leicht erhöhten Fluss durch den Biosyntheseweg führt. In diesem Fall scheint NaMN vermehrt mit ATP zu reagieren, das gebildete NaAD kann nur langsamer amidiert werden, als es synthetisiert wird. Möglicherweise kann Glutamin auch über einen von Ahmad und Moat (1966) postulierten Syntheseweg in Chinolinsäure eingebaut werden und so zu einer Steigerung der NaMN-Konzentration ohne Pyridin-Zugabe führen, welche in einer gesteigerten NAD<sup>+</sup>-Konzentration resultieren kann. Jedoch soll dieser Weg bei Aspartat und Glutamat (Ahmad und Moat, 1966) oder einem C<sub>3</sub>-Körper beginnen und kann zur Nicotinsäure-Versorgung nur in geringem Maß beitragen (Heilmann und Lingens, 1968b). Allerdings ist fraglich, wo das ATP, das sich in dem vermehrt gebildeten NaAD und NAD<sup>+</sup>/H befindet, herkommt. Die Daten deuten auf geringere ATP-Konzentrationen in den Ansätzen mit Glutamin im Vergleich zum Referenzansatz hin und würden gegen einen ATP-Mangel als Erklärung für eine gesteigerte NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration in diesem Fall sprechen. Auch würden sie einen ATP-Mangel als Ursache für die in dem vorausgegangenen Kapitel erörterte Akkumulation von NaMN sprechen. Jedoch implizieren die Daten aus der Zugabe von Adenin, dass eine gesteigerte ATP-Konzentration in Verbindung mit einer gesunkenen NaMN-Konzentration zu einer

Anreicherung mit NAD<sup>+</sup>/H führen kann. Mit den hier gewonnen Daten kann keine eindeutige Erklärung gefunden werden.

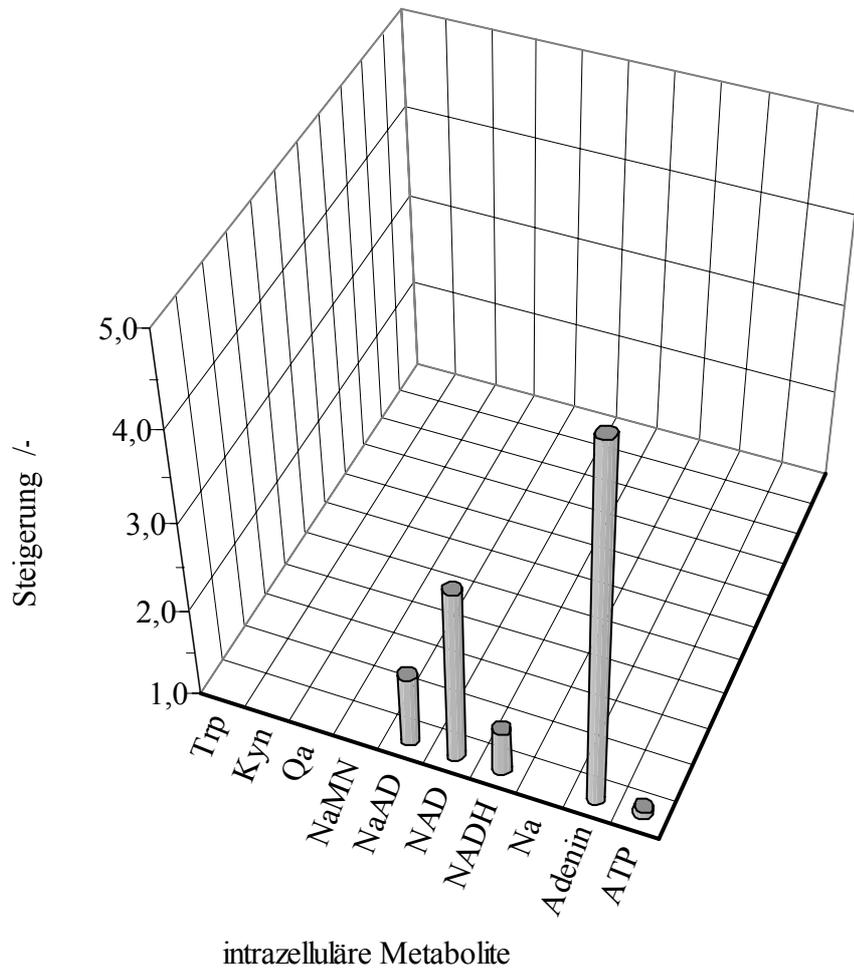
### **5.2.3 Kombination von Zusätzen**

Zur Erklärung der in den beiden vorangegangenen Kapiteln gemachten Beobachtungen soll die Zugabe von Substanzkombinationen aus beiden Gruppen dienen. Aufgrund der höchsten Löslichkeit wurde aus der ersten Gruppe Nicotinsäure ausgewählt, aufgrund der größten Wirkung aus der zweiten Gruppe Adenin. Im Folgenden werden die Ergebnisse der äquimolaren Zugaben von Adenin und Nicotinsäure und anschließend die der Zugabe nicht identischer Konzentrationen dargestellt und im Anschluss diskutiert.

In den Versuchen mit äquimolaren Konzentrationen wurden jeweils 0,5, 1, 3 und 5 mM Adenin und Nicotinsäure vorgelegt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 5.9 zusammengefasst. Hinsichtlich des Zellwachstums konnten keine Wechselwirkungen ausgemacht werden. Mit Biotrockenmassekonzentrationen zwischen 14 und 16 g L<sup>-1</sup> bewegen sich die Ansätze im Bereich des Referenzansatzes ohne Zugabe. Es ist auffällig, dass mit steigender Adenin-Konzentration im Medium auch die Konzentration von Adenin in der Zelle zunimmt. Für die intrazelluläre Nicotinsäure-Konzentration liegen keine Werte vor. Hinsichtlich des Produktes NAD<sup>+</sup>/H bewegen sich die Konzentrationen auf minimal gesteigertem Niveau. Die Konzentration von NaAD steigt in diesen Ansätzen ebenfalls um 10 bis 20 %. Eine Akkumulation von NaMN ist in allen Ansätzen festzustellen. Eine Steigerung der ATP-Konzentration kann nur in dem Ansatz mit jeweils 1 mM Zugabe erkannt werden.



**Abbildung 5.9:** Einfluss äquimolarer Adenin- und Nicotinsäure-Konzentrationen auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup> und NADH als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Adenin und Nicotinsäure nach 72 Stunden Kultivierung. Auf der x-Achse sind Metabolite des Synthesewegs aufgezeigt, auf der y-Achse ist die Konzentration beider Zusätze im Medium beim Animpfen dargestellt. Der Effekt der Zugabe ist auf der z-Achse aufgetragen.



**Abbildung 5.10:** Einfluss jeweils optimaler Adenin- und Nicotinsäure-Konzentrationen auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup> und NADH als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Adenin und Nicotinsäure nach 72 Stunden Kultivierung. Es wurden 5 mM Adenin und 0,5 mM Nicotinsäure im Medium vorgelegt (y-Achse). Auf der x-Achse sind Metabolite des Synthesewegs aufgezeigt. Der Effekt der Zugabe ist auf der z-Achse aufgetragen.

Im Gegensatz zu den Ansätzen mit äquimolarer Adenin- und Nicotinsäure-Konzentration wurde zum Vergleich ein Ansatz gewählt, in dem Adenin und Nicotinsäure in den optimalen Konzentrationen der jeweiligen Einzelansätze vorlag. Der Effekt von 5 mM Adenin und 0,5 mM Nicotinsäure auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup> und NADH ist in Abbildung 5.10 verdeutlicht. Auch in diesem Ansatz ist eine deutlich gesteigerte Adenin-Konzentration in der Zelle aus den Messwerten zu lesen. Eine Steigerung der ATP-Konzentration kann nicht erkannt werden. Für NaMN liegen keine Werte vor. Die

Konzentration von NaAD steigt fast um 80 %, die Folgeprodukte NAD<sup>+</sup> und NADH nehmen um den Faktor 3 bzw. 1,5 zu.

### *Diskussion*

Im Gegensatz zu dem Ansatz mit optimalen Adenin- und Nicotinsäure-Konzentrationen aus den Einzelansätzen kann bei den Ansätzen mit äquimolarer Adenin- und Nicotinsäure-Konzentration im Kultivierungsmedium kein Anstieg der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration festgestellt werden. Mögliche Erklärungen für diese Beobachtungen sollen diskutiert werden.

Wie aus Abbildung 5.9 zu sehen ist, nehmen die intrazellulären Adenin- und NaMN-Konzentrationen mit steigenden Konzentrationen der vorgelegten Stoffe zu. Es ist anzunehmen, dass die Medienzusätze in die Zelle gelangen können, wobei Nicotinsäure in den Preiss-Handler-Weg eingespeist und zu NaMN weiterverarbeitet wird und Adenin offensichtlich nicht zu einer Erhöhung der ATP-Konzentration führt. Dies steht im Gegensatz zu den in Kapitel 5.2.2 gemachten Beobachtungen zur Einzelzugabe von Adenin. Der Effekt von Nicotinsäure entspricht den in Kapitel 5.2.1 genannten Beobachtungen bei der Einzelzugabe. Möglicherweise unterbindet die Nicotinsäure eine Steigerung der ATP-Konzentration, wobei die Adenin-Konzentration scheinbar keinen Einfluß auf die Mononucleotid-Bildung hat. Im Gegensatz zur Einzelzugabe von Adenin führen die Adeninzugaben in Kombination mit Nicotinsäure nicht zu einer Absenkung der NaMN-Konzentration bei gleichzeitiger Steigerung der NaAD- und NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration. Scheinbar unterbindet die Nicotinsäure, dass Adenin einerseits zu ATP und ATP andererseits mit NaMN zu NAD<sup>+</sup>/H reagieren kann.

In Verbindung mit den in den beiden vorangegangenen Kapiteln genannten Ursachen für eine Akkumulation von NaMN scheint ein ATP-Mangel nicht in Frage zu kommen. Adenin kann in Form von ATP die Biosynthese von NAD<sup>+</sup>/H unterstützen, ist aber nicht limitierend. Alle bisher gesammelten Daten deuten darauf hin, dass der Grund für die Akkumulation von NaMN eher in einer Inhibierung einer NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase durch Nicotinsäure und/oder NaMN zu suchen ist.

Aus der zehnfachen Adenin-Konzentration im Vergleich zur Nicotinsäure-Konzentration im Kultivierungsmedium scheint ein positiver Effekt auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup>/H auszugehen. Das in der Zelle angesammelte Adenin wird zwar nicht vermehrt in ATP umgesetzt, führt jedoch indirekt zu einer Senkung der NaMN-Konzentration im Vergleich

zu dem Ansatz mit jeweils 0,5 mM Adenin und Nicotinsäure und zu einer Verdreifachung der NAD<sup>+</sup>-Konzentration im Vergleich zu dem Referenzansatz, sowie im Vergleich zu dem Ansatz mit jeweils 0,5 mM Adenin und Nicotinsäure. Die NADH-Konzentration steigt um 50 %. Die inhibierende Wirkung von NaMN und/oder Nicotinsäure scheint abgeschwächt und der Fluß durch die Biosynthese erhöht zu sein. Diese Ergebnisse bestätigen die oben gemachten Annahmen. Da die Substitution von Nicotinsäure mit Chinolinsäure auch zu einer Anreicherung von NaAD und NAD<sup>+</sup>/H bei gleichzeitiger Akkumulation von NaMN führt (ohne Abbildung), scheint dieser Effekt unabhängig von dem Syntheseweg zu sein, über den der Pyridinzusatz in die Biosynthese von NAD<sup>+</sup>/H eingespeist wird. Auch hier ist anhand der Akkumulation von NaAD (und NAD<sup>+</sup>/H) zu vermuten, dass trotz der Akkumulation von NaMN der Fluss durch die NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese erhöht ist. Obwohl in drei Ansätzen mit Chinolinsäure und Adenin (jeweils 0,5 bzw. 5 mM) eine Verfünffachung der NaMN-Konzentration bestimmt werden kann, die höher ausfällt als ohne Adeninzugabe, erscheint eine NAD<sup>+</sup>/H-Anreicherung trotzdem möglich. Dafür spricht, dass trotz schwankender intrazellulärer NaMN-Konzentrationen diese unterhalb des für Nma1p angegebenen K<sub>m</sub> von 5,0 mM liegen. Eine Substratinhibierung am Beispiel der Nma1p wäre somit für die Einzelzugaben als Erklärung der NaMN-Akkumulation ausschließen. Da es wie oben erläutert bei niedrigen Tryptophan-, Chinolinsäure-, Nicotinsäure- oder Nicotinamid-Konzentrationen nicht, bei höheren Konzentrationen schon zu einer Akkumulation von NaMN und in beiden Fällen zu keiner Steigerung der NaAD- und NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration kommt, deuten diese Daten auf eine *in vivo* Inhibierung einer NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase durch den Pyridin-Charakter der Zusätze hin. Möglicherweise liegen die aus Tryptophan gebildeten inhibierenden Chinolinsäurekonzentrationen unterhalb der Quantifizierungsgrenze der hier eingesetzten Analytik und können nur vermutet werden.

Mit einer Inhibierung einer NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase durch den Pyridin-Charakter der Zusätze könnte auch die moderate NAD<sup>+</sup>-Steigerung durch Glutamin, wie in Kapitel 5.2.2 gezeigt, erklärt werden. Denkbar wäre, dass durch den geringen Beitrag dieses Synthesewegs zur Gesamtkonzentration (Heilmann und Lingens, 1968b), aus Glutamin so wenig Chinolinsäure synthetisiert wird, dass diese eine NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase nicht inhibiert und stattdessen zu NAD<sup>+</sup> metabolisiert wird. Eine moderate Steigerung wäre die Folge.

Diese Inhibierung durch den Pyridin-Charakter der Zusätze kann scheinbar durch einen Adeninüberschuss abgeschwächt werden und aufgrund eines höheren Flusses durch die Biosynthese letztlich zu einer Anreicherung von NaAD und NAD<sup>+</sup>/H führen. Da es zu einer Anreicherung mit NaAD kommt und (in *Saccharomyces cerevisiae*) keine alternativen Synthesewege von Tryptophan und den Pyridin-Zusätzen (über NaMN) zu NAD<sup>+</sup>/H bekannt sind, ist eine Steigerung des Flusses durch die *de novo* Biosynthese (Zugabe von Chinolinsäure) oder über den Preiss-Handler-Weg (Zugabe von Nicotinsäure) bis zu NAD<sup>+</sup>/H durch die Zugabe von Adenin anzunehmen. Das würde letztlich bedeuten, dass eine NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase aktiv an der Akkumulation von NAD<sup>+</sup>/H beteiligt sein muss. Da bisher wenig globale Regulationsmechanismen der NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese in *Saccharomyces cerevisiae* bekannt sind, sollte für eine vollständige Betrachtung u. a. die Kompartimentierung der Zellen, sowie möglicherweise auftretende Enzymkomplexe in Betracht gezogen werden.

In jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten konnte ausgehend von einer NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration im Referenzansatz von  $0,54 \text{ mM} \pm 0,06 \text{ mM}$  durch die Zugabe von 5 mM Adenin und 0,5 mM Nicotinsäure die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration auf  $0,90 \text{ mM} \pm 0,15 \text{ mM}$  gesteigert werden. Bei der Zugabe von 5 mM Adenin und 0,5 mM Chinolinsäure wurden Werte von  $0,89 \text{ mM} \pm 0,14 \text{ mM}$  erzielt. Durch diese Zugaben scheint der Fluss durch die Biosynthese erhöht zu sein und in gesteigerten NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen zu enden.

#### 5.2.4 Zusätze zu Adenin und Nicotinsäure

In den folgenden Experimenten wurden Adenin und Nicotinsäure als Medienzusätze in Konzentrationen von 5 bzw. 0,5 mM gewählt. Es sollte untersucht werden, ob noch weitere Zusätze eine Steigerung der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration ermöglichen. In erster Linie wurden anorganische Salze als dritter Zusatzstoff eingesetzt.

In Abbildung 5.11 ist beispielhaft der Einfluss von Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup> dargestellt.

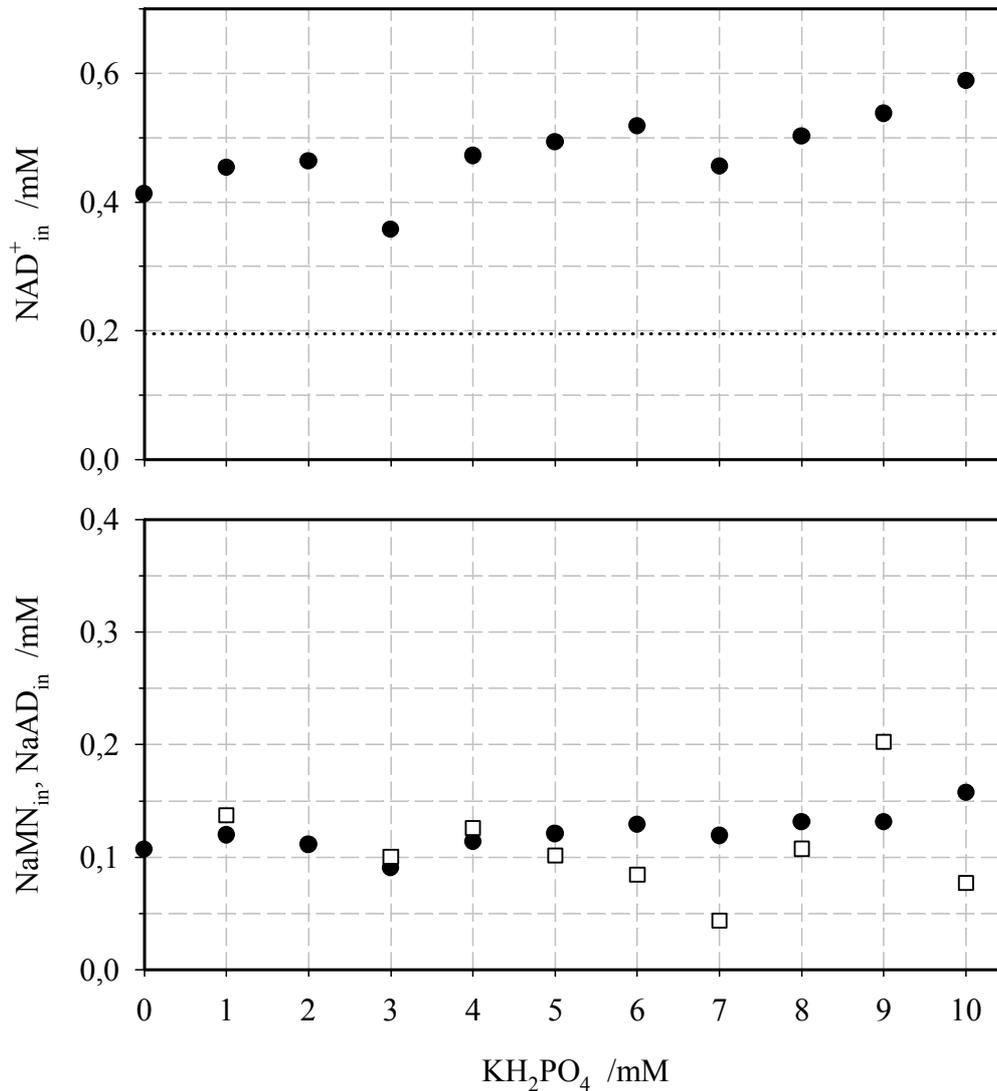


Abbildung 5.11: Einfluss der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentration auf die  $\text{NAD}^+$ -Biosynthese. Allen Ansätzen wurde Adenin und Nicotinsäure in Konzentrationen von 5 bzw. 0,5 mM vorgelegt. Ein Ansatz wurde ohne Zusätze kultiviert. Die  $\text{NAD}^+$ -Konzentration im Referenzansatz ist durch die gestrichelte Linie dargestellt, die  $\text{NAD}^+$ -Konzentrationen in den Untersuchungsansätzen sind durch die geschlossenen Kreise wiedergegeben. Die entsprechenden  $\text{NaMN}$ - und  $\text{NaAD}$ -Konzentrationen sind durch offene Quadrate bzw. geschlossene Dreiecke dargestellt.

Der Einfluss der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentration auf die  $\text{NAD}^+$ /H-Biosynthese ist aus Abbildung 5.11 ersichtlich. Durch die Zugabe von Adenin und Nicotinsäure steigt  $\text{NaAD}$ -Konzentration (geschlossene Dreiecke) von 0,05 auf 0,11 mM (ohne Abbildung). Für  $\text{NaMN}$  (offene Quadrate) konnten in diesen Ansätzen keine Konzentrationen bestimmt werden. Mit zunehmender Salzkonzentration ist eine moderate Steigerung der  $\text{NaAD}$ -Konzentration zu verzeichnen, die Werte für  $\text{NaMN}$  schwanken deutlicher. Die  $\text{NAD}^+$ -

Konzentration (geschlossene Kreise) steigt durch die Zugabe von Adenin und Nicotinsäure von 0,19 auf 0,41 mM. Durch die Salzzugabe kann diese Konzentration mit Schwankungen bis auf 0,59 mM in dem Ansatz mit 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> gesteigert werden. Insgesamt steigt die NAD<sup>+</sup>-Konzentration um den Faktor 3. Die NADH-Konzentration bleibt weitgehend unberührt von der KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Konzentration (ohne Abbildung), somit nimmt auch die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration mit der Salzkonzentration zu. Ein Einfluss der Salzzugabe auf das Zellwachstum kann nicht festgestellt werden.

### *Diskussion*

Aus Abbildung 5.11 ist ersichtlich, dass KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in weiten Bereichen einen deutlicheren Effekt auf die Bildung von NAD<sup>+</sup> als auf die Bildung von NaAD hat. Möglicherweise kann ein Teil des anorganischen Phosphats die ATP-Synthese positiv beeinflussen und so auch die Effektivität der NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese bestimmen. In diesem Fall müsste dann aber gefolgert werden, dass die Aktivität der NAD<sup>+</sup>-Synthetase von ATP als Energielieferant stärker beeinflusst wird als die einer NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase, die ATP als Substrat benötigt. Jedoch ist nur eine Steigerung der ATP-Konzentration durch die Salzzugabe zu erkennen, die von der Salzkonzentration unabhängig erscheint. Denkbar wäre aber auch, dass das Salz den pH in einen Bereich senkt, der entweder die Aktivität der NAD<sup>+</sup>-Synthetase erhöht oder generell für bessere Bedingungen sorgt. Ein Einfluss auf das Zellwachstum oder auf den Zelldurchmesser konnte nicht festgestellt werden.

Nach dem selben Ansatz konnten den Salzen (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> und NH<sub>4</sub>Cl, die in verschiedenen Konzentrationen zu der Kombination aus Adenin und Nicotinsäure zugegeben wurden, kein eindeutiger Effekt zugeordnet werden. Leichte Einbußen in der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration waren mit NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> im untersuchten Konzentrationsbereich zu beobachten. Ein pH über 7,0 kann sich negativ auf die NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese auswirken und geht mit einem reduzierten Zellwachstum einher. Ein möglicher positiver Effekt kann den Zusätzen Histidin und Pyridoxin (Vitamin B6) zugeschrieben werden (alles ohne Abbildung), weitergehende Untersuchungen wurden nicht durchgeführt.

### 5.2.5 Diskussion

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Beobachtungen jeweils ausführlich diskutiert. An dieser Stelle soll abschließend eine kapitelübergreifende Erörterung erfolgen.

Als Maß für die Effektivität einer Zugabe wird ein Verstärkungsfaktor angegeben, der das Verhältnis der Konzentration im betrachteten Ansatz bezogen auf die Konzentration des Referenzansatzes angibt. Dies ermöglicht einerseits eine übersichtlichere Darstellung der Ergebnisse und andererseits auch die Verknüpfung mehrerer Versuchsreihen mit dem selben Zusatz in verschiedenen Konzentrationsbereichen.

Die Akkumulation von NAD<sup>+</sup> wurde schon von Sakai *et al.* (1973a) in verschiedenen Hefestämmen untersucht. Allerdings ist nicht exakt angegeben, ob sich die Akkumulation während des Zellwachstums oder während einer stationären Phase vollzog. Bei einer Untersuchung wurde einer *S. cerevisiae* Kultur nach drei Tagen Inkubation Adenin und Nicotinamid zu einer Endkonzentration von jeweils 3 g L<sup>-1</sup> zugegeben und nach weiteren drei Tagen eine Steigerung der NAD<sup>+</sup>-Konzentration um den Faktor 1,4 beobachtet. Nach diesen Angaben ist zu vermuten, dass sich die Akkumulation eher während der stationären Phase vollzogen hat. Zusätzlich wird noch der Verlauf einer NAD<sup>+</sup>-Anreicherung in *S. carlbergensis* angegeben (Sakai *et al.*, 1973a), der auch eher auf eine Akkumulation während der stationären Phase schließen läßt. In diesem Zusammenhang muß auch erwähnt werden, dass hinsichtlich der oben genannten Ergebnisse nicht eindeutig belegt werden kann, ob die gemachten Beobachtungen auf das Zellwachstum oder auf Effekte der stationären Phase zurückzuführen sind. Die Kultivierungen im Schüttelkolben wurden nach einem Protokoll von Engelking (2004) durchgeführt, bei dem die Erzeugung von Biokatalysatoren mit einem hohen Enantiomerenüberschuss bei der anschließenden Biotransformation im Vordergrund stand und nicht zwangsläufig Zellen einer definierten Wachstumsphase erzeugt werden sollten (Engelking, 2006). Aufgrund von später erstellten Wachstumskurven ist anzunehmen, dass die Zellen schon nach ca. zwei Tagen in die stationäre Phase kommen. Da die Ansätze nach ca. 72 Stunden analysiert wurden, kann somit keine Aussage getroffen werden, ob die NaMN- bzw. NAD<sup>+</sup>/H-Akkumulation das Ergebnis des Wachstums ist oder erst in der stationären Phase eintrat. Dahingehende Untersuchungen deuten auf einen Einfluß der Wachstumsphase, d. h. also auch des Erntezeitpunkts, auf die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen hin. In diesem

Zusammenhang geben Khalmuradov *et al.* (1996) an, dass der NAD<sup>+</sup>-Gehalt in exponentiell wachsenden Zelle höher ist als in stationären Zellen. Der Verlauf der intrazellulären NAD<sup>+</sup>-Konzentration kann auch von dem Zugabezeitpunkt der Zusätze beeinflusst werden (ohne Abbildung). Die in den vorangegangenen Kapiteln gemachten Beobachtungen sind nur unter den angewendeten Reaktionsbedingungen gültig. Da die Versuchsdurchführung nicht geändert wurde, können die Ergebnisse miteinander verglichen werden.

Zwar kam die unproblematische Handhabung von Schüttelkolben zum Tragen, wurde aber im Laufe der Untersuchungen durch Probleme bei der parallelen Probennahme und -aufarbeitung, durch unregelmäßige Wachstumsbedingungen und damit Einschränkungen in der parallelen Vergleichbarkeit, sowie durch eine limitierte Anzahl an Prozessgrößen in Frage gestellt. Idealerweise sollten derartige Untersuchungen in einem Parallelansatz durchgeführt werden, der geregelte Kultivierungsbedingungen und einen Zugang zu einer Vielzahl an Prozessgrößen in Verbindung mit einer automatisierten Probennahme und -aufarbeitung ermöglicht. Da derartige Systeme sich noch in der Entwicklung befinden, wurden die weiteren Untersuchungen in einem Laborbioreaktor im 3 L Maßstab durchgeführt. Anhand mehrerer (Prozess)Daten könnte die Vergleichbarkeit der einzelnen Läufe bestimmt werden.

Im Sinne von Kultivierungsbedingungen wurde die Art, die Kombination und der Zugabezeitpunkt der Zusätze, der *pH* und der Erntezeitpunkt untersucht. Da schon die Auswahl der genannten Parameter zu einer enormen Anzahl an Versuchen führen würde, erheben die Untersuchungen keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Diese Untersuchungen sollten in erster Linie dazu dienen, Einflussgrößen zu identifizieren, die in die folgenden reaktionstechnischen Untersuchungen im Rührkesselreaktor zur Anreicherung von NAD<sup>+</sup>/H in *S. cerevisiae* FasB His6 eingehen können.

### 5.2.6 Zusammenfassung

In dem Kapitel 5.2 stand die Suche nach geeigneten Medienzusätzen zur Erhöhung der intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration im Vordergrund. Die untersuchten Metabolite lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Bei der Zugabe von Tryptophan, Chinolinsäure, Nicotinsäure oder Nicotinamid zu dem Kultivierungsmedium konnte beobachtet werden, dass es in allen vier Fällen zu einer Anreicherung von NaMN in der Zelle kommt. Eine Weiterverarbeitung zu NAD<sup>+</sup>/H ist nicht zu sehen. Im Gegensatz dazu führt die Zugabe von Adenin, Adenosin oder Glutamin zu einer (leichten) Steigerung der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration. Dabei ist Adenin effektiver als Adenosin, welches effektiver als Glutamin ist. Da die Metabolite teilweise auch in den Zellen detektiert werden konnten, ist von einer Aufnahme und Einspeisung in die NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese an der entsprechenden Stelle auszugehen. Aus der äquimolaren Zugabe jeweils eines Vertreters der beiden o. g. Gruppen, hier Nicotinsäure und Adenin, kann geschlossen werden, dass Nicotinsäure (und deren Derivate Nicotinamid oder Chinolinsäure) scheinbar die Aktivität einer NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase bei Einzelzugabe *in vivo* inhibieren oder deren Expression reduzieren kann. Diese Effekte verlieren an Stärke, wenn Adenin im zehnfachen Überschuss mit Nicotinsäure zugegeben wird. Der Fluss durch die Biosynthese erhöht sich und resultiert in gesteigerten NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen. Die Überprüfung einer möglichen Inhibierung einer NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase durch Pyridin-Derivate wäre wünschenswert. Verschiedene Zugaben zu der genannten Kombination sowie variierende Bedingungen wurden ergänzend untersucht, wobei nur Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ein eindeutiger Effekt zugeordnet werden konnte. Mit zunehmender KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Konzentration kann die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration weiter angehoben werden.

### 5.3 Reaktionstechnische Untersuchungen zur Anreicherung von NAD<sup>+</sup>/H

Nach den Voruntersuchungen im Parallelansatz sollen unter geregelten Bedingungen weitere Erkenntnisse gesammelt werden, die letztlich zu einer Vorschrift zur Herstellung NAD<sup>+</sup>/H-angereicherter Biokatalysatoren führen sollen. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der reaktionstechnischen Untersuchungen zur Anreicherung von NAD<sup>+</sup>/H in *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 im Labormaßstab aufgeführt und diskutiert. Der Referenzprozess wird in Kapitel 5.3.1 erläutert, bevor in Kapitel 5.3.2 auf den Einfluss des Zugabezeitpunkts einer einmaligen Glucosezugabe eingegangen wird. In Kapitel 5.3.3 werden auftretende Prozessphasen näher beschrieben, die in einem RQ-gesteuerten Prozess in Kapitel 5.3.4 abschließend untersucht werden. Kapitel 5.3.5 befasst sich mit dem Einfluss von Zusätzen während den Kultivierungen. Die Beobachtungen werden in Kapitel 5.3.6 abschließend diskutiert und zu einer Herstellungsvorschrift formuliert.

#### 5.3.1 Referenzprozess

Zwei Kultivierungen im Labormaßstab werden hier als Grundlage weiterer Untersuchungen dargestellt. Das Zulaufverfahren umfasst eine achtstündige Satzphase, nach der der Zulauf gestartet wird. Es werden zwei Kultivierungen gezeigt, die sich im *pH* und in der vorgelegten Glucosemenge unterscheiden. Dem zuerst genannten Lauf wurden 5,5 g L<sup>-1</sup> Glucose bei einem *pH* von 6,5 vorgelegt, der andere wurde beginnend mit knapp 11 g L<sup>-1</sup> Glucose bei *pH* 5,9 durchgeführt. In Abbildung 5.12 sind für den erstgenannten Versuch (a) das Zellwachstum, (b) die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration und (c) die Konzentrationen der direkten Vorstufen von NAD<sup>+</sup> im Verlauf der Kultivierung gezeigt. Die entsprechenden Werte sind in Abbildung 5.13 für den zweiten Versuch zusammengefasst.

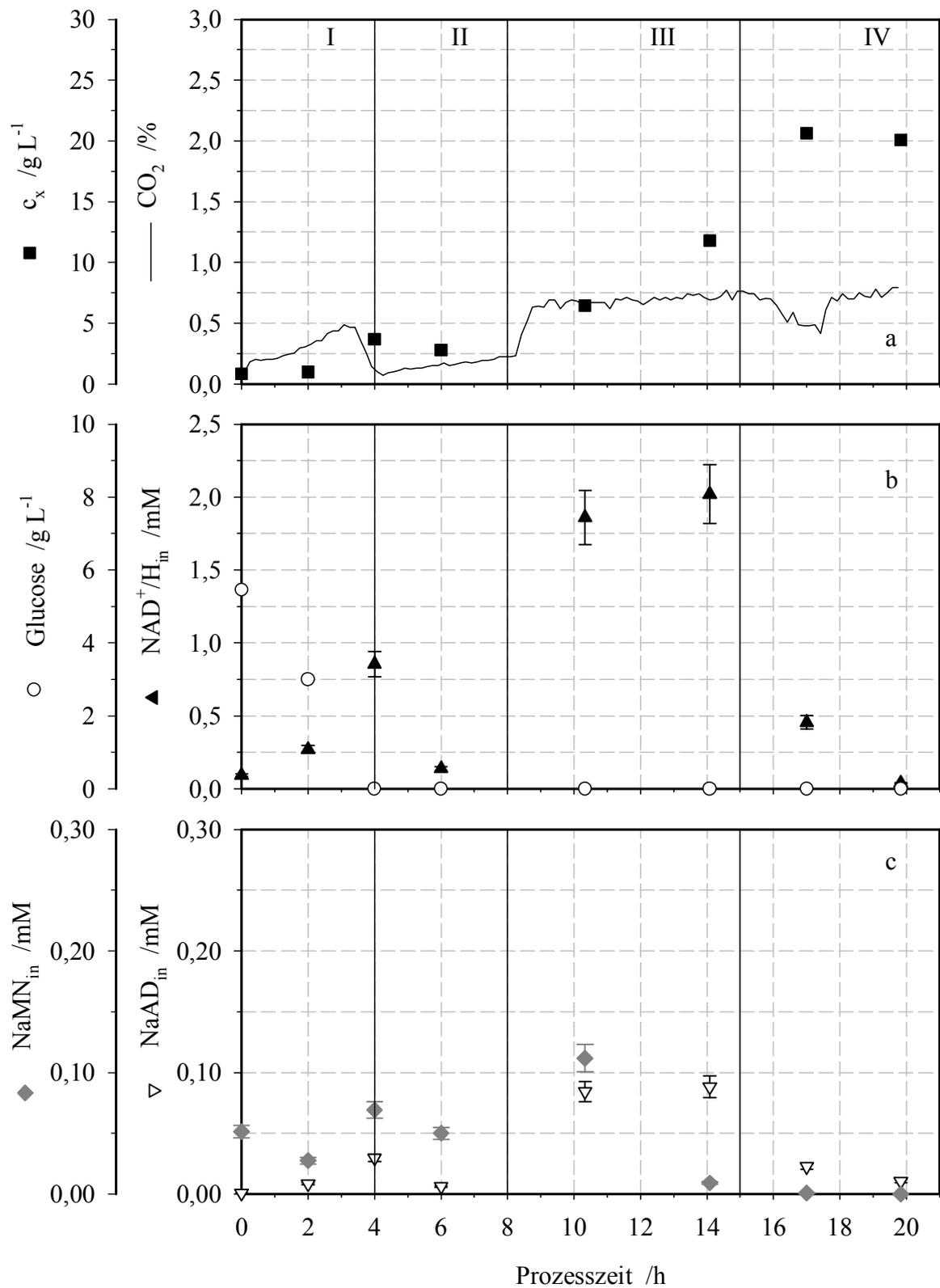


Abbildung 5.12: Verlauf der (a) Biotrockenmasskonzentration (Quadrate), (b) der intrazellulären  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentration (Dreiecke) und (c) der Konzentrationen der direkten Vorstufen von  $\text{NAD}^+$  während einer Kultivierung im 3 L Labormaßstab. Zulaufstart nach acht Stunden (konstante Zudosierung von  $37,3 \text{ mL h}^{-1}$ ),  $\text{pH} = 6,5$ . Glucose: Offene Kreise. NaMN: Graue Diamanten. NaAD: Offene Dreiecke. I, II, III, IV: Prozessphasen.

Abbildung 5.12a zeigt den Verlauf der Biotrockenmassekonzentration der Kultivierung, die bei *pH* 6,5 durchgeführt wurde. Zusätzlich ist der Verlauf der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Abluft sowie der Verlauf der Glucosekonzentration im Medium in Abbildung 5.12b angegeben. Beim Animpfen lag eine Glucose-Konzentration von 5,5 g L<sup>-1</sup> vor, die anfängliche Biotrockenmassekonzentration betrug 0,8 g L<sup>-1</sup>. Innerhalb von weniger als vier Stunden ist die vorgelegte Glucose verstoffwechselt. In dieser Zeit ist ein Anstieg der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Abluft sowie eine Zunahme der Biotrockenmassekonzentration zu bemerken. Danach ist ein deutlicher Rückgang der CO<sub>2</sub>-Konzentration von maximalen 0,47 % auf unter 0,1 % zu beobachten. Im weiteren Verlauf steigt die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Abluft innerhalb von vier Stunden auf 0,22 %. Nach dem Verbrauch der vorgelegten Glucose ist ein leichter Rückgang der Biotrockenmassekonzentration ersichtlich. Nach acht Stunden Kultivierungszeit wird die Zulaufpumpe gestartet und im weiteren Verlauf konstant gehalten. Nach 17 Stunden Kultivierungszeit erreicht die Biotrockenmassekonzentration 20,7 g L<sup>-1</sup> und stagniert auf diesem Niveau bis zum Ende des Laufs nach insgesamt 20 Stunden. Nach dem Beginn der konstanten Glucosezudosierung erreicht die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Abluft schnell Werte um 1,0 % und verharrt auf diesen bis zum Ende der Kultivierung. Nach 16 h Prozesszeit ist ein Einbruch zu erkennen, der sich ab 18 h Prozesszeit wieder erholt. Während der gesamten Zulaufphase ist keine Glucose im Medium nachzuweisen. Die zu diesem Lauf gehörenden intrazellulären Konzentrationen von NAD<sup>+</sup>/H und dessen Vorstufen NaMN und NaAD sind in Abbildung 5.12b und Abbildung 5.12c ergänzt. Ausgehend von einer NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration von 0,09 mM steigt diese während der Satzphase innerhalb von vier Stunden bis auf 0,85 mM, sinkt dann um ein Sechstel auf Werte von 0,14 mM, steigt nach Anschalten des Zulaufs deutlich an und durchläuft zwischen zehn und 14 Stunden ein Maximum von 2,0 mM. Innerhalb der letzten sechs Stunden der Kultivierung sinkt die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration auf Werte von 0,04 mM. Der Verlauf der NaAD-Konzentration gleicht dem eben beschriebenen Verlauf der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration, bewegt sich jedoch insgesamt bei niedrigeren Werten. Der Verlauf der NaMN-Konzentration ist meist identisch zu dem NaAD-Verlauf, jedoch sind die Änderungen nicht so stark ausgeprägt. Der markanteste Unterschied ist, dass die NaMN-Konzentration während der Zulaufphase schon früher sinkt als die NaAD und NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen.

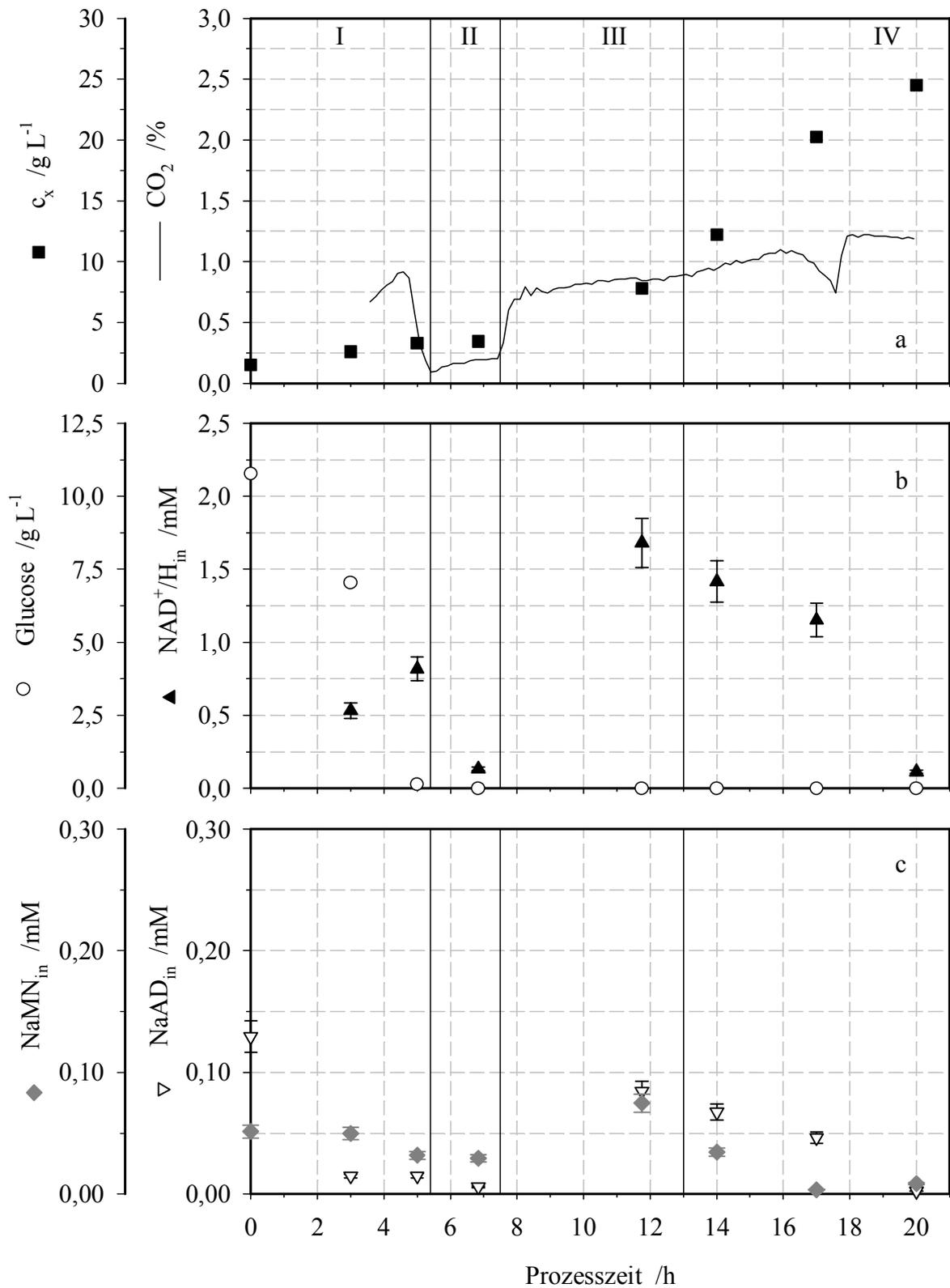


Abbildung 5.13: Verlauf der (a) Biotrockenmassekonzentration (Quadrate), (b) der intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration (Dreiecke) und (c) der Konzentrationen der direkten Vorstufen von NAD<sup>+</sup> während einer Kultivierung im 3 L Labormaßstab. Zulaufstart nach 7,5 Stunden (konstante Zudosierung von 37,3 mL h<sup>-1</sup>), pH = 5,9. Glucose: Offene Kreise. NaMN: Graue Diamanten. NaAD: Offene Dreiecke. I, II, III, IV: Prozessphasen.

Der Verlauf des Zellwachstums und der intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration des zweiten Laufs bei *pH* 5,9 sind in Abbildung 5.13a und b wiedergegeben. Von der zu knapp 11,0 g L<sup>-1</sup> vorgelegten Glucose kann nach ungefähr 5 Stunden im Medium keine mehr nachgewiesen werden. In dieser Zeit vervierfacht sich die Biotrockenmassekonzentration und erreicht Werte von 2,4 g L<sup>-1</sup>. Nach ca. 4,5 h wird eine maximale CO<sub>2</sub>-Konzentration von 0,92 % in der Abluft gemessen, welche daraufhin deutlich abnimmt. Innerhalb der nächsten drei Stunden ist ein moderater Anstieg der Biotrockenmassekonzentration auf 3,0 g L<sup>-1</sup> sowie der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Abluft von 0,1 % auf 0,2 % zu bemerken. Glucose ist im Medium nicht nachzuweisen. Auch nach Anschalten des Zulaufs nach 7,5 Stunden Prozesszeit kann bis zum Ende der Kultivierung keine Glucose im Medium detektiert werden. Nach dem Anstellen der Zulaufpumpe springt die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Abluft auf 0,6 % und steigt im weiteren Verlauf bis auf Sättigungswerte von 1,2 %. Bei 17 und 20 Stunden Kultivierungszeit werden Werte unter- bzw. oberhalb der Sättigung erreicht. Während der Zulaufphase nimmt die Biotrockenmassekonzentration deutlich zu und erreicht nach 20 Stunden Prozesszeit ca. 28 g L<sup>-1</sup>. Die gemessenen NaMN- und NaAD-Konzentrationen sind in Abbildung 5.13c zu ersehen, die entsprechenden NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen sind in Abbildung 5.13b wiedergegeben. Nach fünf Stunden Kultivierung wird in den Zellen eine NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration von 0,8 mM bestimmt. Vor dem Anschalten des Zulaufs sinkt dieser Wert auf 0,13 mM nach 6,8 Stunden. In der Zulaufphase steigt er an und erreicht 1,7 mM nach 11,75 Stunden. Im weiteren Verlauf fallen die Werte der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration bis zum Ende der Kultivierung auf 0,07 mM nach 20 h Prozesszeit. In der zweiten Hälfte der Satzphase ist ein leichter Rückgang der NaAD-Konzentration zu bemerken, welcher bei NaMN schon früher auftritt. Zu Beginn der Zulaufphase steigen die NaMN- und NaAD-Konzentrationen an, wobei die NaAD-Konzentrationen ähnlich der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen zwischen 11,8 und 17 Stunden Prozesszeit ein Maximum durchlaufen und dann bis zum Ende auf wesentlich niedrigere Werte fallen. Die NaMN-Konzentration sinkt schon früher und fällt ab 17 Stunden Prozesszeit unter die Detektionsgrenze.

