

**UNTERSUCHUNGEN ZU FUNKTION UND
EIGENSCHAFTEN EINER PHOSPHOLIPASE AUS
SOJA
(GLYCINE MAX)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

von
Dipl. Chem. Andreas Bade
aus Aachen

Frankfurt am Main 2003
(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische
Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als
Dissertation angenommen

Dekan : Prof. Dr. Müller

Gutachter : Prof. Dr. Rüterjans

Datum der Disputation : 25. Juli 2003

„ICH DENKE, DAB ES SICH BEI *ENZYMEN* UM MOLEKÜLE HANDELT, DIE ZU DEN AKTIVIERTEN KOMPLEXEN, DIE SIE KATALYSIEREN, KOMPLEMENTÄR SIND, DAS HEIßT ZU EINER MOLEKULAREN KONFIGURATION, DIE EINE *ZWISCHENSTUFE* ZWISCHEN DEN REAGIERENDEN SUBSTANZEN, UND DEN PRODUKTEN BILDET. DIE ANZIEHUNG, DIE DIE ENZYME AUF DEN AKTIVIERTEN KOMPLEX AUSÜBEN, FÜHRT SO ZU EINER VERMINDERUNG SEINER ENERGIE UND DAMIT ZU EINER *VERRINGERUNG DER AKTIVIERUNGSENERGIE* DER REAKTION UND ZU EINER *ERHÖHUNG DER REAKTIONSGESCHWINDIGKEIT.*“

Linus Pauling (1948)

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Dezember 1996 bis Dezember 2000 unter Anleitung von Prof. Dr. Heinrich Rüterjans am Institut für Biophysikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Heinrich Rüterjans möchte ich ganz besonders für die interessante Themenstellung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen danken.

Der Firma Roehm Enzyme GmbH danke ich für die Überlassung der Enzymproben.

Herrn Dr. Braun und Herrn Dr. Winter danke ich für ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft zu diversen Fragestellungen.

Herrn Dr. Mathias Haun möchte ich für die interessante und fruchtbare Kooperation bei den Experimenten zu den Wechselwirkungen zwischen Uteruglobin und Phospholipasen danken.

Herrn Dr. Stefan Dierl danke ich für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei molekularbiologischen Fragestellungen.

Herrn Dipl. Ing. Rolf Esche danke ich für die Anregungen und die Hilfsbereitschaft bei der Reparatur und der Erweiterung diverser Messgeräte, sowie für die vielen interessanten Diskussionen.

Frau Sigrid Fachinger möchte ich ganz besonders für Ihren unermüdlichen Einsatz bei administrativen und bürokratischen Dingen danken.

Allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir während der ganzen Zeit mit viel Geduld und Verständnis zur Seite standen.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Phospholipasen und Lysophospholipasen	4
1.1.1	Kinetisches Modell für die Grenzflächenkatalyse	8
1.1.2	Der katalytische Mechanismus der Phospholipase A ₂	9
1.2	Uteroglobulin	11
2	EXPERIMENTELLER TEIL	13
2.1	Gaschromatographie	13
2.1.1	Grundlagen der Gaschromatographie	13
2.1.2	Bestandteile eines Gaschromatographen	14
2.1.3	Der chromatographische Trennprozeß	16
2.2	Derivatisierungsmethoden für die Gaschromatographie	21
2.2.1	Auswahl der Derivatisierungsmittel	21
2.2.2	Durchführung der Derivatisierung	23
2.2.2.1	Methylierung	23
2.2.2.2	Silylierung	24
2.3	Planung und Durchführung gaschromatographischer Experimente	27
2.3.1	Probenvorbereitung	27
2.3.1.1	Extraktion	27
2.3.1.2	Derivatisierung	29
2.3.2	Gaschromatographische Methodenentwicklung	30
2.3.2.1	Injektortemperatur	30
2.3.2.2	Detektortemperatur	32
2.3.2.3	Säulentemperatur	32
2.3.2.4	Trägergas	32
2.3.2.5	Splitfluss	33
2.3.2.6	Identifizierung und Integration	33
2.3.3	Methode für die Fettsäureanalyse	34
2.4	Free-Flow Elektrophorese	36
2.4.1	OCTOPUS-CHIEF-Prozeß mit kommerziellen Ampholyten	36
2.4.1.1	Additive	38

2.4.2	CHIEF-Prozeß mit „OCTOLYTES“	38
2.4.3	CHIEF-Prozeß mit weitem pH-Intervall (3-10)	38
2.4.4	CHIEF-Prozeß mit verschiedenen Medien mit engem pH-Intervall	39
2.4.5	Modifizierte Verfahren der kontinuierlichen isoelektrischen Fokussierung	40
2.4.6	Trennqualität und Probendurchsatz	40
2.4.7	Praktische Durchführung der Free-Flow-Elektrophorese	40
2.5	Verfahren zur Analyse der PL- und LPL-Reaktion	41
2.6	Neu entwickelter Aktivitätstest	43
2.6.1	Probenvorbereitung und Substratauswahl	43
2.6.2	Reaktionsführung	45
2.6.3	Extraktion	45
2.6.4	Derivatisierung	46
2.6.5	Gaschromatographische Analyse	46
2.6.6	Interpretation und Bewertung der Resultate	48
2.6.7	Abgrenzung zu bisherigen Aktivitätsbewertungsmethoden	48
2.7	Methodenüberprüfung	50
2.7.1	Überprüfung der Derivatisierung	50
2.7.2	Reproduzierbarkeit der GC-Meßergebnisse	52
2.7.3	Kalibrierung nach Methode FS-Rev 2	55
2.7.4	Kalibrierung nach Methode FS-Rev 2c	57
2.7.5	Kalibrierung nach Methode FS-Rev 2d	59
2.7.6	Überprüfung der Extraktion	63
2.7.7	Abbruch der Enzymreaktion	65
2.7.8	Substratstabilität	68
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	72
3.1	Klassifizierung der Phospholipasen	72
3.2	Substratspezifität der Phospholipasen	80
3.3	Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Aktivität	84
3.4	pH-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität	90
3.5	Reaktionsverlauf und Kooperativität	95

3.5.1	Proben PL-1035 und PL-1008	97
3.5.2	Probe PL-1007	99
3.6	Free-Flow-Elektrophorese der PL-1007	103
3.7	Wechselwirkungen von Uteroglobin mit PL-1007	106
4	ZUSAMMENFASSUNG	109
5	ANHANG	111
5.1	Methodenbeschreibungen	111
5.2	Abkürzungsverzeichnis	114
5.3	Bezugsnachweise	116
5.3.1	Geräte	116
5.3.2	Chemikalien	118
6	LEBENS LAUF	121
7	LITERATURVERZEICHNIS	122

1 Einleitung

Vor etwa 100 Jahren verglich Emil Fischer [1,2] die Wirkweise von biologischen Katalysatoren, also den Enzymen, mit einem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Umzusetzende Substrate sollten nach dieser Vorstellung in das aktive Zentrum eines Enzyms durch spezifische Wechselwirkungen eingepasst werden. Durch diese spezielle Passform wird die Aktivierungsenergie einer Substratumsetzung um mehrere Größenordnungen erniedrigt, so dass in enzymatisch katalysierten Reaktionen eine etwa um den Faktor 10^7 schnellere Umsetzung erfolgt als in nicht katalysierten Reaktionen. Diese katalytische Funktion von Enzymen ist in biologischen Systemen lebensnotwendig, da ansonsten chemische Reaktionen unter den "in vivo" herrschenden Bedingungen bei weitem zu langsam für den Erhalt des Lebens wären [3]. Neben der eigentlichen biologischen Funktion in Organismen wurden Enzyme aufgrund ihrer Eigenschaften seit langem in industriellen Produktionsverfahren eingesetzt. So wurden enzymatische Reaktionen in der Produktion und Konservierung von Lebensmitteln z.B. in der Käseherstellung und im Brauereiwesen genutzt. Der Einsatz von Enzymen erfolgte jedoch lediglich auf Basis empirischer Beobachtungen [3].

Ausgelöst durch den Artikel von *Emil Fischer* [1] fand die Erforschung und industrielle Nutzung von Enzymen in Industrie und Wissenschaft ein besonderes Interesse. Zwar ist es auch heute noch nicht möglich Enzyme und Proteine für gesuchte Eigenschaften zu entwerfen, allerdings werden in der Wissenschaft weiterhin die Mechanismen der Wechselwirkungen zwischen Substrat und Enzym intensiv untersucht. Hierzu ist in erster Linie die Kenntnis der räumlichen Struktur von Enzymen und Proteinen von großer Bedeutung. Gängige Methoden hierfür sind die Kristallstrukturanalyse mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie und die Bestimmung der Struktur in Lösung mit mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie. Die genaue Kenntnis der Struktur-Wirkungs-Beziehung diverser Enzyme könnte die Möglichkeit eröffnen, gezielt Enzyme mit gewünschten Eigenschaften zu entwickeln.

Die katalytischen Eigenschaften von Enzyme werden heute bereits vielfach in industriellen Produktionsverfahren eingesetzt. Auf diese Weise werden chemische Verfahren optimiert. Im Jahre 1995, also ca. 100 Jahre nach Erscheinen des Artikels

E i n l e i t u n g

von Fischer, hat sich ein weltweiter Markt für industrielle Enzyme entwickelt, dessen Volumen sich bei jährlichen Steigerungsraten von ca. 10% heute in einer Größenordnung von heute 1 Mrd. US\$ bewegt [4].

Eine für die Optimierung chemischer Prozesse eingesetzte Enzymklasse sind die Phospholipasen. In der Nahrungsmittelindustrie nutzt man ihre Eigenschaft, Fettsäureester aus Phospholipiden zu spalten, die in vielen Anwendungen wegen ihrer emulgatorischen Eigenschaften stören und besonders bei der Fruchtsaftgewinnung die Ausbeute mindern.

Neben der Anwendung im industriellen Bereich werden Phospholipasen aber auch vermehrt für klinische Diagnoseverfahren eingesetzt. Pankreatitis, multiples Organversagen, septischer Schock und Arthritis sind einige Beispiele, bei denen die Phospholipaseaktivität und ihre Konzentration im Blutplasma als spezifische Indikatoren genutzt werden können. [5]

Bei der Isolierung und Nutzbarmachung, insbesondere von katalytisch aktiven Enzymen, ist die Beschreibung und Quantifizierung ihrer Aktivität von besonderer Bedeutung. Hierzu muss für jedes Enzym ein spezifischer Aktivitätstest entwickelt werden, der es ermöglicht, die katalytische Aktivität eines Enzyms qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Ebenso sollte der Aktivitätstest einfach genug gehalten werden, um einen Einsatz in der „Online-Prozess-Analytik“ zu ermöglichen [6]. In der klassischen Biochemie werden daher meist relativ schnelle Verfahren wie UV-VIS Spektroskopie oder pH-Wert Messungen zur Analyse verwendet. Die Anwendbarkeit dieser Aktivitätsmessungen ist jedoch begrenzt. Dies gilt vor allem, wenn neben dem hauptsächlich aktiven Enzym noch andere Enzyme mit ähnlichen Aktivitäten vorliegen. Ein klassisches Beispiel, bei dem ein Aktivitätstest auf diese Weise an seine Grenzen stößt, ist die Enzymklasse der Phospholipasen.

Für Phospholipasen, also Fettsäureester spaltende Enzyme, werden neben sehr aufwendigen elektrochemischen [7], radiologischen [8] und spektroskopischen Methoden [9,10,11,12] zur Aktivitätsbestimmung meist recht einfache Verfahren auf Basis von pH-Messungen eingesetzt [13,14]. Hierbei wird die pH-Änderung durch

E i n l e i t u n g

freigesetzte Fettsäuren quantifiziert. Neben der rein methodisch bedingten Ungenauigkeit dieses Verfahrens ist eine Beschreibung und Interpretation kinetischer Eigenschaften wegen der beschränkten Löslichkeit der Fettsäuren schwierig. Darüber hinaus erlauben diese Testverfahren keine analytische Trennung zwischen Haupt- und Nebenaktivitäten, die z.B. bei einer Verunreinigung der Enzymprobe durch weitere Enzyme mit ähnlichen Aktivitäten auftreten können [15].

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Aktivitätstest zu entwickeln, der es bei möglichst geringem apparativem, finanziellem und personellem Aufwand ermöglicht, die Aktivität aller vorhandenen Phospholipasen, Lysophospholipasen und Lipasen simultan zu bestimmen, zu separieren und genau zu quantifizieren. Ferner sollte diese Methode gut automatisierbar und standardisierbar sein, was sich bei bisher eingesetzten Methoden zur parallelen Untersuchung der Lysophospholipase- und Phospholipaseaktivität, die unter anderem die optische Dichte als Nachweiskriterium verwenden, nur schwer realisieren lässt. Nach der Vorstellung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode zur Bestimmung enzymatischer Aktivitäten soll die Anwendung beispielhaft an drei Enzymlösungen mit Phospholipase- und Lysophospholipaseaktivitäten gezeigt werden. Darüber hinaus sollen die Wechselwirkungen zwischen Phospholipasen und Uteroglobin untersucht werden, wie sie in der Literatur bereits mehrfach diskutiert wurden [61,63,64]

E i n l e i t u n g

1.1 Phospholipasen und Lysophospholipasen

Phospholipasen sind eine Familie kleiner, wasserlöslicher Enzyme, die speziell die Hydrolyse der Ester-Bindung in Glycerophospholipiden katalysieren, und dabei neben der korrespondierenden Fettsäure Lysophospholipide freisetzen. [16,17, 18]

In vivo haben Phospholipasen vor allem zwei Funktionen. Zum einen wirken viele als Verdauungsenzyme, die in hoher Konzentration in Verdauungssäften, in bakteriellen Sekreten und in Giften vorkommen. Zum anderen erzeugen Phospholipasen in Signaltransduktionketten hoch aktive Messengermoleküle oder deren unmittelbare Vorstufen. Hierzu zählt auch die durch eine Phospholipase A₂ freigesetzte Arachidonsäure, eine Vorstufe der Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane, und der durch eine Phospholipase C freigesetzte Botenstoff der Phosphoinositidkaskade. Phospholipasen werden entsprechend ihrer Spezifität (Abbildung 1) klassifiziert. Dabei wird in der Literatur zwischen Phospholipasen A (PLA), Phospholipasen C (PLC) und Phospholipasen D (PLD) unterschieden. Jede dieser Klassen hydrolysiert unterschiedliche Esterbindungen des Substrates. [19,20,21]

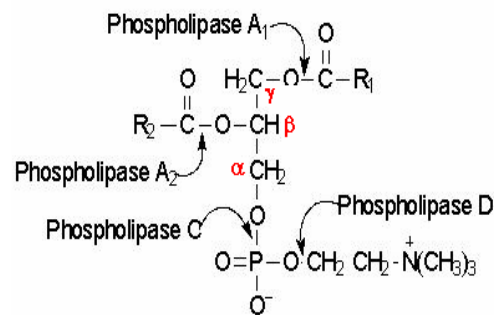


Abbildung 1: Phospholipasen werden entsprechend Ihrer Spezifität klassifiziert. Die in dieser Arbeit untersuchten Phospholipasen A₁ und A₂ hydrolysieren die an die C_γ, bzw. C_β-Atome gebundenen Estergruppen und setzen die gebundenen Fettsäuren R₁ und R₂ frei.

Die Phospholipasen A hydrolysieren die Esterbindung intakter Glycerophospholipide am C-γ bzw. am C-β des Glycerins, wenn ebenfalls die komplementäre β- oder γ-Position einen gebundenen Fettsäureester aufweist, und werden dementsprechend in die Unterklassen A₁ und A₂ eingeteilt. Phospholipasen A₂ (PLA₂) hydrolysieren die an C_β [22] der Phospholipide gebundenen Fettsäureester. Die Fettsäureester an der

E i n l e i t u n g

C_γ-Position hingegen werden durch Phospholipase A₁ (PLA₁) hydrolysiert. [23] Phospholipasen C und D spalten jeweils eine der Phosphodiesterbindungen der Kopfgruppe. Manche Phospholipasen greifen nur einen Typ von Glycerophospholipiden wie z.B. Phosphatidylcholin an, andere sind weniger spezifisch [24].

Phospholipasen hydrolysieren vorzugsweise Substrate, die in Doppelschichtmembranen, Micellen oder Lipoproteinpartikeln lokalisiert sind. Sie führen eine Grenzflächenkatalyse am Übergang der wässrigen zu einer kondensierten Lipidphase aus. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Protein mit der Aminosäuresequenz aus Abbildung 2 untersucht werden. Hierbei handelt es sich um eine für eine Phospholipase aus Soja codierende Sequenz.

Met	Phe	Ser	Gly	Arg	Phe	Gly	Val	Leu	Leu	Thr	Ala	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Leu	Ala	Val	Arg	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
GTAGGTGTGCCCGATTGAGGTGGTTGGATAGC ACTGATGAAGGTGTGAATAG																											
-----Intron 1-----																											
Ser	Val	Ser	Thr	Ser	Thr	Leu	Asp	Glu	Leu	Gln	Leu	Phe	Ala	Gln	Trp	Ser	Ala	Ala	Ala	Tyr	Cys	Ser	Ser	Val	Ser	Thr	Ser
28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
Lys	Asp	Ser	Asn	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala	Asn	Ala	Cys	Pro	Ser	Val	Glu	Glu	Ala	Ser	Thr	Thr	Met	Leu	Leu	Glu	Phe	Asp	Leu
56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83
TAT GTC AC TCAGATCGCAGACATAGAGCACAGCTAATTGAACAG G																											
-----Intron 2-----																											
Thr	Asn	Asp	Phe	Gly	Gly	Thr	Ala	Gly	Phe	Leu	Ala	Ala	Asp	Asn	Thr	Asn	Lys	Arg	Leu	Val	Val	Ala	Phe	Arg	Gly	Ser	Ser
84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111
Thr	Ile	Glu	Asn	Trp	Ile	Ala	Asn	Leu	Asp	Phe	Ile	Leu	Glu	Asp	Asn	Asp	Asp	Leu	Cys	Thr	Gly	Cys	Lys	Val	His	Thr	Gly
112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139
Phe	Trp	Lys	Ala	Trp	Glu	Ser	Ala	Ala	Asp	Glu	Leu	Thr	Ser	Lys	Ile	Lys	Ser	Ala	Met	Ser	Thr	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Leu
140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167
Tyr	Phe	Thr	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	Ala	Thr	Leu	Gly	Ala	Thr	Val	Leu	Arg	Asn	Asp	Gly	Tyr	Ser	Val	Glu	Leu
168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
GTGAGTCCTTCAAAAAGGTGATGGAGCGACAATCGGGTTCTGACAGTCAATAG																											
-----Intron 3-----																											
Tyr	Thr	Tyr	Gly	Cys	Pro	Arg	Ile	Gly	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ala	Glu	His	Ile	Thr	Ser	Gln	Gly	Ser	Gly	Ala	Asn	Phe	Arg	Val
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223
Thr	His	Leu	Asn	Asp	Ile	Val	Pro	Arg	Val	Pro	Pro	Met	Asp	Phe	Gly	Phe	Ser	Gln	Pro	Ser	Pro	Glu	Tyr	Trp	Ile	Thr	Ser
224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251
Gly	Asn	Gly	Ala	Ser	Val	Thr	Ala	Ser	Asp	Ile	Glu	Val	Ile	Glu	Gly	Ile	Asn	Ser	Thr	Ala	Gly	Asn	Ala	Gly	Glu	Ala	Thr
252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279
Val	Ser	Val	Leu	Ala	His	Leu	Trp	Tyr	Phe	Phe	Ala	Ile	Ser	Glu	Cys	Leu	Leu	OCH									
280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297										

Abbildung 2: Sequenz des in *Aspergillus oryzae* (Probe PL-1007), *Trichoderma viride* (Probe PL-1008) und *Pichia pastoris* (Probe PL-1035) exprimierten Proteins

Die Expression wurde in *Aspergillus oryzae* (Probe PL-1007), *Trichoderma viride* (Probe PL-1008) und *Pichia pastoris* (Probe PL-1035) [14] durchgeführt. Unabhängig

Einleitung

vom Expressionssystem sind neben der erwarteten Phospholipaseaktivität auch eine deutliche Lysophospholipaseaktivität und Lipaseaktivität nachweisbar. Die Eigenschaften dieser Enzymsysteme sollen in dieser Arbeit näher untersucht werden.

Aus der Sequenz in Abbildung 2 lassen sich mögliche Eigenschaften des exprimierten Enzyms abschätzen. Nach „ProtParam“ errechnen sich ein theoretischer PI-Wert von 4,5, und ein Molekulargewicht von 31577,2 g/mol. Für die hier vorliegende Sequenz lassen sich folgende Extinktionkoeffizienten abschätzen [25]:

Extinction coefficients are in units of $M^{-1} cm^{-1}$.					
The first table lists values computed assuming ALL Cys residues appear as half cystines, whereas the second table assumes that NONE do.					
	276	278	279	280	282
	nm	nm	nm	nm	nm
Ext. coefficient	47335	47981	47770	47300	45960
Abs 0.1% (=1 g/l)	1.499	1.519	1.513	1.498	1.455
	276	278	279	280	282
	nm	nm	nm	nm	nm
Ext. coefficient	46900	47600	47410	46940	45600
Abs 0.1% (=1 g/l)	1.485	1.507	1.501	1.487	1.444

Abbildung 3: Extinktionskoeffizienten nach "ProtParam"

Ebenso lassen sich aus der Sequenz Hinweise auf Stabilität und Lebensdauer in vivo gewinnen. Nach den in „PROTPARAM“ angewandten Methoden [26] ergibt sich ein Instabilitätsindex von 35. Proteine mit Werten des Instabilitätsindexes über 40 gelten als instabil, unter 40 als stabil. Eine Abschätzung der in vivo-Lebensdauer eines Proteins ist nach „PROTPARAM“ [27,28,29,30] durch eine Bewertung des N-terminalen Endes der Sequenz möglich.

Estimated half-life:
The N-terminal of the sequence considered is M (Met).
The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
>20 hours (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Abbildung 4: Bewertung der Lebensdauer

E i n l e i t u n g

Ein Homologievergleich mit der „Swiss-Prot“-Datenbank lieferte eine bis zu 70% ige Übereinstimmung mit Triacylglycerol Lipase [31,32,33], sowie mit einer Mono-Diacylglycerolipase, vorgestellt in 1992 [34,35,36]

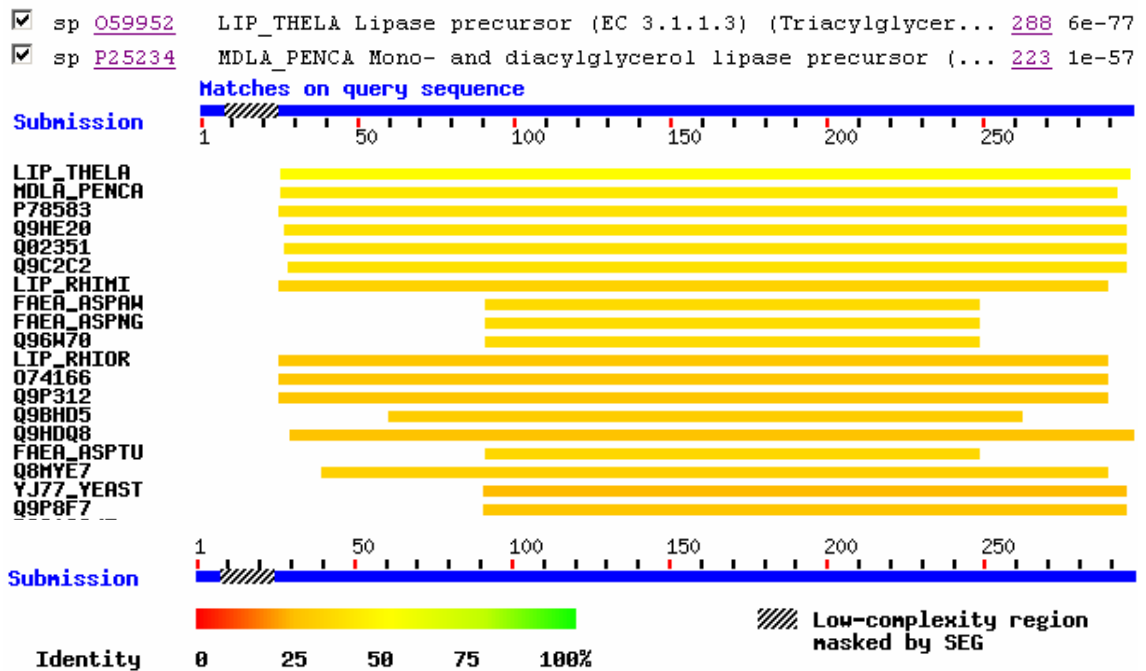


Abbildung 5: „Swiss-Prot“ Recherche nach Proteinen ähnlicher Aminosäuresequenz

Einleitung

1.1.1 Kinetisches Modell für die Grenzflächenkatalyse

Ein allgemeines kinetisches Modell zur Beschreibung dieser Grenzflächenkatalyse wurde von Berg et al. [37] vorgestellt. Es verbindet den Michaelis-Menten Katalysezyklus an der Grenzfläche mit dem in der wässrigen Phase durch das Verteilungsgleichgewicht zwischen der Grenzfläche und dem umgebenden Wasser.

Dabei wird im Gegensatz zu einem anderen Modell [37], das den Austausch von Enzym, Substrat und Hydrolyseprodukten nicht berücksichtigt („kinetics in the scooting mode“), angenommen, dass sich Substrat und Produkt im raschen Austausch befinden. Hydrolyse findet entweder bei Phospholipid-Monomeren oder an der Oberfläche von Micellen statt.

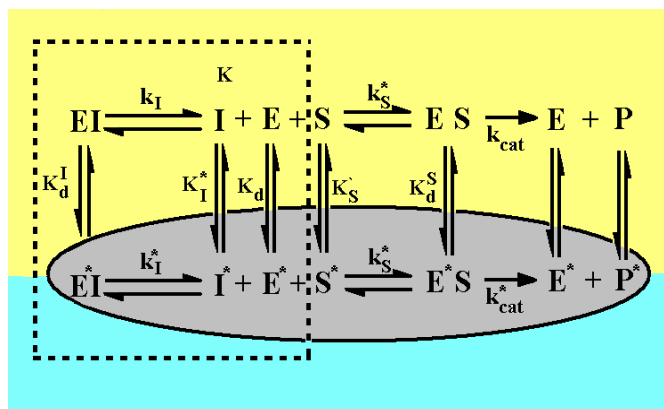


Abbildung 6: Allgemeines Modell für die Grenzflächenkatalyse unter der Voraussetzung, dass Enzym, Substrat, Hydrolyseprodukte und Inhibitor auf die wässrige Phase (gelb) und die Grenzfläche (grau) verteilt sind.

Abbildung 6 zeigt das allgemeine Modell für die Grenzflächenkatalyse unter der Bedingung, dass Enzym, Substrat, Hydrolyseprodukt und Inhibitor auf die wässrige Phase und die Grenzfläche verteilt sind. Die Michaelis-Geschwindigkeitskonstanten an der Oberfläche (in Abbildung 6 markiert durch Sternchen) und der wässrigen Phase (ohne Sternchen) sind entsprechend der Standardnomenklatur definiert. Die Schritte innerhalb des Ovals beschreiben die Umsätze an der Oberfläche. Der Zerfall von ES und E*S (k_{cat} und k_{cat}^*) sind die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte.

In Übereinstimmung mit früheren Veröffentlichungen [38,39,40,41,42] existieren in Abbildung 6 zwei Wege für den Katalysezyklus, nämlich in der wässrigen Phase und an

Einleitung

der Oberfläche. Beide tragen zu der beobachteten Reaktionsgeschwindigkeit bei. Die Konstante k_{cat} in der oberen Zeile beschreibt den Umsatz über den Zerfall von ES in der wässrigen Phase und k_{cat}^* in der unteren Zeile (schattiertes Oval) beschreibt den Zerfall des Michaelis-Komplexes E^*S an der Grenzfläche.

1.1.2 Der katalytische Mechanismus der Phospholipase A₂

Basierend auf einer Kristallstruktur haben Verheij et al. [43] einen katalytischen Mechanismus (Abbildung 7) vorgeschlagen, den man aufgrund der großen Ähnlichkeit zum Serin-Protease-Modell als „katalytische Triade“ bezeichnen kann. Asp99, His48 und ein nukleophiles Wassermolekül im aktiven Zentrum bilden eine katalytische Triade ähnlich der in Serin-Proteasen.

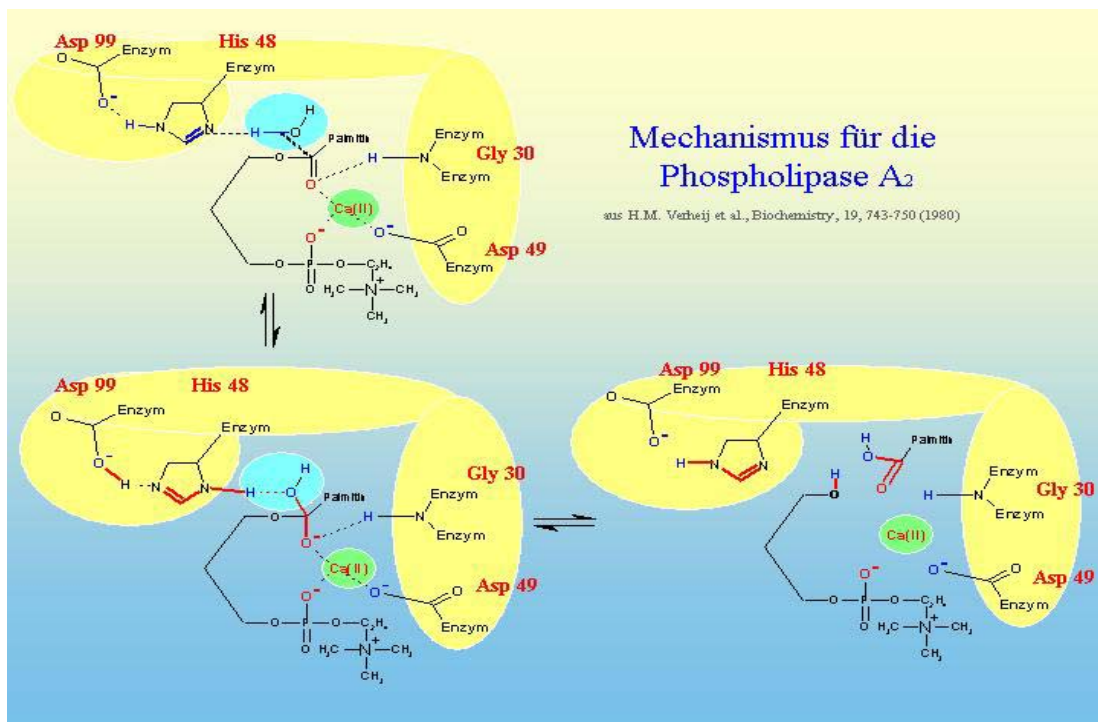


Abbildung 7: Die katalytische Triade der Phospholipase A₂. Die Funktion des Serin-Restes wird von einem Wassermolekül übernommen.

Das aktivierte Wassermolekül greift den Carbonylkohlenstoff der Ester-Gruppe des Substrates an und bildet einen tetraedrischen Übergangszustand. Während dieses Schrittes wird His48 am N_{δ1} protoniert. Das positiv geladene His48 wird durch die Wechselwirkung mit dem positiv geladenen Asp99 stabilisiert. Schließlich entsteht durch den Zerfall des tetraedrischen Übergangszustandes ein Alkoholat, welches von

Einleitung

His48 protoniert wird. Die Aufgabe des Calcium-Ions in der katalytischen Triade besteht darin, das Substrat zu binden und den Carbonylkohlenstoff der Ester-Gruppe zu polarisieren. Es ist damit direkt in den katalytischen Mechanismus einbezogen.

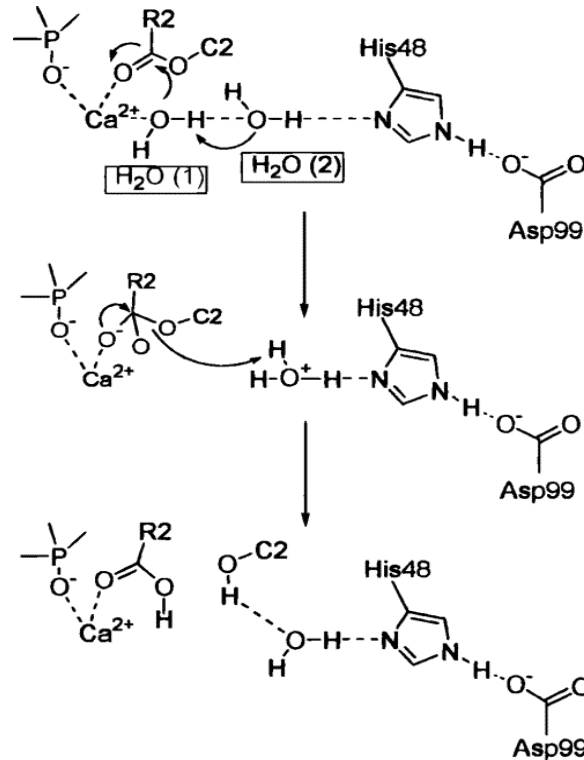


Abbildung 8: Der „calcium-coordinated oxyanion“- Mechanismus als zweite Möglichkeit für die Spaltung von Phospholipiden unter Beteiligung von zwei Wassermolekülen.

Einige experimentelle Ergebnisse aber können durch den beschriebenen Mechanismus nicht zufriedenstellend erklärt werden. Kinetische Studien an Mutanten, bei denen das negativ geladene Asp99 durch ein neutrales Asn ersetzt wurde, haben gezeigt, dass der Effekt von Asp99 in Bezug auf die katalytische Aktivität kleiner ist als der des entsprechenden Asp im Serin-Protease-Modell. Des Weiteren beträgt das Verhältnis der beobachteten Aktivitäten bei Substraten, die eine Ester-Gruppe an der Position besitzen, zu den analogen Thioestern ungefähr 1:10. Da aber ein nukleophiler Angriff an einem Thioester schneller erfolgen sollte als an einem normalen Ester, kann die Bildung des tetraedrischen Zwischenproduktes nicht geschwindigkeitsbestimmend sein.

Aus diesem Grund wurde ein alternativer Mechanismus postuliert, in dem der geschwindigkeitsbestimmende Schritt nicht die Bildung des tetraedrischen Übergangszustandes ist, sondern vielmehr dessen Zerfall. Dabei wird angenommen,

E i n l e i t u n g

dass der Zerfall durch die polare Kopfgruppe des Phospholipids, koordiniert mit dem Calcium-Ion, beeinflusst wird. Dieser Mechanismus unterscheidet sich von der katalytischen Triade dadurch, dass zwei unterschiedliche Wassermoleküle beteiligt sind. Das erste Wassermolekül (H_2O (1) in Abbildung 8) wird deprotoniert und bildet das nukleophile OH^- -Ion, während das zweite (H_2O (2) in Abbildung 8) eine Wasserstoffbrückenbindung zum His48 ausbildet und das Proton des ersten Wassermoleküls aufnimmt. Das Hydroxid-Ion ist an das Calcium-Ion koordinativ gebunden und erhöht damit die Koordinationszahl des Calciums auf acht.

1.2 Uteroglobin

Im Jahre 1968 wurde Uteroglobin (UG) erstmals aus der Uterusschleimhaut (Endometrium) von Kaninchen gewonnen und isoliert [44]. Bei diesen Tieren konnte gezeigt werden, dass es innerhalb der ersten 6 Tage der Schwangerschaft zu einem Anstieg der Uteroglobineexpression von bis zu etwa 25% der exprimierten Gesamtproteinmenge im Endometrium kommt [45]. Dabei wird die Proteinexpression und -sekretion in das Uteruslumen offenbar durch die Steroidhormone Progesteron und Östradiol kontrolliert, deren Konzentration in dieser Zeit ebenfalls ansteigt [46]. Dieser Zusammenhang wird durch die Tatsache untermauert, dass in der Nähe des Promotors des UG-Gens DNA-Bindungsstellen für Östrogenrezeptoren identifiziert wurden [47,48]. Innerhalb der nächsten vier Tage der Schwangerschaft verringert sich die Konzentration an UG, bis es kaum noch nachweisbar ist [49,50].

Aber nicht nur in der Uterusschleimhaut konnte die Produktion von UG nachgewiesen werden, auch in den Epithelzellen des Oviduktes wird UG gebildet [51] und durch Endozytose in die Blastozysten aufgenommen [52]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass UG auch in den Bronchial- und Alveolarepithelzellen produziert, und von dort in das Lumen sezerniert wird [53]. Beim männlichen Kaninchen wird UG außerdem in den Nebenhoden exprimiert und über Testosteron reguliert [54].

Die Uteroglobine wurde von *Miele et al* als neue Proteingruppe in die Literatur eingeführt [55], nachdem sie auch in anderen Wirbeltieren wie Mäusen [56], Ratten

E i n l e i t u n g

[57,58] sowie beim Menschen [59] im Respirationstrakt, im Uterus, in der Niere und in der Prostata nachgewiesen wurden.

Die genaue Funktion von UG bleibt jedoch nach wie vor ungeklärt [60]. Neben der noch ungeklärten Rolle in den ersten Tagen der Schwangerschaft wurde ein Einfluss auf das Immunsystem jedoch eindeutig und speziesübergreifend nachgewiesen [61,62].

Weitere Erkenntnisse über die Funktion von UG lassen sich aus der Beobachtung gewinnen, dass die Aktivität der Phospholipase A₂ durch Uteroglobulin gehemmt wird [61,63,64]. Der Mechanismus, der dieser Hemmung zugrunde liegt, ist bisher noch unbekannt. Sicher ist jedoch, dass er nicht auf einer Protein-Protein-Wechselwirkung beruht [65,66]. Allerdings wäre ein kompetitiver Mechanismus der Hemmung durch Bindung des Phospholipase-A₂-Cofaktors Ca²⁺ an die Ca²⁺ - Bindungsstelle von UG vorstellbar. Dieses Modell der Hemmung ist jedoch nur bei geringen Ca²⁺ Konzentrationen, d.h. äquimolar zur UG-Konzentration, denkbar [67]. Im Rahmen dieser Arbeit soll dieses Modell der Hemmung näher untersucht und verifiziert oder widerlegt werden.

2 Experimenteller Teil

2.1 Gaschromatographie

2.1.1 Grundlagen der Gaschromatographie

Die Gaschromatographie ermöglicht die Trennung einzelner Komponenten einer Mischung. Diese Analyten müssen unzersetzt verdampfbar sein. Das Trennungsprinzip beruht dabei auf der unterschiedlichen Verteilung der Analyten zwischen der *stationären Phase* und der *mobilen Phase*. Die fortlaufende Erfassung der Zusammensetzung der mobilen Phase am Säulenausgang liefert Informationen zur Identifikation der einzelnen Probenkomponenten (*qualitative Analyse*) wie auch zur Ermittlung ihres jeweiligen mengenmäßigen Anteiles der Mischung (*quantitative Analyse*).

Der chromatographische Trennprozess erscheint als das Ergebnis wiederholter Sorptions-Desorption-Vorgänge während der Wanderung der Analyten. Die Trennung wird durch Unterschiede in der Verteilung der individuellen Probenkomponenten zwischen den beiden Phasen hervorgerufen. Diese Verteilung zwischen der mobilen Phase und einer stationären Flüssigphase kann durch Lösungsprozesse erfolgen (Verteilungs-Chromatographie) oder auf Adsorptions-Desorptions-Prozessen zwischen der mobilen Phase und einem Feststoff (Adsorptions-Chromatographie) beruhen. Auch gemischte Retentionsmechanismen werden beobachtet, bei denen gleichzeitig Lösungs- wie auch Adsorptionsvorgänge auftreten. Der gesamte Prozess kann in einer Säule stattfinden (*Säulenchromatographie*); die stationäre Phase kann aber auch eine ebene Fläche besetzen (*Planarchromatographie*). Die chemisch inerte mobile Phase kann eine Flüssigkeit sein (*Flüssigchromatographie*, LC), ein überkritisches Fluid (*überkritische Fluidchromatographie*, SFC) oder ein Gas (*Gaschromatographie*, GC). Als stationäre Phase kann ein Feststoff, ein Gel oder eine Flüssigkeit verwendet werden. Liegt eine Flüssigkeit vor (*Flüssigphase*), ist sie auf die Oberfläche eines Festkörpers aufgetragen (*beladen, immobilisiert, gebunden*), der gegebenenfalls selbst zum Trennprozeß beitragen kann. Auch die Oberfläche der stationären Phase kann die Trennung beeinflussen.

Experimenteller Teil

In der Gaschromatographie wird die Probe verdampft und dann mit der mobilen Phase (*Trägergas*) in die Säule überführt, wo der Trennprozeß durch die oben beschriebenen Mechanismen stattfindet. Durch die Unterschiede in den Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der stationären Phase treten die einzelnen Komponenten der Analysemischung am Ende der Säule zeitversetzt aus und können detektiert werden. Das Detektorsignal wird auch dazu benutzt, die absoluten und relativen Mengen der Analyten zu errechnen. Wenn notwendig, können die getrennten Analyten direkt einem anderen Gerät zu weiteren Untersuchungen zugeführt werden. Es bieten sich unter anderem Massenspektrometer oder IR-Spektrometer an.

2.1.2 Bestandteile eines Gaschromatographen

Wie in Abbildung 9 dargestellt, besteht ein Gaschromatograph im Wesentlichen aus drei integrierten Modulen: Probeneinführung (zur Verdampfung), Trennung (Säule) und Detektion. Das Probeneinlasssystem verdampft flüssige Proben, die in die Gasphase überführbar sein müssen, ohne dass es zu einer Zersetzung der Probe kommt, und leitet die nun gasförmige Probe mit dem chemisch inerten Trägergasstrom in die Analysensäule ein. Üblicherweise besteht das Probeneinlasssystem aus einem erhitzten Block (*Schnell-Verdampfer*), in den die flüssige Probe durch eine Septum eingespritzt wird; abweichend hiervon kann die Probe auch direkt durch ein Septum in den Anfang der Säule eingebracht werden (Säuleninjektion), von wo sie dann während des Aufheizens verdampft. Gasproben werden mit Hilfe spezieller Dosiersysteme (*Gasdosierhahn*) in den Trägerstrom eingeleitet.

