



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TUM School of Life Sciences

Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie
Forschungseinheit BioGeoChemie Helmholtz-Zentrum Neuherberg

Entwicklung von Methoden zur Analyse von Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie und Anwendung auf Hefekultivierungen

Lena Janina Katharina Gmelch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:		Prof. Dr. Harald Luksch
Prüfer der Dissertation:	1.	Prof. Dr. Michael Rychlik
	2.	Prof. Dr. Wilfried Schwab

Die Dissertation wurde am 01.09.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät TUM School of Life Sciences am 19.11.2020 angenommen.

Danksagung

Die Arbeit wurde vom 01.10.2016 bis 30.06.2020 am Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie der Technischen Universität München in Kooperation mit der Forschungseinheit BioGeoChemie (BGC) des Helmholtz-Zentrums München-Neuherberg unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Rychlik und Prof. Dr. Philippe Schmitt-Kopplin angefertigt.

Zunächst geht mein Dank an meinen Betreuer Prof. Dr. Michael Rychlik für die Bereitstellung des herausfordernden und spannenden Themas. Bei Herrn Prof. Philippe Schmitt-Kopplin möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit mit der Forschungseinheit BioGeoChemie des Helmholtz-Zentrums bedanken. Beiden möchte ich zudem danken für die vielen konstruktiven Diskussionen und das entgegengebrachte Vertrauen bei der Wahl des Forschungsschwerpunktes.

Ein großer Dank geht an Dr. Stefan Asam für die fachlichen Diskussionen. Vielen Dank auch an Christopher Zeck für die stets zuverlässige Hilfe bei der Wartung der Geräte. Ganz herzlich möchte ich mich bei Anja Brinckmann nicht nur für die Bearbeitung aller Anträge, sondern auch für die guten zwischenmenschlichen Gespräche bedanken.

Bei Daniela Wirtz möchte ich mich ausdrücklich für das hohe Engagement und die erfolgreiche Zusammenarbeit im Rahmen von Forschungspraktikum und Masterarbeit bedanken.

Mein Dank geht auch an Felix Jacob für die Bereitstellung der Hefekultur.

Dr. Michael Witting vom BGC möchte ich danken für die Einweisung in das sterile Arbeiten sowie die Unterstützung im Umgang mit dem Q-ToF-MS. Mein Dank geht auch an Dr. Basem Kanawati für die Einweisung ins FT-ICR-MS. Des Weiteren möchte ich ganz besonders Michelle Berger für die zahlreichen fachlichen Diskussionen danken. Vielen Dank für die vielen Hilfestellungen beim Durchmanövrieren durch den Dschungel von Mehrfachladungen! Ein herzlicher Dank geht auch an Dr. Alesia Walker für die fachlichen Diskussionen zur Datenauswertung. Allen hier nicht genannten Kollegen vom BGC möchte ich danken für das stets hervorragende Arbeitsklima und die vielen guten Gespräche. Es war mir eine besondere Freude, die Kooperation in diesem Rahmen durchführen zu können.

Meinen Kollegen am Lehrstuhl möchte ich danken für das gute Arbeitsklima und die Zeit, die mir immer in Erinnerung bleiben wird. Besonders bedanken möchte ich mich bei Nadine Weber für die gute Zusammenarbeit im Folatbereich, bei Dr. Irene Thamm, Mengle Wang, Lance Buckett und Eva Biehl für die vielen schönen Momente auch außerhalb der Forschung. Vielen Dank auch Eva für die Korrektur der Dissertation. Ein herzlicher Dank geht auch an Christian Schnurr für die hilfreichen Diskussionen zur Durchführung und Auswertung der Synthesearbeiten.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund Freddy bedanken für die vielen guten Gespräche und das stets offene Ohr. Ohne dich hätte ich diese Zeit nicht so gut meistern können! Vielen Dank auch an meine Brüder: Oli für die Ratschläge zum erfolgreichen Umgang mit dem „Promotionsblues“, Malo für das schon in der Kindheit geweckte Interesse am Experimentieren.

Danke Oma, dass du mir vorgelebt hast, dass man mit Kraft und Willensstärke unglaublich viel erreichen kann!

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern für die Unterstützung während meiner gesamten Ausbildungszeit. Ohne euren Rückhalt wäre all dies nicht möglich gewesen.

Abkürzungsverzeichnis

1

10-CHO-H ₄ folat.....	10-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolat
10-CO-CH ₃ -H ₄ folat.....	10-Acetyl-5,6,7,8-tetrahydrofolat

5

5,10-CH ⁺ -CH ₃ -H ₄ folat.....	5,10-Ethenyl-5,6,7,8-tetrahydrofolat
5,10-CH ⁺ -H ₄ folat.....	5,10-Methenyl-5,6,7,8-tetrahydrofolat
5,10-CH ₂ -H ₄ folat.....	5,10-Methylen-5,6,7,8-tetrahydrofolat
5,10-CH-CH ₃ -H ₄ folat.....	5,10-Ethylen-5,6,7,8-tetrahydrofolat
5-CH ₂ -CH ₃ -H ₄ folat.....	5-Ethyl-5,6,7,8-tetrahydrofolat
5-CH ₃ -H ₄ folat.....	5-Methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolat
5-CHNH-H ₄ folat.....	5-Formimino-5,6,7,8-tetrahydrofolat
5-CHO-H ₄ folat.....	5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolat
5-CO-CH ₃ -H ₄ folat.....	5-Acetyl-5,6,7,8-tetrahydrofolat

6

6-CH ₂ OH-H ₂ pterin.....	6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin
---	-----------------------------------

A

AdoEt.....	Adenosylethionin
AdoHCy.....	Adenosyl-Homocystein
ATP.....	Adenosintriphosphat
AUC.....	area under the curve

C

CHES.....	<i>N</i> -Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure
-----------	--

D

DHFR.....	Dihydrofolatreduktase
DHFS.....	Dihydrofolatsynthetase
DI.....	Direktinjektion
DMGD.....	Dimethylglycin Dehydrogenase
DNS.....	Desoxyribonukleinsäure
dTMP.....	deoxyThymidin Monophosphat
DTT.....	Dithiothreitol
dUMP.....	deoxy Uridin Monophosphat

E

EDC 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
EIC Extracted Ion Chromatogram, Extrahiertes Ionen Chromatogramm
ESI Elektrospray Ionisation

F

FBP folatbindendes Protein
FID free induction decay, freier Induktionsabfall
FPGS Folypolyglutamatsynthetase
FTF Formimidotransferase
FTHFS Formyltetrahydrofolat Synthetase
FT-ICR-MS Fourier-Transformation Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie
FWHM full width at half maximum

G

GCPII Glutamatcarboxypeptidase II
GCS Glycin Cleavage System
GGH gamma-Glutamathydrolase
GNPS Global Natural Products Social Molecular Networking
GTP Guanosintriphosphat
GTPCHI Guanosintriphosphat Cyclohydrolase I

H

H₂neopterin 7,8-Dihydroneopterin
H₂-neopterin-P 7,8-Dihydroneopterinphosphat
H₂-neopterin-P₃ 7,8-Dihydroneopterin-3'-triphosphat
H₄folat 5,6,7,8-Tetrahydrofolat
HCy Homocystein
HEPES 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HLB Hydrophilic-Lipophilic-Balanced
HPLC High Performance Liquid Chromatography

J

J Kopplungskonstante

M

MAX Mixed Anion Exchange, gemischter Anionentauscher
MCE Mercaptoethanol

MES.....	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MFT	Methionyl-tRNA Formyltransferase
MRM.....	Multiple Reaction Monitoring
MRP	multidrug resistance-associated protein
MS ¹ -Spektrum	Vorläuferionen-Spektrum
MS ² -Spektrum	Fragmentspektrum, MS/MS-Spektrum
MSI	Metabolomics Standards Initiative
MTHFC.....	Methenyltetrahydrofolat Cyclohydrolase
MTHFD.....	Methenyltetrahydrofolat Dehydrogenase
MTHFR.....	Methenyltetrahydrofolat Reduktase
MTHFS.....	Methenyltetrahydrofolat Synthetase

N

NADPH.....	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NH ₂	Aminopropyl-Kartuschenmaterial, schwacher Anionentauscher
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernspinresonanzspektroskopie

O

OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
-------------------------	----------------------------

P

pABG.....	<i>para</i> -Aminobenzoylglutamat
pABS	<i>para</i> -Aminobenzoessäure
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCFT	protonengekoppelter Folattransporter, proton coupled folate transporter
Phe	Phenyl-Kartuschenmaterial
PLP.....	Pyridoxalphosphat
PLS.....	Partial Least Squares, Regression der partiellen kleinsten Quadrate
ppm	parts per million
PteGlu	Pteroylmonoglutaminsäure

Q

QqQ.....	Triple-Quadrupol-Massenspektrometer
Q-ToF-MS...	Quadrupol Flugzeit-Massenspektrometer, Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometer

R

R	Auflösung, resolution
RNS.....	Ribonukleinsäure

RP Reversed Phase, Umkehrphase
rpm Rotationen pro Minute

S

SAX Strong Anion Exchange
SD Sarcosin Dehydrogenase
SHMT Serin Hydroxymethyltransferase
SIVA/SIDA Stabilisotopenverdünnungsanalytik/Stable Isotope Dilution Analysis
SNP Single Nucleotide Polymorphism, Einzelnukleotid Polymorphismus
SPE Solid Phase Extraction, Festphasenextraktion
STDA Standardabweichung
SUMO small ubiquitin-like modifier

T

TIC Total Ion Current
Tris 2-Amino-2-(hydroxymehtyl)-propan-1,3-diol
TS Thymidylatsynthetase

U

UHPLC Ultra High Performance Liquid Chromatography
UHR-MS Ultrahochoflösende Massenspektrometrie
UV Ultra Violett

Δ

δ chemische Verschiebung in ppm

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Inhaltsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XIX
Tabellenverzeichnis	XXV

Teil I EINFÜHRUNG..... 1

1 Relevanz der Themenstellung3

2 Stand der Forschung und theoretische Grundlagen4

2.1 Struktur und Stabilität der Folate.....	4
2.1.1 Chemische Eigenschaften der Folate	4
2.1.2 Abbau- und Umwandlungsreaktionen.....	7
2.2 Vorkommen und Biosynthese der Folate	11
2.3 Ernährungsphysiologische Bedeutung der Folate	13
2.3.1 Absorption, Akkumulation und Exkretion im menschlichen Organismus	13
2.3.2 Folatstoffwechsel im Organismus.....	14
2.3.3 Bioverfügbarkeit	17
2.3.4 Folgen eines Folatmangels	18
2.3.5 Mögliche Risiken einer Folatsupplementierung	20
2.4 Aktueller Stand der Folatanalytik	21
2.4.1 Probenvorbereitung.....	21
2.4.2 Probenaufreinigung	22
2.4.3 Analysenmethoden.....	24
2.4.3.1 Mikrobiologische Assays	24
2.4.3.2 Proteinbindungsassays.....	25
2.4.3.3 Chemisch-instrumentelle Methoden.....	25
2.4.3.4 Methoden zur Bestimmung des Polyglutamatgehaltes	26

2.5	Grundlagen der (ultra-)hochauflösenden Massenspektrometrie	27
2.5.1	Quadrupol-Massenspektrometer und Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (QqQ)	28
2.5.2	Quadrupol Flugzeit-Massenspektrometer (Q-ToF-MS)	29
2.5.3	Fourier-Transformation Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS).....	30
2.6	Grundlagen zu Metabolomics	31
2.6.1	Begriffsdefinition.....	31
2.6.2	Vorbereitung, Durchführung und Anwendung metabolomischer Untersuchungen	32
2.6.3	Identifizierungslevel von Metaboliten	33
2.6.4	Auswertung metabolomischer Untersuchungen.....	34
2.6.5	Netzwerkanalyse von Metaboliten	35
2.7	Grundlagen zu Hefen und deren Folatmetabolismus	36
2.7.1	Klassifizierung und Taxonomie von Hefen.....	36
2.7.2	Folatproduktion in Hefen	37
2.7.3	Einflüsse auf die Folatproduktion in Hefen.....	38
2.8	Arbeitsansatz und Aufgabenstellung.....	40
2.8.1	Weiterentwicklung und Optimierung von Methoden zur ganzheitlichen Analyse der Folatmetaboliten mittels LC-MS/MS.....	40
2.8.2	Quantifizierung verschiedener Folat Mono- und Polyglutamate während der Kultivierung von Brauhefen.....	41
2.8.3	Entwicklung und Anwendung von Methoden zur Analyse der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie	41
2.8.4	Identifizierung bislang unbekannter, folatähnlicher Metaboliten in Hefen mittels Metabolic Networking	42

Teil II ERGEBNISSE UND DISKUSSION 43

3 Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS45

3.1 Erweiterung der SIVA-Methode zur Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes um das Oxidationsprodukt MeFox	45
3.1.1 Auswahl einer geeigneten MeFox-freien Matrix	45
3.1.2 Kalibrierfunktionen.....	46
3.1.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	46
3.1.4 Wiederfindung	47
3.1.5 Präzision	48
3.2 Entwicklung einer alternativen Probenextraktion von Folaten aus Hefen .	49
3.2.1 Optimierung der alternativen Probenextraktion.....	50
3.2.2 Bewertung der alternativen Probenextraktion im Vergleich zu den Standardmethoden durch (Semi-)Quantifizierungen.....	53
3.2.2.1 Vergleich der Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes mit der Standardmethode	53
3.2.2.2 Bestimmung der relativen Wiederfindung der Polyglutamate durch Quantifizierung der 5-CH ₃ -H ₄ folat Polyglutamate (1-7) und deren absoluter Wiederfindung.....	55
3.2.3 Vergleichendes Fazit und Diskussion der alternativen Probenextraktion	56
3.3 Entwicklung alternativer Aufreinigungsmethoden der Probenextrakte mittels Festphasenextraktion zur Analyse von Folaten in Hefe	58
3.3.1 Auswahl und Optimierung verschiedener Festphasenextraktionsmethoden	58
3.3.1.1 Selektion von Kartuschenmaterialien für die alternative Probenaufreinigung	59
3.3.1.2 Allgemeine Optimierung der selektierten Kartuschenmaterialien an Hand des Modellorganismus Bäckerhefe	61
3.3.1.3 Optimierung der alternativen SAX-Aufreinigung	63
3.3.1.4 Optimierung der alternativen C18-Aufreinigung	66
3.3.1.5 Optimierung der alternativen HLB-Aufreinigung.....	68