*Diskussion*

Die in Abbildung 5.12 und Abbildung 5.13 dargestellten Versuche sollen als Referenz für folgende Experimente dienen. Ihre Eignung und Aussagen werden im Folgenden diskutiert. Der Einbruch der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Satzphase fällt mit kaum messbaren Glucosekonzentrationen zusammen und ist darauf zurückzuführen, dass mit diesem Zeitpunkt die vorgelegte Glucose vollständig entfernt ist. Zuvor wurde sie aerob u. a. in CO<sub>2</sub> und Biomasse umgesetzt. Da bis zum Einschalten des Zulaufs die CO<sub>2</sub>-Konzentration nach dem Einbruch wieder leicht zunimmt, ist auf eine metabolische Aktivität der Hefezellen zu schließen. Möglicherweise werden die während des unlimitierten Wachstums auf Glucose gebildeten Nebenprodukte verstoffwechselt und führen zu einer vermehrten CO<sub>2</sub>-Bildung. Allerdings scheint die Energieausbeute gering zu sein, da sich nur minimales Zellwachstum bzw. ein leichter Rückgang feststellen lässt. Nach dem Anstellen des Zulaufs ist aufgrund der nicht messbaren Glucosekonzentrationen im Medium davon auszugehen, dass die zudosierte Glucose vollständig metabolisiert wird. Neben einer gesteigerten CO<sub>2</sub>-Produktion ist die Zulaufphase vor allem durch einen deutlichen Anstieg der Biotrockenmassekonzentration geprägt. Die Einbrüche der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Abluft könnten vielleicht mit einer Umstellung des Stoffwechsels aufgrund einer zunehmenden Limitierung zurückgeführt werden. In Abbildung 5.13a startet die Wertaufzeichnung des CO<sub>2</sub> in der Abluft erst nach dreieinhalb Stunden, da zuvor vergessen wurde, von Beginn an die Abluft der Messung zugänglich zu machen. In den genannten Punkten sind große Übereinstimmungen zwischen den beiden Versuchen zu sehen, die die Zusammenhänge unterstreichen und somit die jeweilige Eignung als Referenzprozess darstellen. Nur die erreichten Endkonzentrationen am Erntezeitpunkt trüben dieses Bild. Nach 20 h Kultivierungszeit werden Werte von 20 bzw. knapp 25 g L<sup>-1</sup> erreicht. Möglicherweise könnte dieser Unterschied in dem für die Kultivierung gewählten *pH* zu finden sein. Die höhere Zellkonzentration wurde bei dem Versuch erzielt, der bei *pH* 5,9, dem niedrigeren *pH*, durchgeführt wurde. Möglicherweise hat die Einstellung des zellinternen *pH* in dem Lauf mit dem höheren *pH* von 6,5 dazugeführt, dass der dafür höhere Energieaufwand auf Kosten des Zellwachstums ging. Bis auf das Zellwachstum scheint der *pH* nach diesen Angaben keinen Einfluß auf die Kultivierungen zu haben, was beide qualitativ zu Referenzprozessen macht.

Nicotinsäure-Mononucleotid (NaMN), Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid (NaAD) und (reduziertes) Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD<sup>+</sup>/H) sind drei aufeinanderfolgende

Metabolite der NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese und könnten anhand der Abbildung 5.12b/c und Abbildung 5.13b/c einen Einblick in die Biosynthese ermöglichen. Aus den genannten Abbildungen ist zu ersehen, dass jeweils die drei Metabolite rein qualitativ den selben Verlauf zeigen. Eine gesteigerte NaMN-Konzentration führt zu einer gesteigerten NaAD-Konzentration, welche wiederum zu einer gesteigerten NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration führt. Das würde im umgekehrten Fall hinsichtlich der Beziehung der Metabolite untereinander bedeuten, dass einer erhöhten NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration eine Erhöhung der NaMN- und NaAD-Konzentration vorausgehen würde. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Änderungen in der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration auf eine Änderung der Biosyntheseleistung zurückzuführen sind. Es ist anzunehmen, dass der Fluss durch die Biosynthese erhöht wird und es zur Akkumulation der Zwischenprodukte kommt, da diese jeweils schneller gebildet werden als sie weiterverarbeitet werden können. Die letzten beiden enzymatischen Umsetzungen des Preiss-Handler-Wegs könnten diesen Daten nach geschwindigkeitsbestimmende Schritte in der Biosynthese von NAD<sup>+</sup>/H darstellen. Nach Yu und Dietrich (1972) müsste die NAD<sup>+</sup>-Synthetase unter diesen Bedingungen schon mit maximaler Umsetzungsgeschwindigkeit arbeiten, zur Regelung einer NaNM-/NMN-Adenylyl-Transferase können keine Angaben gemacht werden (Emanuelli *et al.*, 1999). Eine Änderung des Flusses durch die Biosynthese wird auch durch die Beobachtungen bei dem Rückgang der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen gegen Ende der jeweiligen Kultivierung deutlich. Da die NaMN-Konzentration vor der NaAD- und NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration sinkt, scheint die Senkung der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration auf einen reduzierten Fluss durch die Biosynthese zurückzuführen zu sein. Mit einem Rückgang von NAD<sup>+</sup>/H um 1,6 mM ist eine Senkung der NaAD-Konzentration um 0,07 mM und der NaMN-Konzentration um 0,01 mM verknüpft (Abbildung 5.12, zwischen 14 und 17 Stunden Prozesszeit). In diesem Fall müsste dann der regelnde Schritt bei bzw. vor der Mononucleotid-Bildung auftreten. Möglicherweise unterliegen die Chinolinsäure-Phosphoribosyl-Transferase und/oder die Nicotinsäure-Phosphoribosyl-Transferase einer Regulation durch Glucose hinsichtlich der Aktivität oder der Expression. Da leider keine Daten für Nicotinsäure und/oder Chinolinsäure vorhanden sind, ist schwer zu sagen, ob in diesem Fall die Biosynthese eher über die *de novo* Biosynthese oder über den Pyridin-Kreislauf verlief. Ein regelnder Einfluss einer anderen Substanz (oder eines gebildeten Nebenprodukts) auf diese oder andere Enzyme des Biosynthesewegs kann nicht ausgeschlossen werden.

Der Anteil von NAD<sup>+</sup> an NAD<sup>+</sup>/H ist wesentlich geringeren Schwankungen unterzogen als die Summenkurve (ohne Abbildung). Obwohl beispielsweise zwischen vier und sechs Stunden Prozesszeit die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration um den Faktor sechs abnimmt, nimmt der Anteil von NAD<sup>+</sup> an der Summe von 99,5 % nur auf 98,3 % ab. Diese Beobachtung lässt sich beim Vergleich weiterer Werte bestätigen. Da der Anteil von NAD<sup>+</sup> an der Summe (fast) konstant bleibt, sich die Konzentrationen der Summe deutlich im Verlauf der Kultivierung bis 14 Stunden Prozesszeit ändern, kann dies nur auf eine aktive Synthese von NAD<sup>+</sup> zurückgeführt werden, welches den Hauptanteil an NAD<sup>+</sup>/H hat. Nach 14 Stunden Kultivierungszeit nimmt der Anteil von NAD<sup>+</sup> an der Summe NAD<sup>+</sup>/H stärker ab, jedoch nicht so drastisch wie die Summe NAD<sup>+</sup>/H selbst. Der Rückgang der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration ist auf eine reduzierte Biosyntheseleistung zurückzuführen, die möglicherweise von einer ebenfalls reduzierten Regeneration von NADH überlagert ist. Eine Überlastung der Atmungskette wäre denkbar, kann aber anhand des unveränderten pO<sub>2</sub> nicht bekräftigt werden. Möglicherweise treten gegen Ende der Kultivierung Limitierungen oder Inhibierungen deutlicher hervor. Trotzdem ist eine Beeinflussung der Biosyntheseleistung nicht von der Hand zu weisen.

Bedalov *et al.* (2003) geben für NAD<sup>+</sup> eine intrazelluläre Konzentration zwischen 1,5 und 2 mM an. Die gemessenen Werte liegen in diesem Bereich, allerdings wird auch klar, dass hinsichtlich der möglichen Änderungen der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration im Laufe einer Kultivierung beim Vergleich der NAD<sup>+</sup>(/H)-Konzentrationen auch die Kultivierungsbedingungen und der Zeitpunkt der Probenahme berücksichtigt werden sollten. Insofern ist der Vergleich der gemessenen Konzentrationswerte mit Literaturwerten erschwert. Auch wenn quantitative Unterschiede offensichtlich sind, scheinen diese nicht von den qualitativen Zusammenhängen verursacht zu sein. Diese können somit davon unabhängig beurteilt und interpretiert werden. Es bleibt festzuhalten, dass die beobachteten Änderungen in der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration möglicherweise auf Änderungen in der Biosyntheseleistung zurückzuführen sind. Die Kultivierung bei unterschiedlichen *pH* scheint auf den Verlauf der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen und auf die dahinterstehenden Zusammenhänge keinen Einfluss zu haben. Ebenso scheint zwischen erzielter Biotrockenmassekonzentration und dem Verlauf der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration kein Zusammenhang zu bestehen. Anhand der Abbildung 5.12b/c und Abbildung 5.13b/c wird auch deutlich, dass sich beide Läufe in dem Gesagten qualitativ entsprechen, wodurch sie

nicht nur für makroskopische Größen, sondern auch für intrazelluläre Beobachtungen als Referenz Anwendung finden können.

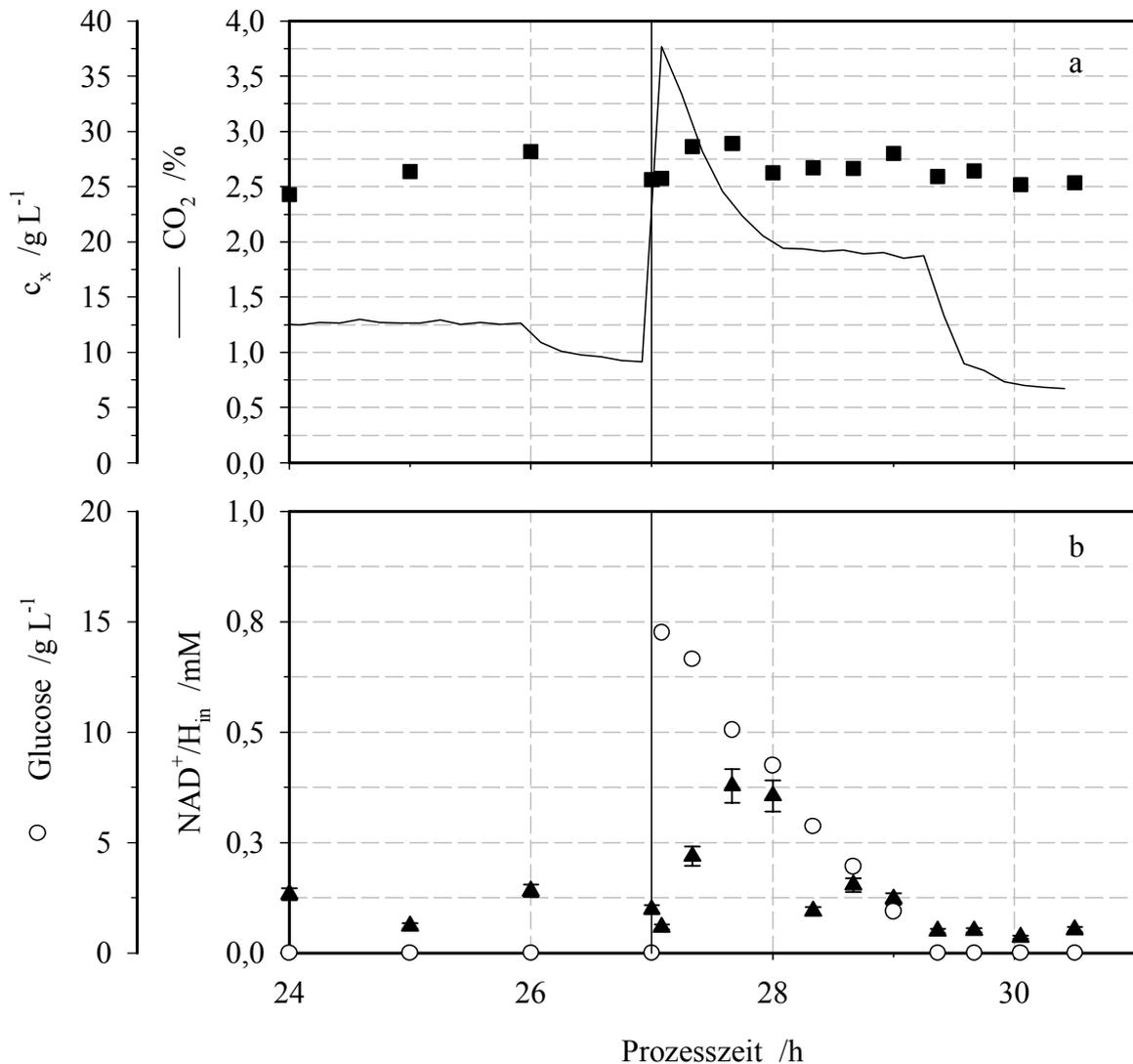
Die beiden dargestellten Prozesse lassen sich jeweils in vier Phasen unterteilen: (I) Satzbetrieb und Wachstum auf Glucose und (II) auf den davor gebildeten Nebenprodukten, (III) Beginn der Zulaufphase und (IV) Ende der Zulaufphase. In den ersten vier bis fünf Stunden nach dem Animpfen wird Glucose verstoffwechselt. In dieser Phase sind steigende NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen in den Zellen zu beobachten. Ist Glucose nicht mehr verfügbar, sinken die intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen deutlich. Dies entspricht der zweiten Phase (II). Ein entsprechender Zusammenhang kann für die vierte Phase (IV) angenommen werden. Aufgrund des fortwährenden Zellwachstums nimmt die Verfügbarkeit der konstant zudosierten Glucose gegen Ende der Zulaufphase immer mehr ab und resultiert in sinkenden NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen. Im Gegensatz dazu sind zu Beginn der Zulaufphase aufgrund der höheren Glucoseverfügbarkeit pro Zelle die intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen höher als in Phase (II) oder (IV). Es wird hier deutlich, dass die Verfügbarkeit von Glucose einen entscheidenden Einfluss auf die intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen haben kann, welche, wie oben angesprochen, durch Änderungen der Biosyntheseleistung eingestellt werden. Dieser Zusammenhang konnte in fünf weiteren Experimenten während der analysierten Satzphase bestätigt werden. Glucose scheint demnach ein globaler Regulator der NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese in *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 unter den gewählten Bedingungen zu sein.

Über die Ursachen dieser Beobachtungen kann nur spekuliert werden. In den ersten vier bis fünf Stunden der Kultivierung (sowie zu Beginn der Zulaufphase) kann ein Zusammenhang mit dem Zellwachstum ausgemacht werden, welcher gegen Ende der Kultivierung nicht mehr zu erkennen ist. Das Zellwachstum scheint von der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration nicht beeinflusst zu sein. Diese Beobachtungen bestätigen die Aussagen von Smith *et al.* (2000), nach denen der Stoffwechsel auch bei geringeren NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen davon unberührt abläuft. Weiterhin decken sich die Beobachtungen mit den Ausführungen von Khalmuradov *et al.* (1996), dass höhere NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen in exponentiell wachsenden Zellen, verglichen mit stationären Zellen, festzustellen sind. Möglicherweise spielt die Kompartimentierung der NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese auch eine Rolle. Allerdings lassen sich die Beobachtungen dadurch auch nicht befriedigend erklären.

### 5.3.2 Einfluss einmaliger Glucosezugabe auf die Biosynthese von NAD<sup>+</sup>/H

Der im vorangegangenen Kapitel erörterte Zusammenhang zwischen Glucose-(verfügbarkeit) und NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese soll in diesem Kapitel eingehender untersucht werden. Dazu wurde Glucose nach der Zulaufphase in den Reaktor eingebracht. Die Ergebnisse der Glucosezugabe nach der Zulaufphase werden im Folgenden dargestellt und im Anschluß diskutiert.

Abbildung 5.14a zeigt den Verlauf der Biotrockenmassekonzentration während der Glucosezugabe nach der Zulaufphase. Nach 26 h Prozesszeit wurde der Zulauf abgestellt, nach einer weiteren Stunde die Glucose in den Reaktor gegeben, verdeutlicht durch einen senkrechten Strich. Vor der Zugabe war Glucose im Medium nicht zu detektieren (Abbildung 5.14b), danach steigt sie auf 14,5 g L<sup>-1</sup> an und fällt stetig über einen Zeitraum von knapp 2,5 Stunden. Nach 29,5 Stunden Kultivierung ist keine Glucose mehr im Medium nachzuweisen. Durch Abstellen des Zulaufs geht die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Abluft (Abbildung 5.14a) von 1,3 auf 0,9 % zurück und springt bei 27 Stunden Prozesszeit von 0,9 auf 3,8 %. Innerhalb einer Stunde sinkt die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Abluft markant auf 2,0 % und verbleibt dort, bis keine Glucose mehr im Medium zu messen ist. Letztlich fällt sie bis auf ca. 0,7 %. Bis zum Abstellen des Zulaufs steigt die Biotrockenmassekonzentration bis auf 28,2 g L<sup>-1</sup> an und schwankt im weiteren Verlauf um Werte von 27 g L<sup>-1</sup>. Da der Referenzversuch nach 20 Stunden Kultivierungszeit geerntet wurde, können nur diese Daten zum Vergleich herangezogen werden. In dieser Zeit entspricht der Verlauf der Biotrockenmassekonzentration dieses Versuchs dem des Referenzversuchs. Der entsprechende Verlauf der intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration ist in Abbildung 5.14b gezeigt. In der Zulaufphase und nach Abstellen des Zulaufs schwanken die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen um 0,1 mM. Nach 27 Stunden ist nach einem schwachen Einbruch knapp eine Vervierfachung der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration zu beobachten. Nach einem Maximum von knapp 0,4 mM fällt die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration nach 20 Minuten wieder auf den Ausgangswert und im weiteren Verlauf noch auf Werte um 0,05 mM.



**Abbildung 5.14:** Verlauf der (a) Biotrockenmassekonzentration (Quadrate) und (b) der intrazellulären  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentration (Dreiecke) während einer Kultivierung im 3 L Labormaßstab, der nach 27 Stunden Kultivierungszeit einmalig Glucose (offene Kreise) zugegeben wurde. Dies ist durch einen senkrechten Strich verdeutlicht. Die Daten der Referenzläufe können Abbildung 5.12 und Abbildung 5.13 entnommen werden.

Die NaMN- und NaAD-Konzentrationen nach dem Abschalten des Zulaufs entsprechen denen davor und bewegen sich bei 0,01 mM NaAD und 0,02 mM NaMN (ohne Abbildung). Nach 27 Stunden Kultivierungszeit fällt die NaMN-Konzentration und kann in den folgenden 2,5 Stunden nicht detektiert werden. Gegen Ende werden die Ausgangswerte erreicht. In dem selben Zeitraum sinkt die NaAD-Konzentration auf Werte unterhalb der Quantifizierungsgrenze, nachdem sie zuvor auf doppelte Werte angestiegen ist.

*Diskussion*

Im Folgenden sollen die gezeigten Ergebnisse diskutiert werden. Wie aus Abbildung 5.14 zu sehen ist, führt die Glucosezugabe nach dem Abstellen des Zulaufs zu keiner wesentlichen Änderung der Biotrockenmassekonzentration. Diese schwankt um 27 g L<sup>-1</sup>, ohne eine erkennbare Tendenz zu zeigen. Die Glucosezugabe scheint keinen Einfluss auf den Verlauf der Biotrockenmassekonzentration zu haben. Die Glucosezugabe führt zu einer deutlich gesteigerten CO<sub>2</sub>-Produktion. Da bei dem in Abbildung 5.14 betrachteten Lauf gleiche Biotrockenmassekonzentrationen wie in dem zweiten Referenzversuch erzielt werden, kann von einem vergleichbaren Zustand der Zellen ausgegangen werden. Ein Zusammenhang zwischen der NaMN-, NaAD- und NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration kann bei der Glucosezugabe nach der Zulaufphase erkannt werden. Mit der ansteigenden NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration nimmt auch die NaAD-Konzentration zu, die NaMN-Konzentration nimmt ab (ohne Abbildung). Ein erhöhter Fluss durch die Biosynthese würde die NaMN-Konzentration senken, wenn mehr NaMN in NaAD umgewandelt wird. Allerdings würde das den im vorangegangenen Kapitel gemachten Aussagen widersprechen. Sofern die NAD<sup>+</sup>-Synthetase mit maximaler Aktivität arbeitet, die nach Yu und Dietrich (1972) einzig durch die NaAD-Konzentration bestimmt ist, und diese geringer ist als die der NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferasen, würde nicht so viel NaAD in NAD<sup>+</sup> umgesetzt werden können, wie NaMN in NaAD umgesetzt wird. Hier ist eine Quantifizierung der Zusammenhänge aufgrund des unbekanntes Flusses durch die Biosynthese sowie der *in vivo* Enzymaktivitäten erschwert. Jedoch kann festgehalten werden, dass die zu beobachtenden Änderungen in der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration auf entsprechende Änderungen der Konzentrationen der Vorstufen zurückgeführt werden können. Die regulierenden Schritte scheinen jedoch bei bzw. vor der NaMN-Synthese zu liegen. Es handelt sich jeweils um eine aktive Beeinflussung der NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese.

Dabei scheint sich ein später Zeitpunkt als günstig zu erweisen. Mit dem späten Zugabezeitpunkt gehen eine höhere Biotrockenmassekonzentration sowie eine niedrigere NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration als Bedingungen für eine NAD<sup>+</sup>/H-Akkumulation einher. Je weiter die Kultivierung fortschreitet, desto limitierter und ausgezehrter sind die Zellen. Eine Limitierung ist anzunehmen, da die einmalig zugegebene Glucose nicht zu einer Steigerung der Biotrockenmassekonzentration führt. Daher ist anzunehmen, dass die Glucose neben CO<sub>2</sub> auch vermehrt in Stoffwechselnebenprodukte überführt wird.

Die Abhängigkeit von der Ethanol- und Glycerinkonzentration kann ausgeschlossen werden, da in einigen Experimenten die Glucosezugabe nach der Zulaufphase ineffektiv war, obwohl in diesen niedrige Ethanol- und Glycerinkonzentrationen vorlagen (ohne Abbildung). Bei diesen Experimenten fiel auf, dass Acetat bis zum Zugabezeitpunkt noch zunahm (ohne Abbildung). Es ist anzunehmen, dass der Abbau von Acetat schon begonnen haben muss, damit eine einmalige Glucosezugabe zu einer Anreicherung mit NAD<sup>+</sup>/H führen kann. Möglicherweise ist das Umschalten von Acetatverstoffwechslung auf die Verstoffwechslung der Glucose mit dem Anstieg der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration in Verbindung zu bringen. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass neben der Glucoseverfügbarkeit auch der Zeitpunkt der Verfügbarkeit einen Einfluss auf die Akkumulation von NAD<sup>+</sup>/H haben kann.

### **5.3.3 Charakterisierung der Prozessphasen und NAD<sup>+</sup>/H-Bedarf**

In den vorangegangenen Kapiteln ist deutlich geworden, dass die Glucoseverfügbarkeit zu bestimmten Prozessphasen einen Einfluss auf die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration haben kann. Zur weiteren Klärung sollen die Prozessphasen der Referenzprozesse näher betrachtet und charakterisiert werden. Zur Charakterisierung der Prozessphasen der Referenzprozesse aus Kapitel 5.3.1 sind die Nebenproduktkonzentrationen bestimmt worden. Die Verläufe sind in Abbildung 5.15 und Abbildung 5.16 gezeigt.

Zu Beginn der Kultivierung liegen die betrachteten Nebenprodukte Acetat (offene Dreiecke), Ethanol (graue Diamanten) und Glycerin (schwarze Kreise) in Konzentrationen von jeweils 0,5 g L<sup>-1</sup>, 0,5 g L<sup>-1</sup> und 4 g L<sup>-1</sup> vor. Mit dem Animpfen und dem einsetzenden Zellwachstum bleiben die Konzentrationen von Acetat und Glycerin fast unverändert. Ein deutlicher Anstieg der Ethanolkonzentration ist zu verzeichnen, solange Glucose noch im Medium gemessen werden kann. Nach dem Verbrauch der vorgelegten Glucose sinkt die Ethanolkonzentration, die Acetatkonzentration nimmt leicht zu, die Konzentration von Glycerin bleibt unverändert. Bis zum Einschalten des Zulaufs haben die Glycerinkonzentration nicht, die Acetatkonzentration leicht und die Ethanolkonzentration deutlich auf Werte von 2,2 bzw. 3,4 g L<sup>-1</sup> zugenommen.

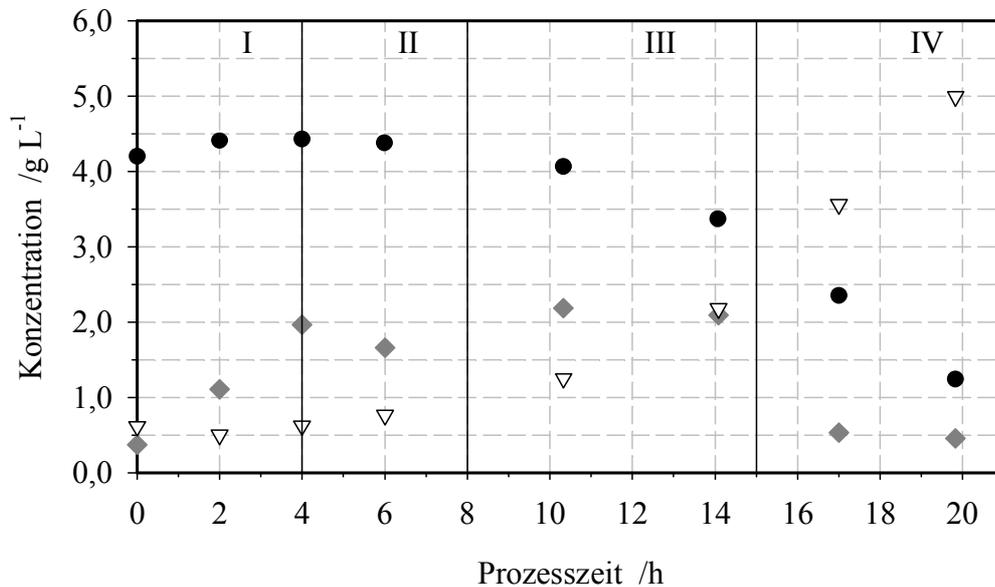


Abbildung 5.15: Verlauf der Nebenproduktkonzentrationen während des in Abbildung 5.12 gezeigten Referenzprozesses. Zulaufstart nach 8 Stunden,  $pH$  6,5. Ethanol: Graue Diamanten. Glycerin: Schwarze Kreise. Acetat: Offene Dreiecke. I, II, III, IV: Prozessphasen.

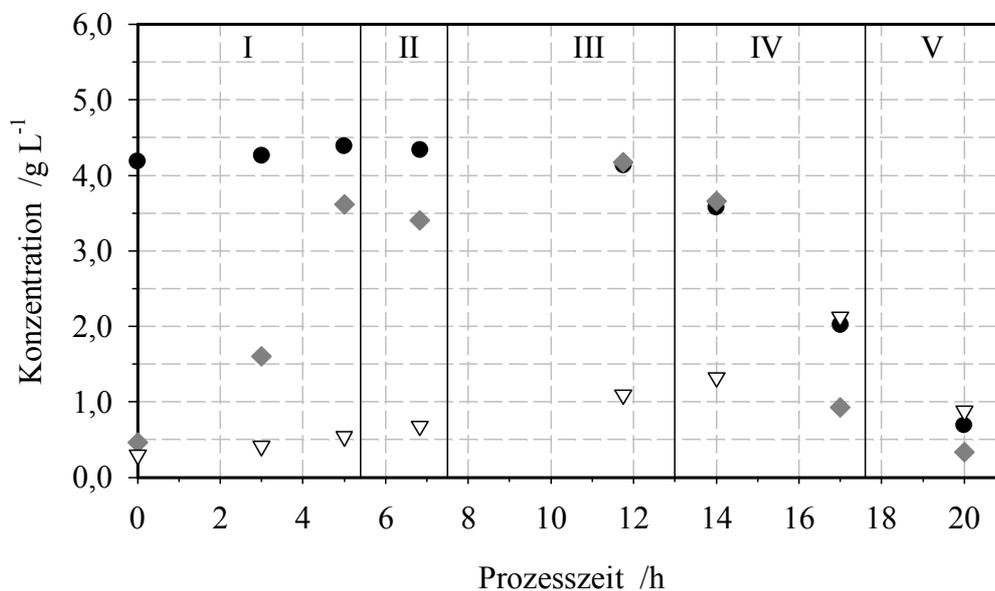


Abbildung 5.16: Verlauf der Nebenproduktkonzentrationen während des in Abbildung 5.13 gezeigten Referenzprozesses. Zulaufstart nach 7,5 Stunden,  $pH$  5,9. Ethanol: Graue Diamanten. Glycerin: Schwarze Kreise. Acetat: Offene Dreiecke. I, II, III, IV, V: Prozessphasen.

Nach dem Einschalten des Zulaufs nehmen die Konzentrationen an Ethanol und Acetat weiterhin zu. Nach 12 bzw. 14 Stunden ändert sich das Bild. Während die Acetatkonzentration weiterhin ansteigt, fallen die Ethanol- und Glycerin-Konzentrationen. Mit den sinkenden Ethanol- und Glycerin-Konzentrationen geht eine markante Steigerung der Acetatbildungsrate einher. In dem ersten Referenzversuch steigt die Acetatkonzentration bis zum Ende der Kultivierung. Im Gegensatz dazu erreicht die Acetatkonzentration in dem zweiten Referenzversuch nach 17 Stunden Prozesszeit ein Maximum und fällt bis zum Ende der Kultivierung.

### *Diskussion*

Hinsichtlich des Verlaufs der Nebenprodukte können die Kultivierungen in bis zu fünf Phasen unterteilt werden, wie in Abbildung 5.15 und in Abbildung 5.16 gekennzeichnet. In der ersten Phase (I) wachsen die Zellen auf Glucose. Da diese im Überschuss vorhanden ist, können sie unlimitiert wachsen. Es kommt zum Überschussmetabolismus, der sich u. a. in der Produktion von CO<sub>2</sub> und Ethanol bemerkbar macht. Es ist anzunehmen, dass in dieser Phase große Glucosemengen in CO<sub>2</sub> und Ethanol anstatt in Biomasse umgewandelt werden. Durch den Überschussmetabolismus nimmt auch die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration zu. Ist nach vier bis fünf Stunden die vorgelegte Glucose aufgebraucht, sinkt die CO<sub>2</sub>-Konzentration deutlich ab. Da diese aber im weiteren Verlauf wieder zunimmt, ist mit Stoffwechselaktivitäten zu rechnen. Anhand der Daten scheint in dieser Phase II das zuvor gebildete Ethanol die Energiequelle zu sein. Möglicherweise wird es teilweise in CO<sub>2</sub> und Acetat umgesetzt, wobei letzteres nicht vollständig veratmet wird (s. Abbildung 3.4). Mit der Verstoffwechslung von Ethanol sind deutlich geringere NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen verknüpft. Nach dem Anschalten des Zulaufs ist Glucose wieder die Energiequelle, welche in CO<sub>2</sub>, Biomasse, Ethanol und Acetat umgesetzt wird. Die letzteren beiden Produkte deuten auf eine Katabolitrepression hin. Eine offensichtliche Steigerung der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration ist mit dieser Art des Stoffwechsels verbunden. Es wird deutlich, dass sich Phase I und Phase III ähneln. Innerhalb der Zulaufphase sind noch zwei weitere Phasen zu erkennen. Da in der Phase IV die Nebenprodukte Ethanol und Glycerin verstoffwechselt werden, ist davon auszugehen, dass in dieser Phase Glucose limitierend ist und (fast) keine Katabolitrepression mehr vorliegt. Es werden Glucose, Ethanol und Glycerin gleichzeitig veratmet. Die gemeinsamen Produkte sind Biomasse, CO<sub>2</sub> und Acetat. In diesem Fall ist Glycerin nicht als Nebenprodukt des Überschussmetabolismus

entstanden. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass es Bestandteil des Komplexmediums ist und wahrscheinlich mit dem CSL eingebracht wird. Jedoch kann Glycerin als Nebenprodukt gebildet und als Substrat aufgenommen und veratmet werden. Obwohl seit dem Einschalten des Zulaufs keine Glucose im Medium zu detektieren ist, deuten die Daten darauf hin, dass in der Phase III im Gegensatz zu Phase IV ein gewisser Überschuss an Glucose bestanden haben muss, der zwar nicht zu einer Akkumulation führte, jedoch aber ausreichte, die Katabolitrepression wie in Phase I aufrecht zu erhalten. Wie in Phase I kann auch in Phase III der Überschuss an Glucose mit einer gesteigerten NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration in Verbindung gebracht werden. In beiden Referenzprozessen werden die Phasen I bis IV durchlaufen, in dem zweiten schließt sich jedoch noch eine weitere Phase an. Diese ist charakterisiert durch die Abnahme der Acetat-Konzentration, was auf eine zusätzliche Acetatverstoffwechslung hindeutet. In Phase V (Abbildung 5.16) werden Glucose, Ethanol, Glycerin und Acetat gleichzeitig zu Biomasse und CO<sub>2</sub> veratmet. Weitere Produkte sind nicht ausgeschlossen, jedoch konnten keine Änderungen in den Konzentrationsverläufen von Acetaldehyd und Succinat festgestellt werden (ohne Abbildung). Der Eintritt in die Phase V kann anhand des kurzzeitigen Einbruchs der CO<sub>2</sub>-Konzentration ausgemacht werden. Wie in Kapitel 5.3.2 erläutert, scheint erst ab diesem Zeitpunkt die NAD<sup>+</sup>/H-Anreicherung durch eine einmalige Glucosezugabe möglich. Allerdings fiel nicht bei allen Versuchen der kurzzeitige Einbruch der CO<sub>2</sub>-Konzentration mit einer sofort einsetzenden Acetatverstoffwechslung zusammen. Möglicherweise setzte diese zwar ein, konnte aber anhand der Messwerte erst einem späteren Zeitpunkt zugeordnet werden. Es ist anzunehmen, dass bei einem Zulaufverfahren mit kontrolliert limitierter Glucosezugabe bei Aufhebung der Katabolitrepression eine NAD<sup>+</sup>/H-Steigerung durch die Glucosezugabe am Ende des Prozesses erzielt werden kann. Dies wäre eine Möglichkeit, bei/nach der Zellanzucht auf die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration positiv Einfluss zu nehmen. Da allerdings die erzielten Konzentrationen weit hinter den in Phase I und III bemerkten Konzentrationen zurückbleiben, wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt. Eine genauere Charakterisierung der Phasen I und III soll als Grundlage für ein Anzuchtverfahren mit gleichzeitiger NAD<sup>+</sup>/H-Anreicherung dienen. Dass in dem zweiten Referenzversuch zusätzlich die Verstoffwechslung von Acetat eintritt, ist wohl auf die höhere Biotrockenmassekonzentration gegen Ende des Prozesses zurückzuführen. Da Glucose, Ethanol und Glycerin nicht ausreichen, die Energieversorgung der Zellen zu decken, zusätzlich einerseits keine anderen Limitierungen

auftreten und andererseits eine assimilierbare Kohlenstoffquelle noch vorhanden ist, wird diese auch noch zur Unterstützung der Energieversorgung herangezogen und ermöglicht wie in Abbildung 5.13 ersichtlich das weitere Zellwachstum. Dass diese Phase V bei dem ersten Referenzprozess nicht auftrat, mag in Verbindung mit dem höher gelegenen *pH* von 6,5 zusammenhängen, der aufgrund ungünstigerer Wachstumsbedingungen zu einem geringeren Zellwachstum und zu Limitierungen im späteren Verlauf der Kultivierung führen kann. Es bleibt festzuhalten, dass es Parallelen zwischen den Phasen I und III sowie zwischen den Phasen II und IV gibt. Die letzteren beiden umfassen metabolische Zustände, die keine NAD<sup>+</sup>/H-Akkumulation bewirken, die ersteren beiden schon. Die Abfolge der assimilierten Energieträger ist in chronologischer Abfolge: Glucose, Glycerin, Ethanol, Acetat. Dies könnte mit dem Energiegehalt dieser Kohlenstoffquellen und der ATP-Ausbeute zusammenhängen. Da zur Phosphorylierung von ADP die Oxidation von NADH eine Voraussetzung ist, könnte der Energiegehalt der Kohlenstoffquelle auch die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration bestimmen. Es ist festzustellen, dass zwischen Energiegehalt der Kohlenstoffquelle und NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration ein Zusammenhang besteht, wobei mit zunehmendem Energiegehalt die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration zunimmt. In dieser Hinsicht ist jedoch unklar, warum bei einem Wechsel von einer energiereichen zu einer energieärmeren Kohlenstoffquelle die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration nicht die Werte der vorigen Phase beibehält sondern entsprechend sinkt. Die Daten deuten bei dieser Art von Wechsel auf einen aktiven Abbau von NAD<sup>+</sup>/H hin. Möglicherweise wird die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration in jeder Stoffwechselphase dem Bedarf angepasst. Eine Rückkopplung zwischen intrazellulärer NAD<sup>+</sup>-Konzentration und Biosynthese auf der Transkriptionsebene wird im Zusammenhang mit posttranslatorischen Proteinmodifikationen (s. Kapitel 3.2.9) beschrieben (Bedalov *et al.*, 2003).

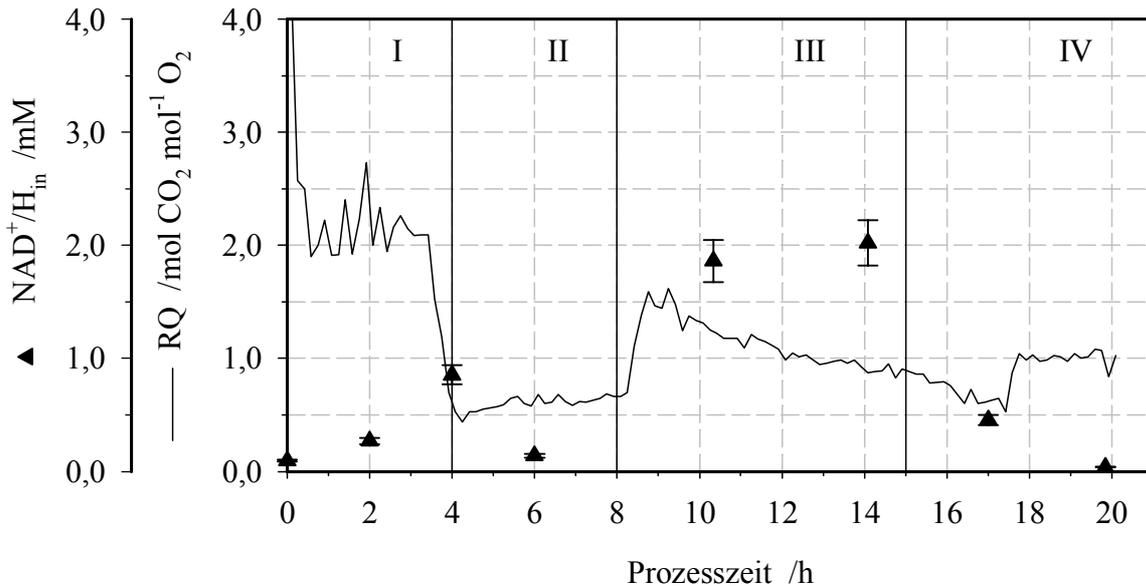
Aus Abbildung 3.4 ist nach Flores *et al.* (2000) zu erkennen, dass bei der aeroben Verstoffwechslung von Glycerin und Ethanol jeweils fünf und von Acetat drei Moleküle NADH gebildet und an der Elektronentransportkette in der inneren Mitochondrienmembran einerseits regeneriert und andererseits in ATP umgewandelt werden können. Interessanterweise kann ein Zusammenhang zwischen der NADH-Ausbeute und der Abfolge der verstoffwechselten Nebenprodukte beim Übergang von Phase III in Phase IV (und V) erkannt werden. Legt man dieser Reihenfolge einen sinkenden Energiegehalt (d. h. sinkende NADH-Ausbeute) zugrunde, könnte dieser eine Erklärung für die ebenfalls sinkende NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration sein. In diesem Fall könnte die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>/H-

Konzentration ein Ergebnis des zu erwartenden Energiegehalts einer Kohlenstoffquelle sein. Je geringer die energetische Ausbeute, desto geringer die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration. Möglicherweise könnte die Integration von Abbildung 3.4 in Abbildung 3.25 an den dort schon angedeuteten Stellen zu weiteren Einblicken in die Zusammenhänge zwischen Zentralstoffwechsel, intrazellulärer NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration und NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese ermöglichen. Eine Verknüpfung des Zentralstoffwechsels mit der NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese wäre über einen cytosolischen und einen mitochondrialen NAD<sup>+</sup>/H-Pool (u. a. in *in silico* Anwendungen) denkbar.

Da die globale Grundlage der Regulation der NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese der Energiegehalt und die Verfügbarkeit einer Kohlenstoffquelle sowie die damit verbundene Stoffwechselsituation sein könnte, kann man bilanzieren, dass die Wiederholung von Phase I nur während/nach Phase V zu einer Anreicherung von NAD<sup>+</sup>/H führen kann. Es müssen die vier Bedingungen (a) hohe Biotrockenmassekonzentration, (b) geringes Zellwachstum, (c) niedrige NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration zu Beginn und (d) Verstoffwechslung von Acetat erfüllt sein. Dabei kann allerdings die durch einmalige Zugabe von Glucose erzeugte NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration schon vor deren kompletter Verstoffwechslung wieder absinken. Aufgrund der komplexen Bedingungen und der geringen NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration im Vergleich zu Phase I und III ist die Suche nach einem anderen Zugang zur Steigerung der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration erstrebenswert. Aufgrund der zu erwartenden geringen Steigerung der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration durch eine einmalige Glucosezugabe am Ende eines Glucose-limitierten Zulaufverfahrens im Vergleich zu den in Phase III erzielbaren Konzentrationen wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Hinsichtlich einer anderen Strategie sollen mit den oben gemachten Angaben die Phasen I und III näher charakterisiert werden und Gemeinsamkeiten herausgearbeitet werden, die den Anstieg der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen in diesen Phasen bedingt haben können. Weitere Parallelen zwischen der Phase I und Phase III können aus Abbildung 5.17 entnommen werden, in der der Verlauf des Respirationskoeffizienten (RQ) während der in Abbildung 5.12 dargestellten Referenzkultivierung aufgetragen ist. Wie aus Abbildung 5.17 deutlich wird, kann ein oxidativer Stoffwechsel mit den Phasen II und IV, den Phasen niedriger NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen, korreliert werden. Bei der Veratmung der Nebenprodukte wird mehr Sauerstoff aufgenommen als CO<sub>2</sub> abgegeben wird. Im

Gegenzug dazu sind die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen hoch, wenn oxidativ-fermentativer Stoffwechsel vorliegt. Mit diesem Zusammenhang können die zuvor gemachten Annahmen nochmals bestätigt werden.



**Abbildung 5.17:** Verlauf des Respirationskoeffizienten (RQ) während der in Abbildung 5.12 dargestellten Referenzkultivierung. Zur Verdeutlichung ist die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration (schwarze Dreiecke) zusätzlich eingetragen. I, II, III, IV: Prozessphasen.

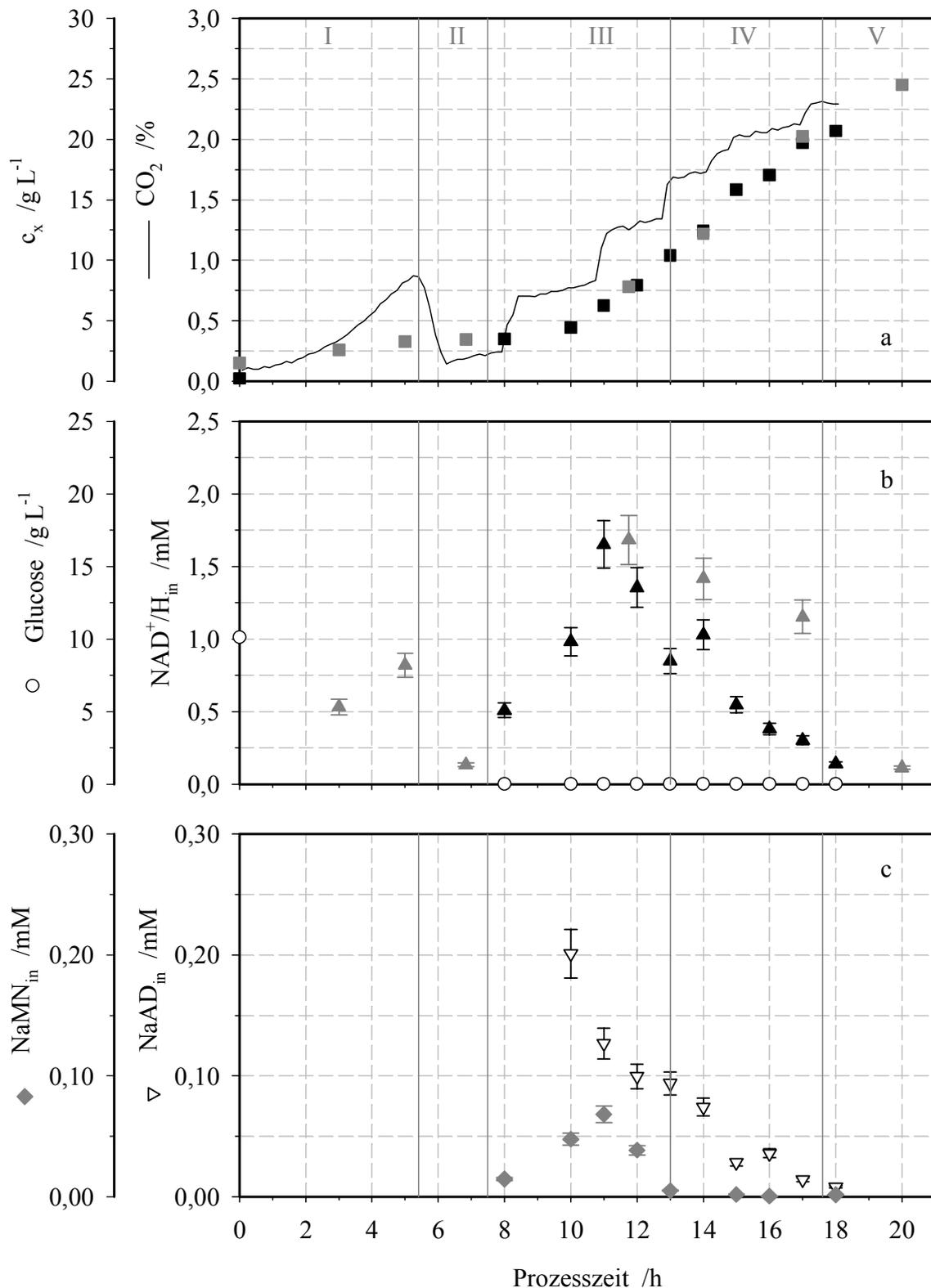
#### 5.3.4 RQ-gesteuerter Prozess

Nach den Beobachtungen im letzten Kapitel tritt eine hohe NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration in Verbindung mit oxidativ-fermentativem Stoffwechsel auf. Da der Respirationskoeffizient (RQ) eine Aussage über den Stoffwechselzustand ermöglicht, könnte diese Größe zur Einstellung und Erhaltung eines bestimmten Stoffwechselzustands herangezogen werden. In diesem Kapitel soll überprüft werden, ob die in den vorausgegangenen Kapiteln getroffenen Annahmen zutreffen und ob ein dauerhaft oxidativ-fermentativer Stoffwechsel während der gesamten Zulaufphase den Einbruch der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen beim Eintritt in die Phasen IV (und V) unterbinden kann. Als Steuergröße wurde der Respirationskoeffizient gewählt, der in Abhängigkeit der Zulaufrate Werte von 1,3 nicht unterschreiten soll.