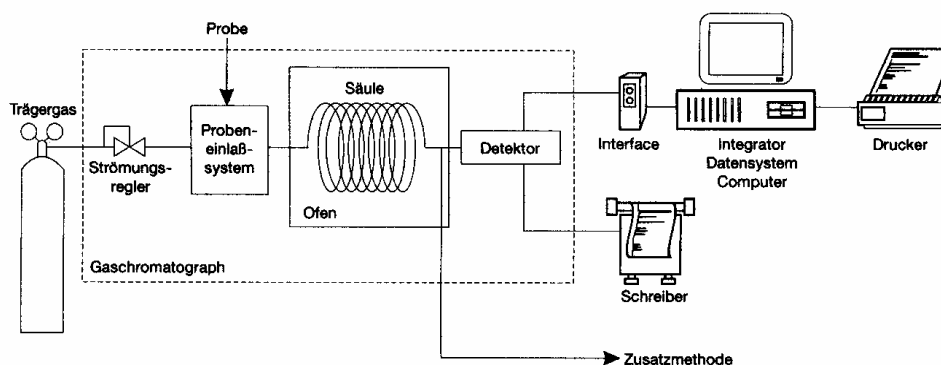


Abbildung 9: Hauptbestandteile eines gaschromatographischen Systems

Experimenteller Teil

Die Trennsäule ist auf der Innenseite mit der stationären Phase beschichtet. Als stationäre Phase kann entweder ein Adsorbens (*solid phase*) oder eine Flüssigkeit (*liquid phase*) verwendet werden. Die Flüssigkeit wird in Form eines dünnen Films auf der Oberfläche eines festen und porösen Trägers verteilt. (*Dünnschichtkapillarsäulen, Schichtsäulen, PLOT-Säulen oder Trägerbeladene Schicht-Kapillarsäulen, SCOT-Säulen*). Die Flüssigphase kann auch direkt auf die Innenwand eines Säulenrohres aufgetragen werden (*wandbeladene, offene Kapillarsäulen, Filmsäulen, WCOT-Säulen*) [68].

Für isotherme Analysen wird die Trennsäule während der Analyse auf einer konstanten Temperatur gehalten. Neben dieser isothermen Arbeitsweise ist es auch möglich, die Säulentemperatur während des Analyselaufes zu variieren (*temperaturprogrammierte Arbeitsweise*). Durch die Änderung der Säulentemperatur können die Unterschiede in den Adsorptions- und Desorptionsraten der Analyten vergrößert und die Trennung optimiert werden. Darüber hinaus können Vaporisations- und Kondensationsvorgänge für die Trennung genutzt werden.

Die sich kontinuierlich durch die Trennsäule bewegende mobile Trägergasphase wird durch eine Trägergasquelle (*Druckgasbehälter oder Gasgenerator*) mit einer Regeleinheit bereitgestellt. Um reproduzierbare Bedingungen innerhalb der Trennsäule zu erhalten, werden an dieses Regelsystem hohe Anforderungen gestellt. Bei temperaturprogrammierter Arbeitsweise sind Regeleinheiten von Vorteil, die es erlauben, die durch Viskositätsänderung des Trägergases hervorgerufene Änderung der linearen Gasgeschwindigkeit durch Druckanpassung am Säuleneinlass zu kompensieren. Durch eine konstante lineare Gasgeschwindigkeit kann eine Linearität der Auflösung über den gesamten Analyselauf sichergestellt werden. Darüber hinaus wird der Erhalt einer laminaren Gasströmung in der Säule gewährleistet. Dies ist vor allem bei Trägergasen wie Stickstoff wichtig, da hier nur ein sehr schmales Geschwindigkeitsfenster, mit laminarer Strömung vorliegt. Andere Gase, wie z.B. Wasserstoff sind hier wesentlich unempfindlicher. Wasserstoff hat den weiteren Vorteil, dass er nicht in Druckgasflaschen bereitgestellt werden muss, sondern mit Hilfe von Wasserstoffgeneratoren direkt vor Ort erzeugt werden kann. Beim Einsatz von Flammenionisationsdetektoren am Säulenausgang wird neben dem Trägergas auch das

Experimenteller Teil

Brenngas von diesem Generator bereitgestellt. Der Einsatz derartiger Gasgeneratoren hilft darüber hinaus, die Gefahrenpotentiale die durch den Einsatz von Druckgasbehältern mit brennbaren Gasen in Laboratorien bedingt sind, zu reduzieren, und den apparativen Aufwand der Gasreinigung zu minimieren [69,70]

Der Flammenionisationsdetektor (*FID*) ionisiert die Probenmoleküle in einer Wasserstoffflamme, deren Leitfähigkeit sich mit der Ionenkonzentration in der Flamme ändert. Die Änderung der Leitfähigkeit ist proportional der Stoffmengenkonzentration der Analyten im Trägergasstrom.

Ein weiterer, universell einsetzbarer Detektor ist der Wärmeleitfähigkeitsdetektor (*WLD*). Der Wärmeleitfähigkeits- oder Hitzdrahtdetektor (*WLS*) misst die Unterschiede der Wärmeleitfähigkeit zwischen dem mit Analyten angereichertem Trägergasstrom aus der Trennsäule und dem reinen Trägergas.

Neben diesen allgemein verwendbaren Detektoren, die auf die meisten Substanzen einer Probe ansprechen, gibt es noch eine Reihe spezifischer Detektoren, die für bestimmte Substanztypen oder funktionelle Gruppen selektiv sind.

Die durch den Detektor gesammelten Daten lassen sowohl eine qualitative wie auch eine quantitative Interpretation zu. Die zeitliche Folge der Elution der Komponenten aus der Säule (Retentionszeit), wird für die Komponentenidentifikation verwendet. Da die Änderung der physikalischen oder chemischen Eigenschaften des Trägergasstromes am Säulenausgang während der Elution proportional der Menge der darin gelösten Analyten ist, kann das Detektorsignal nach entsprechender Kalibrierung auch zur Feststellung der absoluten und relativen Mengen (Konzentrationen) der Probenkomponenten benutzt werden.

2.1.3 Der chromatographische Trennprozeß

Der chromatographische Trennprozeß lässt sich anhand einer Zweikomponentenmischung, die am Anfang einer chromatographischen Säule aufgegeben wird, beschreiben. Zur Vereinfachung wird hierbei angenommen, dass eine der beiden Komponenten nicht von der stationären Phase zurückgehalten wird und sie

Experimenteller Teil

deshalb mit der Geschwindigkeit der mobilen Phase durch die Säule wandert. Die zweite Komponente wird in diesem Modell durch sich ständig wiederholende Sorptions-Desorptions-Schritte mit der stationären Phase zurückgehalten und tritt später als die erste Komponente aus der Säule aus.

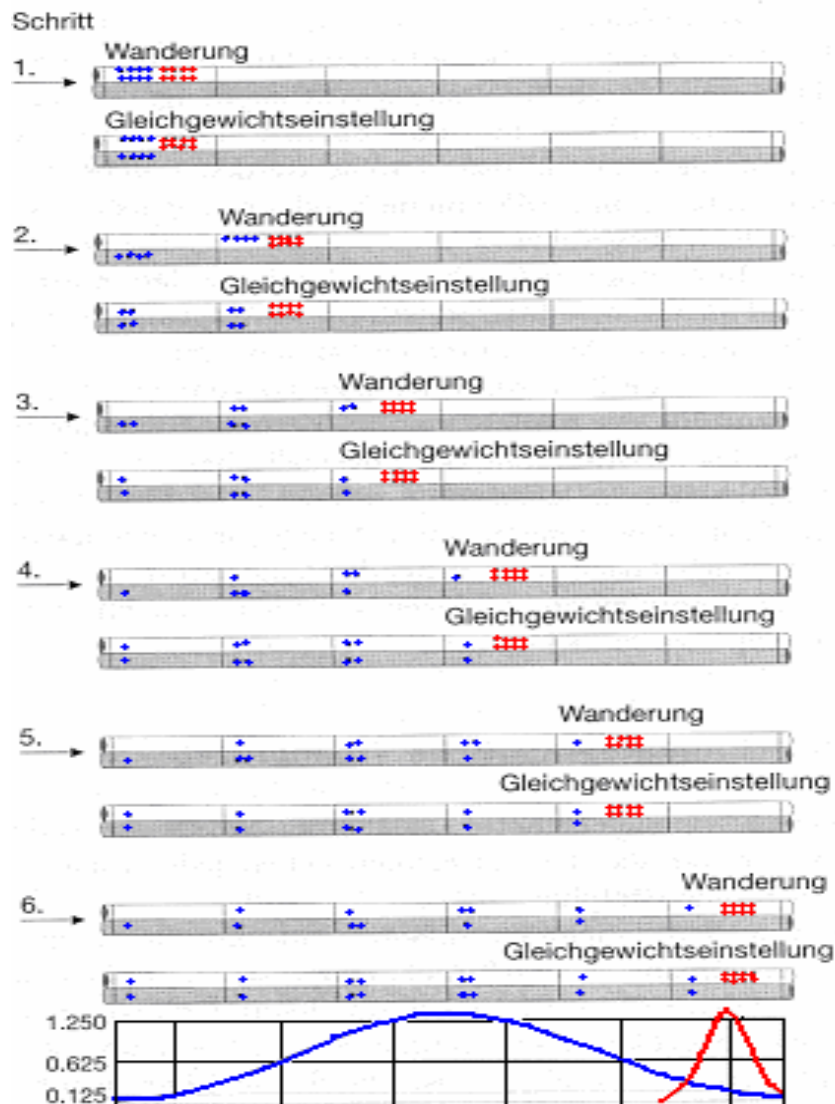


Abbildung 10: Trennung eines Zweistoffgemisches in einer chromatographischen Säule. Oberer Balken: Mobile (Gas-) Phase; unterer Balken: Stationäre (flüssige) Phase). Der Graph unterhalb der Abbildung gibt das resultierende Detektorsignal wieder.

Die Elementarschritte der Trennung einer solchen binären Mischung sind in Abbildung 10 dargestellt. Die roten Punkte symbolisieren die Moleküle der Komponente, die keine Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingeht. Die blauen Punkte kennzeichnen die Moleküle der mit der stationären Phase wechselwirkenden Komponente.

Experimenteller Teil

Für diese Darstellung wird vorausgesetzt, dass sich bei der wechselwirkenden Komponente im Gleichgewichtszustand die gleiche Anzahl von Molekülen in der mobilen und der stationären Phase befindet. Im Gedankenexperiment ist die Säule in kleine Segmente unterteilt („theoretische Böden“). Der Weg durch die Säule setzt sich dann aus aufeinander folgenden Schritten von Wanderungen und Gleichgewichtseinstellungen zusammen. Beim „Wanderungsschritt“ bewegt sich die mobile Phase entsprechend dem Verteilungsverhältnis (in diesem Falle 1:1 für die wechselwirkende Komponente). Abbildung 10 veranschaulicht sechs aufeinander folgende Schritte von Wanderung und Gleichgewichtseinstellung: Im idealen Fall werden schon bei einer derart geringen Zahl von „Böden“ die beiden Probenkomponenten getrennt.

Im Gegensatz zu Abbildung 10 besteht eine chromatographische Trennsäule aus einer möglichst großen Anzahl „theoretischer Böden“. Deshalb werden die Probenkomponenten während des chromatographischen Trennprozesses mehr und mehr getrennt und nach unterschiedlichen Zeiten aus der Säule ausgetragen. Als erste Komponente wird diejenige eluiert, die am wenigsten mit der stationären Phase wechselwirkt, also auch am wenigsten zurückgehalten wird. Die anderen Probenkomponenten eluieren nacheinander entsprechend der Stärke, mit der sie von der stationären Phase zurückgehalten werden. Je mehr das Verteilungsgleichgewicht einer Komponente auf Seiten der stationären Phase liegt, umso länger verbleibt diese auf der Säule und wird entsprechend später von der Säule eluiert.

Da jede Probenkomponente in der Säule in mehreren „theoretischen Böden“ anwesend sein wird (siehe die schwarzen Punkte in Abbildung 10), wird ihre Konzentration in diesen „Böden“ unterschiedlich sein, wobei sich eine Gauß-Verteilung ergibt, die schon bei der geringen Anzahl „theoretischer Böden“ in Abbildung 10 (unten) erkennbar ist. Die Elutionszeit, die Differenz zwischen der Startzeit und dem Maximum dieser Verteilungskurve – dem chromatographischen Peak –, stellt die Gesamtretentionszeit des speziellen Analyten dar.

Die Sorptions-Desorptions-Schritte ergeben im Gleichgewicht eine Konzentrationsverteilung zwischen den beiden Phasen. Das Verhältnis der

Experimenteller Teil

Konzentration des Analyten in der stationären Phase zu seiner Konzentration in der mobilen Phase ist der Verteilungskoeffizient (K) des Analyten:

$$K = \text{Konz. in der stationären Phase} / \text{Konz. in der mobilen Phase} \quad (2.1)$$

Der Verteilungskoeffizient drückt aus, wie stark eine Substanz in der stationären Phase im Vergleich zur mobilen Phase zurückgehalten wird. Probenkomponenten mit kleinerem Verteilungskoeffizienten eluieren vor denjenigen mit größeren Verteilungskoeffizienten.

In der Verteilungschromatographie wird die Konzentration als Masse (W) pro Volumen (V) der Phase ausgedrückt:

$$K = \frac{W_{i(S)} / V_S}{W_{i(M)} / V_M} = \frac{W_{i(S)}}{W_{i(M)}} \cdot \frac{V_M}{V_S} \quad (2.2)$$

$W_{i(S)}$ und $W_{i(M)}$ sind die Massen des Analyten in der stationären bzw. mobilen Phase, V_S und V_M die Volumina der stationären bzw. mobilen Phase.

Der Verteilungskoeffizient ist ein substanzspezifischer Parameter, der in einer gegebenen stationären Phase und bei einer festliegenden Temperatur unabhängig von anderen Parametern ist (z. B. der Menge der beiden Phasen in der Säule). Im Allgemeinen kann angenommen werden, dass der Verteilungskoeffizient von der Gesamtkonzentration des Analyten unabhängig ist.

Thermodynamisch kann der Verteilungskoeffizient als Funktion des Sättigungsdampfdrucks (p^0), des Aktivitätskoeffizienten des Analyten (γ^0) in der stationären Phase, der Dichte (ρ_S) und der Molmasse (M_S) der stationären Phase sowie der (absoluten) Säulentemperatur (T_C) angegeben werden:

$$K = \frac{\rho_S \cdot R \cdot T_C}{p^0 \cdot \gamma^0 \cdot M_S} \quad (2.3)$$

Experimenteller Teil

Die Temperaturabhängigkeit des Verteilungskoeffizienten kann durch die folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\log K = \frac{A}{T_C} + B \quad (2.4)$$

Dabei ist T_C die absolute Säulentemperatur; A und B sind Konstanten. Bei höheren Temperaturen wird der Wert von K kleiner, und der Analyt wird früher eluiert.

In einem relativ engen Temperaturbereich kann die Beziehung zwischen $\log K$ und T_C durch eine lineare Gleichung angenähert werden:

$$\log K = A' \cdot T_C + B' \quad (2.5)$$

A' und B' sind wieder Konstanten.

Aus der vorangegangenen Darstellung geht hervor, dass der chromatographische Trennprozeß auf unterschiedlichen, spezifischen Affinitäten der Probenkomponenten zur stationären Phase beruht und von der Temperatur abhängt.

2.2 Derivatisierungsmethoden für die Gaschromatographie

Eine Derivatisierung von Probenkomponenten ist in der Gaschromatographie immer dann nötig, wenn sich während der Analyse aus den nicht derivatisierten Komponenten Zersetzungsprodukte bilden können, oder wenn die beobachteten Signale trotz sichergestellter Inertheit der Trennsäule asymmetrisch bleiben. Häufig wird diese Art der Probenvorbereitung deshalb bei polaren Verbindungen mit aktiven Protonen, z.B. Alkohole (R-OH), Amide (R-CO(NH₂)), etc. eingesetzt. Eine Derivatisierung kann aber auch dann sinnvoll sein, wenn die Verdampfbarkeit der Analysekomponenten aufgrund von intermolekularen Wasserstoffbrücken erschwert ist. So wird die Flüchtigkeit der freien Fettsäuren durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carboxylgruppen stark reduziert. Die Derivatisierung sollte allerdings nur dann angewandt werden, wenn sich von den Probensubstanzen nur ein einziges reproduzierbares Derivat in einer ökonomisch zu vertretenden Zeit quantitativ herstellen lässt. [71] In diesen Fällen liefert die Derivatisierung folgende Verbesserungen:

- erleichterte Trennung
- Steigerung der thermischen Stabilität
- verbesserte Flüchtigkeit bei schwerflüchtigen Substanzen
- niedrigere Nachweisgrenze infolge verbesserter Peaksymmetrie
- selektive Detektierbarkeit durch Einführung detektorspezifischer Gruppen (z.B. ECD; GC/MS)

2.2.1 Auswahl der Derivatisierungsmittel

Je nach Art und Beschaffenheit des reaktiven Zentrums der Analyten empfehlen sich verschiedene Methoden und Reagenzien zur Derivatisierung. [71] Bei Ihrer Auswahl (Tabelle 1) sind sowohl Aspekte der einfachen Durchführbarkeit, des Erreichens eines möglichst quantitativen Umsatzes und der Auswirkung auf die Nachweisbarkeit der Komponenten im ausgewählten Detektor zu berücksichtigen.

Experimenteller Teil

Tabelle 1: für verschiedene reaktive Zentren können unterschiedliche Derivatisierungsmittel zu Einsatz kommen

funkt. Gruppe	Methode	empfohlene Derivat.-Mittel
Alkohole+ Phenole	Silylierung	BSA, BSTFA, MSTFA, MSHFBA, TSIM
	Acylierung	TFAA, HFBA, MBTFA, MBHFBA
	Methylierung	TMAH, TMSH
primäre + sekundäre Amine Hydrochloride	Silylierung	BSA, MSTFA, MSGFBA,
	Acylierung	TFAA, HFBA, MBTFA, MBHFBA
	Silylierung	MSTFA
Aminosäuren	Silylierung	BSA, BSTFA, MSTFA, MSHFBA
	Methylierung	Methanol/TMCS, TMSH
Amide	Acylierung	TFAA, HFBA, MBTFA, MBHFBA
	Acylierung	TFAA, MBTFA, HFBA, MBHFBA
Carbonsäuren (Fettsäuren)	Silylierung	BSA, MSTFA, MSHFBA, TMCS, TSIM
	Methylierung	DMF-DMA, Methanol/TMCS (1M), TMSH
Salze	Silylierung	TMCS
Kohlenhydrate	Silylierung	MSA, MSTFA, TSIM
	Acylierung	TFAA, MBTFA

Für eine große Zahl reaktiver Zentren sind Derivatisierungsmittel in Form von benutzungsfertigen Reagenzien im Handel erhältlich. Jedoch kann auch bei diesen kommerzieller Reagenzien auf eine anwendungsbezogene Optimierung nicht verzichtet werden. In Tabelle 2 und Tabelle 3 sind der Übersicht wegen die wichtigsten kommerziell erhältlichen Reagenzien für Silylierung und Methylierung zusammengefasst.

Tabelle 2: Reagenzien für die Methylierung

Bezeichnung	Code
<i>N,N</i> -Dimethylformamid-dimethylacetal	DMF-DMA
Trimethylanilinhydroxid, (0,2 M in Methanol)	TMAH
Trimethylsulfonium-hydroxid, (0,2 M in Methanol)	TMSH

Tabelle 3: Reagenzien für die Silylierung

Bezeichnung	Code
1,3-bis(Chlormethyl)-1,1,3,3-tetramethylsilazan	BCM-TMDS
<i>N,O</i> -bis-Trimethylsilyl-acetamid	BSA
<i>N,N</i> -bis-Trimethylsilyltrifluor-acetamid	BSTFA
Dimethyldichlorsilan	DMCS
Hexamethyldisilazan	HMDS
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyl-acetamid	MSA
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyl-heptafluorbutyramid	MSHFBA
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyl-trifluoracetamid	MSTFA
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -tert.-butyl-dimethyl-silyltrifluoracetamid	MBDSTFA
Trimethylchlorsilan	TMCS
Trimethylsilylacid	TMSA
<i>N</i> -Trimethylsilyldiethylamin	TMSDEA
<i>N</i> -Trimethylimidazol	TSIM
BSA-HMDS-TSIM (2:7:1)	Silyl-271
TSIM-Pyridin (11:39)	Silyl-1139
HMDS-TMCS (2:1)	Silyl-21
HMDS-TMCS-Pyridin (2:1:10)	Silyl-2110
BSTFA-TMCS (99:1)	Silyl-991

2.2.2 Durchführung der Derivatisierung

2.2.2.1 Methylierung

Für die im Rahmen dieser Arbeit analysierten freien Fettsäuren finden in der Praxis vor allem drei Methoden zur Methylierung der Carboxylgruppe Anwendung:

Methanol/TMCS

Die Methode der Derivatisierung mit Methanol / TMCS ist zur Veresterung von freien Carbonsäuren und zur Umesterung von Glyceriden geeignet. Das als Nebenprodukt entstehende HCl katalysiert die Veresterung. Mit Hilfe von TMCS bzw. Silyl-Ether wird Wasser dem Reaktionsgleichgewicht entzogen, so dass ein vollständiger Umsatz gewährleistet ist.

Für die Derivatisierungsreaktion wird eine 1M Lösung TMCS in Methanol hergestellt. Zu 1 ml dieser frisch angesetzten Lösung werden nun ca. 50 mg Analysesubstanz zugegeben, und erhitzt. Nach der Reaktion wird das Produkt im Stickstoffstrom eingengt, und in n-Hexan aufgenommen und in die Injektoreinheit injiziert.

DMF-DMA

Neben dem Einsatz von TMCS / Methanol eignet sich auch eine äquimolare Mischung von N,N-Dimethylformamidmethylacetal (DMF-DMA) zur Methylierung freier Fettsäuren. Darüber hinaus kann dieses Reagenz auch zur Derivatisierung von primären Aminen und in manchen Fällen von Aminosäuren eingesetzt werden.

Da die Löslichkeit der angesprochenen Analyten in diese Mischung aber nicht allzu ausgeprägt ist, sollten diese zuvor in anderen Lösungsmitteln wie z.B. Benzol, Pyridin, THF etc. aufgenommen werden. 50 mg der Analytenlösung werden dann zu 1 ml der Reagenzienmischung gegeben. Nachdem die Lösung aufgeklart ist, kann sie injiziert werden. In der Praxis hat sich jedoch ein Erwärmen der Mischung für ca. 15 Minuten auf 60 °C als vorteilhaft erwiesen.

TMSH

Die schnellste und einfachste Art der Probenvorbereitung stellt eine Derivatisierung mit einer 0,2 M Lösung von Trimethylsulfoniumhydroxid in Methanol da. Diese Methode eignet sich zur Methylierung von Säuren, deren Salzen und Derivaten und von Phenolen.

Zur Umsetzung werden 100 mg der Probe in 5 ml eines geeigneten, reaktionsträgen Lösungsmittels gelöst. Nach Zugabe von 10ml des Reagenzes kann die Lösung ohne Zeitverzug injiziert werden. Die Injektortemperatur sollte nicht unter 250°C liegen, um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten. Werden an die Qualität der Analyse sehr hohe Anforderungen gestellt, kann eine vollständige Umsetzung durch 10 minütiges Erhitzen auf 100°C erzielt werden. Bei dieser Methode pyrolysierten die überschüssigen Reagenzien zu nicht störenden Verbindungen.

2.2.2.2 Silylierung

Neben der Methylierung bietet sich zur Derivatisierung freier Fettsäuren auch die Silylierung an [72]. Für gaschromatographische Anwendungen kommen in der Regel Silylierungsreagenzien zum Einsatz, die aktive Protonen gegen eine Trimethylsilylgruppe austauschen. Andere Silylierungen, z.B. durch Trialkylsilylverbindungen oder Dimethylalkylsilylverbindungen mit längeren Alkylketten werden dagegen eher selten genutzt. Die Flüchtigkeit und die thermische Stabilität werden durch Einsatz der Trialkylsilylgruppen erhöht.

Die Silylierung kann durch Zugabe von Pyridin oder TSIM basisch und durch Zugabe von TMCS sauer katalysiert werden.

Experimenteller Teil

BSA, BSTFA, SILYL-991

Diese Silylierungsreagenzien eignen sich für Alkohole, Aminosäuren, aromatische Säuren, Phenole, Nucleotide und Steroide.

BSA und BSTFA silylieren mit Ausnahme von Kohlenhydraten und niedrigmolekularen Reagenzien alle oben angegebenen Verbindungen. BSTFA liefert flüchtigere Reaktionsprodukte, was gerne bei der Analyse niedrigsiedender TMS-Aminosäuren ausgenutzt wird. Beide werden häufig mit anderen Lösungsmitteln oder Silylierungsmitteln gemischt. Eine dieser Reagenzienmischungen ist SILYL-991, ein Gemisch aus BSTFA mit 1% TMCS, welches im Rahmen dieser Arbeit vorwiegend Anwendung findet.

Die Durchführung der Derivatisierungsreaktion gestaltet sich wie auch schon bei den Methoden zur Methylierung sehr einfach. 0,5 ml des Silylierungsmittels werden zu maximal 10 mg der Probe gegeben. Als Lösungsmittel kann hierbei Pyridin verwendet werden. Nach Erhitzen auf 60°C bis 80°C, was einer schnelleren Umsetzung dient, kann die Lösung in den Gaschromatographen injiziert werden. Das Erhitzen erweist sich aber besonders bei den reaktiven Protonen freier Fettsäuren als überflüssig.

MSTFA, MSHFBA

MSTFA und MSHFBA sind flüchtige und sehr reaktive Reagenzien zur Trimethylsilylierung. Aufgrund des in beiden Verbindungen enthaltenen Fluors sind diese Substanzen sehr gut bei Verwendung eines Flammenionisationsdetektors geeignet. Bei der Detektion des Silylierungsmittelüberschusses bildet sich nicht, wie sonst üblich verunreinigendes SiO₂, sondern flüchtige Siliziumverbindungen, die den Flammenionisationsdetektor weder verschmutzen noch korrodieren. Diese Methode kann zur Silylierung von Alkoholen, Phenolen, Carbonsäuren, Aminosäuren sowie primären und sekundären Aminen eingesetzt werden.

Experimenteller Teil

Die Silylierung erfolgt auch hier nach Lösen von 1 bis 2 mg der Probe in 100µl TFA durch tropfenweise Zugabe von 0,9 ml Silylierungsmittel. Hierbei kommt es zu einer exothermen Reaktion. Daher ist die Lösung erst nach dem Erkalten injektionsfähig.

BSA unter Zusatz weiterer Silylierungsmittel

Der Vollständigkeit halber sei hier noch die Silylierung durch BSA-Silylierungsgemische erwähnt. Diese eignen sich für Steroide sowie für primäre und sekundäre Amine. BSA silyliert alle sterisch ungehinderten Hydroxylgruppen am Steroidgerüst. Der Zusatz von TMCS führt zu einer Umsetzung auch von mäßig gehinderten Hydroxylgruppen (Reaktionszeit 3 bis 6 Stunden bei 60°C). Bei stark gehinderten Hydroxylgruppen ist der Zusatz von TSIM zu empfehlen (Reaktionszeit 6 bis 24 Stunden bei 60 °C).

2.3 Planung und Durchführung gaschromatographischer Experimente

2.3.1 Probenvorbereitung

2.3.1.1 Extraktion

Bei der Analyse von lipophilen Substanzen wie Fettsäuren in einer komplexen Matrix ist vor der eigentlichen Analyse ein Aufreinigungsschritt notwendig. Dies gilt besonders für gaschromatographische Analyseverfahren, da nicht verdampfbare Substanzen wie Zucker eine präzise Analyse unmöglich machen würden. Die klassische Art der Probenvorbereitung, die Extraktion im Scheidetrichter ist hierbei jedoch mit gravierenden Nachteilen verbunden. Eine quantitative Extraktion erfordert mehrere Extraktionsschritte, was das Probenvolumen stark vergrößert und die Analytenkonzentration reduziert. Auch aus Umweltaspekten ist der damit verbundene hohe Lösungsmittelverbrauch als Nachteil zu werten. Darüber hinaus neigen besonders biologische Matrices zur Bildung von Emulsionen, was eine Trennung der Phasen teilweise unmöglich macht. Besonders im Hinblick auf die sauerstoffempfindlichen Wax-Phasen, mit denen GC-Säulen zur Fettsäureanalytik oftmals beschichtet sind, ist bei der klassischen flüssig-flüssig Extraktion ein nachgeschalteter Trocknungsschritt notwendig. Durch den Einsatz von Festphasenextraktionssäulen der Fa. Merck, Extrelut NT [73], können all diese Nachteile der klassischen Extraktion umgangen werden.

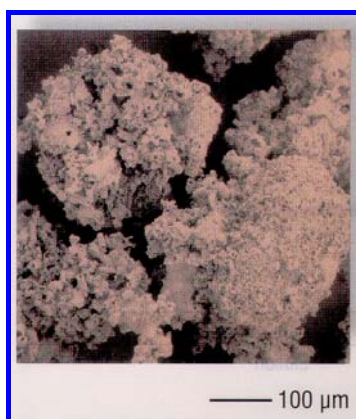


Abbildung 11: Rasterelektronenmikroskopaufnahme des Extrelut NT Säulenmaterials

Nach Aufgabe der abgemessenen wässrigen Probe auf das trockene Trägermaterial verteilt sich die wässrige Phase auf der chemisch inerten Kieselgur Matrix und wirkt so als stationäre Phase. Die zu analysierenden lipophilen Komponenten werden mit einem

Experimenteller Teil

geeigneten nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittel eluiert. Hierbei treten alle lipophilen Substanzen in die organische Phase über. Die wässrige Phase verbleibt auf dem Trägermaterial [73].

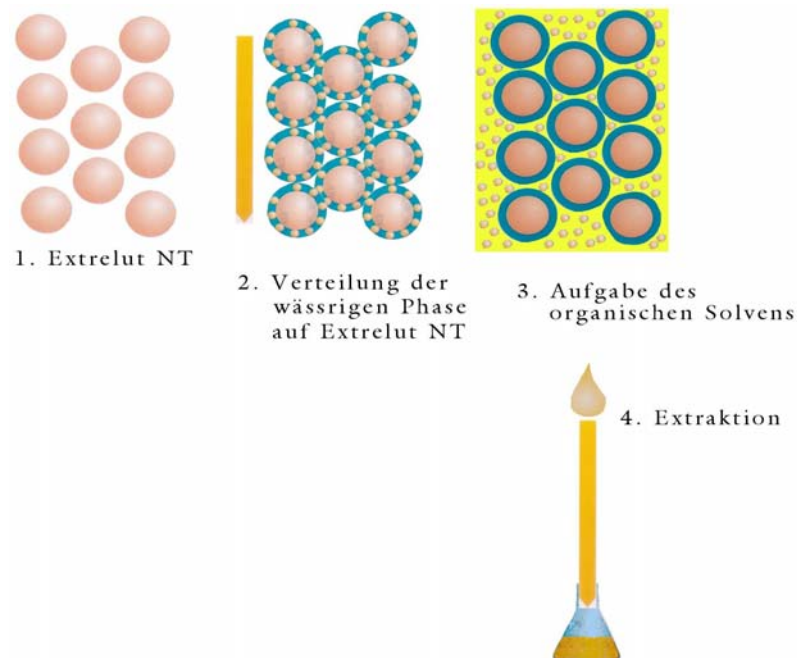


Abbildung 12: Funktionsprinzip der Festphasenextraktion mit Extrelut NT Säulen der Fa. Merck

Diese Form der Extraktion vereint viele Vorteile auf sich. Einerseits ist der aufwendige Trocknungsschritt nicht notwendig, andererseits ist das Verhältnis zwischen den Volumina der wässrigen Phase und der benötigten Menge organischer Lösungsmittel mit 1:5 recht günstig. Der entscheidende Aspekt für den Einsatz solcher Extraktionssäulen bei der Extraktion lipophiler Substanzen aus biologischen Matrices ist jedoch die Vermeidung der Emulsionsbildung. Biologische Medien wie Blut-Seren oder auch die hier untersuchten Phospholipide bilden bei der klassischen flüssig/flüssig Extraktion vielfach stabile Emulsionen, die eine extractive Trennung verhindern. Ein weiterer Vorteil der Extraktionssäulen liegt in der Unempfindlichkeit gegenüber Säuren und Basen. Die Säulen können über einen weiten pH-Bereich von pH 1 bis pH 13 eingesetzt werden [73]. Hierdurch können Lösungen verschiedener pH-Werte eingesetzt werden, was eine mehrstufige Auftrennung ermöglicht. Nicht nur bezüglich der pH-Werte der zu extrahierenden wässrigen Phase, sondern auch hinsichtlich des zu verwendenden Lösungsmittelspektrums zeichnet sich dieses Verfahren durch eine hohe Universalität aus. Die Wahl der organischen Phase kann somit rein nach Kriterien der gaschromatographischen Anforderungen erfolgen [73].

Experimenteller Teil

Fettsäuren sind vor der gaschromatographischen Analyse zu derivatisieren, um die Flüchtigkeit zu erhöhen. Die Auswahl der Lösungsmittel hat also neben einer möglichst quantitativen Extraktion auch nach Kriterien der Derivatisierungsreaktion zu erfolgen. Als besonders geeignet erwiesen sich unpolare Lösungsmittel mit aprotischem Charakter wie Dimethylformamid oder Chloroform, da sie keine reaktiven Zentren für die Derivatisierungsreaktion enthalten. In ersten Versuchen wurde DMF eingesetzt. Diese Versuche wurden allerdings aufgegeben, da durch den hohen Siedepunkt von DMF das Eindampfen nach der Extraktion hohe Temperaturen erforderte, die zur Zersetzung langkettiger Fettsäuren führen können. Der Einsatz von Chloroform anstelle von DMF reduzierte nicht nur die zum Einengen notwendige Temperatur, sondern beschleunigte das Aufkonzentrieren der Lösung auch deutlich.

2.3.1.2 Derivatisierung

Aufgrund Ihrer ausgeprägten Neigung zur Bildung intermolekularer Wasserstoffbrücken weisen freie Fettsäuren einen sehr hohen Siedepunkt auf. Durch Derivatisierung der Carboxylgruppe kann die Flüchtigkeit deutlich gesteigert werden.

Die in der Literatur beschriebene Methode der Veresterung zu Fettsäuremethylestern [74] erwies sich hier als schlecht praktikabel, da sich die Fettsäuremethylester teilweise im Injektor ablagerten, und es somit zur Verschleppung des Analyten zwischen zwei Analyseläufen kam.

Eine alternative Methode zur Derivatisierung freier Fettsäuren stellt die Silylierung der Carboxylgruppe dar. Hierbei wird das acide Proton der Carboxylgruppe durch einen Trimethylsilylrest ersetzt. Neben der Reduktion des Siedepunktes liegt ein weiterer Vorteil dieser Methode in der Einführung dreier weiterer Methyl-Gruppen in jedes Fettsäuremolekül, was die Empfindlichkeit des Flammenionisationsdetektors steigert, und somit die Nachweisgrenze herabsetzt. In allen Versuchen erfolgte die Silylierung durch Einsatz eines Silylierungsreagenzes der Fa. Supelco. Hierbei handelt es sich um ein 1:99 Gemisch aus BSTFA (Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid) und TMCS (Trimethylchlorsilan). Zu jeder Probe die ein Standardvolumen von 1,5 ml aufwies, wurden 0,15 ml des Derivatisierungsreagenzes zugesetzt. Die Derivatisierungsreaktion läuft bei Raumtemperatur quantitativ ab.

2.3.2 Gaschromatographische Methodenentwicklung

Die Entwicklung einer gaschromatographischen Analysemethode ist immer eine Optimierung hinsichtlich Trennleistung, Nachweisgrenze und Reproduzierbarkeit bezüglich der zu analysierenden Substanzen. Bei Gaschromatographen älterer Bauart stellt die Ofentemperatur, in dem sich die Trennsäule befindet, den einzigen variablen Parameter dar. Die Temperatur des Injektors und des Detektors ist vor dem Versuch fest einzustellen. Ebenso sind der Trägergasstrom und der Split-Flow fixe Größen. Bei dem hier verwendeten Gaschromatographen neuester Bauart (Perkin Elmer Autosystem XL) sind all diese Parameter, außer der Detektortemperatur, variabel. Hierdurch ergibt sich eine Vielzahl analytischer Möglichkeiten, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

2.3.2.1 Injektortemperatur

Die richtige Einstellung der Injektortemperatur hat einen großen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Analyse.

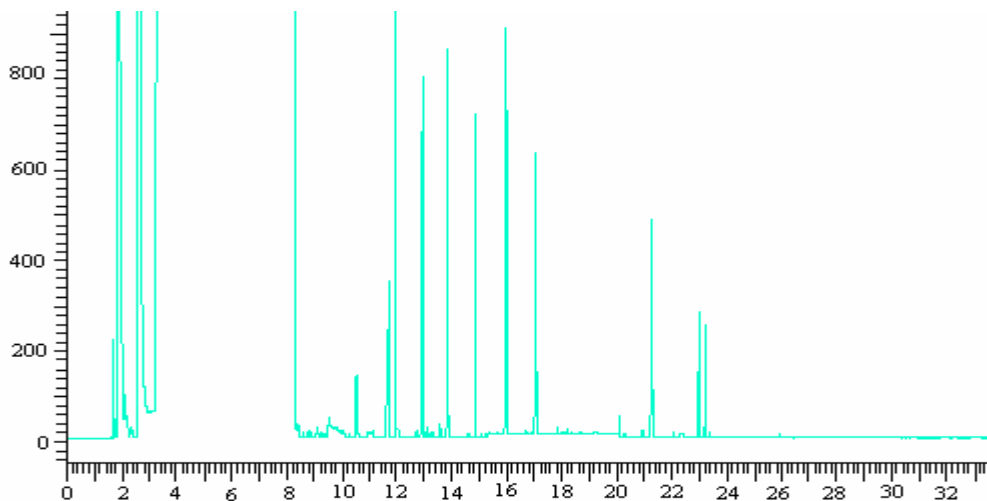


Abbildung 13: Fettsäurechromatogram mit Diskriminierung (schwächeres Signal bei ähnlicher Konzentration) der langkettigen Fettsäuren (Einwaage je 10 mg/50ml). Das Detektorsignal in mV ist gegen die Laufzeit in Minuten aufgetragen

Experimenteller Teil

Wie aus Abbildung 13 zu ersehen, kann eine falsche Wahl der Injektortemperatur zu einer Diskriminierung einzelner Probenbestandteile führen. Hier sind die Signale der langkettigen Fettsäuren im Vergleich zu den Signalen der kürzerkettigen in der Signalintensität stark reduziert, obwohl alle Komponenten in gleicher Menge vorlagen.

Eine zu tiefe Injektortemperatur verhindert das vollständige Verdampfen der Probe und ist somit auf jeden Fall zu vermeiden. Bei modernen Anlagen kann die Injektortemperatur als Funktion der Zeit programmiert werden, also einen großen Temperaturbereich abdecken. Das langsame Aufheizen des Verdampfungsrohres verhindert zuverlässig die Diskriminierung einzelner Probenbestandteile und verbessert die Analyse hierdurch beträchtlich im Hinblick auf die Nachweisgrenze. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 14 dargestellt. Im Vergleich zu Abbildung 13 ist die Diskriminierung hier deutlich reduziert.

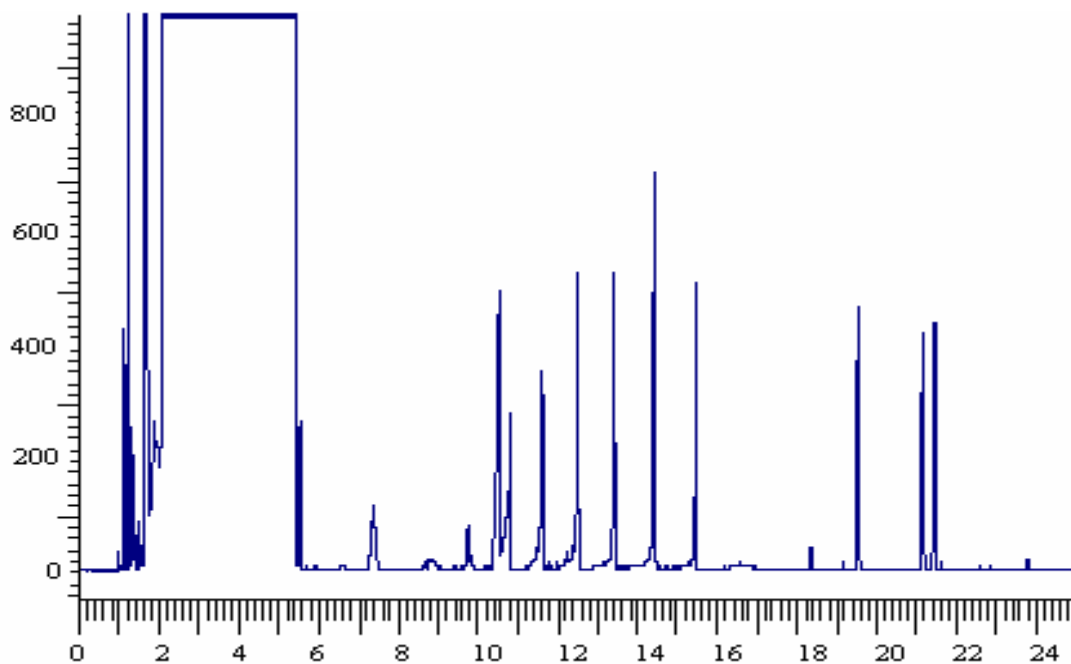


Abbildung 14: Chromatogram eines Fettsäuregemisches mit reduzierter Diskriminierung (schwächeres Signal bei ähnlicher Konzentration, Einwaage je 10mg/50ml) der langkettigen Fettsäuren. Das Detektorsignal in mV ist gegen die Laufzeit in Minuten aufgetragen

2.3.2.2 Detektortemperatur

Die Temperatur des FID ist der einzige nicht variable Parameter moderner Gaschromatographen. Da seine Temperatur keinen bedeutenden Einfluss auf die Analyse hat, kann hier ein fester Wert eingestellt werden, der während des gesamten Analyseverlaufes konstant ist. Die Temperatur ist lediglich ausreichend hoch zu wählen, um eine Kondensation der Probesubstanz im Detektor zu verhindern. Die Temperatur des Detektors sollte also in jedem Fall immer deutlich über der maximalen Säulentemperatur liegen.

2.3.2.3 Säulentemperatur

Generell gibt es zwei Möglichkeiten, einen Gaschromatographen zu betreiben. Die Option ein isothermes Temperaturprogramm zu wählen, kommt vor allem bei Gemischen von Komponenten mit ähnlichen Siedepunkten zum Einsatz. Hierbei ist zu beachten, dass die Trennleistung mit steigender Temperatur stark abnimmt. Für viele Substanzen halbiert sich der k-Wert (Index für die Trennleistung) mit einer Temperaturerhöhung von 15 bis 20°C.

Wenn jedoch die einzelnen Komponenten einer Probe sehr unterschiedliche Siedepunkte aufweisen, kann auf eine Methode mit einem Temperaturgradienten zurückgegriffen werden. Diese Vorgehensweise empfiehlt sich auch bei der Analyse unbekannter Proben, da hier zu der Trennung unter Ausnutzung der Unterschiede im Verteilungsgleichgewicht der Komponenten zwischen mobiler und stationärer Phase auch eine Trennung über die Unterschiede in den Siedepunkten erfolgt. Außerdem kann ein großer Temperaturbereich als Möglichkeit zum Erhalt eines Übersichtsspektrums genutzt werden.