3.3.2	Quantitativer Vergleich alternativer Aufreinigungsmethoden mit der Standardaufreinigung	70
3.3.2.1	Untersuchung der Vitamerenverteilung durch Quantifizierung der Gesamtfolatgehalte.....	70
3.3.2.2	Untersuchung der Polyglutamatverteilung durch prozentuale Quantifizierung der 5-CH ₃ -H ₄ folat Polyglutamate (1-7)	72
3.3.2.3	Untersuchung der Polyglutamatverteilung durch semi-quantitative Bestimmung aller Polyglutamate.....	74
3.3.3	Vergleichendes Fazit und Diskussion der alternativen Kartuschaufreinigung.....	75
3.4	Zusammenfassung und Diskussion der alternativen Aufarbeitungs- und Aufreinigungsmethoden	77
4	Kultivierungsexperimente zur quantitativen Analyse von Folatmetaboliten in Hefen	81
4.1	Auswahl geeigneter Kultivierungsbedingungen.....	81
4.1.1.1	Wahl eines geeigneten Minimalmediums zur Kultivierung.....	82
4.1.1.2	Wahl der geeigneten Kultivierungszeitspanne	84
4.2	Folatgehalte in TUM 68® als Varianz der Kultivierungsdauer	86
4.2.1	Quantifizierung des Gesamtfolatgehaltes als Funktion des zeitlichen Kultivierungsverlaufes	86
4.2.2	Quantifizierung der 5-CH ₃ -H ₄ folat Polyglutamate als Funktion des zeitlichen Kultivierungsverlaufes	89
4.2.3	Semi-Quantifizierung verschiedener Polyglutamate als Funktion des zeitlichen Kultivierungsverlaufes.....	92
4.2.4	Fazit und Diskussion der Kultivierungsstudien.....	94
5	Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie.....	96
5.1	Untersuchungen mittels FT-ICR-MS	96
5.1.1	Methodenentwicklung.....	96
5.1.1.1	Auswahl des Ionisierungsmodus.....	97
5.1.1.2	Optimierung der Messmethode.....	98
5.1.1.3	Verbesserung der Ionisierung durch Zugabe von Ionisierungsverstärkern	99

5.1.1.4	Diskussion der Methodenentwicklung zur Analyse von Folatmetaboliten mittels FT-ICR-MS.....	100
5.1.2	Optimierung der Folatdetektion in Hefen mittels FT-ICR-MS	100
5.1.2.1	Durchführung verschiedener <i>dilute and shoot</i> Methoden	100
5.1.2.2	Durchführung einer folatspezifischen Extraktion und Aufreinigung	101
5.1.2.3	Diskussion der Optimierung der Folatdetektion mittels FT-ICR-MS	102
5.1.3	Folatdetektion in Hefeproben mittels FT-ICR-MS – Möglichkeiten und Grenzen	103
5.1.3.1	Analyse detektierbarer Folatvitamere in verschiedenen Ladungszuständen	103
5.1.3.2	Transformation mehrfach geladener Spezies für die Datenauswertung mittels softwaregestützter Netzwerkanalyse	105
5.1.3.3	Diskussion der Möglichkeiten und Grenzen der Folatanalytik mittels FT-ICR-MS am Beispiel der untersuchten TUM 68@	106
5.2	Untersuchungen mittels UHPLC-Q-ToF-MS	107
5.2.1	Methodenentwicklung.....	107
5.2.1.1	Wahl eines geeigneten Säulenmaterials.....	108
5.2.1.2	Wahl von geeigneten Fließmitteln sowie deren Gradienten	109
5.2.1.3	Wahl der geeigneten MS-Parameter.....	111
5.2.1.4	Überprüfung des Fragmentierungsverhaltens von Mono- und Polyglutamatstandards	111
5.2.1.5	Optimierung der MS-Methode zur Generierung von Tandem-MS-Daten	113
5.2.2	Durchführung verschiedener <i>dilute and shoot</i> Methoden.....	113
5.2.3	Anwendung auf vergleichende Untersuchungen verschiedener Probenaufreinigungen	114
5.2.3.1	Allgemeiner Vergleich der extrahierten Metaboliten.....	114
5.2.3.2	Vergleich der extrahierten Folatmetaboliten.....	117
5.2.4	Anwendungen auf die Analyse von Folatmetaboliten als Funktion des zeitlichen Kultivierungsverlaufes.....	120
5.2.4.1	Untersuchung der Umwandlungsrate der identifizierten Polyglutamate	120
5.2.4.2	Untersuchung von Oxidations- und Interkonversionsreaktionen der identifizierten Polyglutamate	122

5.3	Vergleichendes Fazit der beiden Methoden unter Einbezug der Analytik mittels LC-MS/MS.....	126
5.3.1	Allgemeine Gegenüberstellung von FT-ICR-MS und UHPLC-Q-ToF-MS zur Analyse von Folatmetaboliten.....	126
5.3.1.1	Vor- und Nachteile der Folatanalytik mittels FT-ICR-MS.....	127
5.3.1.2	Vor- und Nachteile der Folatanalytik mittels UHPLC-Q-ToF-MS ...	128
5.3.1.3	Vergleichende Diskussion der Folatanalytik mittels FT-ICR-MS sowie UHPLC-Q-ToF-MS	129
5.3.2	Vergleichende Gegenüberstellung verschiedener MS-Methoden zur Analyse von Folatmetaboliten in Hefen.....	131
5.3.2.1	Untersuchung der generellen Metabolitenzusammensetzung der Folate in Abhängigkeit der verwendeten Messmethodik LC-MS/MS, FT-ICR-MS sowie UHPLC-Q-ToF-MS	131
5.3.2.2	Vergleich der identifizierbaren Folatvitamere in Abhängigkeit der verwendeten Messmethodik	133

6 Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking 135

6.1	Anwendung der Plattform GNPS	135
6.1.1	Prozessierung der Metabolitennetzwerke	136
6.1.1.1	Generierung und weitergehende Prozessierung der Metabolitennetzwerke.....	136
6.1.1.2	Herausarbeiten folatähnlicher Spezies durch den Vergleich zwischen den Metabolitennetzwerken	137
6.1.2	Annotation der folatähnlichen Metabolitenklassen	140
6.1.2.1	Annotation der Metabolitenklasse 1	140
6.1.2.2	Annotation der Metabolitenklasse 2	141
6.1.2.3	Annotation der Metabolitenklasse 3	142
6.1.2.4	Zusammenfassung der Annotationen	143
6.1.3	Theorien zur Identifizierung der Molekularstruktur der annotierten Metabolitenklassen.....	143
6.1.3.1	Mögliche Substitutionspositionen der zu Grunde liegenden Folatvitamere.....	143
6.1.3.2	Diskussion des Strukturvorschlages für Metabolitenklasse 1	146
6.1.3.3	Diskussion des Strukturvorschlages der Metabolitenklasse 2	148

6.1.3.4	Diskussion des Strukturvorschlages der Metabolitenklasse 3.....	151
6.2	Synthese verschiedener C ₂ -Monoglutamatstandards zur Verifizierung von deren Anwesenheit in Hefen.....	152
6.2.1	Synthese von 5-Acetyl-tetrahydrofolat.....	152
6.2.2	Synthese von 5-Ethyl-tetrahydrofolat und dessen Oxidationsprodukt EthylFox.....	153
6.3	Chemisch-physikalisches Verhalten der synthetisierten C ₂ -Monoglutamatstandards bei Messungen mittels LC-MS/MS und UHPLC-Q-ToF-MS.....	154
6.3.1	Analyse von kultivierter Hefe mittels LC-MS/MS.....	154
6.3.1.1	Integration der Metabolitenklasse 2 in die LC-MS/MS Methode zur Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes.....	155
6.3.1.2	Vergleichende Messung der synthetisierten Standards und kultivierten Hefeprobe.....	155
6.3.2	Vergleichende Analyse der synthetisierten Standards mittels UHPLC-Q-ToF-MS.....	156
6.4	Diskussion der möglichen Bedeutung des C ₂ -Metabolismus.....	157
7	Zusammenfassung und Ausblick.....	160
8	Summary.....	163
 Teil III MATERIALIEN UND METHODEN.....		167
9	Chemikalien, Reagenzien, Testmaterialien.....	169
9.1	Chemikalien.....	169
9.2	Referenzsubstanzen.....	171
9.3	Testmaterialien.....	172
10	Lösungen, Puffer, Standardlösungen, Enzyme, Kultivierungslösungen.....	172
10.1	Lösungen und Puffer.....	172
10.2	Standardlösungen.....	176
10.3	Enzymlösungen.....	179

10.4	Lösungen zur Kultivierung und Aufreinigung von Hefe.....	179
11	Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien	181
11.1	Geräte	181
11.2	Geräteparameter	183
11.2.1	HPLC-DAD zur Bestimmung der Analytkonzentration.....	183
11.2.2	HPLC-DAD zur Bestimmung der Konzentration der synthetisierten 5-CH ₃ -H ₄ folat Polyglutamatstandards	183
11.2.3	Präparative HPLC.....	184
11.2.4	LC-MS/MS zur Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes.....	185
11.2.5	LC-MS/MS zur Bestimmung der Folat Polyglutamate	188
11.2.6	FT-ICR-MS	194
11.2.7	UHPLC-Q-ToF-MS	195
11.2.8	Software	197
11.2.9	Verbrauchsmaterialien.....	197
12	Berechnungen	199
12.1	Berechnung einer linearen Kalibrierfunktion.....	199
12.2	Linearitätstest nach Mandel	199
12.3	Berechnung der NWG über das Signal-Rausch-Verhältnis	199
12.4	Berechnung der BG über das Signal-Rausch-Verhältnis.....	200
12.5	Berechnung des Folatgehaltes in µg/100 g, berechnet als PteGlu	200
12.6	Berechnung der relativen Wiederfindung der 5-CH ₃ -H ₄ folat Polyglutamate..	200
13	Quantitative Methoden	201
13.1	Methodenvalidierung des Analyten MeFox zur Bestimmung des Gesamt- MeFox-Gehaltes	201
13.2	Bestimmung der Konzentration der 5-CH ₃ -H ₄ folat Polyglutamatstandards	203
13.3	Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes in Hefen.....	203
13.4	Bestimmung des 5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₁₋₇ Gehaltes in Hefen	204
13.5	Bestimmung des Polyglutamatspektrums in Hefen mittels LC-MS/MS...	205
13.6	Alternative Probenextraktion mittels des Siedens in gepufferter Ethanollösung.....	206

13.7	Bestimmung der relativen Wiederfindung der 5-CH ₃ -H ₄ folat Polyglutamate	208
13.8	Methodenentwicklung für alternative Kartuschenaufreinigungen	208
13.9	Alternative Probenaufreinigungen mittels verschiedener Festphasenextraktionen	210
14	Profiling der Folatmetaboliten mittels (U)HR-MS	211
14.1	Test verschiedener <i>dilute and shoot</i> Methoden zur Probenvorbereitung	211
14.2	Bestimmung des Folatspektrums in Lebensmitteln mittels FT-ICR-MS..	212
14.3	Bestimmung der Folatmetaboliten in Hefen mittels UHPLC-Q-ToF-MS .	214
15	Synthese verschiedener Folatstandards	218
15.1	5-Acetyl-tetrahydrofolat durch Umsetzung von H ₄ folat	218
15.2	5-Ethyl-tetrahydrofolat durch Umsetzung von PteGlu	218
15.3	Oxidation von 5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₇ und 5-Ethyl-H ₄ folat zu MeFox-Glu ₇ und EthylFox	218
15.4	Oxidation von 5-Ethyl-H ₄ folat zu EthylFox.....	219
16	Hefekultivierungen	219
17	Literaturverzeichnis	221
18	Anhang.....	239

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Grundstruktur der Pteroylmonoglutaminsäure (PteGlu).	5
Abbildung 2.2 Hauptvertreter der Monoglutamate.	6
Abbildung 2.3 Interkonversion von 5-CHO-H ₄ folat, 5,10-CH ⁺ -H ₄ folat und 10-CHO-H ₄ folat nach Jägerstad und Jastrebova [2013] und Gmelch et al. [2020] im pH Bereich von pH 4 bis pH 7 und unter Verwendung von Antioxidationsmitteln.	8
Abbildung 2.4 Interkonversions- und Abbaureaktionen verschiedener Folatvitamere nach Chippel und Scrimgeour [1970], Blair und Pearson [1974], Reed und Archer [1980], Strandler et al. [2015] und Delchier et al. [2016].	9
Abbildung 2.5 Oxidationsreaktionen von 5-CH ₃ -H ₄ folat unter Bildung von s-Pyrazinotriazin (MeFox) nach Blair und Pearson [1974], Reed und Archer [1980] und Delchier et al. [2016].	10
Abbildung 2.6 Biosynthese von Folaten in prokaryontischen Zellen.	12
Abbildung 2.7 Kompartimentierung des C ₁ -Metabolismus in menschlichen Zellen nach Fox und Stover [2008] und Stover [2010].	16
Abbildung 2.8 Aufbau eines Quadrupolanalysators nach Gross [2013].	28
Abbildung 2.9 Aufbau eines Q-ToF-Massenspektrometers aus Budzikiewicz und Schäfer [2013].	29
Abbildung 2.10 Schema einer ICR-Zelle aus Budzikiewicz und Schäfer [2013].	30
Abbildung 3.1 Flächenverhältnisse A(A)/A(ISTD = [¹³ C ₅]-5-CH ₃ -H ₄ folat) für verschiedene Folatvitamere mit den getesteten Ansätzen (vgl. Tabelle 3.4) zur Folatextraktion mittels des Siedens mit gepufferter Ethanollösung.	52
Abbildung 3.2 Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes in Bäckerhefe mit der Standardmethode im Vergleich zur Folatextraktion durch Sieden in gepufferter Ethanollösung.	54
Abbildung 3.3 Peakflächenverhältnis der 5-CH ₃ -H ₄ folat Polyglutamate (1-7) im Verhältnis zum zugesetzten internen Standard [¹³ C ₅]-5-CH ₃ -H ₄ folat für verschiedene, getestete Festphasenkartuschen zur Probenaufreinigung; logarithmische Darstellung der Flächenverhältnisse.	62