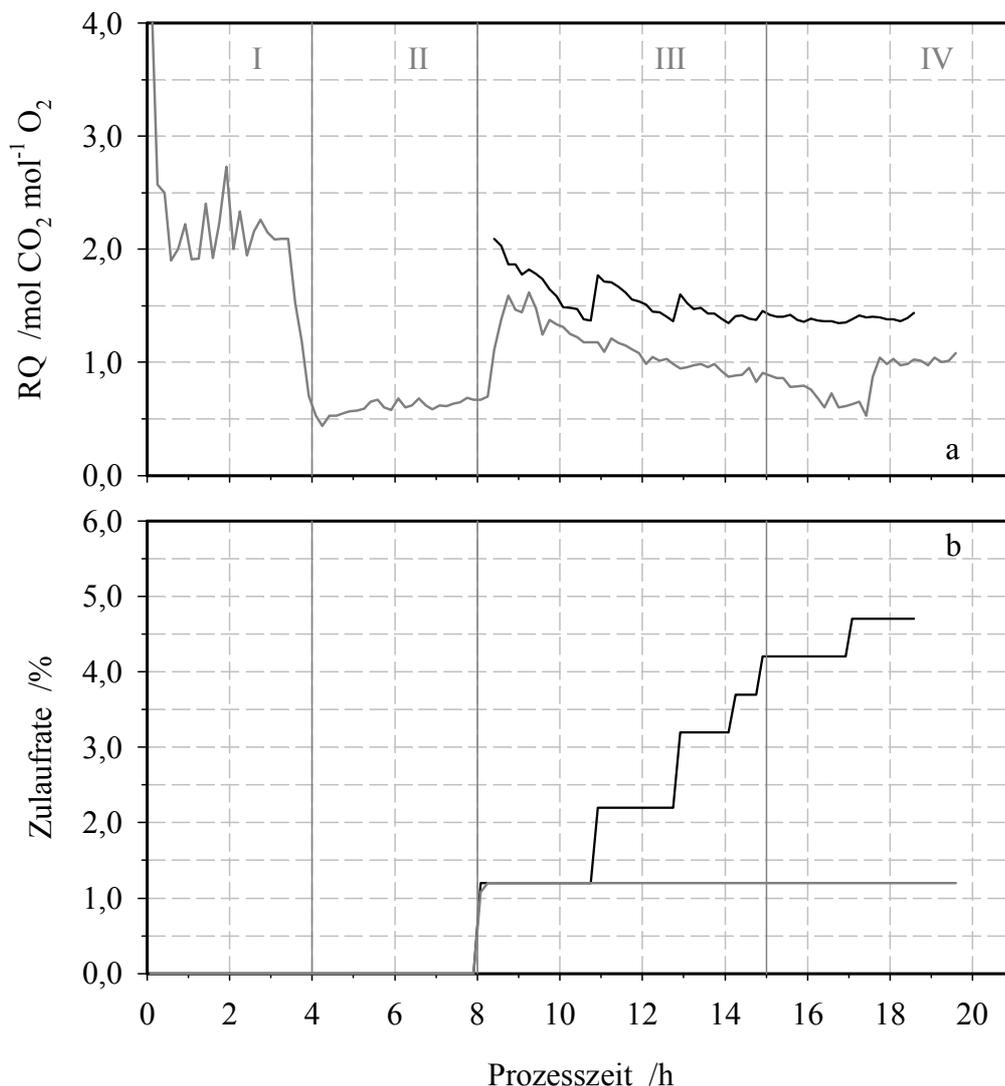
Die Ergebnisse dieser Kultivierung sind in Abbildung 5.18 und Abbildung 5.19 dargestellt. In Abbildung 5.18a ist der Wachstumsverlauf (schwarze Quadrate) gegeben. Nach fünf Stunden ist die zu  $8 \text{ g L}^{-1}$  vorgelegte Glucose aus dem Medium entfernt (Abbildung 5.18b). Bis zum Start des Zulaufs nach acht Stunden und während der gesamten Zulaufphase kann Glucose im Medium nicht nachgewiesen werden. Der Verlauf der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Abluft steigt mit dem Anschalten der Zulaufpumpe nach acht Stunden Kultivierungszeit sprunghaft von 0,24 auf 0,7 % an. Im weiteren Verlauf sind bei knapp 11, 13 und 14 Stunden Prozesszeit weitere Sprünge zu erkennen.

Die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen (Abbildung 5.18b, schwarze Dreiecke) wurden erst mit Beginn der Zulaufphase bestimmt. Ausgehend von 0,5 mM steigt diese in der Zeit zwischen acht und elf Stunden bis auf 1,6 mM an, bricht im Folgenden deutlich bis auf 0,8 mM ein, erholt sich leicht und fällt letztlich bis auf einen Wert von 0,14 mM nach 18 Stunden. Der Verlauf der Konzentrationen der NAD<sup>+</sup>/H-Vorstufen NaMN und NaAD (Abbildung 5.18c) entspricht qualitativ dem Verlauf der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen während der Kultivierung. In den Teilabbildungen a und b sind die entsprechenden Werte der Referenzkultivierung aus Abbildung 5.13 als graue Symbole dargestellt. Ebenfalls in Grau sind die Prozessphasen dieser Referenzkultivierung gezeigt.

Der Verlauf des Respirationskoeffizienten (RQ) für die in Abbildung 5.18 dargestellte Kultivierung ist in Abbildung 5.19a als schwarze Linie gegeben. Zwischen acht und 11 Stunden ist ein kontinuierlicher Abfall des Respirationskoeffizienten von anfänglich 2 bis auf 1,4 auszumachen. In den weiteren drei Stunden wird diese Tendenz beibehalten, allerdings bei knapp 11 und 13 Stunden durch sprunghafte Anstiege unterbrochen. Im weiteren Verlauf schwanken die Werte zwischen 1,4 und 1,5. Die Zulauftrate (Abbildung 5.19b, schwarze Linie) wird bei knapp elf, 13, 14, 15 und 17 Stunden erhöht, wobei durch die ersten beiden Erhöhungen die Zulauftrate jeweils um 1 % von 1,2 auf 3,2 % ansteigt. Die weiteren Erhöhungen erfolgen in 0,5 % Schritten. Für den Respirationskoeffizienten und die Zulauftrate sind die entsprechenden Werte der Referenzkultivierung aus Abbildung 5.12 als graue Linien dargestellt. Zusätzlich sind die Prozessphasen dieser Referenzkultivierung in Grau gegeben.



**Abbildung 5.18:** Verlauf der (a) Biotrockenmassekonzentration (Quadrate), (b) der intrazellulären  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentration (Dreiecke) und (c) der Konzentrationen der direkten Vorstufen von  $\text{NAD}^+$  während einer Kultivierung im 3 L Labormaßstab. Zulaufstart nach acht Stunden,  $\text{pH} = 5,9$ . Der RQ wurde über die stufenweise Erhöhung der Zulauftrate auf Werte über 1,3 gesteuert. Die grauen Symbole in den Teilen a und b geben die Werte der Referenzkultivierung an. I, II, III, IV, V: Prozessphasen der Referenzkultivierung in Grau. Glucose: Offene Kreise. NaMN: Graue Diamanten. NaAD: Offene Dreiecke.



**Abbildung 5.19:** Verlauf des (a) Respirationskoeffizienten (RQ) und der (b) Förderleistung der Zulaufpumpe für den RQ-gesteuerten Prozess aus Abbildung 5.18 (schwarze Linien). Die entsprechenden Werte für den Referenzprozess sind durch graue Linien dargestellt. I, II, III, IV: Prozessphasen der Referenzkultivierung in Grau.

### Diskussion

Der hier gezeigte Lauf soll der Überprüfung der in Kapitel 5.3.3 gemachten Annahmen hinsichtlich der Herstellung  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -angereicherter Biokatalysatoren dienen. Diese Annahmen werden anschließend dahingehend diskutiert.

Die  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentration nimmt während den ersten drei Stunden der Zulaufphase zu. Diese entspricht der in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Phase III. Aufgrund des geringeren Probenahmeintervalls ist anhand der drei aufeinanderfolgenden Werte eine Bestätigung der bisher gemachten Beobachtungen zu sehen. Unter den gewählten

Bedingungen nimmt mit dem Einschalten des Zulaufs nach acht Stunden Kultivierungszeit die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration über eine gewisse Zeit zu. Diese Phase III ist durch einen kontinuierlichen Anstieg der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration gekennzeichnet.

Allerdings ist auch hier zu sehen, dass der Anstieg der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration zeitlich limitiert erscheint. Zwischen 11 und 12 Stunden Kultivierung scheint sich eine Änderung der Bedingungen zu ergeben, die zu einem Rückgang der intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration führt. In dem gezeigten Referenzversuch wurde als Ursache für den Rückgang der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration der Übergang von Phase III in Phase IV herausgearbeitet, der durch den Wechsel von oxidativ-fermentativem zu rein oxidativem Stoffwechsel mit der einsetzenden Versoffwechslung von Ethanol und Glycerin gekennzeichnet ist. Dabei sinkt der Respirationskoeffizienten unter eins. Da in dem hier behandelten Lauf der Respirationskoeffizienten auch in dieser Zeit Werte über eins annimmt, ist nicht mit einer Änderung der Stoffwechselsituation zu rechnen. Der oxidativ-fermentative Stoffwechsel sollte erhalten bleiben. Somit muss erkannt werden, dass der über den RQ bestimmte und dauerhaft eingestellte oxidativ-fermentative Stoffwechsel in dieser Form nicht ausreicht, hohe NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen in der Zelle zu erhalten. Mit dem Einbruch der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration fällt zwar der Respirationskoeffizienten nicht unter eins, jedoch fällt, wie mit Abbildung 5.18b und Abbildung 5.19b zusammen zu erkennen ist, der Zeitpunkt der Zulauferhöhung aufgrund der RQ-Steuerung mit dem Einbruch der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration nach 11 Stunden Prozesszeit zusammen. Interessanterweise führt die Steigerung der Zulauftrate um ca. 80 % von 0,14 auf 0,25 Gramm Glucose pro Minute zu einem Einbruch der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration. Anhand dieser Betrachtung kann verdeutlicht werden, dass wohl schon eine minimale Glucosezugabe während der Zulaufphase zu einem Einbruch der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration führen kann. So mag hinterfragt werden, ob es ein Konzentrationsfenster gibt, das eine Mindestkonzentration zur Einstellung des oxidativ-fermentativen Stoffwechsels und der damit verbundenen NAD<sup>+</sup>/H-Anreicherung erfordert, wobei eine Maximalkonzentration nicht überschritten werden darf, welche zu einem Einbruch der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration führen würde. Es ist anzunehmen, dass beide Konzentrationswerte nahe zusammen und in einem schwer messbaren Bereich liegen. Möglicherweise ist aber auch das hier angenommene Überschreiten dieser Maximalkonzentration nicht die Ursache für den Einbruch, sondern die Tatsache der Glucosezugabe während der Zulaufphase. Möglicherweise können die Organismen in dieser Phase die Glucose nicht in Verbindung

mit einer weiteren Steigerung der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration umsetzen. Abschließend muss die Bedeutung des oxidativ-fermentativen Stoffwechsels für die Akkumulation von NAD<sup>+</sup>/H relativiert werden: Wenn NAD<sup>+</sup>/H gebildet wird, liegt oxidativ-fermentativer Stoffwechsel vor. Jedoch nicht jede oxidativ-fermentative Stoffwechselsituation führt zu einer Steigerung/Erhaltung der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen.

Sollte nicht die Tatsache der zusätzlichen Glucosezugabe, sondern viel mehr die zugegebene Konzentration, die Ursache für den Einbruch der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration sein, wäre statt einer hier verwendeten RQ-Steuerung eine Regelung zu untersuchen. Aufgrund der zuvor unbekanntem Ansprechzeit der Steigerung der Zulauftrate, d. h. hinsichtlich der zu bestimmenden Kombination der Größen Steigerungsfaktor und Abtastintervall zwischen den einzelnen Steigerungen, wurde die Untergrenze des Respirationskoeffizienten auf 1,3 festgesetzt, die Steigerung der Zulauftrate und entsprechend das Abtastintervall bis zum nächsten Werteabgleich im Nachhinein betrachtet zu hoch gewählt und möglicherweise so eine Überdosierung erzeugt. Hinsichtlich der eingängigeren Interpretation der Daten wurde auf eine Regelung verzichtet und der Respirationskoeffizient nur nach unten begrenzt. Mit einem sensitiveren Regler und den entsprechenden Parametern wäre eine exaktere Regelung des Respirationskoeffizienten in der Nähe des Grenzwertes von 1,0 denkbar, eine vermeintlich kritische Maximalkonzentration (pro Erhöhung der Zulauftrate) könnte unterschritten bleiben und könnte so doch zu einer Ausweitung der Phase III und der längeren Erhaltung höherer NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen führen.

Denkbar wäre anhand dieser Informationen auch, mit einer höheren Zulauftrate die Zulaufphase zu beginnen. Dadurch könnte einerseits das Zellwachstum beschleunigt und andererseits die Katabolitrepression bis zu einer späteren Zeit erhalten werden. Beides würde dazu führen, dass zu einem unumgänglichen Erntezeitpunkt nach 12 bis 14 Stunden eine hohe NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration in einer Kultivierung mit gesteigerter Biotrockenmassekonzentration vorliegt.

### 5.3.5 Kontinuierliche Zugabe von Zusätzen

Als weitere Strategie zur Anreicherung von Biokatalysatoren mit NAD<sup>+</sup>/H während der Anzucht soll in diesem Kapitel der Einfluss der kontinuierlich zugegebenen Zusätze Adenin und Nicotinsäure untersucht werden. Dazu wurde nach den ersten vier Stunden der Zulaufphase die Zulauflösung gegen eine, die die genannten Zusätze enthält, ersetzt. Die Zulauftrate wurde konstant gehalten.

In Abbildung 5.20 ist der Verlauf der Biomassekonzentration und der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration (jeweils schwarze Symbole) während einer Kultivierung nach diesem zuvor genannten Prinzip dargestellt. Zum Vergleich sind die relevanten Daten sowie die Prozessphasen einer Referenzkultivierung als graue Symbole angegeben. Bis zu einer Prozesszeit von 14 Stunden gleichen sich die Verläufe der Biotrockenmassekonzentrationen beider dargestellter Kultivierungen. Im weiteren Verlauf ist bei dem Prozess mit kontinuierlicher Zudosierung der Zusätze ein etwas geringeres Zellwachstum zu beobachten, so dass nach 20 Stunden Werte um 20 g L<sup>-1</sup> erreicht werden, in der Referenz knapp 25 g L<sup>-1</sup>. Der Verlauf der intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration ist in Abbildung 5.20b und c mit den Vorstufen NaMN und NaAD gezeigt. In den ersten fünf Stunden ist ein Anstieg der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration bis auf über 3 mM zu erkennen. Danach fällt diese bis auf 0,3 mM ab. Während der Zulaufphase ist eine Zunahme der intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration zwischen acht und 15 Stunden Prozesszeit auszumachen. Nach 15 Stunden sinkt die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration mit einer Schwankung zwischen 18 und 21 Stunden Prozesszeit. Gegen Ende der Kultivierung werden nach 24 Stunden Werte um 0,5 mM gemessen. Mit Beginn der Zulaufphase nehmen die Konzentrationen der NAD<sup>+</sup>/H-Vorstufen NaMN und NaAD zu. Vor dem Zulaufwechsel sinkt die NaMN-Konzentration, die NaAD-Konzentration stagniert. Mit dem Zulaufwechsel bricht die NaMN-Konzentration deutlich ein und sinkt im weiteren Verlauf moderat ab. Zur selben Zeit springt die NaAD-Konzentration von 0,04 auf 0,07 mM, bewegt sich in den folgenden zehn Stunden in diesem Bereich und fällt erst nach 21 Stunden Kultivierungszeit deutlich auf Werte um 0,03 mM. Bis zum Wechsel der Zulauflösung nach 12 Stunden schwanken die im Medium gemessenen Adeninkonzentrationen zwischen null und 1,9 mM (ohne Abbildung). In dem selben Zeitraum sind so gut wie keine Nicotinsäure-Konzentrationen im Medium zu bestimmen (ohne Abbildung). Nach dem Wechsel der Zulauflösung ist je-

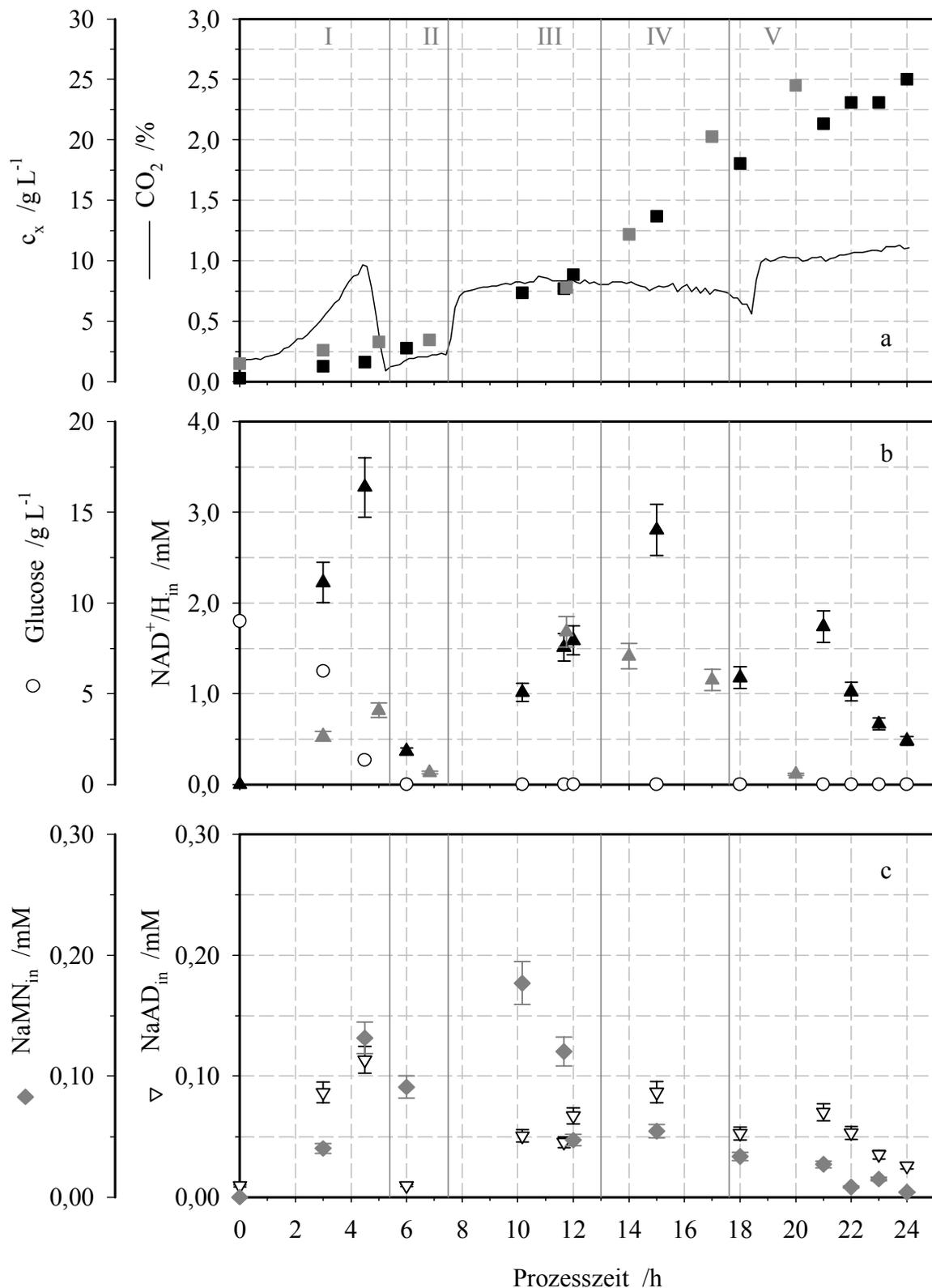


Abbildung 5.20: Verlauf der (a) Biotrockenmassenkonzentration (Quadrate), (b) der intrazellulären  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentration (Dreiecke) und (c) der Konzentrationen der direkten Vorstufen von  $\text{NAD}^+$  während einer Kultivierung im 3 L Labormaßstab. Zulaufstart nach acht Stunden,  $\text{pH} = 5,9$ . Nach 12 Stunden werden mit dem Zulauf Adenin und Nicotinsäure bei konstanter Zulauftrate zugegeben. Daten einer Referenzkultivierung in den Teilen a und b in Grau gezeigt. Glucose: Offene Kreise. NaMN: Graue Diamanten. NaAD: Offene Dreiecke.

weils ein Anstieg der Adenin- und Nicotinsäurekonzentrationen im Medium zu beobachten. In beiden Fällen verläuft dieser in den ersten drei bis sechs Stunden nach dem Wechsel entsprechend dem jeweiligen Dosierprofil, im weiteren Verlauf ergeben sich bei Adenin größere Schwankungen und Abweichungen zu geringeren Konzentrationen, bei Nicotinsäure Abweichungen zu höheren Konzentrationen.

### *Diskussion*

Der Einfluss der kontinuierlichen Adenin- und Nicotinsäurezugabe während einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 wurde untersucht. Wie aus Abbildung 5.20 zu erkennen ist, könnten die Zusätze einen Einfluss auf das Zellwachstum haben, da die Endwerte der Biotrockenmassekonzentration unter denen des Referenzprozesses bleiben. Da diese Abweichung nicht unmittelbar mit dem Wechsel der Zulauflösung nach zwölf Stunden zusammenfällt, könnte auf eine Konzentrationsabhängigkeit geschlossen werden. Nach den Erfahrungen der Untersuchungen in Kapitel 5.2 könnte dieser Effekt eher Nicotinsäure zugeschrieben werden als Adenin. Auffällig sind zwei Abweichungen im Verlauf der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration beim Vergleich mit dem Referenzansatz. Erstens ist mit dem Wechsel der Zulauflösung ein längerer Anstieg der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration über mindestens drei Stunden zu beobachten. Und zweitens können gegen Ende der Kultivierung im Vergleich zum Referenzprozess deutlich höhere NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen in den Zellen bestimmt werden. An dem prinzipiellen Verlauf sind keine Änderungen auszumachen. Die angedeutete Parabel scheint ein Maximum bei höheren Werten und zu späteren Zeiten zu durchlaufen. Diese Verschiebung resultiert in höheren NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen zu einem Erntezeitpunkt nach 20 Stunden Kultivierung.

Da bei der einmaligen Zugabe von Adenin bei zwölf Stunden Prozesszeit ein sprunghafter Anstieg der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration zu beobachten war, und dieser bei der einmaligen Zugabe von Adenin und Nicotinsäure nicht so ausgeprägt war (beides ohne Abbildung), deuten diese Daten darauf hin, dass die längere Konzentrationssteigerung der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration nach dem Wechsel der Zulauflösung eher der Wirkung von Adenin zuzuschreiben ist. Zwar konnte dieser in einem zweiten Lauf mit Wechsel der Zulauflösung nicht beobachtet werden, so muss in diesem Zusammenhang aber genannt werden, dass im letztgenannten Fall der Zulauf zum Wechsel der Lösungen abgestellt wurde. Ein Einbruch der CO<sub>2</sub>- und NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration waren die unmittelbaren Folgen. Möglicherweise konnte der oben angenommene Effekt der Adeninzugabe nicht

zum Tragen kommen, da die Zellen kurzzeitig ohne Glucoseversorgung auskommen mussten und eine Änderung der Stoffwechselsituation nicht ausgeschlossen werden kann. Bei der Betrachtung der Vorstufen von NAD<sup>+</sup>/H in Abbildung 5.20c ist zu sehen, dass mit dem Zulaufwechsel ein Einbruch der NaMN-Konzentration bei gleichzeitiger Steigerung der NaAD-Konzentration einhergeht. Da zur selben Zeit auch die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration ansteigt, könnte der Zulaufwechsel eine Erhöhung des Flusses durch die NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese bewirkt haben. Da nach 15 Stunden die NaMN-Konzentration auf einem niedrigeren Niveau bleibt, die NaAD- und NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen jeweils aber zunehmen, scheint die Annahme eines höheren Flusses durch die Biosynthese von NAD<sup>+</sup>/H bestätigt zu werden. Die Beobachtungen aus der Einzelzugabe von Adenin und/oder Nicotinsäure während der Zulaufphase erlauben den selben Schluss und bestätigen die Annahme. Allerdings ist interessant, dass die noch geringen Adeninkonzentrationen kurz nach dem Zulaufwechsel ausreichen, die durch einmalige Zugabe von Adenin zu 5 mM erzielten Effekte zu wiederholen. Auf die Übereinstimmung mit den in Kapitel 5.2.3 formulierten Beobachtungen sei hingewiesen. Wie in Kapitel 5.2.3 erörtert, kann auch im Rahmen der reaktionstechnischen Untersuchung der Anreicherung von NAD<sup>+</sup>/H allgemein gefolgert werden, dass eine NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase einer Inhibierung unterliegen kann, die durch Adeninzugabe reduziert werden kann. Die zusätzliche Aufhebung einer möglichen Limitierung kann nicht ausgeschlossen werden. Es ist auch denkbar, dass die Nicotinsäure bei der einmaligen Zugabe der Zusätze während der Zulaufphase die Bildung von ATP aus Adenin reduziert, da die reine Adeninzugabe zu einer größeren Auswirkung führt. Es bleibt festzuhalten, dass mit dem Zulaufwechsel zum Zeitpunkt des Wechsels die Biosynthese von NAD<sup>+</sup>/H aktiv beeinflusst werden kann. Mögliche Inhibierungen und/oder Limitierungen können durch Adenin reduziert werden. Neben dem Anstieg der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration nach dem Wechsel der Zulauflösung ist auch eine Verschiebung der fallenden NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen zu einem späteren Zeitpunkt der Kultivierung zu beobachten. Dies wurde auch bei der kontinuierlichen Zudosierung von einer Adenin-haltigen Zulauflösung beobachtet. Zur exakteren Charakterisierung der Einflüsse kann wiederum auf die Erfahrungen bei der einmaligen Zugabe der Zusätze zurückgegriffen werden. Ist bei der einmaligen Zugabe der Kombination aus Adenin und Nicotinsäure der Anstieg der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration am Zugabezeitpunkt weniger ausgeprägt als bei der alleinigen Zugabe von Adenin der selben Endkonzentration, so führt erstere Zugabe ebenfalls zu einer Verschiebung des

Konzentrationsabfalls zu einer späteren Kultivierungszeit (ohne Abbildung). Nach der Zugabe kann über neun Stunden eine konstante Nicotinsäure-Konzentration von ca. 0,5 mM im Medium bestimmt werden, die erst nach 21 Stunden innerhalb der folgenden fünf Stunden auf null abfällt (ohne Abbildung). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Nicotinsäure einen Einfluß auf das Herauszögern des Konzentrationsabfalls gegen Ende der Kultivierung haben kann. Möglicherweise wird in dieser Phase Nicotinsäure aus dem Medium aufgenommen und in die NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese eingespeist. Der Verlauf der Nicotinsäure-Konzentration im Medium deutet eher auf eine aktive Aufnahme als auf eine diffusive Aufnahme hin, da letztere zu einem kontinuierlichen Abklingen der Nicotinsäurekonzentration nach der Zugabe führen sollte. Gegen den aktiven Transport spricht allerdings, dass der Nicotinsäure-Transporter Tna1p erst bei äußerst geringen Nicotinsäurekonzentrationen unter 0,04 µM Wachstumseinbußen verhindern soll (Llorente und Dujon, 2000). Des weiteren ist auch unklar, ob die Kultivierungsbedingungen dazuführen können, dass Nicotinsäure möglicherweise aus den Zellen ausgeschleust wird, was auf einen Adeninmangel zurückgeführt werden kann (Rose, 1960). Letzterer sollte hier jedoch wegen der kontinuierlichen Zudosierung und Akkumulation im Medium nicht auftreten. Unter der Annahme einer Nicotinsäureaufnahme ab 21 Stunden Kultivierungszeit würden sich zwei Konsequenzen anschließen. Einerseits würde die fallende NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration trotz Aufnahme von Nicotinsäure auf eine geringe Verweilzeit der aufgenommenen Nicotinsäuremoleküle innerhalb des Pyridin-Kreislaufs und insbesondere in Form von NAD<sup>+</sup>/H schließen lassen. Ein Abbau der Nicotinsäure zu Metaboliten wie Fumarat (Michal, 1999), die nicht mehr in die NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese eingespeist werden können oder sollen, wäre nicht auszuschließen. Als zweite Konsequenz könnte sich aus der Annahme der (aktiven) Nicotinsäureaufnahme nach 21 Stunden Prozesszeit folgern lassen, dass diese zur Synthese von NAD<sup>+</sup>/H in den vorangegangenen neun Stunden nicht benötigt worden wäre. Da die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration in dieser Zeit jedoch steigt, müssten demnach die Vorstufen, v. a. NaMN, in der *de novo* Biosynthese generiert worden sein. Diese Daten würden biochemisch belegen, dass NAD<sup>+</sup>/H während des (exponentiellen) Zellwachstums in erster Linie über den *de novo* Weg synthetisiert wird (Ghislain *et al.*, 2002). Ein Experiment mit Chinolinsäure oder Tryptophan könnte hier Aufschluss geben. Dem steht jedoch gegenüber, dass die Biosynthese von NAD<sup>+</sup>/H über den *de novo* Weg bei hohen NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen auf Transkriptionsebene durch Hst1p unterbunden werden soll (Bedalov *et al.*, 2003).

Bei 21 Stunden Prozesszeit fällt der Zeitpunkt der beginnenden Abnahme der Nicotinsäurekonzentration im Medium mit dem stagnierenden Zellwachstum zusammen. Da unter stationären Bedingungen die NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese hauptsächlich über den Pyridin-Kreislauf erfolgt (Ghislain *et al.*, 2002), wäre dies ein weiterer Hinweis, dass die Nicotinsäure aus dem Medium aufgenommen und über den Preiss-Handler-Weg zu NAD<sup>+</sup> verarbeitet wird. Biochemisch könnte dies als Beleg des Umschaltens von *de novo* Biosynthese auf Pyridin-Kreislauf in Abhängigkeit der Wachstumsphase gedeutet werden. Allerdings wird auch beschrieben, dass bei niedrigen NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen die Gene des *de novo* Biosynthesewegs induziert werden (Bedalov *et al.*, 2003). Analog den oben gemachten Aussagen muss hier gefragt werden, warum in diesem Fall die *de novo* Biosynthese nicht zugeschaltet wurde und wenn ja, warum die sinkenden NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen nicht abgefangen werden konnten.

Angesichts der oben genannten Widersprüche hinsichtlich der Regulation der NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese kann mit den Erläuterungen aus Kapitel 5.2 wiederum festgestellt werden, dass ein genauer Abgleich der Kultivierungsbedingungen im Rahmen eines inhaltlichen Vergleichs erfolgen sollte. Auch aus diesen fünf Kultivierungen mit der einmaligen oder kontinuierlichen Zugabe der Zusätze Adenin und/oder Nicotinsäure (und weiterer) wird klar, dass an dem allgemeinen Verlauf der intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration unter den hier gewählten Kultivierungsbedingungen keine Veränderung erfolgte. Zwar kann die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration (durch Adenin) lokal weiter gesteigert und (durch Nicotinsäure) das Abklingen herausgezögert werden, so muss aber festgehalten werden, dass auch dieser Strategie Mechanismen übergeordnet sein müssen, die den Verlauf der NAD<sup>+</sup>/H-Kurve maßgeblich bestimmen. Möglicherweise kommt dem Energieinhalt der zu verstoffwechselnden Kohlenstoffquellen doch eine größere Bedeutung zu. Glucose als globaler Regulator der NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese kann hier wiederum bestätigt werden, den Zusätzen kommt eher eine unterstützende Funktion zu.

### 5.3.6 Diskussion und Herstellungsvorschrift

Mit den Untersuchungen in Kapitel 5.3 soll eine Vorschrift zur Herstellung NAD<sup>+</sup>/H-angereicherter Biokatalysatoren am Beispiel der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 erstellt werden. Basierend auf den Ergebnissen der Kapitel 5.2 und 5.3.1 wurden drei

Strategien zur Anreicherung von NAD<sup>+</sup>/H erarbeitet und untersucht. Die einmalige Glucosezugabe (Kapitel 5.3.2), ein RQ-gesteuerter Prozess (Kapitel 5.3.4) sowie die kontinuierliche Zugabe von Zusätzen (Kapitel 5.3.5) sollen folgend kurz betrachtet und hinsichtlich einer Herstellungsverfahren diskutiert werden.

Die einmalige Glucosezugabe kann zu einer Steigerung der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration führen. Vier Bedingungen müssen erfüllt sein: Als günstig hat sich ein später Zugabezeitpunkt erwiesen, der durch eine hohe Zellkonzentration, nur mehr geringes Wachstum, eine niedrigere NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration sowie durch die schon einsetzende Verstoffwechslung von Acetat charakterisiert ist. Es ist anzunehmen, dass der Abbau von Acetat schon begonnen haben muss, damit eine einmalige Glucosezugabe zu einer Anreicherung mit NAD<sup>+</sup>/H führen kann. Es ist anzunehmen, dass bei einem Zulaufverfahren mit kontrolliert limitierter Glucosezugabe bei Aufhebung der Katabolitrepression eine NAD<sup>+</sup>/H-Steigerung durch die Glucosezugabe am Ende des Prozesses erzielt werden kann. Dies wäre eine Möglichkeit, bei/nach der Zellanzucht auf die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration positiv Einfluss zu nehmen.

Bei der Untersuchung eines RQ-gesteuerten Prozesses zur Anreicherung der Biokatalysatoren mit NAD<sup>+</sup>/H musste festgestellt werden, dass ein oxidativ-fermentativer Stoffwechsel, d. h. ein Respirationskoeffizient (RQ) größer eins, nur eine notwendige aber nicht hinreichende Voraussetzung ist. Diese Beobachtungen ergänzen vorige Beobachtungen, dass während der Zulaufphase, wenn das Zellwachstum und die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen hoch sind und Acetat gebildet wird, eine weitere Steigerung bzw. Erhaltung der intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration durch Steigerung der Glucose-Konzentration nicht möglich erscheint (ohne Abbildung). Interessanterweise bewirken schon äußerst geringe Steigerungen der Glucosezugabe einen Einbruch der intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration.

Die Zugabe von Zusätzen wie Adenin und/oder Nicotinsäure führt nicht zu einer wesentlichen Veränderung des Verlaufs der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration während der Zulaufphase. Jedoch kann eine Verschiebung der Kurve derart erfolgen, dass zu Beginn eine Konzentrationssteigerung durch Adenin und ein verzögertes Abklingen gegen Ende der Kultivierung durch Nicotinsäure zu einer wesentlichen Steigerung der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration nach 20 Stunden Kultivierungszeit führen kann.

Die drei untersuchten Strategien können unter bestimmten Voraussetzungen zu einer Anreicherung von NAD<sup>+</sup>/H führen. Es ist anzunehmen, dass die einmalige Glucosezugabe

nach einem kontrolliert Glucose-limitierten Zulaufverfahren zu einer Steigerung der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration führt. Sind alle Voraussetzungen erfüllt, wäre dies eine einfach zu realisierende Methode, die allerdings mit den Nachteilen verbunden ist, dass einerseits die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration schon vor dem vollständigen Veratmen der einmalig zugegebenen Glucose absinken kann. Eine Zellernte nach dem Verstoffwecheln der halben Glucosemenge wäre empfehlenswert. Andererseits liegen die so erzielten NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen weit hinter denen aus der Satzphase. Aus diesen Gründen wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Ein größeres Potential wird einem RQ-gesteuerten Prozess zugeordnet. Obwohl in der Untersuchung keine Erhaltung der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration erzielt werden konnte, sollten Untersuchung mit einem sensitiveren RQ-Regler sowie die Durchführung der Kultivierung mit einer von Beginn an höheren Zulauftrate vorgenommen werden. Bei dieser Strategie wie auch bei der kontinuierlichen Zugabe von Zusätzen ist der Erntezeitpunkt von großer Bedeutung. Generell kann natürlich aus der Betrachtung der Referenzläufe geschlossen werden, dass nach zwölf Stunden Kultivierung Zellen mit einer hohen NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration geerntet werden können. Allerdings sind große Einbußen in der Biotrockenmassekonzentration zu verzeichnen (maximal 10 g L<sup>-1</sup>). Durch die kontinuierliche Zugabe von Adenin und Nicotinsäure kann die Zellernte bei höheren NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen. Allerdings muss auch bei dieser Art der Prozessführung beachtet werden, dass Glucose als globaler Regulator der NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese fungieren kann, den Zusätzen kommt eher eine unterstützende Funktion zu.

Zur intrazellulären Anreicherung von NAD<sup>+</sup>/H wird folgendes Protokoll empfohlen: Nach einer achtstündigen Satzphase wird die Zulauflösung (200 g L<sup>-1</sup> Glucose, 50 g L<sup>-1</sup> Hefeextrakt) mit einer konstanten Rate von 37,3 mL h<sup>-1</sup> zudosiert. Nach weiteren 4 Stunden wird diese durch eine Zulauflösung, die zusätzlich noch 95 mM Adenin und 9,5 mM Nicotinsäure enthält, unter Beibehaltung der Zulauftrate ersetzt. Nach 20 Stunden Kultivierung kann bei einer Biotrockenmassekonzentration von ca. 20 g L<sup>-1</sup> und einer intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration über 1 mM geerntet werden. Im Vergleich zum Standardansatz entspricht das bei 20 % weniger Biotrockenmassekonzentration einer Steigerung der intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration um den Faktor 10.

## 5.4 Zusammenfassung zur Anreicherung von NAD<sup>+</sup>/H in *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6

Bei den Untersuchungen zur Anreicherung von NAD<sup>+</sup>/H in *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 konnte beobachtet werden, dass Nicotinsäure (und deren Derivate Nicotinamid oder Chinolinsäure) scheinbar die Aktivität einer NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase bei Einzelzugabe *in vivo* inhibieren oder deren Expression reduzieren kann. Diese Effekte verlieren an Stärke, wenn Adenin im zehnfachen Überschuß mit Nicotinsäure zugegeben wird. Der Fluss durch die Biosynthese erhöht sich und resultiert in gesteigerten NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen. Da die Metabolite teilweise auch in den Zellen detektiert werden konnten, ist von einer Aufnahme und Einspeisung in die NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese an der entsprechenden Stelle auszugehen.

Im Verlauf einer Kultivierung kann die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration Schwankungen unterliegen. In diesem Zusammenhang kann Glucose die Rolle eines globalen Regulators der NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese in *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 unter den gewählten Bedingungen zukommen. In Ergänzung scheint eine Verbindung zwischen Kohlenstoffquelle und NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration zu existieren. Dabei bleibt noch zu klären, ob der Energieinhalt der Kohlenstoffquellen, d. h. die NADH- und/oder ATP-Ausbeute, die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration entsprechend bestimmt, oder ob der NAD<sup>+</sup>/H-Bedarf in der jeweiligen Stoffwechselsituation die Konzentration vorgibt. Die Änderungen in der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration sind auf eine aktive Biosynthese zurückzuführen. Es ist anzunehmen, dass der Fluss durch die Biosynthese erhöht wird und es zur Akkumulation der Zwischenprodukte kommt, da diese jeweils schneller gebildet werden als sie weiterverarbeitet werden können. Bei fallenden NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen kann ein analoger Zusammenhang ausgemacht werden, wobei regelnde Einflüsse schon bei/vor der Bildung von NaMN zu erwarten sind.

Es wurden drei Strategien zur intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H-Anreicherung erarbeitet und untersucht. Der Erfolg einer zusätzlichen Glucosegabe scheint von der Prozessphase und von der entsprechenden metabolischen Situation abzuhängen. Als günstig hat sich ein späterer Zeitpunkt erwiesen, der durch eine hohe Zellkonzentration, nur mehr geringes Wachstum, eine niedrigere NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration sowie durch die schon einsetzende Verstoffwechslung von Acetat charakterisiert ist. Ein oxidativ-fermentativer Stoffwechsel erwies sich nur als notwendige aber nicht hinreichende Voraussetzung.

Einem RQ-geregelten Prozess ( $RQ > 1,0$ ) wird großes Potenzial zur Erzeugung NAD<sup>+</sup>/H-reicher Biokatalysatoren zu akzeptablen Zelldichten eingeräumt, sofern ein sehr sensitiver RQ-Regler zum Einsatz kommt. Alternativ könnte auch mit einer höheren Zulauftrate gearbeitet werden.

Die Zugabe der Zusätze Adenin und Nicotinsäure führt einzeln und in Kombination nicht zu einer wesentlichen Veränderung des Verlaufs der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration während der Zulaufphase. Jedoch kann eine Verschiebung der Kurve derart erfolgen, dass eine anfängliche Konzentrationssteigerung durch Adenin und ein verzögertes Abklingen gegen Ende der Kultivierung durch Nicotinsäure zu einer wesentlichen Steigerung der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration nach 20 Stunden Kultivierungszeit führen kann. Die erzielten NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen liegen bei 1 mM und damit um den Faktor 10 über den entsprechenden Konzentrationen des Standardansatzes. Glucose als globaler Regulator der NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese kann bestätigt werden, den Zusätzen kommt eher eine unterstützende Funktion zu.

## 6 Untersuchungen zur Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H in *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6

In diesem Kapitel wird die Anreicherung von *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 mit NADP<sup>+</sup>/H untersucht. Bevor in Kapitel 6.3 auf die reaktionstechnische Untersuchung der NADP<sup>+</sup>/H-Anreicherung eingegangen wird, befassen sich die Kapitel 6.1 mit der Darstellung der Ausgangssituation sowie mit der Untersuchung möglicher Regulationsmechanismen der NADH-Kinasen in Kapitel 6.2. Die Beobachtungen werden abschließend in Kapitel 6.4 zusammengefasst. Innerhalb der Unterkapitel werden jeweils die Ergebnisse zuerst dargestellt und im Anschluss diskutiert.

### 6.1 Darstellung der Ausgangssituation

In diesem Kapitel erfolgt die Darstellung der Ausgangssituation hinsichtlich der Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H in ganzen Hefezellen *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6. Dieser Aspekt ist in der Literatur nur selten angerissen. Eine Publikation von Murata *et al.* (1981) behandelt u. a. die Produktion von NADP<sup>+</sup> mit *Saccharomyces cerevisiae* Zellen. In Anlehnung an dieses Protokoll soll untersucht werden, ob und in wie weit eine Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H in *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 möglich ist. Dazu wurden die gegebenen Konzentrationen der Zusätze ATP und NAD<sup>+</sup> variiert.

In Abbildung 6.1 ist der Einfluss variierender (a) NAD<sup>+</sup>- und (b) ATP-Konzentrationen auf die intrazelluläre Konzentration von NADP<sup>+</sup>/H in ruhenden *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 Zellen gezeigt (schwarze Symbole). Die Werte können auf jeweils zwei Referenzen bezogen werden, auf die Konzentration vor der Inkubation (dargestellt durch eine gestrichelte Linie) und auf die Konzentration nach der Inkubation ohne Zusätze (offene Symbole). Mit Abbildung 6.1b kann erkannt werden, dass mit steigender ATP-Konzentration im Reaktionsmedium die intrazellulären Konzentrationen von NADP<sup>+</sup>/H und ATP zunehmen. Die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration nimmt in dem Ansatz mit 20 mM ATP leicht zu im Vergleich zu dem Ansatz mit 15 mM ATP und erreicht keine weitere Konzentrationssteigerung bei 25 mM ATP.