2.3.2.4 Trägergas

Trägergas und Trägergasstrom beeinflussen die Trennung in der Säule. Für jede Gasart und Säule gibt es eine optimale lineare Vortriebsgeschwindigkeit des Gasstromes. Diese Gasgeschwindigkeit ist abhängig von der Viskosität des gewählten Trägergases, dem freien Querschnitt und der Länge der Trennsäule. Die idealen linearen

Experimenteller Teil

Gasgeschwindigkeiten sind der Tabelle 4 für vier Säulendurchmesser und drei verschiedene Gase zu entnehmen.

Säulendurchmesser	Helium [ml/min]	Wasserstoff [ml/min]	Stickstoff [ml/min]
0,15 mm	0,5	0,6	0,2
0,25 mm	0,8	1,2	0,5
0,32 mm	1,0	1,6	0,6
0,53 mm	2-9	3-12	1-5

Tabelle 4: optimale Trägergasgeschwindigkeiten für verschiedene Trägergase und Säulendurchmesser [75]

2.3.2.5 Splitfluss

Der Splitfluss ist das über das Splitventil eingestellte Verhältnis zwischen dem Gasstrom zur Trennsäule und einem aus dem gesamten Trägergasstrom abgetrennten Anteil. Hierdurch wird der Anteil des Trägergasstromes definiert, der auf die Trennsäule gelangt. Der Split reduziert also das injizierte Probenvolumen in genau definierbarem Maße. Eine Injektion eines geringeren Probenvolumens hätte wegen mechanischer Ungenauigkeiten gravierende Nachteile. Diese Methode steigert die Genauigkeit der Probenaufgabe. Bei der hier eingesetzten „wide-bore“ Säule ist ein Split-Verhältnis zwischen 1:5 und 1:20 ideal. Ein solches Splitverhältnis reduziert das Injektionsvolumen von 6 µl auf ein Probenvolumen von 1-0,25 µl auf der Säule.

2.3.2.6 Identifizierung und Integration

Die Identifizierung einzelner Komponenten kann beim Einsatz eines Flammenionisationsdetektors (FID) nur durch Retentionszeitvergleiche mit Standardproben bekannter Zusammensetzung erfolgen. Unter der Voraussetzung einer hinreichend hohen Auflösung ist die Retentionszeit charakteristisch für jede Komponente. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierfür eine Fettsäure-Referenzlösung hergestellt [75].

2.3.3 Methode für die Fettsäureanalyse

Bei der Wahl der chromatographischen Parameter ist neben der Beschaffenheit und Art der Analyten auch die Reinheit der Proben zu berücksichtigen. Methodenbedingt ist bei der Entwicklung eines gaschromatographischen Verfahrens für die Analyse freier Fettsäuren aus Reaktionsproben davon auszugehen, dass auch die extrahierte Probe noch einen deutlichen Anteil an Proteinresten und sonstigen Verunreinigungen enthält.

Eine gaschromatographische Methode ist generell in drei Teilschritte zerlegbar. Der erste Schritt besteht aus dem Verdampfen und dem Aufbringen der Analyten auf die Trennsäule. In diesem ersten Vorbereitungsschritt kann auch die Abtrennung unerwünschter Probenbestandteile erfolgen. Hieran schließt sich der eigentliche Trennschritt an, in dem die Analyten auf der Säule aufgespalten und im Detektor nachgewiesen werden. Im dritten und letzten Schritt des Analyselaufs werden dann alle Komponenten des Gaschromatographen ausgeheizt und hierdurch alle Probenreste aus der Anlage ausgetragen.

Der Auftrag der Probe auf die Trennsäule bei einer Temperatur oberhalb des Siedepunktes der am höchsten siedenden in der Probelösung vorkommenden Fettsäure. Nachdem diese Temperatur für eine bestimmte Zeit, meist 2 bis 5 Minuten, gehalten wurde, wird der Injektor für weitere 5 min auf Maximaltemperatur erhitzt, um alle höher siedenden Komponenten zu verdampfen und den Inliner (das Verdampfungsröhrchen) zu reinigen. Zur Vermeidung des Auftrags dieser Komponenten auf die Säule, und damit deren Konterminierung, wird zu diesem Zeitpunkt der Split (2.3.2.5) ausgehend von einem Verhältnis von 5:1 bis 20:1 auf 100:1 geöffnet. Somit werden die im zweiten Schritt verdampften Komponenten durch den Split aus der Anlage entfernt und gelangen so nur zu einem unbedeutenden Bruchteil auf die Säule.

Experimenteller Teil

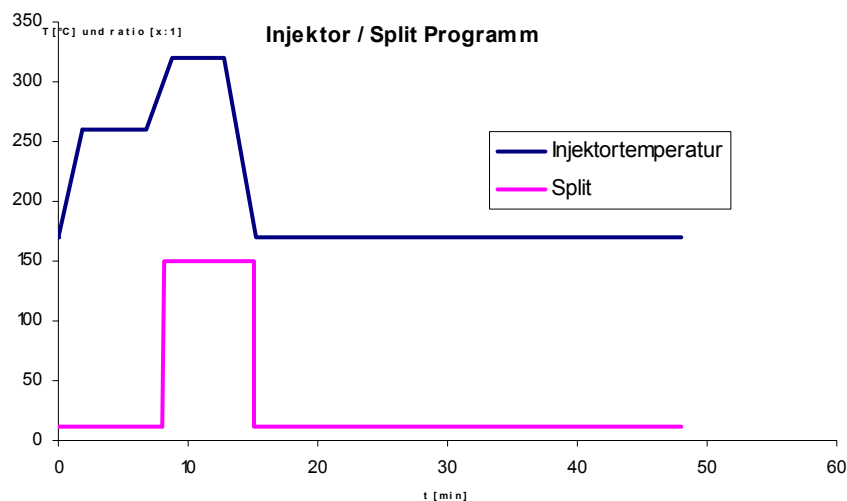


Abbildung 15: erster Verdampfungs- und Auftrennungsschritt einer gaschromatographischen Methode

Bei sehr großer Probenverdünnung kann gegebenenfalls die Analytenkonzentration für eine präzise Analyse zu gering sein. Da aber handelsübliche Verdampfungsröhrchen maximal das Gasvolumen, das 5 μl einer flüssigen Probe entspricht, aufnehmen können, kann diese Splitveränderung auch genutzt werden, um bis zu 50 μl Probe im Verdampfungsrohr aufzukonzentrieren. Hierbei wird die Probe bei einem Split von 1:100 und einer Injektortemperatur über dem Siedepunkt des Lösungsmittels, aber deutlich unter dem Siedepunkt des am leichtesten flüchtigen Analyten injiziert. Hierdurch wird das Lösungsmittel im Injektor abdestilliert und die Probe aufkonzentriert.

Eine Veränderung des Split-Flow während eines Analyselaufes kann jedoch auch zum Ausheizen des Injektors während des Analyselaufes verwendet werden. Zum Ausheizen wird der Split auf ein Verhältnis von 100:1 gesetzt, was für jedes Volumenelement des Trägergases, das in die Säule eintritt, 100 Volumenelemente an ihr vorbeileitet. Hierdurch können Reste schwer flüchtiger Bestandteile der Probe, die ansonsten die Säule beschädigen würden, an dieser vorbeigeleitet werden.

2.4 Free-Flow Elektrophorese

Bei der konventionellen Elektrophorese werden die Analyten auf ein statisches Trägermaterial aufgebracht. Die Fokussierung auf diesem Trägermaterial erfolgt bei angelegtem elektrischem Feld durch Unterschiede in den isoelektrischen Punkten der Proteine. Diese konventionelle Elektrophorese ist jedoch eine rein analytische Trennmethode. Mit dem Ziel, diese Trennmethode auch präparativ nutzen zu können, wird in der Literatur wiederholt über Experimente der kontinuierlichen isoelektrischen Fokussierung berichtet [76]. Diese Experimente wurden im strömenden Pufferfilm ohne jeglichen Träger durchgeführt.

Die in diesen Publikationen vorgestellte Trennleistung ist allerdings gering und keinesfalls vergleichbar mit der Trennleistung der analytischen PAGIEF- Methode [77,78].

Die Ergebnisse in der Publikation von *Mazereeuw et al.* [79] erreichen zwar die besten Resultate aller früheren Experimente, aber die Trennleistung ist auch hier noch nicht befriedigend.

Der von der Firma *Dr. Weber* entwickelte und apparativ umgesetzte CHIEF-Prozeß führt zu einer neuen Qualität in der isoelektrischen Fokussierung [80]. Dieser Prozess macht es möglich, die Trennleistung der analytischen PAGIEF in einem kontinuierlichen präparativem Trennverfahren zu erreichen.

2.4.1 OCTOPUS-CHIEF-Prozeß mit kommerziellen Ampholyten

Die für diesen Prozess entwickelte Apparatur besteht im Wesentlichen aus einem Fließbett mit im 90° Winkel zur Fließrichtung angeordneten Elektroden. Auf dieses geneigte Fließbett wird die Probe gemeinsam mit einem geeigneten Fließmittel aufgegeben.

Experimenteller Teil

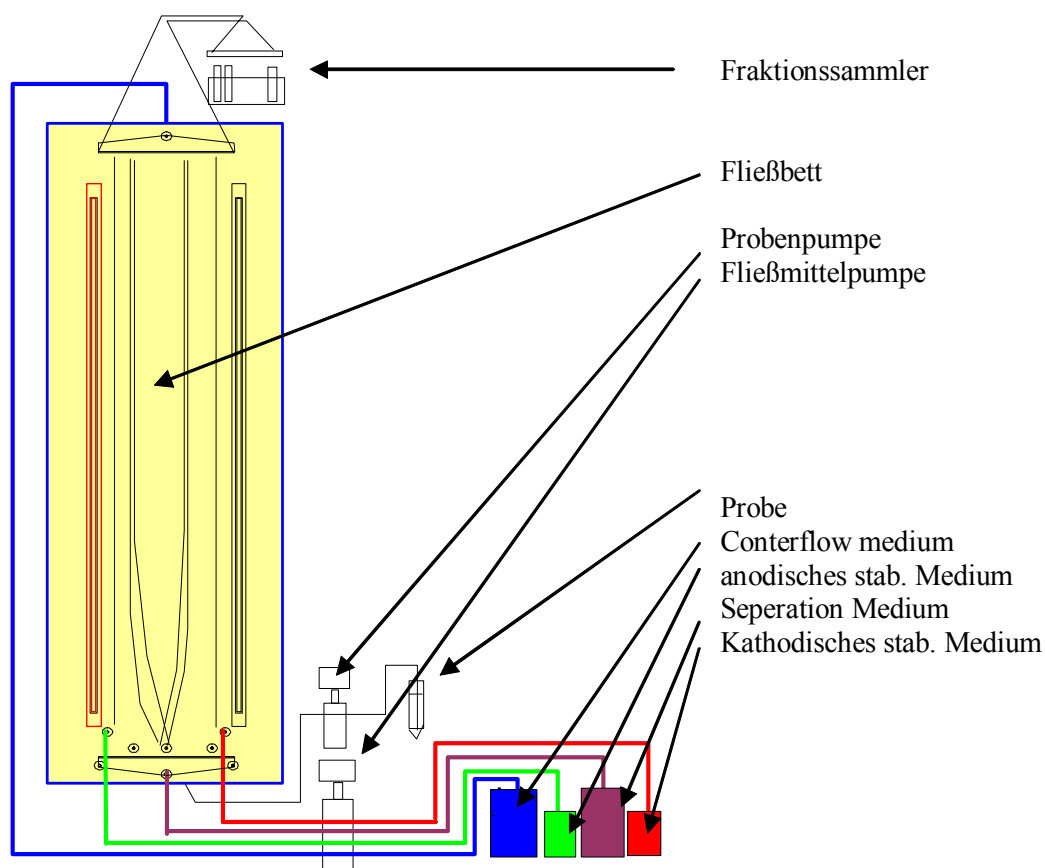


Abbildung 16: Apparativer Aufbau der Octopus-Anlage für den CHIEF-Prozeß

Ähnlich dem modernen PZE-Prozeß werden auch im CHIEF-Prozeß in den elektrodennahen Bereichen des Trennraumes sogenannte Stabilisierungsmedien verwendet. Das Stabilisierungsmedium des Anodenraumes ist in der Regel eine 100 mmol Phosphorsäurelösung mit den jeweiligen Additiven, wie sie in den Trennprotokollen empfohlen werden [81]. Das Stabilisierungsmedium des Kathodenraumes ist eine 100 mmol Natronlauge wiederum mit den empfohlenen Additiven.

Als Trennmedium wird eine 0.5 % ige Lösung eines kommerziell erhältlichen Ampholyten mit den jeweiligen Additiven eingesetzt.

Während des Durchlaufs der Medien durch den Trennraum wird am Anfang des Trennraumes der pH-Gradient gebildet. Nachfolgend werden die amphotereren Spezies

Experimenteller Teil

der Probe in diesem pH-Gradienten getrennt und im Bereich des Trennmediums mit einem pH-Wert entsprechend dem pI-Wert der Analyten fokussiert.

Die getrennten Probenspezies erreichen die Fraktionierung an verschiedenen Orten und werden in separaten Gefäßen gesammelt.

2.4.1.1 Additive

Zur probenspezifischen Optimierung des Trennverfahrens werden unterschiedliche Additive verwendet. Diese Additive sollen eine mögliche Präzipitation verhindern, eine Protein-Protein Interaktion minimieren und den Einfluss der Elektroosmose reduzieren [82]. Zu den häufig eingesetzten Additiven zählen neben Hydroxy-propylderivaten auch Methyl-cellulose, Polyäthylenglykole, Polyvinylpyrrolidon, Dextrane, Glycerin, Harnstoff, verschiedene Zucker und nichtionische Detergentien wie z.B. Triton, Tween, Octylglucoside, Octyl-POE.

Je nach Art und Konzentration der verwendeten Additive müssen die Trennparameter (Spannung und Verweilzeit) modifiziert werden. Eine gute Trennqualität kann nur erreicht werden, wenn die Dichte und Viskosität der Probe, des Trennmediums und der Stabilisierungsmedien angeglichen werden [83].

2.4.2 CHIEF-Prozeß mit „OCTOLYTES“

Die OCTOLYTES sind eine Mischung von definierten chemischen Verbindungen mit einem Molekulargewicht unter 280 Dalton. Je nach Anzahl und relativer Konzentration dieser Einzelverbindungen können Medien mit engen bzw. weitem pH-Intervall und einem beliebigen pH-Profil hergestellt werden.

2.4.3 CHIEF-Prozeß mit weitem pH-Intervall (3-10)

In einem CHIEF-Prozeß mit weitem pH-Intervall wird das Trennmedium über 5 Medieneinlässe in den Trennraum eingeführt. In speziellen Applikationen wird ein „Probenmedium“ verwendet [83]. Im Falle der kathodalen Probenaufgabe wird ein Probenmedium mit einem pH-Wert im Bereich von pH 8.5 bis 10.5 eingesetzt.

Experimenteller Teil

Hingegen wird bei anodaler Probenaufgabe ein pH-Wert des Probenmediums im pH-Bereich von 2.5 bis 4.5 gewählt.

2.4.4 CHIEF-Prozeß mit verschiedenen Medien mit engem pH-Intervall

In diesem Verfahren werden simultan mehrere Trennmedien in den Trennraum eingebracht, deren pH-Wert durch die Veränderung des Konzentrationsverhältnisses derart variiert wurde, daß der pH-Wert der Medien in der Richtung der Kathode in Stufen ansteigt. Der am Anfang des Trennraumes durch das Mischungsverhältnis in den Medien vorgegebene pH-Stufengradient wird mit zunehmender Dauer des Trennprozesses unter dem Einfluß des elektrischen Feldes in einen weitgehend linearen pH-Gradienten transformiert [83].

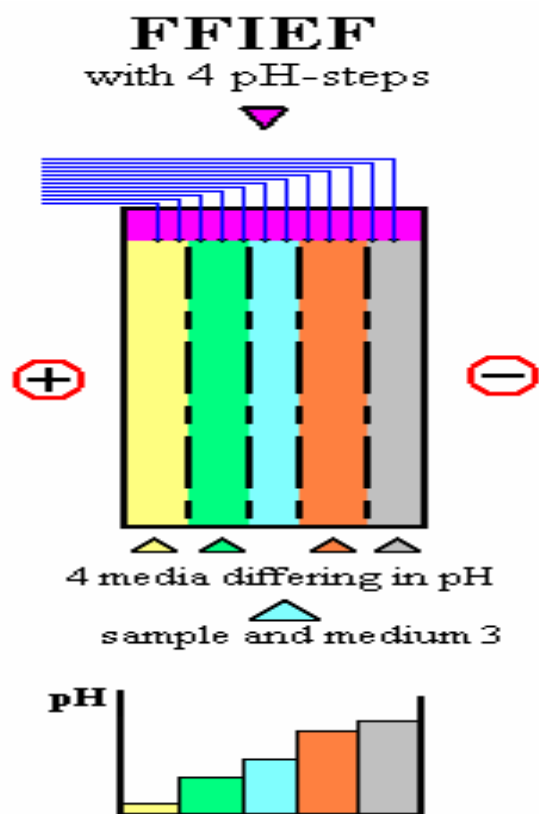


Abbildung 17: Apparativer Aufbau der Free Flow IEF

2.4.5 Modifizierte Verfahren der kontinuierlichen isoelektrischen Fokussierung

Der Probendurchsatz kann bei gut löslichen Proteinproben und Zugabe von „Octolyten“ in einem weiten pH-Intervall sehr deutlich erhöht werden. Dazu wird die Probe im gesamten Trennmedium oder in einem Teilstrom der Trennmedien im Verhältnis 1:5 bis 1:20 gelöst. Proben mit einem erhöhtem Gehalt an Salzen (50 bis 150 mmol) müssen mindestens um den Faktor 1:10 verdünnt werden [84].

2.4.6 Trennqualität und Probendurchsatz

Bei Verwendung von kommerziellen Ampholyten können in Trennmedien mit engem pH-Intervall Proteine mit geringen Differenzen des pI-Wertes (0.02 pI) getrennt werden.

Ähnlich gute Trennungen werden auch mit den pH-Gradienten der oben beschriebenen binären Mischungen erzielt. Der Probendurchsatz gemäß der modifizierten Verfahren nach 2.4.2 kann bis in den Bereich von >250 mg/h erhöht werden. Der Probendurchsatz der in den Abschnitten 2.4.3, 2.4.4 und 2.4.5 beschriebenen Verfahren variiert im Bereich von 1- 50 mg/h.

2.4.7 Praktische Durchführung der Free-Flow-Elektrophorese

Die elektrophoretische Trennung erfolgte mit 0,5% „Servalyte“ (pH 3-6), 0,2 Vol% HPMC und 25% Glycerin auf einer Free-Flow-Elektrophorese (2.4) mit 2000 V angelegter Elektrodenspannung bei einer Stromstärke von 10 mA und einer Verweilzeit von 16 min. Der anodale Elektrodenpuffer war 0,1 M H₂SO₄ der kathodale 0,1 M NaOH. Als Stabilisierungsmedium wurden die Elektrodenpuffer mit je 0,2% HPMC und 25% Glycerin versetzt. Das Conterflow-Medium bestand aus 25% Glycerin und 0,2 % HPMC in dest. Wasser. Zwischen Elektrophorese und erster Aktivitätsprüfung wurden die Enzymproben bei -18°C gelagert. Zur Reaktion wurde jede Elektrophoresefraktion mit je 1ml einer 1,486 mM Substratlösung versetzt. Die Enzymreaktion erfolgte bei Raumtemperatur, und wurde nach 15 min Reaktionszeit durch thermische Denaturierung abgebrochen. Nach Extraktion und Derivatisierung

Experimenteller Teil

wurden die Proben nach Methode FS-Rev 2d (2.7.5) gaschromatographisch auf ihren Fettsäuregehalt und ihre Fettsäurezusammensetzung hin untersucht.

2.5 Verfahren zur Analyse der PL- und LPL-Reaktion

Die bisher sowohl zur Identifizierung und Charakterisierung wie auch zur Bestimmung enzymatischer Aktivitäten und zur Ermittlung kinetischer Parameter von Lipasen, im speziellen von Phospholipasen, eingesetzten Verfahren lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Die im Rahmen wissenschaftlicher Forschungen eingesetzten Fluoreszenzspektroskopischen Verfahren [9], elektrochemischen Verfahren [7], pH-Wert erfassenden [13] oder radioaktive Substrate nutzende Verfahren [8] lassen in der Regel eine universelle Einsetzbarkeit durch beschränkte Substratauswahl vermissen oder zeichnen sich durch einen hohen apparativen sowie finanziellen Aufwand aus. Darüber hinaus sind solche Verfahren aufgrund ihrer Komplexität für Screeninguntersuchungen kaum einsetzbar.

Im industriellen Rahmen werden vorwiegend einfache und standardisierte Verfahren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität verwendet. Diese Verfahren beruhen, auf der Bestimmung der pH-Änderung der Reaktionslösung durch Fettsäuren die während der Reaktion freigesetzt werden [14].

Hierzu wird eine Substratlösung mit Phosphatidylcholin aus Soja (Epikuron 200, Lucas Meyer, Best. Nr. 139029) eingesetzt. In 100 ml VE-Wasser werden 1,00 g Epikuron 200 und 5 ml einer 0,32 molaren (4,70g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml Wasser) CaCl_2 Lösung gegeben und bei 24.000 rpm 2 Minuten homogenisiert.

Für die Bestimmung der Enzymaktivität werden 10 ml der Substratlösung mit 10 ml einer 1% igen (vol) -Lösung und 5 ml einer 0,0033 molaren Zitronensäuremonohydrat Lösung in einen 25 ml Erlenmeyerkolben pipettiert und 10 Minuten auf 40°C temperiert.

Nach der Zugabe von 0,1 ml unverdünnter Enzymlösung wird der Ansatz 10 Minuten bei 40°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Ansatz mit 0,01 molarer KOH auf pH 10 titriert.

Experimenteller Teil

Zur Verifizierung wird eine Blindwertmessung mit einer über 15 Minuten bei 95°C deaktivierter Enzymlösung durchgeführt.

Die Enzymaktivitäten werden nach

$$\text{PLU/g} = (\text{dV(KOH)} \cdot \text{c(KOH)} \cdot 1000) / (\text{dt} \cdot \text{C(s)} \cdot \text{v})$$

berechnet. Eine PLU entspricht hierbei der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen 1 µmol Fettsäure pro Minute freisetzt.

2.6 Neu entwickelter Aktivitätstest

Die bisher bei der Analyse von fettsäureesterspaltenden Enzymen angewendeten Verfahren waren entweder für die Beantwortung der bei der Untersuchung der Proben PL-1007, PL-1008 und PL-1035 zu klärenden Fragen hinsichtlich Spezifität und Präzision unzureichend genau [14,13,9], oder bedurften eines sehr großen apparativen Aufwandes [7]. Teilweise wurden die Verfahren auch wegen vermeidbarer Gesundheitsrisiken, die z.B. radiochemische Verfahren mit sich bringen, nicht in Betracht gezogen [8].

Daher ergab sich im Rahmen dieser Arbeit die Notwendigkeit, ein Testverfahren zu entwickeln, das allen Ansprüchen hinsichtlich Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Interpretierbarkeit hinreichend gerecht wurde, gleichzeitig aber gut standardisierbar und weitestgehend universell einsetzbar war.

Das hier etablierte Verfahren wurde derart modifiziert, dass jedes beliebige Substrat für die Enzymreaktion bei jedem pH-Wert und unabhängig von der Matrix eingesetzt werden kann. Dabei sind die Ansprüche, die dieses Verfahren an die Reinheit der Enzymlösungen stellt, minimal. Die Enzym/Substrat-Lösung wird vor dem eigentlichen gaschromatographischen Analyseschritt über Extrelut 3 Säulen extrahiert. Diese Extraktionssäulen arbeiten weitgehend (pH 1-13) [73] pH-unabhängig, und vermeiden dabei konsequent jede Emulsionsbildung. Durch diese Form der Extraktion ist die Probe für die gaschromatographische Analyse unabhängig von den Reaktionsbedingungen.

Das Verfahren lässt sich in fünf Teilverfahren unterteilen.

2.6.1 Probenvorbereitung und Substratauswahl

Die Auswahl geeigneter Substrate unterliegt diversen Kriterien. Um eine eindeutige Analyse der gaschromatographischen Ergebnisse zu gewährleisten, sollte an jeder Esterposition der Phospholipide nur eine bestimmte Fettsäure gebunden sein. Dies wird durch die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Phospholipide der Fa. Sigma-Aldrich

Experimenteller Teil

gewährleistet. Diese weisen nach Herstellerangaben eine stereospezifische Reinheit von über 99% auf.

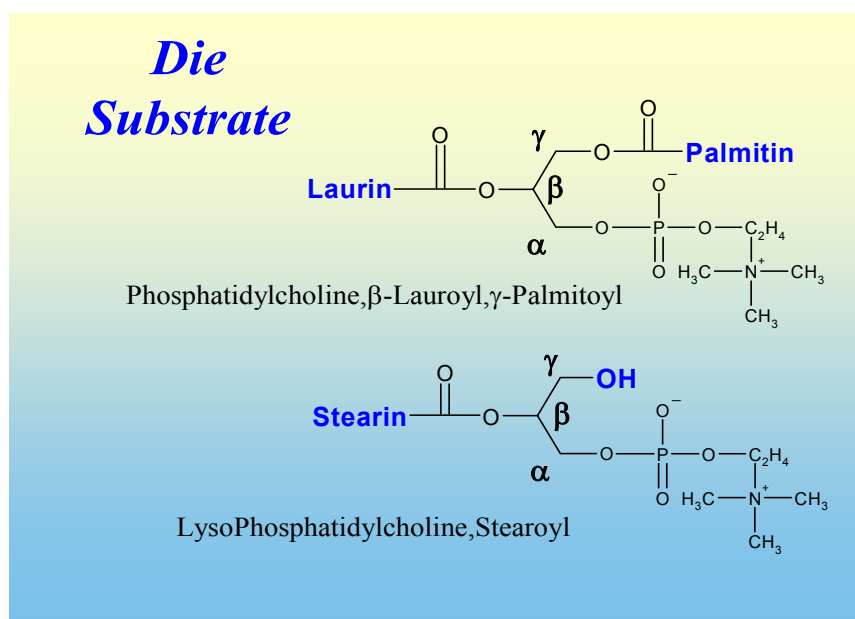


Abbildung 18: Substrate für die Bestimmung der Phospholipase (L- α -Phosphatidylcholine- β -Lauroyl- γ -Palmitoyl) bzw. Lysophospholipaseaktivität (L- α -Lysophosphatidylcholine-Stearoyl).

In einer Stammlösung wird L- α -Phosphatidylcholine- β -Lauroyl- γ -Palmitoyl als Substrat der Phospholipase sowie L- α -Lysophosphatidylcholine-Stearoyl als Substrat der Lysophospholipase eingesetzt. Die Konzentrationen variieren je nach Zielsetzung des Versuches zwischen 0,5 und 2 mg/ml.

Diese Stammlösung enthielt neben dem für die Reaktion notwendigem Calciumacetat noch einen Emulgator, um das Lösen der Substrate zu erleichtern und zusätzlich eine Referenzfettsäure für die gaschromatographische Analyse.

Bei der Auswahl des Emulgators ist darauf zu achten, dass durch evtl. vorhandene Lipaseaktivitäten keine die Analyse störenden Komponenten freigesetzt werden. Der ursprüngliche Emulgator Triton X-100 wurde im Zuge der Verfahrensentwicklung wegen seiner hemmenden Eigenschaften auf die Enzymaktivität durch Tween 20 ersetzt [85]. Ebenso musste das ursprünglich verwendete CaCl_2 durch Calciumacetat ersetzt werden, da die Cl^- Ionen zu Niederschlagsbildung mit einigen reaktiven Derivatisierungsmitteln führten.

Experimenteller Teil

Der pH-Wert wird mit Essigsäure auf 4,4 eingestellt. Die von der *Fa. Roehm* zur Verfügung gestellten Enzymproben PL-1007, PL-1008 und PL-1035 wurden mit der Stammlösung verdünnt. Hierdurch wurde die Reaktivität herabgesetzt und das zur Beobachtung der Reaktion verbleibende Zeitfenster vergrößert.

2.6.2 Reaktionsführung

Die in einer Stammlösung aufgenommenen Substrate wurden zu einer verdünnten Enzymlösung gegeben. Die Enzymreaktion fand bei Raumtemperatur statt. Im Gegensatz zum bisherigen Aktivitätsbewertungsverfahren wurden höhere Reaktionstemperaturen vermieden, um die Reaktionsgeschwindigkeit in einem für kinetische Beobachtungen günstigen Zeitfenster von ca. 15 min (je nach gewählten Konzentrationen) zu halten. Nach definierten Zeiten werden die Reaktionslösungen in Eppendorf-Caps überführt, die auf einem Thermoblock auf ca. 100°C vorgewärmt wurden. Die Enzymreaktion wird durch thermische Denaturierung der Proteine beendet.

Für kinetische Untersuchungen wurde ein Volumen von je 25 ml beider Lösungen in einen Spitzkolben gegeben und unter Rühren auf der gewünschten Reaktionstemperatur gehalten. Zu definierten Zeitpunkten wurde je 1 ml der Reaktionslösung entnommen und in auf 100°C vorgeheizte Eppendorf-Caps gegeben. Wiederum kommt die Enzymreaktion durch thermische Denaturierung zum Erliegen.

2.6.3 Extraktion

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Reaktionslösung über Extrelut 3 NT Säulen der *Fa. Merck* mit einer Extraktionslösung aus Chloroform und 30%vol n-Hexan extrahiert. Diese vermieden zuverlässig die Emulsionsbildung und gewährleisteten somit eine nahezu quantitative Extraktion. Die Reaktionsgefäße wurden mit je 1ml Stammlösung ausgespült, die ebenfalls auf die Säule aufgetragen wird. Nach Einlagerung des H₂O in die Kieselgurmatrix wurden die lipophilen Komponenten mit 15 ml einer Mischung aus 30% n-Hexan und 70% Chloroform extrahiert. Der Extrakt wurde unter Vakuum in einem Rotationsverdampfer „Seed-Vac“ bis zur Trockne eingengt und anschließend in 1,5ml Chloroform aufgenommen.

Experimenteller Teil

2.6.4 Derivatisierung

Da freie Fettsäuren durch Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrücken einen sehr hohen Siedepunkt aufweisen, wurden die Säuregruppierungen der Fettsäuren durch Zugabe von 0,15ml Silylierungsreagenz (BSTFA+TMCS, 1:99 Supelco 33154-U) silyliert. Dies hat unter anderem gegenüber der klassischen Methode, der Überführung in die Methylester der freien Fettsäuren [74], den Vorteil, dass das Molekulargewicht der Fettsäuremoleküle stärker zunimmt und somit die Nachweisempfindlichkeit des FID dieser Moleküle erhöht wird.

2.6.5 Gaschromatographische Analyse

Nach der Derivatisierung wurden je 5µl einer Probe in den Gaschromatographen injiziert. Die gaschromatographische Analyse erfolgte nach einer speziell für Proben mit umfangreicher biologischer Matrix entwickelten Methode auf einer ZB-5 Säule der *Fa. Phenomenex* mit einem Durchmesser vom 0,53 mm, einer Länge von 30m und einer Filmdicke von 5µm. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte des GC-Programmablaufes dargestellt und beschrieben:

Das Temperaturprogramm des Injektors dient neben dem zügigen Verdampfen der Analyten auch der abschließenden Reinigung des Injektors

	rate	temp	hold
inital :		170	0
step1	50	260	5
step2	30	320	4

Tabelle 5: Temperaturprogramm des Injektors mit abschließendem Ausheizschritt

Nach Erreichen des ersten Plateaus von 260°C - hier sind alle Fettsäuren verdampft - wurde der Split - eine Bypassleitung zur GC-Säule - geöffnet. Bei dem nun folgenden Aufheizschritt wurden die verdampften Komponenten nicht mehr auf die Säule aufgebracht, sondern nach außen abgeleitet.

Experimenteller Teil

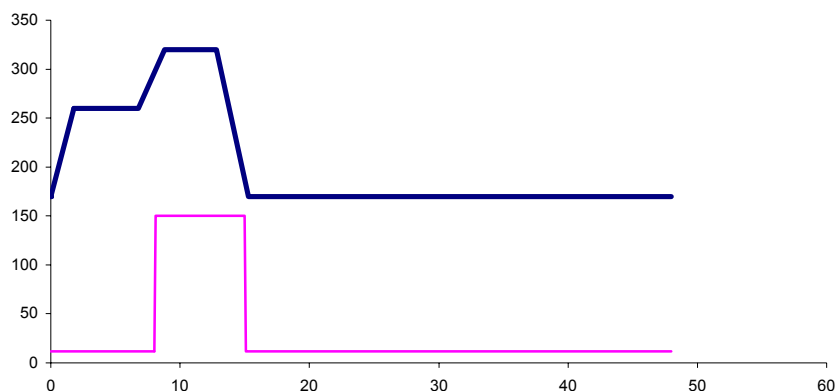


Abbildung 19: Temperaturprogramm des Injektors (blau) mit Splitöffnung (rot)

Das Temperaturprogramm des Säulenofens erleichtert einerseits die Trennung der Komponenten auf der Säule, andererseits reinigte es in einem nachgeschaltetem Ausheizschritt die Säule von schwerflüchtigen Verunreinigungen (Abbildung 20).

	rate	temp	hold
inital		140	8
step 1	20	300	15

Tabelle 6: Temperaturprogramm Säulenofen mit nachgeschaltetem Ausheizschritt

Bei einer Temperatur von 140°C werden die Fettsäuren teilweise am Säulenanfang kondensiert und mit steigender Temperatur im Ofen erneut verdampft.

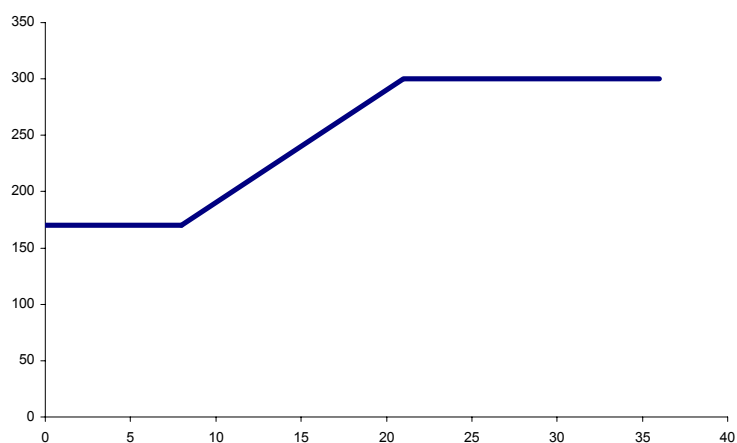


Abbildung 20: Ofentemperaturprogramm bei der Fettsäureanalyse

2.6.6 Interpretation und Bewertung der Resultate

Aus den integrierten Signalen der Gaschromatogramme können die Stoffmengenkonzentrationen der einzelnen Fettsäuren in der Reaktionslösung berechnet werden. Aus den Stoffmengen der Fettsäuren, die von den jeweiligen Enzymen freigesetzt wurden, lassen sich Rückschlüsse auf deren Aktivitäten ziehen. Neben der quantitativen Beurteilung der enzymatischen Aktivitäten können auch qualitative Aussagen, wie eine Bewertung der Regiospezifität (A_1 oder A_2) von Phospholipasen getroffen werden.

Um zuverlässige Aussagen bezüglich der Stoffmengenkonzentration der Fettsäuren in der Reaktionslösung treffen zu können, ist neben einer Kalibrierung, die einen Bezug zwischen der Fläche der Peaks und Stoffmengenkonzentration in der extrahierten Lösung herstellt, auch eine Überprüfung der Extraktionsmethodik hinsichtlich Präzision und Reproduzierbarkeit notwendig.

2.6.7 Abgrenzung zu bisherigen Aktivitätsbewertungsmethoden

Das bisher vorwiegend angewandte Verfahren nutzt zur Quantifizierung der Aktivitäten die pH-Wert-Änderung der Reaktionslösung durch freigesetzte Fettsäuren [13,14]. Um hier einen messbaren Effekt zu erzeugen, ist jedoch bis zu 1g eines beliebigen Phosphatidylcholins als Substrat notwendig. Darüber hinaus ist es nicht möglich, zwischen den Aktivitäten von Phospholipase und Lysophospholipase zu unterscheiden. Dies kann zu Fehlern in der Aktivitätsbewertung führen, da die Reaktion der Phospholipase das Substrat für Lysophospholipase liefert (Abbildung 21). Diese Fehlerquelle macht sich bei langen Reaktionszeiten und vollständigem Substratumsatz der Phospholipase besonders deutlich bemerkbar.

Experimenteller Teil

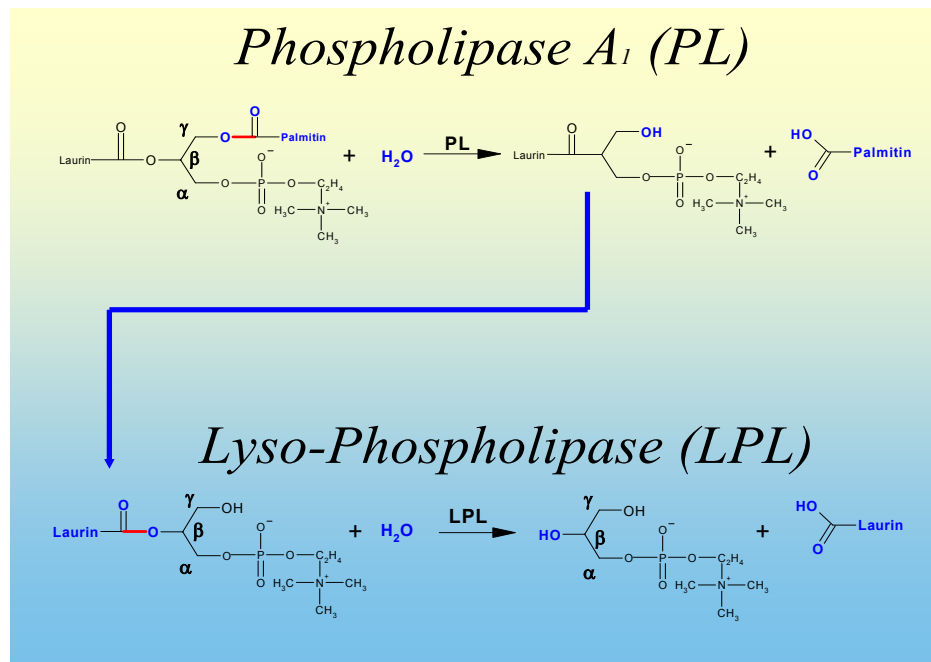


Abbildung 21: Aus dem Substrat der Phospholipase wird das Substrat der Lysophospholipase. Hierdurch kann die Bewertung der Phospholipaseaktivität durch Messung der pH-Änderung deutlich verfälscht werden

Im Gegensatz zu dem bisherigen Aktivitätsbewertungsverfahren ist es möglich, die Aktivitäten von Phospholipase und Lysophospholipase eindeutig zu trennen und somit die Aktivitäten von Phospholipase und Lysophospholipase gleichzeitig zu bestimmen. Bei Anwendung der hier vorgestellten Methode ist weder eine Trennung noch eine Aufreinigung der Enzyme notwendig.

2.7 Methodenüberprüfung

Um eine korrekte Interpretation der Messergebnisse zu gewährleisten, war eine Überprüfung der gesamten Methodik des hier vorgestellten Analyseverfahrens notwendig. Hierbei ist die Derivatisierungsmethode hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Vollständigkeit der Umsetzung zu untersuchen. Von essentieller Bedeutung ist hierbei auch die Reproduzierbarkeit der Gaschromatographiemethodik und die Qualität und Reproduzierbarkeit des gewählten Extraktionsverfahrens. Darüber hinaus ist das ausgewählte Verfahren zum Abbruch der enzymatischen Reaktion, und die Stabilität der Enzyme unter den auftretenden Bedingungen zu überprüfen.

2.7.1 Überprüfung der Derivatisierung

Derivatisierungsverfahren, die auf der Veresterung der freien Fettsäuren zu Fettsäuremethylestern beruhen, führten zu Verlusten von Analysesubstanzen. In einem auf einen Analyselauf folgenden Kontrolllauf mit reinem Lösungsmittel wurden alle Fettsäuren des Analyselaufs wieder nachgewiesen. Diese Reste betragen etwa 10% (Abbildung 22 und Abbildung 23) der in der Analyselösung enthaltenen Analytenmenge. Diese Menge nahm mit weiteren Leerläufen ab, bis nach ca. 3 Analysen mit reinem Lösungsmittel keine Fettsäuren mehr nachzuweisen waren.

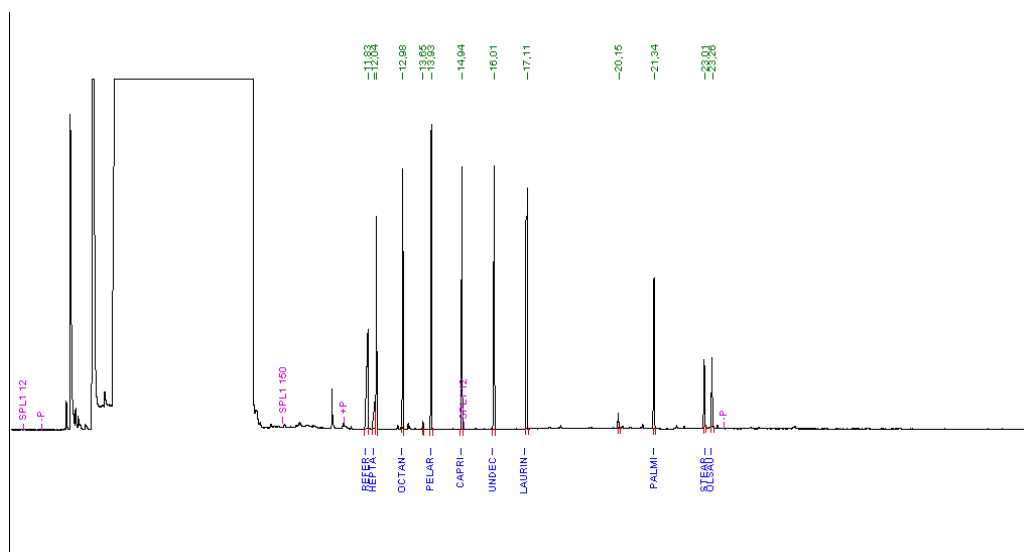


Abbildung 22: Gaschromatogram von Fettsäuremethylester in DMF

Experimenteller Teil

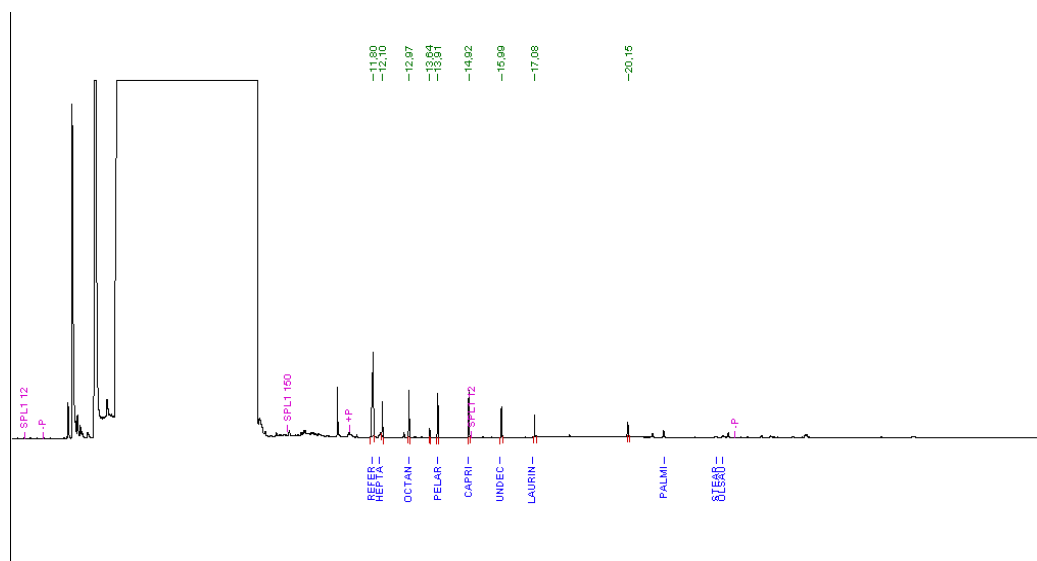


Abbildung 23: Das Kontrollchromatogram zu Abbildung 22 zeigt auf der Säule verbleibende Reste der Fettsäuremethylester bei einem Leerlauf mit DMF

Hingegen war nach der Silylierung der Fettsäuren in Gegenwart von TMCS und BSTFA eine weitgehend quantitative Bestimmung der Analyten möglich. Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurde je zweimal 1,5 ml einer Fettsäuremischung in Chloroform mit je 0,15 ml TCMS mit BSTFA versetzt und gaschromatographisch analysiert. Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, kann bei Abweichungen von maximal 4% auch eine Reproduzierbarkeit der Messungen als gegeben angesehen werden.