Abbildung 3.4 Semi-quantitative Optimierung des Organikanteils der alternativen SAX-Aufreinigung. Logarithmische Darstellung der Flächenverhältnisse A(A)/A(ISTD=[¹³ C ₅]-5-CH ₃ -H ₄ folat).	65
Abbildung 3.5 Semi-quantitative Optimierung des Säureanteils und des Bettvolumnes der alternativen C18-Aufreinigung. Beschreibung der Ansätze vgl. Tabelle 3.10. Logarithmische Darstellung der Flächenverhältnisse A(A)/A(ISTD=[¹³ C ₅]-5-CH ₃ -H ₄ folat).	68
Abbildung 3.6 Semi-quantitative Optimierung des Lösungsmittels der alternativen HLB-Aufreinigung. Logarithmische Darstellung der Flächenverhältnisse A(A)/A(ISTD=[¹³ C ₅]-5-CH ₃ -H ₄ folat).	69
Abbildung 3.7 Quantitative Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes in Bäckerhefe in Abhängigkeit der Festphasenaufreinigung.	71
Abbildung 3.8 Qualitativer Anteil der 5-CHO-H ₄ folat und 5,10-CH ⁺ -H ₄ folat Polyglutamate an der Summe aus nachweisbaren Polyglutamaten.	74
Abbildung 4.1 Optimierung des Minimalmediums zur Kultivierung von TUM 68 [®]	83
Abbildung 4.2 Optimierung der geeigneten Kultivierungszeitspanne von TUM 68 [®] in Minimalmedium.	85
Abbildung 4.3 Gesamtfolatgehalte in TUM 68 [®] nach Kultivierung in Minimalmedium für 20 bis 80 h.	86
Abbildung 4.4 Gehalte der 5-CH ₃ -H ₄ folat Polyglutamate (1-7) in TUM 68 [®] nach Kultivierung in Minimalmedium für 20 bis 80 h.....	89
Abbildung 4.5 Verhältnis der Hexa- und Heptaglutamatformen der Polyglutamate in kultivierter TUM 68 [®] gemessen am relativen Flächenverhältnis der Analyten zum internen Standard (ISTD) [¹³ C ₅]-5-CH ₃ -H ₄ folat nach Messung mittels LC-MS/MS.	93
Abbildung 5.1 Intensitätsvergleich ausgewählter Folatstandards (c = 1 µg/mL) in ESI ⁺ sowie ESI ⁻ gemessen mittels FT-ICR-MS.	97
Abbildung 5.2 Intensitätsvergleich der PteGlu ₄ (c = 1 µg/mL) am FT-ICR-MS in ESI ⁻ -Modus.	98
Abbildung 5.3 Ionisierungsvergleich der PteGlu (c = 1 µg/mL) am FT-ICR-MS gemessen in ESI ⁻ -Modus.	99

Abbildung 5.4 FT-ICR-MS Spektren aufgearbeiteter Hefeproben im Massenbereich von m/z 615 – 616.	101
Abbildung 5.5 Anzahl detektierbarer und an Hand des vorhandenen Isotopenpatterns identifizierbarer Folatsignale in Bäckerhefe und kultivierter TUM 68® nach Analyse mittels FT-ICR-MS.	104
Abbildung 5.6 Verteilung der zum Teil in verschiedenen Ladungszuständen identifizierbaren Folatvitamere in den untersuchten Hefeproben nach Analyse mittels FT-ICR-MS.	105
Abbildung 5.7 Extrahierte Ionen Chromatogramme (EIC) der Monoglutamatstandards getestet auf verschiedenen UHPLC-Säulenmaterialien und Messung mittels Q-ToF-MS.	108
Abbildung 5.8 Chromatogramm der Monoglutamatstandards nach Trennung auf Restek Raptor ARC-18 UHPLC-Material und Messung mittels Q-ToF-MS.	109
Abbildung 5.9 Chromatogramme der Monoglutamat- und Polyglutamatstandards nach Trennung auf Restek Raptor ARC-18 UHPLC-Material und Messung mittels Q-ToF-MS.	110
Abbildung 5.10 MS/MS Spektren von 5-CH ₃ -H ₄ folat, 5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₇ , MeFox sowie MeFox-Glu ₇ nach Messung mittels Q-ToF-MS.	112
Abbildung 5.11 EICs (Extracted Ion Chromatogram) des Hauptvitameres 5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₇ nach Extraktion mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen und Messung mittels UHPLC-Q-ToF-MS.	114
Abbildung 5.12 Multivariate statistische Auswertung mittels UHPLC-Q-ToF-MS analysierter Hefen nach Aufreinigung mit verschiedenen Festphasenmaterialien.	115
Abbildung 5.13 Identifizierung der Metabolitenklassen der aus den Regressionen der partiellen kleinsten Quadrate extrahierten 100 diskriminierendsten der experimentell ermittelten Spezies der mittels UHPLC-Q-ToF-MS analysierten Hefen nach Aufreinigung mit verschiedenen Festphasenmaterialien.	116
Abbildung 5.14 Mittels UHPLC-Q-ToF-MS identifizierbare Folatvitamere in Abhängigkeit des zur Aufreinigung verwendeten Festphasenmaterials. Darstellung nach Gmelch et al. [2020].	118

Abbildung 5.15 Verhältnis der Hexa- und Heptaglutamatformen der Polyglutamate in kultivierter TUM 68 [®] nach Analyse mittels UHPLC-Q-ToF-MS gemessen am relativen Flächenverhältnis der Analyten zum internen Standard [¹³ C ₅]-5-CH ₃ -H ₄ folat.....	121
Abbildung 5.16 Anteil der Interkonversions- und Oxidationsvitamere gemessen am entsprechenden metabolisch aktiven Vitamer.	123
Abbildung 5.17 Relative Zusammensetzung der Folatvitamere in TUM 68 [®] in Abhängigkeit der Substitutionsart und der gewählten Messmethodik.	132
Abbildung 5.18 Anzahl der identifizierbaren Folatpolyglutamate in kultivierter TUM 68 [®] in Abhängigkeit der gewählten Messmethodik.	133
Abbildung 6.1 Prozessierung der folatrelevanten Metabolitennetzwerken generiert mit Hilfe der Plattform GNPS an Hand der Hefeproben nach 26 h Kultivierungszeit.	136
Abbildung 6.2 Verlauf der folatähnlichen Metabolitenklassen im zeitlichen Verlauf der Hefekultivierung im Verhältnis des Hexaglutamates zum Heptaglutamat bestimmt an Hand des Intensitätsverhältnisses der Analyten zum internen Standard [¹³ C ₅]-5-CH ₃ -H ₄ folat.....	139
Abbildung 6.3 Annotation der potentiell folatähnlichen Metabolitenklasse 1.	140
Abbildung 6.4 Annotation der potentiell folatähnlichen Metabolitenklasse 2.	141
Abbildung 6.5 Analyse weiterer Massendifferenzen bekannter Folatvitamere und des Hexaglutamates der Metabolitenklasse 2.	142
Abbildung 6.6 Annotation der potentiell folatähnlichen Metabolitenklasse 3.	142
Abbildung 6.7 Mögliche Substitutionspositionen der Folatgrundstrukturen unter Einschätzung der Zugänglichkeit der Position dargestellt durch die absteigende Nummerierung.	144
Abbildung 6.8 Zusammenfassung der plausibelsten Strukturformelvorschläge der Metabolitenklassen 1-3.	145
Abbildung 6.9 Extrahierte ionische Chromatogrammspuren (EIC) der Hexaglutamate der Metabolitenklasse 1-3 im Vergleich zu den damit in Zusammenhang stehenden Folat-Hexaglutamaten.....	145

Abbildung 6.10 Anpassung des C ₁ -Metabolismus und Postulierung des C ₂ -Metabolismus (C ₂ -Metaboliten gezeigt in roter Farbe).	148
Abbildung 6.11 Abwandlung der Oxidationsreaktionen von 5-CH ₃ -H ₄ folat zu MeFox unter Berücksichtigung von C ₂ -Metaboliten.....	150
Abbildung 6.12 Verlauf der Gehalte von H ₄ PteGlu, 5-Serin-H ₄ PteGlu sowie 5,10-CH ₂ -H ₄ PteGlu während der Hefekultivierung von TUM 68 [®] gemessen an Hand des Intensitätsverhältnisses zum ISTD [¹³ C ₅]-5-CH ₃ -H ₄ folat.	151
Abbildung 6.13 Vergleich der Flächenverhältnisse der Metabolitenklasse 2 im Verhältnis zum zugesetzten ISTD [¹³ C ₅]-5-CH ₃ -H ₄ folat im zeitlichen Verlauf der Hefekultivierung nach Messung mittels UHPLC-Q-ToF-MS und nach enzymatischer Dekonjugation mittels LC-MS/MS.....	155
Abbildung 6.14 Chromatogramme der unbekanntes Substanz nach enzymatischer Dekonjugation sowie der synthetisierten C ₂ -Metaboliten nach Messung mittels LC-MS/MS.	156
Abbildung 6.15 Chromatogrammspuren des Hexa- und Heptaglutamates der Metabolitenklasse 2 im Vergleich zu den synthetisierten C ₂ -Metaboliten nach Messung mittels UHPLC-Q-ToF-MS.....	157
Abbildung 6.16 C ₁ -Metabolismus in Hefezellen nach Christensen und MacKenzie [2006] unter Adaption zum postulierten C ₂ -Metabolismus in roter Hervorhebung...	158

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Identifizierungslevel wie von der MSI vorgeschlagen [Sumner et al. 2007], verändert nach Blaženović et al. [2018] unter Berücksichtigung der aktuellsten Überarbeitungen der MSI	33
Tabelle 3.1 Kalibrierfunktionen zur Bestimmung der Konzentration des Analyten MeFox in Hefeproben.	46
Tabelle 3.2 Wiederfindung des Analyten MeFox nach Bestimmung mittels LC-MS/MS nach Vogelgesang und Hädrich [1998].....	48
Tabelle 3.3 Präzisionen des Analyten MeFox nach Bestimmung mittels LC-MS/MS; STDA = Standardabweichung.	48
Tabelle 3.4 Getestete Ansätze zur Folatextraktion mittels des Siedens in gepufferter Ethanollösung.	51
Tabelle 3.5 Prozentuale Differenz der Gesamfolatgehalte bestimmt nach der Siedemethode im Vergleich zur Standardmethode.....	55
Tabelle 3.6 Relative Wiederfindung der 5-CH ₃ H ₄ folat Polyglutamate nach Folatextraktion mittels der Standard- und Siedemethode.	56
Tabelle 3.7 Effizienz der Extraktion der Polyglutamate 5-CH ₃ -H ₄ PteGlu _n mit Hilfe des Siedens in gepufferter Ethanollösung im Verhältnis zur klassischen Folatextraktion.	56
Tabelle 3.8 Getestete alternative Festphasenmaterialien zur Aufreinigung von Folatextrakten.	60
Tabelle 3.9 Semi-quantitative Optimierung des Säureanteils der alternativen SAX-Aufreinigung an Hand der 5-CH ₃ -H ₄ folat Polyglutamate unter Angabe des Flächenverhältnisses A(A)/A(ISTD); ISTD = [¹³ C ₅]-5-CH ₃ -H ₄ folat, n.d. = nicht detektierbar.	64
Tabelle 3.10 Getestete Ansätze zur Optimierung der Elutionslösungsmittel der alternativen C18-Aufreinigung.....	67
Tabelle 3.11 Prozentuale Quantifizierung der Polyglutamate 5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₁₋₇ nach verschiedenen Kartuschaufreinigungen; n.q. = nicht quantifizierbar.	73

Tabelle 4.1 Getestete Medien zur Entwicklung des optimalen Kultivierungsmediums der Hefe TUM 68®.....	82
Tabelle 5.1 Getestete Säulenmaterialien während der Methodenentwicklung zur Folatanalyse mittels UHPLC-Q-ToF-MS.....	108
Tabelle 5.2 Vergleichende Gegenüberstellung von FT-ICR-MS und UHPLC-Q-ToF-MS hinsichtlich verschiedener Parameter.....	127
Tabelle 6.1 Anzahl der innerhalb der GNPS-Metabolitennetzwerke clusternden Verbindungen und deren Eingrenzung auf den folatrelevanten Kontext.	137
Tabelle 6.2 Masse-zu-Ladungsverhältnisse der sich metabolisch aktiv verhaltenden Metabolitenklassen mit folatähnlichem Fragmentierungsverhalten in den untersuchten Hefeproben.....	138
Tabelle 6.3 Annotation der folatähnlichen Metabolitenklassen.....	143
Tabelle 6.4 Signalzuordnungen im ¹ H-Spektrum von 5-CO-CH ₃ -H ₄ folat aufgenommen bei 500 Hz; δ = chemische Verschiebung in ppm; J = Kopplungskonstante.....	153
Tabelle 6.5 Signalzuordnungen im ¹ H-Spektrum von 5-CO-CH ₃ -H ₄ folat aufgenommen bei 500 Hz; δ = chemische Verschiebung in ppm; J = Kopplungskonstante.....	154
Tabelle 10.1 Verwendete Testwaschlösungen während der Methodenentwicklung der Aufreinigung mittels verschiedener Festphasenmaterialien.....	175
Tabelle 10.2 Verwendete Testwaschlösungen während der Methodenentwicklung der Aufreinigung mittels verschiedener Festphasenmaterialien.....	175
Tabelle 10.3 Verwendete Chemikalien zur Herstellung des Basis Minimalmediums zur Hefekultivierung.	180
Tabelle 10.4 Vitaminlösung für die Herstellung der Minimalmedien zur Hefekultivierung..	180
Tabelle 11.1 Messparameter zur Bestimmung der Analytkonzentrationen der Referenzverbindungen mittels HPLC-DAD.....	183
Tabelle 11.2 Gradient zur Konzentrationsbestimmung der Folatreferenzverbindungen mittels HPLC-DAD.	183
Tabelle 11.3 Messparameter zur Konzentrationsbestimmung der synthetisierten 5-CH ₃ -H ₄ folat Polyglutamate mittels HPLC-DAD.....	184