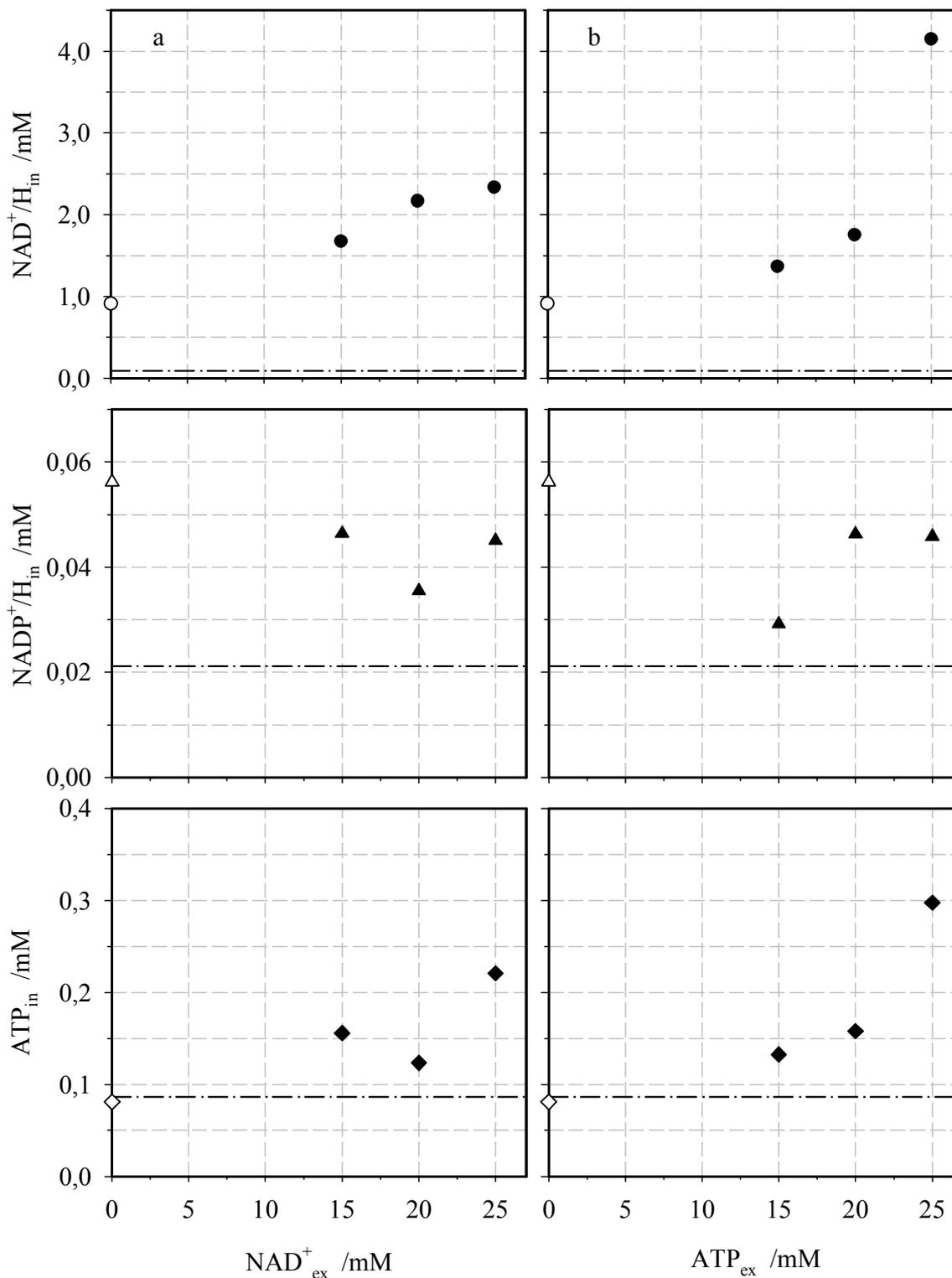


Abbildung 6.1: Einfluss variierender (a) NAD<sup>+</sup>- und (b) ATP-Konzentrationen auf die intrazelluläre Konzentration von NADP<sup>+</sup>/H (Mitte, Dreiecke) in ruhenden *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6. Als Ergänzung sind jeweils die intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H- (oben, Kreise) und ATP-Konzentrationen (unten, Diamanten) gegeben. Die gerührten 2 mL Ansätze wurden 6 Stunden bei 30 °C bei einer Biotrockenmassekonzentration von 20 g L<sup>-1</sup> inkubiert. Die gestrichelte Linie gibt jeweils die Konzentration des betrachteten Referenzansatzes vor der Inkubation wieder.

Bei allen Ansätzen ist zu erkennen, dass sie nach der Inkubation (schwarze Symbole) in höheren Konzentrationen vorliegen als zu Beginn der Inkubation (gestrichelte Linie). Die Vergleichswerte des Ansatzes ohne Zusätze (offene Symbole) liegen mit Ausnahme von ATP nach der Inkubation ebenfalls über den Werten vor der Inkubation. Für ATP und NAD<sup>+</sup> wird deutlich, dass nach der Inkubation in den Ansätzen mit Zusätzen höhere Konzentrationen erzielt werden als in dem Ansatz ohne Zusätze. In dem Ansatz ohne Zusätze (offene Symbole) wird nach der Inkubation eine höhere NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration gemessen als in Ansätzen mit Zusätzen (schwarze Symbole, Abbildung 6.1b).

Der Einfluss verschiedener NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen auf die intrazelluläre Konzentration von NADP<sup>+</sup>/H ist in Abbildung 6.1a wiedergegeben. Mit der vorgelegten NAD<sup>+</sup>-Konzentration nimmt die intrazelluläre NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration zu (schwarze Symbole). Die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration ist in dem Ansatz mit 20 mM NAD<sup>+</sup> niedriger als in den Ansätzen mit 15 und 25 mM NAD<sup>+</sup>. Die intrazellulären ATP-Konzentrationen verhalten sich analog. In diesen drei Ansätzen mit NAD<sup>+</sup>-Zugabe sind die erzielten Konzentrationen aller Metabolite nach der Inkubation (schwarze Symbole) höher als vor der Inkubation (gestrichelte Linie). Im Falle von ATP und NADP<sup>+</sup>/H sind in diesen Ansätzen nach der Inkubation die Konzentrationen höher als in dem Ansatz mit Phosphatpuffer ohne Zusätze. Die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen sind zwar nach der Inkubation höher als vor der Inkubation, die höchste Konzentration erzielt der Ansatz ohne jegliche Zugabe (offene Symbole).

In einer dritten Versuchsreihe wurde die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration variiert (ohne Abbildung). Bei einer Mg<sup>2+</sup>-Konzentration von 10 mM erreichen die intrazellulären Konzentrationen von NADP<sup>+</sup>/H und NAD<sup>+</sup> ihr Maximum im Vergleich zu den Ansätzen mit 7,5 und 12,5 mM Mg<sup>2+</sup>. Die Beobachtungen im Vergleich zu den Referenzansätzen vor der Inkubation bzw. ohne Zusätze entsprechen den oben gemachten. In keinem der Ansätze ist NADP<sup>+</sup>/H in der Reaktionslösung nachzuweisen.

### *Diskussion*

Der Einfluss variierender Konzentrationen der Zusätze ATP und NAD<sup>+</sup> auf die Biosynthese von NADP<sup>+</sup>/H wurde in ruhender Hefe *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 untersucht. Da zu erkennen ist, dass die ATP- und NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen in den Ansätzen mit Substratzugabe nach der Inkubation höher als zuvor und auch höher als die Konzentration in einem Ansatz ohne Zusätze nach der Inkubation sind, ist anzunehmen,

dass diese Metabolite aus der Reaktionslösung in das Zellinnere gelangt sind. Da die intrazellulären ATP- und NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen mit der Konzentration jeweils einer vorgelegten Substanz zunehmen und keine Abhängigkeit von der vorgelegten Mg<sup>2+</sup>-Konzentration zeigen, könnten dafür osmotische Ausgleichsprozesse angeführt werden. Der Ansatz mit 10 mM Mg<sup>2+</sup>, 20 mM ATP und 20 mM NAD<sup>+</sup> wurde dreimal durchgeführt und ergab eine mittlere NAD<sup>+</sup>-Konzentration von  $2,1 \pm 0,4$  mM und eine mittlere NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration von  $0,04 \pm 0,01$  mM. Angesichts möglicher Pipettierungenauigkeiten bei der Konzentrationseinstellung und/oder bei der Probenahme, möglicher Verdunstungseffekte, unkontrollierter Reaktionsbedingungen, unterschiedlicher pH- und Ionenstärken zeugen diese Bestimmungen von zufriedenstellender Reproduzierbarkeit.

Obwohl in allen Ansätzen die NAD<sup>+</sup>/H- (und ATP-)Konzentrationen aufgrund der Zusätze höher sind als vor der Zugabe, ist zu erkennen, dass die Inkubation in Puffer ohne Zusätze auch zu einer Steigerung der intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H- und NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen führen kann. Auffällig ist, dass die Pufferzusätze nur zu einer Steigerung der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration führen, nicht jedoch zu einer Steigerung der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration. Bei genauerer Analyse ist zu beachten, dass die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* drei NADH-Kinasen besitzt, Utr1p, Yef1p und Pos5p (s. Kapitel 3.2.7). Die Beteiligung der mitochondrialen NADH-Kinase Pos5p (Outten und Culotta, 2003; Strand *et al.*, 2003; Huh *et al.*, 2003) ist angesichts der für NAD<sup>+</sup>/H impermeablen inneren Mitochondrienmembran (von Jagow und Klingenberg, 1970) und der unbekanntem Aktivität des NAD<sup>+</sup>-Transporters Ndt1p (Todisco *et al.*, 2006) fraglich und soll daher bei dieser Betrachtung vernachlässigt werden. Da Yef1p nur einen geringen Beitrag zu der *in vivo* Versorgung mit NAD<sup>+</sup> und NADH leisten soll (Bieganowski *et al.*, 2006), konzentrieren sich die Bewertungen folglich auf Utr1p. Angesichts eines K<sub>m</sub> von 0,5 mM für NAD<sup>+</sup> (Kawai *et al.*, 2001) würde die in den Zellen bestimmte mittlere NAD<sup>+</sup>-Konzentration von 1,8 mM eine hohe Umsetzungsgeschwindigkeit implizieren. Da der K<sub>m</sub> für ATP bei 0,6 mM liegt (Kawai *et al.*, 2001) und selbst in dem Ansatz mit höchster ATP-Konzentration diese bei knapp 0,3 mM liegt, könnte eine gesteigerte ATP-Konzentration noch zu einer Erhöhung der Aktivität führen. Obwohl Utr1p auch NADH phosphorylieren kann (Shi *et al.*, 2005), ist angesichts der bisher beobachteten Verteilung der Oxidationsstufen zugunsten von NAD<sup>+</sup> fraglich, ob und wie diese zu verschieben wäre, und ob angesichts der geringeren Aktivität mit NADH als Substrat (Bieganowski *et al.*, 2006) dies zu einer Steigerung der

NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration führen würde. Diese Betrachtungen deuten mehrheitlich darauf hin, dass diese NADH-Kinase angesichts der intrazellulären Substratkonzentrationen schon mit sehr hoher Aktivität arbeitet und somit eine stoffliche Unterversorgung auszuschließen wäre.

Aufgrund der Kompartimentierung wurde die mitochondriale NADH-Kinase Pos5p im Vorfeld von den Betrachtungen ausgenommen. Da das Cytosol als Wirkungsort von Yef1p (Bieganowski *et al.*, 2006) und von Utr1p (Huh *et al.*, 2003) angegeben wird, sollten die Substrate Zugang zu beiden Enzymen haben. Ob und wie eine zusätzliche Lokalisierung von Utr1p im Zellkern (Huh *et al.*, 2003) diese Beobachtungen beeinflussen kann, ist anhand dieser Daten nicht zu bestimmen. Somit können die Kompartimentierung und die Substratversorgung als Ursachen für die eingeschränkte NADP<sup>+</sup>/H-Biosynthese in den Ansätzen mit Zusätzen ausgeschlossen werden, die die Biosyntheseleistung in dem Ansatz ohne Zusätze nach der Inkubation nicht übertraf.

Insgesamt bleiben die Ergebnisse auch hinter den Beobachtungen von Murata *et al.* (1981) zurück. Innerhalb einer achtstündigen Inkubation erzielen sie eine NADP<sup>+</sup>-Konzentration von ca. 0,4 mM. Allerdings wurde diese Konzentration in der Reaktionslösung bestimmt. Da die eingesetzten Zellen in einem Polyacrylamidgel immobilisiert waren und eine ähnliche Produktivität wie die zur Verbesserung des Stofftransports mit Toluol behandelten immobilisierten Zellen zeigten (Murata *et al.*, 1981), ist von einer Schädigung der Zellwand bzw. -membran durch die Immobilisierung auszugehen. Ein erleichterter Stofftransport über die Zellwand/-membran könnte einerseits zu einer Steigerung der Phosphorylierungsaktivität führen und andererseits auch dafür sorgen, dass im Fall von Utr1p inhibierende Substanzen wie NADPH (Kawai *et al.*, 2001) aus der Zelle in das Reaktionsmedium abgeführt werden. Die Absenkung der intrazellulären Konzentration könnte eine Reduzierung oder Aufhebung einer möglichen Inhibierung bewirken. Da in den durchgeführten Ansätzen kein NADP<sup>+</sup>/H in der Reaktionslösung nachzuweisen ist, ist von integralen Zellen auszugehen. Beim Einsatz ganzer Zellen scheint die Phosphorylierung von NAD<sup>+</sup> durch den Stofftransport über die Zellwand/-membran, durch die Kompartimentierung der Biosynthese innerhalb der Zelle und durch Regulationsmechanismen deutlich eingeschränkt zu sein. Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, dass in anderen Ansätzen, in denen wohl aufgrund zu hoher Rührgeschwindigkeiten ein (teilweiser) Zellaufschluß erzeugt wurde, eine Akkumulation von NADP<sup>+</sup> im Reaktionsmedium nachzuweisen ist. Aufgrund der enzymatischen

Gegebenheiten ist die Biosynthese von NADP<sup>+</sup>/H in/mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 prinzipiell möglich, jedoch müssen die oben genannten Hindernisse überwunden werden.

Unter der Annahme, dass die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration in den Zellen zu Beginn bei ca. 0,1 mM lag, kann man bestimmen, dass zu einer Konzentrationssteigerung auf 2,1 mM genau 3 Promille der vorgelegten NAD<sup>+</sup>-Moleküle aus der Reaktionslösung in die Zellen gelangen müssen. Eine unversehrte Plasmamembran könnte als Ursache angegeben werden. Diese Daten bestärken die in Kapitel 4.2 beobachtete Impermeabilität der Plasmamembran für NAD<sup>+</sup> (und NADP<sup>+</sup>). Angesichts dieses Wirkungsgrades scheint unter diesen Reaktionsbedingungen eine Vorlage in dieser Form als unökonomisch. Daher wurden in einem modifizierten Protokoll wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben, NAD<sup>+</sup>/H-angereicherte Hefe *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 eingesetzt. Die erzielten NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen liegen mit Werten zwischen 1,5 und 2,4 mM mindestens um den Faktor drei über den Konzentrationen der Referenzansätze. In diesen Ansätzen wurde ebenfalls keine Akkumulation von NADP<sup>+</sup>/H in den Zellen beobachtet (ohne Abbildung). Somit bleibt festzuhalten, dass eine sequentielle Produktion von NADP<sup>+</sup>/H aus NAD<sup>+</sup>/H, das zuvor aus Metaboliten wie Adenin und Nicotinsäure oder Chinolinsäure hergestellt wurde, unter diesen Bedingungen unmöglich erscheint. Jenseits der Impermeabilität der Zellmembran kann mit diesen Daten eine Stofftransportlimitierung über die Zellwand/-membran ausgeschlossen werden. Als bestimmende Größen für die Phosphorylierung von NAD<sup>+</sup>/H scheinen sich die Kompartimentierung und Regulationsmechanismen herauszukristallisieren.

Bei Murata *et al.* (1981) ist aufgeführt, dass die NADP<sup>+</sup>-Produktivität der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ca. um ein Drittel geringer ist als die des Bakteriums *Brevibacterium ammoniagenes*. Diese Ergebnisse können zusätzlich den Hinweis geben, dass die höhere Organisation der eukaryotischen Hefe im Vergleich zu dem prokaryotischen Bakterium die NADP<sup>+</sup>/H-Syntheseleistung negativ beeinflussen kann, wobei wiederum die Kompartimentierung der Biosynthese sowie Regulationsmechanismen als Ursachen in diesem Zusammenhang genannt werden können.

Ähnliche Untersuchungen haben auch gezeigt, dass die NADP<sup>+</sup>/H-Biosyntheseleistung von der Inkubationsdauer, der Pufferkonzentration und von dem metabolischen Zustand der Zellen (d. h. Erntezeitpunkt) unabhängig erscheint.

## 6.2 Mögliche Regulationsmechanismen

Im Gegensatz zu den im vorangegangenen Kapitel dargestellten Untersuchungen mit ruhenden Zellen sollen in diesem Kapitel die Ergebnisse der Untersuchungen mit wachsenden Kulturen betrachtet und diskutiert werden.

Sämtliche in Kapitel 5.2 zusammengefassten Untersuchungen wurden auch auf die Akkumulation von NADP<sup>+</sup>/H untersucht. Weder die Art der Zusätze, die Kombination oder Konzentration der Zusätze noch der Zugabe- oder Erntezeitpunkt scheinen einen signifikanten Einfluss auf die intrazelluläre NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration zu haben.

Der Einfluss verschiedener Chinolinsäurekonzentrationen im Wachstumsmedium wurde untersucht. Da weder auffällige Änderungen im Zellwachstum noch in der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration nachzuweisen sind, kann die in dem Bakterium *Bacillus subtilis* beschriebene Regulation der NAD<sup>+</sup>-Kinase durch Chinolinsäure (Garavaglia *et al.*, 2003) unter diesen Umständen nicht beobachtet werden. Hinsichtlich des unveränderten Zellwachstums macht Chinolinsäure unter diesen Bedingungen nicht den Eindruck eines Zellgifts. Es konnten keine Einblicke in Regulationsmechanismen gewonnen werden, eine NADP<sup>+</sup>/H-Akkumulation blieb aus.

Der Einfluss von Ca<sup>2+</sup> auf die Biosynthese von NADP<sup>+</sup>/H wurde untersucht. Eine Akkumulation aufgrund der Ca<sup>2+</sup>-Ionen kann jedoch nicht ausgemacht werden. Ca<sup>2+</sup> kann mit dem Protein Calmodulin interagieren und so zu einer Steigerung der Aktivität der NAD<sup>+</sup>-Kinase führen (Epel *et al.*, 1981). Nach den vorliegenden Daten scheint dieser Mechanismus in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nicht ausgeprägt zu sein. Diese Daten belegen experimentell, dass in Studien zur Wirkung von Calmodulin in *Saccharomyces cerevisiae* keine NADH-Kinase als Zielprotein ermittelt wurde (Zelter *et al.*, 2004).

Ein erhöhter NADP<sup>+</sup>/H-Bedarf zur Reduktion von HNO<sub>3</sub> (Bruinenberg *et al.*, 1983), eine knapp 40 %-ige Aktivitätssteigerung einer mitochondrialen NADH-Kinase durch Inkubation der Zellen mit 4 g L<sup>-1</sup> Chloramphenicol (Iwahashi und Nakamura, 1989), eine 3,4-fache Steigerung der *POS5*-Transkripte durch Inkubation mit 2,5 mM CuSO<sub>4</sub> (Strand *et al.*, 2003) sowie die Erzeugung von oxidativem Stress durch Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Outten

und Coulotta, 2003) wurden in wachsenden und ruhenden Kulturen untersucht. Eine Steigerung der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration konnte nicht festgestellt werden. Da diese Beschreibung die Konzentrationen in den einzelnen Kompartimenten außer Acht lässt, kann nicht bestimmt werden, ob es zu Konzentrationssteigerungen beispielsweise in den Mitochondrien gekommen ist. Sofern das der Fall ist, wäre der Beitrag der mitochondrialen NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration an der Gesamtkonzentration so gering, dass er mit der eingesetzten Analytik nicht erfasst werden kann, von einem thermischen Aufschluss der Mitochondrien wird ausgegangen. Hinsichtlich des Einsatzes als Biokatalysator ist fraglich, ob eine möglicherweise höhere NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration in den Mitochondrien einem als cytosolisch angenommen Produktionsenzym dienlich sein kann. Ein möglicher Effekt von Nitrat als einzige Stickstoffquelle könnte möglicherweise in einem definierten Medium eher zum Tragen kommen. Da die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 in Mineralmedium nicht möglich erscheint (Engelking, 2004), konnten diese selektiven Untersuchungen nicht durchgeführt werden.

Zusätzlich wurde versucht, die Mikroorganismen auf Kohlenstoffquellen anzuziehen, die von NADP<sup>+</sup>-abhängigen Enzymen verstoffwechselt werden. Ein Anwachsen auf Xylose, Arabinose oder Sorbitol blieb aus. Möglicherweise könnte ein Effekt bei der einmaligen Zugabe dieser Substrate zu gewachsenen Kulturen, nachdem die Glucose verstoffwechselt wurde, auftreten. Als Substrate kämen möglicherweise Glutamat oder Isocitrat in Frage.

Diese Daten lassen vermuten, dass eine konstante NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration für die Zellphysiologie essentiell bzw. zu hohe Konzentration möglicherweise schädlich sein können. Hinsichtlich der Erzeugung NADP<sup>+</sup>/H-angereicherter Biokatalysatoren sind reaktionstechnische Untersuchungen zur Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H unumgänglich (siehe folgendes Kapitel).

### 6.3 Reaktionstechnische Untersuchung der Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H

Aufgrund der Erfahrungen in den beiden vorangegangenen Kapiteln soll in einem reaktionstechnischen Ansatz die Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H in *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 während Kultivierungen im 3 L Labormaßstab untersucht werden. In Kapitel 6.3.1 wird zunächst ein Referenzprozess beschrieben, bevor in den Kapiteln 6.3.2 und 6.3.3 zwei Strategien zur Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H durch Salzzugabe bzw. durch Medienzusätze untersucht werden. Aus Kapitel 6.1 kann vermutet werden, dass die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration kein limitierender Faktor der Phosphorylierung ist. Daher soll untersucht werden, ob durch Steigerung der Phosphat- oder Adeninverfügbarkeit indirekt über ATP die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration gesteigert werden kann. In Kapitel 6.3.4 werden die Beobachtungen abschließend vergleichend diskutiert und ein Herstellungsverfahren wird vorgeschlagen. Kapitel 6.4 bietet eine Zusammenfassung.

#### 6.3.1 Referenzprozess

Um mögliche Ansatzpunkte einer Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H in *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 zu erarbeiten, wird zunächst der Verlauf der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration während einer Kultivierung betrachtet.

In Abbildung 6.2b ist der Verlauf der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration während einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 im 3 L Labormaßstab gezeigt. Nach 7,5 Stunden Satzbetrieb wurde der Zulauf gestartet. Zu Beginn der Kultivierung wurden knapp 11 g L<sup>-1</sup> Glucose vorgelegt, welche nach fünf Stunden nicht mehr nachzuweisen sind. Im weiteren Verlauf der Kultivierung ist keine Glucose mehr zu detektieren. Die Biotrockenmassekonzentration (Abbildung 6.2a) vervierfacht sich in den ersten fünf Stunden von anfänglichen 1,5 g L<sup>-1</sup> auf 3,3 g L<sup>-1</sup>. Bis zum Einschalten des Zulaufs bei 7,5 Stunden Prozesszeit steigt die Biotrockenmassekonzentration nur moderat an. In den folgenden 13,5 Stunden Zulaufbetrieb kommt es fast zu einer Verzehnfachung der Biomasse, nach 20 Stunden Kultivierung wird ein Endwert von ca. 25 g L<sup>-1</sup> erreicht. Während der Satzphase ist eine maximale NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration (Abbildung 6.2b) von 0,08 mM nach drei Stunden zu erkennen. Diese fällt mit der vollständigen Veratmung der

Glucose nach 5 Stunden bis auf 0,01 mM. Im weiteren Verlauf ist ein Anstieg bis auf eine Endkonzentration von ca. 0,06 mM nach 20 Stunden auszumachen. In Abbildung 6.2c ist zusätzlich der Verlauf der Nebenproduktkonzentrationen gegeben, welcher in Kapitel 5.3.3 ausführlich behandelt wurde.

### *Diskussion*

Die in diesem Zusammenhang gezeigten Daten sind einem Lauf entnommen, der in Kapitel 5.3.1 als Referenzversuch angeführt wurde. Die Eignung als Referenzprozess wurde in Kapitel 5.3.1 erörtert und soll an dieser Stelle nicht mehr angeführt werden. Die Betrachtung der NADP<sup>+</sup>/H-Kurve soll in den Vordergrund gestellt werden. Da während der 7,5-stündigen Satzphase nur drei Proben genommen wurden, ist deren Aussagekraft zur Beurteilung des Verlaufs eingeschränkt. Bis zum Entfernen der Glucose aus dem Medium ist deutlich ein Anstieg der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration auszumachen, danach ein ebenso deutlicher Rückgang. Zur Verifizierung dieser Aussage können Läufe herangezogen werden, bei denen die Satzphase durch mehr Probenahmen abgedeckt war (ohne Abbildung). Die Verläufe der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration während der Satzphase zeigen, dass während der Verstoffwechslung der Glucose mit abnehmender Glucose-Konzentration im Medium die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration zunimmt. Aus der Glucose werden in erster Linie Biomasse, CO<sub>2</sub>, Ethanol und Acetat gebildet. Da die Bildung von Acetat und Ethanol nicht mit NADP<sup>+</sup>/H als Coenzym in Verbindung steht, scheint das Zellwachstum für den Anstieg der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration verantwortlich zu sein. Zusammen mit diesen Daten zeigt die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration während der Satzphase einen Anstieg, der scheinbar auf das Zellwachstum zurückzuführen ist. Es kann auch erkannt werden, dass die Kurven ein Maximum durchlaufen, das in dem Bereich der vollständigen Entfernung der vorgelegten Glucose aus dem Medium liegt. Im weiteren Verlauf bis zum Eintritt in die Zulaufphase deutet der NADP<sup>+</sup>/H-Verlauf auf einen leichten Rückgang hin. Aus anderen Versuchen ist zu erkennen, dass ein Anstieg sowie auch eine Stagnation auftreten können (ohne Abbildung).

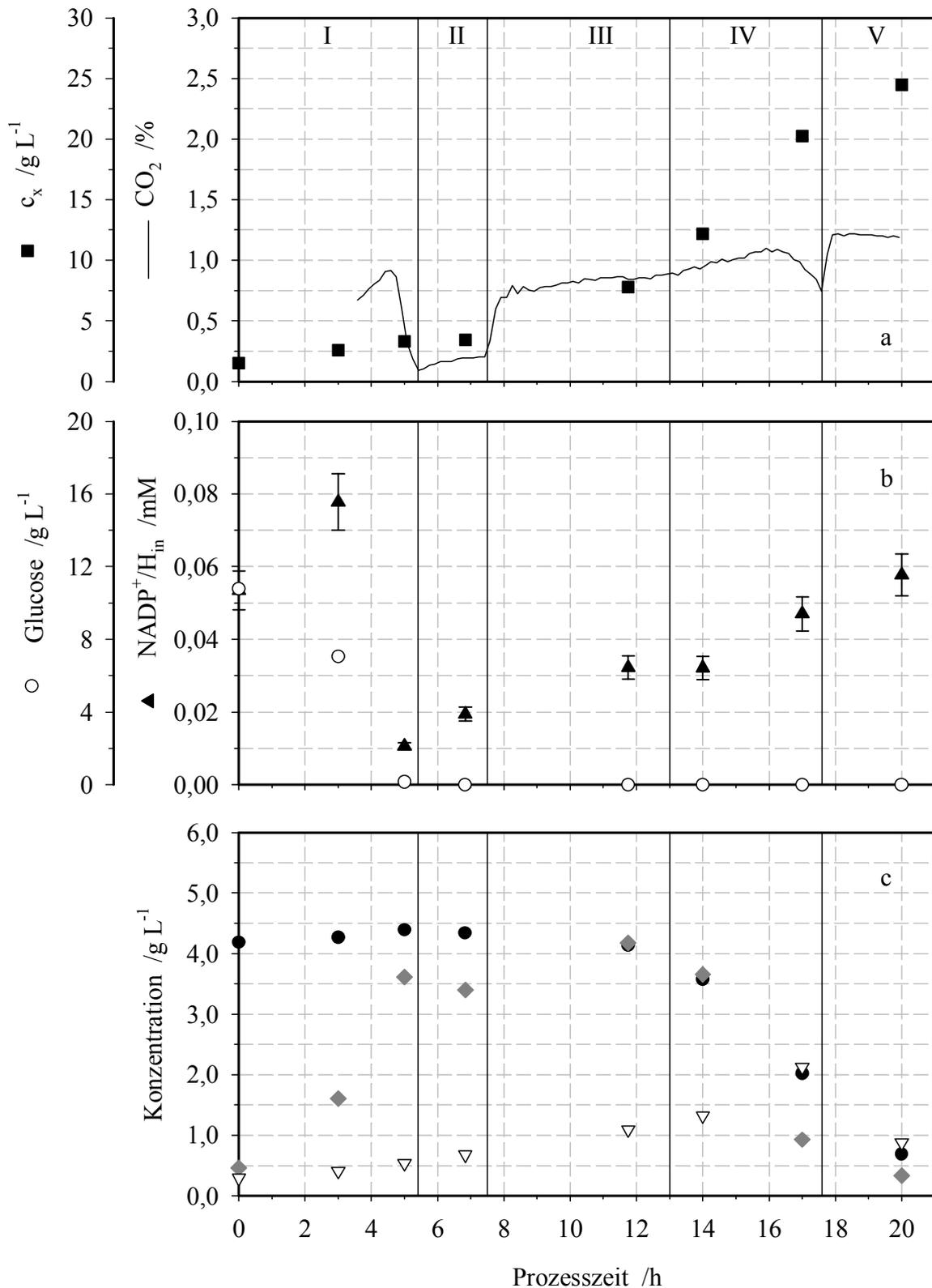


Abbildung 6.2: Verlauf der (a) Biotrockenmassekonzentration (Quadrate), (b) der intrazellulären  $\text{NADP}^+/\text{H}$ -Konzentration (Dreiecke) und (c) der Nebenproduktkonzentrationen während einer Kultivierung im 3 L Labormaßstab. Zulaufstart nach 7,5 Stunden,  $\text{pH}$  5,9. Glucose: Offene Kreise. Ethanol: Graue Diamanten. Glycerin: Schwarze Kreise. Acetat: Offene Dreiecke. I, II, III, IV, V: Prozessphasen.

Einblicke in die Entwicklung der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration nach dem Verbrauch der vorgelegten Glucose können aus einem Satzversuch gewonnen werden, der hier zur Verdeutlichung herangezogen werden soll. In Abbildung 6.3b ist der Verlauf der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration während eines Satzversuchs dargestellt. Es ist zu erkennen, dass nach dem Verstoffwecheln der Glucose die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration sinkt und im weiteren Verlauf wieder ansteigt, sobald nach einer Stagnation das Zellwachstum nach 20 Stunden wieder einsetzt (Abbildung 6.3a). Da ab diesem Zeitpunkt die Ethanolkonzentration im Medium, wie in Abbildung 6.3c gezeigt, abnimmt, wird Ethanol verstoffwechselt. Damit wird einerseits deutlich, dass auch in dieser Phase ein Anstieg der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration mit dem Zellwachstum in Verbindung gebracht werden kann. Andererseits wird auch deutlich, dass in dem Referenzprozess in Abbildung 6.2 aus den größeren Abtastzeiten eine Variation des Verlaufs in dieser Prozessphase resultieren kann.

Es bleibt festzuhalten, dass in dieser Phase II ein Absinken der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration aufgrund des reduzierten Wachstums nach dem Verbrauch der Glucose sowie ein folgender Anstieg möglich ist, sobald das Zellwachstum wieder einsetzt. In dieser Zwischenphase ist anzunehmen, dass sich die Hefe von Glucose auf ein anderes Substrat als Energiequelle umstellt. Mit den in Kapitel 5.3.3 gegebenen Erläuterungen ist die Umstellung auf die Verstoffwechslung des zuvor gebildeten Ethanols am wahrscheinlichsten. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis sein, dass die Biosynthese von NADP<sup>+</sup>/H im Gegensatz zu der Biosynthese von NAD<sup>+</sup>/H nicht (ausschließlich) durch Glucose induziert werden kann, sondern unabhängig von der Energiequelle an das Zellwachstum gekoppelt ist. Dies würde dafür sprechen, dass NADP<sup>+</sup>/H nicht explizit an dem Abbau einer (bestimmten) Energiequelle beteiligt ist, sondern eher an der Verarbeitung deren Monomere. Das hauptsächliche Vorkommen von NADP<sup>+</sup>/H in anabolen Stoffwechselwegen würde dies belegen (Alberts *et al.*, 1999). Möglicherweise sollten diese Schlüsse auf das aerobe Wachstum eingeschränkt werden. Somit ist für einen Anstieg der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration auch in dieser Phase II das einsetzende Zellwachstum anzuführen, unabhängig von der momentanen Energiequelle.

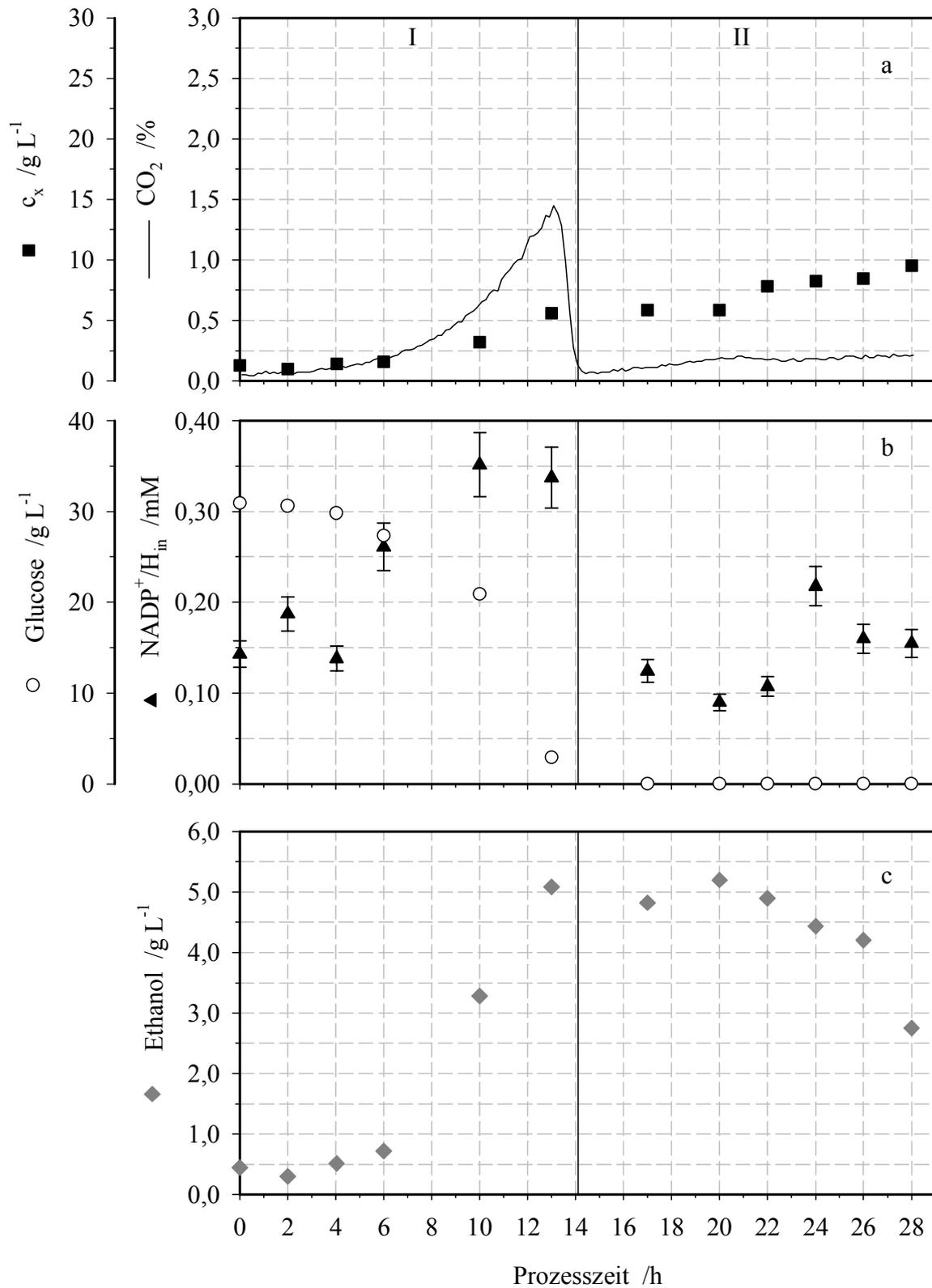


Abbildung 6.3: Verlauf der (a) Biotrockenmasskonzentration (Quadrate), (b) der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration (Dreiecke) und (c) der Ethanolkonzentration (graue Diamanten) während einer Satzkultivierung im 3 L Labormaßstab. Glucose: Offene Kreise. I, II: Prozessphasen.

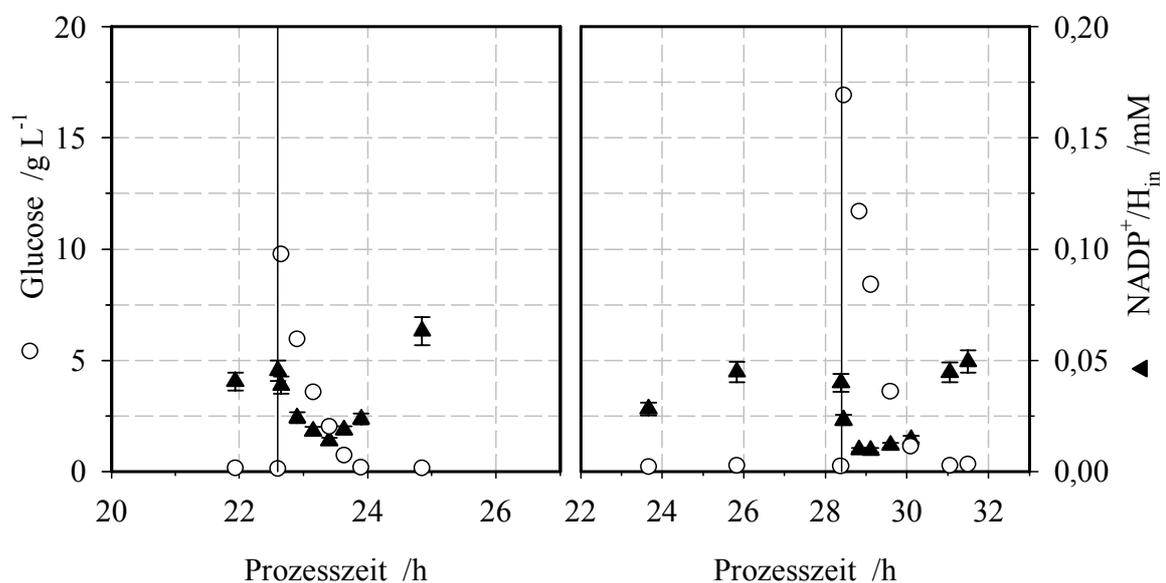
Während der gesamten Zulaufphase ist in Abbildung 6.2 zu erkennen, dass die Biotrockenmassekonzentration zunimmt. Ebenfalls ist eine Zunahme der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration zu verzeichnen. Wiederum kann zwischen dem Zellwachstum und der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration eine Verbindung gesehen werden. Insgesamt kann festgestellt werden, dass gegen Ende der Zulaufphase Werte in einem Bereich von 0,04 bis 0,07 mM erreicht werden.

Abbildung 6.2c zeigt den Verlauf der Konzentrationen der Nebenprodukte und der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration während der Referenzkultivierung und kann zur Erläuterung der oben genannten Zusammenhänge insbesondere während der Zulaufphase herangezogen werden. Wie schon in Kapitel 5.3.3 erläutert, kann die Zulaufphase in drei Phasen (III, IV und V) unterteilt werden. Die in den einzelnen Phasen auftretenden Stoffwechselsituationen scheinen einen deutlichen Einfluss auf die intrazelluläre NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration zu haben. Wie aus der Abbildung 6.2b zu erkennen ist, steigt die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration laufend an. Unter der Berücksichtigung der o. g. Schwankungen kann der Messwert bei 14 Stunden eher als Ausreißer gesehen werden. In Phase III ist noch so viel Glucose vorhanden, um die Katabolit-Repression aufrecht zu erhalten. Aus der Acetat- und Ethanol-Bildung kann auf Überschussmetabolismus geschlossen werden. In Phase IV ist die Katabolit-Repression nur noch für Acetat erhalten, das aus Glucose, Glycerin und Ethanol gebildet wird. In Phase V ist die Katabolit-Repression vollständig aufgehoben, Glucose, Glycerin, Ethanol und Acetat werden zu CO<sub>2</sub> und Biomasse umgesetzt. An allen vier Phasengrenzen tritt ein Substratwechsel und damit auch eine Umstellung des Stoffwechsels auf. Jedoch scheint die intrazelluläre NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration von diesen Änderungen nicht berührt zu sein. Ob das Wachstum auf Glucose, auf Ethanol oder auf mehreren Substraten gleichzeitig erfolgt, scheint ohne Auswirkung zu bleiben – solange Wachstum erfolgt. Im Verlauf mehrerer Versuche erscheint eher der Eindruck, die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration wäre auf 0,06 mM eingestellt. Ein Anstieg auf diesen Wert bzw. Schwankungen um diesen Wert konnten beobachtet werden, eine Überschreitung nicht. Diese Ergebnisse deuten eher darauf hin, dass die NADP<sup>+</sup>/H-Biosynthese von der einzelnen Stoffwechselsituation unabhängig sei (vielleicht ausgenommen der Sauerstoffverfügbarkeit). Dies ist ein deutlicher Unterschied zu der NAD<sup>+</sup>/H-Biosynthese. Letztere scheint beim Wachstum deutlich durch die einzelne Stoffwechselsituation bestimmt zu sein (und damit bestimmbar zu sein). Allerdings kann kein Grenzwert ausgemacht werden. Obwohl Hst1p die Expression der *de novo* Biosynthesegene bei

ausreichender NAD<sup>+</sup>-Versorgung unterbinden soll (Bedalov *et al.*, 2003), kann in wachsenden Kulturen sowie auch in ruhenden Zellen (Kapitel 5.1 und 6.2) keine Obergrenze ausgemacht werden. Im Gegensatz dazu erscheint die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration begrenzt zu werden. Aus der Literatur ist bisher nicht eindeutig zu ersehen, welche Abbaureaktionen es in *Saccharomyces cerevisiae* für NADP<sup>+</sup>/H gibt. Es kämen u. a. eine Phosphatase (Bernofsky und Utter, 1968), eine Nucleosidase (Pyrophosphorylase) oder Glycohydrolase in Frage, denen (noch) keine Gen zugeordnet werden konnte ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). Auf dieser Stufe ist keine Aussage zu treffen, ob die eingestellte und scheinbar limitierte NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration durch einen stark regulierten Aufbau, durch einen stark regulierten Abbau oder durch eine Kombination aus reguliertem Auf- und Abbau zustande kommt. Dieses unbeirrbar Verhalten legt eine komplexe, effektive und effiziente Regulation nahe. Zusätzlich ist fraglich, ob in den Mitochondrien und im Cytosol die selben Mechanismen zum Tragen kommen würden. Da die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration von der Art und Konzentration einer Energiequelle (unter aeroben Bedingungen) unabhängig erscheint und makroskopisch nur dadurch bestimmt wird, ob diese ein Zellwachstum ermöglicht, sind mögliche Effekte bei anabolischen Prozessen zu suchen. Eine steigende Konzentration könnte mit einem steigenden Fluss durch die anabolen Stoffwechselwege zusammenhängen. Dies erscheint in den ersten fünf Stunden der Kultivierung plausibel, kann aber gegen Ende der Zulaufphase an Grenzen stoßen, da eher anzunehmen ist, dass in dieser Phase V aufgrund der zunehmenden Glucose- und/oder Nährstofflimitierung eher Speicherstoffe aufgebraucht als angelegt werden. Die beobachtete Sättigung der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration könnte entweder ausreichen, um die anabolen Prozesse bei maximaler Aktivität zu halten oder zu einer Limitierung führen. Da diese Überlegungen nicht zu einem schlüssigen Ziel führen, scheint eine Regulation der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration seitens des Aufbaus als physiologisch unpraktisch. Die Einstellung einer bestimmten Konzentration über den Abbau könnte da vielleicht zu weniger Beeinträchtigungen des Stoffwechsels führen. Allerdings sind zu diesen Prozessen keine Enzyme und Reaktionen bekannt, um über die Beobachtung der entsprechenden Metabolitkonzentrationen diese Möglichkeit näher zu charakterisieren.

6.3.2 Einmalige Zugabe von Glucose und KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Während der in Kapitel 5.3.2 dargestellten Experimente wurde auch der Einfluss der einmaligen Glucosezugabe nach der Zulaufphase auf die Biosynthese von NADP<sup>+</sup>/H untersucht. Die Beobachtungen werden im Folgenden beschrieben und diskutiert. In Abbildung 6.4 ist für zwei unabhängige Experimente der Verlauf der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration während einer einmaligen Glucosezugabe nach der Zulaufphase gezeigt.



**Abbildung 6.4:** Einfluss einer einmaligen Glucosezugabe (offene Kreise) nach der Zulaufphase auf die intrazelluläre NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration (Dreiecke). Der Zugabezeitpunkt ist durch einen senkrechten Strich dargestellt.

In Abbildung 6.4 ist der Einfluss einer einmaligen Glucosezugabe nach der Zulaufphase auf die intrazelluläre NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration während zwei Kultivierungen dargestellt. In beiden Fällen bewegen sich die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen vor der Glucosezugabe (nach dem Ausschalten des Zulaufs) im Bereich zwischen 0,03 und 0,05 mM. Mit der Zugabe der Glucose bei 22,5 bzw. 28,5 Stunden Kultivierungszeit, jeweils durch einen senkrechten Strich dargestellt, steigt diese sprunghaft auf 10 bzw. 17 g L<sup>-1</sup> an. Bei dem links dargestellten Lauf nimmt diese dann stetig ab und ist nach ca. einer Stunde nicht mehr zu messen. In dem rechts abgebildeten Verlauf ist über zwei Stunden eine konstante Abnahme der Glucosekonzentration im Medium zu erkennen, in der dritten Stunde verlangsamt sich

die Abnahme zusehends. Ab dem Zugabezeitpunkt der Glucose ist in beiden Fällen zu erkennen, dass die zellinternen NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen rapide einbrechen. Sie fallen auf Werte um 0,01 mM und verbleiben auf diesem Niveau bis annähernd keine Glucose mehr im Medium nachzuweisen ist. Ist diese überhaupt nicht mehr nachzuweisen, erreichen die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen ihre Ausgangswerte vor der Glucosezugabe.