Laurinsäure				Palmitinsäure				Stearinsäure			
[μmol]	area 01	area 02	Abw.	[μmol]	area 01	area 02	Abw.	[μmol]	area 01	area 02	Abw.
0,6470	2341254	2332462	1,88%	0,4680	2106440	2117452	2,61%	0,4218	1827222	1836645	2,57%
0,5751	2143360	2135730	1,78%	0,4160	2032736	2040761	1,97%	0,3749	1597560	1606589	2,82%
0,5032	1862962	1851973	2,96%	0,3640	1795506	1787235	2,31%	0,3281	1412767	1399911	4,57%
0,4314	1570207	1580888	3,39%	0,3120	1506592	1523979	5,74%	0,2812	1195049	1184996	4,22%
0,3595	1394523	1393770	0,27%	0,2600	1308116	1306865	0,48%	0,2343	992736	986809	2,99%
0,2876	1079180	1081636	1,14%	0,2080	1019537	1026854	3,58%	0,1875	771813	771196	0,40%
0,2588	944790	938076	3,57%	0,1872	894303	889620	2,63%	0,1687	623487	621031	1,97%
0,2301	850956	848952	1,18%	0,1664	780822	776902	2,52%	0,1500	542330	541533	0,74%
0,2013	732442	734933	1,70%	0,1456	675972	673224	2,04%	0,1312	454772	449024	6,36%
0,1725	621292	621278	0,01%	0,1248	574527	571172	2,93%	0,1125	378002	377365	0,84%
0,1438	521031	519289	1,67%	0,1040	501484	498998	2,48%	0,0937	332421	327161	7,97%
0,1150	383730	385884	2,80%	0,0832	358505	359136	0,88%	0,0750	231871	228361	7,63%
0,0863	277438	278866	2,57%	0,0624	256361	260634	8,27%	0,0562	173815	172011	5,22%
0,0575	169763	168812	2,81%	0,0416	172566	172010	1,61%	0,0375	106553	107593	4,86%

Tabelle 7: Reproduzierbarkeit nach Methode FS-Rev 2 (2.7.3, Seite 55)

Experimenteller Teil

Mit wenigen Ausnahmen liegen alle Abweichungen zwischen zwei Analysen im Bereich von 2% bis 4%. Eine Aussage bezüglich der Vollständigkeit der Derivatisierung kann nicht getroffen werden, da hierfür keine Referenz zur Verfügung stand. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Derivatisierung nahezu vollständig abläuft, da die Abweichungen sonst wesentlich größer ausfallen würden.

2.7.2 Reproduzierbarkeit der GC-Meßergebnisse

Um die Reproduzierbarkeit der GC-Messungen zu überprüfen, wurden Lösungen verschiedener Fettsäurekonzentrationen mit TCMS und BSTFA derivatisiert, und je 4 mal mit dem Autosampler injiziert. Das Injektionsvolumen betrug dabei jeweils 5 µl. Die GC-Analyse wurde mit der Methode FS-Rev 2 (2.7.3, Seite 55) durchgeführt.

Laurinsäure				
area 01	area 02	area 03	area 04	σ [%]
2314813,68	2341254	2330727,5	2332462	0,47%
2121223,68	2143360	2121485	2135730	0,51%
1889471,88	1862962	1894784,4	1851973	1,10%
1618513,92	1570207	1621130,8	1580888	1,62%
1349535,6	1394523	1351780,9	1393770	1,83%
1069006,68	1079180	1071850,3	1081636	0,55%
952077,24	944790	949106,16	938076	0,64%
835726,68	850956	832993,2	848952	1,08%
714871,44	732442	712764,36	734933	1,60%
602623,8	621292	604432,8	621278	1,68%
574007,04	551031	572405,4	519289	5,60%
381987,36	383730	382862,16	385884	0,44%
271406,16	277438	269705,16	278866	1,63%
161842,32	169763	162108	168812	2,56%

Tabelle 8: Prozentuale Standardabweichung der gemessenen Peakflächen. Die prozentuale Standardabweichung errechnet sich aus dem Quotienten der Standardabweichung der Stichprobe und dem Mittelwert der Flächenintegrale.

Alle prozentualen Standardabweichungen betragen maximal 2%. Die in einem Fall auftretenden 5,6% sind als Ausreißer zu werten, da hier lediglich einer von vier Messwerten stark von den anderen abweicht. Die Auswahl der Fettsäuren entspricht den in späteren Versuchen mit Phospholipiden freiwerdenden Fettsäuren. Palmitin- und Laurinsäure sind in L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl, Stearinsäure in L- α -Lysophosphatidylcholine-stearoyl als Fettsäureester an C $_{\alpha}$ bzw C $_{\beta}$ des Glyceringerüsts gebunden

Experimenteller Teil

Palmitinsäure				
area 01	area 02	area 03	area 04	σ [%]
2191510	2106440	2206691	2117452	2,36%
1979604	2032736	1970299	2040761	1,80%
1746338	1795506	1749781	1787235	1,43%
1471265	1506592	1481120	1523979	1,60%
1238662	1308116	1242833	1306865	3,03%
969728	1019537	972260	1026854	3,04%
857083	894303	861852	889620	2,16%
762304	780822	759031	776902	1,39%
655440	675972	649930	673224	1,94%
556794	574527	558443	571172	1,58%
509456	501484	508906	498998	1,04%
339481	358505	341740	359136	3,02%
241641	256361	238926	260634	4,30%
155155	172566	153676	172010	6,33%

Tabelle 9: Prozentuale Standardabweichung der gemessenen Peakflächen. Die prozentuale Standardabweichung errechnet sich aus dem Quotienten der Standardabweichung der Stichprobe und dem Mittelwert der Flächenintegrale.

Stearinsäure				
area 01	area 02	area 03	area 04	σ [%]
1801546	1827222	1811878	1836645	0,86%
1616614	1597560	1608856	1606589	0,49%
1425855	1412767	1436746	1399911	1,13%
1184295	1195049	1191752	1184996	0,44%
969771	992736	975651	986809	1,06%
723286	771813	725667	771196	3,63%
555637	623487	558624	621031	6,38%
535278	542330	536912	541533	0,64%
462780	454772	460195	449024	1,34%
390850	378002	386969	377365	1,74%
354518	332421	352809	327161	4,09%
236434	231871	234624	228361	1,51%
181794	173815	180932	172011	2,79%
117706	106553	116899	107593	5,29%

Tabelle 10: Prozentuale Standardabweichung der gemessenen Peakflächen. Die prozentuale Standardabweichung errechnet sich aus dem Quotienten der Standardabweichung der Stichprobe und dem Mittelwert der Flächenintegrale.

Alle Vergleichsmessungen liefern verlässliche Werte bezüglich der Reproduzierbarkeit. Für Stearin- und Palmitinsäure gelten die gleichen Aussagen wie im Falle der Laurinsäure. Somit lässt sich feststellen, dass diese Messmethodik gute Resultate bezüglich der Reproduzierbarkeit liefert.

Experimenteller Teil

Nach der Reproduzierbarkeit wiederholter Injektionen mit dem gleichen Volumen war noch die Möglichkeit der Übertragung dieser Aussage auf Injektionen mit verschiedenen Volumina zu untersuchen. Hierzu wurde eine Lösung aus 8 Fettsäuren verschiedener Konzentrationen mit TMCS und BSTFA silyliert. Eine gaschromatographische Analyse mit Injektionsvolumina zwischen 1 μl und 5 μl wurde nach Methode FS-Rev 2c (2.7.3, Seite 55) durchgeführt.

In Abbildung 24 wurden die Integrale der GC-Signale für verschiedene Volumina auf ein Volumen von 5 μl hochgerechnet, und gegen das Injektionsvolumen aufgetragen.

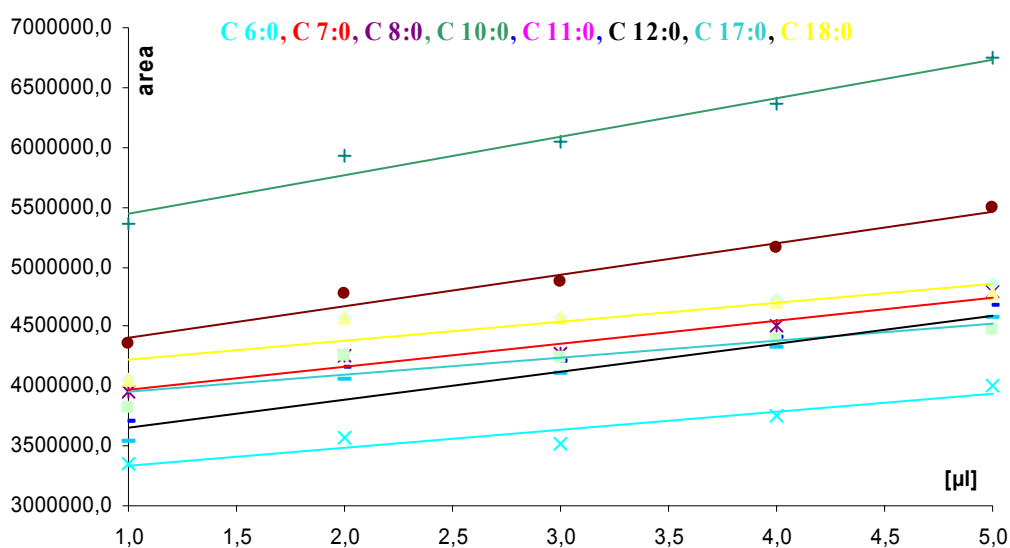


Abbildung 24: Flächenintegrale der chromatographischen Signale bei Injektionen verschiedener Volumina einer Fettsäurelösung (Farbkodierung: Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge)

Mit einer maximalen Differenz zwischen den normierten Flächenintegralen für 1 μl und 5 μl von 20% kann nicht von einer direkten Übertragbarkeit der Kalibrierung für 5 μl Injektionsvolumen auf 1 μl ausgegangen werden. Für Injektionen verschiedener Volumina ist somit jeweils eine separate Kalibrierung aufzunehmen. In der vorliegenden Arbeit wurden daher alle Analysen mit einem Injektionsvolumen von 5 μl durchgeführt.

Eine detaillierte Beschreibung der Methodenparameter findet sich im Anhang..

Experimenteller Teil

2.7.3 Kalibrierung nach Methode FS-Rev 2

Die Methode FS-Rev 2 basiert auf einer hochpolaren FFAP Säule der Fa. Phenomenex. Für diese Methode wurde eine Kalibrierung nur bezüglich der Fettsäuren C12:0, C16:0 und C18:0 durchgeführt.

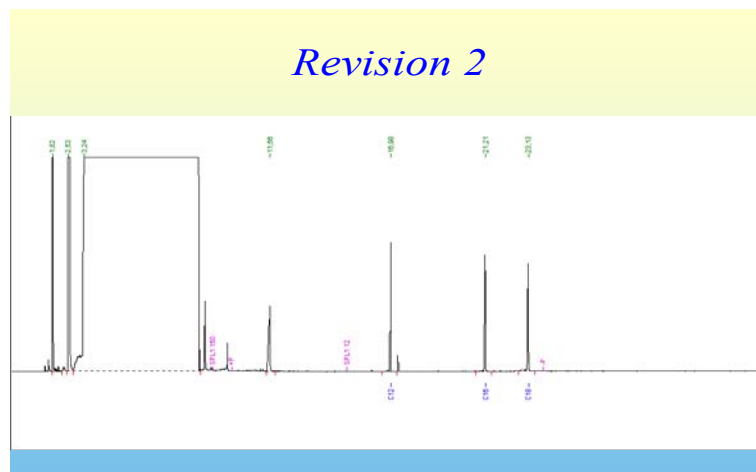


Abbildung 25: Referenzchromatogramm einer Fettsäurelösung mit C12:0, C16:0, C18:0. Jede Fettsäure wurde mit einer Konzentration von ca. 0,2 mg/ml eingesetzt.

Die Bruttoretentionszeiten der Fettsäuren C12:0, C16:0 und C18:0 ergeben sich aus Abbildung 25 und sind in Tabelle 11 aufgeführt.

RT	Name	C x:x
16,98	Lauric	C 12:0
21,22	palmitic	C 16:0
23,13	stearic	C 18:0

Tabelle 11: Bruttoretentionszeiten für 3 Fettsäuren nach Methode FS-Rev 2

Um einen Zusammenhang zwischen Signalintegral und Stoffmenge Fettsäure in der Probe herstellen zu können, wurde eine Konzentrationsreihe über den, in realen Proben erwarteten Konzentrationsbereich aufgenommen. Hierbei wurden zwei Ansätze erstellt und ausgewertet, um die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen.

Experimenteller Teil

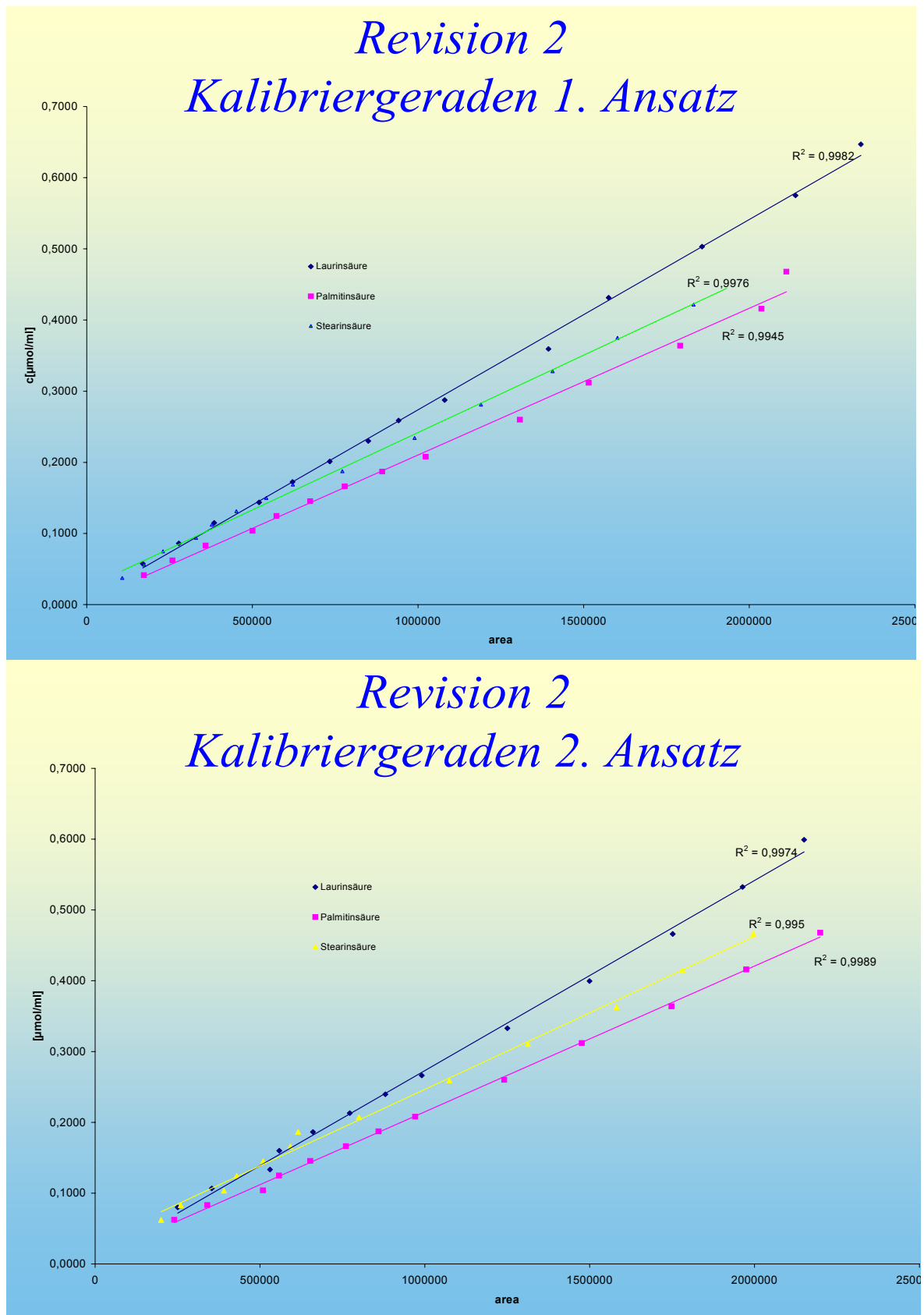


Abbildung 26: Kalibriergeraden des ersten und zweiten Ansatzes der FS-Methode Rev 2

Experimenteller Teil

Die Pearson'schen Korrelationskoeffizienten aller Regressionsgeraden liegen über 0,99.
Die Regression ist daher als zuverlässig zu betrachten.

Revision 2
Kalibrierfunktionen

	Pearson
$n(C12) = ([area]-24996) / 3741022$	0,9982
$n(C16) = ([area]+2397,8) / 4699350$	0,9945
$n(C18) = ([area]-13133) / 3869389$	0,9976

1. Ansatz

	Pearson
$n(C12) = ([area]-16039) / 3710760$	0,9974
$n(C16) = ([area]-38697) / 4834355$	0,9989
$n(C18) = ([area]-125381) / 4529623$	0,9950

2. Ansatz

Tabelle 12: Regressionsfunktionen beider Ansätze der Kalibrierung der FS-Methode Rev 2

Für alle weiteren Messungen auf der Basis dieser Methode erfolgt die Auswertung der Flächenintegrale unter Berücksichtigung dieser Regressionsgleichungen. Die Divergenz der Regressionsfunktionen beider Ansätze ist ebenfalls als marginal einzustufen.

2.7.4 Kalibrierung nach Methode FS-Rev 2c

Mit der Methode FS-Rev 2c, ebenfalls auf der FFAP-Säule basierend, wurde das Spektrum der detektierbaren Fettsäuren bis zu C10:0 erweitert und die Signalseparation verbessert. Hierzu war eine geringfügige Abflachung des Temperaturgradienten im Säulenofen notwendig.

Experimenteller Teil

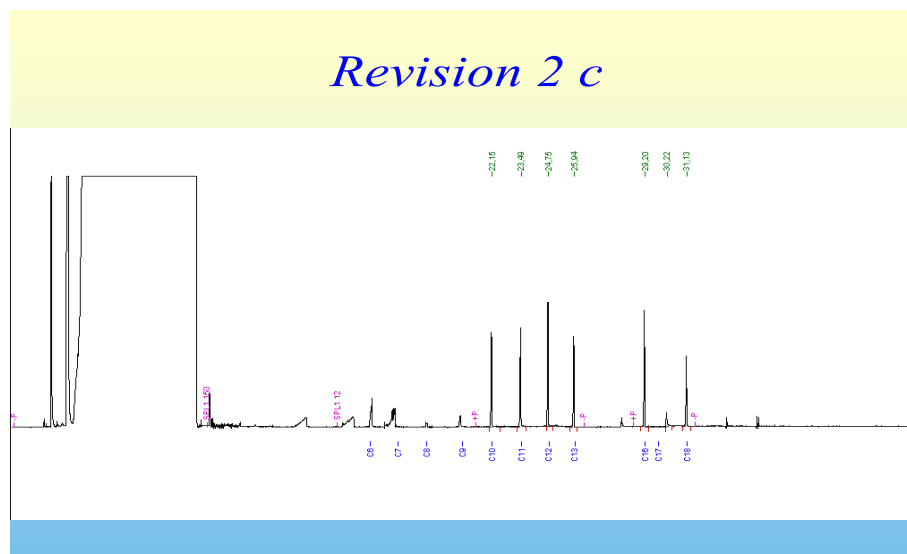


Abbildung 27: Referenzchromatogram eines Fettsäurelösung mit C10:0, C11:0, C12:0, C16:0, C17:0, C18:0. Jede Fettsäure wurde mit einer Konzentration von ca. 0,2 mg/ml eingesetzt.

RT	Name	C x:x
22,15	Decanoic acid	C 10:0
23,49	Undecanoic acid	C 11:0
24,75	Lauric acid	C 12:0
29,20	Palmitic acid	C 16:0
30,22	Heptadecanoic acid	C 17:0
31,13	Stearic acid	C 18:0

Tabelle 13: Bruttoretentionszeiten für 7 Fettsäuren nach Methode FS-Rev 2c

Da mit der Methode FS-Rev 2 bereits die Reproduzierbarkeit und die Zuverlässigkeit der Gesamtapparatur gezeigt worden ist, kann sich die Kalibrierung der Methode FS-Rev 2c auf je drei Messwerte je Fettsäure beschränken.

Revision 2 c						
Name	C x:x	RT	M [g/mol]			
decanoic	C 10:0	22,16	172,27	n [µmol]	0,8707	1,7415
				area	444468	918832
Undecanoic	C 11:0	23,50	186,29	n [µmol]	0,8052	1,6104
				area	439374	945413
Lauric	C 12:0	24,77	200,3	n [µmol]	0,7489	1,4978
				area	533212	1177377
	C 13:0	25,96	214,3	n [µmol]	0,7000	1,3999
				area	506190	1094544
palmitic	C 16:0	29,22	256,4	n [µmol]	0,5850	1,1700
				area	510237	1038766
haptadecano	C 17:0	30,23	270,44	n [µmol]	0,5547	1,1093
				area	60532	198645
stearic	C 18:0	31,15	284,5	n [µmol]	0,5272	1,0545
				area	358764	851313

Tabelle 14: Kalibrierwerte zur Methode FS-Rev 2c

Experimenteller Teil

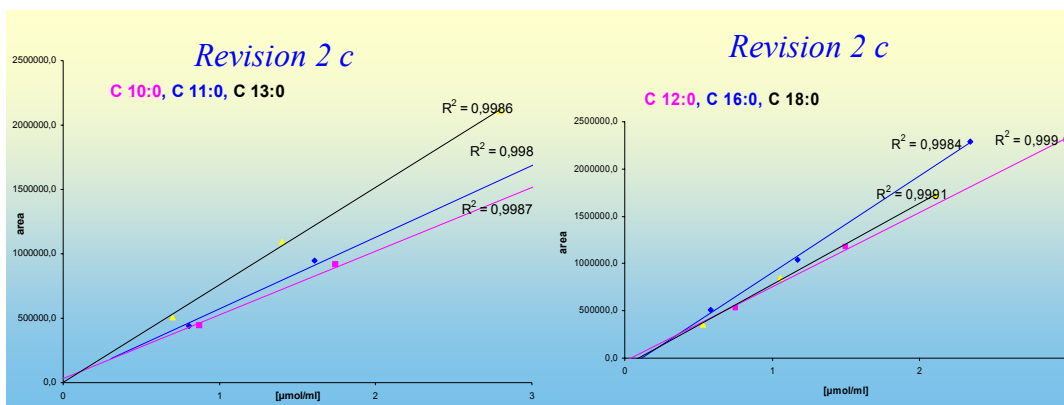


Abbildung 28: Kalibriergeraden für C 10:0, C 11:0, C 13:0, C 12:0, C 16:0 und C 18:0 nach Methode FS-Rev 2c

Die Regressionsgeraden weisen wie auch schon bei Methode FS-Rev 2 sehr gute Korrelationskoeffizienten nach Pearson auf. Diese betragen bei allen 6 Geraden etwa 0,998.

Revision 2 c	
	Pearson
$n(\text{C10}) = ([\text{area}] - 31736) / 494232$	0,9987
$n(\text{C11}) = ([\text{area}] - 14077) / 556841$	0,9980
$n(\text{C12}) = ([\text{area}] + 34124) / 786895$	0,9990
$n(\text{C13}) = ([\text{area}] + 897) / 757631$	0,9986
$n(\text{C16}) = ([\text{area}] + 116507) / 1023348$	0,9984
$n(\text{C18}) = ([\text{area}] + 79771) / 861025$	0,9991

Tabelle 15: Geradengleichungen zur Kalibrierung der Methode FS-Rev 2c

2.7.5 Kalibrierung nach Methode FS-Rev 2d

Als letzte Stufe der Entwicklung bildet FS-Rev 2d eine komplette Neuorientierung des Analyseverfahrens. Für die Verfahren FS-Rev2 und FS-Rev 2c wurde eine hochpolare Säule benutzt. Auf dieser Säule erfolgte die Trennung der Fettsäuren durch Bindung an das Säulenmaterial. Mit diesem Verfahren war zwar eine ideale Signalform erreichbar, diese Signalform hat jedoch den Nachteil, dass die Kalibriergeraden eine sehr hohe Steigung aufweisen und somit der detektierbare Konzentrationsbereich relativ klein ist. Ferner ermöglichte dieses Verfahren zusammen mit dem geringen Säulendurchmesser

Experimenteller Teil

nur recht geringe Injektionsvolumina. Mit FS-Rev 2d wurde nun die Analyse auf eine ZB-5 Säule umgestellt. Hier erfolgt die Trennung der langkettigen Fettsäuren rein destillativ. Dieses Verfahren verbreitert zwar die Signale, ermöglicht aber eine Flächenzunahme, ohne dass die Signalhöhe den Detektorbereich überschreitet. Mit FS-Rev 2d wurde das Fettsäurespektrum bis zu C6:0 erweitert und gleichzeitig die Empfindlichkeit der Methode deutlich verbessert. Ferner konnte die Dauer eines Chromatographielaufes deutlich reduziert werden.

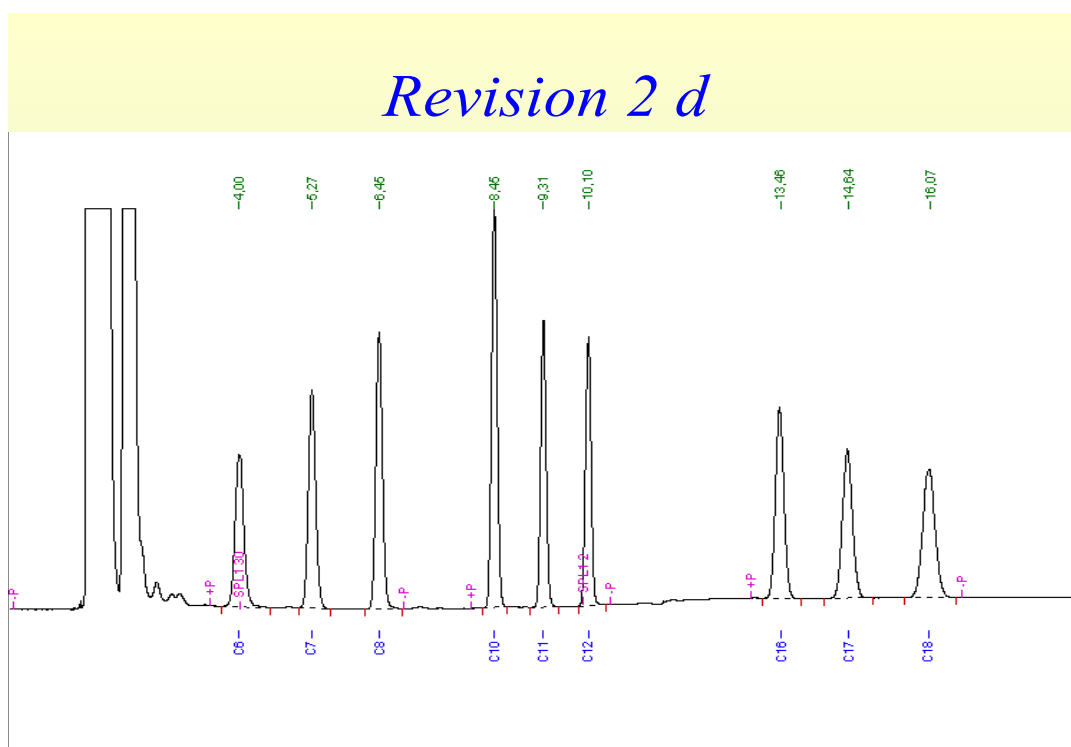


Abbildung 29: Referenzchromatogram eines Fettsäurelösung mit C6:0, C7:0, C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C16:0, C17:0, C18:0. Jede Fettsäure wurde mit einer Konzentration von ca. 0,2 mg/ml eingesetzt.

Experimenteller Teil

Die Retentionszeiten ab dem Zeitpunkt der Injektion betragen:

Name	C x:x	RT	M[g/mol]								
n-caproic	C 6:0	4,00	116,16	n[μmol]	4,86245	3,58286	2,34739	1,19429	0,59714	0,11943	0,05971
				area	7757091	5687626	4007077	1827861	961612	203749	119992
heptanoic	C 7:0	5,27	130,19	n[μmol]	4,97780	3,66785	2,40307	1,22262	0,61131	0,12226	0,06113
				area	6883978	4796098	2201539	1119321	198883	122956	
octanoic	C 8:0	6,45	144,21	n[μmol]	4,72749	3,48341	2,28223	1,16114	0,58057	0,11611	0,05806
				area	7860783	5491640	2547663	1280026	227499	118342	
decanoic	C 10:0	8,46	172,27	n[μmol]	4,53267	3,33986	2,18818	1,11329	0,55664	0,11133	0,05566
				area	6755711	3135439	1564463	284059	148747		
Undecanoic	C 11:0	9,32	186,29	n[μmol]	2,87238	2,11649	1,38666	0,70550	0,35275	0,07055	0,03527
				area	4676713	2184467	1101065	215803	137608		
Lauric	C 12:0	10,10	200,3	n[μmol]	2,57252	1,89554	1,24191	0,63185	0,31592	0,06318	0,03159
				area	6555915	4569554	2138698	1051611	185151	90979	
palmitic	C 16:0	13,46	256,4	n[μmol]	2,19517	1,61749	1,05974	0,53916	0,26958	0,05392	0,02696
				area	9455162	6962451	4856007	2334126	1200389	266606	196949
haptadecanoic	C 17:0	14,63	270,44	n[μmol]	1,97861	1,45792	0,95519	0,48597	0,24299	0,04860	0,02430
				area	8780480	6446408	4464340	2161477	1113169	214510	111957
stearic	C 18:0	16,07	284,5	n[μmol]	1,97835	1,45773	0,95507	0,48591	0,24296	0,04859	0,02430
				area	9229405	6824735	4767126	2318008	1220546	288514	241305

C x:x	Achsen - Quadrat des peasonschen		
	Steigung	abschnitt	Korreltionskoeffizienten
C 6:0	1.598.203	23.815	0,9987
C 7:0	1.912.180	-23.900	0,9980
C 8:0	2.303.053	-27.499	0,9980
C 10:0	3.088.638	-108.735	0,9980
C 11:0	3.354.037	-47.919	0,9979
C 12:0	3.532.478	-28.976	0,9982
C 16:0	4.295.190	74.679	0,9992
C 17:0	4.440.798	32.672	0,9993
C 18:0	4.633.547	118.299	0,9992

Tabelle 16: Kalibrierungsdaten zur Methode FS-Rev 2d auf einer Zebtron ZB-5 Säule

In der Datentabelle (Tabelle 16) enthalten einige Felder keine Werte, da hier die Signalhöhe den Maximalwert des Detektors überschritten hat. Somit wäre eine zuverlässige Bewertung des Flächenintegrals unmöglich gewesen. Die Steigungen der Regressionsgeraden wachsen mit zunehmender Kettenlänge der Fettsäuren konstant. Daher ist davon auszugehen, dass eine Diskriminierung von einzelnen Komponenten während der Verdampfung weitgehend verhindert werden konnte. Für eine weitestgehende Vermeidung der Diskriminierung sprechen ebenfalls die hohen Absolutwerte der Steigungen der Regressionsgeraden. Es gelangen also alle Komponenten nahezu vollständig auf die Säule.

Experimenteller Teil

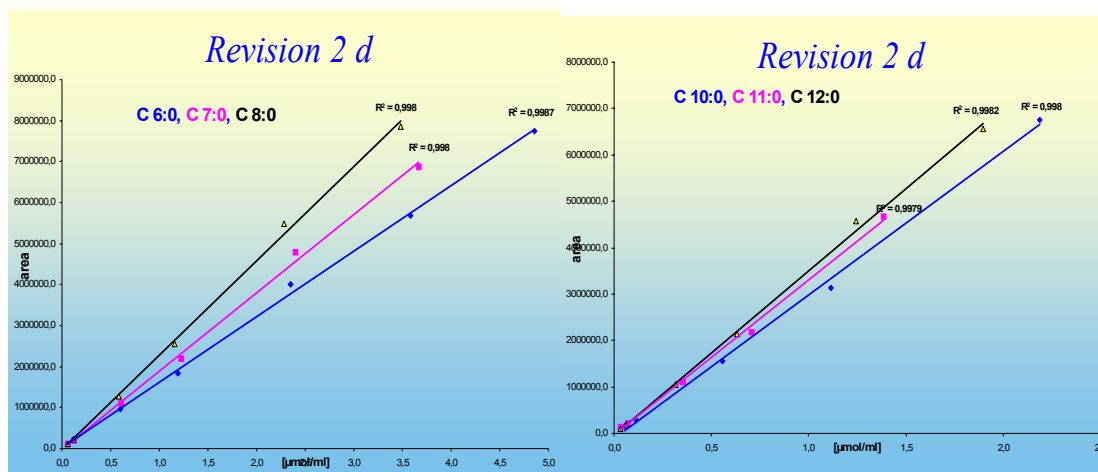


Abbildung 30: Kalibriergeraden für C6:0, C7:0, C8:0, C10:0, C11:0 und C12:0 nach FS-Rev 2d auf Zebtron ZB-5

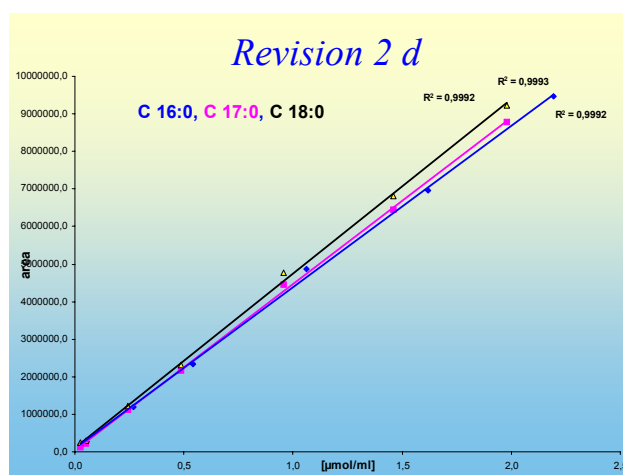


Abbildung 31: Kalibriergeraden für C16:0, C17:0 und C18:0 nach FS-Rev 2d auf Zebtron ZB-5

Revision 2 d

Geradengleichung	Pearson
$n(C\ 6) = ([area]-23815) / 1598203$	0,9987
$n(C\ 7) = ([area]+23815) / 1912180$	0,9980
$n(C\ 8) = ([area]+27499) / 2303053$	0,9980
$n(C\ 10) = ([area]+108735) / 3088638$	0,9980
$n(C\ 11) = ([area]+47919) / 3354037$	0,9979
$n(C\ 12) = ([area]+28976) / 3532478$	0,9982
$n(C\ 16) = ([area]-74679) / 4295190$	0,9992
$n(C\ 17) = ([area]-32672) / 440798$	0,9993
$n(C\ 18) = ([area]-118299) / 4633547$	0,9992

Tabelle 17: Geradengleichungen für C6:0, C7:0, C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C16:0, C17:0 und C18:0 nach FS-Rev 2d auf Zebtron ZB-5

Experimenteller Teil

2.7.6 Überprüfung der Extraktion

Zur Überprüfung der Extraktion wurde eine mit Undecansäure (C11) gesättigte (1,67 $\mu\text{mol/ml}$), wässrige Lösung aus 30% Glycerin, 20% Tween 20 hergestellt. Je 3 ml dieser Lösung wurden über Extrelut 3 Säulen (2.3.1.1 Seite 27) mit je 3ml, 5ml, 7ml, 9ml, 12ml und 15ml Chloroform extrahiert. Der Maximalwert von 15 ml entspricht dem von Merck zur quantitativen Extraktion empfohlenen Volumen. Die Extrakte wurden gaschromatographisch analysiert. Hierbei zeigt sich ein Anstieg der in die organische Phase übergetretenen Fettsäure mit steigendem Lösungsmittelvolumen bis zum Maximalwert von 15ml Chloroform. Die Retentionszeit der C11:0 Fettsäure wurde mit Hilfe einer Referenzlösung (Abbildung 32 Abbildung 33) ermittelt.

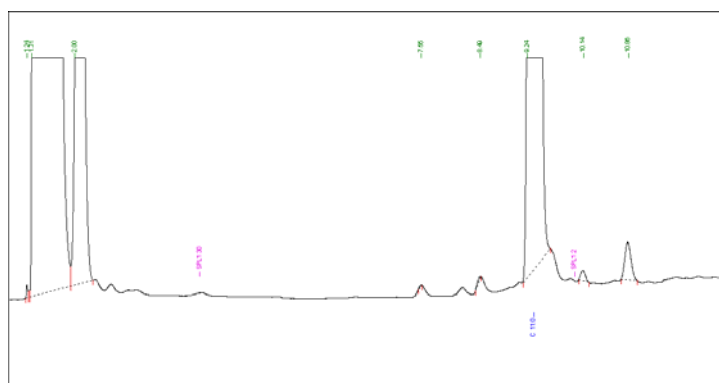


Abbildung 32: Referenzchromatogramm C11:0 in Chloroform mit BSTFA und TMCS

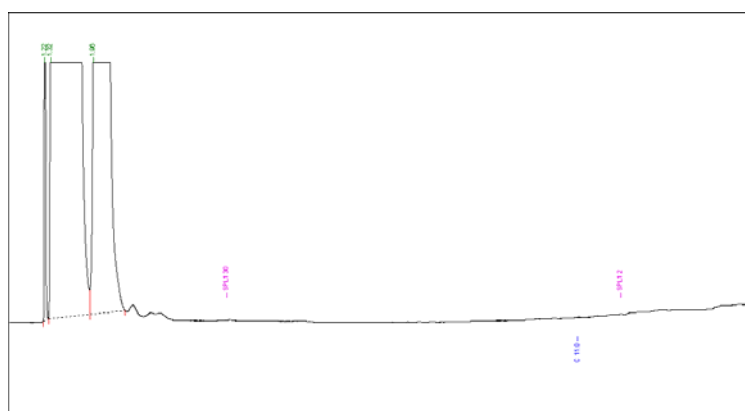


Abbildung 33: Chromatogramm Chloroform mit BSTFA und TMCS

Die Flächenintegrale der GC-Signale nahmen mit steigenden Extraktionsvolumen konstant zu. (Abbildung 34)

Experimenteller Teil

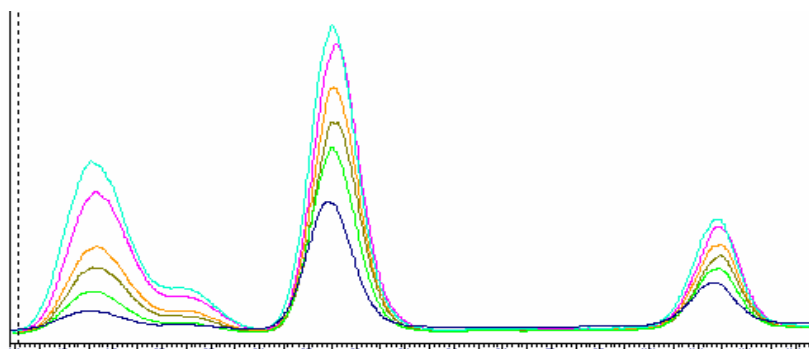


Abbildung 34: C11:0 Signalverfolgung über alle Extraktionsproben. blau=3ml, grün=5ml, d.grün=7ml, orange=9ml, lila=12ml und hellblau=15ml Chloroform

Die Auftragung der Peakfläche gegen das verwendete Lösungsmittelvolumen zeigt, dass bei einem Volumen von 15ml von einer quantitativen Extraktion ausgegangen werden kann, da die Kurve hier in ein Plateau mündet.

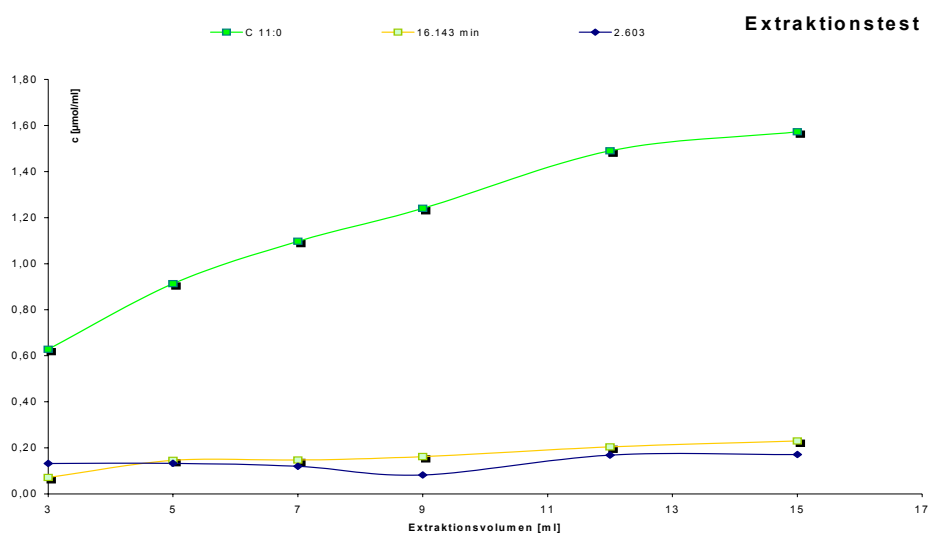


Abbildung 35: Auswertung des Extraktionstests, grün=extrahierte C11:0, blau und gelb Lösungsmittelkomponenten

Die hierbei extrahierte Lösung enthielt neben der Sättigungskonzentration C11:0 noch 30% Glycerin und 3% Tween 20. Mit Hilfe der Kalibrierfunktion lässt sich aus der Peakfläche die Konzentration der in den Gaschromatographen injizierten organischen Lösung für ein Extraktionsvolumen von 15ml zu 1,57 $\mu\text{mol/ml}$ errechnen. Mit einer eingewogenen Stoffmengenkonzentration von 1,673 $\mu\text{mol/ml}$ ergibt sich eine Wiederfindungsrate von 93,8%. Die Extraktion war daher bei einem Lösungsmittelvolumen von 15 ml als quantitativ anzusehen.