Tabelle 11.4 Gradient zur Konzentrationsbestimmung der synthetisierten 5-CH ₃ -H ₄ folat Polyglutamate mittels HPLC-DAD.	184
Tabelle 11.5 Messparameter zur Aufreinigung des synthetisierten 5-CH ₂ -CH ₃ -H ₄ folates mittels präparativer HPLC.	184
Tabelle 11.6 Gradient zur Aufreinigung des synthetisierten 5-CH ₂ -CH ₃ -H ₄ folates mittels präparativer HPLC.	185
Tabelle 11.7 Messparameter zur Bestimmung der Folatvitamere nach enzymatischer Dekonjugation in den analysierten Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS.	185
Tabelle 11.8 Massenübergänge und Parameter zur Bestimmung der Folatvitamere nach enzymatischer Dekonjugation in den untersuchten Proben mittels LC-MS/MS.	186
Tabelle 11.9 Gradient zur Konzentrationsbestimmung der Folatvitamere nach enzymatischer Dekonjugation in den untersuchten Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS.	187
Tabelle 11.10 Massenübergänge und Parameter zur Bestimmung des unbekanntes Metaboliten der Metabolitenklasse 2 nach enzymatischer Dekonjugation in den untersuchten Proben mittels LC-MS/MS.	187
Tabelle 11.11 Messparameter zur Bestimmung der Folat Polyglutamate in den analysierten Proben mittels LC-MS/MS.	188
Tabelle 11.12 Gradient zur Bestimmung der Folat Polyglutamate in den untersuchten Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS.	188
Tabelle 11.13 Massenübergänge und Parameter der PteGlu Polyglutamate (1-10) in den untersuchten Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS.	189
Tabelle 11.14 Massenübergänge und Parameter der H ₄ folat Polyglutamate (1-10) in den untersuchten Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS.	190
Tabelle 11.15 Massenübergänge und Parameter der 5-CH ₃ -H ₄ folat Polyglutamate (1-10) in den untersuchten Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS.	191
Tabelle 11.16 Massenübergänge und Parameter der 5-CHO-H ₄ folat Polyglutamate (1-10) in den untersuchten Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS.	192
Tabelle 11.17 Massenübergänge und Parameter der 5-CHO-H ₄ folat Polyglutamate (1-10) in den untersuchten Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS.	193

Tabelle 11.18 Massenübergänge und Parameter der PteGlu Polyglutamate (1-10) in den untersuchten Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS.	194
Tabelle 11.19 Parameter zur Analyse der Folatmetaboliten in Lebensmitteln mittels FT-ICR-MS.	195
Tabelle 11.20 Parameter zur Analyse der Folatmetaboliten mittels UHPLC-Q-ToF-MS.....	195
Tabelle 11.21 Gradient zur Analyse der Folatmetaboliten in den untersuchten Proben mittels UHPLC-Q-ToF-MS; Pre run time: 3,7 min.	196
Tabelle 11.22 Preference Mass List zur Erweiterung der AutoMSn Fragmentierung mittels UHPLC-Q-ToF-MS.	196
Tabelle 13.1 Zusammensetzung des Matrixblanks zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze von MeFox.	202
Tabelle 13.2 Dotierniveaus zur Bestimmung von NWG und BG des Analyten MeFox.	202
Tabelle 13.3 Dotierniveaus zur Bestimmung der Wiederfindung des Analyten MeFox.	202
Tabelle 13.4 Getestete Ansätze zur Methodenentwicklung der Folatextraktion mittels des Siedens in gepufferter Ethanollösung.	206
Tabelle 14.1 Verwendete Lösungsmittelgemisch für die Probenextraktion mittels <i>dilute and shoot</i> Methode.	212
Tabelle 14.2 Getestete Gradienten während der Methodenentwicklung zur Analyse der Folatmetaboliten mittels UHPLC-Q-ToF-MS.	215

Teil I EINFÜHRUNG

1 Relevanz der Themenstellung

Folate sind eine Vielzahl an sogenannten Vitameren, d. h. strukturell ähnlichen Verbindungen aus der Folatgruppe, welche zu den B-Vitaminen gehören, vom menschlichen Organismus allerdings nicht synthetisiert werden können. Weltweit jedoch wird eine unzureichende Aufnahme mit der täglichen Nahrung angenommen. Folate sind essentiell beteiligt an Stoffwechselprozessen des C₁-Metabolismus und verantwortlich für Methylierungsreaktionen im Körper. Des Weiteren werden diese Vitamere bei der Zellteilung benötigt und liefern Bausteine für die Purin- und Nukleotidsynthese. Folgen eines Folatmangels sind unter anderem ein erhöhtes Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen, Demenz oder Krebserkrankungen. Eine unzureichende Folatzufuhr während der Schwangerschaft erhöht das Risiko von Neuralrohrerkrankungen (Spina bifida) signifikant. Um die Bevölkerung ausreichend mit Folaten zu versorgen, werden daher in einigen Ländern Zwangsanreicherungen durchgeführt. Allerdings sind auch diese Anreicherungen kritisch zu sehen, da sie mit einigen Negativfolgen in Verbindung gebracht werden. So steigt durch eine Supplementierung mit Folsäure das Risiko für Darmkrebserkrankungen beträchtlich. Bei Supplementierung mit den natürlich vorkommenden Folatvitameren sind diese Risiken nicht zu beobachten. Daher ist es von Interesse, folatreiche Lebensmittel zu identifizieren, die Biosynthese der Folate in diesen Organismen nachzuvollziehen und gezielt zu steigern. Die so generierten Lebensmittel könnten sodann als natürliche Supplemente eingesetzt werden. Vorteil wäre eine Vermeidung negativer Folgen synthetischer Supplemente sowie die höhere Akzeptanz beim Konsumenten, welcher genetisch modifizierten Lebensmitteln im Allgemeinen eher kritisch gegenübersteht.

Als sehr folatreiche Lebensmittel sind hierbei unter anderem Hefen bekannt. Vorteil von Hefen sind deren einfache Kultivierung und das ubiquitäre Vorkommen. Zudem ist der Metabolismus von Hefen größtenteils aufgedeckt. Um den Metabolismus der Folate detailliert zu untersuchen, bieten sich Methoden der Metabolomics an, d.h. der Studie des Metaboloms eines Organismus. Durch diese Untersuchung aller von einem Organismus gebildeten Metaboliten und deren Vorkommen können sodann Schlussfolgerungen über deren Synthese und Funktion gezogen werden. Ist der Metabolismus eines Organismus bekannt, so kann dieser gezielt genutzt werden, um gewünschte Metaboliten bevorzugt zu exprimieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, Synthese und Metabolismus von Folaten in Hefen nachzuvollziehen und detaillierter in Form von noch unbekanntem Folatvitameren aufzuklären. Dazu sollen verschiedene Methoden der Massenspektrometrie eingesetzt werden. Mit Hilfe von Kultivierungsexperimenten sollen optimale Bedingungen für möglichst hohe Folatkonzentrationen herausgearbeitet werden, welche künftig der Herstellung natürlicher Supplemente dienen könnten.

2 Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

Zu Beginn der 1930er Jahre berichtete Lucy Wills von der Heilung makrozytischer Anämie bei schwangeren Frauen in Bombay nach Einnahme von Hefeextrakt. [Wills 1931] Bereits zuvor hatte sie mit Hilfe von Studien an Ratten belegen können, dass das Krankheitsbild der makrozytischen Anämie durch einen Mangel an Nährstoffen verursacht wird und durch die Gabe von Hefe als Quelle von B-Vitaminen geheilt werden kann. [Wills 1930] Die dafür verantwortliche Substanz war zunächst als „Wills-Faktor“ bekannt. 1941 wurde eine saure Substanz erstmals aus Spinatblättern isoliert und als Wachstumsfaktor für bestimmte Bakterien, darunter *Streptococcus lactis*, identifiziert. Abgeleitet vom lateinischen Wort für Blatt, *folium*, bekam die Substanz fortan den Namen „Folsäure“. [Mitchell et al. 1941] Mit Beginn der strukturellen Aufklärung und erstmaligen Synthese von Folsäure durch Angier im Jahr 1945 konnte zudem der „Wills-Faktor“ als Folsäure identifiziert werden. [Angier et al. 1945] Seither wurde viel zum Vorkommen und Metabolismus der Folsäure und ihrer Derivate untersucht. [Stokstad 1979; Tibbetts und Appling 2010; Hanson und Gregory 2011] Die stetige instrumentelle Verbesserung hinsichtlich Selektivität und Sensitivität bietet hierbei die Möglichkeit, den Metabolismus der Folsäurederivate im Detail zu untersuchen.

2.1 Struktur und Stabilität der Folate

Zwischen Entdeckung und Strukturaufklärung der Folate vergingen etwas mehr als zehn Jahre. Währenddessen bekam die entdeckte Substanz verschiedene Namen, darunter der bereits erwähnte Wills-Faktor, Vitamin M oder Vitamin B_c. Erst mit Beginn der Strukturaufklärung konnte gezeigt werden, dass es sich dabei nicht nur um eine einzelne Substanz, sondern um eine ganze Substanzklasse mit gleichem Grundgerüst handelt. [Rosenberg 2012]

2.1.1 Chemische Eigenschaften der Folate

Unter dem Begriff „Folate“ werden im Allgemeinen die Folsäure und deren Vitamere zusammengefasst. [Pfeiffer et al. 1994; Shane 2001; Saini et al. 2016b] Folsäure ist des Weiteren unter dem Begriff Vitamin B₉ bekannt. Grundstruktur dieser wasserlöslichen Vitamine bildet die Pteroylmonoglutaminsäure (PteGlu) bestehend aus einem 2-Amino-4-oxo-pteridinkern, der an C⁶ über eine Methylengruppe mit *para*-Aminobenzoesäure (pABS) und einer oder mehreren

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

L-Glutaminsäureeinheiten verknüpft ist. [Quinlivan et al. 2006; Saini et al. 2016b] Es wird vermutet, dass natürlicherweise über 150 Folatvitamere in Lebensmitteln vorkommen. [Garratt et al. 2005] Die große Varianz ergibt sich durch verschiedene Substituenten und Oxidationsstufen des Pteridinringes sowie weitere Verknüpfung von bis zu 14 Glutamatresten. [Garratt et al. 2005; Rebeille et al. 2006] Natürlich vorkommende Vitamere sind die Derivate der reduzierten Form 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (H₄folat), wohingegen die volloxidierte Folsäure nicht natürlicherweise in Lebensmitteln vorkommt. Die Folatderivate unterscheiden sich durch verschiedene C₁-Substituenten an N⁵ und N¹⁰ des Pteridingrundgerüsts. Bislang bekannte Hauptvertreter sind die 5-Methyltetrahydrofolsäure (5-CH₃-H₄folat), 5,10-Methylenetetrahydrofolsäure (5,10-CH₂-H₄folat), 5,10-Methenyltetrahydrofolsäure (5,10-CH⁺-H₄folat), 5- und 10-Formyltetrahydrofolsäure (5-CHO-H₄folat und 10-CHO-H₄folat) sowie 5-Formiminotetrahydrofolsäure (5-CHNH-H₄folat). [Pfeiffer et al. 1994; Rebeille et al. 2006; Saini et al. 2016b] Polyglutamate unterscheiden sich von Monoglutamaten durch die zusätzliche γ -Verknüpfung von bis zu 13 weiteren Glutaminsäureeinheiten. Abbildung 2.1 gibt einen Überblick über die Grundstruktur der Folate, Abbildung 2.2 eine Übersicht über bekannte Monoglutamate. [Rebeille et al. 2006]

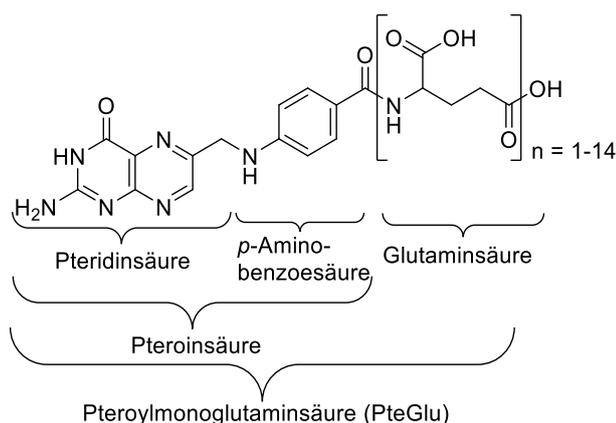


Abbildung 2.1 Grundstruktur der Pteroylmonoglutaminsäure (PteGlu).