### *Diskussion*

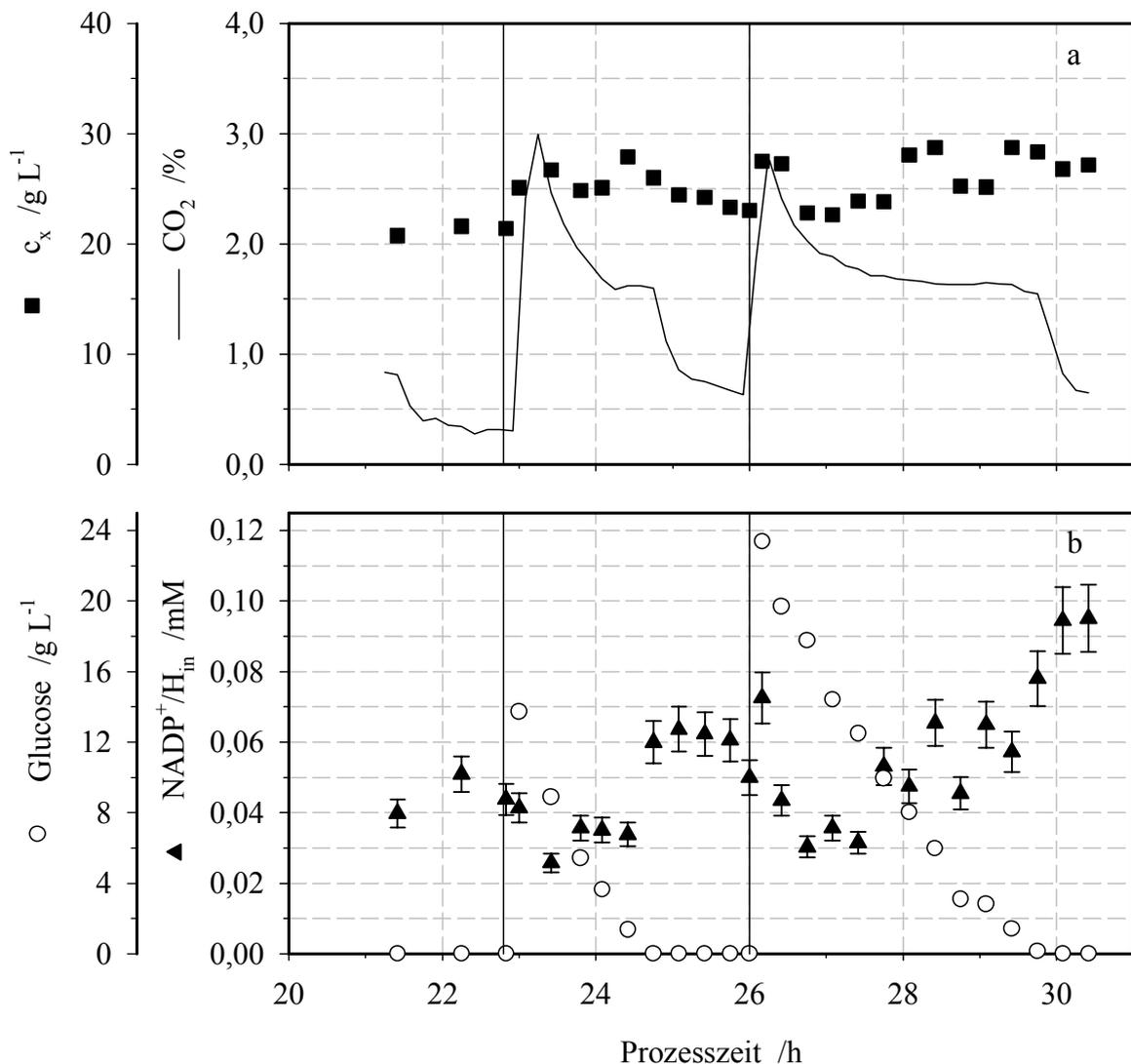
In dem vorigen Kapitel wurde gezeigt, dass ein Anstieg der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration mit dem Zellwachstum in Verbindung stehen kann. Die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration scheint unabhängig von der Energiequelle bei deren Vorhandensein bis auf einen Wert von ca. 0,06 mM anzusteigen. Anhand der oben gezeigten Beispiele wird deutlich, dass der Verlauf der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen nach Abschalten des Zulaufs sich dadurch nicht ändert. Diese Beobachtungen stehen etwas im Widerspruch zu den Aussagen in Kapitel 6.3.1. Nachdem die eine Energiequelle verstoffwechselt ist, kommt es zu einem Rückgang der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration, weil dadurch auch das Zellwachstum eingeschränkt ist. Da es hier nicht zu einem Einbruch kommt, wäre die Umstellung auf eine andere Energiequelle notwendig. So müsste einerseits im Medium noch eine Energiequelle vorhanden sein, die von den Hefen verstoffwechselt werden kann. Dann wäre der Zulauf allerdings nicht (Glucose-/C-Quellen-)limitiert gewesen, wogegen jedoch in anderen Versuchen die deutlich sinkenden Nebenproduktkonzentrationen sprechen. Und andererseits müsste die Senke in der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration genau im Probenahmeintervall liegen.

Da mit Zugabe der Glucose die intrazelluläre NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration offensichtlich fällt, scheint das Verstoffwechseln einer Energiequelle unter der Annahme des sich anschließenden Anabolismus keine hinreichende Voraussetzung zu sein. Diese Beobachtung steht bisher deutlich im Gegensatz zu den Beobachtungen und Schlüssen der Phasen I und III, in denen der Glucoseüberschuss zu einer Steigerung der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration führt. Es ist also anzunehmen, dass die vermeintlich gleichen äußeren Bedingungen zu unterschiedlichen Konsequenzen in der Zelle führen können. Mögliche Unterschiede können in der Art der Verstoffwechslung/Nebenproduktbildung sowie in dem Auftreten von (weiterem) Zellwachstum liegen.

Ebenso auffällig ist, dass sich die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration erholt, sobald nur noch geringe Mengen an Glucose im Medium zu detektieren sind. Besonderes Augenmerk soll auf diese

Erholungsphase gerichtet werden, da mit der Klärung der Ursachen Ansatzpunkte zur intrazellulären Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H erarbeitet werden könnten. Dieser qualitativ inverse Verlauf der Glucosekonzentration und der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration gibt Anlass zu der Vermutung, dass im Falle der Glucose als Ursache diese unabhängig von der Konzentration ist und einzig mit dem Vorhandensein in Zusammenhang steht. In diesem Fall wäre die Glucose wie ein Schalter für den Einbruch und die Erholung der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration verantwortlich. Da der Zusammenhang zwischen Glucose und Einbruch der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration nicht eindeutig ist, könnte u. a. auch die Verstoffwechslung der zuvor gebildeten Nebenprodukte eine Rolle spielen. Allerdings müsste in diesem Fall die Umstellung sehr schnell erfolgen. In anderen Experimenten wurde den Kulturen nach dem Abstellen des Zulaufs (und einer Wartezeit) anstelle von Glucose Glycerin, Ethanol oder Acetat zugegeben. Obwohl eine Abnahme der Substratkonzentration zu erkennen war, blieb die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration unverändert (ohne Abbildung). Somit scheint der Anstieg der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration nach dem Veratmen der Glucose nicht auf eine Verstoffwechslung von Glycerin, Ethanol oder Acetat zurückzuführen sein. Diese Beobachtungen stehen wiederum im Widerspruch zu den in Kapitel 6.3.1 gezogenen Schlüssen und Beobachtungen in Phase II, IV und V, als auch beim Wachstum auf diesen Nebenprodukten ein Anstieg der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration zu beobachten ist. Sämtliche in Kapitel 6.3.1 gemachten Aussagen hinsichtlich Energiequelle und NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration scheinen unter diesen Bedingungen nicht zuzutreffen. Da in den in Abbildung 6.4 dargestellten Läufen die Glucosezugabe kein merkliches Zellwachstum ermöglichte, könnte eventuell hierin eine Erklärung für die offensichtlichen Widersprüche liegen. Weder die Zugabe von Glucose noch von Glycerin, Acetat oder Ethanol scheint einen positiven Einfluss auf die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration zu haben und kann zur Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H in Biokatalysatoren nicht zur Anwendung kommen.

Was bei den gezeigten Experimenten bisher außer Acht gelassen wurde, ist die limitierte Beobachtungszeit der Entwicklung der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration nach dem Verbrauch der Glucose. In Abbildung 6.5 ist der Verlauf der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration nach einem Glucosepuls bei längerer Beobachtung dargestellt.



**Abbildung 6.5:** Entwicklung der (a) Biotrockenmassekonzentration (Quadrate) und der (b) NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration (Dreiecke) nach der Verstoffwechslung einer einmalig zugegebenen Glucosemenge (offene Kreise). Der zweiten Zugabe nach 26 Stunden wurde zusätzlich KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> zu einer Endkonzentration von ca. 100 mM zugegeben. Die Zugabezeitpunkte sind jeweils durch senkrechte Striche dargestellt.

In Abbildung 6.5b ist die Entwicklung der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration nach der Verstoffwechslung einer einmalig zugegebenen Glucosemenge dargestellt. Der Beobachtungszeitraum nach dem Verbrauch der ersten Glucosezugabe ist auf eineinviertel Stunden ausgedehnt. Wiederum wird deutlich, dass mit der Glucosezugabe die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration massiv fällt und auf diesen niedrigen Werten verbleibt, bis die Glucose fast vollständig verstoffwechselt ist. Nach dem Verbrauch der Glucose verbleibt die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration während einer Stunde auf leicht gestiegenen Werten von ca. 0,06 mM im

Vergleich zu 0,04 mM vor der Glucosezugabe. Mit der zweiten Glucosezugabe wird zusätzlich noch KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> zu einer Endkonzentration von ca. 100 mM in den Reaktor eingebracht. Als direkte Folge sinkt der *pH* von 5,9 auf 5,5 (ohne Abbildung) und wird auf diesem Wert bis zum Ende der Kultivierung gehalten. Direkt im Anschluß an die Glucosezugabe ist auch hier ein Absinken der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration zu beobachten, welche jedoch schon ab einer höheren Restglucosekonzentration im Reaktor zu steigen beginnt. Als die Glucose vollständig veratmet ist, erzielt die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration ein Maximum von knapp 0,10 mM. Wie aus Abbildung 6.5a zu erkennen ist, nimmt die Bio-trockenmassekonzentration innerhalb von acht Stunden von knapp 20 g L<sup>-1</sup> auf 27 g L<sup>-1</sup> zu.

### *Diskussion*

Bei dem in Abbildung 6.5 beschriebenen Experiment wurden zwei Glucosezugaben, jeweils durch einen senkrechten Strich dargestellt, in den Reaktor eingebracht. Die weiter oben getroffenen Aussagen können für die Bewertung und Interpretation der ersten Zugabe übernommen werden. Die Verläufe sind entsprechend. Mit der Verlängerung der Beobachtungszeit wird deutlich, dass die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration nach dem Verbrauch der Glucose durchaus auf Werte oberhalb der Ausgangskonzentration vor der Glucosezugabe steigen kann. Aufgrund der Konsistenz der Messdaten nach dem Verbrauch der Glucose kann eine sinkende Konzentration im weiteren Verlauf angenommen werden. Die einmalige Glucosezugabe kann eine moderate Steigerung der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration nach dem Verstoffwechseln der Glucose zur Folge haben. Allerdings scheint diese zeitlich begrenzt zu sein. Da bei der Zugabe der Glucose-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Mischung ebenfalls ein Einbruch der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration zu beobachten ist, scheint dieser zweite Zusatz den Effekt der Glucose bei der Zugabe nicht zu beeinflussen. Allerdings kann erkannt werden, dass die intrazelluläre NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration sich schon bei wesentlich höheren Glucose-Konzentrationen erholt. Scheinbar kann das Salz einen dämpfenden Effekt der Glucose(zugabe) kompensieren und führt letztlich zu einer Verdoppelung der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration im Vergleich zu den Werten vor der ersten Zugabe. Neben dem kompensierenden Effekt kann also auch noch ein unterstützender Effekt herausgearbeitet werden. Es ist denkbar, dass das Phosphat in die Zelle gelangt und dort auf die Bildung von ATP positiv wirkt, was wiederum die Phosphorylierung von NAD<sup>+</sup>/H durch eine höhere Substratkonzentration verbessern könnte. Allerdings wurde in Kapitel 6.1 gezeigt, dass trotz Vorlage von ATP im Reaktionspuffer davon keine

stimulierende Wirkung auf die NADP<sup>+</sup>/H-Bildung ausgeht. Entweder kann ATP im letztgenannten Vergleich nicht aufgenommen werden und ist daher ineffektiv oder die ATP-Versorgung ist nicht der limitierende Schritt. Somit könnte noch eine Änderung des intrazellulären *pH* durch das Salz als Erklärung in Frage kommen. Sofern die Dihydrogenphosphationen in der Zelle ein Proton aufnehmen, würde der *pH* steigen und würde den in der Literatur angegebenen *pH*-Optima im basischen Bereich (Kawai *et al.*, 2001) näher kommen. Allerdings sind die *pH*-Regulationsmechanismen der Zelle sowie die Übertragbarkeit von *in vitro* Daten auf *in vivo* Beobachtungen zu berücksichtigen.

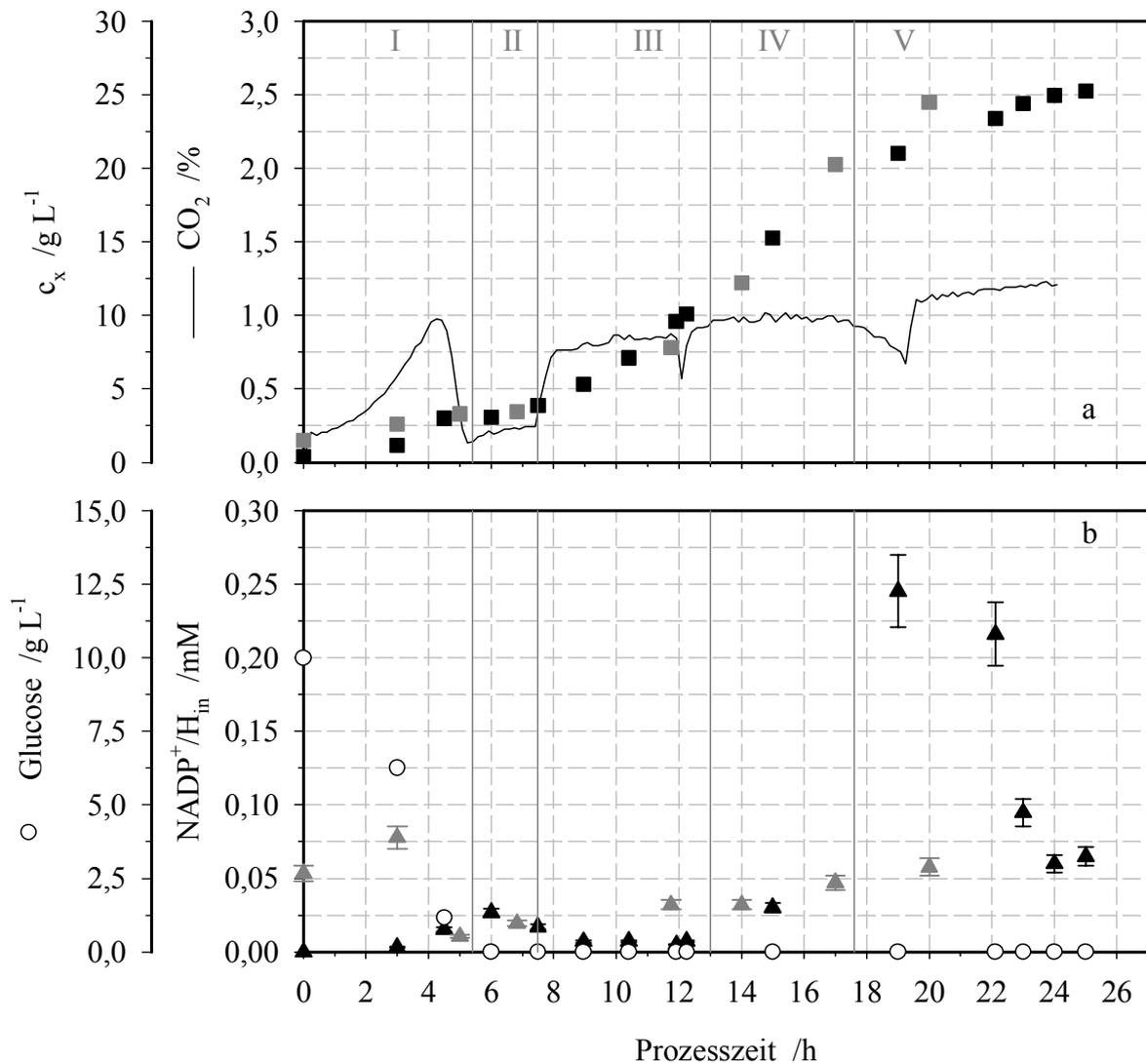
Mit diesem zweiten Puls konnte eine Beobachtung aus einem Schüttelkolbenexperiment bestätigt werden. Durch die Anwesenheit von KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> kann die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration nach einem Glucosepuls über den Ausgangswert hinaus gesteigert werden. Ob die Anwesenheit einer Phosphatquelle oder der geänderte *pH* die Ursache für diese Beobachtung sein kann, muss noch geklärt werden.

### **6.3.3 Kontinuierliche Zugabe von Zusätzen**

Die in Kapitel 5.3.5 beschriebenen Ansätze mit Zugabe von Zusätzen wurden auch hinsichtlich der Akkumulation von NADP<sup>+</sup>/H untersucht. Die Ergebnisse dieser Kultivierungen sind Inhalt dieses Kapitels.

In Abbildung 6.6 ist der Einfluss der kontinuierlichen Zugabe von Adenin auf die Biosynthese von NADP<sup>+</sup>/H während einer Kultivierung im 3 L Labormaßstab dargestellt (schwarze Symbole). Adenin wurde mit dem Zulauf ab zwölf Stunden Prozesszeit zugegeben. Von anfänglichen 0,4 g L<sup>-1</sup> steigt die Biotrockenmassekonzentration auf 3,0 g L<sup>-1</sup> nach 4,5 Stunden Prozesszeit (Abbildung 6.6a). Nach einer leichten Stagnation ist bis zum Einschalten des Zulaufs nach 7,5 Stunden Kultivierung ein moderater Anstieg bis auf 3,9 g L<sup>-1</sup> zu erkennen. In der Zulaufphase ist eine deutliche Zunahme der Biotrockenmassekonzentration zu sehen, die ab ca. 16 Stunden Kultivierungszeit etwas an Steigung abnimmt. Letztlich werden nach 25 Stunden ungefähr 25 g L<sup>-1</sup> Biotrockenmassekonzentration erreicht. Die vorgelegte Glucose einer Konzentration von 10 g L<sup>-1</sup> ist nach 5 Stunden Prozesszeit nicht mehr zu detektieren (Abbildung 6.6b). Die

Glucosekonzentration im Medium verbleibt auf der Nulllinie bis zum Ende der Kultivierung. In den ersten fünf Stunden nimmt die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Abluft mit der Kultivierungszeit immer deutlicher zu, durchläuft ein Maximum von 1,0 % und fällt dann auf Werte unter 0,2 %. Bis zum Anstellen des Zulaufs steigt die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Abluft auf 0,25 % an und nimmt danach deutlich auf 0,8 % zu. Bis 16 Stunden Prozesszeit verharrt die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Abluft auf diesem Niveau, bevor sie langsam sinkt und nach 19 Stunden kurzzeitig einbricht. Nach der Erholung werden bis zum Ende der Kultivierung Werte von bis zu 1,2 % erreicht. Bei 12 Stunden Kultivierungszeit ist ebenfalls ein kurzzeitiger Einbruch zu erkennen. Der Verlauf der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration während dieser Kultivierung mit Adenin in der Zulauflösung ab 12 Stunden Prozesszeit ist in Abbildung 6.6b zusammengefasst. Nach sechs Stunden Kultivierung erreicht die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration ein lokales Maximum von 0,03 mM bevor sie in den weiteren drei Stunden vor und nach dem Beginn der Zulaufphase bis auf 0,01 mM fällt und bis zum Wechsel der Zulauflösung auf diesen Werten bleibt. In den folgenden sieben Stunden steigt die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration erst langsam und ab 15 Stunden Prozesszeit bedeutend schneller an und erreicht einen Maximalwert von knapp 0,25 mM. Bis zum Ende der Kultivierung ist ein Abklingen der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration zu verfolgen. Innerhalb von fünf Stunden gehen die Werte auf ca. 0,06 mM zurück.



**Abbildung 6.6:** Verlauf der (a) Biotrockenmassekonzentration (Quadrate) und (b) der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration (Dreiecke) während einer Kultivierung im 3 L Labormaßstab,  $pH = 5,9$ . Nach 12 Stunden wurde die Zulauflösung durch eine Adenin-haltige ersetzt. Die Prozessphasen und die entsprechenden Werte eines Referenzversuches sind in grauen Symbolen eingezeichnet. Glucose: Offene Kreise.

### Diskussion

Im Vergleich zu dem in Kapitel 6.3.1 gezeigten und besprochenen Verlauf der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration während der Referenzkultivierung sind in diesem Lauf Unterschiede auszumachen. Die entsprechenden Werte der Referenzkultivierung sind als graue Symbole in Abbildung 6.6 eingezeichnet. Ebenfalls in Grau sind die Prozessphasen der Referenzkultivierung dargestellt. Der Verlauf der Wachstums- und NADP<sup>+</sup>/H-Kurve (schwarze Symbole) zeigt in der Satzphase in beiden Fällen große Übereinstimmung mit

der Referenzkultivierung, so dass die in Kapitel 6.3.1 angeführten Schlussfolgerungen eine weitere Bestätigung finden. Wie schon angesprochen, kann es in dem Zeitraum zwischen Verbrauch der Glucose und Starten des Zulaufs durchaus zu Unregelmäßigkeiten im Verlauf der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration kommen, die in erster Linie auf den Zeitpunkt der Probenahme, die Entwicklung der Kultur sowie auf die Länge der Probenahmeintervalle zurückzuführen sind. Beide Kulturen scheinen in den ersten acht Stunden eine identische Entwicklung zu nehmen, was eine gute Basis für weitere Vergleiche darstellt.

In den ersten viereinhalb Stunden nach Zugabe der Nährlösung können anhand der bestimmten Daten keine Unterschiede in der Biomasseentwicklung ausgemacht werden. Allerdings sind leichte Unterschiede in der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration festzustellen. Nach ungefähr zwölf Stunden Kultivierung sind 0,01 mM NADP<sup>+</sup>/H in diesem Lauf zu detektieren, im Referenzlauf 0,04 mM. Eine Klärung der Ursachen ist angesichts der Vielzahl der möglichen Einflüsse erschwert, anhand eines weiteren Experiments mit gleicher Ausrichtung kann von einer nicht signifikanten Veränderung ausgegangen werden, da dort die Werte um 0,04 mM pendelten.

Nach zwölf Stunden wurde die Zulauflösung durch eine mit Adenin angereicherte Zulauflösung ersetzt. Die Wachstumskurve zeigt hier keine offensichtliche Änderung im Vergleich zu der Referenzkurve. Bis zum Ende der Kultivierungen werden allerdings Unterschiede deutlich, der hier betrachtete Ansatz erreicht eine Endkonzentration von ca. 25 g L<sup>-1</sup> fünf Stunden später als der Referenzlauf. Mögliche *pH*-Änderungen durch Zugabe der angereicherten Zulauflösung können durch die *pH*-Regelung auf 5,9 ausgeglichen werden. Aus den Vorexperimenten ist bekannt, dass höhere Adeninkonzentrationen zu einer Steigerung der Biotrockenmassekonzentration führen können. Anhand der vorliegenden Daten kann keine Erklärung für diese widersprüchlichen Beobachtungen gegeben werden.

Auffällig ist, dass sich der Anstieg der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration nicht linear verhält. Im Vergleich zum Referenzlauf kann die Zugabe der Vorstufen mit diesem Anstieg im Zusammenhang stehen, da einerseits mehrere Läufe zu einer leicht ansteigenden und auf ca. 0,06 mM stagnierenden Konzentration geführt haben, und andererseits der Zulaufwechsel die einzige offensichtlich Änderung ist. In diesem Fall wurde der Zulauf kurzzeitig angehalten, um die Vorlageflasche zu tauschen. Mit dem damit verbundenen Ausbleiben der Glucose kann der zeitweise Einbruch der CO<sub>2</sub>-Konzentration zu diesem Zeitpunkt erklärt werden. In einem Reproduktionslauf erfolgte der Wechsel der

Zulaufung ohne Verzögerung. In beiden Fällen ist nach dem Wechsel der Zulaufung ein Anstieg der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration zu beobachten. Es ist also anzunehmen, dass die ab zwölf Stunden Prozesszeit zugegebenen Vorstufen mit dem Anstieg der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration in Verbindung stehen.

Mit der linear ansteigenden Menge des zugegebenen Zusatzes geht ein nicht linearer Anstieg der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration in den Zellen einher. Zwar sind im Folgenden nur alle drei Stunden Proben genommen und analysiert worden, so dass diese Datenpunkte nicht den wirklichen Verlauf der Entwicklung der intrazellulären Konzentration wiedergeben, jedoch ist dieser Effekt bei zwei unabhängig durchgeführten Läufen zu beobachten. Somit könnte ein Zusammenhang zwischen vorgelegter Konzentration des Zusatzes und der NADP<sup>+</sup>/H-Biosyntheseleistung (und/oder Regulation) bestehen. Die Konzentration der verfügbaren Vorstufe scheint einen Einfluss zu haben, eine Mindestkonzentration scheint für den deutlichen Anstieg zwischen 15 und 19 Stunden Kultivierungszeit verantwortlich zu sein. Auf eine verzögerte Wirkung der Vorstufe kann auch geschlossen werden, da die einmalige Zugabe wesentlich höherer Konzentrationen unmittelbar zu einer Steigerung der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration führen kann. Da bei diesem zuletzt genannten Experiment ebenfalls Adenin zugegeben wurde und ebenso zu einer Steigerung führte wie die kontinuierliche Zugabe von Adenin, scheint die beobachtete Konzentrationszunahme von NADP<sup>+</sup>/H mit der Verfügbarkeit von Adenin in Verbindung zu stehen. Diese Beobachtungen erweitern die in den Kapiteln 5.2.2 und 5.2.3 beschriebenen Erfahrungen hinsichtlich der Bedeutung des Zusatzes Adenin. In diesem Zusammenhang muss gefragt werden, ob höhere Coenzym-Konzentrationen dem Organismus überhaupt einen Vorteil bringen und gezielt eingestellt werden oder eher das Resultat einer mangelnden Regulation sind? Zusätzlich ist zu hinterfragen, welchen Einfluss Adenin auf die Verfügbarkeit/Biosynthese von ATP hat und ob die Biosynthese von ATP mit den in der Literatur beschriebenen Synthesewegen von NAD(P)<sup>+</sup>/H verknüpft werden soll, da ATP einerseits als Energielieferant und andererseits in Form des AMP-Anteils strukturell und massenmäßig die Hälfte des NAD(P)<sup>+</sup>/H-Moleküls ausmacht. Eine ähnliche Überlegung wäre auch für PRPP denkbar. Es bleibt festzuhalten, dass der Anstieg der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration mit der Zudosierung der Vorstufe in Verbindung zu setzen ist, ein verzögerter Anstieg lässt auf eine konzentrationsabhängige Reaktion/Regulation schließen. Der Einfluss von Adenin wird größer gewichtet als der der Nicotinsäure.

Des Weiteren ist als Konsequenz des oben genannten zu hinterfragen, warum es in dieser Situation zu einer Anreicherung mit NADP<sup>+</sup>/H kommt. Aus den Beobachtungen der Referenzversuche wurde, wie in Kapitel 6.3.1 nachzulesen, ausgeführt, dass einerseits das Zellwachstum für die Steigerung der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration verantwortlich sei und andererseits die Steigerung an sich sowie die Höhe der Steigerung unabhängig von der Stoffwechselsituation (C-Quelle/n) sei. Unter diesen Annahmen kann der hier beobachtete Anstieg der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen auf einen höheren Fluss durch die Biosynthese zurückgeführt werden. Es ist allerdings nicht zu klären, ob dieser Anstieg auf eine gesteigerte Neusynthese oder einen reduzierten Abbau zurückzuführen ist. Sofern das Zellwachstum die Biosynthese von NADP<sup>+</sup>/H stimuliert, ist in diesem Fall zu hinterfragen, ob der Anstieg auf eine ausgesetzte/inhibierte Regulation zurückzuführen ist oder in den Referenzversuchen durch eine mangelnde stoffliche Versorgung verursacht ist. In dieser Phase zwischen 12 und 19 Stunden Prozesszeit scheint die stoffliche Versorgung eher als Grund anzuführen zu sein. Es bleibt festzuhalten, dass in dieser Phase die bisher beobachtete Maximalkonzentration deutlich überschritten wird.

Sofern diese stoffliche Versorgung mit der ansteigenden NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration in Verbindung steht, sollte der ab 19 Stunden Prozesszeit zu beobachtende Abfall der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration nicht auf eine Adenin-, (ATP- oder Nicotinsäure-)Limitierung zurückzuführen sein, da zu diesem Zeitpunkt eine Adeninkonzentration von 7 mM im Medium zu bestimmen ist (ohne Abbildung). Möglicherweise kommt die Regulation der NADP<sup>+</sup>/H-Biosynthese wieder zum Tragen. Dies würde den Beobachtungen entsprechen, dass aufgrund der stabilen NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen diese einer effektiven Regulation unterliegen könnte. Für regulierende Einflüsse würde auch sprechen, dass zum Ende der Kultivierung eine Konzentration von 0,06 mM eingestellt ist, die der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration anderer Läufe mit Zusätzen und den Referenzläufen entsprechen würde. Allerdings ist unklar, ob und in wie weit der große Zeitraum von fünf Stunden zur Einstellung der Sollkonzentration regulierende Einflüsse vermuten lässt. Da zwischen 19 und 22 Stunden keine Probe genommen wurde, kann in dieser Zeit auf den realen Verlauf nicht zurückgeschlossen werden. Es bleibt festzuhalten, dass durch Zugabe von Adenin und Nicotinsäure mit der Zulauflösung eine Steigerung der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration erzielt werden kann. Einerseits scheint in der Akkumulationsphase der Grenzwert von 0,06 mM sowie die Regelung ausgesetzt, andererseits könnte in der Abbauphase die Regulation wieder an Einfluss gewinnen und zu der Rückkehr zu der

bisher beobachteten Sättigungskonzentration von 0,06 mM führen. Diese Effekte könnten von dem Einfluss der kontinuierlich ansteigenden Adeninkonzentration im Medium überlagert sein. Eine Beeinflussung der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration ist möglich.

Im Gegensatz zu der Referenzkultivierung fällt hier der Maximalwert der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration mit dem Einbruch in der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Abluft zusammen. Wurde in Kapitel 6.3.1 noch eine Unabhängigkeit der NADP<sup>+</sup>/H-Biosynthese von der jeweiligen Stoffwechselsituation beschrieben, scheint dieser Zusammenhang mit diesen Daten in Frage gestellt zu werden. Wie in Kapitel 5.3.3 für NAD<sup>+</sup>/H ausgeführt, kann die beginnende Acetatverstoffwechslung und die damit einhergehende Änderung der Stoffwechselsituation für den weiteren Rückgang der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration verantwortlich gemacht werden. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang, der durch den angenommenen höheren Fluss (bei ausgesetzter Regulation) durch die Biosynthese deutlicher zum Tragen kommt. Allerdings könnte das geringere Wachstum, das möglicherweise in den Referenzkultivierungen für die Stagnation der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration verantwortlich gemacht werden kann, in diesem Fall zu einem Rückgang der Konzentration auf die Sättigungskonzentration der Referenzkultivierungen führen.

#### **6.3.4 Diskussion und Herstellungsverfahren**

Im Rahmen der reaktionstechnischen Untersuchungen zur Anreicherung von *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 mit NADP<sup>+</sup>/H wurden zwei Strategien erarbeitet. Da, wie aus Kapitel 6.1 ersichtlich, die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration scheinbar keinen Einfluß auf die Biosynthese von NADP<sup>+</sup>/H hat und exogenes ATP wirkungslos erscheint, sollte versucht werden, über die intrazelluläre ATP-Konzentration auf die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration Einfluss zuzunehmen. Zur Unterstützung der ATP-Biosynthese wurde die Wirkung von anorganischem Phosphat und Adenin untersucht.

Die erste Strategie basiert zusätzlich auf der Beobachtung, dass die einmalige Zugabe von Glucose nach der Zulaufphase zu einem unvermittelten Einbruch der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration führt. Diese erholt sich erst, sobald nur noch geringe Mengen an Glucose im Medium zu detektieren sind. Mit der Verlängerung der Beobachtungszeit wird deutlich, dass die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration nach dem Aufbrauchen der Glucose durchaus auf Werte oberhalb der Ausgangskonzentration vor der Glucosezugabe steigen kann.

Bei der Zugabe der Glucose-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Mischung kann erkannt werden, dass die intrazelluläre NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration sich schon bei wesentlich höheren Glucose-Konzentrationen erholt und zu einer weiteren Steigerung der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration im Vergleich zu den Werten vor der ersten Zugabe führen kann.

Durch die Zugabe von Adenin (und Nicotinsäure) als Vorstufe mit der Zulauflösung kann nach einer gewissen zeitlichen Verzögerung eine Akkumulation von NADP<sup>+</sup>/H beobachtet werden.

Die gezeigten Strategien führen jeweils zu einer Änderung der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration. Sicher hat die Zugabe von Glucose (und KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) den Vorteil der einfacheren Durchführbarkeit. Außerdem erfolgen diese Änderungen bei hohen Zelldichten gegen Ende der Kultivierung. Jedoch ist die Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes mit Unsicherheiten verbunden, da von einer dauerhaft höheren NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration nach der Zugabe nicht ausgegangen werden kann.

Daher ist der Prozess mit kontinuierlicher Zugabe von Adenin letztlich zu bevorzugen. Zwar können die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen über den gesamten Verlauf auch hier nicht konstant gehalten werden, so ermöglicht doch der Verlauf eine Zellernte nach maximal 19 Stunden. Mit der früheren Ernte der Coenzym-reicheren Zellen sind nur geringe Einbußen im Zellertrag hinzunehmen.

Zur intrazellulären Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H wird folgendes Protokoll empfohlen: Im Anschluss an eine achtstündige Satzphase wird die Zulauflösung (200 g L<sup>-1</sup> Glucose, 50 g L<sup>-1</sup> Hefeextrakt) mit einer konstanten Rate von 37,3 mL h<sup>-1</sup> zudosiert. Nach weiteren 4 Stunden wird diese durch eine Zulauflösung, die zusätzlich noch 95 mM Adenin enthält, unter Beibehaltung der Zulauftrate ersetzt. Nach 19 Stunden Kultivierung kann bei einer Biotrockenmassekonzentration von ca. 20 g L<sup>-1</sup> und einer intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration von 0,25 mM geerntet werden. Im Vergleich zum Standardansatz entspricht das bei 10 % weniger Biotrockenmassekonzentration einer Steigerung der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration um den Faktor 4.

## 6.4 Zusammenfassung zur Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H

In Kapitel 6 wurden Möglichkeiten zur intrazellulären Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H in *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 untersucht. Exogenes NAD<sup>+</sup> führt nicht zu einer intrazellulären Anreicherung in ruhenden Zellen. Zusätzlich ist zu erkennen, dass eine sequentielle Produktion von NADP<sup>+</sup>/H aus NAD<sup>+</sup>/H, das zuvor aus Metaboliten wie Adenin und Nicotinsäure oder Chinolinsäure in den Zellen hergestellt wurde, unter diesen Bedingungen unmöglich erscheint. Als Ursache kann eine Stofftransportlimitierung ausgeschlossen werden. Die Kompartimentierung der NADP<sup>+</sup>/H-Biosynthese kann als Ursache nicht ausgeschlossen werden, jedoch erscheinen Regulationsmechanismen als Hauptursache. Der limitierte Einfluss äußerer Faktoren mag auf eine herausragende physiologische Aufgabe/Funktion von NADP<sup>+</sup>/H hinweisen, die mit einer (fast) unbeirraren intrazellulären Konzentration einhergeht. Molekulare Regulationsmechanismen der drei NADH-Kinasen in *Saccharomyces cerevisiae* sind vereinzelt erst in den letzten Jahren erarbeitet worden (Kawai *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2005).

In einer Vielzahl von weiteren Experimenten wurden Strategien zur Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H in *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 sowie Angaben aus der Literatur über mögliche Wechselwirkungen mit NADP<sup>+</sup>/H auf eine intrazelluläre Anreicherung hin untersucht. All diese Ergebnisse zeigen, dass weder in ruhenden noch in wachsenden Zellen die Biosynthese von NADP<sup>+</sup>/H durch äußere Faktoren beeinflussbar erscheint. Dies grenzt NADP<sup>+</sup>/H sehr deutlich von NAD<sup>+</sup>/H ab.

Im Verlauf einer Zulaufkultivierung kann beobachtet werden, dass die intrazelluläre NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration nur geringen Schwankungen unterliegt. Es ist ein Zusammenhang zwischen Wachstum und NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration auszumachen, welcher von der Stoffwechselsituation (Art und Konzentration der Energiequelle) unabhängig erscheint.

Da die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration scheinbar keinen Einfluss auf die Phosphorylierung hat, sollte versucht werden, über die intrazelluläre ATP-Konzentration auf die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration Einfluss zunehmen. Zur Unterstützung der ATP-Biosynthese wurde die Wirkung von anorganischem Phosphat und Adenin untersucht. Im Gegensatz zu den Referenz- und zu den Vorversuchen konnte die angenommene effektive Regulation der NADP<sup>+</sup>/H-Biosynthese und die vermeintliche Begrenzung der intrazellulären Konzentration (kurzzeitig) durchbrochen werden.

Ein Prozess mit kontinuierlicher Zugabe von Adenin ist letztlich zur Herstellung NADP<sup>+</sup>/H-angereicherter Biokatalysatoren zu bevorzugen. Zwar können die NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen über den gesamten Verlauf auch hier nicht konstant gehalten werden, jedoch ermöglicht diese Prozessführung mehr Einflussnahme auf wachsende Zellen. Bei der Zellanzucht nach dem entwickelten Verfahren zur Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H in *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 steigt nach 19 Stunden Kultivierung die intrazelluläre NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration um den Faktor 4 auf 0,25 mM im Vergleich zu einem Standardansatz.

## 7 Biotransformation mit angereicherten Zellen

In diesem Kapitel soll untersucht werden, ob die in den Kapiteln 5 und 6 aufgezeigten Strategien zur Anreicherung von NAD<sup>+</sup>/H bzw. NADP<sup>+</sup>/H zu einer Veränderung der Produktkonzentration und des Enantiomerenüberschusses (ee) bei der Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE führen können. Mit Proben aus ausgewählten Kultivierungen wurden Biotransformationen in einem wässrigen Ansatz durchgeführt. In Kapitel 7.1 wird auf den Einsatz NAD<sup>+</sup>/H-angereicherter Zellen eingegangen. Kapitel 7.2 befasst sich mit der Untersuchung NADP<sup>+</sup>/H-angereicherter Zellen. Innerhalb jedes Kapitels werden die Ergebnisse diskutiert und anschließend in Kapitel 7.3 zusammengefasst.

### 7.1 Einsatz NAD<sup>+</sup>/H-angereicherter Zellen

Der Einsatz NAD<sup>+</sup>/H-angereicherter Zellen zur Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE soll untersucht werden. Zu bestimmten Zeiten wurden Proben aus dem Reaktor während eines Glucosepulses entnommen und für die Biotransformation eingesetzt.

In Abbildung 7.1 ist exemplarisch der Einfluss variierender NAD<sup>+</sup>/H-Konzentrationen auf die Biotransformation von 4-Cl-ACE dargestellt. Die Veränderung der intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration wurde, wie in Kapitel 5.3.2 dargestellt, durch die einmalige Zugabe einer Glucoselösung zu der Kultivierung nach der Zulaufphase herbeigeführt (senkrechter Strich in Abbildung 7.1b). Mit der Zugabe steigt die Glucosekonzentration im Medium auf knapp 17 g L<sup>-1</sup> an, fällt im weiteren Verlauf deutlich und erreicht nach ungefähr drei Stunden sehr geringe Konzentrationen um 0,3 g L<sup>-1</sup>. Die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration steigt von unter 0,01 mM auf 0,13 mM an und fällt mit dem Verbrauch der Glucose auf Werte um 0,05 mM.

Die Ergebnisse der jeweiligen Biotransformationen mit den zu den gegebenen Zeitpunkten geernteten Zellen sind in Abbildung 7.1a gezeigt. In der Beobachtungszeit von drei Stunden durchläuft die S-CHBE-Konzentration ein Minimum bei einer Konzentrationsabnahme von etwas mehr als 3 mM auf knapp 15 mM. Im Gegensatz dazu zeigt die R-CHBE-Konzentration ein Maximum in dem selben Zeitraum. Sie steigt von unter 1 mM auf 1,8 mM an.

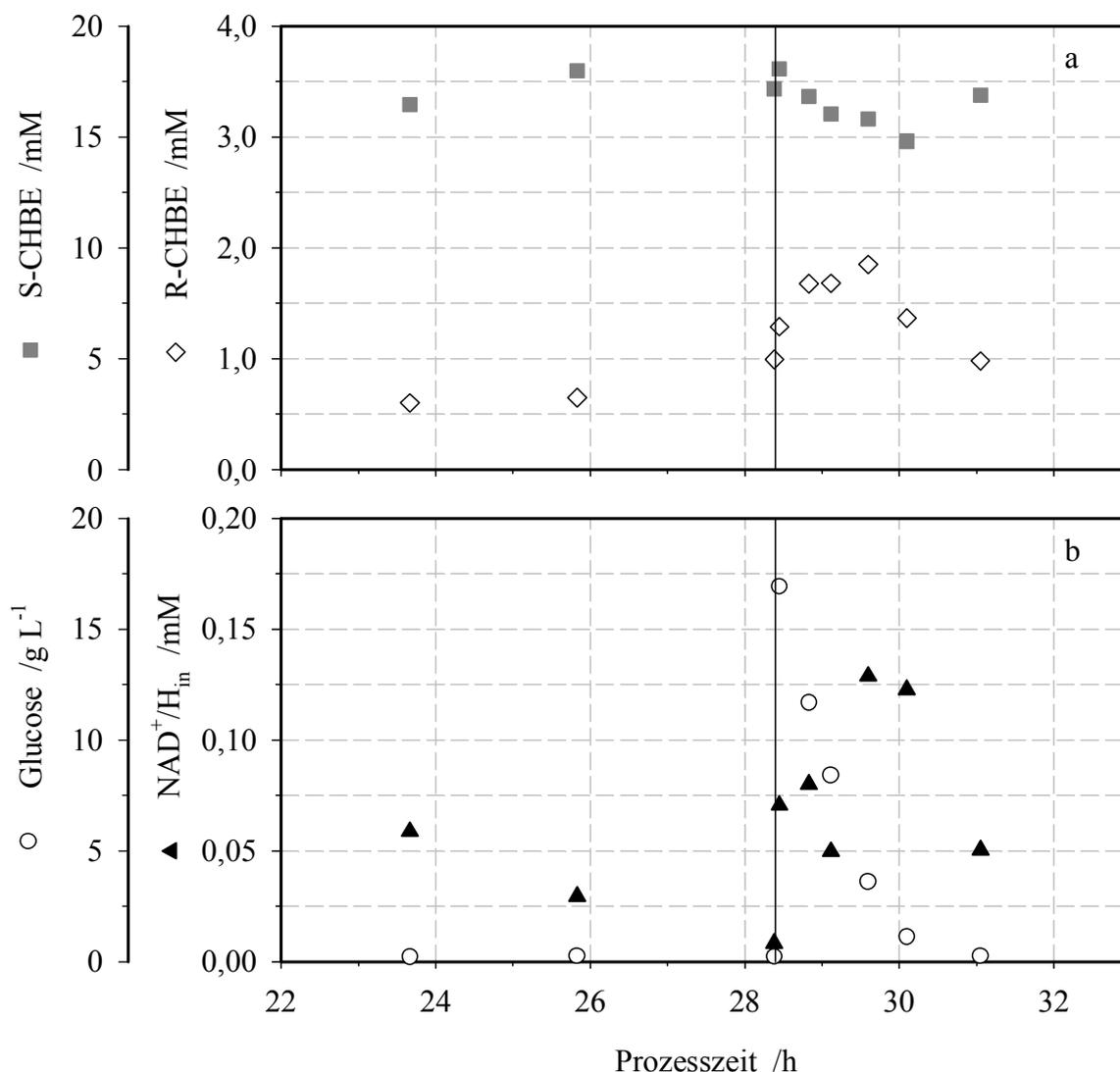


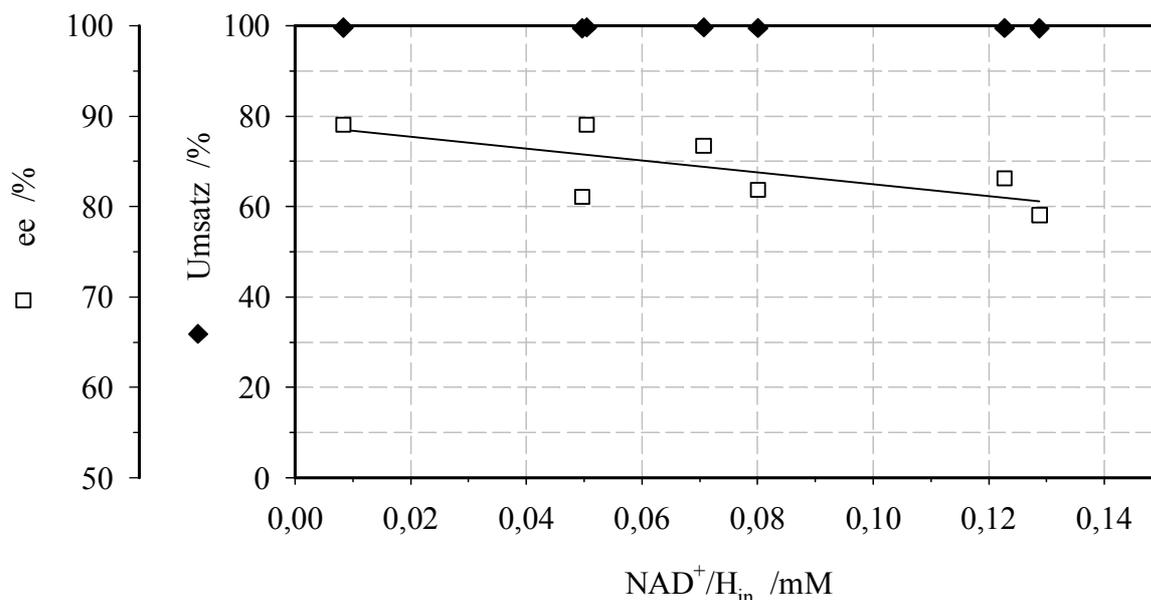
Abbildung 7.1: (a) Umsetzung von 4-Cl-ACE mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 unter (b) Variation der intrazellulären  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentrationen (Dreiecke). Die variierenden  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentrationen wurden durch einmalige Glucosezugabe (offen Kreise) nach der Zulaufphase erzeugt. Der Zugabezeitpunkt ist durch einen senkrechten Strich dargestellt. In einphasigen 2 mL Ansätzen wurden folgende Konzentrationen eingestellt:  $c_x = 20 \text{ g L}^{-1}$ ,  $c(\text{ACE}) = 19,6 \text{ mM}$ ; Umsetzungsdauer: 13 Stunden. In Teilabbildung a: R-CHBE: offene Diamanten. S-CHBE: graue Quadrate.