Experimenteller Teil

2.7.7 Abbruch der Enzymreaktion

Für die Durchführung kinetischer Untersuchungen ist es notwendig, die enzymatische Reaktion zu einem definierten Zeitpunkt abzubrechen.

In Abbildung 36 sind die Chromatogramme der Versuche mit EDTA (3M) und Zitronensäure (pH 2) dargestellt. Für die hier dargestellten Analysen wurde die Enzymlösung mit EDTA bzw. Zitronensäure versetzt und nach 3 min das Substrat zugegeben.

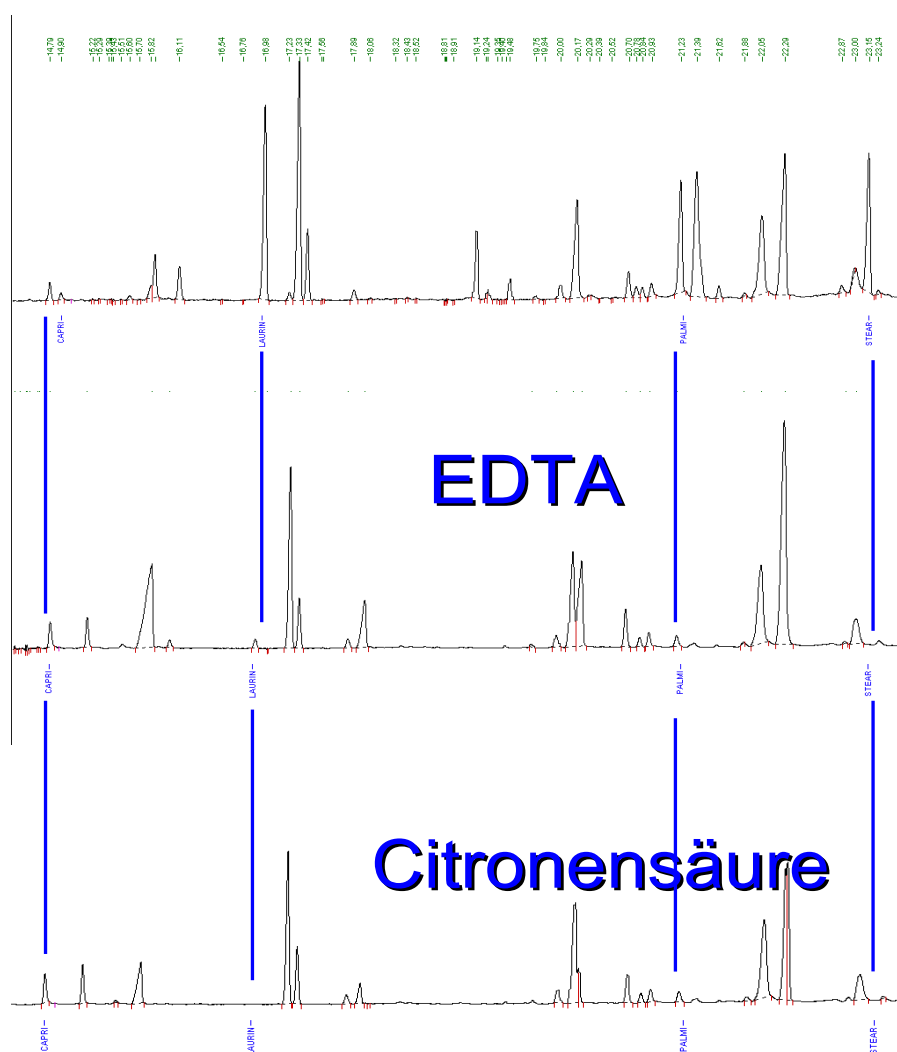


Abbildung 36: Chromatogramm nach Abbruch der Enzymreaktion mit EDTA (3M) und Zitronensäure (pH2) in der Stammlösung (die Fettsäuren C12:0, C16:0 und C18:0 sind farblich markiert) Weder mit EDTA noch mit Zitronensäure findet eine nennenswerte Fettsäurefreisetzung statt.

Experimenteller Teil

Wenn jedoch bereits Substrat und Enzym in der Lösung vorlagen, dauerte es ca. 5 min, bis die enzymatische Reaktion zum Erliegen kam. Daher erwiesen sich diese Methoden zum Abbruch der Reaktion als ungeeignet.

Als ebenso ungeeignet aufgrund der langen Denaturierungsdauer erwies sich der Abbruch der Reaktion durch Zugabe einer 16 molaren Harnstofflösung. Da die Zugabe im Verhältnis 1:1 zur Reaktionslösung erfolgte, betrug die zu erwartende Harnstoffkonzentration etwa 8 M.

Eine gut nutzbare, da einfache und schnelle Möglichkeit, die enzymatische Reaktion zu beenden, ist eine schnelle Temperaturerhöhung der Reaktionslösung auf ca. 100°C (ungefähr 5 min) und einer daraus resultierenden thermischen Denaturierung der Enzyme. Hierzu war allerdings die Stabilität der eingesetzten Substrate unter diesen Bedingungen zu untersuchen. Zur Überprüfung wurden die Substrate Temperaturen bis 94°C für bis zu 20 min ausgesetzt. Die Untersuchung der Substratstabilität erfolgte bei pH 3,3 und 5,06. Diese pH-Werte bilden die obere und untere Grenze des pH-Bereiches, in dem die Enzymreaktionen durchgeführt wurden. (2.7.8)

Die thermische Denaturierung wurde an zwei Enzymproben, PL-1035 und PL-1008 untersucht. Für alle Untersuchungen wurde je 1 ml einer thermisch oder chemisch vorbehandelten Enzymlösung, dem 1 mg des Phospholipasesubstrates L- α -Phosphatidylcholine, β -Lauroyl, γ -Palmitoyl zugesetzt wurde, verwendet. Die Lösung wurde über Extrelut 3 Säulen der Fa. Merck mit je 15 ml Chloroform extrahiert, bis zur Trockne eingedampft und in 1,5 ml Chloroform aufgenommen. Anschließend wurden die freien Fettsäuren mit 0,15 ml BSTFA und TMCS (99:1) silyliert. Die derivatisierten Fettsäuren wurden anschließend gaschromatographisch identifiziert und quantifiziert. Die theoretische Maximalausbeute bei 1 mg L- α -Phosphatidylcholine, β -Lauroyl, γ -Palmitoyl liegt bei 1,486 μ mol/ml. Diese Maximalausbeute wurde als Referenz durch eine chemische Spaltung der Fettsäureester ermittelt. Hierfür wurden die Phospholipide über 60 min in einer salzsauren Lösung bei pH 1,5 auf 100°C erhitzt.

Experimenteller Teil

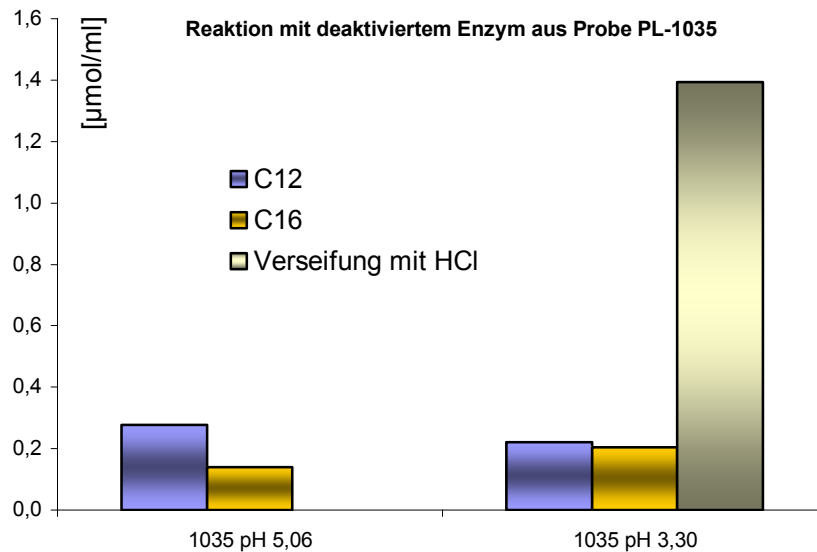


Abbildung 37: Thermische Denaturierung der Enzymprobe 1035 bei pH 5,06 und pH 3,30: detektierte freie Fettsäuren nach Erhitzen der Enzymlösung für 10 min auf 100°C . Die Verseifung mit HCl dient als Referenz für den Maximalumsatz.

Die Enzymlösung mit der internen Bezeichnung PL-1035 weist nach thermischer Denaturierung noch eine Restaktivität von ca. 14% auf.

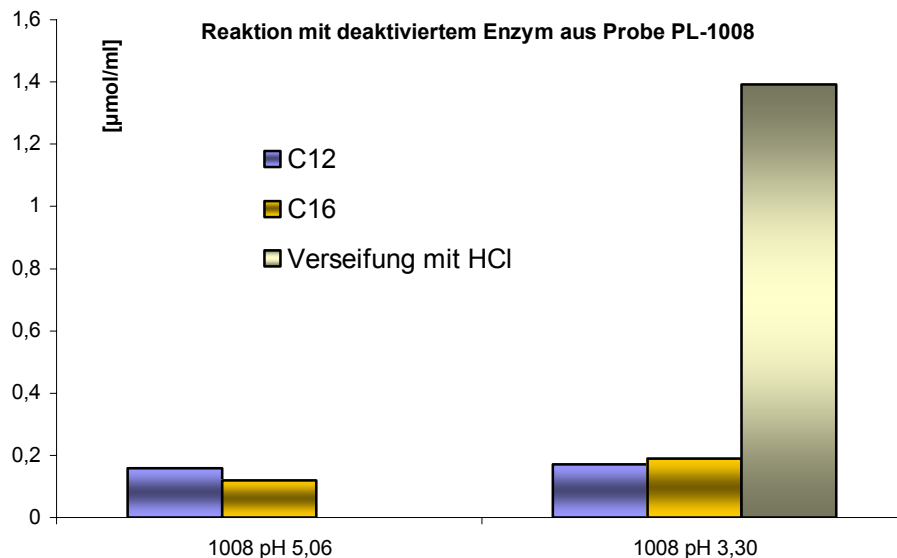


Abbildung 38: Thermische Denaturierung der Enzymprobe 1008 bei pH 5,06 und pH 3,30: detektierte freie Fettsäuren nach Erhitzen der Enzymlösung für 10 min auf 100°C . Die Verseifung mit HCl dient als Referenz für den Maximalumsatz.

Bei der Enzymlösung mit der internen Bezeichnung PL-1008 liegt die verbleibende Restaktivität noch unterhalb der Probe PL-1035. Somit ist die Methode der thermischen

Experimenteller Teil

Denaturierung zur Beendigung der enzymatischen Esterspaltung als geeignet anzusehen. Die verbleibende Restaktivität ist darauf zurückzuführen, dass es einige Sekunden dauert, bis die Enzymlösung nach Einfüllen in die auf 100°C vorgeheizten Eppendorf-Caps die Denaturierungstemperatur erreicht.

2.7.8 Substratstabilität

Um sicherzustellen, dass es während der thermischen Denaturierung der Enzyme nicht zu einer chemischen Esterspaltung kommt, wurden die verwendeten Substrate hinsichtlich ihrer thermischen Stabilität überprüft.

Für alle Untersuchungen wurden je 1 ml einer wässrigen Lösung mit 1 mg L- α -Phosphatidylcholine, β -Lauroyl, γ -Palmitoyl eingesetzt. Die Lösung wurde über Extrelut 3 Säulen der Fa. Merck mit je 15 ml Chloroform extrahiert, bis zur Trockene eingedampft und in 1,5 ml Chloroform aufgenommen. Anschließend wurden die freien Fettsäuren mit 0,15 ml BSTFA und TMCS (99:1) silyliert. Die derivatisierten Fettsäuren wurden anschließend gaschromatographisch identifiziert und quantifiziert. Die theoretische Maximalausbeute bei 1 mg L- α -Phosphatidylcholine, β -Lauroyl, γ -Palmitoyl beträgt 1,486 $\mu\text{mol/ml}$.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Substratlösung jeweils über einen Zeitraum von 10 Minuten auf verschiedene Temperaturen zwischen 40°C und 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen erfolgte die gaschromatographische Bestimmung des Gehaltes freier Fettsäuren der Substratlösungen. Zur Kontrolle wurden in einer Probe die Fettsäureester des Substrates chemisch gespalten, so dass hier alle im Substrat als Fettsäureester gebundenen Fettsäuren in Lösung vorlagen.

Diese Versuche wurden bei zwei verschiedenen pH-Werten durchgeführt, die den gesamten, in der späteren Reaktionsführung vorgesehenen Bereich abdeckten.

Experimenteller Teil

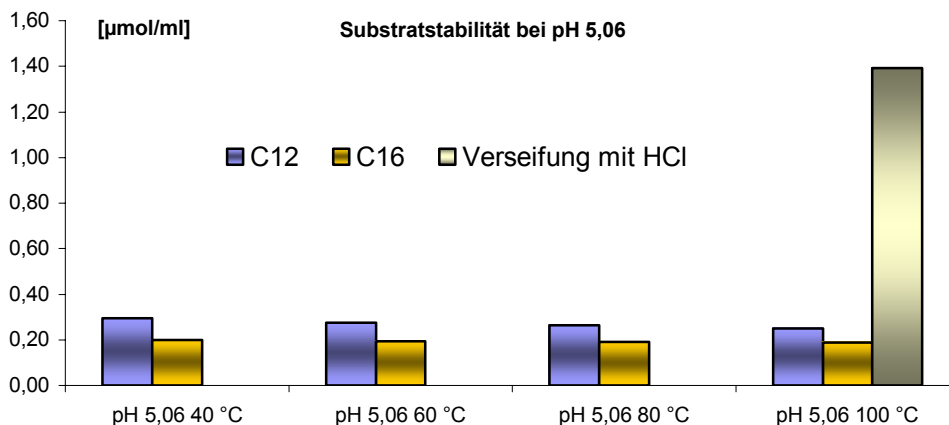


Abbildung 39 : Substratstabilität bei pH 5,06: detektierte freie Fettsäuren nach Erhitzen und Inkubation für 10 Minuten bei den angegebenen Temperaturen. Die Verseifung mit HCl dient als Referenz für den Maximalumsatz. Es kommt also unter den hier gewählten Bedingungen nicht zu einer signifikanten chemischen Umsetzung des Substrates.

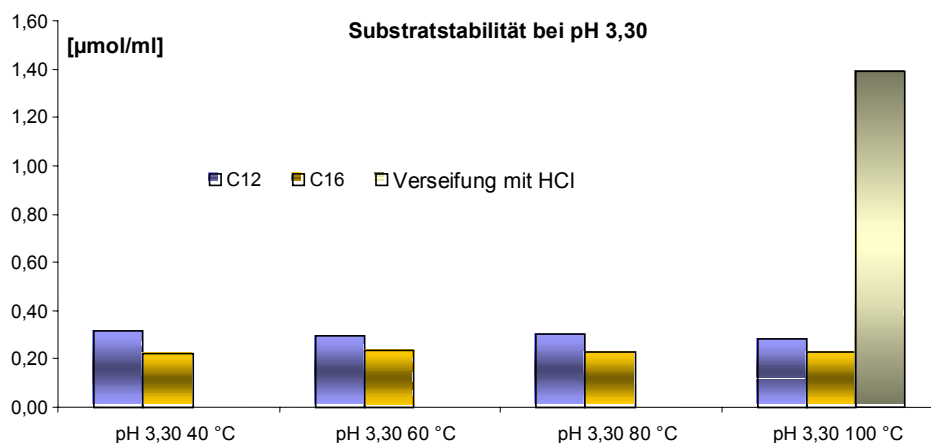


Abbildung 40: Substratstabilität bei pH 3,30: detektierte freie Fettsäuren nach Erhitzen und Inkubation für 10 Minuten bei den angegebenen Temperaturen. Die Verseifung mit HCl dient als Referenz für den Maximalumsatz. Es kommt also unter den hier gewählten Bedingungen nicht zu einer signifikanten chemischen Umsetzung des Substrates.

Weder bei pH 3,30 noch bei pH 5,06 war eine signifikante chemische Freisetzung der in den Fettsäureestern gebundenen Fettsäuren zu beobachten. Bei beiden pH-Werten blieben sie mit Konzentrationen zwischen 0,18 µmol/ml und 0,25 µmol/ml weit unter dem Maximalwert von 1,40 µmol/ml bei vollständiger chemischer Spaltung der Ester zurück.

Die Substratstabilität konnte folglich über einen Bereich von pH 3,30 bis pH 5,06 bei Temperaturen bis 100°C über 10 min als gegeben angesehen werden. Die

Experimenteller Teil

nachgewiesenen freien Fettsäuren entsprechen dem Blindwert der Substratlösung und sind daher nicht ursächlich in der thermischen Behandlung der Substrate begründet.

In einer zweiten Versuchsreihe war des weiteren zu prüfen, ob diese Stabilität auch über einen längeren Zeitraum gegeben ist. Hierfür wurde die Substratlösung für 5 min, 10 min, 15 min und 20 min auf 100°C erhitzt. Dies geschah wiederum bei zwei verschiedenen pH-Werten von 3,30 und 5,06.

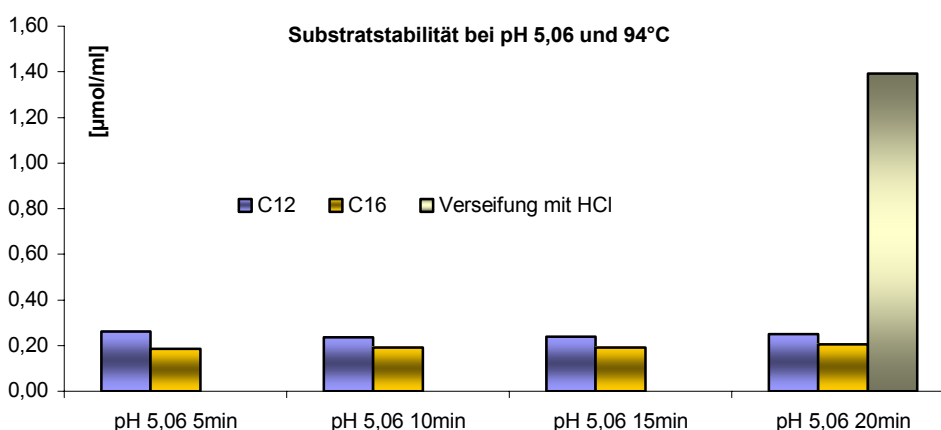


Abbildung 41: Substratstabilität bei 94°C und pH 5,06; detektierte freie Fettsäuren nach Erhitzen der Substratprobe über die angegebenen Zeiten . Die Verseifung mit HCl dient als Referenz für den Maximalumsatz. Es kommt also unter den hier gewählten Bedingungen nicht zu einer signifikanten chemischen Umsetzung des Substrates.

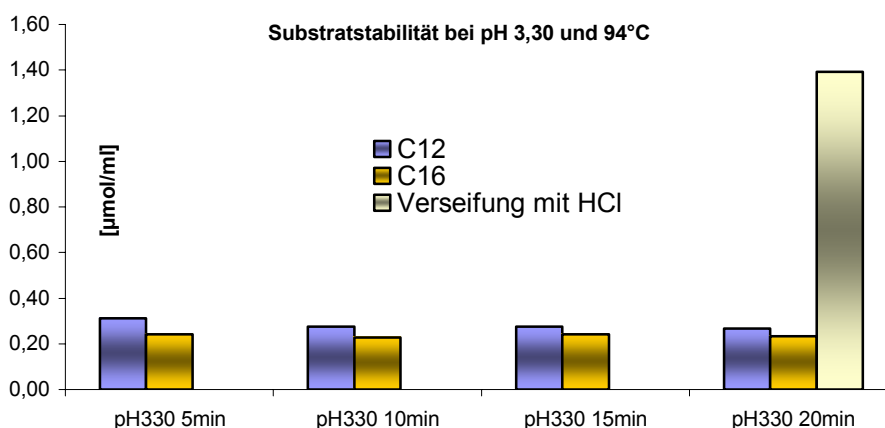


Abbildung 42: Substratstabilität bei 94°C und pH 3,30 ; detektierte freie Fettsäuren nach Erhitzen der Substratprobe über die angegebenen Zeiten . Die Verseifung mit HCl dient als Referenz für den Maximalumsatz. Es kommt also unter den hier gewählten Bedingungen nicht zu einer signifikanten chemischen Umsetzung des Substrates.

Experimenteller Teil

Auch bei dieser Versuchsreihe lagen die nachgewiesenen Fettsäurekonzentrationen sowohl bei pH 5,06 (Abbildung 41) und bei pH 3,30 (Abbildung 42) im Rahmen der Blindwerte der Enzymlösungen, und wichen deutlich von den Maximalwerten bei vollständiger chemischer Umsetzung ab.

Über den gesamten pH-Bereich von pH 3,30 bis 5,06 und ein Temperaturfenster bis 100°C sind die Substrate daher als stabil anzusehen.

In allen Fällen entsprechen die bei der thermischen Behandlung der Substrate freigesetzten Fettsäurekonzentrationen den Blindwerten in der Enzymlösung und sind nicht ursächlich in der thermischen Substratbehandlung begründet.

Ein Reaktionsabbruch durch thermische Denaturierung der aktiven Enzyme verfälscht die Bestimmung der durch die Enzymreaktion freigesetzten Fettsäuren also nicht.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Klassifizierung der Phospholipasen

Aus der durch eine enzymatisch katalysierte Esterhydrolyse freigesetzten Fettsäure kann direkt auf die Spezifität der beteiligten Phospholipase geschlossen werden. Phospholipasen A₂ (PLA₂) hydrolysieren die an C_β (sn-2 Position) [22] und Phospholipasen A₁ hydrolysieren die an C_γ (sn-1 Position) der Phospholipide gebundenen Fettsäureester [23], wobei die Phospholipide sowohl an C_β wie auch an C_γ verestert sein müssen. Hierzu werden als Substrat für die Phospholipasereaktion Phospholipide [86] eingesetzt, die an C_γ und C_β verestert sind, wie z.B. L-α-Phosphatidylcholine-β-lauroyl-γ-palmitoyl. Die Freisetzung der Fettsäuren aus den Phospholipiden lässt direkte Rückschlüsse auf die Spezifität der untersuchten Phospholipase zu. Wird die an C_γ gebundene Fettsäure freigesetzt, liegt eine Phospholipase A₁ vor, wird hingegen die an C_β gebundene Fettsäure freigesetzt handelt es sich um eine Phospholipase A₂.

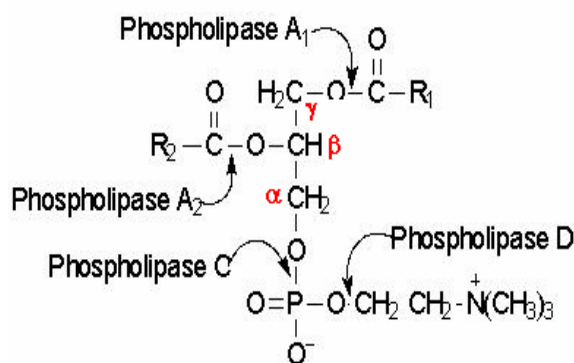


Abbildung 43 (Abbildung 1): Phospholipasen werden entsprechend Ihrer Spezifität klassifiziert. Die in dieser Arbeit untersuchten Phospholipasen A₁ und A₂ hydrolysieren die an die C_β, bzw. C_γ-Atome gebundenen Estergruppen und setzen die gebundenen Fettsäuren R₁ und R₂ frei.

Diese Eigenschaft der Phospholipasen macht sich die vorliegende Arbeit mit der in Abschn. 2.6 vorgestellten Methode zu Nutze, um die in den behandelten Enzymsystemen mit den Probenbezeichnungen PL-1007, PL-1008 und PL-1035 vorliegenden Phospholipasen zu klassifizieren und ihre enzymatischen Aktivitäten matrixunabhängig zu bestimmen.

Ergebnisse und Diskussion

Die Lysophospholipase setzt Phospholipide um, die bereits an C_β oder C_γ hydrolysiert wurden, also anstelle des Fettsäureesters eine OH-Gruppe tragen. Da aus der Reaktion der Phospholipase ein Substrat für die parallel vorliegende Lysophospholipase entsteht, ist die zeitliche Abfolge der Freisetzung der Fettsäurereste zur Beurteilung der Spezifität der Phospholipase heranzuziehen. Eine primäre Freisetzung des C_β gebundenen Fettsäurerestes lässt auf eine Phospholipase A_2 schließen, eine primäre Freisetzung der an C_γ gebundenen Fettsäure hingegen auf eine Phospholipase A_1 .

Als Substrat für die Phospholipasereaktion wurde L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl (1,486 μmol) eingesetzt. L- α -LysoPhosphatidylcholine-stearoyl (einfach verestert) (1,486 $\mu\text{mol/l}$) wurde als Substrat für die Lysophospholipasereaktion gewählt. Beide Substrate wurden in 1 ml der Stammlösung (Abschn. 2.6.1) suspendiert. Für eine komplette Umsetzung ergibt sich unter Berücksichtigung einer Wiederfindungsrate bei der Extraktion von 93,8% eine Stoffmengenkonzentration von 1,393 $\mu\text{mol/ml}$ je Fettsäurerest in den GC-Proben. Die Enzymproben wurden 1:20 mit Stammlösung (Abschn. 2.6.1) verdünnt. Zur Reaktion wurden beide Lösungen nach Inkubation bei Raumtemperatur vermischt und die Umsetzung nach definierten Zeiten durch thermische Denaturierung der Enzyme abgebrochen. Die thermische Denaturierung erfolgte in auf 94°C vorgeheizten Eppendorf-Caps. Nach 15 min wurden die Proben im Eisbad auf Raumtemperatur abgekühlt, mit Chloroform extrahiert und derivatisiert. Die anschließende GC-Analyse erfolgte nach den Methoden FS-Rev 2 (PL-1007) (Abschn. 2.7.3) und FS-Rev 2c (PL-1008, PL-1035) (Abschn. 2.7.4).

Das in Probe PL-1007 vorliegende Enzymsystem, dessen Gesamtzymkonzentration mit der Methode nach Bradford [87] zu 4,3 g/l bestimmt wurde, setzte dabei zuerst in großem Maße die Fettsäure C12:0 (Laurinsäure) frei (Abbildung 44). Eine Isolierung der PLA Aktivität war wie in Abschnitt 3.6 gezeigt wird nicht möglich. Daher ist eine Bestimmung der Phospholipasekonzentration im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgt.

Ergebnisse und Diskussion

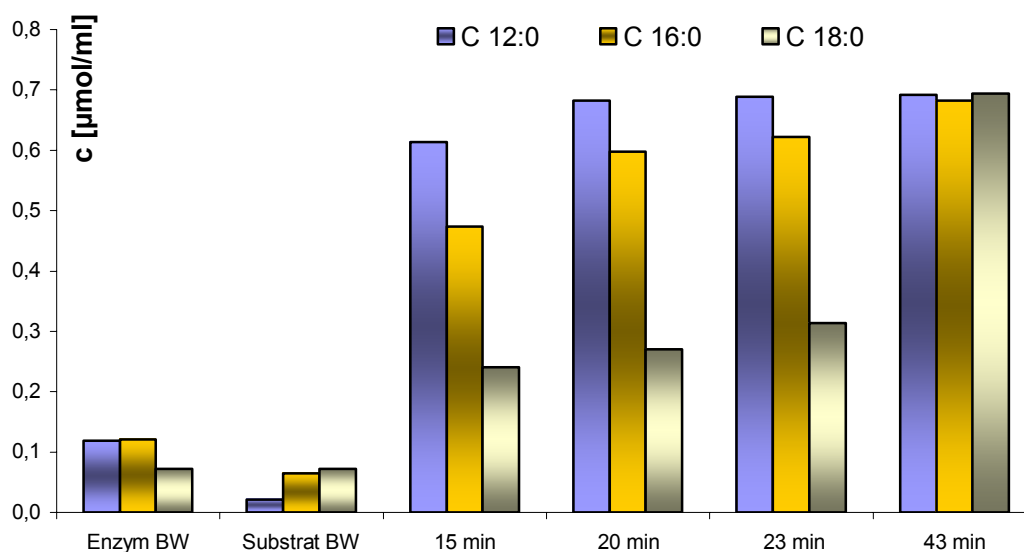


Abbildung 44: Gesamtstoffmenge der freigesetzten Fettsäuren aus der PL-1007 Reaktion bei Raumtemperatur. Die Fettsäuren C 12:0 und C 16:0 sind an die C_{β} , bzw. C_{γ} -Position von L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl gebunden, die C 18:0 ist der aliphatische Rest des L- α -LysoPhosphatidylcholine-stearoyl.

Da die Phospholipase zuerst einen Fettsäureester des bisubstituierten (C12:0 und C16:0) Phospholipids spalten muss, bevor der verbleibende Fettsäurerest durch die Lysophospholipase katalytisch gespalten werden kann, ist die zuerst frei werdende Fettsäure der Phospholipasereaktion zuzuschreiben. Jede freigesetzte Fettsäure ist repräsentativ für eine Esterposition (C_{β} oder C_{γ}), der hochspezifisch substituierten Phospholipide. Hierdurch kann eine Unterscheidung zwischen Phospholipase A_1 (C_{γ} , C16:0) und A_2 (C_{β} , C 12:0) vorgenommen werden.

Eine alternative Betrachtung ist die aus Abbildung 45 abgeleitete Zunahme der Produktstoffmenge pro Minute Reaktionszeit.

Hier ist die primäre Freisetzung der Laurinsäure (C 12:0) deutlich aus dem Verhältnis des blauen Balkens zu den anderen abzuleiten. Das Phospholipasesubstrat, hier L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl, ist an der C_{β} -Position mit Laurinsäure substituiert [88]. Daher ist die Freisetzung der Laurinsäure auf die Aktivität der Phospholipase zurückzuführen.

Ergebnisse und Diskussion

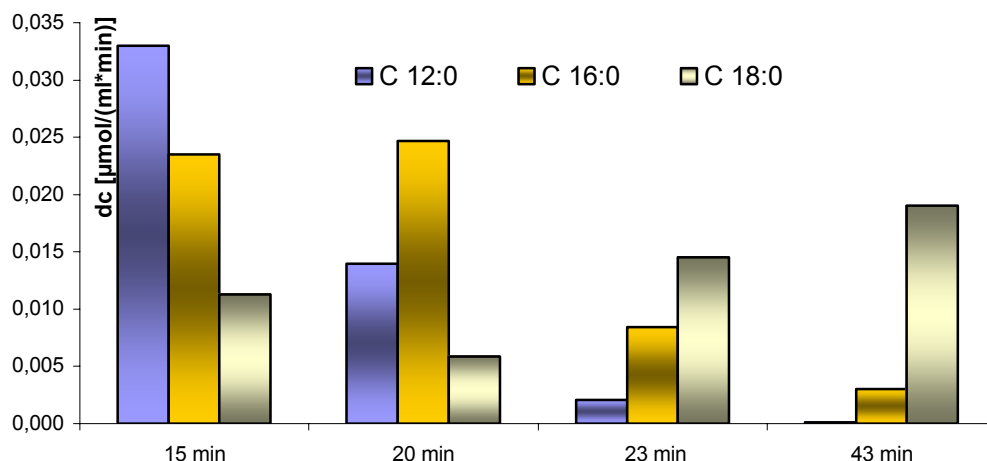


Abbildung 45: freigesetzte Fettsäuremenge pro Minute im Verlauf der PL-1007 Reaktion. Die Fettsäuren C 12:0 und C 16:0 sind an die C_β, bzw. C_γ-Position von L-α-Phosphatidylcholine-β-lauroyl-γ-palmitoyl gebunden, die C 18:0 ist der aliphatische Rest des L-α-LysoPhosphatidylcholine-stearoyl.

Bei der in der Probe PL-1007 vorliegenden Phospholipase handelt es sich folglich um eine **Phospholipase des Typs A₂ (PLA₂)**

Die signifikante Freisetzung der Fettsäuren C 16:0 aus dem Produkt der PLA₂-Reaktion und C 18:0 aus dem L-α-LysoPhosphatidylcholine-stearoyl ist der in diesem Enzymsystem vorhandenen Lysophospholipaseaktivität zuzuschreiben.

Während die Freisetzung der C 12:0 unabhängig von der Freisetzung der anderen Fettsäuren verläuft, besteht zwischen der Freisetzung von C 16:0 und C 18:0 ein direkter Zusammenhang. In den Zeitfenstern, in denen die Freisetzung der C 16:0 zurückgeht, steigt die der C 18:0 signifikant an (Abbildung 45). Es ist daher davon auszugehen, dass diese Umsetzung durch das gleiche Enzym, die Lysophospholipase, erfolgt.

Ein identisches Verfahren wie bei der Probe PL-1007 wurde auch zur Bestimmung der Spezifität der in Probe PL-1008 vorliegenden Phospholipase, deren Gesamtzymkonzentration nach Bradford [87] 4,8 g/l betrug, herangezogen. Die während der Reaktion der Probe PL-1008 freigesetzte Fettsäurestoffmenge pro ml Enzymlösung ist in Abbildung 46 zu definierten Zeiten der Reaktion abgebildet.

Ergebnisse und Diskussion

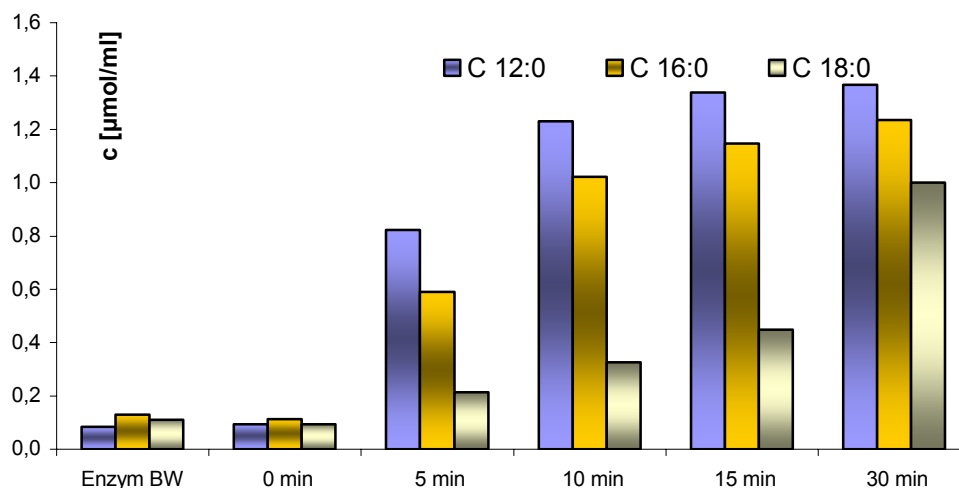


Abbildung 46: Mengen der freigesetzten Fettsäuren aus der PL-1008 Reaktion bei Raumtemperatur. Die Fettsäuren C 12:0 und C 16:0 sind an die C_β, bzw. C_γ-Position des L-α-Phosphatidylcholine-β-lauroyl-γ-palmitoyl gebunden, die C 18:0 ist der aliphatische Rest des L-α-LysoPhosphatidylcholine-stearoyl.

Die Bestimmung der Spezifität der Phospholipase erfolgt durch eine Analyse der Geschwindigkeiten der enzymatischen Reaktion (Abbildung 47).

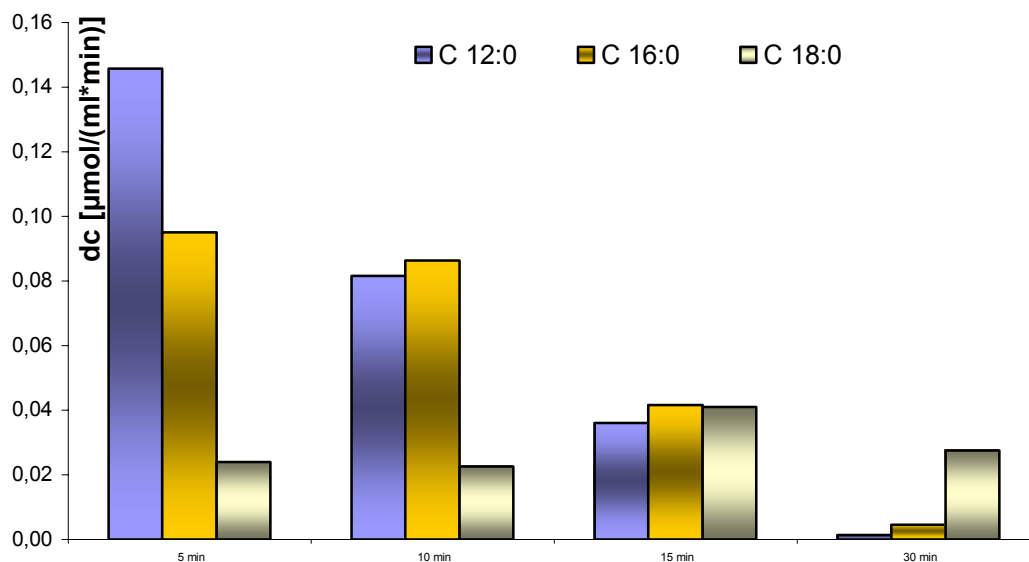


Abbildung 47: freigesetzte Fettsäuremenge pro Minute im Verlauf der PL-1008 Reaktion. Die Fettsäuren C 12:0 und C 16:0 sind an die C_β, bzw. C_γ-Position des L-α-Phosphatidylcholine-β-lauroyl-γ-palmitoyl gebunden, die C 18:0 ist der aliphatische Rest des L-α-LysoPhosphatidylcholine-stearoyl

Ergebnisse und Diskussion

Ebenso wie in Probe PL-1007 setzt die enzymatische Reaktion der Probe PL-1008 zuerst in großem Maße C12:0 frei, wodurch sich die Phospholipase aus Probe PL-1008 ebenfalls als **Phospholipase des Typs A₂ (PLA₂)** klassifizieren lässt.

Wie bereits bei der Probe PL-1007 lassen die deutlichen Umsatzraten von C16:0 und C18:0 auf eine ebenfalls vorliegende Lysophospholipaseaktivität [23] schließen.

Die Beobachtung, dass die Konzentrationsänderung der C12:0 unabhängig von der Freisetzung der anderen Fettsäuren verläuft, jedoch ein direkter Zusammenhang zwischen der Konzentrationsänderung von C16:0 und C18:0 vorliegt, bestätigt auch hier die Annahme, dass deren Umsetzung durch das gleiche Enzym, die Lysophospholipase, erfolgt.

Die letzte nach diesem Verfahren untersuchte Enzymprobe ist die Probe PL-1035. Für diese Enzymprobe wurde die Gesamtenzymkonzentration nach dem von Bradford [87] vorgestellten Verfahren zu 5,3 g/l bestimmt.

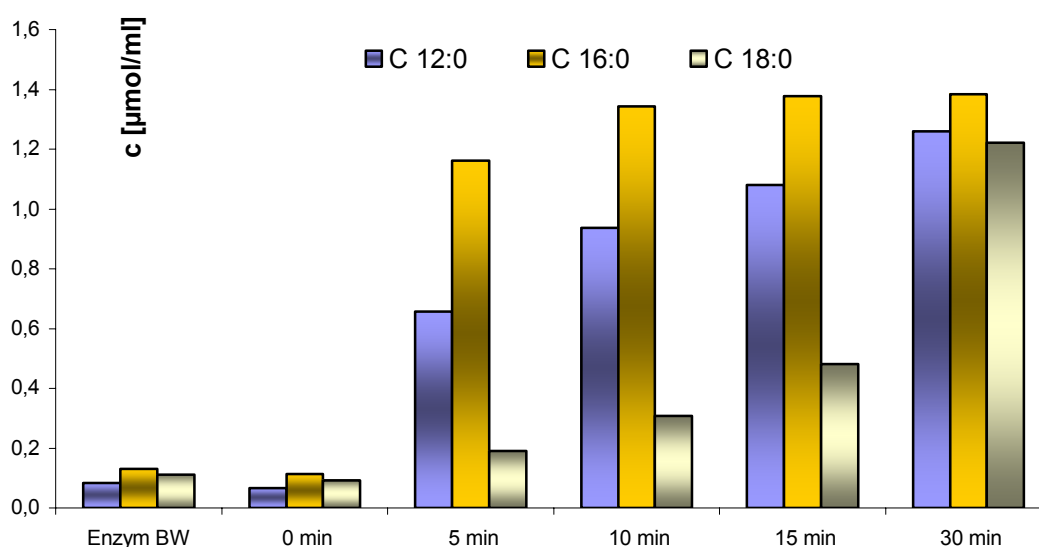


Abbildung 48: Stoffmenge der freigesetzten Fettsäuren aus der PL-1035 Reaktion bei Raumtemperatur Die Fettsäuren C 12:0 und C 16:0 sind an die C_β, bzw. C_γ-Position des L-α-Phosphatidylcholine-β-lauroyl-γ-palmitoyl gebunden, die C 18:0 ist der aliphatische Rest des L-α-LysoPhosphatidylcholine-stearoyl

In Abbildung 48 ist der Reaktionsverlauf der Probe PL-1035 wiedergegeben. Im Gegensatz zur Probe PL-1007 und der Probe PL-1008 wird hier zuerst in signifikantem

Ergebnisse und Diskussion

Maße die Fettsäure C16:0, die an die C_γ-Position des L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl gebunden ist, freigesetzt. Die Fettsäure C12:0, die bei Probe PL-1007 und Probe PL-1008 als erste freigesetzt wurde, tritt hier erst zeitversetzt auf (Abbildung 48).

Die enzymatische Reaktion der Phospholipase aus Probe PL-1035 setzt zuerst in großem Maße C 16:0 frei (Abbildung 49). Da die Fettsäure C 16:0 an das Substrat der Phospholipase gebunden ist, muss diese Aktivität der Phospholipase zugeschrieben werden. Die Änderung der Stoffmenge Fettsäure pro Minute und ml Enzymlösung ist in Abbildung 49 wiedergegeben.