Im Gegensatz dazu dienen Polyglutamate zum einen als effektivere Substrate für folatabhängige Cofaktoren bestimmter Enzyme. Zum anderen dienen sie als präferierte Speicherform im Organismus. [Shane 2001] Durch die zusätzlichen negativen Ladungen, eingeführt durch die Verlängerung des Glutamatrestes, wird die intrazelluläre Akkumulation durch erhöhte Affinität zu folatbindenden Proteinen gesteigert. [Matthews et al. 1987]

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

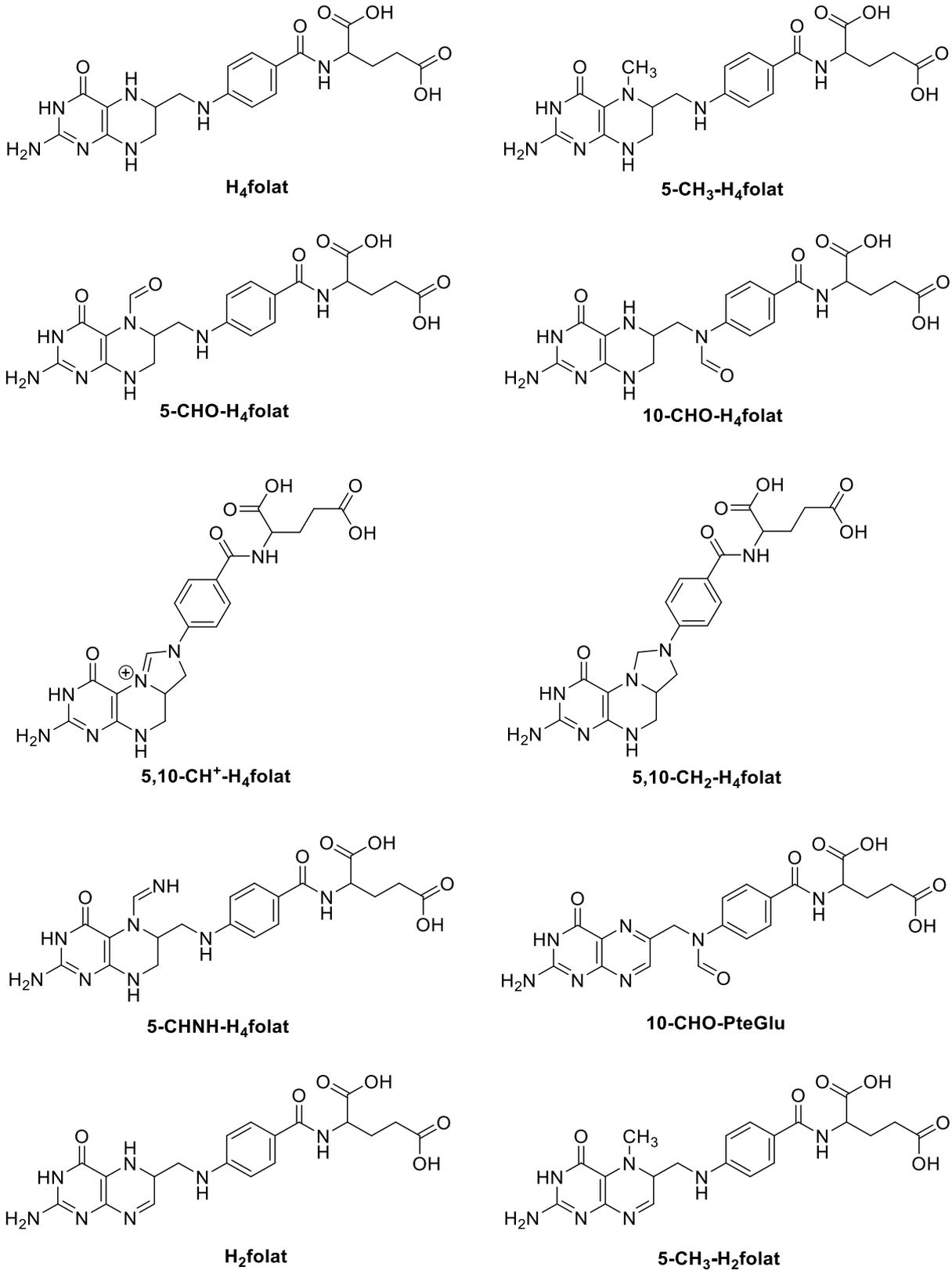


Abbildung 2.2 Hauptvertreter der Monoglutamate.

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

2.1.2 Abbau- und Umwandlungsreaktionen

Folate sind empfindlich gegenüber der Einwirkung von Licht, Hitze, Sauerstoff sowie extremen pH-Werten, wobei die verschiedenen Vitamere unterschiedliche Sensitivität gegenüber diesen Faktoren aufweisen.

Brouwer et al. [2007] haben eine Reihe von Experimenten mit Folatmonoglutamatstandards durchgeführt, um die Stabilität der einzelnen Vitamere zu untersuchen. Dazu wurden die Standards in 50 mM Phosphatpuffer unter Zusatz der üblicherweise verwendeten Reduktionsmittel Ascorbinsäure sowie Mercaptoethanol bei verschiedenen pH-Werten zwischen pH 2 und pH 10 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass mit Ausnahme von H₄folat ein Großteil der Folate stabil ist in pH-Bereichen zwischen pH 2 und pH 10. Lediglich ein zusätzlicher Erhitzungsschritt führte zu Verlusten der jeweiligen Vitamere. Hierbei konnte eine Korrelation zwischen sinkendem pH-Wert und Folatinstabilität gezeigt werden. Im Allgemeinen konnte Baggott [2000] eine höhere Stabilität der Folate im alkalischen Milieu nachweisen. Dies gilt vor allem für die Interkonversion zwischen 5,10-CH₂-H₄folat und H₄folat in Lösungen mit einem Überschuss an Ameisensäure. Lediglich bei pH-Werten über pH 8 liegt dieses Gleichgewicht zu Gunsten des 5,10-CH₂-H₄folates. [Strandler et al. 2015]

Bei extremen pH-Werten, Hitze- oder Sauerstoffeinfluss zeigen die verschiedenen Folatvitamere Interkonversionen und Abbaureaktionen auf, welche in den nachfolgenden Abbildungen (Abbildung 2.3 und Abbildung 2.4) veranschaulicht werden. Bereits in frühen Studien konnte gezeigt werden, dass an Position N⁵ substituierte, reduzierte Folatvitamere eine höhere Stabilität im Vergleich zu unsubstituierten Vitameren aufweisen. Dieses Phänomen wird auf geringeren Zugang von Sauerstoff und anderen Oxidationsmitteln zum Pteridinring durch sterische Hinderung zurückgeführt. [Blair und Pearson 1974; Reed und Archer 1980]

Üblicherweise wird die kovalente Bindung zwischen C⁹ und N¹⁰ von unsubstituierten Folaten durch autoxidative Vorgänge gebrochen. Hauptabbauprodukte sind *p*-Aminobenzoylglutamat (pABG) sowie verschiedene substituierte Pteridine, welche unter Freisetzung von Ameisensäure zu Pteridin abgebaut werden. [Chippel und Scrimgeour 1970; Blair und Pearson 1974; Reed und Archer 1980; Strandler et al. 2015]

Abbildung 2.3 zeigt, dass unter mild sauren bis neutralen Bedingungen (pH 4 bis pH 7) und bei Anwesenheit von Reduktionsmitteln (üblicherweise Ascorbinsäure in Kombination mit Thiolen) ein Gleichgewicht zwischen 5-CHO-H₄folat sowie 5,10-CH⁺-H₄folat und 10-CHO-H₄folat besteht. Wird der pH unter einen Wert von pH 2 abgesenkt, so bildet sich irreversibel das 5,10-CH⁺-H₄folat, welches unter diesen Bedingungen auch ohne den Zusatz von Reduktionsmitteln stabil ist. Liegt dagegen alkalisches Milieu vor, so wird das Gleichgewicht zum Isomer 10-CHO-H₄folat verschoben, sodass unter diesen Bedingungen lediglich die Summe der

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

Formyl-Vitamerie bestimmt werden kann. Als Oxidationsprodukt wurde hierbei 10-CHO-H₂folat identifiziert, welches weiter zum 10-CHO-PteGlu sowie weiteren unbekanntem Oxidationsprodukten oxidiert. Diese Oxidationsprodukte werden ebenfalls bei Abwesenheit von Reduktionsmitteln gebildet. Des Weiteren ist zu beachten, dass 10-CHO-H₄folat beim Erhitzen ausschließlich zum 5-CHO-H₄folat isomerisiert. Überdies konnte eine Oxidation zur stabilen 10-CHO-PteGlu über das Intermediat 10-CHO-H₂folat nachgewiesen werden. [Baggott 2000; Jägerstad und Jastrebova 2013]

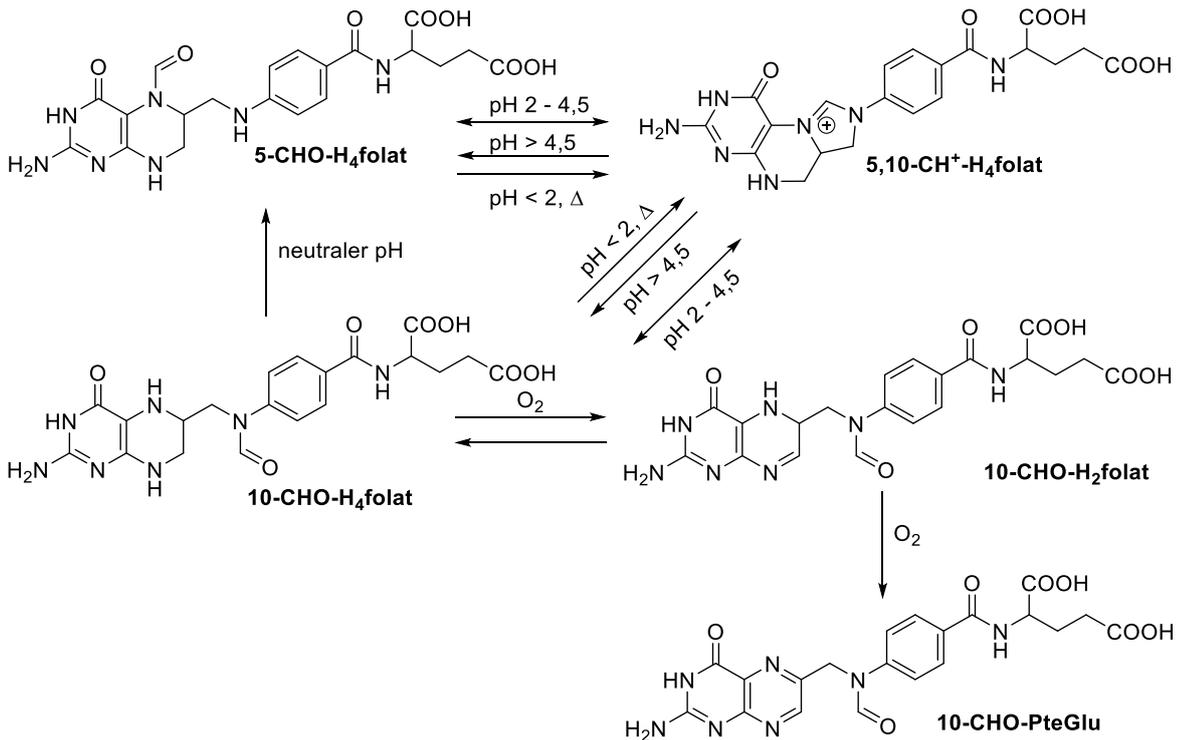


Abbildung 2.3 Interkonversion von 5-CHO-H₄folat, 5,10-CH⁺-H₄folat und 10-CHO-H₄folat nach Jägerstad und Jastrebova [2013] und Gmelch et al. [2020] im pH Bereich von pH 4 bis pH 7 und unter Verwendung von Antioxidationsmitteln.

Eines der instabilsten Vitamere ist das H₄folat, welches bei Anwesenheit von Antioxidantien sowie unter alkalischen Bedingungen zum 5,10-CH₂-H₄folat umgewandelt wird. Um während der Probenaufarbeitung eine erhöhte Folatstabilität zu gewährleisten, werden üblicherweise die Extraktionspuffer mit Antioxidationsmitteln versetzt. 1 % Ascorbinsäure in Kombination mit 1-2 % Thiolen (Mercaptoethanol, Dithiothreitol oder 2,3-Dimercapto-1-propanol) haben sich hierbei als am effektivsten herausgestellt. [Jastrebova et al. 2013] Die Thiole dienen dabei der Entfernung des aus der Ascorbinsäure während der Probenaufarbeitung gebildeten Formaldehyds. [Brouwer et al. 2007] Hauptabbauprodukte des relativ labilen H₄folates sind unter sauren Bedingungen *p*-Aminobenzoylglutamat sowie Dihydropterin, welches über 6-Hydroxytetrahydropterin weiter zum Xanthopterin oxidiert wird. [Reed und Archer 1980; Delchier et al. 2016] Im neutralen Milieu wurden Dihydroxanthopterin beziehungsweise unter zusätzlicher

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

Hitzeeinwirkung 6-Formyldihydropterin als Hauptabbauprodukte identifiziert. [Chippel und Scrimgeour 1970]

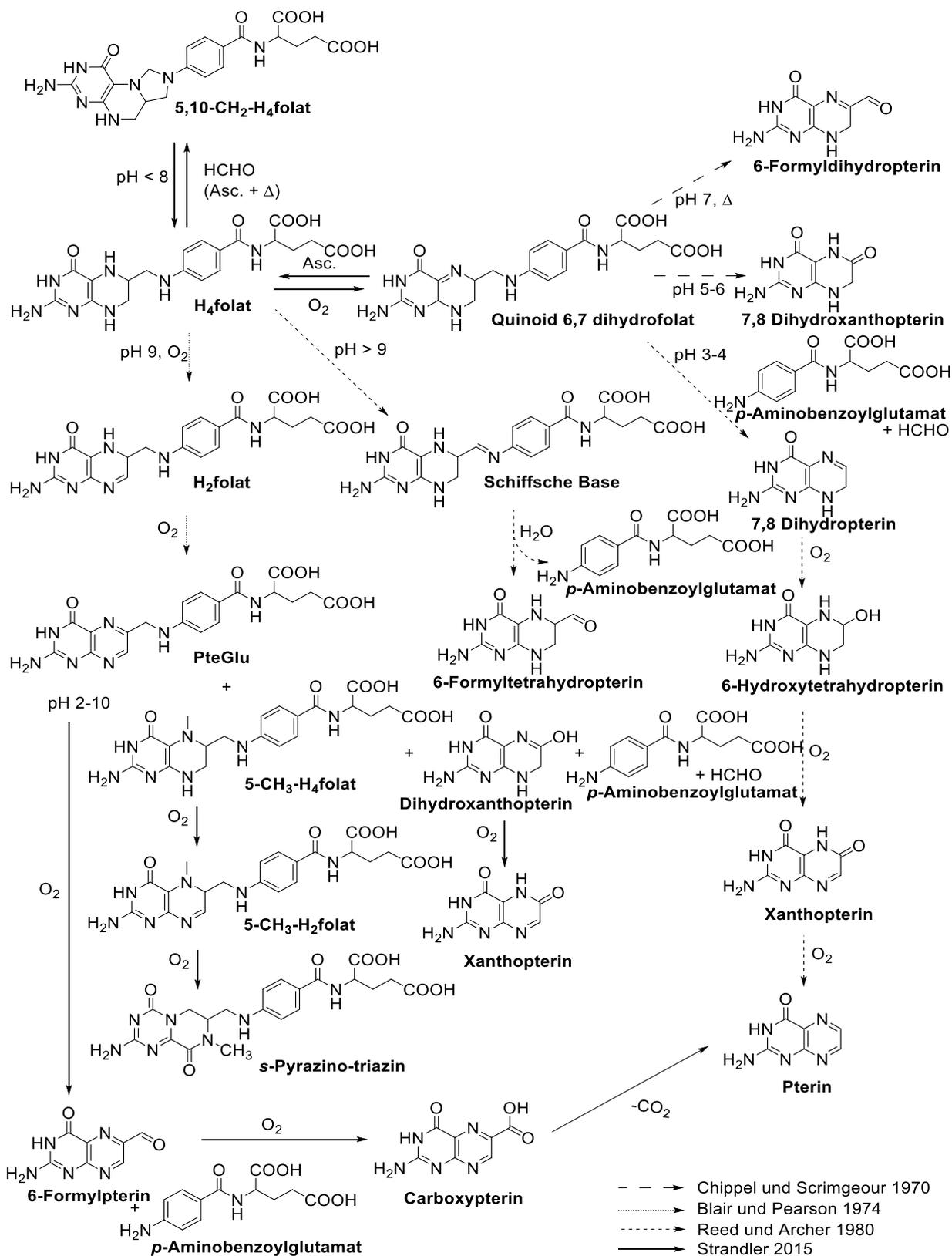


Abbildung 2.4 Interkonversions- und Abbaureaktionen verschiedener Folatvitamere nach Chippel und Scrimgeour [1970], Blair und Pearson [1974], Reed und Archer [1980], Strandler et al. [2015] und Delchier et al. [2016].