### Diskussion

Die Zusammenhänge zwischen Glucosezugabe nach der Zulaufphase und intrazellulärer  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentration können Kapitel 5.3.2 entnommen werden. Aus Abbildung 7.1a ist zu erkennen, dass der Verlauf der S-CHBE-Konzentration spiegelbildlich zu dem Verlauf der R-CHBE-Konzentration verläuft. Bei den ersten vier Proben nach der Glucosezugabe kann möglicherweise mehr R-CHBE zu Ungunsten von S-CHBE gebildet werden. Für die

letzten drei Proben gilt dieser Zusammenhang in umgekehrter Weise. Wie in Kapitel 6.3.2 erläutert, kann die intrazelluläre  $\text{NADP}^+/\text{H}$ -Konzentration während einer einmaligen Glucosezugabe nach der Zulaufphase absinken. Dieser Effekt kann auch hier beobachtet (ohne Abbildung) und mit dem Verlauf der S-CHBE-Konzentration verknüpft werden.

Zusätzlich ist zu sehen, dass die Verläufe der R-CHBE-Kurve und der  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Kurve sich entsprechen. Mit steigender  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentration nimmt die R-CHBE-Konzentration zu, sinkt die  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentration, nimmt die R-CHBE-Konzentration ebenfalls ab. Es ist wahrscheinlich, dass das Substrat von weiteren in der Zelle vorkommenden Oxidoreduktasen zu dem R-Enantiomer umgesetzt werden kann und dass diese eine Präferenz für  $\text{NAD}^+/\text{H}$  als Elektronenüberträger haben. Dies kann in Verbindung mit Abbildung 7.2 verdeutlicht werden.



**Abbildung 7.2:** Einfluss der intrazellulären  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentration auf dem Umsatz (Diamanten) und auf den Enantiomerenüberschuss (offene Quadrate) bei der Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6. Die variierenden  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentrationen wurden durch einmalige Glucosezugabe nach der Zulaufphase erzeugt. In einphasigen 2 mL Ansätzen wurden folgende Konzentrationen eingestellt:  $c_x = 20 \text{ g L}^{-1}$ ,  $c(4\text{-Cl-ACE}) = 19,6 \text{ mM}$ ; Umsetzungsdauer: 13 Stunden.

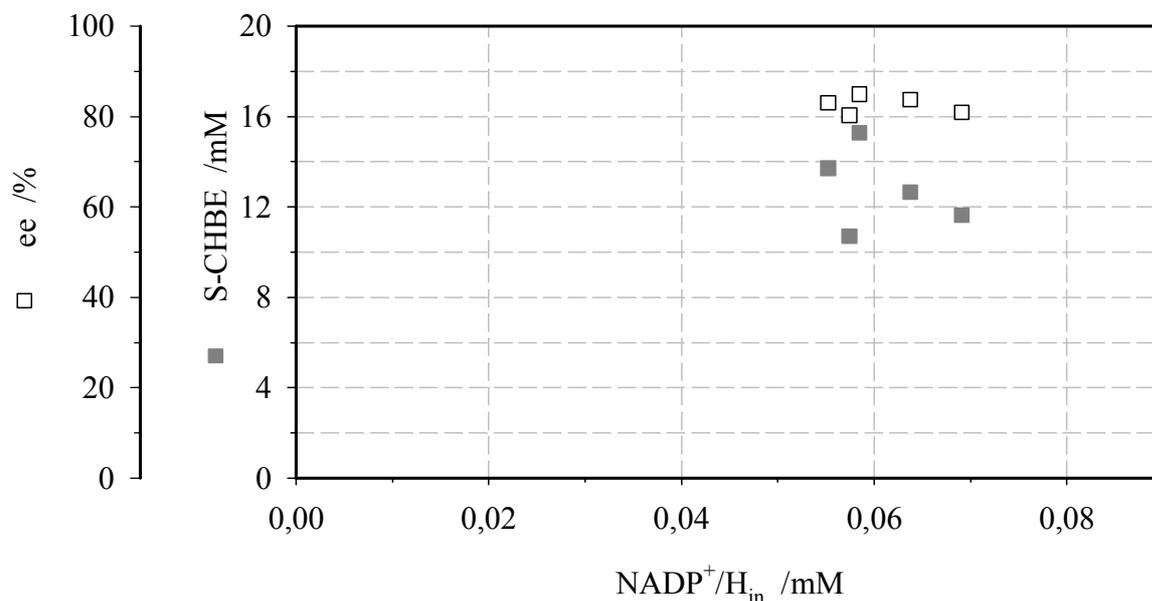
In Abbildung 7.2 ist der Einfluss variierender intrazellulärer  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentrationen auf den Umsatz und auf den Enantiomerenüberschuss ergänzend für die nach der Glucosezugabe untersuchten Proben dargestellt. Ein Umsatz von mehr als 99 % ist für alle

durchgeführten Biotransformationen zu erkennen. Der Enantiomerenüberschuss erreicht Maximalwerte um 90 % und Minimalwerte um 80 %. Es ist zu erkennen, dass die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration den Umsatz nicht bestimmt. Jedoch führt eine steigende NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration zu einer Reduzierung des Enantiomerenüberschusses. Dies ist in Abbildung 7.2 durch lineare Regression verdeutlicht. Die Reduzierung des Enantiomerenüberschusses kann auf die vermehrte Bildung von R-CHBE zurückgeführt werden (ohne Abbildung).

Anhand dieser Daten wird deutlich, dass in der Zelle vorhandenes NAD<sup>+</sup>/H trotz des erhöhten Bedarfs an NADP<sup>+</sup>/H aufgrund der Biotransformation nicht (in dem Maß) phosphoryliert werden kann, um zu einer Steigerung der S-CHBE-Konzentration beitragen zu können. Mit steigender zellinterner NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration nimmt die R-CHBE-Konzentration wie erwartet zu. Folglich sinkt die S-CHBE-Konzentration.

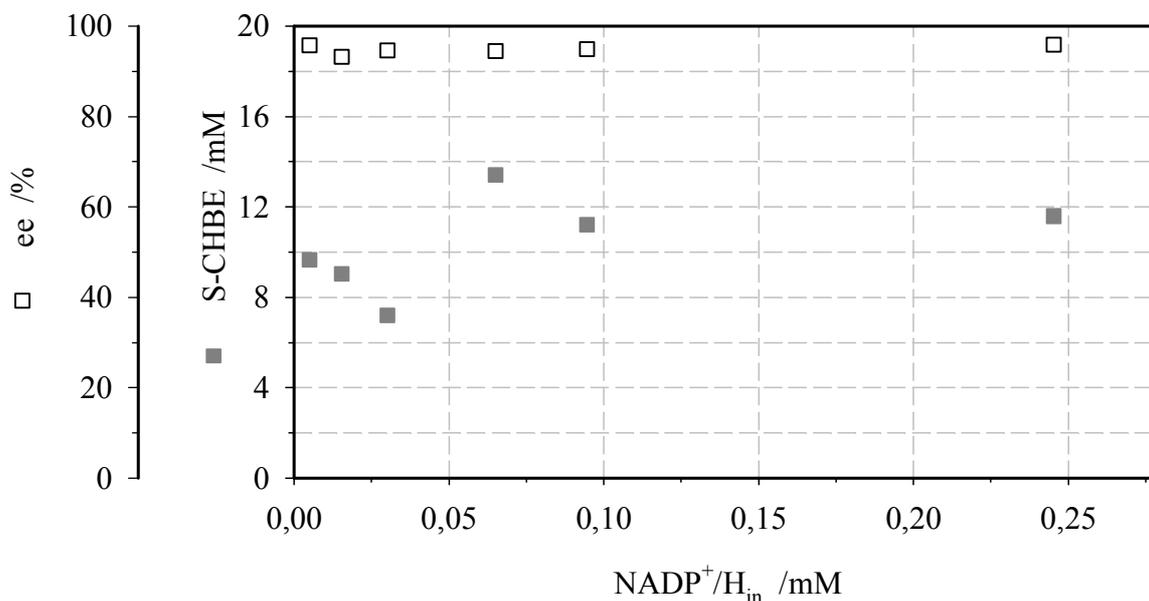
## 7.2 Einsatz NADP<sup>+</sup>/H-angereicherter Zellen

Im Folgenden soll die Verwendung NADP<sup>+</sup>/H-angereicherter *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 Zellen zur asymmetrischen Synthese von S-CHBE untersucht werden. Dabei soll auf die Anreicherung durch Zugabe einer Glucose-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung nach der Zulaufphase (in Kapitel 6.3.2 beschrieben) sowie auf die Anreicherung durch kontinuierliche Zugabe von Adenin mit der Zulaufphase (in Kapitel 6.3.3 beschrieben) eingegangen werden. In Abbildung 7.3 und in Abbildung 7.4 sind für jeweils eine Kultivierung, bei der entweder die Zugabe einer Glucose-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung nach der Zulaufphase (Abbildung 7.3) oder die kontinuierliche Zudosierung von Adenin mit der Zulaufphase (Abbildung 7.4) erfolgte, die Ergebnisse jeweils ausgewählter Proben bei der Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE in Bezug auf die intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen dargestellt. Die durchgeführten Biotransformationen wurden jeweils mit einer Biotrockenmassekonzentration von 10 g L<sup>-1</sup> und einer Substratkonzentration von 19,6 mM 4-Cl-ACE angesetzt.



**Abbildung 7.3:** Produktkonzentration (graue Quadrate) und Enantiomerenüberschuss (offene Quadrate) bei der Biotransformation von 4-Cl-ACE mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 unter Variation der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen. Die variierenden NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen wurden durch Zugabe einer Glucose-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung nach der Zulaufphase erzeugt. In einphasigen 3 mL Ansätzen wurden folgende Konzentrationen eingestellt:  $c_x = 10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $c(4\text{-Cl-ACE}) = 19,6 \text{ mM}$ ; Umsetzungsdauer: 13 Stunden.

Nach den in Abbildung 7.3 gezeigten Biotransformationen bewegt sich der Enantiomerenüberschuss mit geringen Schwankungen um knapp 83 %, die S-CHBE-Konzentrationen bewegen sich zwischen 11 und 15 mM deutlicher um einen Mittelwert von knapp 13 mM. Die intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen bewegen sich in einem Bereich zwischen 0,05 und 0,07 mM. Die mittlere Ausbeute liegt bei 70 % ± 12 %, der Umsatz bei 91 % ± 8 % (ohne Abbildung). Mit den Ansätzen, die in Abbildung 7.4 dargestellt sind, kann ein Bereich der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,25 mM abgedeckt werden. Bei allen Ansätzen bewegt sich der Enantiomerenüberschuss zwischen 93 und 96 %. Die S-CHBE-Konzentrationen bewegen sich zwischen 7,2 und 13,4 mM. Es werden Ausbeuten von 54 % ± 16 % und Umsätze von 76 % ± 11 % erzielt (ohne Abbildung).



**Abbildung 7.4:** Produktkonzentration (graue Quadrate) und Enantiomerenüberschuss (offene Quadrate) bei der Biotransformation von 4-Cl-ACE mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 unter Variation der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen mit ausgewählten Proben der in Abbildung 6.6 dargestellten Kultivierung. Die Variation der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen wurde wie in Kapitel 6.3.3 beschrieben durch kontinuierliche Adeninzugabe mit der Zulauflösung ab 12 Stunden Prozesszeit erzielt. In einphasigen 3 mL Ansätzen wurden folgende Konzentrationen eingestellt:  $c_x = 10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $c(4\text{-Cl-ACE}) = 19,6 \text{ mM}$ ; Umsetzungsdauer: 40 Minuten.

### Diskussion

Der Einfluss variierender NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen auf die Produktbildung und auf den Enantiomerenüberschuss wurde bei der Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 untersucht. Aus Abbildung 7.3 und Abbildung 7.4 ist zu erkennen, dass mit einer Veränderung der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration in den Zellen nur unwesentliche Änderungen des Enantiomerenüberschusses einhergehen. Anhand der in Abbildung 7.3 gezeigten Daten ist kein Zusammenhang zwischen der zellinternen NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration und der S-CHBE-Konzentration auszumachen. Im Vergleich zu den in Abbildung 7.3 veranschaulichten Untersuchungen können die niedrigeren Werte von Ausbeute und Umsatz bei den Untersuchungen, die in Abbildung 7.4 gezeigt sind, auf die wesentlich geringere Umsetzungsdauer von 40 Minuten statt 13 Stunden zurückgeführt werden. Die Umsetzungsdauer wurde reduziert, um die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in die Betrachtung einzubeziehen. Aus Abbildung 7.4 ist zu erkennen, dass auch bei der kürzeren Umsetzungsdauer der Enantiomerenüberschuss der einzelnen Ansätze von der

---

intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration unberührt ist. In Abhängigkeit der erzielten Produktkonzentrationen können in Abbildung 7.4 zwei Bereiche unterschieden werden. In einem Konzentrationsbereich zwischen 0,01 und 0,03 mM NADP<sup>+</sup>/H werden durchschnittlich 9 mM S-CHBE gebildet, in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,07 und 0,25 mM NADP<sup>+</sup>/H dagegen durchschnittlich 12 mM S-CHBE. Diese Daten zeigen, dass von einem Bereich niedrigerer zellinterner NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen (0,01 bis 0,03 mM) zu einem Bereich höherer NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen (0,07 bis 0,25 mM) die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit eine Steigerung erfährt. Ab einem Schwellenwert von 0,07 mM NADP<sup>+</sup>/H scheint eine Sättigung erreicht zu sein. Für alle hier angesprochenen Biotransformationsansätze kann ergänzt werden, dass weder die NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration (ohne Abbildung) noch die anabole Reduktionskraft<sup>1</sup> (ohne Abbildung) einen Einfluss auf den Enantiomerenüberschuss der jeweils betrachteten Untersuchungsreihe hat.

---

<sup>1</sup> Unter anaboler Reduktionskraft versteht man das Konzentrationsverhältnis von NADPH und der Summe NADP<sup>+</sup>/H. Dieses liegt bei Werten größer 0,5.

### 7.3 Zusammenfassung

Die Untersuchungen in Kapitel 7 dienen dazu, die in Kapitel 5 und 6 erarbeiteten Strategien zur Coenzym-Anreicherung beim Einsatz der Biokatalysatoren in der Biotransformation zu überprüfen. Als Beispielreaktion dient die asymmetrische Reduktion von 4-Cl-ACE zu S-CHBE. Untersucht wurden  $\text{NAD}^+/\text{H}$ - und  $\text{NADP}^+/\text{H}$ -angereicherte Hefe *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6.

Beim Einsatz  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -angereicherter Biokatalysatoren zur Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE ist zu erkennen, dass mit steigender  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentration die R-CHBE-Konzentration zu- und die S-CHBE-Konzentration abnimmt. Die Enantiomerenreinheit nimmt erwartungsgemäß ab.

Bei den Untersuchungen mit  $\text{NADP}^+/\text{H}$ -angereicherten Biokatalysatoren kamen Zellen, die nach der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Strategie und nach der Adenin-Strategie behandelt wurden, zum Einsatz. Es ist jeweils zu beobachten, dass die Enantiomerenreinheiten von den intrazellulären  $\text{NADP}^+/\text{H}$ -Konzentrationen unberührt bleiben. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit nimmt in Abhängigkeit der intrazellulären  $\text{NADP}^+/\text{H}$ -Konzentration bis zu einem Schwellenwert von 0,07 mM  $\text{NADP}^+/\text{H}$  zu.

---

## 8 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Coenzymbereitstellung in *Saccharomyces cerevisiae* zur Ganzzell-Biokatalyse untersucht. Bei der asymmetrischen Synthese bieten ganze Zellen als Biokatalysator neben der leichten Verfügbarkeit den ökonomischen Vorteil, dass sie die Coenzyme als Teil des natürlichen Stoffwechsels besitzen. Jedoch kann in Ganzzell-Biotransformationen eine Abnahme der intrazellulären Coenzymkonzentration beobachtet werden, die mit der Inaktivierung des Biokatalysators in Verbindung gebracht werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher am Beispiel der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 Strategien zur Herstellung Coenzym-angereicherter Biokatalysatoren entwickelt und diese Zellen für die asymmetrische Synthese von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester (4-Cl-ACE) zu (S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethylester (S-CHBE) eingesetzt werden. Die rekombinante Hefe *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 überexprimiert zur Steigerung der Enantiomerenreinheit bei asymmetrischen Synthesen die  $\beta$ -Untereinheit der zelleigenen Fettsäuresynthase und zur Unterstützung der Coenzymregenerierung (NADPH) eine Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis*.

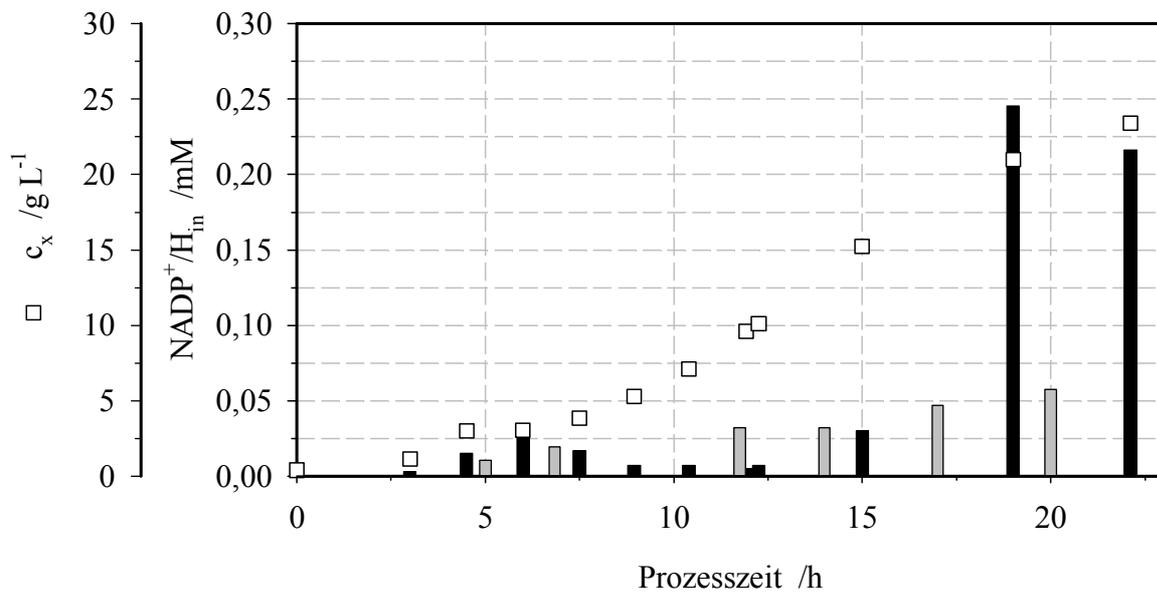
In einem  $\text{NAD}^+$ -Molekül sind ein Molekül Nicotinamid und Adenin über jeweils ein Molekül Ribose und eine Diphosphatgruppe miteinander verknüpft. Die elektronenübertragende Funktion von  $\text{NAD}^+$  erfolgt durch reversible Reduktion des Pyridin-Derivats Nicotinamid (formal:  $\text{NAD}^+ + 2e^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NADH}$ ). Hinsichtlich der Biosynthese von  $\text{NAD}^+/\text{H}$  können in *Saccharomyces cerevisiae* zwei Wege unterschieden werden.  $\text{NAD}^+$  ist ein Intermediat eines Kreislaufs, der fünf Pyridin-Derivate verbindet. In Form von Nicotinsäure, ein Intermediat eines Kreislaufs, kann beispielsweise direkt in die Biosynthese von  $\text{NAD}^+/\text{H}$  eingespeist werden. Im Gegensatz dazu wird bei der *de novo* Biosynthese zuerst aus der Aminosäure L-Tryptophan ein Pyridin-Derivat gebildet, welches dann an entsprechender Stelle in den Pyridin-Kreislauf zur Biosynthese von  $\text{NAD}^+/\text{H}$  eingespeist wird. Die intrazelluläre  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentration ist das Resultat eines ständigen Auf- und Abbaus. Stoffströme aus dem Kreislauf erfolgen u. a. bei der Biosynthese von  $\text{NADP}^+/\text{H}$ , das nur durch die Phosphorylierung von  $\text{NAD}^+/\text{H}$  erhalten werden kann. Dazu besitzt die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* drei NADH-Kinasen, zwei im Cytosol und eine in den Mitochondrien. Neben dem Vorkommen von  $\text{NAD}^+/\text{H}$  in katabolen Stoffwechselwegen kommt  $\text{NAD}^+$  eine bedeutende Rolle als Substrat für

---

posttranslatorische Proteinmodifikationen zu, die der Stilllegung von Genen und der Verlängerung der Lebensdauer dienen können. Diese Mechanismen führen auch zu einem Stoffstrom aus dem Kreislauf. Außer in anabolen Stoffwechselwegen ist NADPH an der Abwehr von oxidativem Stress beteiligt und führt so zum Schutz des Genoms vor Mutationen. Soweit Informationen verfügbar waren, sind die einzelnen Schritte der NAD(P)<sup>+</sup>/H-Biosynthese in *Saccharomyces cerevisiae* ausführlich dargestellt. Basierend auf Literaturangaben wurde eine graphische Darstellung der Kompartimentierung der NAD(P)<sup>+</sup>/H-Biosynthese zwischen Zellkern, Cytosol und Mitochondrien mit ausführlichen Erklärungen erarbeitet. Zusätzlich wurden die verfügbaren Informationen über Regulationsmechanismen und Physiologie in einen graphischen Zusammenhang gebracht und eingehend erläutert.

Im Rahmen der experimentellen Untersuchungen zur Anreicherung von NAD<sup>+</sup>/H und NADP<sup>+</sup>/H konnten Hinweise auf eine Impermeabilität der Plasmamembran für NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup> gefunden werden. Des Weiteren deuten die gesammelten Daten auf eine mögliche *in vivo* Inhibierung der Aktivität einer NaMN-/NMN-Adenylyl-Transferase oder deren Expression durch Nicotinsäure (und deren Derivate Nicotinamid oder Chinolinsäure) hin. Generell ist zu erkennen, dass durch Vorlage von NAD<sup>+</sup>/H-Vorstufen diese an den entsprechenden Stellen in die Biosynthese eingespeist werden und zu einer Akkumulation von NAD<sup>+</sup>/H führen können. Dies grenzt NAD<sup>+</sup>/H deutlich von NADP<sup>+</sup>/H ab.

Während aerober Zulaufkultivierungen im 3 L Labormaßstab mit Glucose und Hefeextrakt als Kohlenstoffquelle ist zu beobachten, dass die intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H- und NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen im Verlauf der Kultivierung Änderungen unterliegen können. Der Verlauf der NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration kann in Verbindung mit dem Zellwachstum gesehen werden. Es gibt Hinweise auf eine maximal erreichbare intrazelluläre Konzentration von 0,06 mM. Der Verlauf der NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration kann mit der Art und Konzentration der verwerteten Kohlenstoffquelle korreliert werden. Entsprechend der sequentiellen Verstoffwechslung von Glucose, gefolgt von Ethanol und Glycerin und zuletzt Acetat nimmt die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration von über 1 mM bis auf Werte unter 0,1 mM ab. Möglicherweise kann eine abnehmende NADH-Ausbeute bei der sequentiellen Veratmung dieser Kohlenstoffquellen eine Ursache für den Rückgang der intrazellulären NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration sein.



**Abbildung 8.1:** Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (offene Quadrate) und der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration (schwarze Balken) in einem entwickelten Zulaufprozess zur Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H in *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 im Vergleich zu einem Referenzprozess (graue Balken). Die Akkumulation von NADP<sup>+</sup>/H beruht auf der konstanten Zudosierung von Adenin mit der Zulauflösung.

Aus den umfangreichen Voruntersuchungen wurden drei Strategien zur Anreicherung von NAD<sup>+</sup>/H und zwei Strategien zur Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H erarbeitet und überprüft. In beiden Fällen werden Zulaufverfahren mit konstantem Zulauf favorisiert. Zur Anreicherung von NAD<sup>+</sup>/H erfolgt eine kontinuierliche Zudosierung von Adenin und Nicotinsäure mit der Zulauflösung. Mit dieser Art der Prozessführung können nach 21 Stunden intrazelluläre NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration von über 1,0 mM erzielt werden, was einer Steigerung um den Faktor 10 im Vergleich zum Referenzansatz nach 20 Stunden (0,1 mM NAD<sup>+</sup>/H) entspricht.

Zur Anreicherung von NADP<sup>+</sup>/H eignet sich ein Verfahren mit Adenin-haltigem Zulauf. Nach 19 Stunden steigt die intrazelluläre NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration bis auf Werte von 0,25 mM an (siehe Abbildung 8.1). In dem Referenzlauf liegen die intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentrationen bei maximal 0,06 mM. Mit dieser Art der Prozessführung wird eine Steigerung der intrazellulären NADP<sup>+</sup>/H-Konzentration um mehr als den Faktor 4 erzielt.

---

Bei der Verwendung  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -angereicherter *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 Zellen zur Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE wird mit steigender intrazellulärer  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentration erwartungsgemäß mehr R-CHBE gebildet, was eine Reduzierung des Enantiomerenüberschusses bedeutet. Werden  $\text{NADP}^+/\text{H}$ -angereicherte *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 Zellen verwendet, wird deutlich, dass von 0,02 mM  $\text{NADP}^+/\text{H}$  zu einer Sättigungskonzentration von 0,07 mM  $\text{NADP}^+/\text{H}$  in den Biokatalysatoren die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit um 25 % gesteigert werden kann.

Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die Enantiomerenreinheit von den intrazellulären Coenzym-Konzentrationen abhängt. Methoden zur Beeinflussung der Coenzym-Konzentrationen wurden erarbeitet. Zur Reduzierung von Nebenreaktionen wäre zu untersuchen, wie das Konzentrationsverhältnis der Coenzyme  $\text{NAD}^+/\text{H}$  und  $\text{NADP}^+/\text{H}$  entsprechend zu optimieren ist.

## 9 Literaturverzeichnis

**Ahmad F und Moat AG.** 1965. Nicotinic Acid Biosynthesis in Prototrophs and Certain Yeast Auxotrophs. *Federation Proc.* **24**: 480

**Ahmad F und Moat AG.** 1966. Nicotinic Acid Biosynthesis in Prototrophs and Tryptophan Auxotrophs of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **241(4)**: 775 - 780

**Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K und Walter P.** 1999. Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. Wiley-VCH. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto

**Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O und Sinclair DA.** 2003. Nicotinamide and *PNC1* govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **423**: 181 - 185

**Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Cohen H, Lin SS, Manchester JK, Gordon JI und Sinclair DA.** 2002. Manipulation of a Nuclear NAD<sup>+</sup> Salvage Pathway Delays Aging without Altering Steady-state NAD<sup>+</sup> Levels. *J. Biol. Chem.* **277(21)**: 18881 - 18890

**Apps DK.** 1970. The NAD Kinases of *Saccaromyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **13**: 223 - 230

**Bakker BM, Overkamp KM, van Maris AJA, Kötter P, Luttik MAH, van Dijken JP und Pronk JT.** 2001. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 15 - 37

**Bandlow W.** 1972. Membrane separation and biogenesis of the outer membrane of yeast mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* **282**: 105 - 122

---

**Barry K, Stiles JI, Pietras DF, Melnick L und Sherman F.** 1987. Physical Analysis of the COR Region: a Cluster of Six Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **7(2)**: 632 - 638

**Bedalov A, Hirao M, Posakony J, Nelson M und Simon JA.** 2003. NAD<sup>+</sup>-Dependent Deacetylase Hst1p Controls Biosynthesis and Cellular NAD<sup>+</sup> Levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **23(19)**: 7044 - 7054

**Belenky P, Racette FG, Bogan KL, McClure JM, Smith JS und Brenner C.** 2007. Nicotinamide Riboside Promotes Sir2 Silencing and Extends Lifespan via Nrk and Urh1/Pnp1/Meu1 Pathways to NAD<sup>+</sup>. *Cell* **129**: 473 - 484

**Bernofsky C.** 1969. Synthesis of pyridine nucleotides in yeast. *FEBS Letters* **4(3)**: 167 - 169

**Bernofsky C und Utter MF.** 1968. Interconversions of Mitochondrial Pyridine Nucleotides. *Science* **159**: 1362 - 1363

**Bertau M und Bürli M.** 2000. Enantioselective Microbial Reduction with Baker's Yeast on an Industrial Scale. *Chimia* **54**: 503 - 507

**Bieganowski P und Brenner C.** 2004. Discoveries of Nicotinamide Riboside as a Nutrient and Conserved *NRK* Genes Establishing a Preiss-Handler Independent Route to NAD<sup>+</sup> in Fungi and Humans. *Cell* **117**: 495 - 502

**Bieganowski P, Pace HC und Brenner C.** 2003. Eukaryotic NAD<sup>+</sup> Synthetase Qns1 Contains an Essential, Obligate Intramolecular Thiol Glutamine Amidotransferase Domain Related to Nitrilase. *J. Biol. Chem.* **278(35)**: 33049 - 330055

**Bieganowski P, Seidle HF, Wojcik M und Brenner C.** 2006. Synthetic Lethal and Biochemical Analyses of NAD and NADH Kinases in *Saccharomyces cerevisiae* Establish Separation of Cellular Functions. *J. Biol. Chem.* **281(32)**: 22439 - 22445

**Bode R und Birnbaum D.** 1979. Vorkommen und Verteilung multipler Formen der Formamidase bei verschiedenen Hefen. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* **19(3)**: 221 - 222

**Brommarius AS und Riebel BR.** 2004. Biocatalysis. Fundamentals and Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

**Bruinenberg PM, van Dijken JP und Scheffers WA.** 1983. A Theoretical Analysis of NADPH Production and Consumption in Yeasts. *Journal of General Microbiology* **129**: 953 - 964

**Buchner E.** 1907. Cell-free fermentation. In: Noble Lectures. Chemistry 1901 - 1921. Elsevier Publishing Company. Amsterdam. 1966

**Chappie JS, Cànaves JM, Han GW, Rife CL, Xu Q und Stevens RC.** 2005. The Structure of a Eukaryotic Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase Reveals Structural Homogeneity among Type II PRTases. *Structure* **13**: 1385 - 1396

**Chenault HK und Whitesides GM.** 1987. Regeneration of Nicotinamide Cofactors for use in Organic Synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **14**: 147 - 197

**Collinge MA und Althaus FR.** 1994. Expression of human poly(ADP-ribose) polymerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **245**: 686 - 693

**Dahmen W, Webb B und Preiss J.** 1967. The Deamido-Diphosphopyridin Nucleotide and Diphosphopyridin Nucleotide Pyrophosphorylase of *Escherichia coli* and Yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **120**: 440 - 450

**Emanuelli M, Amici A, Carnevali F, Pierella F, Raffaelli N und Magni G.** 2003. Identification and characterisation of a second NMN adenylyltransferase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification* **27**: 357 - 364

---

**Emanuelli M, Carnevali F, Lorenzi M, Raffaelli N, Amici A, Ruggieri S und Magni G.** 1999. Identification and characterization of YLR328W, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding NMN adenylyltransferase. Expression and characterizing of the recombinant enzyme. *FEBS Letters* **455**: 13 - 17

**Engelking H.** 2004. Reaktionstechnische Untersuchungen zur asymmetrischen Reduktion von  $\beta$ -Ketoestern mit rekombinanten Hefen. Dissertation. TU München

**Engelking H.** 2006. Mündliche Mitteilung

**Engelking H, Pfaller R, Wich G und Weuster-Botz D.** 2006. Reaction engineering studies on  $\beta$ -ketoester reductions with whole cells of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* **38**: 536 - 544

**Epel D, Patton C, Wallace RW und Cheung WY.** 1981. Calmodulin Activates NAD Kinase of Sea Urchin Eggs: an Early Event of Fertilization. *Cell* **23**: 543 - 549

**Faraone-Mennella MR, De Maio A, Petrelle A, Syntichaki E, Kerbalaeva AM, Nasmetova SM, Goulyamova TG und Farina B.** 2005. Yeast (ADPribosyl)ation: Revisiting a Controversial Question. *Journal of Cellular Biochemistry* **94**: 1258 - 1266

**Flores C-L, Rodríguez C, Petit T und Gancedo C.** 2000. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 507 - 529

**Garavaglia S, Galizzi A und Rizzi M.** 2003. Allosteric Regulation of *Bacillus subtilis* NAD Kinase by Quinolinic Acid. *J. Bacteriol.* **185(6)**: 4844 - 4850

**Ghislain M, Talla E und François JM.** 2002. Identification and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* nicotinamidase gene, *PNC1*. *Yeast* **19**: 215 - 224

**Gholson RK, Tritz GJ, Matney TS und Andreoli AJ.** 1969. Mode of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Utilization by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **99(3)**: 895 - 896

**Griffin DR, Gainer JL und Carta G.** 2001. Asymmetric Ketone Reduction with Immobilized Yeast in Hexane: Biocatalyst Deactivation and Regeneration. *Biotechnol. Prog.* **17**: 304 - 310

**Griffiths MM und Bernofsky C.** 1970a. Synthesis of triphosphopyridine nucleotide in yeast mitochondria. *Federation Proc.* **29**: 344

**Griffiths MM und Bernofsky C.** 1970b. Activation of mitochondrial DPN kinase from yeast. *FEBS Letters* **10(2)**: 97 - 100

**Griffiths MM und Bernofsky C.** 1972. Purification and Properties of Reduced Diphosphopyridine Nucleotide Kinase from Yeast Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **247(5)**: 1473 - 1478

**Gulyamova TG, Ruzieva DM, Nasmetova SM, Shakirzyanova MR und Kerbalaeva AM.** 2001. Metabolism of NAD<sup>+</sup> in Nuclei of *Saccharomyces cerevisiae* during Stimulation of Its Biosynthesis by Nicotinamide. *Biochemistry (Moscow)* **66(9)**: 979 - 981

**Hanna LS, Hess SL und Sloan DL.** 1983. Kinetic Analysis of Nicotinate Phosphoribosyltransferase from Yeast Using High Pressure Liquid Chromatography. *J. Biol. Chem.* **258(16)**: 9745 - 9754

**Harden A.** 1930. The function of phosphate in alcoholic fermentation. In: Noble Lectures. Chemistry 1922 - 1941. Elsevier Publishing Company. Amsterdam. 1966

**Heilmann HD und Lingens F.** 1968a. Reinigung und Eigenschaften der 3-Hydroxy-anthranilat-Oxygenase aus *Saccharomyces cerevisiae*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **349**: 223 - 230

**Heilmann HD und Lingens F.** 1968b. Zur Regelung der Nicotinsäure-Biosynthese in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **349**: 231 - 236

- 
- Hillyard D, Rechsteiner M, Manlapaz-Ramos P, Imperial JS, Cruz LJ und Olivera BM.** 1981. The Pyridine Nucleotide Cycle – Studies in *Escherichia coli* and the human cell line D98/AH2. *J Biol. Chem.* **256(16)**: 8491 - 8497
- Honjo T, Nakamura S, Nishizuka Y und Hayaishi O.** 1966. Stoichiometric utilization of adenosine 5'-triphosphate in nicotinate ribonucleotide synthesis from nicotinate and 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **25(2)**: 199 - 204
- Huh W-K, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS und O'Shea EK.** 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**: 686 - 691
- Hummel W und Kula M-R.** 1989. Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Eur. J. Biochem.* **184**: 1 - 13
- Iwahashi Y, Hitoshio A, Tajima N und Nakamura T.** 1989. Characterization of NADH Kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* **105**: 588 - 593
- Iwahashi Y und Nakamura T.** 1989. Localization of the NADH Kinase in the Inner Membrane of Yeast Mitochondria. *J. Biochem.* **105**: 916 - 921
- Iwamoto Y, Lee ISM, Tsubaki M und Kido R.** 1995. Tryptophan 2,3-dioxygenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* **41**: 19 - 26
- Kawai S, Suzuki S, Mori S und Murata K.** 2001. Molecular cloning and identification of *UTR1* of a yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a gene encoding an NAD kinase. *FEMS Microbiology Letters* **200**: 181 - 184
- Khalmuradov AG, Gulymova TG, Shakirzyanova MR und Kerbalaeva AM.** 1996. NAD-metabolizing Ability in *Saccharomyces cerevisiae* Mutants. *Microbiology (Moscow)* **65(3)**: 302 - 304

**Klebl F, Zillig M und Sauer N.** 2000. Transcription of the yeast *TNAI* gene is not only regulated by nicotinate but also by *p*-aminobenzoate. *FEBS Letters* **481**: 86 - 87

**Kornberg A.** 1948. The participation of inorganic phosphate in the reversible enzymatic synthesis of diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.* **176**: 1474 - 1476

**Kornberg A.** 1950a. Reversible enzymatic synthesis of diphosphopyridine nucleotide and inorganic pyrophosphate. *J. Biol. Chem.* **182**: 779 - 793

**Kornberg A.** 1950b. Enzymatic synthesis of triphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.* **182**: 805 - 813

**Kornberg A und Pricer WE jr.** 1950. On the Structure of Triphosphopyridine Nucleotide. *J. Biol. Chem.* **186**: 557 - 567

**Kosaka A, Spivey HO und Gholson RK.** 1971. Nicotinate Phosphoribosyltransferase of Yeast - Purification and Properties. *The Journal of Biological Chemistry* **246(10)**: 3277 - 3283

**Kosaka A, Spivey HO und Gholson RK.** 1977. Yeast Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase. Studies of Reaction Paths, Phosphoenzyme, and  $Mg^{2+}$  Effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **179**: 334 - 341

**Kradolfer P, Niederberger P und Hütter R.** 1982. Tryptophan Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*: Characterization of Two Aromatic Aminotransferases. *Arch. Microbiol.* **133**: 242 - 248

**Krems B, Charizanis C und Entian K-D.** 1995. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* sensitive to oxidative and osmotic stress. *Curr. Genet.* **27**: 427 - 434

**Kucharczyk R, Zagulski M, Rytka J und Herbert CJ.** 1998. The yeast gene *YJR025c* encodes a 3-hydroxyanthranilic acid dioxygenase and is involved in nicotinic acid biosynthesis. *FEBS Letters* **424**: 127 - 130

---

**Leistner E und Breckle SW.** 2000. Pharmazeutische Biologie – Grundlagen und Systematik. Pharmazeutische Biologie, Band 1. 6. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

**Lesuisse E, Casteras-Simon M und Labbe P.** 1996. Evidence for the *Saccharomyces cerevisiae* Ferrireductase System Being a Multicomponent Electron Transport Chain. *J. Biol. Chem.* **271(23)**: 13578 - 13583

**Li X, Gou M, Fan J, Tang W, Wang D, Ge H, Rong H, Teng M, Niu L, Liu Q und Hao Q.** 2006. Crystal structure of 3-hydroxyanthranilic acid 3,4-dioxygenase from *Saccharomyces cerevisiae*: A special subgroup of the type III extradiol dioxygenases. *Protein Science* **15**: 761 - 773

**Li YF und Shi F.** 2006. Partial Rescue of *pos5* Mutants by *YEF1* und *UTR1* Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **38(5)**: 293 - 298

**Lingens F und Heilmann HD.** 1967. Nachweis von 3-Hydroxyanthranilsäure-Oxygenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Naturwissenschaften* **54(14)**: 369

**Llorente B und Dujon B.** 2000. Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *DAL5* gene family and identification of the high affinity nicotinic acid permease *TNA1* (*YGR260w*). *FEBS Letters* **475**: 237 - 241

**Löffler G und Petrides PE** (Hrsg.). 2003. Biochemie und Pathobiochemie. 7. Auflage. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York

**Lynen F.** 1969. Yeast Fatty Acid Synthase. *Methods in Enzymology* **14**: 17 - 33

**Lynen F, Hopper-Kessel I und Eggerer H.** 1964. Zur Biosynthese von Fettsäuren. III. Die Fettsäuresynthetase der Hefe und die Bildung enzymgebundener Acetessigsäure. *Biochemische Zeitschrift* **340**: 95 - 124

**Michal G** (Hrsg.). 1999. Biochemical Pathways. Biochemie-Atlas. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin

**Miozzari G, Niederberger P und Hütter R.** 1978. Tryptophan Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Control of the Flux Through the Pathway. *Journal of Bacteriology* **134(1)**: 48 - 59

**Moore GP und Sullivan DT.** 1975. The characterization of multiple forms of kynurenine formidase in *Drosophila melanogaster*. *Biochimica et Biophysica Acta* **397**: 468 - 477

**Murata K, Tani K, Kato J und Chibata I.** 1981. Glycolytic Pathway as an ATP generation system and its application to the production of glutathione and NADP. *Enzyme Microb. Technol.* **3**: 233 - 242

**Nakamura S, Nishizuka Y und Hayaishi O.** 1964. Regulation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Biosynthesis by Adenosine Triphosphate. *J. Biol. Chem.* **239(8)**: PC2717 - PC2719

**Natalini P, Ruggieri S, Raffaelli N und Magni G.** 1986. Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase. Molecular and Enzymatic Properties of the Homogeneous Enzyme from Baker's Yeast. *Biochemistry* **25**: 3725 - 3729

**Ogasawara N und Gholson RK.** 1966. The non-identity of yeast nicotinic acid mononucleotide pyrophosphorylase and nicotinic acid mononucleotidase. *Biochim. Biophys. Acta* **118**: 422 - 424

**Oka Y.** 1954. Studies of hydrolytic enzyme of nicotinamide. I. Nicotinamidase of beer yeast. *The Journal of Biochemistry* **41(1)**: 89 - 99

**Oppenheimer NJ.** 1994. NAD hydrolysis: Chemical and enzymatic mechanisms. *Molecular and Cellular Biochemistry* **138**: 245 - 251

---

**Outten CE und Culotta VC.** 2003. A novel NADH kinase is the mitochondrial source of NADPH in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* **22(9)**: 2015 - 2024

**Panozzo C, Navara M, Suski C, Kucharczyka R, Skoneczny M, Bécam AM, Rytka J und Herbert CJ.** 2002. Aerobic and anerobic NAD<sup>+</sup> metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **517**: 97 - 102

**Peters J.** 1998. Dehydrogenases – Characteristics, Design of Reaction Conditions, and Applications. Biotechnology Vol. 8a: Biotransformations I. Kelly DR (Editor). Wiley VCH

**Pfründer H.** 2005. Ganzzell-Biokatalyse in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Dissertation. TU München

**Preiss J und Handler P.** 1958a. Biosynthesis of Diphosphopyridine Nucleotide. I. Identification of Intermediates. *J. Biol. Chem.* **233(2)**: 488 - 492

**Preiss J und Handler P.** 1958b. Biosynthesis of Diphosphopyridine Nucleotide. II. Enzymatic Aspects. *J. Biol. Chem.* **233(2)**: 493 - 500

**Rehm H-J und Reed G.** 1993. Biotechnology. Second Edition. Volume 1. Biological Fundamentals. VCH. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo

**Reidl J, Schlör S, Kraiß A, Schmidt-Brauns J, Kemmer G und Soleva E.** 2000. NADP and NAD utilization in *Haemophilus influenzae*. *Molecular Microbiology* **35(6)**: 1573 - 1581

**Richard P.** 2003. The rhythm of yeast. *FEMS Microbiology Reviews* **27**: 547 - 557

**Richard P, Teusink B, Westerhoff HV und van Dam K.** 1993. Around the growth phase transition *S. cerevisiae*'s make-up favours sustained oscillations of intracellular metabolites. *FEBS Letters* **318**: 80 - 82

**Rose AH.** 1960. Excretion of Nicotinic Acid by Biotin-Deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **23**: 143 - 152

**Ruggieri S, Gregori L, Natalini P, Vita A und Magni G.** 1988. Recent observations on the structure and the properties of yeast NMN adenylyltransferase. *Experientia* **44**: 27 - 29

**Ruggieri S, Gregori L, Natalini P, Vita A, Emanuelli M, Raffaelli N und Magni G.** 1990. Evidence for an Inhibitory Effect Exerted by Yeast NMN Adenylyltransferase on Poly(ADP-ribose) Polymerase Activity. *Biochemistry* **29**: 2501 - 2506

**Sakai T, Uchida T und Chibata I.** 1973a. Production of Nicotinamide Adenine Dinucleotide by *Saccharomyces carlbergensis*. *Agr. Biol. Chem.* **37(5)**: 1041 - 1048

**Sakai T, Uchida T und Chibata I.** 1973b. Accumulation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide in Baker's Yeast by Secondary Culture. *Agr. Biol. Chem.* **37(5)**: 1049 - 1056

**Schlenk F und von Euler H.** 1936. Cozymase. *Naturwissenschaften* **24(50)**: 794 - 795

**Schott HH und Krause U.** 1979. Purification and Characterization of 3-Hydroxykynureninase from Yeast. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **360**: 481 - 488

**Schott HH und Staudinger H.** 1971. The Regulatory Function of L-Kynurenin 3-Hydroxylase (EC 1.14.1.2) for the Biosynthesis of Pyridin Nucleotides in Anaerobically and Aerobically Grown *Saccharomyces cerevisiae*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **352**: 1654 - 1658

**Shetty AS und Gaertner FH.** 1973. Distinct Kynureninase and Hydroxykynureninase Activities in Microorganisms: Occurrence and Properties of a Single Physiologically Discrete Enzyme in Yeast. *Journal of Bacteriology* **113(3)**: 1127 - 1133

**Shi F, Kawai S, Mori S, Kono E und Murata K.** 2005. Identification of ATP-NADH kinase isoenzymes and their contribution to supply of NADP(H) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Journal* **272**: 3337 - 3349

---

**Shianna KV, Marchuk DA und Strand MK.** 2006. Genomic characterization of *POS5*, the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial NADH kinase. *Mitochondrion* **6**: 99 - 106

**Shieh W-R, Gopalan AS und Sih CJ.** 1985. Stereochemical Control of Yeast Reductions. 5. Characterization of the Oxidoreductases Involved in the Reduction of  $\beta$ -Keto Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **107**: 2993 - 2994

**Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schönfish B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N und Meisinger C.** 2003. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100(23)**: 13207 - 13212

**Smith JS, Brachmann CB, Celic I, Kenna MA, Muhammad S, Starai VJ, Avalos JL, Escalante-Semerena JC, Grubmeyer C, Wolberger C und Boeke JD.** 2000. A phylogenetically conserved NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97(12)**: 6658 - 6663

**Strand MK, Staurt GR, Longley MJ, Graziewicz MA, Dominick OC und Copeland WC.** 2003. *POS5* Gene of *Saccharomyces cerevisiae* Encodes a Mitochondrial NADH Kinase Required for Stability of Mitochondrial DNA. *Eukaryotic Cell* **2(4)**: 809 - 820

**Suda Y, Tachikawa H, Yokota A, Nakanishi H, Yamashita N, Miura Y und Takahashi N.** 2003. *Saccharomyces cerevisiae* *QNS1* codes for NAD<sup>+</sup> synthetase that is functionally conserved in mammals. *Yeast* **20**: 995 - 1005

**Sundaram TK, Rajagopalan KV, Pichappa CV und Sarma PS.** 1960. Studies on Pyridin Nucleotide Synthesis. *Biochem. J.* **77**: 145 - 149

**Tanny JC, Dowd GJ, Huang J, Hilz H, Moazed D.** 1999. An Enzymatic Activity in the Yeast Sir2 Protein that Is Essential for Gene Silencing. *Cell* **99**: 735 - 745

**Ting HY, Jacobson EL und Jacobson MK.** 1977. Regulation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Levels in Yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **183**: 98 - 104

**Todisco S, Agrimi G, Castegna und Palmieri F.** 2006. Identification of the Mitochondrial NAD<sup>+</sup> Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **281(3)**: 1524 - 1531

**Tseng YM, Harris BG und Jacobson MK.** 1979. Isolation and characterization of yeast nicotinamide adenine dinucleotide kinase. *Biochimica et Biophysica Acta* **568**: 205 - 214

**Vestin R.** 1937. Enzymatische Umwandlung von Codehydrogenase I in Codehydrogenase II. *Naturwissenschaften* **25(41)**: 667 - 668

**von Euler H.** 1930. Fermentation of sugars and fermentative enzymes. In: Noble Lectures. Chemistry 1922 - 1941. Elsevier Publishing Company. Amsterdam. 1966

**von Euler H und Schlenk F.** 1937. Co-Zymase. *Hoppe Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **246**: 64 - 82

**von Euler H, Albers H und Schlenk F.** 1935. Über die Co-Zymase. *Hoppe Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **237**: I

**von Jagow G und Klingenberg M.** 1970. Pathways of Hydrogen in Mitochondria of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Eur. J. Biochem.* **12**: 583 - 592

**Warburg O, Christian W und Griese W.** 1935. Wasserstoffübertragendes Co-Ferment, seine Zusammensetzung und Wirkungsweise. *Biochemische Zeitschrift* **282**: 157 - 205

**Wenz P, Schwank S, Hoja U und Schüller H-J.** 2001. A downstream regulatory element located within the coding sequence mediates autoregulated expression of the yeast fatty acid synthase gene *FAS2* by the *FAS1* gene product. *Nucleic Acids Research* **29(22)**: 4625 - 4632

---

**Xu WL, Dunn CA und Bessman MJ.** 2000. Cloning and Characterization of the NADH Pyrophosphatases from *Caenorhabditis elegans* and *Saccharomyces cerevisiae*, Members of a Nudix Hydrolase Subfamily. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**: 753 - 758

**Yan C und Sloan DL.** 1987. Purification and Characterization of Nicotinamide Deamidase from Yeast. *J. Biol. Chem.* **262(19)**: 9082 - 9087

**Yu CK und Dietrich LS.** 1972. Purification and Properties of Yeast Nicotinamide Adenine Dinucleotide Synthetase. *J. Biol. Chem.* **247(15)**: 4794 - 4802

**Yuan Z, Müller SC und Hess B.** 1989. Oscillating enzyme-bound NADH in glycolysis. *FEBS Letters* **249(2)**: 159 - 162

**Zagulski M, Babinska B, Gromadka R, Migdalski A, Rytka J, Sulicka J und Herbert CJ.** 1995. The Sequence of 24,3 kb from Chromosome X Reveals Five Complete Open Reading Frames, all of which Correspond to New Genes, and a Tandem Insertion of a Tyl Transposon. *Yeast* **11**: 1179 - 1186

**Zelter A, Bencina M, Bowmann BJ, Yarden O und Read ND.** 2004. A comparative genomic analysis of the calcium signaling machinery in *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 827 - 841

## 10 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die eingesetzten Materialien und Methoden erläutert. In Kapitel 10.1 werden Mikroorganismus, Lösungen und Medien beschrieben, in Kapitel 10.2 wird die Durchführung erläutert und in Kapitel 10.3 werden die analytischen Methoden aufgelistet.