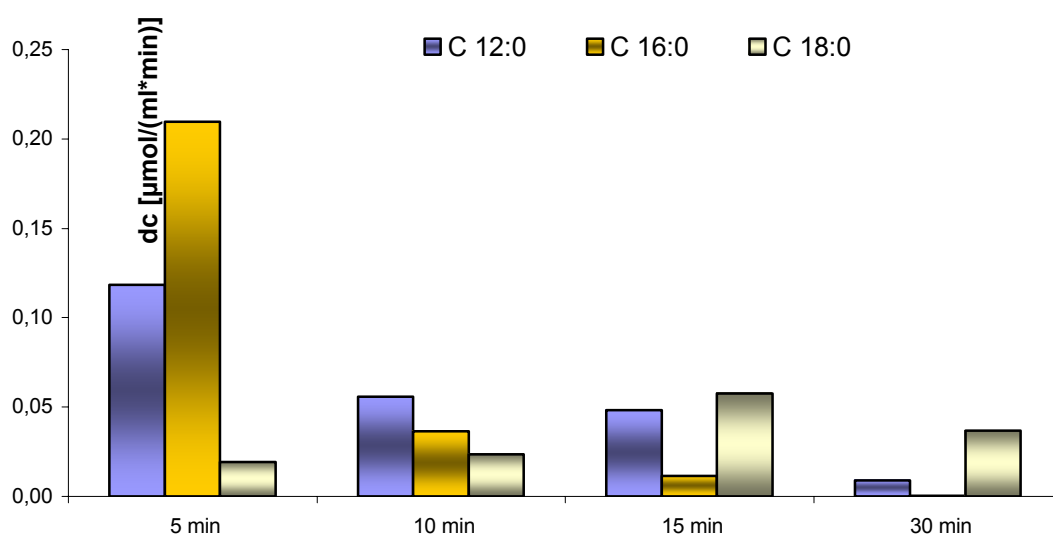


Abbildung 49: freigesetzte Fettsäuremenge pro Minute im Verlauf der PL-1035 Reaktion. Die Fettsäuren C 12:0 und C 16:0 sind an die C_β, bzw. C_γ-Position des L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl gebunden, die C 18:0 ist der aliphatische Rest des L- α -LysoPhosphatidylcholine-stearoyl

Bei der hier vorliegenden Phospholipase, die im Gegensatz zu Probe PL-1007 und Probe PL-1008 an der Palmitinsäureposition angreift, handelt es sich um eine **Phospholipase des Typs A₁ (PLA₁)**

In Übereinstimmung mit den Resultaten der Probe PL-1007 und der Probe PL-1008 weist auch Probe PL-1035 eine signifikante Lysophospholipaseaktivität auf.

Ergebnisse und Diskussion

Wie schon bei der Untersuchung der Probe PL-1007 und Probe PL-1008 festgestellt wurde ist auch bei Probe PL-1035 die Freisetzung der Fettsäure aus der Phospholipasereaktion, hier C16:0, unabhängig von der Freisetzung der anderen Fettsäuren. Jedoch besteht zwischen der Stoffmengen Zunahme von C12:0 und C18:0 ein direkter Zusammenhang. Dieser Befund lässt vermuten, dass die Abspaltung von C16:0, sowie C12:0 und C18:0 aus den Substraten durch verschiedene Enzyme erfolgt.

Mit der hier vorgestellten Methode konnten drei Enzymsysteme (PL-1007, PL-1008 und PL-1035) mit Phospholipaseaktivitäten klassifiziert werden. Bei den Phospholipaseaktivitäten aus Probe PL-1007 und Probe PL-1008 handelt es sich um Phospholipasen des Typs A₂. Hingegen liegt in der Probe PL-1035 eine Phospholipase des Typs A₁ vor. Das hier vorgestellte Verfahren ermöglicht es auf sehr einfachem, schnellem und effizientem Wege genaue Informationen über die Spezifität von Phospholipasen zu erlangen. Die bisher beschriebenen Verfahren (2.5) waren entweder, wenn es sich um einfache, automatisierte Verfahren handelte, nicht in der Lage, eine solche Klassifizierung vorzunehmen oder benötigten dafür einen wesentlich größeren apparativen, präparativen sowie zeitlichen Aufwand. Darüber hinaus stellt sich diese Methode im Gegensatz zu anderen Methoden, die radioaktiv markierte Substrate [8] verwenden, als sehr kostengünstig dar.

Eine Beschreibung der Spezifität der Lysophospholipase lässt sich mit dem Experiment, wie es hier vorgestellt wird, nicht treffen, da Lysophospholipasen sehr häufig auch die Umesterung der Lysophospholipide katalysieren [89] und somit eine Eindeutigkeit der Zuordnung der Fettsäureester zu den C_γ und C_β Positionen der Substrate nicht gewährleistet ist. Es ist jedoch ohne größeren Aufwand möglich, die Methode auch dahingehend zu modifizieren, dass Aussagen bezüglich der Spezifität der Lysophospholipase möglich werden. Hierfür wären Substrate der Lysophospholipase zu wählen, die an der C_γ oder C_β Position eine Schutzgruppe [90] aufweisen und somit eine Umlagerung verhindern. Es war jedoch das Ziel dieser Arbeit, Phospholipasen zu charakterisieren. Somit wurde auf eine Erweiterung der Methode auf eine präzise Charakterisierung der Lysophospholipaseaktivitäten verzichtet.

3.2 Substratspezifität der Phospholipasen

Neben den in 3.1 beschriebenen Möglichkeit, auf einfachem, schnellem und effizientem Wege die Spezifitäten bezüglich der Esterpositionen von Phospholipasen aufzuklären, können mit dem hier vorgestellten Verfahren durch Variation der Substrate auf die selbe und effiziente Art auch die Substratspezifitäten von Phospholipasen und ähnlichen, fettsäurefreisetzenden Enzymen untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Spezifität der Phospholipaseaktivität dreier Enzymsysteme hinsichtlich der Kettenlängen der Fettsäureester der Phosphatidylcholine näher untersucht. Hierfür wurden Phosphatidylcholone mit verschiedenen Substituenten an β - und γ -Position ausgewählt. Da Substrate für die Lysophospholipase-Reaktion nicht in ausreichender Anzahl zur Verfügung standen, wurde auf deren Einsatz verzichtet.

Tabelle 18: Substrate für die Bestimmung der Substratspezifität der Phospholipasen bezüglich der Kettenlänge der Fettsäuren. Es wurden sowohl gesättigte, wie auch ungesättigte Fettsäurereste untersucht, da hierdurch auch Informationen bezüglich der Spezifität der Phospholipasen gegenüber rigiden Substratmolekülen untersucht werden können. Die Katalognummer bezieht sich auf den Katalog 2001 von Sigma-Aldrich

Katalog-Nr.	Substituenten (β, γ)	Position	
		β	γ
P8648	dinonanoyl	C 9:0	C 9:0
P8898	diundecanoyl	C 11:0	C 11:0
P3204	lauroyl, palmitoyl	C 12:0	C 16:0
P6284	palmitoyl, hexadecyl	C 16:0	C 16:1
P8180	distearoyl	C 18:0	C 18:0
P9649	oleoyl, stearoyl	C 18:1	C 18:0
P9202	dielaidoyl	C 18:2	C 18:2
P9898	di-arachidoyl	C 20:4	C 20:4

Die ausgewählten Substrate wurden zu je 1 mg/ml in der Stammlösung (2.6.1) suspendiert. Diese Substratlösung wurde für die Enzymreaktion mit je 1 ml einer im Verhältnis 1:20 mit der Stammlösung verdünnten (2.6.1) Enzymlösung vermischt. Die Reaktionszeit bei Raumtemperatur betrug 10 min. Hiernach wurden die aktiven Enzyme in der Reaktionslösung bei 94°C (15min) thermisch denaturiert. Nach Extraktion über Extrelut 3 Säulen mit 15ml Chloroform, Eindampfen und Wiederaufnahme in 1,5ml Chloroform, wurden die Proben gaschromatographisch nach Methode FS-Rev 2d analysiert.

Ergebnisse und Diskussion

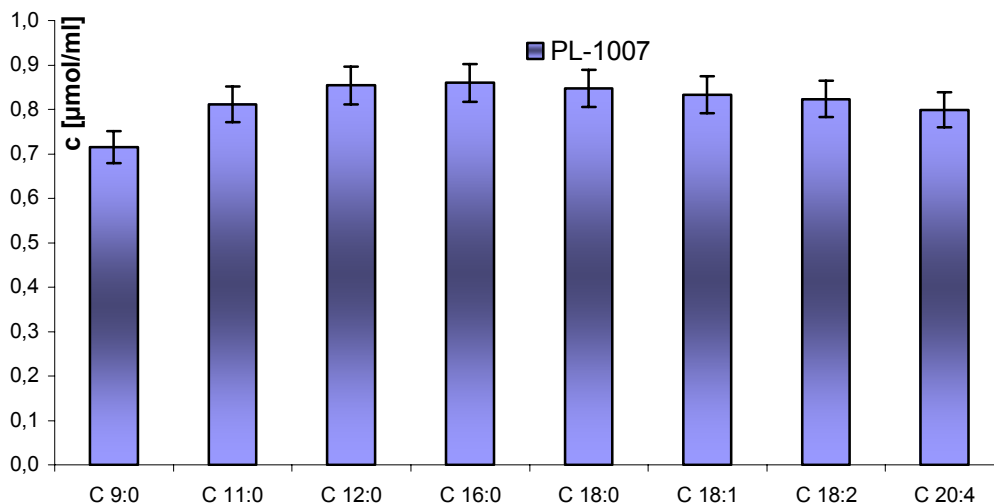


Abbildung 50: Substratspezifität der Probe PL-1007 gegenüber den an die C_{β} -Position des L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl gebundenen gesättigten und ungesättigten Fettsäureresten. Gemessen bei 20°C.

Die Probe PL-1007, in der eine die C_{β} -Position des Substrates hydrolysierende Phospholipase A_2 -Aktivität nachgewiesen wurde, (Abbildung 50) zeigt keine ausgeprägte Selektivität gegenüber verschiedenen Fettsäuren der Substrate in der β -Position. Lediglich zu kurzkettigeren $< C_{11:0}$ nimmt die Affinität leicht ab. Darüber hinaus weist diese Enzymprobe nur eine geringe Bevorzugung gesättigter Fettsäuren auf. Die Bindungseigenschaften scheinen also von der Rigidität der an das Substrat gebundenen Fettsäuren unabhängig zu sein.

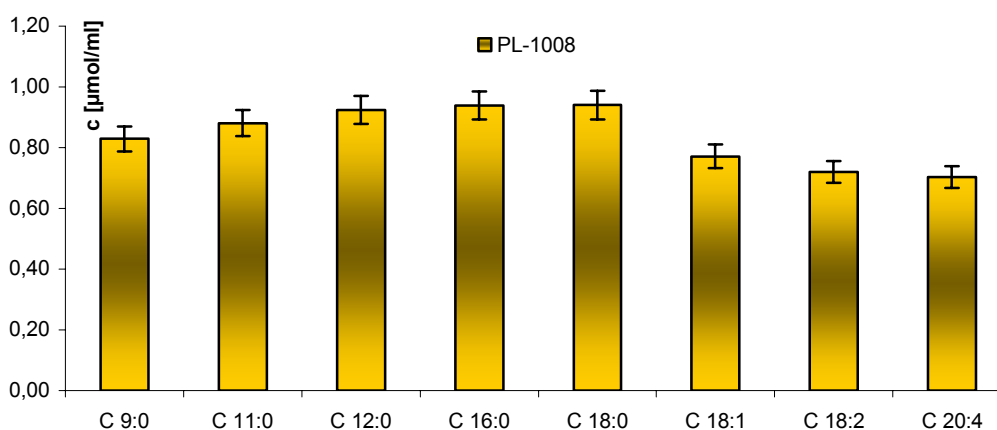


Abbildung 51: Substratspezifität der Probe PL-1008 gegenüber den an die C_{β} -Position des L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl gebundenen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. Gemessen bei 20°C.

Hingegen zeigt die Probe PL-1008, die ebenso wie die Probe PL-1007 eine an C_{β} angreifende Phospholipase A_2 -Aktivität aufweist, in Abbildung 51 eine deutliche

Ergebnisse und Diskussion

Bevorzugung zugunsten gesättigter Fettsäurereste. Dies wird besonders beim Vergleich der mit C18:0 und C18:1 Fettsäureresten substituierten Substrate deutlich. Hierbei liegt der Umsatz des C18:0 substituierten Lipids ca. 20% über dem des C18:1, und ca. 25% über dem des C18:2 substituierten Substrates. Für die Ausbildung einer maximalen Aktivität der Probe PL-1008 scheint daher eine größere Flexibilität der Substratmoleküle notwendig zu sein. Die Kettenlängenabhängigkeit hingegen ist bei der Probe PL-1008 nur geringfügig stärker ausgeprägt als bei der Probe PL-1007. Eine Präferenz im Kettenlängenbereich von C 16:0 bis C 18:0 ist jedoch unverkennbar.

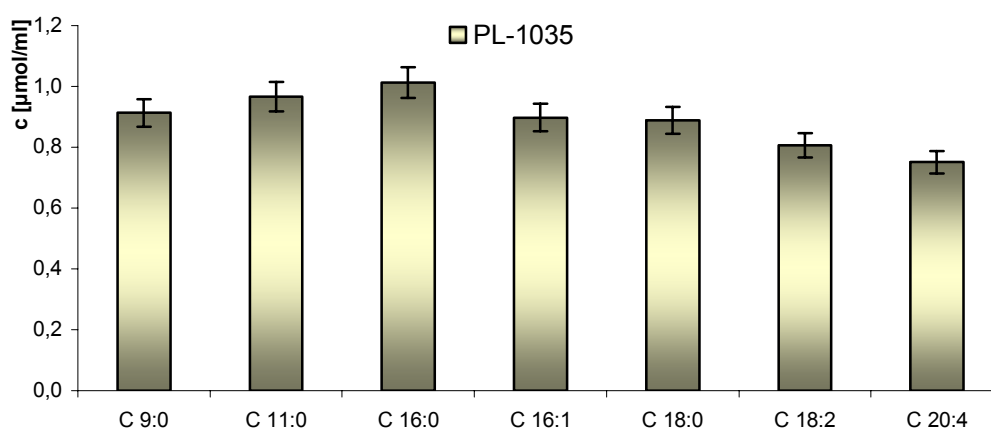


Abbildung 52: Substratspezifität der Probe PL-1035 gegenüber verschiedenen an der C_γ-Position des L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl gebundenen gesättigten und ungesättigten Fettsäureresten. (bei 20°C).

Sowohl eine ausgeprägte Kettenlängenspezifität wie auch eine Favorisierung gesättigter Fettsäurereste ist im Falle der Probe PL-1035 in Abbildung 52 zu erkennen, in der die Raten der freigesetzten Fettsäuremenge der C_γ-Position des Substrates gegen die Kettenlänge aufgetragen ist. Bei der Phospholipase, die in Probe PL-1035 enthalten ist, handelt es sich um eine Phospholipase des Typs A₁, die den an die C_γ-Position des Substrates gebundenen Fettsäureester hydrolysiert. Die Selektivität gegenüber gesättigten Fettsäureresten ist jedoch deutlich geringer als in Probe PL-1008. Das Umsatzmaximum dieser Phospholipase liegt im Bereich der C16:0 Fettsäuren. Längere Fettsäureketten werden deutlich diskriminiert, ebenso wie ungesättigte und daher weniger flexible Fettsäurereste.

Der direkte Vergleich der Substratspezifitäten in Abbildung 53 zeigt, dass die Phospholipase in Probe PL-1007 (A₂; C_β) nach 10 Minuten Reaktionszeit bei

Ergebnisse und Diskussion

Raumtemperatur bezüglich der Phospholipide mit ungesättigten Fettsäureresten die höchsten Umsätze aufweist. Dagegen werden die Umsätze im Bereich der langkettigen (C 18:0) gesättigten Fettsäuren von der Phospholipase aus Probe PL-1008 ($A_2;C_\beta$) dominiert. Die absolut höchsten Umsätze bei mittel- bis kurzkettig substituierten Phospholipide hingegen weist die Phospholipase aus Probe PL-1035 ($A_1;C_\gamma$) auf.

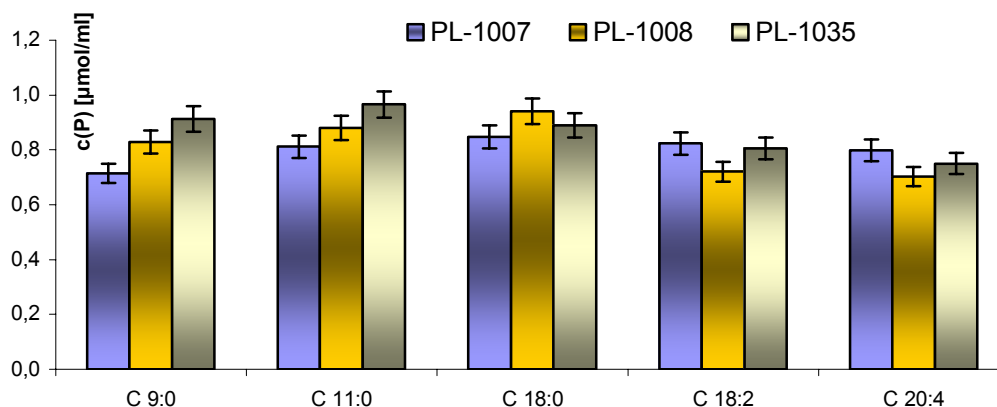


Abbildung 53: Substratspezifitäten der Proben PL-1007 ($A_2;C_\beta$), PL-1008 ($A_2;C_\beta$) und PL-1035 ($A_1;C_\gamma$) im Vergleich. Die relativ höchsten Umsatzraten im Bereich der ungesättigten, langkettigen Fettsäurereste zeigt die PL aus PL-1007. Hingegen werden die Umsatzraten im kurzkettigen Bereich von der PL aus PL-1035 dominiert.

Die Substratspezifitäten aller drei Phospholipasen unterscheiden sich nicht signifikant. Allerdings sind in einigen Bereichen Präferenzen erkennbar.

Besondere Unterschiede der Substratspezifität bezüglich gesättigter bzw. ungesättigter Fettsäurereste ergeben sich aus Abbildung 53. Da sich die gesättigten und ungesättigten Fettsäurereste vorwiegend durch ihre mehr oder weniger ausgeprägte Flexibilität unterscheiden [91], lässt sich hierin die Ursache für die unterschiedlichen Affinitäten vermuten. Diese Annahme wird auch durch die Ergebnisse von Neas et al. [92] gestützt. Diese Gruppe fand eine Bevorzugung von gesättigten Fettsäureresten, besonders bei einer Reaktionstemperatur um 20°C. Okazaki et al [93] zeigten, dass für eine Phospholipase aus der menschlichen Uterusschleimhaut bezüglich der Spezifität hinsichtlich gesättigter und ungesättigter Fettsäurereste der hier gefundene Zusammenhang bestätigt werden kann. Allerdings weist die von Okazaki et al untersuchte Phospholipase eine deutlich höhere Aktivität bei größeren Fettsäurekettenlängen auf.

3.3 Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Aktivität

Zur Beurteilung enzymatischer Parameter ist die Kenntnis der Temperaturabhängigkeit der enzymatisch katalysierten Reaktion von Interesse. Neben der optimalen Umsetzungstemperatur können hieraus Informationen bezüglich der Enzymstabilität erhalten werden. Diesen Parametern kommt besonders bei industriell eingesetzten Enzymen eine besondere Bedeutung zu, da in industriellen Großprozessen die Enzyme oft im Kreislauf gefahren werden, und somit jeweiligen Reaktionstemperaturen über einen möglichst langen Zeitraum ein Maximum an Aktivität aufweisen sollten [94]. Daher ist es notwendig, die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit enzymatischer Reaktionen unter Bedingungen zu untersuchen, die den in industriellen Großprozessen eingestellten Prozessparametern entsprechen [95]. Die hier vorgestellte Methode zur Beurteilung und Messung enzymatischer Aktivitäten zeichnet sich vor allem durch eine hohe Flexibilität hinsichtlich der Reaktionsbedingungen aus, da Reaktion und Analyse klar separiert sind. Bei dieser Methode können die Reaktionsparameter faktisch beliebig variiert und somit an die jeweiligen Prozessbedingungen angepasst werden. Bei den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Substraten handelt es sich um synthetische Moleküle, jedoch ist im Sinne der weiteren Anpassung an gegebene Prozessbedingungen auch der Einsatz von Substratgemischen denkbar.

Zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Aktivität wurde je 1 mg Phosphatidylcholine, β -Lauroyl, γ -Palmitoyl und 0,8 mg LysoPhosphatidylcholine-stearoyl in je 1 ml der Stammlösung (2.6.1) suspendiert. Die verschiedenen Einwaagen wurden gewählt, um äquivalente Stoffmengen von 1,486 μmol für die Reaktion vorzulegen. Unter Berücksichtigung einer Reproduzierbarkeit der Extraktion von 93,8% liegen bei einem theoretischen Maximalumsatz 1,393 $\mu\text{mol/ml}$ in den GC-Proben vor. Die Enzymprobe wurde mit der Stammlösung (pH 4,4) (2.6.1)1:10 verdünnt. Vor der Reaktion wurden beide Lösungen bei der Reaktionstemperatur inkubiert, und nach 10 min Inkubationszeit vermischt. Zum Abbruch der Reaktion nach 60 Sekunden wurde die Reaktionslösung in auf 94°C vorgeheizte Eppendorf-Caps gegeben. Nach 15 min wurde die Reaktionslösung über Extrelut 3 Säulen mit Chloroform extrahiert, derivatisiert und nach Methode FS-Rev 2d gaschromatographisch analysiert.

Ergebnisse und Diskussion

Der Umsatz der Phospholipasereaktion (PLA₂; C_β) aus Probe PL-1007 in

Abbildung 54 wird durch die freigesetzte Fettsäure C 12:0 aus Phosphatidylcholine,β-Lauroyl,γ-Palmitoyl (blaue Linie) abgebildet. Das Umsatzmaximum, also die Temperatur der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit der Phospholipase liegt bei Probe PL-1007 zwischen 50°C und 60°C. Auch bei 80°C ist über 60 Sekunden noch eine signifikante Restaktivität nachweisbar.

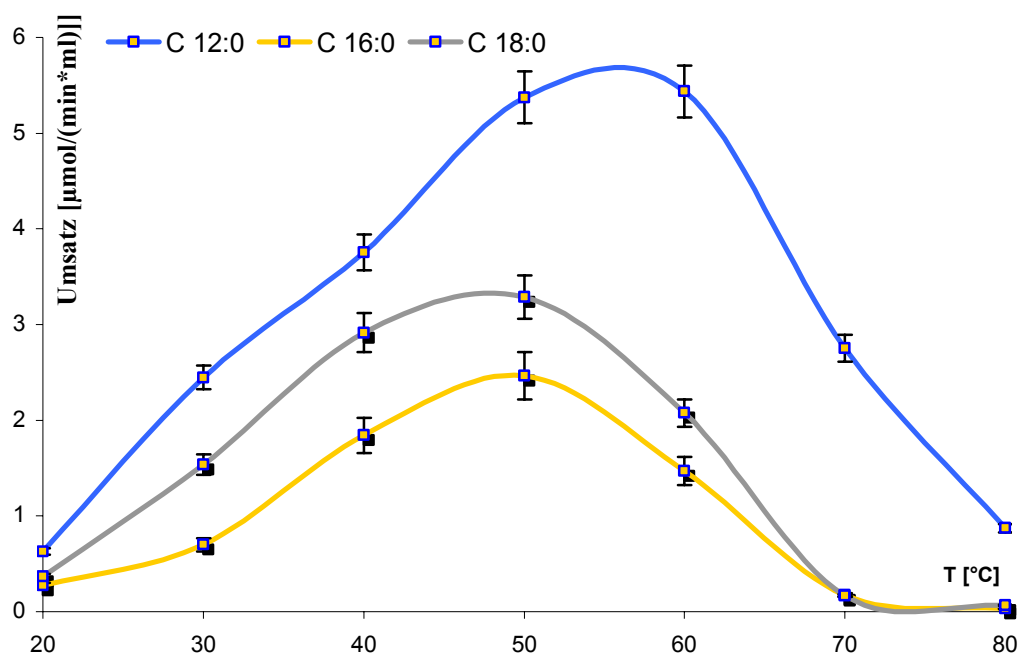


Abbildung 54: Temperaturabhängigkeit der Aktivität der Probe PL-1007. Der Umsatz ist in μmol pro Minute und ml Enzymlösung angegeben. Die Umsätze der Phospholipase (blau, C12 aus L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl) (PLA₂; C_β) zeigen maximale Werte bei ca. 55°C, und eine hohe Stabilität des Enzyms bis 80°C. Die Lysophospholipase (gelb, C16 aus L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl und grau, C18 aus L- α -LysoPhosphatidylcholine-stearoyl) hat ein Umsatzmaximum bei 50°C, ist jedoch bei 70°C nahezu vollständig denaturiert.

Die Lysophospholipaseaktivität, die durch die freigesetzten Fettsäuren C16:0 (aus Phosphatidylcholine,β-Lauroyl,γ-Palmitoyl nach erfolgter Hydrolyse eines Fettsäureesters durch die Phospholipase) und C18:0 (aus LysoPhosphatidylcholine-stearoyl) repräsentiert wird, hat ihr Maximum im Vergleich zu Phospholipase deutlich zu kleineren Temperaturen verschoben. Der Punkt maximalen Umsatzes pro Zeiteinheit liegt für die Lysophospholipase bei ca. 50°C.

Ergebnisse und Diskussion

Die Temperaturstabilität der Lysophospholipase ist gegenüber der Phospholipase deutlich geringer ausgeprägt, bereits ab ca. 70°C ist ein signifikanter Umsatz nicht mehr nachweisbar.

Die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivitäten in Probe PL-1008 erfolgte zu den gleichen Bedingungen wie bei Probe PL-1007. Allerdings ist die Absolutaktivität beider Enzymsysteme nicht vergleichbar, da die Gesamtenzymkonzentrationen (4,3 g/l PL-1007 und 4,8 g/l PL-1008) deutlich voneinander abweichen. Bezüglich der Phospholipasekonzentration oder Lysophospholipasekonzentration lagen keine Informationen vor.

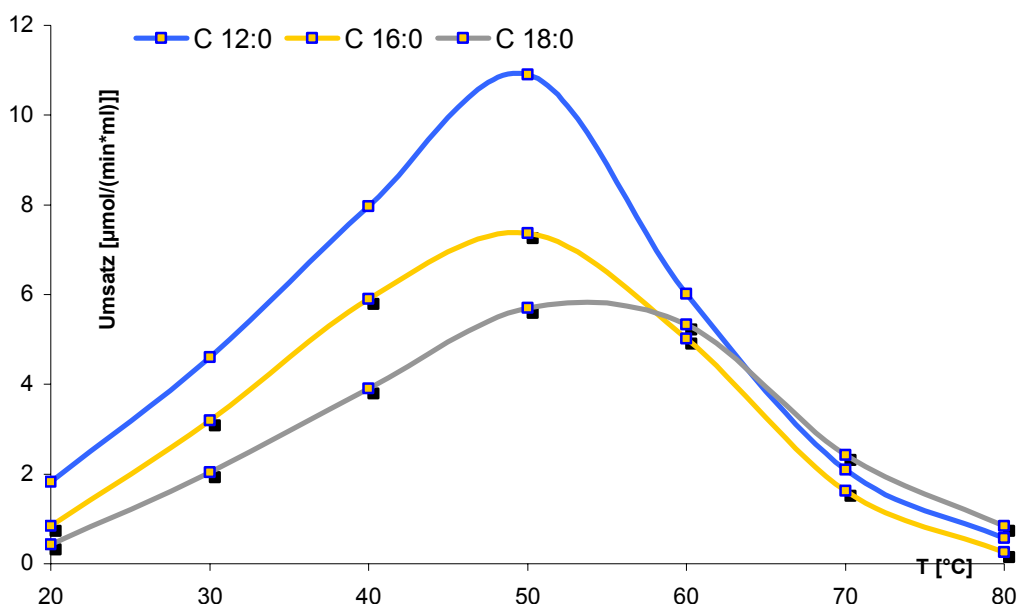


Abbildung 55: Temperaturabhängigkeit der Aktivität der PL-1008. Der Umsatz ist in μmol pro Minute und ml Enzymlösung angegeben. Die Umsätze der Phospholipase (blau, C12 aus L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl) zeigen maximale Werte bei ca 50°C. Die Lysophospholipase (gelb, C16 aus L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl und grau, C18 aus L- α -LysoPhosphatidylcholine-stearoyl) hat ein Umsatzmaximum bei 55°C, bei 80°C sind beide Enzyme nahezu vollständig denaturiert.

Wie schon bei der Probe PL-1007 wird der Umsatz der Phospholipasereaktion aus Probe PL-1008 in Abbildung 55 durch die freigesetzte Fettsäure C 12:0 aus dem Phospholipasesubstrat (C_{β}) abgebildet. Das Umsatzmaximum, also die Temperatur der maximalen Phospholipaseaktivität liegt für Probe PL-1008 bei 50°C. Im Gegensatz zu

Ergebnisse und Diskussion

Probe PL-1007 ist jedoch bei 80°C nach 60 Sekunden keine signifikante Restaktivität mehr nachweisbar.

Die Lysophospholipaseaktivität wird durch die freigesetzten Fettsäuren C16:0 (aus Phosphatidylcholine, β -Lauroyl, γ -Palmitoyl) und C18:0 (aus Lysophosphatidylcholine, Stearoyl) abgebildet. Jedoch ist hier zu berücksichtigen, dass die Freisetzung der C16:0 Fettsäure an die vorausgehende Phospholipasereaktion gebunden ist. Somit darf die Lysophospholipaseaktivität nicht allein auf Basis der C16:0 Freisetzung beurteilt werden. Die reduzierte Freisetzung der Fettsäure C16:0 oberhalb von 50°C ist nicht aus einen Rückgang der Lysophospholipaseaktivität, sondern vielmehr durch einen, auf die stark abgeschwächte Phospholipaseaktivität zurückzuführenden, Substratmangel begründet. Die Umsätze des im Überschuss vorliegenden, und damit von der Phospholipaseaktivität unabhängigen Lysophospholipasesubstrates erreichen erst zwischen 55°C und 60°C ihr Maximum. Im Gegensatz zu dem Enzymsystem aus Probe PL-1007 liegt hier also eine Lysophospholipase vor, die eine höhere Temperaturstabilität als die Phospholipase aufweist.

Da es sich bei der Phospholipase aus Probe PL-1035 im Gegensatz zu der Phospholipase aus Probe PL-1007 und Probe PL-1008 um eine Phospholipase des Typs A₁ handelt, der die Acylreste der C _{γ} -Position hydrolysiert, wird der Umsatz der Phospholipasereaktion aus PL-1035 in Abbildung 56 nicht durch die freigesetzte Laurinsäure C12:0, sondern durch die Palmitinsäure C16:0 beschrieben. Das Umsatzmaximum liegt für Probe PL-1035 bei 50°C. Wie bei Probe PL 1008, aber im Gegensatz zu Probe PL-1007 ist bei 80°C keine signifikante Restaktivität mehr nachweisbar.

Ergebnisse und Diskussion

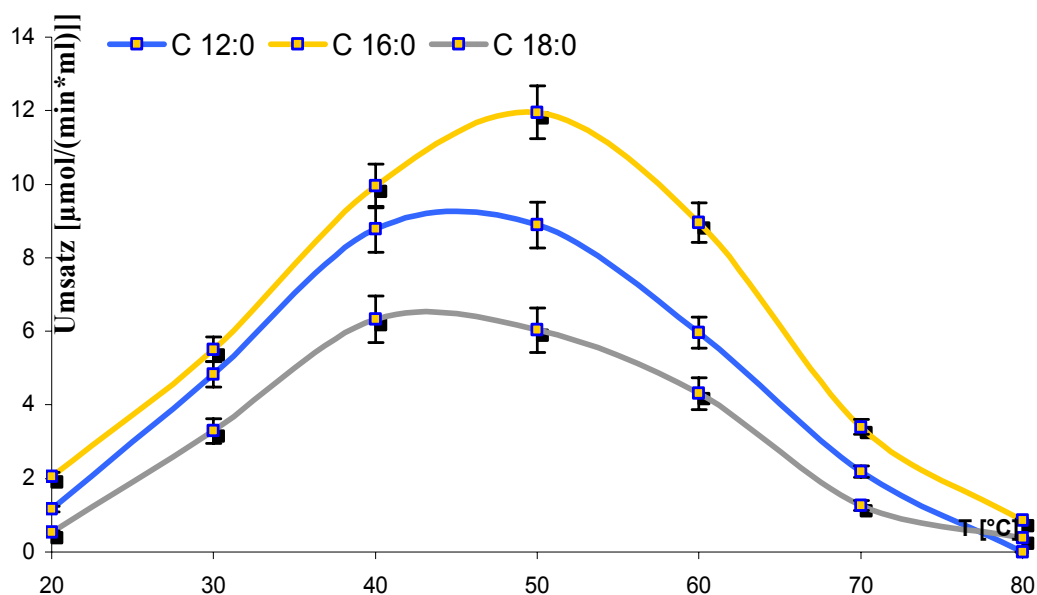


Abbildung 56: Temperaturabhängigkeit der Aktivität der Probe PL-1035. Der Umsatz ist in μmol pro Minute und ml Enzymlösung angegeben. Die Umsätze der Phospholipase (gelb, C16 aus L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl) zeigen maximale Werte bei ca. 50°C. Die Lysophospholipase (blau, C12 aus L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl und grau, C18 aus L- α -LysoPhosphatidylcholine-stearoyl) hat ein Umsatzmaximum bei 45°C; bei 80°C sind beide Enzyme nahezu vollständig denaturiert.

Die Lysophospholipaseaktivität wird durch die aus Phosphatidylcholine, β -Lauroyl, γ -Palmitoyl freigesetzte Laurinsäure (C12:0) und die aus Lysophosphatidylcholine, Stearoyl freigesetzte Stearinsäure (C18:0) repräsentiert. Jedoch ist hier wiederum zu berücksichtigen, dass die Freisetzung der Laurinsäure C12:0 an die vorausgehende Phospholipasereaktion gebunden ist, und daher die Aktivität der Lysophospholipase nicht direkt abzubilden vermag. Die Umsätze des im Überschuss vorliegenden, und für die Lysophospholipaseaktivität repräsentativen, Lysophospholipasesubstrates erreichen bereits bei 45°C ihr Maximum. Allerdings dürfen auch hierbei Inhibitionsprozesse durch Konkurrenz zweier Substrate um ein aktives Zentrum nicht vernachlässigt werden. Zur Optimalen Bestimmung der Aktivität der Lysophospholipase wäre somit nur ein Versuch in Abwesenheit jedes Phospholipasesubstrates heranzuziehen. Im Vergleich zu den Enzymsystemen aus Probe PL-1007 und Probe PL-1008 weist die Lysophospholipase aus Probe PL-1035 die geringste Temperaturstabilität auf.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Phospholipaseaktivitäten aller drei Enzymsysteme ein sehr ähnliches Verhalten gegenüber Temperaturänderungen zeigen.

Ergebnisse und Diskussion

Lediglich das Temperaturoptimum der Probe PL-1007 ist um 5°C bis 10°C zu höheren Temperaturen verschoben. Darüber hinaus weist die in diesem Enzymsystem enthaltene Phospholipase die größte Stabilität auf, da sie auch noch bei 80°C ein signifikantes Maß an Aktivität zeigt.

Aus der Temperaturabhängigkeit der Lysophospholipaseaktivitäten ist kein so homogenes Bild wie bei den Phospholipaseaktivitäten zu erkennen. Die Temperaturbereiche maximalen Umsatzes erstrecken sich hier von 45°C für die Probe PL-1035 bis zu 60°C im Falle der Probe PL-1008.

Abgesehen von einigen Proteinen aus thermophilen Organismen, die Denaturierungstemperaturen zwischen 70°C und 110°C aufweisen, werden andere Phospholipasen zwischen 30°C und 80°C denaturiert [94]. Bei den hier vorgestellten Phospholipasen handelt es sich demnach im Vergleich zu anderen Enzymen um eine sehr temperaturstabile Spezies, die sich folglich gut für den industriellen Einsatz eignet [96].

Neben der Abschätzung der Temperaturstabilität war es Ziel dieser Messungen, eine geeignete Temperatur für die kinetischen Untersuchungen der Enzymsysteme zu bestimmen. Um eine möglichst gute zeitliche Auflösung, also geringe Reaktionsgeschwindigkeit zu erlangen, wurde für die kinetische Analyse eine Reaktionstemperatur von 20°C gewählt.

3.4 pH-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität

Neben dem in 3.3 untersuchten Einfluss der Temperatur auf die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion und die Stabilität der Enzyme stellt auch die Kenntnis dieser Parameter bei verschiedenen pH-Werten ein nicht zu vernachlässigendes Kriterium zur Beurteilung enzymatischer Reaktionen dar. Hierbei muss allerdings nicht immer ein direkter Zusammenhang zwischen dem optimalen pH-Wert für die Reaktivität und der Stabilität der Enzyme bestehen. [94,96,97]

Bei Untersuchungen der Enzymaktivitäten bei verschiedenen pH-Werten zeichnet sich die hier vorgestellte Analyseverfahren wiederum durch eine universelle Einsetzbarkeit aus, da die Analysenschritte vom pH-Wert der Reaktionslösung nicht beeinflusst werden. Hierbei sei vor allem die Extraktionsmethodik hervorgehoben, die gute Resultate über einen weiten pH-Bereich von pH1- pH13 der wässrigen Phase liefert, und dabei die Probleme der klassischen flüssig-flüssig Extraktion von Lipidlösungen durch Emulsionsbildung ausschließt [98].

In Abschnitt 2.7.8 wurde die Stabilität der Substrate in einem pH-Bereich von pH 3,30 bis pH 5,06 beurteilt. Es konnte gezeigt werden, dass unter den gewählten Reaktionsbedingungen der Einfluss der säurekatalysierten Verseifung der in den Substraten enthaltenen Fettsäureester auf die Fettsäurefreisetzung zu vernachlässigen ist. Unter Anwendung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode wurde auch die Abhängigkeit der Substratumsätze von Phospholipasen (PL) und Lysophospholipasen (LPL) aus den Proben PL-1007, PL-1008 und PL-1035 innerhalb dieses pH-Bereiches näher untersucht.

Eine ausreichende Kenntnis der pH-Abhängigkeit ist nicht nur für die Bestimmung des optimalen pH-Wertes für die enzymatische Umsetzung notwendig, sondern auch um den Einfluss schwankender pH-Werte auf die Reaktionsgeschwindigkeit beurteilen zu können. Während der Reaktion freigesetzte Fettsäuren sollten den pH-Wert absenken, und somit bei einer sehr ausgeprägten Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert zu einer Verlangsamung der Reaktion führen, wenn durch die pH-Absenkung

Ergebnisse und Diskussion

der für die enzymatische Umsetzung optimale pH-Bereich verlassen wird. Eine kinetische Untersuchung wäre damit mit Fehlern behaftet.

Zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität wurde je 1 mg Phosphatidylcholine, β -Lauroyl, γ -Palmitoyl und 0,8 mg LysoPhosphatidylcholine-stearoyl in 1 ml der Stammlösung (2.6.1) verschiedener pH-Werte suspendiert. Die verschiedenen Einwaagen wurden gewählt, um äquivalente Stoffmengen von 1,486 μ mol für die Reaktion vorzulegen. Unter Berücksichtigung einer Reproduzierbarkeit bei der Extraktion von 93,8% ergibt sich bei theoretischem Vollumsatz eine Fettsäurekonzentration von 1,393 μ mol/ml in den GC-Proben. Die Enzymprobe wurde 1:10 mit Stammlösung (2.6.1) verdünnt. Zur Reaktion wurden beide Lösungen bei Raumtemperatur vermischt. Zum Abbruch der Reaktion nach 5 Minuten wurde die Reaktionslösung in auf 94°C vorgeheizte Eppendorf-Caps gegeben, und über 15 min denaturiert.

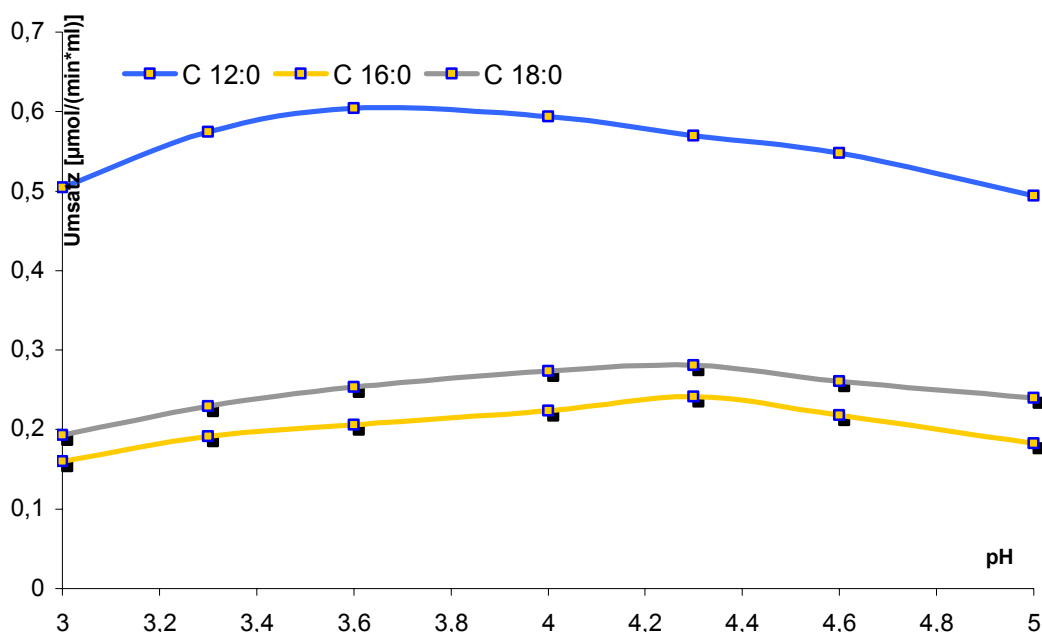


Abbildung 57: Substratumsatz der Probe PL-1007 bei pH-Werten zwischen pH 3,0 und pH 5,0 bei einer Reaktionsdauer von 5 Minuten. Den Maximalumsatz pro Zeit und Volumen Enzymlösung erreicht die PLA₂ bei pH 3,6, die LPL bei pH 4,3. (blau: C12 und gelb: C16 aus L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl, grau: C18 aus L- α -LysoPhosphatidylcholine-stearoyl)

Im Falle der Phospholipase aus der Probe PL-1007 (PLA₂;C β) ist bei der Umsetzung von Phosphatidylcholine, β -Lauroyl, γ -Palmitoyl und LysoPhosphatidylcholine-stearoyl

Ergebnisse und Diskussion

im pH-Bereich zwischen pH 3,0 und pH 5,0 eine Änderung des Umsatzes von 16 % festzustellen (Abbildung 57). Das Umsatzmaximum liegt bei pH 3,6.