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

Bei pH-Werten über pH 9 wird H₄folat nach Hydratisierung der intermediär gebildeten Schiff'schen Base zum 6-Formyltetrahydropterin abgebaut. [Reed und Archer 1980] Andererseits konnte eine Oxidation zum H₂folat, gefolgt von einer weiteren Oxidation zur Pteroylglutaminsäure sowie eine Methylierung zum 5-CH₃-H₄folat beobachtet werden. PteGlu kann davon ausgehend über 6-Formylpterin und Carboxypterin zum Pterin weiteroxidiert werden. 5-CH₃-H₄folat andererseits kann über 5-CH₃-H₂folat zum Pyrazino-s-triazin (MeFox) oxidiert werden. Zudem kann eine Oxidation zum 4-OH-5-CH₃-H₄folat erfolgen, wie in Abbildung 2.5 veranschaulicht wird. [Gapski et al. 1971; Off et al. 2005; Fazili und Pfeiffer 2013; Strandler et al. 2015; Ringling und Rychlik 2017]

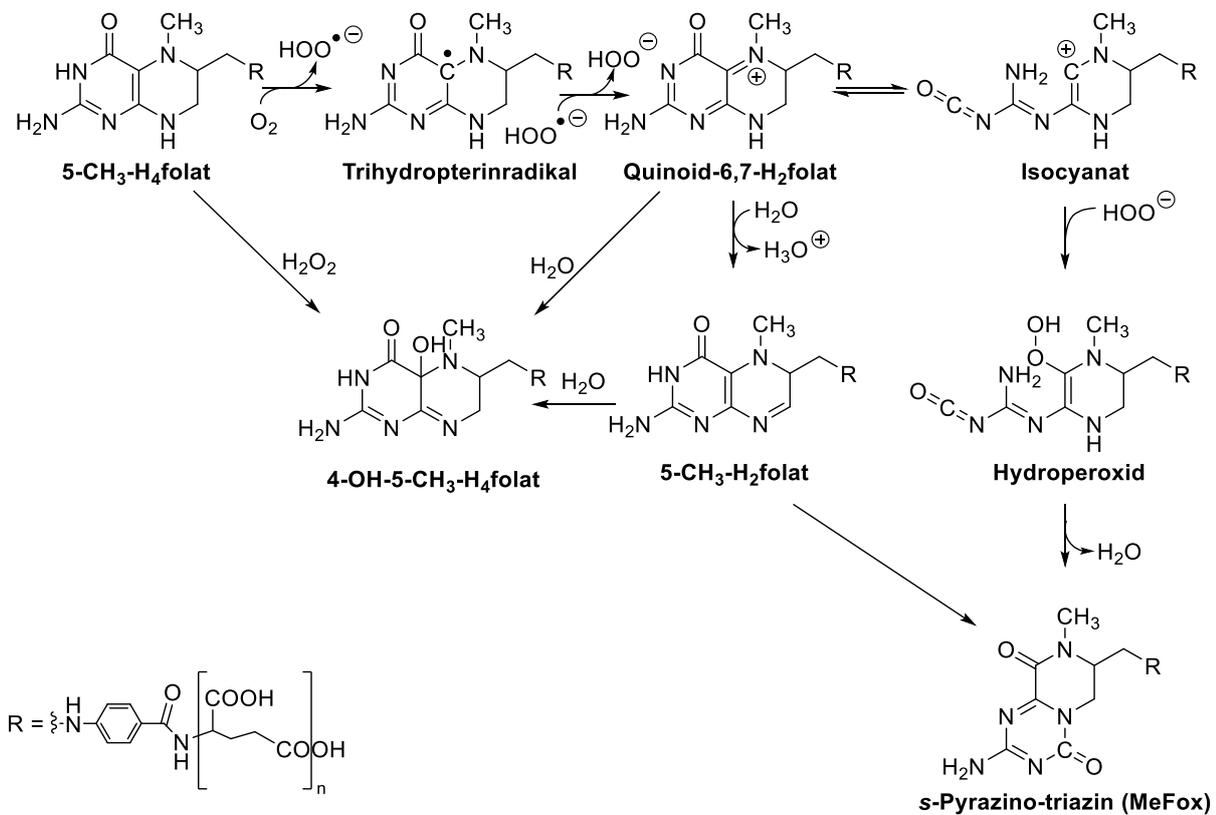


Abbildung 2.5 Oxidationsreaktionen von 5-CH₃-H₄folat unter Bildung von s-Pyrazino-triazin (MeFox) nach Blair und Pearson [1974], Reed und Archer [1980] und Delchier et al. [2016].

2.2 Vorkommen und Biosynthese der Folate

Folate können von Pilzen, Prokaryonten, einigen Mikroorganismen sowie Pflanzen *de novo* gebildet werden, wohingegen Eukaryonten für gewöhnlich diese Fähigkeit nicht besitzen. Eukaryonten besitzen dagegen ein membrangesteuertes aktives Transportsystem für die Aufnahme von Folaten und sind auf die exogene Zufuhr angewiesen. [Hanson und Gregory 2011]

Die Folatbiosynthese gliedert sich analog zur Grundstruktur (vgl. Abbildung 2.1) in drei Teilbiosynthesewege, welche teilweise in verschiedenen Zellkompartimenten stattfinden. So werden die Pterine aus Guanosintriphosphat (GTP) im Cytosol gebildet. pABS wird synthetisiert aus Chorismat, welches aus dem Shikimisäureweg stammt. Während in Eukaryonten diese Biosynthese ebenfalls im Cytosol stattfindet, wird in Pflanzenzellen pABS in Plastiden synthetisiert. Die Folatsynthese aus Pterin, pABS und Glutaminsäure findet letztlich in den Mitochondrien statt. [Rebeille et al. 2006; Hanson und Gregory 2011] Abbildung 2.6 zeigt schematisch die einzelnen Schritte des Biosyntheseweges auf.

Bereits in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden erste Schritte zur Aufdeckung der Folatbiosynthese erreicht. So konnte Albert [1957] durch Inkubation von Purinen mit 1,2-Dicarbonylverbindungen bei 37 °C beweisen, dass Purine in Pteridine umgewandelt werden können, welche als biosynthetische Vorläufer dienen. Krumdieck et al. [1966] konnte durch Markierungsexperimente die Kohlenstoffatome an Position C⁶, C⁷ und C⁹ in Folaten den Kohlenstoffatomen C², C¹ beziehungsweise C³ in Ribose zuordnen. Des Weiteren konnte durch Arbeiten von Weisman und Brown [1964] 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin (6-CH₂OH-H₂pterin) als Vorläufer von 7,8-Dihydrofolat identifiziert werden. Arbeiten von Burg und Brown [1968] beziehungsweise von Jones und Brown [1967] lieferten letztlich entscheidende Informationen für die Postulierung der Folatbiosynthese. So konnte gezeigt werden, dass GTP enzymatisch zum 7,8-Dihydroneopterin-3'-triphosphat (H₂-neopterin-P₃) hydrolysiert wird. Nach hydrolytischer Öffnung des Imidazolringes, Formiatabspaltung sowie einer Amadori-Umlagerung kann der Ringschluss zum H₂neopterin-P₃ erfolgen. Die enzymatische Dephosphorylierung vom H₂neopterin-P₃ zum 7,8-Dihydroneopterin (H₂neopterin) erfolgt in zwei Schritten. H₂neopterin-P₃ wird zunächst zum 7,8-Dihydroneopterinphosphat (H₂-neopterin-P) umgewandelt, welches anschließend zum H₂neopterin dephosphoryliert wird. [Suzuki und Brown 1974]

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

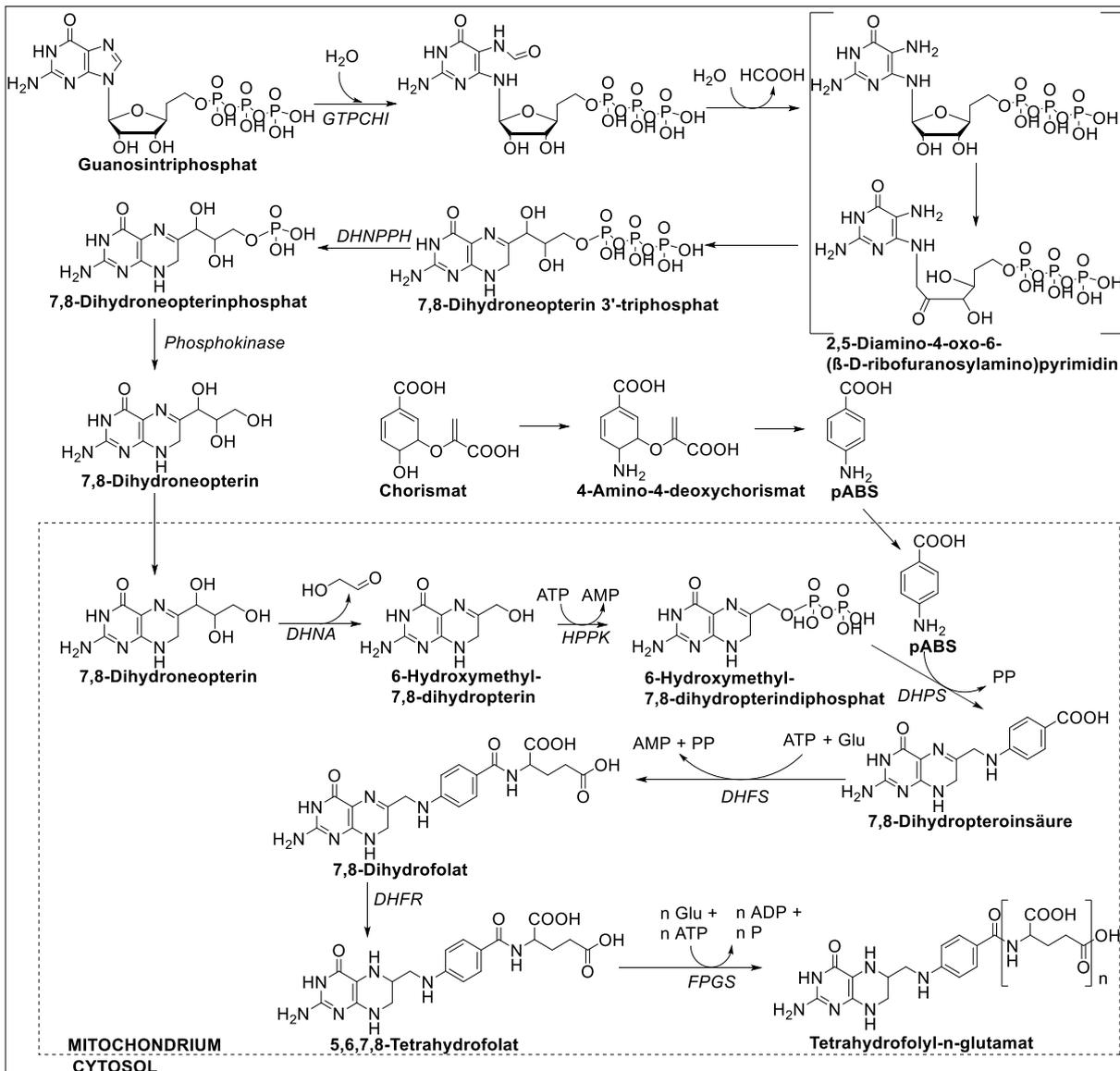


Abbildung 2.6 Biosynthese von Folate in prokaryontischen Zellen.

GTPCHI = Guanosintriphosphat Cyclohydrolase I, DHNPPH = Dihydroneopterin-triphosphat Diphosphohydrolase, DHNA = Dihydroneopterin Aldolase, HPPK = Dihydroxymethyl-dihydropterin Pyrophosphokinase, DHPS = Dihydropterinsäure Synthase, DHFS = Dihydrofolatsynthetase, DHFR = Dihydrofolatreduktase, FPGS = Folpolyglutamatsynthetase.

Die weitere Biosynthese der Folate findet in den Mitochondrien der Zellen statt. Jones und Brown [1967] konnten zeigen, dass dort vom H₂neopterin zunächst die Seitenkette abgespalten wird unter Entstehung von 6-CH₂OH-H₂pterin und Glycolaldehyd. 6-CH₂OH-H₂pterin wird anschließend unter ATP-Verbrauch (Adenosintriphosphat) aktiviert zum 6-CH₂OH-H₂pterindiphosphat. Nach Kombination mit pABS wird so die 7,8-Dihydropterinsäure gebildet. [Richey und Brown 1969] Die Addition von Glutaminsäure letztlich wird katalysiert von den Enzymen Dihydrofolatsynthetase (DHFS) sowie Folpolyglutamatsynthetase (FPGS). DHFS ist nur in folatproduzierenden Organismen aktiv und addiert Glutaminsäure an die 7,8-Dihydropterinsäure, sodass H₂folat entsteht. [Griffin und Brown 1964] Nach Reduktion mittels Dihydro-

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

folatreduktase (DHFR) entsteht H₄folat, welches als Vorläufer weiterer Folatvitamere im Organismus dient. Die Addition weiterer Glutaminsäureeinheiten an das H₄folat wird schließlich katalysiert von FPGS, welche auch in eukaryontischen Zellen aktiv ist. [Iwai et al. 1977]

2.3 Ernährungsphysiologische Bedeutung der Folate

Die ernährungsphysiologische Bedeutung der Folate für den menschlichen Organismus soll im Nachfolgenden hinsichtlich verschiedener Faktoren beleuchtet werden.