### 10.1 Mikroorganismus, Lösungen und Medien

In diesem Kapitel werden der eingesetzte Mikroorganismus sowie die Lösung- und Medienzusammensetzung erläutert.

#### 10.1.1 Mikroorganismus

Sofern nicht anders angegeben, wurde für sämtliche Versuche, die während dieser Arbeit durchgeführt wurden, der Mikroorganismus *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 verwendet.

Die rekombinante Hefe *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 ist ein *Saccharomyces cerevisiae* CM3260 Stamm, der konstitutiv die  $\beta$ -Untereinheit der zelleigenen Fettsäuresynthase (*FAS1*) (Wenz *et al.*, 2001) unter der Kontrolle des Promotors der Alkohol-Dehydrogenase (*ADHI*) überexprimiert (Engelking *et al.*, 2006). Aufgrund einer Autoregulation wird die  $\alpha$ -Untereinheit der Fettsäuresynthase (*FAS2*) ebenfalls überexprimiert (Wenz *et al.*, 2001). Die Fettsäuresynthase zeigt mit NADH als Coenzym ein Viertel der Aktivität im Vergleich zu NADPH (Lynen *et al.*, 1964). Zur Verbesserung der NADPH-Regenerierung wird zusätzlich die Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* unter der Kontrolle des Promotors der Phosphoglyceratkinase (*PGK*) überexprimiert. Durch die Transformation mit dem Bluescript Vektor erfolgt eine Integration beider Gene in das Hefegenom (Engelking *et al.*, 2006).

Die Stammhaltung erfolgte als Glycerinkulturen (29 % v/v Glycerin) bei -80 °C.

### 10.1.2 Lösungen

Alle Lösungen wurden, soweit nicht anders beschrieben, in voll entsalztem Wasser (VE-Wasser) angesetzt. Bis zu ihrer Verwendung wurden sie, sofern nicht anders angegeben, bei 4 °C gelagert.

#### *PBS-Puffer*

|   |                        |
|---|------------------------|
| NaCl  | 8 g L <sup>-1</sup>    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 0,2 g L <sup>-1</sup>  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O | 1,35 g L <sup>-1</sup> |

*pH* 6,5

Der *pH* wurde mit HCl eingestellt. Verwendet wurde der PBS-Puffer zur Bestimmung der optischen Dichte.

#### *Isoton*

NaCl 20 g L<sup>-1</sup> in Coulter® Isoton® II Diluent

Die Isoton-Lösung wurde zweimal filtriert, bei Raumtemperatur gelagert und zur Messung des anteiligen Zellvolumens mit dem Coulter Counter verwendet.

#### *Zellaufschlusspuffer*

|   |                         |
|---|-------------------------|
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O | 6,8 g L <sup>-1</sup>   |
| Glycerin (87 %)                                     | 57,5 mL L <sup>-1</sup> |
| EDTA  | 372 mg L <sup>-1</sup>  |

*pH* 7,4

Der *pH* wurde mit NaOH eingestellt. Der Zellaufschlusspuffer wurde beim mechanischen Aufschluss der Hefezellen zur Bestimmung der Aktivität der Fettsäuresynthase verwendet.

#### *Umsetzungspuffer*

|                                 |                          |
|---------------------------------|--------------------------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 10,713 g L <sup>-1</sup> |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 5,239 g L <sup>-1</sup>  |
| NaCl                            | 5,844 g L <sup>-1</sup>  |

*pH* 7

Nach dem Mischen wurde der *pH* kontrolliert. Dieser Puffer diene als wässrige Phase bei der Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE mit *S. cerevisiae* FasB His6.

#### *Messpuffer*

|                                 |                        |
|---------------------------------|------------------------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 2,3 g L <sup>-1</sup>  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 11,8 g L <sup>-1</sup> |

*pH* 6,0

Der *pH* wurde nach dem Mischen überprüft. Dieser Puffer wird zur Bestimmung der Aktivität der Fettsäuresynthase verwendet. Dazu wird direkt vor jeder Messung 4-Cl-ACE in dem Puffer gelöst. Für eine 50 mM Lösung werden 27 µL 4-Cl-ACE in 3973 µL Messpuffer unter kräftigem Rühren gelöst. Ebenfalls frisch vor jeder Messung wird eine 5 mM NADPH-Lösung in VE-Wasser angesetzt.

#### *Lösungsmittel*

Ethylacetat (getrocknet: reines Ethylacetat über K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Schicht)

#### *Extraktionsmittel*

36 mM Acetophenon in o. g. Lösungsmittel

Es werden 4,5 mL Acetophenon in 3995,5 mL getrocknetem Ethylacetat gelöst. Diese Lösung wurde bei -20 °C gelagert und diene gleichzeitig als interner Standard für die GC-Messung.

### 10.1.3 Medien

Alle Medien wurden in voll entsalztem Wasser (VE-Wasser) angesetzt. Für das sterile Arbeiten wurden die Medien autoklaviert (121 °C, 20 min). Glucoselösungen und komplexe Medienbestandteile wurden getrennt autoklaviert und nach dem Abkühlen unter sterilen Bedingungen vereinigt. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert (Rotilabo®-Spritzenfilter steril, 0,22 µm, Roth). Bis zu ihrer Verwendung wurden alle Medien bei 4 °C gelagert.

*Medium für Parallelansätze*

|                          |                      |
|--------------------------|----------------------|
| Hefeextrakt              | 10 g L <sup>-1</sup> |
| Pepton aus Casein        | 20 g L <sup>-1</sup> |
| Maisquellwasser          |                      |
| (Corn Steep Liquor, CSL) | 2% v/v               |
| Glucose Monohydrat       | 22 g L <sup>-1</sup> |

*pH 6,5**Vorkulturmedium für Kultivierungen im 3 L Labormaßstab*

|                          |                      |
|--------------------------|----------------------|
| Hefeextrakt              | 10 g L <sup>-1</sup> |
| Pepton aus Casein        | 20 g L <sup>-1</sup> |
| Maisquellwasser          |                      |
| (Corn Steep Liquor, CSL) | 2% v/v               |
| Glucose Monohydrat       | 33 g L <sup>-1</sup> |

*pH 6,5**Reaktormedium (CSL-Medium)*

|                          |                      |
|--------------------------|----------------------|
| Hefeextrakt              | 10 g L <sup>-1</sup> |
| Pepton aus Casein        | 20 g L <sup>-1</sup> |
| Maisquellwasser          |                      |
| (Corn Steep Liquor, CSL) | 2% v/v               |
| Glucose Monohydrat       | 11 g L <sup>-1</sup> |

*pH 5,9**Zulaufmedium*

|                    |                       |
|--------------------|-----------------------|
| Hefeextrakt        | 50 g L <sup>-1</sup>  |
| Glucose Monohydrat | 220 g L <sup>-1</sup> |

*Zulaufmedium mit Zusätzen*

|                    |                       |
|--------------------|-----------------------|
| Hefeextrakt        | 50 g L <sup>-1</sup>  |
| Glucose Monohydrat | 220 g L <sup>-1</sup> |
| Adenin             | 95 mM                 |
| Nicotinsäure       | 9,5 mM                |

### *Einmalige Zugaben*

Die Substanzen wurden als Konzentrate in VE-Wasser gelöst, entsprechend sterilisiert und über eine sterile 50 mL Spritze in den Reaktor eingebracht.

### *Reaktormedium MH<sub>20</sub>P<sub>20</sub>T*

Das Reaktormedium MH<sub>20</sub>P<sub>20</sub>T sowie die Zulauflösung sind Engelking (2004) zu entnehmen.

## **10.2 Durchführung**

Folgend wird die Durchführung der Experimente beschrieben.

### *Wechselwirkung zwischen intrazellulären und extrazellulären Coenzymen*

Die Mikroorganismen wurden 72 Stunden in Parallelansätzen angezogen, mit VE-Wasser gewaschen, pelletiert und in Umsetzungspuffer resuspendiert. Die Untersuchungen erfolgten jeweils in einem gerührten Becherglas bei Raumtemperatur. Einem von zwei Ansätzen wurde eine NAD<sup>+</sup>-Lösung zu einer Endkonzentration von ca. 250 µM zugegeben, dem anderen nur das entsprechende Volumen VE-Wasser. In definierten Zeitabständen wurden Proben genommen und, wie in Kapitel 10.3.5 beschrieben, aufgearbeitet.

### *NAD<sup>+</sup>-Anreicherung in ruhenden Zellen*

Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an Sakai *et al.* (1973b) mit handelsüblicher Bäckerhefe (Wieninger Hefe). Ein Liter Zellsuspension enthält eine Biotrockenmasse von ca. 140 - 150 g und 27,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Der *pH* ist 4,5. Adenin und Nicotinsäure werden zu 22,2 mM bzw. 50 mM eingesetzt. Dabei werden die Zusätze sauer aufgenommen und den entsprechenden Ansätzen als Lösung zugegeben. Jeweils 50 mL Zellsuspension werden in je einem 500 mL Schüttelkolben bei 30 °C für 72 h bei 140 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Die Ansätze werden ohne *pH*-Kontrolle durchgeführt. Die Probenaufarbeitung erfolgt wie in Kapitel 10.3.5 gegeben.

### *Inkubation im Phosphatpuffer*

Die Zellen werden nach 72 Stunden Kultivierung im Schüttelkolben geerntet, d. h. das Zellmaterial wird in einem 1 L Zentrifugenbecher gesammelt und für 30 Minuten bei 4 °C und 4500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und die Zellen in 50 mM Phosphatpuffer (*pH* 7) gewaschen. Der Überstand wird nach nochmaligem, dreißigminütigem Zentrifugieren verworfen. Abermaliges Resuspendieren in Phosphatpuffer und die anschließende Messung der optischen Dichte ermöglichen die Bestimmung der Zellkonzentration der Stammlösung. Für die im 4 mL Glasreaktor einzustellende Biotrockenmassekonzentration von 20 g L<sup>-1</sup> wird das erforderliche Volumen der resuspendierten Zellen ermittelt. Die Zellkonzentration im 4 mL Glasgefäß wurde stets konstant gehalten. Die Inkubationstemperatur lag bei 30 °C, das Gesamtvolumen im Glasreaktor bei 2 mL. Neben den Referenzansätzen in reinem Phosphatpuffer wurde die ATP-, NAD<sup>+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Konzentration variiert. ATP lag wie auch NAD<sup>+</sup> in den Konzentrationen 15 mM, 20 mM und 25 mM im Reaktionsgefäß vor. Mg<sup>2+</sup> lag hingegen bei 7,5 mM, 10 mM und 12,5 mM vor. Es wurde immer nur eine Komponente in ihrer Konzentration variiert, während die anderen Komponentenkonzentrationen konstant gehalten wurden. Mg<sup>2+</sup> wurde bei 10 mM konstant gehalten, ATP und NAD<sup>+</sup> hingegen bei 20 mM. Die Probenaufarbeitung erfolgt wie in Kapitel 10.3.5 gegeben.

### *Parallelkultivierungen im Schüttelkolben*

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zusätze wurden zu Beginn im Medium vorgelegt. Sie wurden als wässrige Lösung jeweils einzeln autoklaviert und neben der Glucoselösung dem Reaktionsmedium vor dem Animpfen zugegeben. Unerwünschte Interaktionen sollten damit vermieden werden. Die Kultivierung erfolgte in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen, die mit Alu-Kappen verschlossen wurden. Das Füllvolumen betrug 100 mL. Jeder Kolben wurde mit 50 µL einer aufgetauten Glycerinkultur angeimpft und bei 28 °C und 250 rpm in einem Schüttelinkubator 72 Stunden inkubiert. Die Probenaufarbeitung erfolgt wie in Kapitel 10.3.5 gegeben.

### *Animpfkulturen*

Für die Erstellung der Animpfkulturen wurde das CSL-Medium mit einem Impfösenabstrich von einer erhaltenen Kultur einer Agarplatte angeimpft. Nach 24 Stunden Inkubation im Schüttelkolben bei 28 °C und 250 rpm wurden 40 mL

Zellsuspension der sich in der exponentiellen Phase befindenden Zellen mit 20 mL sterilem Glycerin (87 % v/v) vermischt. Je 500  $\mu$ L der Suspension wurden in sterile 1,5 mL-Reaktionsgefäße gegeben. Die 29 % v/v Glycerin-Zellbank wurde bei -80 °C gelagert.

#### *Kultivierungen im Laborbioreaktor*

Die Kultivierungen wurden in einem Labfors® Bioreaktor der Firma HT INFORS (Bottmingen, Schweiz) mit 7 L Fassungsvermögen durchgeführt. Das Arbeitsvolumen betrug 3,0 L. Dieser Rührkesselreaktor wurde mit der Labfors® Steuereinheit verbunden. Die Begasung erfolgte über einen Gasverteiler, deren Austrittsöffnungen direkt unter der Rührwelle platziert wurden. Die Dispergierung und die Durchmischung erfolgte über drei Rushton 6-Blattrührer. Die Vermischung im Bioreaktor wurde von Strömungsbrechern unterstützt. Die Temperatur wurde über eine Mantelheizung geregelt. Messdaten wurden über eine pO<sub>2</sub>-Sonde, eine pH-Sonde und eine Temperatursonde aufgenommen. Zur Messung des pH wurde eine Gelelektrode (Schott Instruments, Mainz) eingesetzt, die vor dem Autoklavieren kalibriert wurde. Für die Erhaltung des eingestellten pH wurden über zwei Schlauchpumpen an der Steuereinheit je ein Gefäß mit 25 % v/v Ammoniaklösung bzw. 40 % v/v H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> angeschlossen. Antischaummittel (Struktol J673) wurde manuell über eine weitere Schlauchpumpe bei Bedarf zugegeben. Für die Messung des Sauerstoffpartialdruckes wurde eine amperometrisch arbeitende pO<sub>2</sub>-Sonde verwendet (Mettler-Toledo, Giessen). Kalibriert wurde die Sonde bei 30 °C und pH 5,9 in autoklaviertem Medium. Der Nullwert wurde durch Verdrängung des Sauerstoffs durch Stickstoff im Reaktor bestimmt, 100 % Sauerstoffsättigung wurden bei 1000 rpm und einer Begasung mit 6 L min<sup>-1</sup> Luft bestimmt. Weitere Einbauten waren eine Probenahmeverrichtung, ein Septum, ein Zulaufstutzen sowie eine mit Rückflusskühler versehene Abluftleitung mit nachgeschalteter Schaumfalle. Über eine Abgasanalytikeinheit (Advance SCC F, ABB Automaten, Frankfurt) wurden die Anteile an CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> in der Abluft bestimmt.

Die Messdaten und Regelparameter wurden in der Labfors® Steuereinheit zusammengefasst und mit Hilfe der Software IRIS NT PRO Balance Version 4.11 (INFORS, Bottmingen, Schweiz) auf der angeschlossenen Prozesskontrolle aufgezeichnet. Über diese kann auf die Prozessparameter und Zustandsgrößen des Labfors® Bioreaktorsystems zugegriffen werden.

### *Vorkulturen*

Für die Vorkulturen wurden drei 500 ml Schüttelkolben mit jeweils 100 ml CSL-Medium mit 250 µl *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 Glycerinkultur angeimpft. Diese wurden für ca. 24 h bei 30 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator (Multitron, HT Infors, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Zur Inokulation des Bioreaktors wurden die Zellen aus allen drei Schüttelkolben bei 4528 x g und 4 °C für 5 min abzentrifugiert (4500 rpm, Rotixa 50 RS, Hettich Zentrifugen, Bäch, Schweiz), in ca. 50 ml Überstand resuspendiert und in einer sterilen Einmalspritze (Terumo, Eschborn) aufgenommen.

### *Satzbetrieb*

Der Labfors® Bioreaktor wurde autoklaviert und mit 3 L sterilem CSL-Medium befüllt. Die Temperatur wurde auf 30 °C und der *pH* auf 5,9 eingestellt. Diese Bedingungen wurden während des gesamten Versuches konstant gehalten. Anschließend wurden die pO<sub>2</sub>-Sonde und die Abgasanalytik kalibriert. Der Versuch wurde mit einer Rührerdrehzahl von 400 rpm gestartet. Zur Regelung des pO<sub>2</sub> auf mindestens 60 % wurde die Drehzahl des Rührers entsprechend erhöht. Der Luftvolumenstrom wurde konstant auf 6 L min<sup>-1</sup> gehalten. Zum Animpfen wurden die in der Einmalspritze resuspendierten Zellen mit Hilfe einer Kanüle (Sterican, B. Braun, Melsungen) über ein Septum in den Bioreaktor gegeben. Die Probenahme erfolgte etwa im Abstand von 90 min. Die Probenaufarbeitung erfolgt wie in Kapitel 10.3.5 gegeben.

### *Zulaufbetrieb*

Nach 7,5 oder 8 Stunden Prozesszeit wurde der Zulaufbetrieb gestartet. Die Zulauflösung wurde mit einer konstanten Rate zudosiert, welche aus der Glucoseaufnahmerate gegen Ende der Satzphase bestimmt wurde. Die Zulauftrate betrug 37,3 mL h<sup>-1</sup> Zulaufmedium, was einer Glucosezudosierung von 8,2 g h<sup>-1</sup> bezogen auf 3 L Anfangsvolumen entsprach. Diese Einstellung wurde für alle Versuche beibehalten. Die Temperatur wurde weiterhin bei 30 °C, der *pH* bei 5,9 und der pO<sub>2</sub> bei 60 % konstant gehalten.

### *Probenahme und gemessene Größen*

Zur Probenahme bei der Kultivierung im Rührkesselreaktor wurden vor der Entnahme der eigentlichen Probe ca. 15 ml Kultur durch die Probenahmeverrichtung entnommen, um das Totvolumen in der Probenahmeverrichtung, das nicht dem aktuellen Zustand im

Kulturmedium entsprach, zu entfernen. Das Volumen der zu analysierenden Probe betrug ca. 8 ml. Die Proben wurden in 15 ml Falcon-Röhrchen (Nunc, Wiesbaden) genommen und nach der Entnahme sofort auf Eis gestellt, um die metabolischen Reaktionen abzustoppen. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Bevor ein Teil der Probe zur weiteren Verarbeitung entnommen wurde, wurde die Probe jedes Mal auf dem Reagenzglasschüttler (REAX top, Heidolph, Schwabach) gut durchmischt. Von der Probe wurden die optische Dichte, die Biotrockenmasse, die Glucosekonzentration, die Aktivität der Fettsäuresynthase, das anteilige Zellvolumen, die Konzentrationen der intrazellulären Metabolite und der extrazellulären Zusätze sowie möglicher Nebenprodukte bestimmt. Aus der kontinuierlichen Datenaufzeichnung waren weitere Größen wie  $pO_2$ , Rührerdrehzahl, Begasungsrate,  $pH$ , Säurezugabe, Basenzugabe,  $CO_2$ - und  $O_2$ -Konzentration in der Abluft und Temperatur zugänglich.

#### *Einmalige Zugaben*

Die einmaligen Zugaben wurden mittels einer Spritze über das Spetum in den Reaktor eingebracht.

#### *Wechsel der Zulauflösung*

Die Zulauflösung wurde gewechselt, indem der Zulauf kurz angehalten und die Vorlageflasche unter sterilen Bedingungen getauscht wurde. Wesentlich praktischer ist die Verbindung von zwei Vorlageflaschen über eine Y-Stück mit dem Reaktor. Durch Öffnen und Schließen einer Schlauchklemme kann die entsprechende Lösung gefördert werden.

#### *RQ-gesteuerter Prozess*

Die Steuerung des RQ erfolgte über die stufenweise Erhöhung der Zulauftrate. Aufgrund der unbekanntenen Trägheit des Systems wurden Parameter gewählt, die ein Absinken des RQ unter eins verhindern sollten. Als unterer Grenzwert wurde ein RQ von 1,3 vorgegeben, die Zulauftrate sollte bei Bedarf um 80 % gesteigert werden. Nach jeder Erhöhung der Zulauftrate war ein zehnminütiges Intervall vorgesehen, in dem kein Soll-Ist-Abgleich stattfand, um sich möglicherweise überlagernde Effekte zu erkennen.

### *Biotransformation*

Für die bei der Biotransformation eingesetzte Zellstammlösung wurde das bei der zusätzlichen Probenahme gewonnene Pellet einmal mit Umsetzungspuffer gewaschen und anschließend in etwa 30 % v/v Umsetzungspuffer resuspendiert. Von dem erhaltenen Konzentrat wurde die optische Dichte bestimmt. Mit dem erhaltenen Wert wurde für das jeweilige Pipettierschema das Volumen an Zellkonzentrat bestimmt, um die vorgegebene Biotrockenmassekonzentration einzustellen.

Die Biotransformation erfolgte in 4 mL bzw. 20 mL Glaszylindern mit einem Füllvolumen von 2 bzw. 3 mL. Die Zellkonzentration wurde, wenn nicht anders angegeben, zu  $10 \text{ g L}^{-1}$  eingestellt. Neben der Zellstammlösung wurden Glucose zu 100 mM und 4-Cl-ACE als Substrat (Gilson-Microman) zu 19,6 mM vorgelegt. Mit Umsetzungspuffer wurde auf 2 bzw. 3 mL aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates gestartet.

Die Reaktionsgefäße wurden während der Biotransformation gasdicht verschlossen. Auf der Magnetrührplatte wurden bis zu 15 Ansätze im Parallelansatz unter gleichmäßigem Rühren mit 300 rpm bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionszeit betrug, wenn nicht anders angegeben, 13 Stunden. Die Probenaufarbeitung erfolgt wie in Kapitel 10.3.9 beschrieben.

### *Biotransformation mit Coenzymzugabe*

In 3000  $\mu\text{L}$  wurden folgende Konzentrationen eingestellt: frische Zellen  $10 \text{ g L}^{-1}$ , 4-Cl-ACE 19,6 mM, Glucose 100 mM,  $\text{NAD}^+$  oder  $\text{NADP}^+$  100  $\mu\text{M}$ . Die Ansätze wurden für 20 Stunden bei Raumtemperatur und 300 rpm inkubiert. Die Probenaufarbeitung erfolgt wie in Kapitel 10.3.9 gegeben.

## **10.3 Analytische Methoden**

Die analytischen Methoden werden in diesem Kapitel dargestellt.

### **10.3.1 Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse**

Zur gravimetrischen Bestimmung der Biotrockenmasse wurde 1 mL der Probe in ein ausgewogenes 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und bei  $7516 \times \text{g}$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 5 min abzentrifugiert (9000 rpm, Heraeus® Biofuge® stratos, Kendro, Langenselbold). Der

Überstand wurde verworfen und das Pellet bis zur Gewichtskonstanz bei 80 °C getrocknet und ausgewogen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

### 10.3.2 Bestimmung der Optischen Dichte

Die optische Dichte wurde direkt nach der Probenahme bei 600 nm im Vis Spectrophotometer (Genesys 20, ThermoSpectronic) in 1,5 mL Einmalküvetten aus PMMA (Roth, Karlsruhe) bestimmt. Der Nullabgleich erfolgte mit PBS-Puffer. Zu jeder Messung wurden die Proben so verdünnt, dass der Messwert innerhalb des Linearitätsbereichs zwischen 0,030 und 0,300 liegt.

### 10.3.3 Bestimmung des anteiligen Zellvolumens mittels Coulter Counter

Zur Bestimmung des anteiligen Zellvolumens am Gesamtprobevolumen wurden die Proben mit Isotonlösung in den Messbereich des Coulter Counters (Coulter® Multisizer™ II, Beckman Coulter, Krefeld) verdünnt. Zu jeder Messung wurden 50 µL der entsprechend verdünnten Zellsuspension in 10 mL Isoton in einem Becher gleichmäßig suspendiert und in den Messstand gebracht. Der Nullabgleich erfolgte nur mit Isoton. Die Messung der Anzahl und der Größe der Partikel beruht auf dem gleichmäßigen Durchfluss einer Partikelsuspension durch zwei großflächige Platinelektroden. Passiert eine Zelle die Öffnung zwischen den Elektroden, verändert sich der Widerstand und dadurch die angelegte Spannung. Aus Anzahl und Größe der Partikel lässt sich das Zellvolumen pro Kulturvolumen berechnen. In die Berechnung einbezogen wurden alle gemessenen Partikel zwischen 2,5 und 9 µm Durchmesser. Verwendet wurde für die Messung und Berechnung die Software Coulter® Multisizer AccuComp® Version 3.01a (Beckman Coulter, Krefeld).

### 10.3.4 Bestimmung der Glucosekonzentration

Die Glucosekonzentration wurde direkt nach der Probenahme durch Glucosemessstreifen (AccuChek®, Roche Diagnostics, Mannheim) bestimmt. Zur Verdünnung in den Messbereich zwischen 0,06 und 6 g L<sup>-1</sup> wurde VE-Wasser benutzt.

### **10.3.5 Probenaufarbeitung und Zellaufschluss**

Für die Bestimmung intra- und extrazellulärer Metabolite, Nebenprodukte und Zusätze wurden 1,5 ml (OD600 > 10) bzw. 3 ml (OD600 < 10) der Probe für 5 min bei 7516 x g und 4 °C abzentrifugiert (9000 rpm, Heraeus® Biofuge® stratos, Kendro, Langenselbold). Für die Bestimmung extrazellulärer Nebenprodukte und Zusätze wurden 750 µl Überstand entnommen und bei 20 °C tiefgefroren. Der restliche Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 750 µl eisgekühltem VE-Wasser gewaschen und nochmals bei 7516 x g und 4 °C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren.

Für die Bestimmung der intrazellulären Metabolite wurden die Zellpellets aufgetaut und thermisch aufgeschlossen. Dazu wurden jeweils 250 µl VE-Wasser zugegeben und die Pellets resuspendiert. Die Reaktionsgefäße wurden für 5 min bei 85 °C und 1000 rpm in den Thermomixer gestellt (Thermomixer, Comfort, Eppendorf, Hamburg). Nach dem Zellaufschluss wurden sie auf Eis abgekühlt. Nachdem der Dampf des Kopfraumes kondensiert war, wurden die Proben gut gemischt und anschließend die Zelltrümmer bei 50377 x g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert (23300 rpm, Heraeus® Biofuge® stratos, Kendro, Langenselbold). Der Überstand wurde abgenommen und dabei das Volumen bestimmt. Da die Volumina der Überstände, in denen nun die intrazellulären Metabolite gelöst waren, bei den verschiedenen Proben etwas variierten, ließ sich so nach der Messung in Kombination mit dem am Coulter Counter bestimmten Zellvolumenanteil die genaue intrazelluläre Konzentration der Metabolite berechnen.

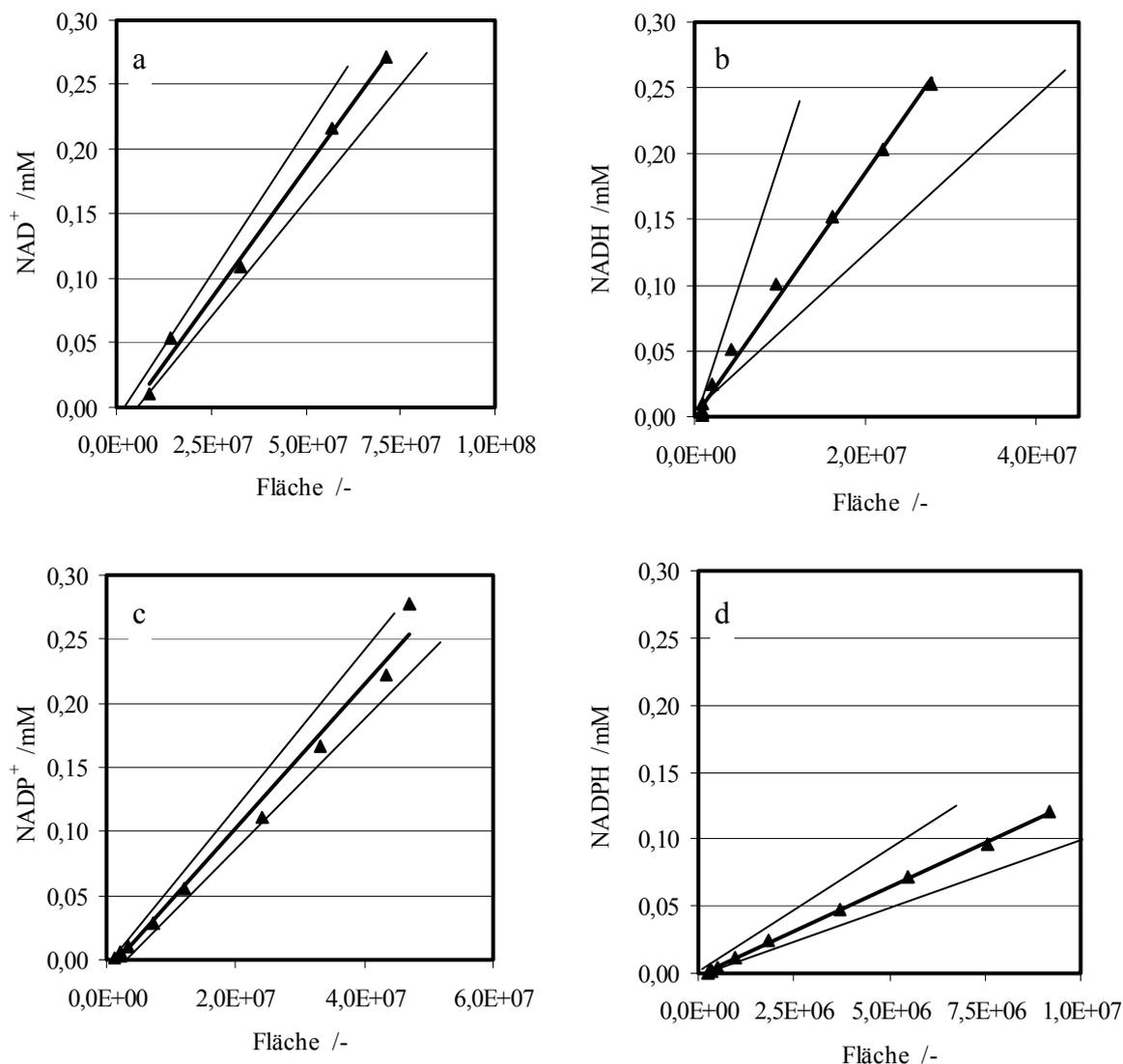
Für die Konzentrationsbestimmung der Zusätze und Nebenprodukte im Überstand wurden die eingefrorenen Überstände der Proben aufgetaut und bei 50377 x g bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert (23300 rpm, Heraeus® Biofuge® stratos, Kendro, Langenselbold), um eventuelle kleine Zell- oder Medienpartikel zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen, in ein frisches Probengefäß überführt, welches zur Analyse verwendet wurde.

### 10.3.6 Bestimmung intrazellulärer Metabolite und extrazellulärer Zusätze mittels HPLC/MS

Mittels HPLC/MS (High Performance Liquid Chromatography, Mass Spectrometry) wurden die Konzentrationen folgender, intrazellulärer Metabolite bestimmt:  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{NADPH}$ ,  $\text{NaMN}$ ,  $\text{NaAD}$ ,  $\text{AMP}$ ,  $\text{ADP}$ ,  $\text{ATP}$ ,  $\text{ADP-Ribose}$ ,  $\text{Qa}$  und  $\text{Kyn}$ . Außerdem folgender Zusätze: Adenin, Chinolinsäure und Nicotinsäure. Verwendet wurde ein HPLC-Gerät der Firma Thermo Finnigan mit dem Massenspektrometer MS LCQ Advantage. Für die vorgeschaltete HPLC wurde die Aquasil C18 Säule der Firma ThermoHypersil (Kleinostheim) eingesetzt. Als Laufmittel wurden VE-Wasser (Laufmittel A) und 80 % v/v Methanol in VE-Wasser (Laufmittel B) verwendet. Als Detektor kam zusätzlich ein UV/Vis Detektor zum Einsatz.

|                       |                                 |        |         |
|-----------------------|---------------------------------|--------|---------|
| Injektionsvolumen:    | 20 $\mu\text{L}$ (push loop)    |        |         |
| Flussrate:            | 0,5 $\text{mL min}^{-1}$        |        |         |
| Temperatur der Säule: | 35 $^{\circ}\text{C}$           |        |         |
| Laufmittelgradient:   | 0 min                           | 98 % A | 0 % B   |
|                       | 20 min                          | 98 % A | 2 % B   |
|                       | 30 min                          | 0 % A  | 100 % B |
|                       | 40 min                          | 0 % A  | 100 % B |
|                       | 50 min                          | 98 % A | 2 % B   |
| Messbereich UV/Vis:   | 190 - 800 nm                    |        |         |
| Messbereich MS:       | 50 - 850 $m/z$ (negative Ionen) |        |         |

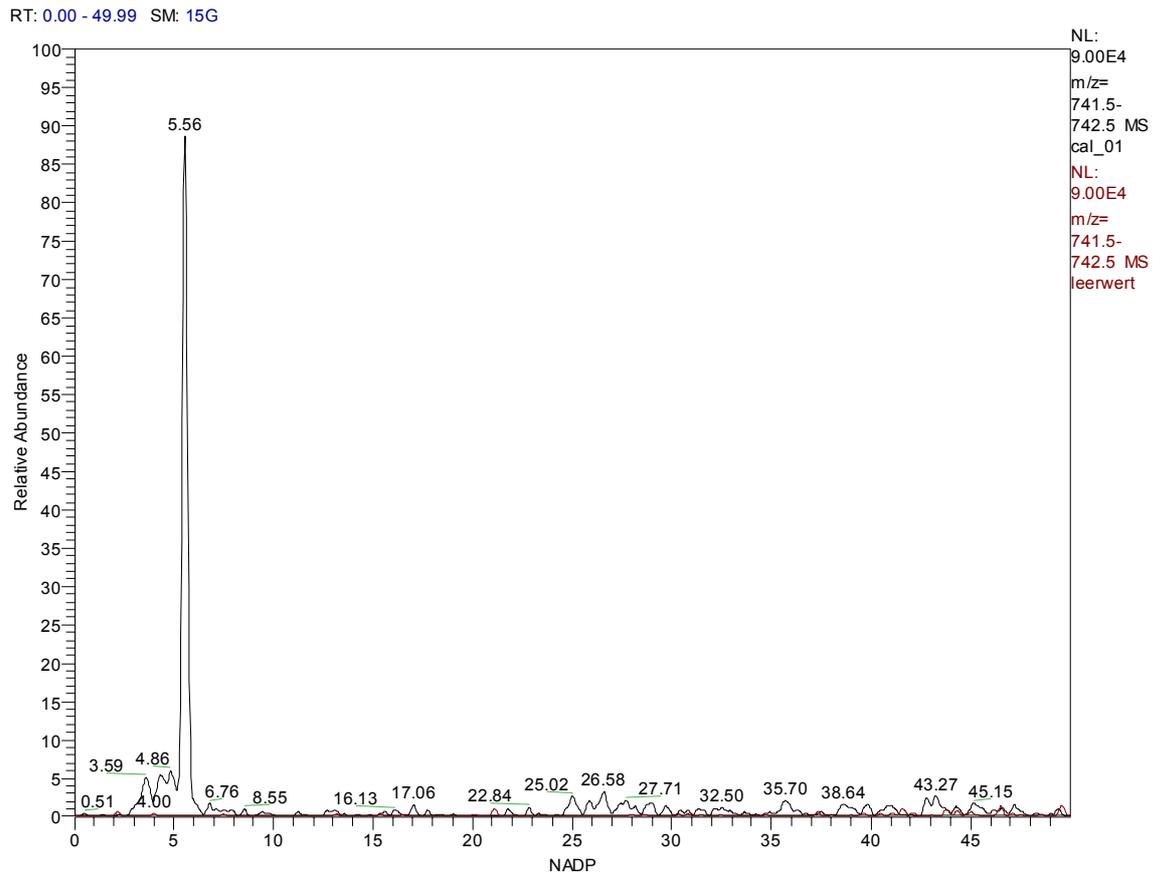
Als Standardlösungen wurden die Metabolite in Konzentrationen von 0,001 bis 0,25 mM eingesetzt. Die Metabolite wurden dazu in Zellextrakt von *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 gelöst. Für diesen wurden die Zellen wie in Kapitel 10.3.5 aufgeschlossen und abzentrifugiert. Kalibriergeraden für  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+$  und  $\text{NADPH}$  sind in Abbildung 10.1 zusammengefasst.  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  wurde von verschiedenen Herstellern verwendet, wodurch die Kalibrierungen aber nicht beeinflusst wurden.



**Abbildung 10.1:** Kalibriergeraden für (a) NAD<sup>+</sup>, (b) NADH, (c) NADP<sup>+</sup> und (d) NADPH. Die Standardlösungen wurden in einer Zellextraktmatrix erstellt.

Die Aquasil C18 Säule ist mit C<sub>18</sub>-Gruppen, die zusätzlich eine polare Gruppe tragen, beschichtet. Daher eignet sie sich besonders zur Trennung von polaren Substanzen. Nach der Trennung des Probengemisches durch die Flüssigchromatographie, wird dieses im Massenspektrometer weiter analysiert. Dazu werden die einzelnen Moleküle der Probe durch die Electrospray Ionisation (ESI) ionisiert. Die Analytlösung wird dabei in ein elektrisches Feld eingebracht, wobei die einzelnen Tröpfchen elektrisch geladen werden. Diese verkleinern sich durch die zunehmende Ladungsdichte immer weiter, bis schließlich einzelne ionisierte Moleküle die Gegenelektrode, die gleichzeitig der Eingang ins Massenspektrometer ist, erreichen. Das verwendete Massenspektrometer LCQ Advantage

arbeitet nach dem Prinzip der Ionenfalle. Dabei handelt es sich um ein hochfrequentes elektrisches Feld, in dem die Ionen auf bestimmten Flugbahnen festgehalten werden. Durch geeignete Veränderung des Feldes können Ionen mit einer bestimmten Masse die Ionenfalle verlassen.



**Abbildung 10.2: Beispielhafte Darstellung des Chromatogramms eines 0,007 mM NADP<sup>+</sup>-Peaks als untere Nachweisgrenze**

Eine Übersicht über die Kalibrierdaten und Nachweisgrenzen ist in Tabelle 10.1 zusammengefasst.

**Tabelle 10.1: Übersicht über Kalibrierdaten und Nachweisgrenzen**

| Substanz          | m/z | Kalibriergerade  | R <sup>2</sup> | Nachweisgrenze |
|-------------------|-----|--|----------------|----------------|
| NAD <sup>+</sup>  | 662 | $c(\text{NAD}^+) = 4,052 \cdot 10^{-9} \cdot \text{Peakfläche}$  | 0,99           | 0,020 mM       |
| NADH              | 664 | $c(\text{NADH}) = 9,227 \cdot 10^{-9} \cdot \text{Peakfläche}$   | 0,99           | 0,006 mM       |
| NADP <sup>+</sup> | 742 | $c(\text{NADP}^+) = 5,618 \cdot 10^{-9} \cdot \text{Peakfläche}$ | 0,99           | 0,007 mM       |
| NADPH             | 744 | $c(\text{NADPH}) = 1,319 \cdot 10^{-8} \cdot \text{Peakfläche}$  | 0,99           | 0,005 mM       |
| ATP               | 506 | $c(\text{ATP}) = 1,216 \cdot 10^{-7} \cdot \text{Peakfläche}$    | 0,99           | 0,020 mM       |
| NaMN              | 334 | $c(\text{NaMN}) = 3,504 \cdot 10^{-8} \cdot \text{Peakfläche}$   | 0,99           | 0,003 mM       |
| NaAD              | 663 | $c(\text{NaAD}) = 4,799 \cdot 10^{-9} \cdot \text{Peakfläche}$   | 0,99           | 0,002 mM       |
| Na                | 122 | $c(\text{Na}) = 1,145 \cdot 10^{-6} \cdot \text{Peakfläche}$     | 0,97           | 0,030 mM       |
| Adenin            | 134 | $c(\text{Adenin}) = 8,143 \cdot 10^{-5} \cdot \text{Peakfläche}$ | 0,85           | 0,600 mM       |

Aus 20 unabhängig durchgeführten Bestimmungen der intrazellulären Konzentration von NAD<sup>+</sup>/H wurde ein mittlerer Fehler von ± 8,5 % ermittelt. Allen Bestimmungen der intrazellulären Konzentrationen wird ein Fehler von ± 10 % zugrunde gelegt.