Auch die Lysophospholipaseaktivität (LPL) zeigt eine geringe Abhängigkeit vom pH-Wert der Reaktionslösung. Hier liegt die Umsatzänderung von 30% prozentual jedoch über der der Phospholipaseaktivität (PLA₂). Das Umsatzmaximum ist gegenüber der Phospholipaseaktivität leicht zu basischen pH-Werten von pH=4,3 verschoben. Weniger deutlich fallen die Unterschiede der von Phospholipase und Lysophospholipase bevorzugten pH-Werte im Falle des Enzymsystems aus Probe Probe PL-1008 aus (Abbildung 58). Der maximale Umsatz der Phospholipaseaktivität (blau, C12) liegt hier bei pH 4,0.

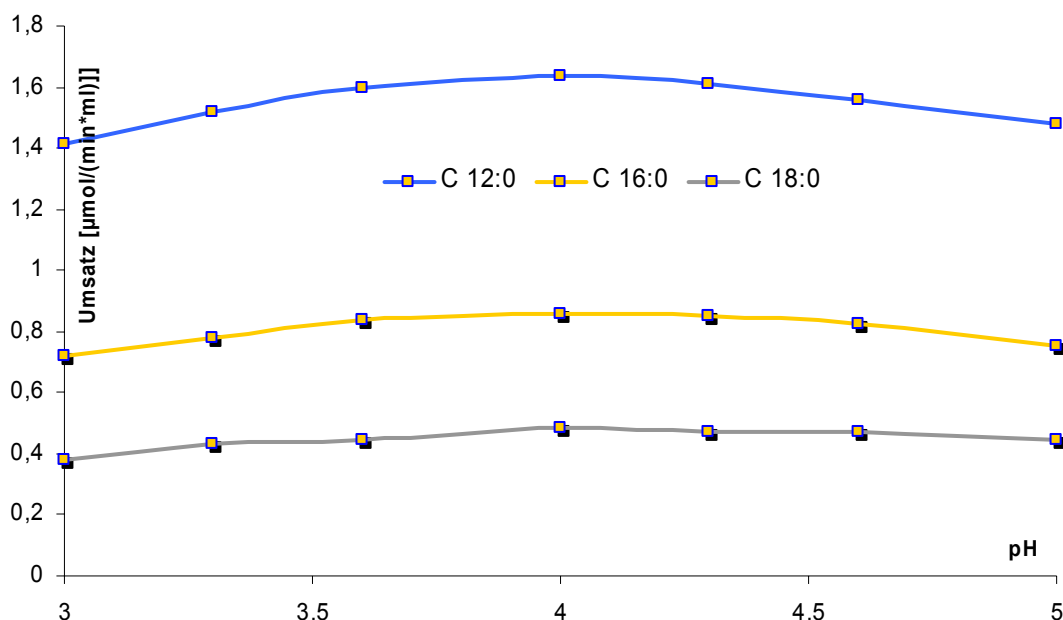


Abbildung 58: Substratumsatz der Probe PL-1008 bei pH-Werten zwischen pH 3,0 und pH 5,0 bei einer Reaktionsdauer von 5 Minuten. Den Maximalumsatz pro Zeit und Volumen Enzymlösung erreicht die PLA₂ bei pH 4,0, die LPL bei pH 4,3. (blau: C12 und gelb: C16 aus L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl, grau: C18 aus L- α -LysoPhosphatidylcholine-stearoyl)

Ihren maximalen Umsatz hingegen erreicht die Lysophospholipaseaktivität (gelb, grau) schon bei einem nur in geringem Maße höherem pH-Wert von pH 4,3.

Bei der Phospholipase aus der Probe PL-1035 (gelb, Fettsäure C 16:0 in Abbildung 59) ist das Umsatzmaximum weiter zu höheren pH-Werten verschoben als bei den Proben

Ergebnisse und Diskussion

PL-1007 und PL-1008. Die Phospholipaseaktivität aus der Probe PL-1035 weist einen maximalen Umsatz pro Zeiteinheit und Volumeneinheit der Enzymlösung pH 4,3 auf (Abbildung 59). Die Lysophospholipase erreicht das Umsatzmaximum bei pH 4,6.

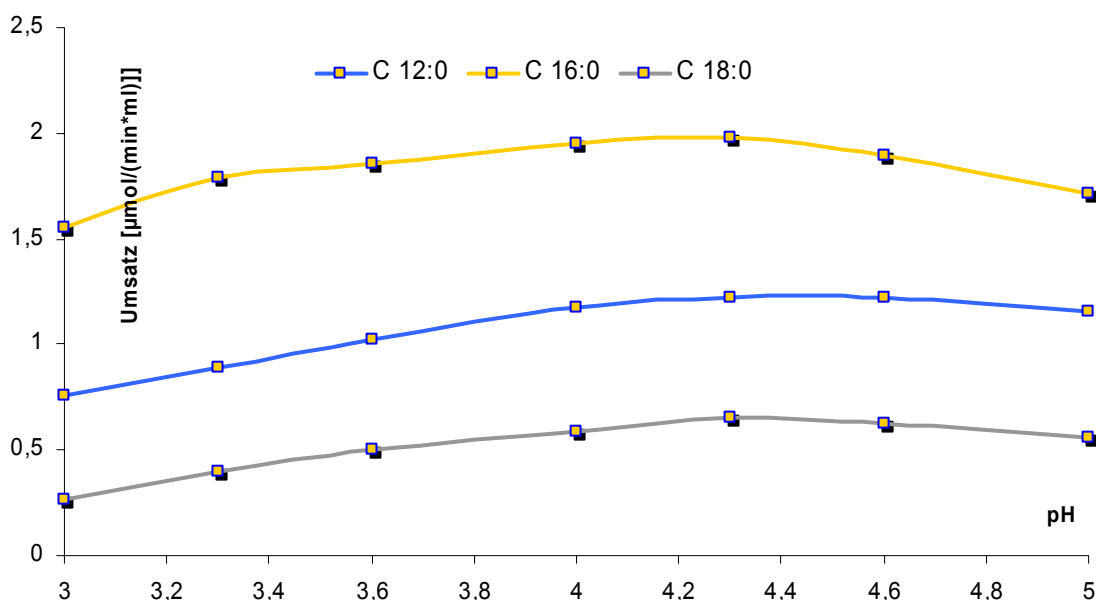


Abbildung 59: Substratumsatz der Probe PL-1035 bei pH-Werten zwischen pH 3,0 und pH 5,0 bei einer Reaktionsdauer von 5 Minuten. Den Maximalumsatz pro Zeit und Volumen Enzymlösung erreicht die PLA₂ bei pH 4,3, die LPL bei pH 4,6. (blau: C12 und gelb: C16 aus L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl, grau:C18 aus L- α -LysoPhosphatidylcholine-stearoyl)

Bei der Auswahl eines geeigneten pH-Wertes für kinetische Untersuchungen ist zu berücksichtigen, dass der pH-Wert der Reaktionslösung durch frei werdende Fettsäuren in den sauren Bereich verschoben wird. Experimentell konnte gezeigt werden, dass diese Absenkung kann bis zu 0,5 pH Einheiten betragen kann.

Es ist auf Grund der Verschiedenheit der pH-Wert-Präferenzen der Phospholipasen und Lysophospholipasen unmöglich, einen pH-Wert zu finden, der der Phospholipase- und Lysophospholipaseaktivität gleichermaßen optimal gerecht wird. Bei einem Reaktions-pH-Wert von pH 4,4 erreichen jedoch alle drei Phospholipasen einen nahezu maximalen Umsatz. Auch eine geringfügige Änderung des pH-Wertes durch freiwerdende Fettsäuren beeinflusst den pH-Wert nicht in dem Maße, dass ein merklicher Aktivitäts- und damit Umsatzrückgang durch die pH-Änderung zu beobachten wäre.

Ergebnisse und Diskussion

Wie sich aus den Abbildung 57 bis Abbildung 59 ergibt, erreichen die hier untersuchten Phospholipasen zwischen pH 3,6 und pH 4,3 den maximalen Substratumsatz. Dies steht in guter Übereinstimmung mit der Literatur. So wurden von Yost et al [98] pH-Werte für einen optimalen Substratumsatz von pH 4-5 für Phospholipasen A₁ und A₂ aus Hefe [99], und von Kunze et al optimale Reaktionsbedingungen einer Phospholipase A₁ aus Leberzellen bei einem pH-Wert von pH 4,5 beschrieben. Allerdings werden in der Literatur auch Phospholipasen mit maximaler Aktivität bei basischen pH-Werten beschrieben [100,101,102]. Durchgängig lässt sich feststellen, dass die hier untersuchten Phospholipasen zu den Vertretern Ihrer Art gehören, die in saurem Medium eine maximale Aktivität entfalten. Auch kann die geringe Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität als Hinweis auf eine ausgeprägte Stabilität der Enzyme gewertet werden.

Lysophospholipasen aus den hier untersuchten Enzymsystemen weisen einen optimalen pH-Wert unterhalb der korrespondierenden Phospholipasen auf. Für die Probe PL-1007 liegt der pH-Wert maximaler Aktivität 0,7 pH-Einheiten unter der der entsprechenden Phospholipase, bei den Proben PL-1008 und PL-1035 sind es jeweils nur 0,3 pH-Einheiten. Dieser Zusammenhang ist auch in der Literatur von Hirano et al [23] beschrieben worden, die für eine PLA₁ aus Linnaeus einen optimalen pH-Wert von pH 6,5 bis pH 7,0 und für die korrespondierende Lysophospholipase einen pH-Wert maximaler Aktivität von pH 6,0 bis pH 6,5 also 0,5 pH-Einheiten tiefer beobachteten.

3.5 Reaktionsverlauf und Kooperativität

Die untersuchten Enzymsysteme weisen neben einer Phospholipaseaktivität auch eine Lysophospholipaseaktivität auf. Wie bereits mehrfach angesprochen, wird neben der freien Fettsäure durch die Phospholipaseaktivität auch das Substrat der Lysophospholipaseaktivität bereitgestellt. Diese Kooperativität kann anhand der Reaktionsverläufe näher untersucht werden. Darüber hinaus kann die zeitliche Abfolge der Produktfreisetzung auch Hinweise auf mögliche Inhibitions- oder Aktivierungsprozesse liefern. In der Literatur wurde für eine Phospholipase A₁ eine Hemmung durch ein Reaktionsprodukt (freie Fettsäuren), jedoch gleichzeitig eine Aktivierung durch das andere (Lysophosphatidylcholine) beschrieben [103,104].

Eine detaillierte Analyse dieser Aktivierungs- bzw. Inhibitionsvorgänge wird dadurch erschwert, dass neben den Phospholipase- und Lysophospholipaseaktivitäten noch eine deutliche Lipaseaktivität in den Enzymproben festzustellen war. Durch diese Lipaseaktivität werden Fettsäuren aus den Emulgatoren (Tween20) abgespalten, die zu einer verstärkten Hemmung der Phospholipase- und Lysophospholipaseaktivität beitragen. Es kommt also durch Freisetzung von Fettsäuren aus der Lipase-Nebenreaktion, der Lysophospholipasereaktion und der Phospholipasereaktion selber zu einer Inhibition der Phospholipaseaktivität. Neben dieser Hemmung trägt das ebenso durch die Phospholipase freigesetzte Lysophosphatidylcholine zu einer Aktivierung der Phospholipase bei [104].

Durch die sich im Reaktionsverlauf ständig ändernde Konzentration der Substrate für die Reaktion der Lysophospholipase liegen auch hier sehr komplexe kinetische Zusammenhänge vor, die eine detaillierte Beschreibung nahezu ausschließen. Neben dem in definierter Menge zugesetzten L- α -Lysophosphatidylcholine-Steaoryl wird durch die Phospholipaseaktivität neben der Fettsäure auch ein Lysophosphatidylcholine gebildet. Darüber hinaus kann es bei Lysophosphatidylcholinen, besonders bei höheren Temperaturen, zu Umesterungen kommen, was eine reaktionskinetische Betrachtung weiter erschweren würde [105,106].

Ergebnisse und Diskussion

Die Anforderungen hinsichtlich Präzision und Reproduzierbarkeit der verwendeten Analysemethode, die bereits in Abschnitt 2.7 aufgezeigt und nachgewiesen wurden, sind bei der Analyse des zeitlichen Verlaufs einer Reaktion ebenso von Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die durch die katalytischen Reaktionen freigesetzte Fettsäuremenge über die gesamte Reaktionszeit verfolgt. Hierzu wurden 25 ml einer Substratlösung mit 1mg/ml L- α -Phosphatidycholine- β -Lauroyl- γ -Palmitoyl (1,486 mM) und 0,8 mg/ml L- α -Lysophosphatidycholine-Steaoyl (1,486 mM) in einer Stammlösung (2.6.1) angesetzt. Die verwendete Stammlösung enthielt 100 g/l Tween, 20, 4 g/l Calciumacetat und 350 g/l Glycerin. Der pH-Wert von pH 4,4 wurde mit Zitronensäure eingestellt. Die Enzymlösung wurde mit der gleichen Stammlösung (2.6.1) im Verhältnis 1:20 verdünnt. Nach Inkubation und Vermischung fand die Reaktion unter Rühren bei Raumtemperatur statt. Ständiges, starkes Rühren ist von essentieller Bedeutung, um die Homogenität der Reaktionslösung zu gewährleisten [107,108]. Zu den jeweiligen Messzeiten wurde dieser Reaktionslösung je 1 ml entnommen und in auf 94°C vorgeheizte Eppendorf-Caps eingefüllt. In diesen, in einem Heizblock befindlichen Caps wurde die Enzymlösung über 15 min bei 100°C deaktiviert. Anschließend wurden die Fettsäuren mit 15ml Chloroform über Extrelut 3 Säulen extrahiert, bis zur Trockne in einer „Speed-Vac“ eingeeengt, und in 1,5 ml Chloroform aufgenommen. Diese Lösung wurde mit 0,15 ml einer Derivatisierungslösung mit TMCS und BSTFA (99:1) derivatisiert. Anschließend wurde der Fettsäuregehalt gaschromatographisch bestimmt.

Die gaschromatographische Untersuchung des Reaktionsverlaufes der Probe PL-1035 und der Probe PL-1008 erfolgte nach Methode FS-Rev 2d, die Analyse der Probe PL-1007 nach FS-Rev 2c.

3.5.1 Proben PL-1035 und PL-1008

Wie bereits in Abschnitt 3.1 festgestellt werden konnte, handelt es sich bei der Phospholipase aus der Proben PL-1008 um eine Phospholipase des Typs PLA_2 , während es sich bei der Phospholipase aus der Probe PL-1035 um eine PLA_1 handelt. Entsprechend der Resultate aus Abschnitt 3.1, wurde die bevorzugte Freisetzung der an die C_γ -Position des L- α -Phosphatidylcholine- β -Lauroyl- γ -Palmitoyl gebundene Fettsäure C16:0 für die PLA_1 aus der Probe PL-1035 beobachtet (Abbildung 60). Das aus dieser Reaktion resultierende L- α -Lysophosphatidylcholine-Lauroyl (C12:0) dient wiederum als Substrat für die Lysophospholipase, und tritt somit in Konkurrenz zu dem in der Reaktionslösung äquimolar vorliegenden Lysophosphatidylcholine-Stearyl (C18:0).

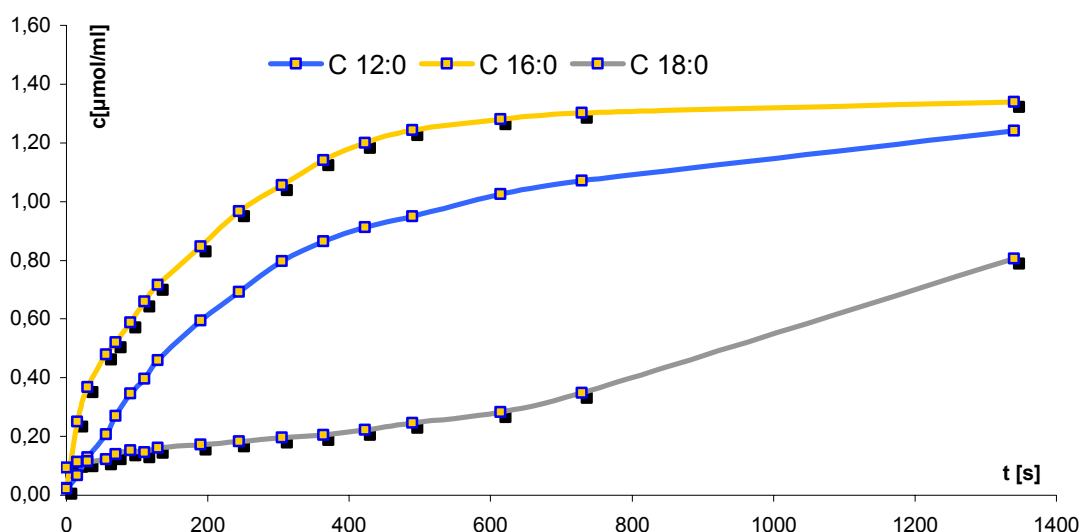


Abbildung 60: Zeitlicher Verlauf der Reaktion der Probe PL-1035. Die gelbe Linie repräsentiert die PLA_1 -Aktivität (C16:0, C_γ), die blaue (C12:0, C_β) und die graue die LPL-Aktivität aus PL-1035

Ebenso wie in der Probe PL-1035 zeigt auch die PLA_2 aus der Probe PL-1008 die primäre Freisetzung einer Fettsäure aus dem Phosphorlipid. Entsprechend der Spezifität der PLA_2 für die C_β -Position des Phospholipides wird durch die PLA_2 aus PL-1008 zuerst die an C_β -Position des L- α -Phosphatidylcholine- β -Lauroyl- γ -Palmitoyl gebundene Fettsäure C12:0 freigesetzt. Bezüglich der Lysophospholipasereaktion kommt es bei der Probe PL-1008 zu einer Konkurrenz zwischen

Ergebnisse und Diskussion

L- α -Lysophosphatidylcholine-Palmitoyl (C16:0) und dem in der Reaktionslösung äquimolar vorliegenden Lysophosphatidylcholine-Stearoyl (C18:0).

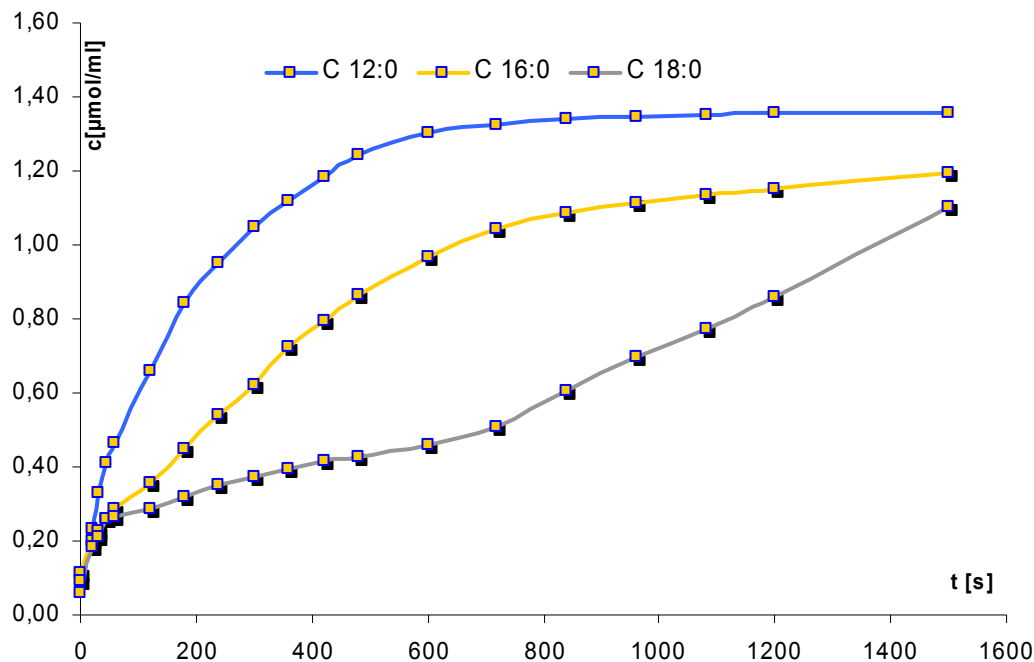


Abbildung 61: Zeitlicher Verlauf der Reaktion von der Probe PL-1008. Die blaue Linie repräsentiert die PLA₂-Aktivität (C 12:0, C_β), die gelbe (C 16:0, C_γ) und die graue die LPL-Aktivität aus PL-1008

Die Freisetzung der Fettsäuren aus den Lysophospholipiden ist bei PL-1008 und PL-1035 gegenüber der konkurrierenden Freisetzung der Fettsäure C18:0 aus L- α -Lysophosphatidylcholine-Stearoyl stark bevorzugt (Abbildung 60 und Abbildung 61). Die Freisetzung der Fettsäure C18:0 aus L- α -Lysophosphatidylcholine-Stearoyl kommt nach einigen Sekunden der Reaktion fast zum Erliegen, während die Fettsäuren C16:0 sowie C12:0 aus den durch die Reaktion der PLA₁ beziehungsweise PLA₂ gebildeten Lysophospholipasesubstrate ungebremst durch die Lysophospholipase freigesetzt werden. Daher ist davon auszugehen, dass die kürzerkettigen Fettsäuren von der Lysophospholipase bevorzugt umgesetzt werden. Erst nachdem die Phospholipasereaktion aufgrund von Substratmangel verlangsamt wird, steigt die Umsetzung des L- α -Lysophosphatidylcholine-Stearoyl wieder an, da nun das L- α -Lysophosphatidylcholine-Stearoyl im deutlichen Überschuss vorliegt.

3.5.2 Probe PL-1007

Das Enzymsystem aus Probe PL-1007 wurde eingehender untersucht als die Enzymsysteme aus Probe PL-1008 und PL-1035, da es als Beispielsystem im besonderen Interesse dieser Arbeit, und in wesentlich größeren Mengen zur Verfügung stand. Zur Klärung der Frage, ob es sich bei den beiden, parallel vorliegenden, und nicht isolierbaren Phospholipase- und Lysophospholipaseaktivitäten um zwei Enzyme, oder nur um ein Enzym mit verschiedenen Funktionalitäten handelt, wurde eine Untersuchung mit Variation der Substratmenge durchgeführt. Ausgehend von der Annahme, dass bei Vorhandensein nur eines aktiven Zentrums die Steigerung eines Substrates automatisch die Umsetzung des anderen inhibieren sollte, wurde in einem ersten Versuch die 1,5 fache Menge der bei den anderen Versuchen eingesetzten Substratmenge von 1,486 $\mu\text{mol/ml}$ des Phospholipasesubstrates eingesetzt. Gleichzeitig wurde die Substratmenge des Lysophospholipasesubstrates um den Faktor 0,5 reduziert.

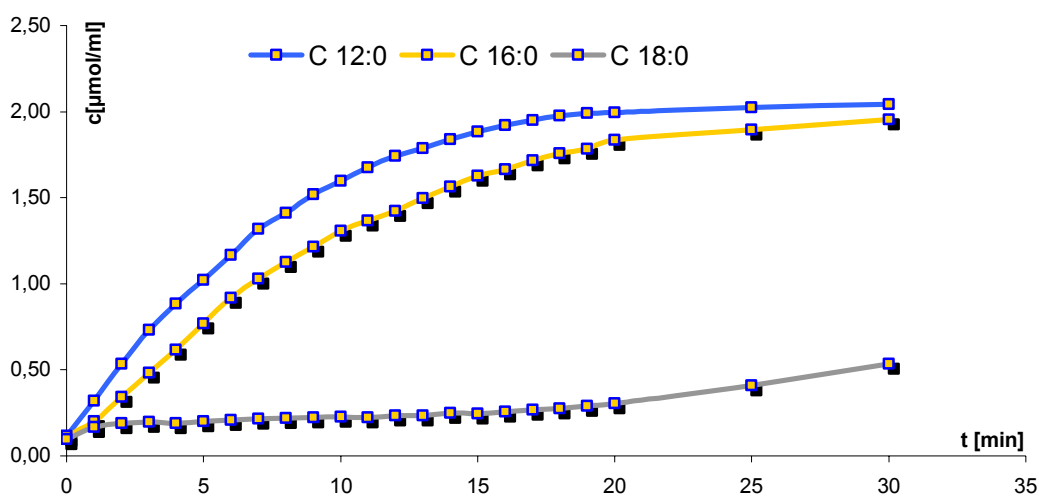


Abbildung 62: Zeitlicher Verlauf der Reaktion von PL-1007 mit 2,229 μmol Phosphatidylcholine- β -Lauroyl- γ -Palmitoyl, und 0,743 μmol L- α -Lysophosphatidylcholine-Stearoyl (100%-Werte ohne Extraktionsverlust von 6,73%) Die blaue Linie repräsentiert die PLA₂-Aktivität (C12:0, C _{β}), die gelbe (C16:0, C _{γ}) und die graue Linie die LPL-Aktivität

Für den zweiten Reaktionsansatz der Probe PL-1007 wurden die Konzentrationsverhältnisse von Phospholipasesubstrat und Lysophospholipasesubstrat im Vergleich zum ersten Ansatz invertiert. Es wurde die 1,5 fache Menge der bei den anderen Versuchen eingesetzten Substratstoffmenge von 1,486 $\mu\text{mol/ml}$ des

Ergebnisse und Diskussion

Lysophospholipasesubstrates eingesetzt. Gleichzeitig wurde die Substratmenge des Phospholipasesubstrates um den Faktor 0,5 reduziert. Die Substratkonzentrationen lagen bei 0,743 $\mu\text{mol/ml}$ für das Phospholipasesubstrat (C12:0 und C16:0), und bei 2,229 $\mu\text{mol/ml}$ für das Substrat der Lysophospholipase (C18:0).

Es ist davon auszugehen, dass die Aktivität der Lysophospholipasereaktion allein durch den Substratüberschuss des Lysophospholipasesubstrates bestimmt wird. Der Einfluss des aus der Phospholipasereaktion freigesetzten Substrates der Lysophospholipase kann als vernachlässigbar eingestuft werden (Abbildung 63).

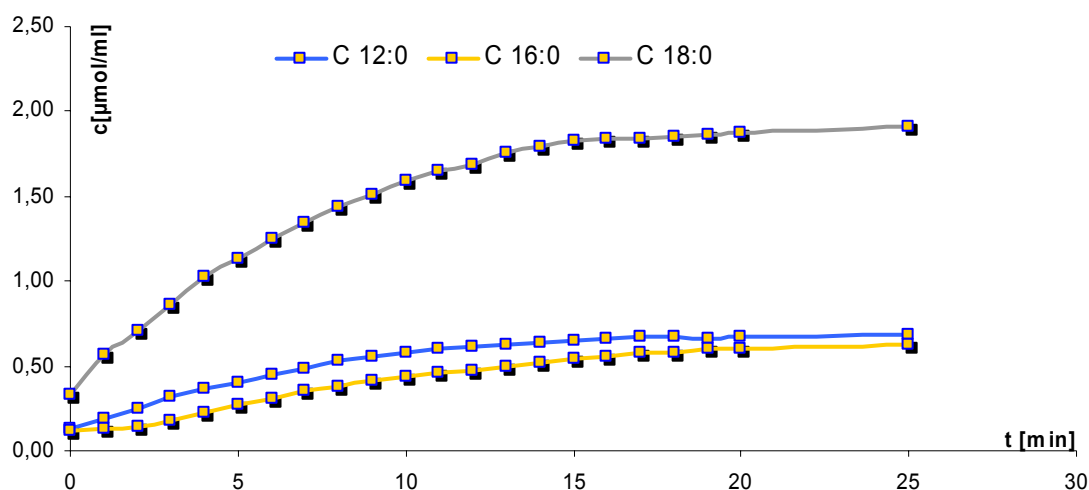


Abbildung 63: Verlauf der Reaktion von PL-1007 mit 2,229 μmol L- α -Lysophosphatidcholine-Steaeryl, und 0,743 μmol Phosphatidcholine- β -Lauroyl- γ -Palmitoyl (100%-Werte ohne Extraktionsverlust von 6,73%) Die blaue Linie repräsentiert die PLA₂-Aktivität (C 12:0, C _{β}), die gelbe (C 16:0, C _{γ}) und die graue Linie die LPL-Aktivität

Aus der Überlagerung der Konzentrationsänderungen der Fettsäure C12:0 aus beiden Substratansätzen (Abbildung 64) geht hervor, dass kein Einfluss auf die Umsatzrate der Phospholipase durch Variation der Menge des Lysophospholipasesubstrats besteht.

Ergebnisse und Diskussion

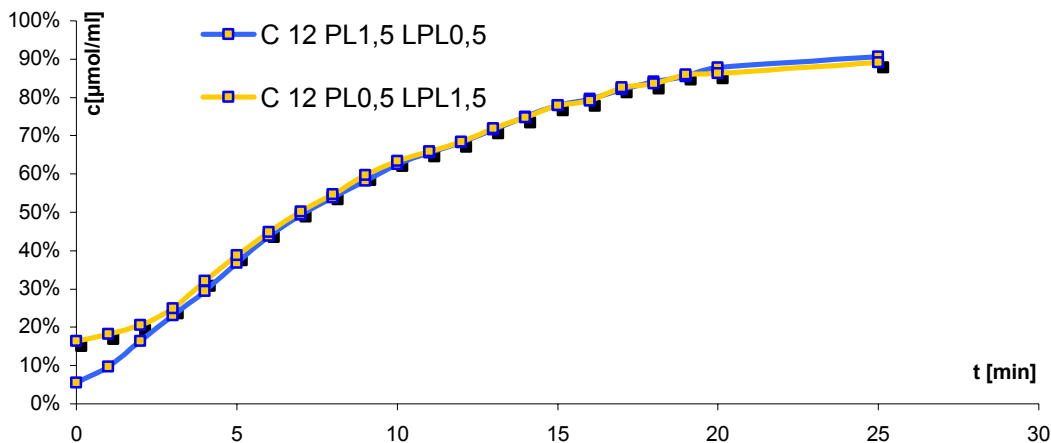


Abbildung 64: Überlagerungen der C 12:0 Freisetzung durch die Phospholipase mit 1,5 und 0,5 facher LPL-Substratkonzentration

Da die vorliegende Änderung der Konzentration des Lysophospholipasesubstrates keinen Einfluss auf die Umsetzung des Phospholipasesubstrates hat, ist davon auszugehen, dass es sich bei Phospholipase und Lysophospholipase um unabhängige Enzyme handelt.

Hingegen weist die Umsetzung des Substrates der Lysophospholipase, das aus der Phospholipasereaktion entsteht, eine deutliche Abhängigkeit von der Lysophospholipasesubstratkonzentration auf (Abbildung 65).

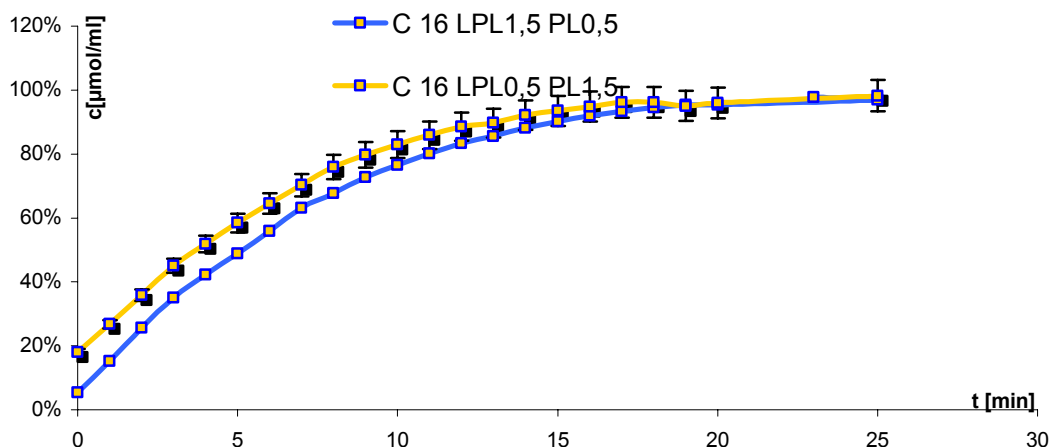


Abbildung 65: Überlagerungen der C 16:0 Freisetzung durch die Lysophospholipase mit 1,5 und 0,5 facher LPL-Substratkonzentration

E r g e b n i s s e u n d D i s k u s s i o n

Bei einem Überschuss des C18:0 Lysophosphatidylcholins ist die Umsetzung des aus der Phospholipasereaktion entstandenen Lysophospholipasesubstrates Lysophosphatidyl-choline-Palmitoyl deutlich reduziert. Diese Reaktionen werden folglich durch das gleiche Enzym katalysiert.

Die parallele Phospholipase- und Lysophospholipaseaktivität wird auch in der Literatur beschrieben [23]. Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnisse wird in der Literatur aber teilweise eine Kinetik beschrieben, die für hohe 230 mg/ml Enzymkonzentrationen nach einem anfänglichen Burst-Bereich eine lineare Zunahme der Produktkonzentration mit der Zeit zeigt. Für geringe 930 ng/ml Enzymkonzentrationen bei 250 μ M Substratkonzentration nähern sich die von Matthew G. vorgestellten kinetischen Daten einer cytosolischen Phospholipase A₂ immer mehr dem hier gezeigten Reaktionsverlauf an [107].

3.6 Free-Flow-Elektrophorese der PL-1007

Da die klassischen, in der Biochemie eingesetzten Methoden zur Enzymtrennung [19] bei der Trennung der LPL- und PLA₂-Aktivität nicht zu befriedigenden Ergebnissen führten, wurden Versuche mit einer präparativen Free-Flow-Elektrophorese unternommen.

Die gaschromatographische Analyse der Reaktionsprodukte nach elektrophoretischer Trennung der Enzymaktivitäten zeigen, dass Phospholipase- und Lysophospholipaseaktivitäten eindeutig separiert werden konnten (Abbildung 66). Die Aktivitätsbewertung erfolgte unmittelbar nach der Trennung.

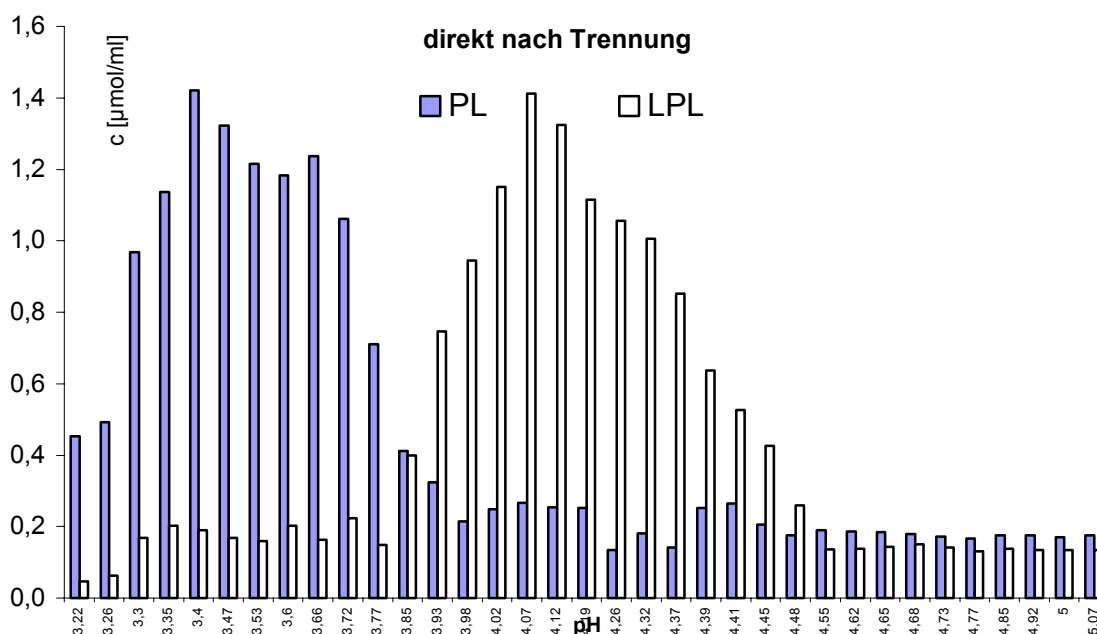


Abbildung 66: Ergebnisse der Aktivitätsprüfung direkt nach der elektrophoretischen Trennung. Zu diesem Zeitpunkt waren die Aktivitäten von Phospholipase und Lysophospholipase deutlich, wenn auch nicht zu 100% getrennt. (Substrate: L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl, L- α -LysoPhosphatidylcholine-stearoyl)

Während das Aktivitätsmaximum der Phospholipase in Fraktion 13 (pH 3,4) beobachtet wurde, zeigt die Lysophospholipase in Fraktion 24 (pH 4,1) die maximale Aktivität.

Ergebnisse und Diskussion

Mit der Methode der Free-Flow-Elektrophorese ist eine Trennung von Lysophospholipase und Phospholipase möglich, da in den Fraktionen maximaler Phospholipaseaktivität die Restaktivität der Lysophospholipase sehr gering ausgeprägt ist. Ebenso ist eine Restaktivität der Phospholipase in den Fraktionen maximaler Lysophospholipaseaktivität kaum noch nachweisbar.

Diese Ergebnisse legen also den Schluss nahe, dass es sich bei der Phospholipase und Lysophospholipase nicht etwa um ein Enzym mit zwei aktiven Zentren oder ein unspezifisch wirkendes aktives Zentrum handelt. Vielmehr zeigen diese Resultate eindeutig, dass die verschiedenen Aktivitäten in der Probe PL-1007 jeweils an ein eindeutiges Enzym gebunden sind.

Zur Kontrolle der Ergebnisse wurden die Proben nach diesen Analysen 2 Wochen bei Raumtemperatur aufbewahrt, und erneut einer Aktivitätsbewertung unterzogen.

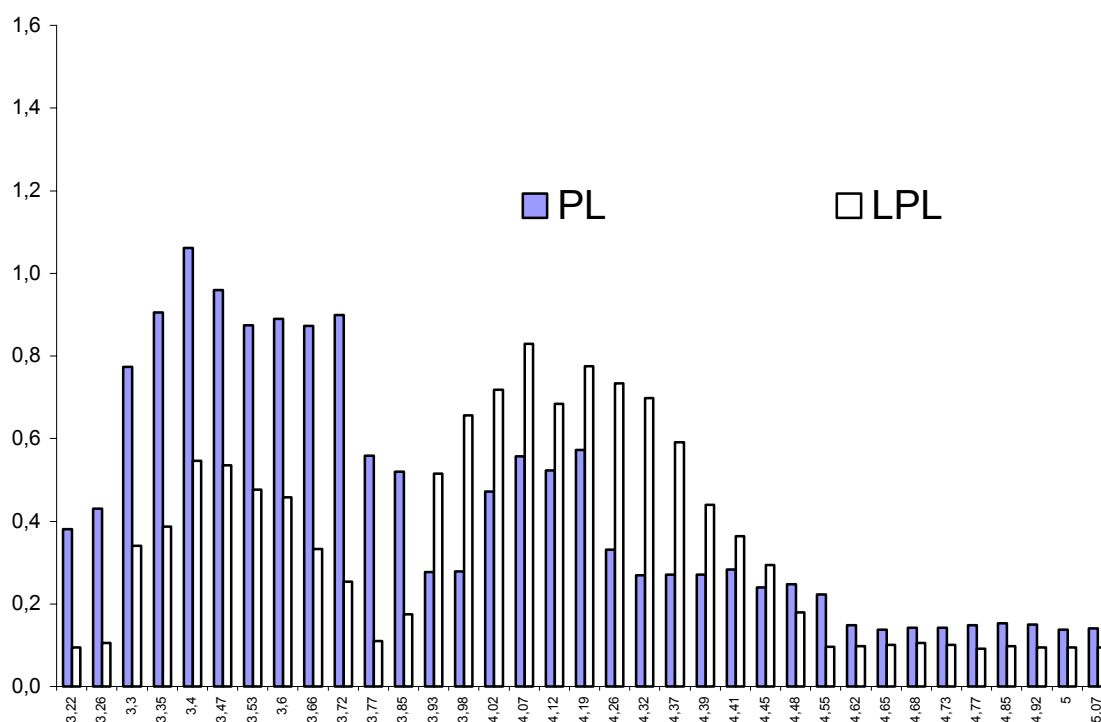


Abbildung 67: Aktivitätsverteilung der elektrophoretisch getrennten Enzyme nach 2 Wochen Lagerung bei Raumtemperatur. Aus den nach dem ersten Analyselauf klar getrennten Fraktionen hat sich erneut eine Mischung beider Aktivitäten (PLP und PL) gebildet.

(Substrate: L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl, L- α -LysoPhosphatidylcholine-stearoyl)

E r g e b n i s s e u n d D i s k u s s i o n

Nach dieser Lagerungszeit ist die Gesamtaktivität (Umsatz pro Zeit) nahezu unverändert geblieben. Allerdings ist die Trennung deutlich unschärfer geworden. In Fraktionen, in denen direkt nach der Trennung fast ausschließlich eine Lysophospholipaseaktivität vorlag (Fraktion 24 pH 4,1), hat sich eine deutliche Phospholipaseaktivität entwickelt. Ebenso kam es in den Fraktionen mit reiner Phospholipaseaktivität (Fraktion 13, pH 3,4) zu einer deutlichen Ausbildung einer Lysophospholipaseaktivität.

Da die Gesamtaktivität der Enzymlösung PL-1007 konstant geblieben ist, also in einigen Fraktionen die Phospholipaseaktivität in dem Maße abnahm, wie es zu einer Zunahme der Lysophospholipaseaktivität kam, während in anderen Fraktionen die Lysophospholipaseaktivität zugunsten der Phospholipaseaktivität reduziert wurde, ist zu vermuten, dass sich die Spezifitäten der Enzyme geändert haben. Zu einer solchen Änderung der Spezifität kann eine Änderung der räumlichen Struktur der Enzyme führen. Es könnte sich bei beiden Enzymen also um Faltungsisomere, die zueinander in einem dynamischen Gleichgewicht stehen handeln. Die Tatsache, dass es bereits bei Raumtemperatur zu dieser Strukturänderung in signifikantem Ausmaß kommt, deutet auf eine sehr geringe Energiebarriere zwischen beiden Faltungsisomeren hin. Ähnliches wurde auch schon von Fisher et al gezeigt, die die Umlagerung zweier Phospholipasemodifikationen NMR-spektroskopisch untersuchten [109].

3.7 Wechselwirkungen von Uteroglobin mit PL-1007

In der Literatur wird eine Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ durch Uteroglobin diskutiert. (Levin et al., 1986[63]; Miele et al., 1987 [55]; Mukherjee et al 1992 [66]).

Der Mechanismus, der dieser Hemmung zugrunde liegt, ist bisher noch unbekannt. Sicher ist jedoch, dass er nicht auf einer Protein-Protein-Wechselwirkung beruht (Märki et al., 1990 [65]; Mukherjee et al., 1993 [49]). Allerdings wäre ein kompetitiver Hemmungsmechanismus durch Bindung des PLA₂-Cofaktors Ca²⁺ an die Ca²⁺ - Bindungsstelle des UG3 vorstellbar. Dieses Hemmungsmodell ist allerdings nur bei geringen, äquimolar zur UG-Konzentration, Ca²⁺ Konzentrationen denkbar (Nord et al., 1995 [67]).