2.3.1 Absorption, Akkumulation und Exkretion im menschlichen Organismus

Die Absorption von Folaten in den menschlichen Organismus erfolgt hauptsächlich im Dünndarm und dort speziell im Duodenum und Jejunum. [Hoffbrand 1971] Durch Markierungsexperimente mit Infusion von Tritium-markierter PteGlu sowie ¹⁴C PteGlu konnte Halsted [1989] nachweisen, dass für die Absorption von Folaten zunächst eine Hydrolyse der in der Nahrung primär vorkommenden Polyglutamate zu den Monoglutamaten nötig ist. Diese Hydrolyse wird katalysiert von der Glutamatcarboxypeptidase II (GCPII), welche im proximalen Teil der Bürstensaummembran des Jejunums lokalisiert ist. [Chandler et al. 1986; Halsted 1989] Die sich daran anschließende Absorption der Monoglutamate über die intestinale Bürstensaummembran erfolgt hauptsächlich über den protonengekoppelten Folattransporter (proton coupled folate transporter, PCFT). [Qiu et al. 2006]

Bevor die absorbierten Monoglutamate in die hepatische Portalvene geschleust werden, findet in der Darmmucosa eine Konversion der reduzierten Folate zum 5-CH₃-H₄folat statt, da nur dies die metabolisch aktive Folatform darstellt. Folsäure dagegen wird nur langsam reduziert zum H₄folat und anschließend methyliert. Daher findet der Haupttransport von PteGlu über passive Diffusion in die Portalvene statt. [Finglas und Wright 2002; Wright et al. 2005; Patanwala et al. 2014] Der Export von Folaten aus den Mucosazellen in die Portalvene wird durch sogenannte multidrug resistance-associated proteins (MRP) gesteuert, welche an der basolateralen Membran exprimiert werden. [Zhao et al. 2011; Patanwala et al. 2014]

Nach Absorption in die portale Zirkulation wird ein Großteil der Folate von der Leber aufgenommen. Es wird angenommen, dass der Haupttransport auch hier PCFT-vermittelt stattfindet. [Horne et al. 1993; Zhao et al. 2009] Von der Leber absorbierte Folate unterliegen verschiedenen Funktionalitäten. Zum einen können die absorbierten Monoglutamate mittels γ -Glutamathydrolase (GGH) zu Polyglutamaten konvertiert und dort ab einer Länge von drei Glutamatresten gespeichert werden. [Finglas und Wright 2002] Andererseits wird 5-CH₃-H₄folat durch Freisetzung von der Leber in die Galle in die enterohepatische Zirkulation

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

geschleust und eine Reabsorption im Dünndarm kann erfolgen. Zudem wird 5-CH₃-H₄folat von der Leber ausgehend über die Lebervenen ins Blut abgegeben, wodurch eine Zirkulation in verschiedene periphere Gewebe ermöglicht wird. [Zhao et al. 2009; Zhao et al. 2011]

Nach Eintreten der Folate ins Cytosol der verschiedenen Gewebezellen werden diese entweder von Enzymen des C₁-Metabolismus zu anderen Folatderivaten metabolisiert oder mittels Polyglutamatsynthetase in Polyglutamate umgewandelt. Polyglutamate stellen zum einen die aktive Coenzymform dar und sind nötig für die Aufrechterhaltung eines normalen C₁-Metabolismus, auf welchen im nachfolgenden Abschnitt detailliert eingegangen wird. Zum anderen dienen sie der intrazellulären Speicherung, welche ab einer Länge von drei Glutamylresten ermöglicht wird. [Schirch und Strong 1989; Shane 1989] Innerhalb der Zelle konkurrieren mitochondrielle Folattransporter mit cytosolischer FPGS um die eindringenden Monoglutamate als Substrat. Polyglutamylierung von Monoglutamaten durch FPGS wird hierbei durch Binden intrazellulär gebildeter Polyglutamate an folatbindende Proteine (FBPs) begünstigt, sodass ein Großteil der eingeschleusten Monoglutamate metabolisiert werden kann. So liegt unter physiologischen Bedingungen fast alles an intrazellulärem Folat in an FBPs gebundener Form vor. [Shane 2001]

Die Menge an gespeichertem Folat im gesamten menschlichen Organismus wird auf 10 – 100 mg mit Speicherung von 3 – 16 mg in der Leber geschätzt. [Hoppner und Lampi 1980; Lin et al. 2004] Hauptumwandlung von Folaten erfolgt mit einer Halbwertszeit von 100 – 200 Tagen über Katabolismus zu entsprechenden Abbauprodukten. [Suh et al. 2001; Lin et al. 2004] Ein Großteil des Umsatzes erfolgt über Hydrolyse zu den entsprechenden Monoglutamaten gefolgt von Zirkulation und Reabsorption im Dünndarm oder dem proximalen renalen Tubulus. Somit werden lediglich etwa 5 % der absorbierten Folate ausgeschieden. Hauptausscheidungsprodukte sind Pterinderivate sowie N-Acetamido-benzoylglutamate, welche durch oxidative Spaltung der C⁹-N¹⁰-Bindung und anschließende enzymatische Metabolisierung gebildet werden. [Murphy et al. 1976]

2.3.2 Folatstoffwechsel im Organismus

Folate sind ubiquitär in allen Zellen und Organismen vertreten und spielen eine entscheidende Rolle bei verschiedenen biochemischen Reaktionen. So ist H₄folat als Coenzym bei der Aktivierung und dem Transfer von C₁-Einheiten beteiligt. [Schirch und Strong 1989; Appling 1991; Pfeiffer et al. 1994; Iyer und Tomar 2009; Tibbetts und Appling 2010] Der Transfer von Einkohlenstoffeinheiten spielt eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von Nucleinsäuren sowie Proteinen oder dem Metabolismus von Aminosäuren. Somit werden Folate essentiell benötigt

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

für die Synthese von DNS (Desoxyribonukleinsäure) und RNS (Ribonukleinsäure) im Zuge der Zellteilung und des Zellwachstums. [Wright et al. 2005; Jennings und Willis 2015] Zudem sind Folate verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Methioninzyklus durch Remethylierung von Homocystein zu Methionin. Dieses wiederum dient als Substrat für S-Adenosylmethionin (Ado-Met), welches als Methylgruppendonor im Organismus fungiert und Methylgruppen unter anderem auf DNS, RNS, Neurotransmitter, Proteine und Phospholipide überträgt. Das hierbei gebildete Adenosyl-Homocystein (AdoHCy) wird anschließend zu Homocystein (HCy) regeneriert, sodass eine erneute Remethylierung stattfinden kann. [Crider et al. 2012]

Die Diversität der genannten C₁-Transferreaktionen ist darauf zurückzuführen, dass das Coenzym H₄folat C₁-Einheiten an verschiedenen Stellen (üblicherweise an Position N⁵ und/oder N¹⁰ im Molekül) sowie in verschiedenen Oxidationsstufen transportieren kann. [Pfeiffer et al. 1994; Tibbetts und Appling 2010] Wichtige Regulatoren des C₁-Metabolismus stellen hierbei die Polyglutamatformen der Folatcoenzyme dar. Die hohe Affinität von Polyglutamaten zu Enzymen des C₁-Metabolismus ist auf starke Interaktion zwischen negativ geladenen Carboxylgruppen des Polyglutamatrestes und positiv geladenen Seitenketten der folatbindenden Proteine zurückzuführen. Die starke Bindung zwischen Cofaktor und Enzym resultiert somit in einer erhöhten Effektivität der katalysierten Reaktion sowie erhöhtem Schutz des Moleküls gegen oxidativen Abbau. [McGuire und Coward 1984; Schirch und Strong 1989; Appling 1991; Scott et al. 2000; Mehrshahi et al. 2010]

Im menschlichen Organismus findet eine Kompartimentierung der Folatcoenzyme sowie der folatabhängigen Enzyme je nach Aufgabe in dem jeweiligen zellulären Organell statt, welche übersichtsweise in Abbildung 2.7 dargestellt wird. [Schirch und Strong 1989; Appling 1991] Den Folaten kommt in den verschiedenen Organellen unterschiedliche Bedeutung zu. Allerdings sind die Kompartimente metabolisch durch den transmembranen Transport von C₁-Einheiten in Form von Serin, Glycin und Formiat miteinander verknüpft. [Shane 1989; Appling 1991; Cherest et al. 2000]

Im Cytoplasma sind Folatcoenzyme an der Synthese von Purinen und Thymidylat, der Interkonversion von Serin und Glycin sowie der Remethylierung von Homocystein zu Methionin beteiligt. Essentiell für die Purinbiosynthese ist hierbei die Bildung von 10-CHO-H₄folat aus H₄folat und Formiat. [Appling 1991; Fox und Stover 2008] 10-CHO-H₄folat kann zudem reversibel über das Intermediat 5,10-CH⁺-H₄folat zum 5,10-CH₂-H₄folat reduziert werden. [Tan et al. 1977] Alternativ wird 5,10-CH₂-H₄folat in einer reversiblen, Pyridoxalphosphat (PLP) abhängigen Reaktion durch Übertragung des Kohlenstoffatoms C³ von Serin auf H₄folat unter Bildung von Glycin und 5,10-CH₂-H₄folat gebildet. [Scheer et al. 2005] 5,10-CH₂-H₄folat stellt die Verbindungsstelle zwischen der Nukleotidbiosynthese einerseits und Methylierungsreaktionen

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

andererseits dar. So dient dieses Vitamer zum einen sowohl als Cofaktor als auch als Reduktionsmittel bei der Synthese von deoxyThymidin Monophosphat (dTMP) aus deoxyUridin Monophosphat (dUMP). Diese Reaktion ist die einzige Quelle zur *de novo* Generierung der Pyrimidinbase dTMP, einem wichtigen Baustein der DNS. [Trinh et al. 2002] Zum anderen dient die Reduktion von 5,10-CH₂-H₄folat der Bereitstellung von C₁-Einheiten für die Methioninbiosynthese. Durch diese NADPH-abhängige (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) Reduktion wird 5-CH₃-H₄folat generiert. [Wagner 2001] Dieses stellt den nötigen Cofaktor für die Zink- und Cobalamin-abhängige Remethylierung von Homocystein zu Methionin dar, wodurch eine Akkumulation von HCy in der Zelle verhindert und zugleich der Cofaktor H₄folat regeneriert wird. [Appling 1991; Shane 2008; Crider et al. 2012]

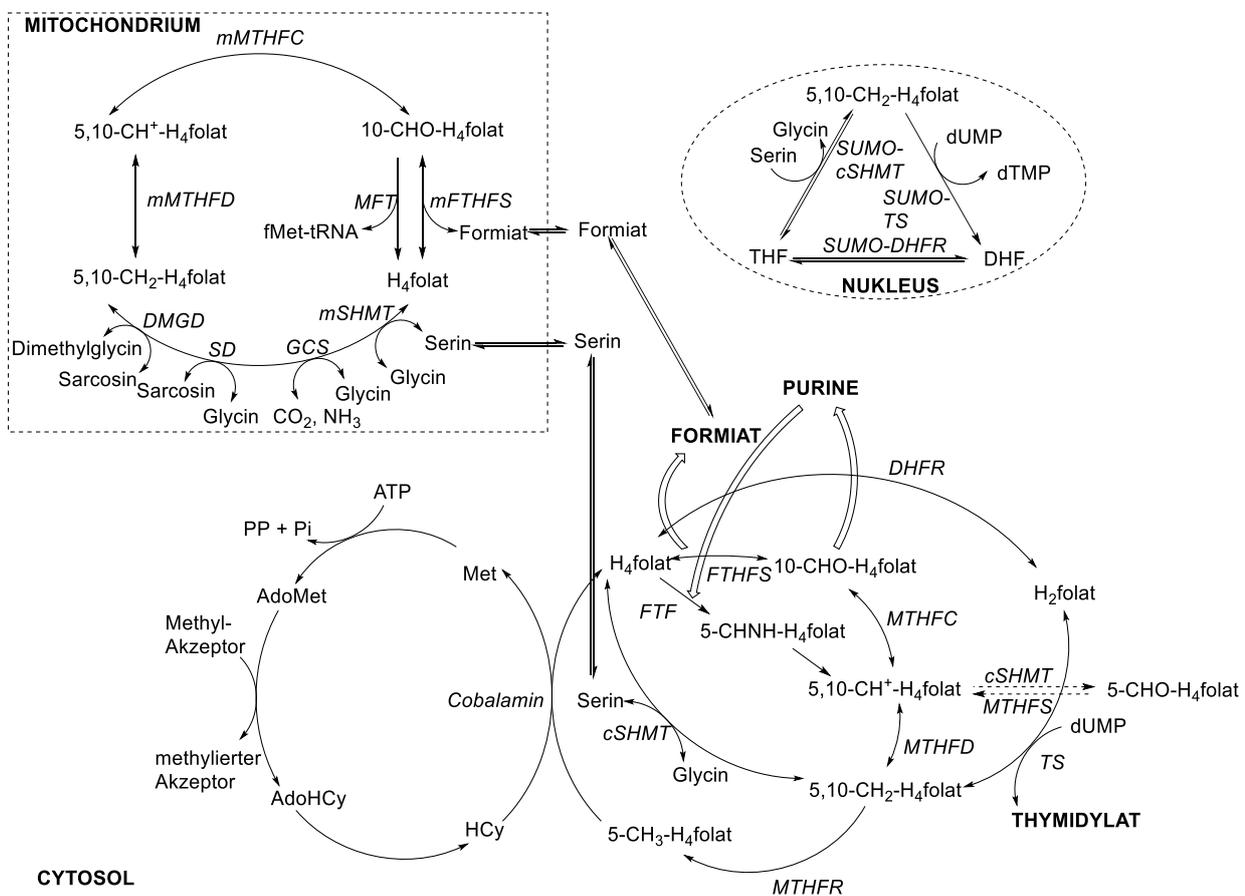


Abbildung 2.7 Kompartimentierung des C₁-Metabolismus in menschlichen Zellen nach Fox und Stover [2008] und Stover [2010].