### 10.3.7 Bestimmung der Konzentrationen von Ethanol, Glycerin und Acetat mittels

#### HPLC

Für die Messung der Konzentrationen an Ethanol, Glycerin und Acetat mittels HPLC wurden die Überstände der Proben zunächst filtriert (Einmal-Spritzenfilter, 0,2 µm, Roth, Karlsruhe), da das Gerät über keine Kühlvorrichtung verfügte. So wurden mikrobielles Wachstum und die damit verbundenen Stoffumwandlungen unterbunden. Verwendet wurde das Gerät der Serie 1100 der Firma Agilent Technologies (Waldbronn) mit folgenden Einstellungen:

---

|                    |                                     |
|--------------------|-------------------------------------|
| Säule:             | Aminex HPX-87H von Bio-rad          |
| Laufmittel:        | 5 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |
| Injektionsvolumen: | 20 µL                               |
| Flussrate:         | 0,5 mL min <sup>-1</sup>            |
| Ofentemperatur:    | 50 °C                               |
| Messdauer:         | 35 min                              |
| UV-Vis-Detektor:   | 210 nm                              |
| RI-Detektor:       | 950 nm                              |

Zur Messung und Auswertung wurde die Software ChemStation for LC (Rev.A.08.03) von Agilent Technologies (Waldbronn) verwendet. Für die Auswertung wurden nur die Chromatogramme des RI-Detektors herangezogen.

### 10.3.8 Bestimmung der Aktivität der Fettsäuresynthase

Bei jeder Probenahme wurde 1 mL Probe zur Bestimmung der Aktivität der Fettsäuresynthase abgenommen und in einem Probengefäß für 5 min bei 7516 x g und 4 °C abzentrifugiert (9000 rpm, Heraeus® Biofuge® stratos, Kendro, Langenselbold). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden mit 1 mL Zellaufschlusspuffer gewaschen. Nach abermaligem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und die Zellprobe bis zur Messung bei -20 °C eingefroren. Zur Bestimmung der Aktivität der Fettsäuresynthase wurden die Proben auf Eis aufgetaut, mit dem entsprechenden Volumen Glasperlen (Durchmesser 0,17 - 0,18 mm) und mit jeweils 1 mL Zellaufschlusspuffer versetzt. Die Zellen wurden für 10 Minuten in einer Kugelschwingmühle (MM200, Retsch, Hahn) bei 30 s<sup>-1</sup> aufgeschlossen und anschließend bei 50377 x g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert (23300 rpm, Heraeus® Biofuge® stratos, Kendro, Langenselbold). Der Überstand wurde in ein anderes Probengefäß überführt und zur Messung eingesetzt. Zur photometrischen Bestimmung wurden in jeweils eine Kavität einer 96er Mikrotiterplatte (MTP, F-Typ, Roth, Karlsruhe)

160 µL Messpuffer mit 50 mM 4-Cl-ACE,  
20 µL Probe oder Messpuffer für Blindwert und  
20 µL 5 mM NADPH-Lösung

pipettiert. In einem Mikrotiterplattenphotometer (EL808 Ultra Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall) wurde bei 30 °C über einen Zeitraum von 10 Minuten alle 30 Sekunden die Absorption von NADPH bei 365 nm bestimmt. Von allen Proben wurde eine Doppelbestimmung gemacht. Über die Software (KCjunior, Bio-Tek Instruments) wurde aus dem linearen Bereich der Absorptionsänderung die Steigung pro Minute  $\Delta E/\Delta t$  bestimmt. Aus dem Lambert-Beerschen Gesetz kann die volumetrische Aktivität  $A_{\text{vol}}$  bestimmt werden:

$$A_{\text{vol}} = 2995 \cdot \Delta E/\Delta t$$

Die spezifische Aktivität bezogen auf die Biotrockenmasse wird folgendermaßen bestimmt:

$$A_{\text{spez}} = A_{\text{vol}} / c_x$$

### **10.3.9 Extraktion der Biotransformationsansätze zur GC-Messung**

Die Biotransformation wurde durch Zugabe der Acetophenon-Stammlösung (36 mM in Ethylacetat) in den Glaszylinder gestoppt. Das zugegebene Volumen entsprach dem Volumen des Biotransformationsansatzes. Bei 1000 rpm wurde bei Raumtemperatur auf der Magnetrührplatte für 10 Minuten extrahiert. Anschließend wurde jeweils 1 mL in ein Probengefäß überführt, in dem ca. 400  $\mu\text{L}$  Glasperlen (Durchmesser 0,17 - 0,18 mm) vorgelegt waren. Die Zellen wurden für 10 Minuten in einer Kugelschwingmühle (MM200, Retsch, Hahn) bei  $30 \text{ s}^{-1}$  aufgeschlossen und anschließend bei  $50377 \text{ x g}$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 10 min abzentrifugiert (23300 rpm, Heraeus® Biofuge® stratos, Kendro, Langenselbold).

In GC-Vials wurden dann jeweils 400  $\mu\text{L}$  Ethylacetat (getrocknet) vorgelegt und 100  $\mu\text{L}$  aus der organischen Phase der abzentrifugierten Proben zugegeben (Gilson-Microman). Die so erhaltenen Proben sind 1:5 verdünnt und haben eine Acetophenon-Konzentration von 7,2 mM. Die Gefäße wurden unmittelbar nach Zugabe der Proben mit Kappen luftdicht verschlossen und bis zur Messung bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 10.3.10 Bestimmung der 4-Cl-ACE- und S/R-CHBE-Konzentration mittels chiraler Gaschromatographie

Die Substrat- und Produktkonzentrationen der Biotransformationsansätze wurden mittels chiraler Gaschromatographie bestimmt. Es wurde der Gaschromatograph CP-3800 (Varian, Darmstadt) mit der Software Star Version 5.51 (Varian, Darmstadt) eingesetzt. Folgende Methode kam zum Einsatz:

|                    |  |
|--------------------|--|
| Säule:             | Lipodex E (Machery-Nagel, Düren, 25 m, ID 0,32 mm) |
| Ofentemperatur:    | 110 °C   |
| Injektionsvolumen: | 1 µL, Split 50                                     |
| Trägergas:         | 5 mL min <sup>-1</sup> Helium 5.0                  |
| Dauer:             | 15 Minuten   |
| Detektor:          | FID, 250 °C  |

### 10.3.11 Berechnungen

Der Verstärkungsfaktor ist der Quotient aus der Konzentration im Untersuchungsansatz und der Konzentration im Referenzansatz für eine bestimmte Substanz. Der Verstärkungsfaktor gibt an, um welchen Faktor mehr die betreffende Substanz im Untersuchungsansatz vorliegt bezogen auf den Referenzansatz.

Die Biotrockenmassekonzentration kann aus der optischen Dichte bei 600 nm (OD600) durch Multiplikation mit dem Faktor 0,74 berechnet werden.

Die Berechnung der Konzentration der intrazellulären Metabolite erfolgte folgendermaßen:  
Intrazelluläre Konzentration = Fläche · Steigung der Kalibriergeraden · Probenvolumen  
nach dem Zellaufschluss / Probenvolumen · 1000 / anteiliges Zellvolumen

Die Berechnung der Konzentration der extrazellulären Metabolite erfolgte folgendermaßen:

Extrazelluläre Konzentration = Fläche · Steigung der Kalibriergeraden · (Probenvolumen -  
anteiliges Zellvolumen) / Probenvolumen

Die Berechnung der Konzentration der Nebenprodukte erfolgte folgendermaßen:

Konzentration Nebenprodukte = Fläche · Steigung der Kalibriergeraden · (Probenvolumen - anteiliges Zellvolumen) / Probenvolumen

Der Enantiomerenüberschuss für das S-Enantiomer berechnet sich aus der Differenz der Konzentrationen des S- und des R-Enantiomers bezogen auf die Summe der Konzentrationen beider Enantiomere.

Das anteilige Zellvolumen kann aus der optischen Dichte durch Multiplikation mit dem Faktor 1,8 erhalten werden. Zur Berechnung aus der Biotrockenmassekonzentration ist ein Faktor von 2,3 anzuwenden.

Die intrazelluläre NAD<sup>+</sup>/H-Konzentration in ‚mM‘ kann aus der Konzentrationsangabe in ‚mg g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>‘ durch Multiplikation mit dem Faktor 0,6647 erhalten werden. Für NADP<sup>+</sup>/H beträgt der Umrechnungsfaktor 0,6625.

## 11 Anhang

Im Anhang sind die verwendeten Symbole und Abkürzungen erklärt, die verwendeten Chemikalien und Geräte aufgelistet und das Abbildungsverzeichnis enthalten.

### 11.1 Symbole und Abkürzungen

| <i>Abkürzung</i>                  | <i>Bedeutung</i>   |
|-----------------------------------|--|
| 2A-3C-Ald                         | 2-Amino-3-Carboxy-Muconatsemialdehyd   |
| 3OH-A                             | 3-Hydroxy-Anthranilat  |
| 3OH-Kyn                           | 3-Hydroxy-L-Kynurenin  |
| 4-Cl-ACE                          | 4-Chlor-Acetessigsäureethylester   |
| ADP                               | Adenosindiphosphat   |
| ADP-Ribose                        | Adenosindiphosphatribose   |
| $A_{\text{FAS}}$                  | spezifische Aktivität der Fettsäuresynthase  |
| AMP                               | Adenosinmonophosphat   |
| $A_{\text{spez}}, A_{\text{vol}}$ | spezifische/volumetrische Enzymaktivität   |
| ATP                               | Adosintriphosphat  |
| BTM                               | Biotrockenmasse  |
| $c_s$                             | Substratkonzentration  |
| $c_x$                             | Biotrockenmassekonzentration   |
| CSL                               | Corn Steep Liquor (Maisquellwasser)  |
| $\Delta E$                        | Änderung der Absorption  |
| $\Delta t$                        | Zeitintervall  |
| ee                                | Enantiomerenüberschuss   |
| FAS                               | Fettsäuresynthase  |
| HPLC                              | High performance liquid chromatography   |
| $K_m, K_M$                        | Michelis-Menten-Konstante  |
| Kyn                               | L-Kynurenin  |
| L                                 | Liter (abweichend von den SI-Einheiten wird hier ein 'L' verwendet, um Verwechslungen der Zahl '1' mit dem kleinen 'l' zu vermeiden) |
| $\mu, \mu_{\text{max}}$           | (maximale) spezifische Wachstumsrate   |

---

|   |   |
|---|---|
| mM  | Millimolar  |
| MS  | Massenspektrometrie   |
| N   | Nicotinamid (in Abweichung zum Perioden-<br>system steht dieses Symbol hier nicht für Stickstoff) |
| Na  | Nicotinsäure (in Abweichung zum Perioden-<br>system steht dieses Symbol hier nicht für Natrium)   |
| NaAD  | Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid   |
| NaADP   | Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid-Phosphat  |
| NAD <sup>+</sup>  | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid  |
| NAD <sup>+</sup> <sub>ex</sub> , NAD <sup>+</sup> <sub>in</sub> | extra-/intrazelluläres NAD <sup>+</sup>   |
| NADP <sup>+</sup>   | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat   |
| NADH  | reduziertes NAD <sup>+</sup>  |
| NADPH   | reduziertes NADP <sup>+</sup>   |
| NAD <sup>+</sup> /H   | NAD <sup>+</sup> und NADH   |
| NADP <sup>+</sup> /H  | NADP <sup>+</sup> und NADPH   |
| NaMN  | Nicotinsäuremononucleotid   |
| N-Kyn   | N-Formyl-L-Kynurenin  |
| NMN   | Nicotinamidmononucleotid  |
| NR  | Nicotinamidribose   |
| OD  | optische Dichte   |
| P <sub>i</sub>  | Phosphat  |
| PP <sub>i</sub>   | Pyrophosphat  |
| PRPP  | Phosphoribosyl-Pyrophosphat   |
| Qa  | Chinolinsäure   |
| rpm   | Umdrehungen pro Minute  |
| RQ  | Respirationskoeffizient   |
| S-CHBE  | (S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethylester  |
| t   | Zeit  |
| Trp   | L-Tryptophan  |
| V   | Geschwindigkeit einer Enzymreaktion   |
| VE-Wasser   | vollständig entsalztes Wasser   |
| V <sub>max</sub>  | maximale Geschwindigkeit einer<br>enzymatischen Reaktion  |

## 11.2 Chemikalien und Geräte

### *Chemikalien*

|   |                                    |
|---|------------------------------------|
| 4-Cl-ACE  | Fa. Merck, Nr. 8.18571.0100        |
| Acetophenon   | Merck, Art. 800028                 |
| Adenin  | Fa. Fluka, 01830, Nr. 2007961      |
| ATP   | Fa. Sigma, Nr. 51963-61-2          |
| Chinolinsäure   | Fa. Fluka, 22690, Nr. 2018748      |
| Coulter Isoton II Diluent   | Fa. Beckman Coulter GmbH           |
| CSL (Corn Steep Liquor)   | Fa. Sigma, Nr. 266-113-4           |
| Dikaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ )                             | Roth, Art. P749.2                  |
| Ethanol   | Roth, Art. 9065.2                  |
| Ethylacetat   | Merck, Art. 109623                 |
| D-(+)-Glucose-Monohydrat  | Merck, Art. 108342                 |
| Glycerin (1,2,3-Propantriol)  | Merck, Art. 104091                 |
| Hefeextrakt, OHLY KAT   | Dt. Hefewerke GmbH                 |
| Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )                             | Roth, Art. 3904.1                  |
| Kaliumglutamatmonohydrat  | Sigma, Art. G1149                  |
| Methanol  | Roth, Art. 7342.1                  |
| $MgCl_2$ wasserfrei   | Fa. Merck, Nr. 8.14733.0500        |
| $NAD^+$   | Fa. Sigma, N-7004                  |
| $NADP^+$ -Mononatriunsalz   | Calbiochem, 481971                 |
| Natriumchlorid (NaCl)   | Roth, Art. 3957.1                  |
| Natriumdihydrogenphosphat-<br>Monohydrat ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ) | Merck, 106346                      |
| Nicotinsäure  | Fa. Sigma [59-67-6], Nr. 200-441-0 |
| Pepton aus Casein   | Roth, Art. 8986.1                  |
| Salzsäure conc. (HCl)   | Merck, Art. 100314                 |

*Geräte*

|                           |  |
|---------------------------|--|
| Schüttelinkubator         | INFORS AG, Multitron II  |
| Wärmeschrank              | BINDER   |
| Coulter Counter           | CC®, Coulter® Multisizer™ II   |
| Gaschromatograph          | Varian, C-P3800 Gaschromatograph   |
| Magnetrührplatte          | H + P Labortechnik AG,<br>Variomag - Multipoint 15   |
| Mikroskop                 | Carl Zeiss, AxioLab drb KT   |
| pH-Meter                  | Schott Glas Mainz, Typ CG843pH-/°C<br>Elektrode BlueLine 14pH (pH 0...14,<br>°C -5...100, Elektrolyt L300) |
| Pipetten                  | Eppendorf, 20/ 200/ 1000 µL<br>Gilson, 100/ 1000 µL Gilson-Microman  |
| UV/Vis-Spektralphotometer | Thermo Spectronic - Genesys 20   |
| Waagen                    | OHAUS-Explorer   |
| Zentrifugen               | Kendro, Biofuge stratos<br>Heraeus Hettich, Rotixa 50 RSHettich,<br>Mikro 20                               |
| Magnetrührer              | Monotherm der Fa. Variomag   |
| Autoklav                  | System 5075 ELV, H+P Typ VI 500 EV-Z   |
| HPLC/MS                   | Thermo Finnigan mit MS LCQ Advantage   |
| Vortex-Schüttler          | REAX top der Fa. Heidolph  |
| Thermomixer comfort       | Eppendorf  |
| -80 °C Eisschrank         | GFL  |
| -20 °C Eisschrank         | Liebherr, AEG  |
| Kühlschrank               | Bauknecht, Kirsch  |
| Cleanbench                | Waldner Laboreinrichtungen GmbH&Co. KG   |
| Eismaschine               | Scotsman AF 80   |
| Gaschromatograph          | CP-3800, Varian  |

*Sonstiges Material*

- Reaktionsgefäße BT-Glaszylinder (4mL CLR shell vial, Roth, Art. H306-1)  
Erlenmeyer Kolben
- Eppendorf-Probengefäße (1,5 mL, 2 mL)
- Falcon-Probengefäße (10 mL, 50 mL)
- Impföse
- Küvetten (1,5 mL, 12,5 mm x 12,5 mm x 45 mm, 1941 PMMA Microcuvettes, Plastibrand®, Art. 759115)
- Magnetrührstäbchen, kreuzförmig (Dmr: 10 mm, Höhe: 5 mm, VWR, Art. COWI001.2401)
- Pipetten-Spitzen (für Eppendorf 20/ 200/1000  $\mu$ L, Gilson Microman 100/1000  $\mu$ L)
- Schott-/ Schraubflaschen
- Spritzen (10 mL, 20 mL)
- Spritzenfilter (Rotilabo-Spritzenfilter, Dmr: 25 mm, Porengröße: 0,2  $\mu$ m, Roth, P664.1)
- GC-Vials mit Caps (1,5 mL, VWR, Art. 548-0003 / Cap ALU, 11 mm, VWR, Art. 548-0010)
- Zentrifugenbecher (1000 mL PE-Becher)
- Glasvials mit Schraubkappe und Dichtplättchen für HPLC/MS
- Vialeinsätze Rotilabo 100  $\mu$ L der Fa. Roth

### 11.3 Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1.1: Schematische Darstellung beider Enantiomere eines chiralen Alkohols. Die Moleküle können nicht zur Deckung gebracht werden und verhalten sich wie Bild und Spiegelbild. $R_1, R_2$ : nicht dargestellte Reste der Molekülstruktur. $R_1 \neq R_2$ .   | 1  |
| Abbildung 2.1: (a) Asymmetrische Biosynthese eines chiralen Alkohols mittels einer isolierten Alkohol-Dehydrogenase ADH1 mit (b) Coenzym-Regenerierung durch eine zweite isolierte Alkohol-Dehydrogenase ADH2. (c) Asymmetrische Biosynthese eines chiralen Alkohols mittels Ganzzell-Biokatalyse. Die Coenzym-Regenerierung erfolgt im Mikroorganismus. $R_1, R_2$ : nicht dargestellte Reste der Molekülstruktur. $R_1 \neq R_2$ . | 3  |
| Abbildung 3.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Alberts <i>et al.</i> , 1999)  | 8  |
| Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Elektronenübertragung der Pyridindinucleotide am Beispiel von $NAD^+$ . -R-ADP: ADP-Ribose.  | 10 |
| Abbildung 3.3: Änderung des Absorptionsspektrums von $NAD^+$ bei der Reduktion (Warburg <i>et al.</i> , 1935). Wellenlänge in nm. $\beta$ : Absorption.  | 10 |
| Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des Zentralstoffwechsels von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Flores <i>et al.</i> , 2000).  | 13 |
| Abbildung 3.5: Einfluss der Glucosekonzentration auf die spezifische Ethanolbildungsrate, auf die spezifische Wachstumsrate und auf den Zellertrag (Rehm und Reed, 1993).  | 15 |
| Abbildung 3.6: Vereinfachte Darstellung der vier $NAD^+$ -Biosynthesewege in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . NaMN: Nicotinsäuremononucleotid. NaAD: Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid. $NAD^+$ : Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid. NADH: reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid. $NADP^+$ : Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat. NADPH: reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat. NMN: Nicotinamidmononucleotid.    | 18 |
| Abbildung 3.7: Biosynthese von Nicotinsäuremononucleotid in Strukturformeln. Diese Reaktion ist der erste Schritt im Preiss-Handler-Weg und wird von der Nicotinsäure-Phosphoribosyl-Transferase (Npt1p) katalysiert.  | 20 |
| Abbildung 3.8: Enzymatische Umsetzung von Nicotinsäuremononucleotid (NaMN) zu Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid (NaAD) als zweiter Schritt im Preiss-Handler-Weg.  |    |

|  |    |
|--|----|
| Diese Reaktion wird von einer NaMN/NMN-Adenyly-Transferase (Nma1p, Nma2p) katalysiert. ....  | 25 |
| Abbildung 3.9: Der dritte und letzte Schritt im Preiss-Handler-Weg ist die Amidierung von Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid (NaAD) zu Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD <sup>+</sup> ), der von der Glutamin-abhängigen NAD <sup>+</sup> -Synthetase (Qns1p) durchgeführt wird. .... | 29 |
| Abbildung 3.10: Katalytische Reaktion der L-Tryptophan-2,3-Dioxygenase (Bna2p) in Strukturformeln als ersten Schritt der <i>de novo</i> Biosynthese. Es entsteht N-Formyl-L-Kynurenin. ....  | 33 |
| Abbildung 3.11: Der zweite Schritt der <i>de novo</i> Biosynthese ist die Darstellung von L-Kynurenin. Diese Reaktion wird von der N-Formyl-L-Kynurenin-Formamidase (Bna3p) durchgeführt. ....   | 35 |
| Abbildung 3.12: Der dritte Schritt der <i>de novo</i> Biosynthese wird von der L-Kynurenin-3-Monooxygenase (Bna4p) katalysiert. Es entsteht 3-Hydroxy-Kynurenin. ....  | 36 |
| Abbildung 3.13: Biosynthese von 3-Hydroxy-Anthranilat als vierten Schritt der <i>de novo</i> Biosynthese. Diese Reaktion wird von dem Enzym 3-Hydroxy-L-Kynureninase (Bna5p) katalysiert. ....   | 38 |
| Abbildung 3.14: Reaktion der 3-Hydroxyanthranilat-3,4-Dioxygenase (Bna1p) zur Synthese von 2-Amino-3-Carboxy-Muconatsemialdehyd. Dies ist der fünfte Schritt der <i>de novo</i> Biosynthese. ....  | 40 |
| Abbildung 3.15: Der sechste Schritt der <i>de novo</i> Biosynthese ist eine spontane Zyklisierung des 2-Amino-3-Carboxy-Muconatsemialdehyds zur Chinolinsäure. Der Stickstoff der Amino-Gruppe wird dabei in den Sechsering eingebaut. ....  | 41 |
| Abbildung 3.16: Synthese des Chinolinsäuremononucleotids als siebten Schritt der <i>de novo</i> Biosynthese. Diese Reaktion wird von der Chinolinsäure-Phosphoribosyl-Transferase durchgeführt. ....   | 42 |
| Abbildung 3.17: Decarboxylierung des Chinolinsäuremononucleotids als achten Schritt der <i>de novo</i> Biosynthese. Diese Reaktion wird von der Chinolinsäure-Phosphoribosyl-Transferase durchgeführt. Es entsteht das Nicotinsäuremononucleotid. ....                               | 42 |
| Abbildung 3.18: Deamidierung von Nicotinamid. Nicotinsäure kann in den Preiss-Handler-Weg eingespeist werden und schließt so den Kreislauf zwischen NAD <sup>+</sup> -Auf- und Abbau. Diese Reaktion wird von der Nicotinamid-Deamidase (Pnc1p) durchgeführt. ....                   | 45 |

---

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 3.19: Biosynthese von Nicotinamidmononucleotid. Mittels der Nicotinamidribose-Kinase (NrK1p) kann ein Nicotinamid-Derivat auf einem von allen anderen Synthesen unabhängigen Weg in die Biosynthese von NAD <sup>+</sup> eingespeist werden. ....   | 46 |
| Abbildung 3.20: Modifikation eines Proteins durch (ADP-Ribosyl)ierung. Diese Reaktion kann von der Mono-(ADP-Ribosyl)-Transferase Sir2p durchgeführt werden. Das freigesetzte Nicotinamid kann als Nicotinsäure wieder in den Preiss-Handler-Weg eingespeist werden. ....   | 50 |
| Abbildung 3.21: Schematische Darstellung der Proteindeacetylierung. Diese Reaktion kann von einer NAD <sup>+</sup> -abhängigen Protein-Deacetylase (z. B. Sir2p) katalysiert werden. Es entstehen 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose und Nicotinamid, welches als Nicotinsäure wieder in den Preiss-Handler-Weg eingespeist werden kann.....                                | 52 |
| Abbildung 3.22: Phosphorylierung von NAD <sup>+</sup> . Diese Reaktion kann von einer NADH-Kinase (z. B. Utr1p) katalysiert werden und findet hauptsächlich im Cytosol statt. ...   | 55 |
| Abbildung 3.23: Biosynthese von NADPH durch Phosphorylierung von NADH. Diese Reaktion wird von der NADH-Kinase Pos5p durchgeführt und findet ausschließlich in den Mitochondrien statt.....   | 58 |
| Abbildung 3.24: Übersicht über das NAD(P) <sup>+</sup> /H-Biosynthesenetzwerk in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in Strukturformeln. Weiterführende Informationen zu den einzelnen Reaktionsschritten sowie zu den beteiligten Enzymen können Tabelle 3.2 entnommen werden. ....  | 60 |
| Abbildung 3.25: Schematische Darstellung der Kompartimentierung der Biosynthese von NAD(P) <sup>+</sup> /H in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Weiterführende Informationen zur Lokalisierung der beteiligten Enzyme sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Informationen zu den Reaktionsschritten können Tabelle 3.2 und Abbildung 3.24 entnommen werden. .... | 62 |
| Abbildung 3.26: Schematische Darstellung physiologischer und regulatorischer Mechanismen, die in Zusammenhang mit der Biosynthese von NAD(P) <sup>+</sup> /H stehen. Kurze Erläuterungen der Zusammenhänge sind Tabelle 3.4 zu entnehmen, eine ausführliche Erläuterung ist Inhalt des Kapitels 3.2.9. ....   | 73 |
| Abbildung 3.27: Schematische Darstellung zweier Enantiomere. Die Moleküle können nicht zur Deckung gebracht werden und verhalten sich wie Bild und Spiegelbild. R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> : nicht dargestellte Reste der Molekülstruktur. R <sub>1</sub> ≠ R <sub>2</sub> . ....  | 85 |

- Abbildung 3.28: Schematische Darstellung einer enzymatischen Redoxreaktion zur asymmetrischen Synthese eines chiralen Alkohols. (a) Enzymatische Reduktion eines Ketons durch eine Alkoholdehydrogenase (ADH1). (b) Regeneration des Coenzym durch enzymatische Oxidation eines Cosubstrats (ADH2). (c) Verwendung ganzer Zellen zur asymmetrischen Biosynthese eines chiralen Alkohols.  $R_1$ ,  $R_2$ : nicht dargestellte Reste der Molekülstruktur.  $R_1 \neq R_2$ . ..... 86
- Abbildung 3.29: Schematische Darstellung der Coenzym-Regenerierung unter Verwendung von (a) einem und (b) zwei Enzymen.  $R_1$ ,  $R_2$ : nicht dargestellte Reste der Molekülstruktur.  $R_1 \neq R_2$ ..... 87
- Abbildung 3.30: Enantioselektive Reduktion von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester (4-Cl-ACE) zu (S)-4-Chlor-3-Hydroxy-Buttersäureethylester (S-CHBE) mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 (nach Engelking (2004))..... 89
- Abbildung 3.31: (a) Dehalogenierung oder (b) Hydrolyse von 4-Cl-ACE in *Saccharomyces cerevisiae* (Engelking, 2004)..... 89
- Abbildung 3.32: Schematische Darstellung der charakteristischen Wachstumsphasen einer Satzkultivierung..... 91
- Abbildung 4.1: Einfluss des Erntezeitpunkts auf die Biotransformation. (a) Zellwachstum (Quadrate) in einem Satzverfahren. (b) Produktbildung (graue Balken) und ee (Dreiecke) von ausgewählten Proben bei der Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE. Eine Biotrockenmassekonzentration von  $10 \text{ g L}^{-1}$  wurde in einem einphasigen Ansatz mit  $19,6 \text{ mM}$  4-Cl-ACE eingesetzt; Umsetzungsdauer: 16 Stunden. .... 94
- Abbildung 4.2: Einfluss des Erntezeitpunkts auf die Biotransformation. (a) Zellwachstum (Quadrate) in einem Zulaufverfahren nach Engelking (2004). Der linear ansteigende Zulauf wurde nach 10 Stunden gestartet und ab 42 Stunden konstant gehalten. (b) Produktbildung (graue Balken) und ee (Dreiecke) von ausgewählten Proben bei der Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE. Eine Biotrockenmassekonzentration von  $10 \text{ g L}^{-1}$  wurde in einem einphasigen Ansatz mit  $19,6 \text{ mM}$  4-Cl-ACE eingesetzt; Umsetzungsdauer: 16 Stunden. .... 95
- Abbildung 4.3: Verlauf der extrazellulären (a)  $\text{NAD}^+$ - und (b) Nicotinsäurekonzentration für einen Ansatz, dem  $\text{NAD}^+$  zugegeben wurden (geschlossene Symbole) im Vergleich zu einem Referenzansatz ohne Zugabe (offene Symbole). Die Zugabe erfolgte zu dem Zeitpunkt null Stunden.  $\text{NAD}^+$ : Dreiecke. Nicotinsäure: Kreise. .... 99

---

|  |     |
|--|-----|
| Abbildung 4.4: Verlauf der intrazellulären (a) $\text{NAD}^+$ - und (b) Nicotinsäurekonzentration für einen Ansatz, dem $\text{NAD}^+$ zugegeben wurden (geschlossene Symbole) im Vergleich zu einem Referenzansatz ohne Zugabe (offene Symbole). Die Zugabe erfolgte zu dem Zeitpunkt null Stunden. $\text{NAD}^+$ : Quadrate. Nicotinsäure: Kreise.....  | 100 |
| Abbildung 4.5: Einfluss der Coenzymzugabe bei der Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE mittels <i>S. cerevisiae</i> FasB His6. In einem einphasigen Ansatz wurde eine Biotrockenmassekonzentration von $20 \text{ g L}^{-1}$ mit $100 \text{ mM}$ 4-Cl-ACE für 19 Stunden inkubiert.....   | 104 |
| Abbildung 5.1: Einfluss der $\text{NAD}^+$ -Vorstufen Adenin und Nicotinsäure auf die intrazelluläre $\text{NAD}^+$ -Konzentration ruhender Hefezellen ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ). Adenin wurde zu einer Konzentration von $3 \text{ g L}^{-1}$ und Nicotinsäure zu $6 \text{ g L}^{-1}$ vorgelegt. Der Volumenanteil der Zellen wurde aus der Biotrockenmassekonzentration berechnet. Der Referenzansatz ist mit Kreisen, der Untersuchungsansatz mit Dreiecken dargestellt. Jeder Ansatz wurde zweifach durchgeführt..... | 109 |
| Abbildung 5.2: Einfluss variierender Tryptophan-Konzentrationen auf die Biosynthese von $\text{NAD}^+$ und $\text{NADH}$ als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Tryptophan nach 72 Stunden Kultivierung. Auf der x-Achse sind Metabolite des Synthesewegs aufgezeigt, auf der y-Achse ist die Tryptophan-Konzentration im Medium beim Animpfen dargestellt. Der Effekt der Zugabe ist auf der z-Achse aufgetragen. ....   | 112 |
| Abbildung 5.3: Einfluss variierender Chinolinsäure-Konzentrationen auf die Biosynthese von $\text{NAD}^+$ und $\text{NADH}$ als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Chinolinsäure nach 72 Stunden Kultivierung. Auf der x-Achse sind Metabolite des Synthesewegs aufgezeigt, auf der y-Achse ist die Chinolinsäure-Konzentration im Medium beim Animpfen dargestellt. Der Effekt der Zugabe ist auf der z-Achse aufgetragen. ....  | 113 |
| Abbildung 5.4: Einfluss variierender Nicotinsäure-Konzentrationen auf die Biosynthese von $\text{NAD}^+$ und $\text{NADH}$ als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Nicotinsäure nach 72 Stunden Kultivierung. Auf der x-Achse sind Metabolite des Synthesewegs aufgezeigt, auf der y-Achse ist die Nicotinsäure-Konzentration im Medium beim Animpfen dargestellt. Der Effekt der Zugabe ist auf der z-Achse aufgetragen. ....   | 115 |

- Abbildung 5.5: Einfluss variierender Nicotinamid-Konzentrationen auf die Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Nicotinamid nach 72 Stunden Kultivierung. Auf der x-Achse sind Metabolite des Synthesewegs aufgezeigt, auf der y-Achse ist die Nicotinamid-Konzentration im Medium beim Animpfen dargestellt. Der Effekt der Zugabe ist auf der z-Achse aufgetragen..... 116
- Abbildung 5.6: Einfluss variierender Adenin-Konzentrationen auf die Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Adenin nach 72 Stunden Kultivierung. Auf der x-Achse sind Metabolite des Synthesewegs aufgezeigt, auf der y-Achse ist die Adenin-Konzentration im Medium beim Animpfen dargestellt. Der Effekt der Zugabe ist auf der z-Achse aufgetragen..... 119
- Abbildung 5.7: Einfluss steigender Adenosin-Konzentrationen auf die Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Adenosin nach 72 Stunden Kultivierung. Auf der x-Achse sind Metabolite des Synthesewegs aufgezeigt, auf der y-Achse ist die Adenosin-Konzentration im Medium beim Animpfen dargestellt. Der Effekt der Zugabe ist auf der z-Achse aufgetragen..... 121
- Abbildung 5.8: Einfluss steigender Glutamin-Konzentrationen auf die Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Glutamin nach 72 Stunden Kultivierung. Auf der x-Achse sind Metabolite des Synthesewegs aufgezeigt, auf der y-Achse ist die Glutamin-Konzentration im Medium beim Animpfen dargestellt. Der Effekt der Zugabe ist auf der z-Achse aufgetragen..... 122
- Abbildung 5.9: Einfluss äquimolarer Adenin- und Nicotinsäure-Konzentrationen auf die Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Adenin und Nicotinsäure nach 72 Stunden Kultivierung. Auf der x-Achse sind Metabolite des Synthesewegs aufgezeigt, auf der y-Achse ist die Konzentration beider Zusätze im Medium beim Animpfen dargestellt. Der Effekt der Zugabe ist auf der z-Achse aufgetragen. .... 126
- Abbildung 5.10: Einfluss jeweils optimaler Adenin- und Nicotinsäure-Konzentrationen auf die Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  als Faktor der Konzentrationssteigerung in bezug auf den Referenzansatz ohne Zugabe von Adenin und Nicotinsäure nach 72

---

Stunden Kultivierung. Es wurden 5 mM Adenin und 0,5 mM Nicotinsäure im Medium vorgelegt (y-Achse). Auf der x-Achse sind Metabolite des Synthesewegs aufgezeigt. Der Effekt der Zugabe ist auf der z-Achse aufgetragen. .... 127

Abbildung 5.11: Einfluss der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentration auf die  $\text{NAD}^+$ -Biosynthese. Allen Ansätzen wurde Adenin und Nicotinsäure in Konzentrationen von 5 bzw. 0,5 mM vorgelegt. Ein Ansatz wurde ohne Zusätze kultiviert. Die  $\text{NAD}^+$ -Konzentration im Referenzansatz ist durch die gestrichelte Linie dargestellt, die  $\text{NAD}^+$ -Konzentrationen in den Untersuchungsansätzen sind durch die geschlossenen Kreise wiedergegeben. Die entsprechenden NaMN- und NaAD-Konzentrationen sind durch offene Quadrate bzw. geschlossene Dreiecke dargestellt. .... 131

Abbildung 5.12: Verlauf der (a) Biotrockenmassekonzentration (Quadrate), (b) der intrazellulären  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentration (Dreiecke) und (c) der Konzentrationen der direkten Vorstufen von  $\text{NAD}^+$  während einer Kultivierung im 3 L Labormaßstab. Zulaufstart nach acht Stunden (konstante Zudosierung von  $37,3 \text{ mL h}^{-1}$ ),  $\text{pH} = 6,5$ . Glucose: Offene Kreise. NaMN: Graue Diamanten. NaAD: Offene Dreiecke. I, II, III, IV: Prozessphasen. .... 137

Abbildung 5.13: Verlauf der (a) Biotrockenmassekonzentration (Quadrate), (b) der intrazellulären  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentration (Dreiecke) und (c) der Konzentrationen der direkten Vorstufen von  $\text{NAD}^+$  während einer Kultivierung im 3 L Labormaßstab. Zulaufstart nach 7,5 Stunden (konstante Zudosierung von  $37,3 \text{ mL h}^{-1}$ ),  $\text{pH} = 5,9$ . Glucose: Offene Kreise. NaMN: Graue Diamanten. NaAD: Offene Dreiecke. I, II, III, IV: Prozessphasen. .... 139

Abbildung 5.14: Verlauf der (a) Biotrockenmassekonzentration (Quadrate) und (b) der intrazellulären  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentration (Dreiecke) während einer Kultivierung im 3 L Labormaßstab, der nach 27 Stunden Kultivierungszeit einmalig Glucose (offene Kreise) zugegeben wurde. Dies ist durch einen senkrechten Strich verdeutlicht. Die Daten der Referenzläufe können Abbildung 5.12 und Abbildung 5.13 entnommen werden. .... 146

Abbildung 5.15: Verlauf der Nebenproduktkonzentrationen während des in Abbildung 5.12 gezeigten Referenzprozesses. Zulaufstart nach 8 Stunden,  $\text{pH} 6,5$ . Ethanol: Graue Diamanten. Glycerin: Schwarze Kreise. Acetat: Offene Dreiecke. I, II, III, IV: Prozessphasen. .... 149

- Abbildung 5.16: Verlauf der Nebenproduktkonzentrationen während des in Abbildung 5.13 gezeigten Referenzprozesses. Zulaufstart nach 7,5 Stunden,  $pH$  5,9. Ethanol: Graue Diamanten. Glycerin: Schwarze Kreise. Acetat: Offene Dreiecke. I, II, III, IV, V: Prozessphasen. .... 149
- Abbildung 5.17: Verlauf des Respirationskoeffizienten (RQ) während der in Abbildung 5.12 dargestellten Referenzkultivierung. Zur Verdeutlichung ist die  $NAD^+/H$ -Konzentration (schwarze Dreiecke) zusätzlich eingetragen. I, II, III, IV: Prozessphasen. .... 154
- Abbildung 5.18: Verlauf der (a) Biotrockenmassekonzentration (Quadrate), (b) der intrazellulären  $NAD^+/H$ -Konzentration (Dreiecke) und (c) der Konzentrationen der direkten Vorstufen von  $NAD^+$  während einer Kultivierung im 3 L Labormaßstab. Zulaufstart nach acht Stunden,  $pH = 5,9$ . Der RQ wurde über die stufenweise Erhöhung der Zulauftrate auf Werte über 1,3 gesteuert. Die grauen Symbole in den Teilen a und b geben die Werte der Referenzkultivierung an. I, II, III, IV, V: Prozessphasen der Referenzkultivierung in Grau. Glucose: Offene Kreise. NaMN: Graue Diamanten. NaAD: Offene Dreiecke. .... 156
- Abbildung 5.19: Verlauf des (a) Respirationskoeffizienten (RQ) und der (b) Förderleistung der Zulaufpumpe für den RQ-gesteuerten Prozess aus Abbildung 5.18 (schwarze Linien). Die entsprechenden Werte für den Referenzprozess sind durch graue Linien dargestellt. I, II, III, IV: Prozessphasen der Referenzkultivierung in Grau. .... 157
- Abbildung 5.20: Verlauf der (a) Biotrockenmassekonzentration (Quadrate), (b) der intrazellulären  $NAD^+/H$ -Konzentration (Dreiecke) und (c) der Konzentrationen der direkten Vorstufen von  $NAD^+$  während einer Kultivierung im 3 L Labormaßstab. Zulaufstart nach acht Stunden,  $pH = 5,9$ . Nach 12 Stunden werden mit dem Zulauf Adenin und Nicotinsäure bei konstanter Zulauftrate zugegeben. Daten einer Referenzkultivierung in den Teilen a und b in Grau gezeigt. Glucose: Offene Kreise. NaMN: Graue Diamanten. NaAD: Offene Dreiecke. .... 161
- Abbildung 6.1: Einfluss variierender (a)  $NAD^+$ - und (b) ATP-Konzentrationen auf die intrazelluläre Konzentration von  $NADP^+/H$  (Mitte, Dreiecke) in ruhenden *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6. Als Ergänzung sind jeweils die intrazellulären  $NAD^+/H$ - (oben, Kreise) und ATP-Konzentrationen (unten, Diamanten) gegeben. Die gerührten 2 mL Ansätze wurden 6 Stunden bei 30 °C bei einer Biotrockenmasse-

---

|  |     |
|--|-----|
| konzentration von $20 \text{ g L}^{-1}$ inkubiert. Die gestrichelte Linie gibt jeweils die Konzentration des betrachteten Referenzansatzes vor der Inkubation wieder. ....   | 171 |
| Abbildung 6.2: Verlauf der (a) Biotrockenmassekonzentration (Quadrate), (b) der intrazellulären $\text{NADP}^+/\text{H}$ -Konzentration (Dreiecke) und (c) der Nebenproduktkonzentrationen während einer Kultivierung im 3 L Labormaßstab. Zulaufstart nach 7,5 Stunden, $\text{pH}$ 5,9. Glucose: Offene Kreise. Ethanol: Graue Diamanten. Glycerin: Schwarze Kreise. Acetat: Offene Dreiecke. I, II, III, IV, V: Prozessphasen.....  | 180 |
| Abbildung 6.3: Verlauf der (a) Biotrockenmassekonzentration (Quadrate), (b) der intrazellulären $\text{NADP}^+/\text{H}$ -Konzentration (Dreiecke) und (c) der Ethanolkonzentration (graue Diamanten) während einer Satzkultivierung im 3 L Labormaßstab. Glucose: Offene Kreise. I, II: Prozessphasen.....  | 182 |
| Abbildung 6.4: Einfluss einer einmaligen Glucosezugabe (offene Kreise) nach der Zulaufphase auf die intrazelluläre $\text{NADP}^+/\text{H}$ -Konzentration (Dreiecke). Der Zugabezeitpunkt ist durch einen senkrechten Strich dargestellt.....   | 185 |
| Abbildung 6.5: Entwicklung der (a) Biotrockenmassekonzentration (Quadrate) und der (b) $\text{NADP}^+/\text{H}$ -Konzentration (Dreiecke) nach der Verstoffwechslung einer einmalig zugegebenen Glucosemenge (offene Kreise). Der zweiten Zugabe nach 26 Stunden wurde zusätzlich $\text{KH}_2\text{PO}_4$ zu einer Endkonzentration von ca. 100 mM zugegeben. Die Zugabezeitpunkte sind jeweils durch senkrechte Striche dargestellt.....   | 188 |
| Abbildung 6.6: Verlauf der (a) Biotrockenmassekonzentration (Quadrate) und (b) der intrazellulären $\text{NADP}^+/\text{H}$ -Konzentration (Dreiecke) während einer Kultivierung im 3 L Labormaßstab, $\text{pH} = 5,9$ . Nach 12 Stunden wurde die Zulauflösung durch eine Adenin-haltige ersetzt. Die Prozessphasen und die entsprechenden Werte eines Referenzversuches sind in grauen Symbolen eingezeichnet. Glucose: Offene Kreise. ....   | 192 |
| Abbildung 7.1: (a) Umsetzung von 4-Cl-ACE mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> FasB His6 unter (b) Variation der intrazellulären $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentrationen (Dreiecke). Die variierenden $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentrationen wurden durch einmalige Glucosezugabe (offen Kreise) nach der Zulaufphase erzeugt. Der Zugabezeitpunkt ist durch einen senkrechten Strich dargestellt. In einphasigen 2 mL Ansätzen wurden folgende Konzentrationen eingestellt: $c_x = 20 \text{ g L}^{-1}$ , $c(\text{ACE}) = 19,6 \text{ mM}$ ; Umsetzungsdauer: 13 Stunden. In Teilabbildung a: R-CHBE: offene Diamanten. S-CHBE: graue Quadrate. .... | 201 |

- Abbildung 7.2: Einfluss der intrazellulären  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentration auf dem Umsatz (Diamanten) und auf den Enantiomerenüberschuss (offene Quadrate) bei der Biotransformation von 4-Cl-ACE zu S-CHBE mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6. Die variierenden  $\text{NAD}^+/\text{H}$ -Konzentrationen wurden durch einmalige Glucosezugabe nach der Zulaufphase erzeugt. In einphasigen 2 mL Ansätzen wurden folgende Konzentrationen eingestellt:  $c_x = 20 \text{ g L}^{-1}$ ,  $c(4\text{-Cl-ACE}) = 19,6 \text{ mM}$ ; Umsetzungsdauer: 13 Stunden. .... 202
- Abbildung 7.3: Produktkonzentration (graue Quadrate) und Enantiomerenüberschuss (offene Quadrate) bei der Biotransformation von 4-Cl-ACE mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 unter Variation der intrazellulären  $\text{NADP}^+/\text{H}$ -Konzentrationen. Die variierenden  $\text{NADP}^+/\text{H}$ -Konzentrationen wurden durch Zugabe einer Glucose- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung nach der Zulaufphase erzeugt. In einphasigen 3 mL Ansätzen wurden folgende Konzentrationen eingestellt:  $c_x = 10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $c(4\text{-Cl-ACE}) = 19,6 \text{ mM}$ ; Umsetzungsdauer: 13 Stunden. .... 204
- Abbildung 7.4: Produktkonzentration (graue Quadrate) und Enantiomerenüberschuss (offene Quadrate) bei der Biotransformation von 4-Cl-ACE mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 unter Variation der intrazellulären  $\text{NADP}^+/\text{H}$ -Konzentrationen mit ausgewählten Proben der in Abbildung 6.6 dargestellten Kultivierung. Die Variation der intrazellulären  $\text{NADP}^+/\text{H}$ -Konzentrationen wurde wie in Kapitel 6.3.3 beschrieben durch kontinuierliche Adeninzugabe mit der Zulauflösung ab 12 Stunden Prozesszeit erzielt. In einphasigen 3 mL Ansätzen wurden folgende Konzentrationen eingestellt:  $c_x = 10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $c(4\text{-Cl-ACE}) = 19,6 \text{ mM}$ ; Umsetzungsdauer: 40 Minuten. .... 205
- Abbildung 8.1: Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (offene Quadrate) und der intrazellulären  $\text{NADP}^+/\text{H}$ -Konzentration (schwarze Balken) in einem entwickelten Zulaufprozess zur Anreicherung von  $\text{NADP}^+/\text{H}$  in *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 im Vergleich zu einem Referenzprozess (graue Balken). Die Akkumulation von  $\text{NADP}^+/\text{H}$  beruht auf der konstanten Zudosierung von Adenin mit der Zulauflösung. .... 210
- Abbildung 10.1: Kalibriergeraden für (a)  $\text{NAD}^+$ , (b)  $\text{NADH}$ , (c)  $\text{NADP}^+$  und (d)  $\text{NADPH}$ . Die Standardlösungen wurden in einer Zellextraktmatrix erstellt. .... 239
- Abbildung 10.2: Beispielhafte Darstellung des Chromatogramms eines  $0,007 \text{ mM}$   $\text{NADP}^+$ -Peaks als untere Nachweisgrenze ..... 240