Zur Überprüfung dieses Hemmungsmodells wurden der Substratlösung neben der je 1,486 µM Substratkonzentration noch 10µl einer UG3 Lösung zugesetzt.

In einen weiteren Substratansatz wurden 10µl einer UG3CS-Lösung zugegeben. Bei dem UG3CS handelt es sich um eine Cys -> Ser Mutante des UG3.

Beide Lösungen wurden je einmal mit einer hohen Ca²⁺-Konzentration, und mit einer niedrigen (äquimolar zum Gesamtproteingehalt der Enzymlösung) angesetzt. Diese Substratlösungen wurden 1:1 mit einer 1:10 verdünnten Enzymlösung vermischt, und nach einer Reaktionszeit von 10 min bei Raumtemperatur thermisch denaturiert.

Parallel wurden noch die Fettsäureblindwerte der Einzellösungen gaschromatographisch bestimmt. Die gaschromatographische Analyse erfolgte nach FS-Rev 2.

Ergebnisse und Diskussion

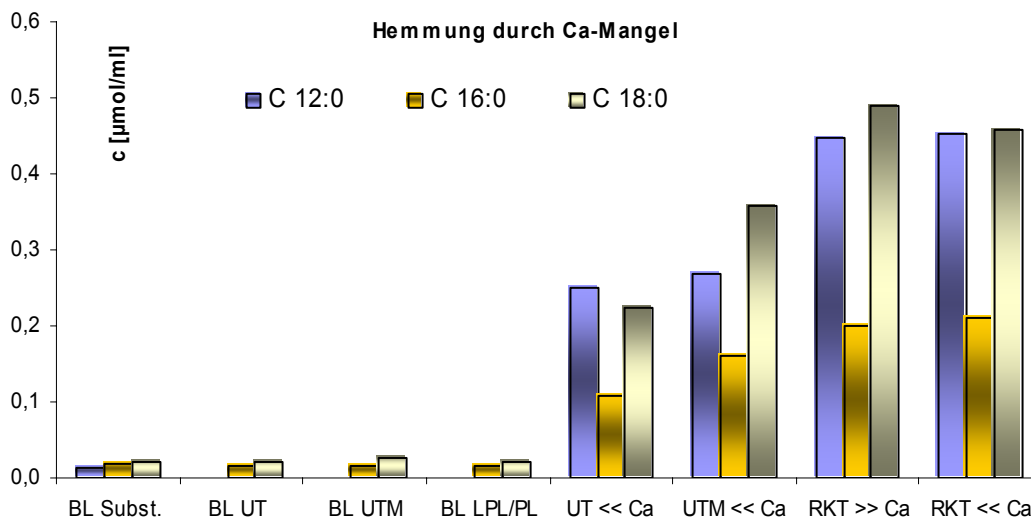


Abbildung 68: Hemmung der PL/LPL-Aktivität durch UG3 / UG3 CS bei minimaler Ca-Versorgung . (Substrate: L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl, L- α -LysoPhosphatidylcholine-stearoyl)

Erwartungsgemäß kommt es im Vergleich zu den ungehemmten Reaktionen (rechts in der Abbildung) zu einer deutlichen Hemmung sowohl der Phospholipase- als auch der LysoPhospholipaseaktivität. Dieser Befund stützt die gängige Modellvorstellung.

Bei einem identischen Experiment in Gegenwart von ausreichend Ca^{2+} sollte überprüft werden, ob dieser Mechanismus der Hemmung sich als ausschließliche Hemmungsursache bestätigen lässt.

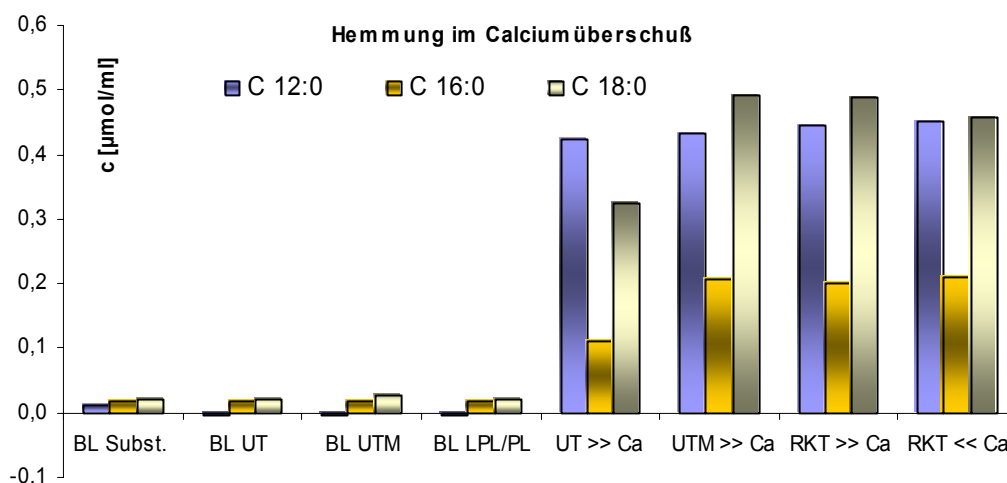


Abbildung 69: Hemmung der PL/LPL-Aktivität durch UG3 / UG3 CS bei ausreichender Ca-Versorgung . (Substrate: L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl, L- α -LysoPhosphatidylcholine-stearoyl)

E r g e b n i s s e u n d D i s k u s s i o n

Bezüglich der Phospholipaseaktivität lässt sich das Hemmungsmodell durch Bindung des für die Phospholipasereaktion essentiellen Ca^{2+} [110] als ausschließlicher Hemmungsmechanismus bestätigen, da es bei ausreichender Ca^{2+} Versorgung nicht zu einer signifikanten Hemmung der Phospholipase kommt.

Die Lysophospholipase hingegen wird auch bei hohen Ca^{2+} Konzentration in Gegenwart sowohl des UG3 wie auch seiner Mutante UG3 CS gehemmt.

Diese Beobachtungen lassen sich durch die Bindung des UG3 an den aliphatischen Rest der Phospholipide erklären. Für die Phospholipase, deren Substrat zwei aliphatische Reste enthält ist diese Bindung offenbar nicht von Bedeutung. Ursächlich hierfür könnte neben der kinetischen Hemmung der Bindung und Freisetzung der Phospholipide eine inverse Substratspezifität des UG3 gegenüber der Phospholipase sein [111,112], die bevorzugt die aliphatischen Reste bindet, gegenüber denen die Phospholipase keine deutliche Spezifität zeigt. Der vom UG3 nicht bevorzugte aliphatische Rest ist also nach wie vor für die Phospholipase frei zugänglich. Auch geht das UG3 keine Wechselwirkungen mit der polaren Kopfgruppe der Phospholipide ein, deren Zugänglichkeit für die Bindung an die Phospholipase essentiell ist.

Das Substrat der Lysophospholipase hingegen weist nur einen aliphatischen Rest auf, der, einmal an UG3 gebunden, für die Lysophospholipase unzugänglich ist, wobei Bindung und Freisetzung der Phospholipide durch UG3 kinetisch gehemmt sind. Daher ist der hemmende Effekt auch bei hoher Ca^{2+} -Konzentration signifikant.

Die Mutante UG3CS weist weder eine Hemmung bezüglich der Phospholipase noch der Lysophospholipase auf. Hierdurch wird die Theorie der selektiven Fettsäurebindung durch das UG3 gestützt, da bei der UG3CS im Gegensatz zu UG3 die Bindung und Freisetzung der aliphatischen Reste nicht kinetisch gehemmt ist.

4 Zusammenfassung

Bei der Expression einer Phospholipase A₂ aus Soja in *Aspergillus oryzae* (Probe PL-1007), *Trichoderma viride* (Probe PL-1008) und *Pichia pastoris* (Probe PL-1035) wurde neben der erwarteten Phospholipaseaktivität auch eine deutliche Lysophospholipaseaktivität beobachtet. Eine Trennung dieser Aktivitäten war nur mittels einer Free-Flow-Elektrophorese kurzzeitig möglich, bevor sich in jeder Fraktion wieder das ursprüngliche Aktivitätsverhältnis zwischen Phospholipase und Lysophospholipase einstellte.

Zur näheren Untersuchung und Charakterisierung dieser Enzymsysteme wurden für einen gaschromatischen Aktivitätstest hochspezifisch substituierte Substrate eingesetzt, die eine parallele Bestimmung der Phospholipase- und Lysophospholipaseaktivitäten ermöglichten. So konnte gezeigt werden, dass nicht in allen Organismen eine Phospholipase A₂ exprimiert wird, sondern es in *Pichia pastoris* (Probe PL-1035) zur Expression einer Phospholipase A₁ kommt. Im Falle der Probe PL-1007 konnte die beobachtete Lysophospholipaseaktivität durch Versuche mit veränderten Substratverhältnissen zwischen Lysophospholipase- und Phospholipasesubstrat einem separaten aktiven Zentrum zugeschrieben werden. Durch elektrophoretische Trennungsversuche konnte gezeigt werden, dass es sich nicht nur um separate aktive Zentren, sondern um verschiedene Enzyme handelt. Die Tatsache, dass sich das Aktivitätsverhältnis nach der Trennung selbständig wieder einstellt, lässt das Vorliegen von Faltungsisomeren vermuten.

Bezüglich ihrer katalytischen Eigenschaften weisen alle drei Enzymsysteme eine große Ähnlichkeit auf. Sowohl die Phospholipase- wie auch die Lysophospholipaseaktivitäten sind erst ab einer Reaktionstemperatur von über 70°C nicht mehr nachweisbar. Das Aktivitätsmaximum wurde in allen drei Fällen zwischen 45°C und 55°C beobachtet. Auch die pH-Bereiche in denen eine maximale enzymatische Aktivität zu beobachten ist, liegen mit pH 3,6 (PL-1007) bis pH 4,3 (PL-1035) für die Phospholipaseaktivitäten und pH 4,3 (PL-1007 / PL-1008) und pH 4,6 (PL-1035) in ähnlichen Bereichen. Die Aktivität der untersuchten Enzymsysteme zeigt jedoch im beobachteten pH-Bereich von pH 3 bis pH 5 nur eine geringe pH-Abhängigkeit.

A n h a n g

Deutlichere Unterschiede konnten jedoch für die Substratspezifitäten nachgewiesen werden. Die Phospholipasen A₂ zeigen tendenziell höhere Umsätze bei Substraten mit C 12:0 bis C 16:0 Fettsäureresten, während die Phospholipase A₁ aus Probe PL-1035 maximale Umsätze bei C 18:0 Fettsäureresten aufweist. Bei allen Enzymproben jedoch bleiben die Umsatzraten der ein- bis mehrfach ungesättigten Fettsäurereste hinter denen der gesättigten zurück. Lediglich bei der Probe PL-1007 sind die Aktivitätsunterschiede zwischen gesättigten und ungesättigten Substraten nicht signifikant.

Neben der Untersuchung der katalytischen Eigenschaften konnte im Rahmen dieser Arbeit die in der Literatur mehrfach aufgestellte These der Hemmung der Phospholipaseaktivität in Gegenwart von Uteroglobin bestätigt werden. Ein Hemmungsmechanismus aufgrund direkter Wechselwirkung der Enzyme konnte ausgeschlossen werden. Vielmehr konnte zweifelsfrei bewiesen werden, dass der Hemmungsmechanismus bei den hier eingesetzten Enzymsystemen auf einer Bindung des für die Phospholipasereaktion essentiellen Ca²⁺ durch das Uteroglobin zurückzuführen ist.

5 Anhang

5.1 Methodenbeschreibungen

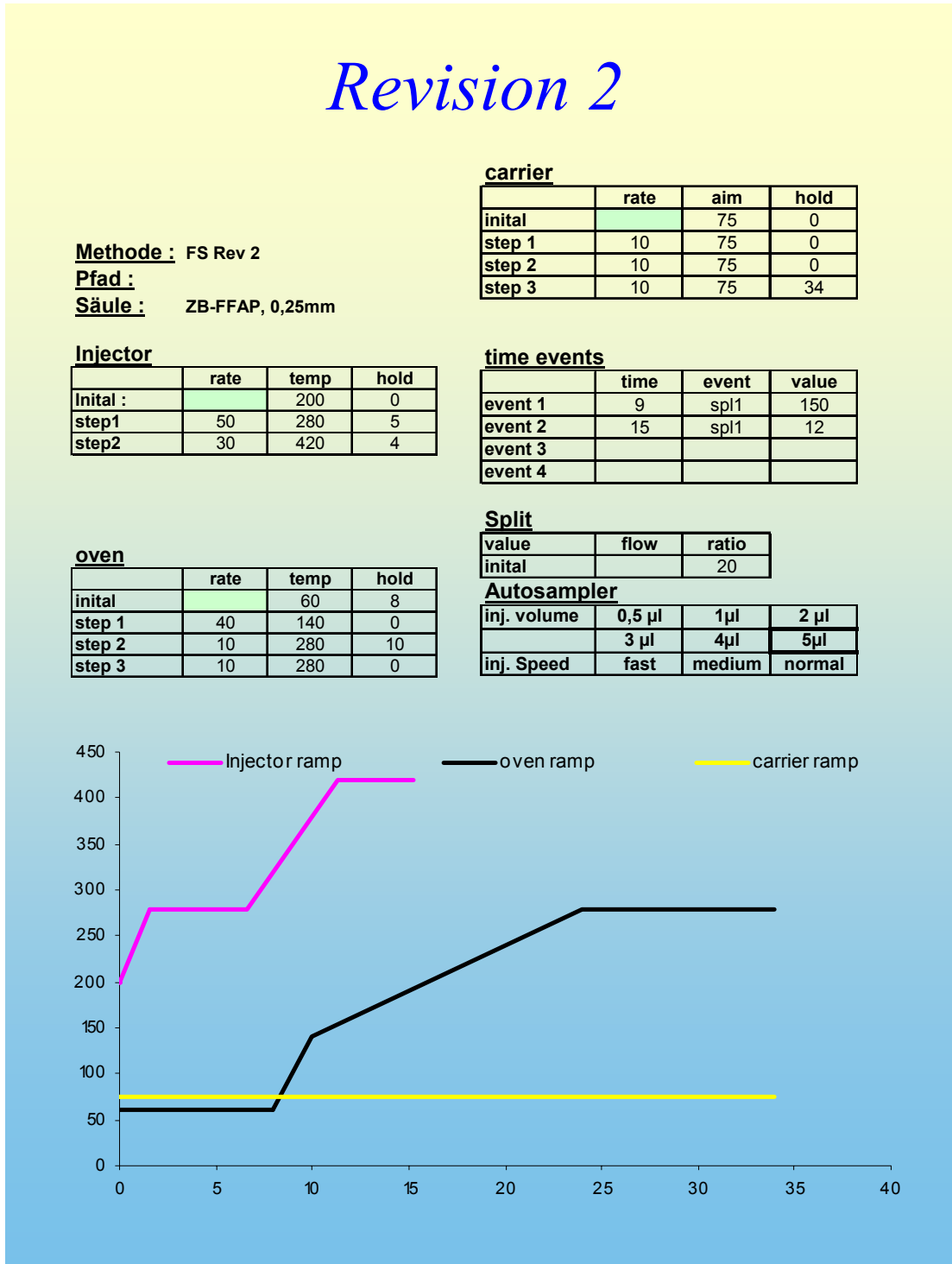


Abbildung 70: Methode 2, Alle Werte (Injektor, Ofen) in °C, Carrier Gas in kPa

Revision 2c

Methode : FS-Rev 2c

Pfad :

Säule : ZB-FFAP, 0,25mm

carrier

	rate	aim	hold
inital	75	75	0
step 1	10	75	0
step 2	10	75	0
step 3	10	75	34

Injector

	rate	temp	hold
Inital :	200	200	0
step1	50	280	5
step2	30	420	4

time events

	time	event	value
event 1	9	spl1	150
event 2	15	spl1	12
event 3			
event 4			

oven

	rate	temp	hold
inital	60	60	8
step 1	40	140	0
step 2	10	280	10
step 3	10	280	0

Split

value	flow	ratio
inital		20

Autosampler

inj. volume	0,5 µl	1µl	2 µl
	3 µl	4µl	5µl
inj. Speed	fast	medium	normal

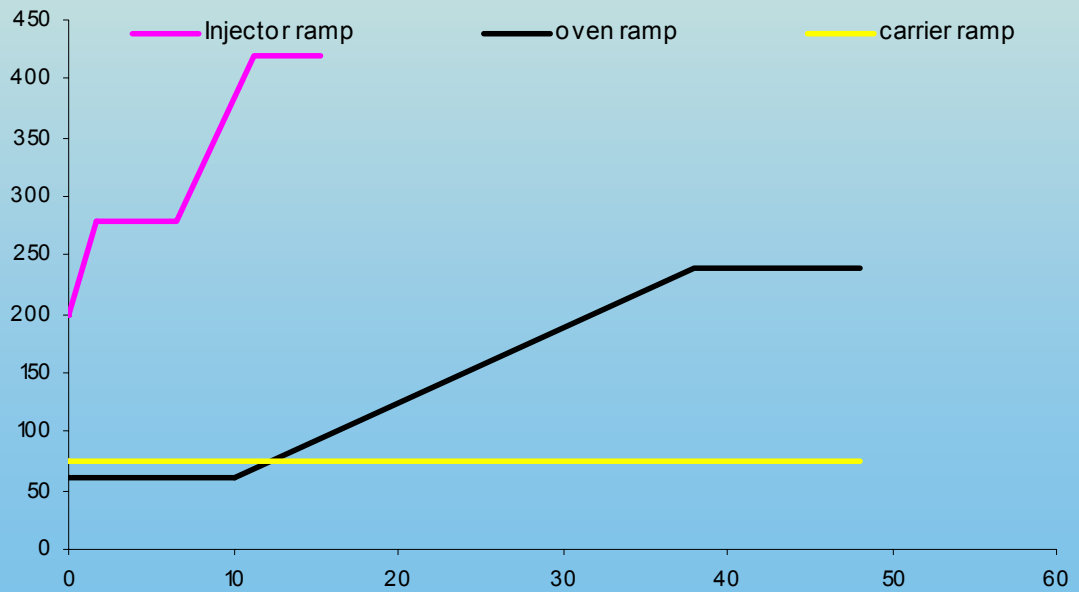


Abbildung 71: Methode 2c, Alle Werte (Injektor, Ofen) in °C, Carrier Gas in kPa

Revision 2d

Methode : FS-Rev 2d

Pfad :

Säule : ZB-5, 0,53mm

Injector

	rate	temp	hold
inital :		200	0
step1	50	280	2
step2	30	300	15

oven

	rate	temp	hold
inital		160	4
step 1	40	280	10
step 2			
step 3			

carrier

	rate	aim	hold
inital		25	0
step 1	10	25	0
step 2	10	25	0
step 3	10	25	17

time events

	time	event	value
event 1	6	spl1	30
event 2	10	spl1	2
event 3			
event 4			

Split

value	flow	ratio
inital		5

Autosampler

inj. volume	0,5 µl	1 µl	2 µl
	3 µl	4 µl	5 µl
inj. Speed	fast	medium	normal

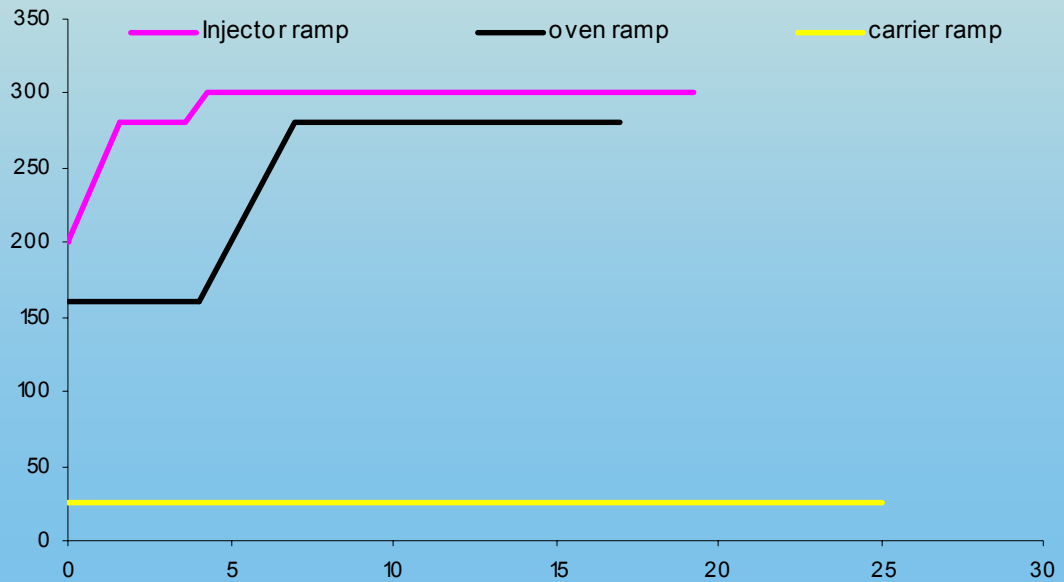


Abbildung 72: Methode 2d, Alle Werte (Injektor, Ofen) in °C, Carrier Gas in kPa

5.2 Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bis-N,O-(trimethylsilyl)-acetamid
BSTFA	Bis-N,O-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
CaCl ₂	Calciumchlorid
C x:y	Fettsäuren, x=Anzahl C-Atome, y=Anzahl Doppelbindungen
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DMA	Dimethylacetal
DMF	Dimethylformamid
DNA/DNS	Desoxyribonucleinsäure
ECD	Elektroneneinfangdetektor
ES	Enzym-Substrat Komplex
FID	Flammenionisationsdetektor
FS	Fettsäure
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Massenspektrometer als Detektor für Gaschromatographen
IR	InfraRot
KOH	KaliumHydoxid
LC	Flüssigkeitschromatographie
LPL	Lysophospholipase
MBTFA	N-Methyl-bis-(trifluoracetamid)
MS	Massenspektrometer
MSHFBA	N-Methyl-N-trimethylsilyl-heptaluorbuyqamid
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PL	Phospholipase
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D

A n h a n g

PLOT	Dünnschichtkapillarsäulen
PLU	Einheit der Phospholipaseaktivität
rpm	Umdrehungen pro Minute
SCOT	Trägerbeladene Schichtkapillarsäulen
SFC	Chromatographie mit superkritischen Flüssigkeiten
Silyl-991	Mischung 99% BSTFA und 1% TMCS
SiO ₂	Siliziumdioxid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THF	Trihydrofuran
TMCS	TriMethylChlorSilan
TMSDEA	N-Trimethyl-silyl-diethylamin
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-methylamin
TSIM	N-Trimethylsilyl-Imidazol
UG	Uteroglobin
UG3	in E.coli kloniertes Uteroglobin
UG3 CS	Uteroglobinmutante C2S, C63S von UG3
UV	Ultraviolett
VE	vollentsalzt
WCOT	wandbeladene offene Kapillarsäulen
WLD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor
WLS	Hitzedrahtdetektor

5.3 Bezugsnachweise

5.3.1 Geräte

Gerät	Hersteller / Spezifikation / Typ
Analysewaage	Mettler H20T, Satorius
Autosamplerspritzen	Hamilton 88035 AS-Spritze 5µl SGE 50f-PE-0,63 50µl 4670 SGE 5f-PE-0,63 5 µl 1954
Autosamplergefäße	Perkin-Elmer Original AS-Gefäße Achroma Mikroflaschen mit 0,1ml Einatz
Druckfiltrationszellen	Amicon 8003, 8050, 8200, 8400
Extraktionssäulen	Merck Extrelut NT 3
Gaschromatograph	Perkin-Elmer Autosystem XL Autosampler, PSS, PCC mit Split/Splitless Injector
Gaschromatographie-Software	Perkin-Elmer-Nelson Turbochrom Worstation V6.1.0.1
Gaschromatographie-Säulen	Zebron ZB 5 30m, 0,53mm iD, 5µm SD Zebron FABP 30m, 0,53 mm iD, 1µm SD
Gasbrenner	Tecnomara, Fireboy
Gefrierschränke	GFL (-70°C), BBC, GS2700 (-20°C)
Glasgeräte	Schott,Mainz; Simax
Glaswolle (Inliner, silanisiert)	Perkin-Elmer
Grobwaage	Mettler-Toledo P1200N
HPLC	Merck-Hitachi Pumpe L-6220, IF D-6000, Det: L- 4250 UV-Vis
Heizblock	Bioblock sciebtific 92675
Inliner (Verdampfungsrohr)	Perkin-Elmer N610-1539
Küvetten	Hellma
Laborfilm	Nescofilm
Magnetrührer	IKA Ikamag, IKA KMO
pH-Elektrode	Ingold
pH-Meter	Radiometer Kopenhagen, pH M82
Pipetten	Eppendorf
Schüttler	Eppendorf Thermomixer

A n h a n g

Septen	Supelco Thermogreen IB2 11mm 20654
Thermofühler	Testotherm 1100 Sekundenthermometer
Thermostaten	Haake
Vakuumpumpen	Vacuubrand RD4 Vacuubrand MZ 2C Synchro
Vortexer	Julabo, Paramix II
Wasserbäder	Köttermann 3041 Memmert
Wasser-Bidestille	Heraeus Schott
Wasser-Filtrationsanlage	Milipore
Wasserstoffgenerator	Packard 9200 hydrogen generator
Vakuumzentrifuge	Bachofer Speed-Vac

A n h a n g

5.3.2 Chemikalien

Bezeichnung	Lieferant
Aceton	Roth
Acrylamid	Sigma
Benzol	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Merck
Bis-Methylenacrylamid	Sigma-Aldrich
BSA + BSTFA (Silyl-991)	Supelco
BSTFA+TMCS	Supelco
Calciumchlorid	Merck
Caprylsäure	Merck
Chloroform	Sigma-Aldrich / Merck /Roth
Cl ₃ COOH	Sigma-Aldrich
CH ₃ COOH	Roth
Decanoic acid	Sigma-Aldrich
Dextrane	Dr. Weber GmbH
Diethylether	Roth
DMA	Supelco
DMF	Sigma-Aldrich
Dodecansäure	Sigma-Aldrich
EDTA Natriumsatz	Roth
Epikuron 200	Lucas Meyer
Essigsäure	Merck
Essigsäureethylester	Merck
Ethanol	Roth
Glycerin	Roth
Harnstoff	Roth
HCl	Sigma-Aldrich

A n h a n g

Iso-Propanol	Sigma-Aldrich
KOH	Roth
Laurinsäure	Roth
MBTFA	MBTFA
Methanol	Roth
Methyl-cellulose	Dr. Weber GmbH
Merkaptoethanol	Sigma-Aldrich
MSHFBA	MSHFBA
MSTFA	
Myristinsäure	Roth
n-Hexan	Roth
NaCl	Roth
NaOH	Merck
OCTOLYTE 2.5 bis 4.5	Dr. Weber GmbH
OCTOLYTE 8.5 bis 10.5	Dr. Weber GmbH
Octylglucoside	Dr. Weber GmbH
Octyl-POE	Dr. Weber GmbH
Ölsäure	Sigma-Aldrich
Palmitinsäure	Sigma-Aldrich
L- α -Phosphatidylcholine- β -Lauroyl- γ -Palmitoyl	Sigma-Aldrich
L- α -Lysophosphatidylcholine-Stearoyl	Sigma-Aldrich
L- α -Phosphatidylcholine- β - γ -dininonyl	Sigma-Aldrich
L- α -Phosphatidylcholine- β - γ -diundecanoyl	Sigma-Aldrich
L- α -Phosphatidylcholine- β -lauroyl- γ -palmitoyl	Sigma-Aldrich
L- α -Phosphatidylcholine- β -palmitoyl- γ -hexadecyl	Sigma-Aldrich
L- α -Phosphatidylcholine- β - γ -distearoyl	Sigma-Aldrich
L- α -Phosphatidylcholine- β -oleoyl- γ -stearoyl	Sigma-Aldrich
L- α -Phosphatidylcholine- β - γ -dielaidoyl	Sigma-Aldrich
L- α -Phosphatidylcholine- β - γ -di-arachidoyl	Sigma-Aldrich
Polyäthylenglykole	Dr. Weber GmbH

A n h a n g

Polyvinylpyrrolidon	Dr. Weber GmbH
Pyridin	Sigma-Aldrich
Serva-blue	Serva
SDS	Serva
Stearinsäure	Roth
Sulfosalicylsäure	Roth
TEMED	Sigma-Aldrich
TFA	Supelco
THF	Supelco
TMCS	Supelco
TMSDEA	Supelco
TMSH	Supelco
TRIS	Sigma-Aldrich
TSIM	Supelco
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Roth
Undecansäure	Sigma-Aldrich
Zitronensäuremonohydrat	Sigma-Aldrich

6 Lebenslauf

Schulausbildung

1974 bis 1978 Grundschule St. Laurentius, Essen Steele

1978 bis 1988 Carl-Humann Gymnasium, Essen-Steele

1988 Abitur

Hochschulausbildung

1989 bis 1995 Chemiestudium an der Universität Dortmund

1995 bis 1996 Diplom Chemiker Hauptexamen an der Universität Dortmund, Thema der schriftlichen Arbeit:
„Untersuchung der Lösungsstruktur von Somatopstatinanaloga mit Hilfe der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie“

Seit 1996 Dissertation im Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften zum Thema
„Untersuchungen zu Funktion und Eigenschaften einer Phospholipase aus Soja (Glycine max)“

Seit 1996 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Biophysikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten:

B.Boddenberg, P.Eilbracht, A.Geiger, F. Huber, H.Jacobs, W.Kreiser, R.P.Kreher,

B.Lippert, M.Lehnig, R.Minkwitz, S. Schecker, R.W.Schmutzler, R.Winter

7 Literaturverzeichnis

- [1] **Emil Fischer**, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1894, 27, 2892-3229
- [2] **Lichtenthaler F.W.**, Eur. J. Org. Chem., 2002 (im Druck)
- [3] **Drautz K.**, Waldmann H., Enzyme Catalysts in organic synthesis, VCH 1995
- [4] **Hüsing B.**, Fraunhofer Institut für Systemtechnik und Innovationsforschung für das Screening Committee der Hüls AG, 1996
- [5] **Kaiser E.** Crit Rev Clin Lab Sci, 1999, 36(2), 65-163
- [6] **Schürigel K.**, Analytische Methoden in der Biochemie, Vieweg, 1991
- [7] **Vladimir M Mirsk**, capacitive Approach to determine Phospholipase A2 acitivity toward artificial and natural substrates, Anal. Biochem 1998, 70; 3674-3678
- [8] **Hirashima Y**, simplified microdetermination of cerebral Phospholipase A1, A2 and Lysophospholipase, No To Shinkei, 1983 35(8):811-7
- [9] **Iban, Uberretxena-Belanda**, role of the cofactor calcium in the activaton of outer membrane phpspholipase A, Biochemistry (1998) 37, 16011-16018
- [10] **Conway T.F.**, J. Am. Oil Chemists Soc.,1971, 48, 54-58
- [11] **Earl F.R.**, J. Am. Oil Chemists Soc.,1963, 40, 265-268
- [12] **Farooqui A.A.**, Taylo W.A., Pendley C.E., Cox.J.W., J. Lipid Res., 1984, 25(13), 1555-62
- [13] **Bao-Zhu**, contributions of residues of pancreatic Phospholipase A2 to interfacial binding catalysis and activation, Biochemistry 1999 , 38, 4875-4884
- [14] **Roehm Enzyme GmbH**, Firmeninternes Informationsschreiben, 2000
- [15] **Pardun H.** Analyse der Nahrungsfette, Verlag Paul Parey, Berlin, 1976
- [16] **Verheij H.M.**, Slotbloom A.J., Physiol.Biochem.Pharmacol., 1981, 91, 91-203
- [17] **Dennis E.A.**, Enzymes, 1983, 16, 308-353
- [18] **Waite M.**, The Phospholipases, Plenum Press, New York, 1987
- [19] **Stryer L.**, Biochemie, 4. Auflage, Spektrum Verlag, Heidelberg 1996
- [20] **Nolte D.**, Phospholipase D, a review, Z Lebensmittel Unters. Forsch, 1975, 24, 159(4), 255-33
- [21] **Arni R.K.**, Ward R.J., Toxicon, 1996 34(8), 827-41
- [22] **Murakami M.**, Crit Rev Immunol, 1997, 17(3-4), 225-283
- [23] **Hirano K.**, J. Biochem (Tokio), 1997, 122(6), 1160-6
- [24] **Romas J.Kazlauskas**, Biotransformations with Lipases, Biotechnology 2000, VCH, Vol 8
- [25] **Gill S.C.**, von Hippel P.H., Anal Biochem., 1989, 182, 319-326

A n h a n g

- [26] **Guruprasad K.**, Reddy B.V.B., Pandit M.W., Protein Engineering, 1990, 4, 155-161
- [27] **Bachmair A.**, Findley D., Varshavsky A., Science, 1986, 234, 179-186
- [28] **Gonda D.K.**, Bachmair A., Wunning I., Tobias J.W., J. Biol. Chem., 1989, 234, 16700-16712
- [29] **Tobias J.W.**, Shrader T.E., Rocap G., Science, 1991, 254, 1374-1377
- [30] **Cienchanover A.**, Schwartz A.L., Trends Biochem Sci., 1989, 14, 483-488
- [31] **Boel E.**, Muller S., Sandal T., Kamp-Hansen P, EMBL/GenBank/DDBJ database, 1998
- [32] **Holmquist M.**, Martinelle M., Clausen I.G., 1994 Lipids, 29, 599-603
- [33] **Peters G.H.**, Svendsen A., Langbarg H., Vind J., Biochemistry 1998, 37, 12375-12383
- [34] **Yamaguchi S.**, Mase T., Takeuchi K., 1991, Gene 103, 61-67
- [35] **Isobe K.**, Nokihara K., 1993, FEBS Letters, 320, 101-106
- [36] **Derewenda U.**, Swenson L., Green R., Wei Y., Nat. Struct Biol., 1994, 1, 36-47
- [37] **Berg et al.** Biochemistry 1997, 36, 14512-14530
- [38] **Pieterse WA**, Volwerk JJ, de Haas GH, Biochemistry 1974 Mar 26;13(7):1439-45
- [39] **Vergers R**, Rietsch J, Dam-Mieras MC, de Haas GH, J Biol Chem 1976 May 25;251(10):3128-33
- [40] **Kramer RM**, Roberts EF, Jakubowski JA, Adv Exp Med Biol 1997;400A:19-24
- [41] **Verheij HM**, Egmond MR, de Haas GH, Biochemistry 1981 Jan 6;20(1):94-9
- [42] **Fanni T**, Deems RA, Dennis EA, Biochim Biophys Acta 1989 Jul 17;1004(1):134-8
- [43] **Verheij et al**, Biochemistry 1980, 19, 743 - 750
- [44] **Beier H.M.** 1968, Biochim.Biophys Acta, 160, 289-291, Biochemistry, 31, 4876-4882
- [45] **Krusche C.**, Beier H.M., 1994, Anatomischer Anzeiger, 176, 23-31
- [46] **Müller B.**, Beato M., 1980, Eur. J. Biochem, 112, 235-241
- [47] **Lopez de Haro M.S.** Alvaraz L. Nieto A., 1988a, Biochem. J., 250, 647-651
- [48] **Slater E.P.** Redeuhl G., Theis K., Suske G., Beato M., 1990, Mol Endocrinol, 4, 604-610
- [49] **Mukherjee A.B.**, Cordella-Miele E., 1992, DNA Cell Biol., 11, 233-243
- [50] **Beier H.M.**, Krusche C., 1994, Anatomischer Anzeiger, 176, 23-31
- [51] **De La Torre, J.**, Lopez De Haro M.S. Nieto A., 1987, Histochem J., 19, 572-578
- [52] **Dannhorn D.R.**, Kirchner C., 1990, Cell Tissue Res, 262, 569-577
- [53] **Guy J.**, Dhanireddy R., Mukherjee A.B., 1992 Biochem. Biophys. Res. Commun., 189, 622-669
- [54] **Lopez de Haro M.S.** Alvaraz L. Nieto A., 1988b, FEBS Lett, 232, 351-353

A n h a n g

- [55] **Miele L.**, Cordella-Miele E., Mukerjee A.B., 1987, *Endocrine Rev.*, 8, 474-490
- [56] **Singh G.**, Katayal S.L., Brown W.E., Phillips S., Kennedy A.L. Anthony J., Squeglia N., 1988a, *Biochem Biophys Acta*, 950, 329-337
- [57] **Lund J.**, Devereux T., Glaumann H., Gustaffson J.A., 1988, *Drug Metab. Dispos.*, 16, 590-599
- [58] **Norlund-Möller L.**, Andreason O., Ahlgreen R., Schilling J., Gillner M., Gustaffson J.A., Lund J., 1990, *J. Biol. Chem.*, 265, 12690-12693
- [59] **Singh G.**, Singh J., Katyal S.L., Brown W.E., Phiollips S., Kramps J.A., Dauner J.H., Macpherson T.A., Squeglia N., 1988b, *J. Histochem.Cytochem.*, 36, 73-80
- [60] **Umland T. C.**, Sax M., 1995, *Nature Struc. Biol*, 2, 919-922
- [61] **Miele L.**, Cordella-Miele E. Mantile G., Peri A., Mukherjee A.B., 1994, *J. Endocrinol Invest.*, 17, 679-692
- [62] **Vasanthkumar G.**, Manjunath R. Mukherjee A.B. Warabi H., Schiffmann E., 1988, *Biochem Pharmacol.*, 37, 389-394
- [63] **Levin S.W.**, Butler J.D. Schumacher U.K., Wightman P.D. Mukherjee A.B., 1986, *Life Science*, 38, 1813-1819
- [64] **Mukherjee A.B.**, Cordella-Miele E., Kikukawa T., Miele L., 1998, plenum press, NY, 135-152
- [65] **Märki F.**, Pfeilschifter J., Rink H., Weisenberg I., 1990, *FEBS Letters*, 264, 171-175
- [66] **Mukherjee A.B.**, Cordella-Miele E., 1992, *DNA Cell Biol.*, 11, 233-243
- [67] **Nord M.**, Gustaffson J.A., Lund J., 1995, *FEBS Letters*, 374, 403-406
- [68] **Ettre S.L.**,Hinsaw J.V., Rohrschneider L., *Grundbegriffe und Gleichungen der Gaschromatographie*, VCH, 1996
- [69] **Supelco Inc.** 1999, Bulletin 918
- [70] **Gefahrstoffverordnung (GefStoffV)**, BGI. I.S: 1470, Anhang IV
- [71] **D.R. Knapp**, *Handbook of analytical Derivatisation Reactions*, Wiley&sons, New York 1975
- [72] **M. La-Monde**, T.H. Chan, organosilicon reagents as protective groups, *synthesis* 1985, 817-845
- [73] **Merck KGaA**, Darmstadt, Dokumentation zu Extrelut NT Extraktionssäulen, (2001) W 216 900
- [74] **Müller, Karl-Dieter**, a new rapid method for the assay of arterial fatty acids using high resolution capillary gas chromatography and trimethylsulfonium hydroxide, *Zbl Bakt.* 1990, 274, 174-182
- [75] **Wolfgang Gottwald**, *GC für Anwender*, VCH 1995, Weinheim
- [76] **Spanik I.**, Lim P., Vigh G., *J. Chromatogr A.*, 2002, 960 (1-2), 241-6
- [77] **Weber G.**, Bocek P., *Electrophoresis* 1998 Jul;19(10):1649-53
- [78] **Bauer J.**, Kachel V., *Electrophoresis*, 1988, 9(1), 62-3
- [79] **Mazereeuw M.** de Best C.M. Tjaden U.R. Irth H.,Greef J., *Anal Chem* 2000 Aug 15, 72(16), 3881-6

A n h a n g

- [80] **Weber G**, Bocek P., Electrophoresis 1998 Dec;19(18):3090-3
- [81] **Vokl A.**, Mohr H., Weber G., Fahimi H.D., Electrophoresis, 1998 , 19(7), 1140-4
- [82] **Poggel M.**, Melin T., Treutlein S., Electrophoresis, 2002, 23(14), 2252-8
- [83] **Weber G.**, Grimm D., Bauer J., Electrophoresis, 2000, 21(2), 325-8
- [84] **Weber G.**, Bauer J., Electrophoresis 1996, 17(3), 526-8
- [85] **Shinozaki, K.** Biochemistry, 1999, 38(6), 1670-1675
- [86] **Jirano K.**, Biochim Biophys Acta, 2000, 1000, 1483 (3), 325-33
- [87] **Bradford M.M.**, Anal Biochem, 1976, 72, 248-254
- [88] **Sigma-Aldrich**, Chemikalenspezifikationen, Katalog 2000-2001
- [89] **Sugimoto H.**, Biochim Biophys Acta 1999, 1438 (2), 264-72
- [90] **Danner RL**, Van Dervort AL, Doerfler ME, Stuetz P, Parrillo JE , Pharm Res 1990 Mar;7(3):260-3
- [91] **Pomeranz Y.**, Functional Properties of food components, Academic Press Inc. Orlando, 1985
- [92] **Naes N.P.** , Lipids, 1984, 19(4), 258-63
- [93] **Okazaki T.** Am J. Obstet Gynecol, 1978, 15, 130(4), 432-8
- [94] **Drautz K.**, Waldmann H., Enzyme Catalysts in organic synthesis, VCH 1995
- [95] **Yamamoto K.**, Agric. Biol Chem. 1991, 55, 3125-3129
- [96] **Torres Bacete J.**, Biotechnol Appl Biochem, 2000, 32 (Pt3), 173-7
- [97] **Masarova J.**, Biotechnol Appl. Biochem, 2001, 34, (Pt2), 127-133
- [98] **Yost R.W.**, Biochem Int, 1991, 24(2), 199-208
- [99] **Kunze H.**, Klein Wochenschau, 1989, 76(3), 126-30
- [100] **Grotendorst G.R.**, Toxicol, 2000, 38, 931-43
- [101] **Shuibun M.N.**, J. Enzyme Inhib, 2001, 16(5), 433-41
- [102] **Freedman S.D.**, Gastroenterology, 2001, 121(4), 950-7
- [103] **Kucera G.L.**, J. Biol Chem, 1988, 5, 263(4), 1920-1928
- [104] **Boa-Zuh Y.**, Biochemistry, 1997, 36, 3870-3881
- [105] **Yamashita A.**, J. Biochem, 1997, 122 (1), 1-16
- [106] **Amate L.**, Lipids, 1999, 34(8), 865-71
- [107] **Guenther M.G.** Archives of biochemistry and biophysics, 2002, Vol 398 No 1, 101-108
- [108] **Bell J.D.**, Biochemistry, 1996, 16, 35(15), 4945-55

A n h a n g

[109] **Fisher J.**, Biochemistry, 1989, 11, 28(14), 5939-46

[110] **Belinda et al**, Biochemistry, 1998, 37, 16011-16018

[111] **Haun M.**, Dissertation, Institut für Biophysikalische Chemie, Frankfurt a.M., 1999

[112] **Koumanov K.S.**, Biochim J., 2002, 363, 45-51