(m)MTHFD = (mitochondrielle) Methylen tetrahydrofolat Dehydrogenase, (m)MTHFC = (mitochondrielle) Methylen tetrahydrofolat Cyclohydrolase, MFT = Methionyl-tRNA Formyltransferase, (m)SHMT = (mitochondrielle) Serin Hydroxymethyltransferase, GCS = Glycin Cleavage System, SD = Sarcosin Dehydrogenase, DMGD = Dimethylglycin Dehydrogenase, SUMO = small ubiquitin-like modifier, DHFR = Dihydrofolatreduktase, FTHFS = Formyltetrahydrofolat Synthetase, FTF = Formimidotransferase, MTHFS = Methylen tetrahydrofolat Synthetase, MTHFR = Methylen tetrahydrofolat Reduktase, TS = Thymidylatsynthetase.

In den Mitochondrien hingegen wird der C₁-Metabolismus in die oxidative Richtung hin zur Formiatsynthese getrieben. Diese wird für die Formylierung der Methionin-beladenen tRNS (Transport RNS) benötigt, was die Proteinbiosynthese in Mitochondrien initiiert. [Bianchetti et

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

al. 1977; Blakley und Benkovic 1984; Appling 1991; Fox und Stover 2008] Zudem werden C₁-Einheiten wie Formiat und Glycin generiert, welche dem C₁-Metabolismus im Cytoplasma zur Verfügung gestellt werden. [McNeil et al. 1996; Kastanos et al. 1997] Über den Folatmetabolismus im Nukleus ist bislang wenig bekannt. Allerdings wurde auch hier Thymidylatsynthese nachgewiesen. [Fox und Stover 2008]

2.3.3 Bioverfügbarkeit

Bioverfügbarkeit von Nährstoffen wird als der Anteil des mit der Nahrung aufgenommenen jeweiligen Nährstoffes definiert, welcher absorbiert und metabolischen Prozessen oder der intrazellulären Speicherung zur Verfügung gestellt wird. Im Gegensatz dazu wird die Biozugänglichkeit als derjenige Anteil des mit der Nahrung aufgenommenen Nährstoffes definiert, welcher im Darm von der Nahrungsmittelmatrix freigesetzt und somit für intestinale Absorption verfügbar gemacht wird. [Jackson 1997; Fernández-García et al. 2009] Im Allgemeinen konnte gezeigt werden, dass Folate aus natürlichen Quellen im Gegensatz zur relativ stabilen, synthetischen Folsäure eine um 10 – 98 % reduzierte Bioverfügbarkeit aufweisen. [Castorena-Torres et al. 2014; Mönch et al. 2015; Saini et al. 2016a] Die Ursache hierfür liegt an präabsorptiven und postabsorptiven Faktoren. Zu den präabsorptiven Faktoren zählen etwa die unterschiedliche Länge der Polyglutamylkette [Melse-Boonstra et al. 2002], die Art des aufgenommenen Folatvitamers [Winkels et al. 2007] oder der pH-Wert des Darmlumens [Ng et al. 2008]. Postabsorptive Faktoren dagegen sind beispielsweise genetische Polymorphismen von Genen (etwa 484 A → G des GPCII Gens) [Andersson und Oeste 1992], welche Folat-transportierende Proteine codieren [Saini et al. 2016b; VanderMeer et al. 2016]. Allerdings konnten hierbei zwar leicht erhöhte HCy-Level im Blut, jedoch bislang keine signifikanten Beeinflussungen der Folatbioverfügbarkeit im Menschen beobachtet werden. [Halsted et al. 2007]

Wie bereits unter Punkt 2.3.1 erläutert, müssen mit der Nahrung aufgenommene Polyglutamate zunächst durch GPCII-Aktivität zu Monoglutamaten hydrolysiert werden, um von den Epithelzellen des Darmes absorbiert werden zu können. Faktoren, welche die GPCII-Aktivität inhibieren, haben demnach eine verminderte Aufnahme von Monoglutamaten zur Folge. Tamura et al. [1976] konnten zeigen, dass ein Absenken des intestinalen pH-Wertes die Aufnahme von Polyglutamaten drastisch reduziert im Vergleich zu optimalen pH-Bedingungen von pH 6,8. Des Weiteren können sich Nahrungsmittelbestandteile nachteilig auf die GPCII-Aktivität auswirken. So konnte gezeigt werden, dass organische Säuren wie Citrat, Malat oder Phytat [Wei et al. 1996] ebenso die GPCII inhibieren wie etwa Nukleinsäuren in Hefen [Hoffbrand und Weir 2001] oder die Aufnahme von Ethanol [Halsted et al. 2002]. Einen weiteren Einflussfaktor im Darmlumen stellt die Nahrungsmittelmatrix an sich dar. Meist liegen

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

Folate proteingebunden in der Nahrung vor. Verschiedene Studien konnten am Beispiel Spinat zeigen, dass ein technologisches Zerkleinern des Lebensmittels vor dem Verzehr im Vergleich zum Verzehr ganzer Blätter zu deutlich besserer Bioverfügbarkeit von den darin enthaltenen Folaten führt. [Hof, van het, Karin H. et al. 1999; Castenmiller et al. 2000] Zum einen wird davon ausgegangen, dass durch die Prozessierung kovalent gebundene Folate freigesetzt werden, zum anderen werden durch die Behandlung vermutlich Polyglutamate durch endogene GGH in Monoglutamate umgewandelt. [Munyaka et al. 2010; Wang et al. 2011] Allerdings können durch weniger schonende Prozessierung wie beispielsweise Hochdruckbehandlung im Vergleich zum Blanchieren auch Folatverluste bis zu einer Höhe von 80 % [Melse-Boonstra et al. 2002] respektive 94 % [Bureau et al. 2015] verzeichnet werden. Auch während der Kühlung, dem Blanchieren oder Dämpfen konnten Folatverluste zwischen 8 % und 28 % festgestellt werden. [Melse-Boonstra et al. 2002] Allgemein kann die unvollständige Bioverfügbarkeit natürlicher Folate unter anderem mit der geringen Stabilität im Darmlumen nach der Aufnahme mittels der Nahrung erklärt werden. [Seyoum und Selhub 1998a] Andererseits zeigen manche Nahrungsmittelbestandteile wie etwa Ascorbinsäure oder FBPs in Milch und Milchprodukten folatstabilisierende Wirkung. [Andersson und Oeste 1992]

2.3.4 Folgen eines Folatmangels

Durch äußere Faktoren hervorgerufene Verluste von Nahrungsmittelfolaten führen dazu, dass lediglich 86 % der deutschen Bevölkerung adäquat mit Folat versorgt sind. Dies ist laut der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) [Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. 2017] ab einer Serumfolatkonzentration von $\geq 4,4$ ng/mL der Fall. Eine Folatunterversorgung kann unterschiedliche Ausmaße annehmen. Generell lassen sich die beobachteten Effekte auf zwei Hauptfunktionen der Folate im Organismus zurückführen: die Purin- und Pyrimidinsynthese und somit die Synthese von RNS und DNS einerseits und die Aufrechterhaltung des Methioninzyklus durch Remethylierung von HCy zu Methionin andererseits. [Fox und Stover 2008; Iyer und Tomar 2009; Saini et al. 2016b] Zu erwähnen ist hierbei, dass für den Ablauf des Methioninzyklus sowohl ausreichende Folat- als auch B₁₂-Konzentrationen vonnöten sind. Daher sind viele adverse Folgen nicht zwingend auf einen Folatmangel, sondern vielmehr auf eine unzureichende Versorgung mit einem der beiden Vitamine zurückzuführen.

Ein kurzzeitiger Folatmangel äußert sich auf Grund von eingeschränkter DNS-Synthese und einer Verlängerung der Zellteilungsphase in Form von vergrößerten roten Blutkörperchen mit verringertem Hämoglobingehalt, sogenannter megaloblastärer Anämie. [Iyer und Tomar 2009]

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

Verminderte Synthese von Thymidylat führt zudem zum fälschlichen Einbau von Uracil in die DNS. [Jill et al. 1994; Duthie et al. 2000; Crider et al. 2011] Dies führt zu Einfach- und Doppelstrangbrüchen und resultiert in chromosomalen Schäden und einer erhöhten Prävalenz der Onkogenese. [Kim et al. 1997]

Durch einen Folatmangel hervorgerufene, verminderte Remethylierung von HCy durch Mangel des Methylgruppenspenders 5-CH₃-H₄folat resultiert zudem in einer Akkumulation von HCy. Diese dadurch ausgelöste Hyperhomocysteinämie wurde in vielen Studien assoziiert mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen. [Pancharuniti et al. 1994; Morrison et al. 1996; Robinson et al. 1998] Hyperhomocysteinämie als Folge einer verringerten Remethylierung zu Methionin wird nicht nur als Risikofaktor für kardiovaskuläre, sondern auch peripher vaskuläre und cerebrovaskuläre Erkrankungen angesehen. [Cook et al. 2002; McCully 2007] So werden erhöhte HCy Level mit Neurodegeneration und Neurotoxizität in Verbindung gebracht. [Ho et al. 2003; Iyer und Tomar 2009] Eine Störung von Methylierungsreaktionen auf Grund eines nicht ablaufenden Methioninzyklus resultiert unter anderem in einer unzureichenden DNS-Methylierung. Diese ungenügende Methylierung wird mit neuronalen Plastizitätsänderungen und vermehrten extrazellulären Ablagerungen in bestimmten Gehirnregionen in Verbindung gebracht. [Bottiglieri und Reynold 2010] Die unter anderem so hervorgerufenen Plaques werden vermehrt in Patienten gefunden, welche unter der Alzheimer'schen Krankheit leiden. [West et al. 1995]

Bereits früh wurde ein Zusammenhang zwischen einem mütterlichen Folatmangel und dem Auftreten von Neuralrohrdefekten in Neugeborenen durch unzureichenden Verschluss des Neuralrohres in den ersten Wochen der Schwangerschaft erkannt. [Dansky et al. 1987] Speziell in der Schwangerschaft finden vermehrt C₁-Transferreaktionen wie Methylierungen sowie *de novo* Nukleotidsynthese statt. Daher steigt währenddessen der Folatbedarf signifikant an. [Iyer und Tomar 2009; Ciappio und Mason 2010] Durch Steigerung der mütterlichen Folatezufuhr konnte das Auftreten von Neuralrohrdefekten bereits in den 1990er Jahren nachweislich gesenkt werden. [Milunsky et al. 1989; Wald et al. 1991; Werler et al. 1993] Daher wurde in einigen Ländern wie den USA, Kanada oder Australien eine verpflichtende Anreicherung mit synthetischer Folsäure für die gesamte Bevölkerung eingeführt. Bereits 1998 wurde beispielsweise in den USA eine Zwangsanreicherung von Getreide(mehl) mit 140 µg Folsäure/100 g durchgeführt [Department of Health and Human Services 1996], was zu einer Reduktion von Neuralrohrdefekten um 21 – 34 % führte. [Honein et al. 2001]

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

2.3.5 Mögliche Risiken einer Folatsupplementierung

Zwar konnte durch Zwangsanreicherungen von Lebensmitteln mit Folat eine deutliche Reduktion des Auftretens von Neuralrohrdefekten [Honein et al. 2001; Canfield et al. 2005] oder Schlaganfällen beobachtet [Yang et al. 2006] werden, allerdings sind diese Zwangsanreicherungen mitunter nicht nur positiv zu bewerten.

Wie bereits angemerkt, sind manche Risiken und Krankheiten nicht nur einem Folatmangel zuzuschreiben, sondern spiegeln lediglich ein gestörtes Zusammenspiel von Folat und Vitamin B₁₂ wider. Wird nun durch Supplementierung mit Folsäure der C₁-Metabolismus weiterhin aufrechterhalten, kann das als Marker eines B₁₂-Mangels herangezogene Krankheitsbild der megaloblastären Anämie nicht mehr diagnostiziert werden. Die supplementierte Folsäure wird nach Reduktion zum H₄folat in den Metabolismus eingeschleust und steht somit intrazellulären Interkonvertierungsreaktionen zur Verfügung. Demnach können weiterhin Purin- und Pyrimidinnukleotide synthetisiert werden und eine normale Zellteilung stattfinden. Dennoch kann weiterhin ein B₁₂-Mangel vorliegen, welcher zur Akkumulation von HCy und den damit verbundenen neurogenerativen Schäden führt. [Brouwer und Verhoef 2007; Molloy 2010; Green 2017] Allerdings wird für eine akkurate Einschätzung des B₁₂-Status mittlerweile meist direkt der Cobalamin-Gehalt im Blut bestimmt. [Green 2017]

Auch hinsichtlich einer Reduktion des Tumorrisikos ist eine Folatsupplementierung kritisch zu betrachten. Tumorzellen unterscheiden sich von anderen Zellen unter anderem in der vermehrten Zellteilungsrate. Steht den Zellen vermehrt Folat zur Verfügung, wird diese Rate zusätzlich gesteigert, da eine ausreichende Folatzufuhr die Grundlage einer funktionierenden Zellteilung darstellt. [Mason et al. 2007] Die vermehrte Diagnose von Darm-, Brust-, Lungen-, Pankreas- oder Speiseröhrenkrebs in Verbindung mit einer Folatsupplementierung untermauern dies. [Stolzenberg-Solomon et al. 2006; Mason et al. 2007] In einigen Modellsystemen mit neoplastischen Zellen konnte des Weiteren gezeigt werden, dass eine Reduktion der Folatzufuhr mit einer verringerten Tumorgenese korreliert. [Guelpen, van et al. 2006; Stolzenberg-Solomon et al. 2006] Demnach ist speziell in Fällen von bereits existierenden Neoplasten oder der stärkeren Neigung von Zellen zur Tumorgenese von einer übermäßigen Folatsupplementierung abzuraten. Diese negativen Effekte konnten allerdings nur bei Supplementierung mit synthetischer Folsäure und nicht mit dem natürlich vorkommenden 5-CH₃-H₄folat festgestellt werden. [Wien et al. 2012] Als weitere Vorteile einer Supplementierung mit 5-CH₃-H₄folat wären die verringerte Maskierung einer durch Vitamin B₁₂-Mangel ausgelösten megaloblastären Anämie zu nennen. Des Weiteren kann das natürliche Folat im Gegensatz zur synthetischen Folsäure unabhängig von möglicherweise vorliegenden Polymorphismen der Gene, welche

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

DHFR encodieren, metabolisiert werden. Zudem wird somit die Akkumulation von überschüssiger Folsäure in der Blutbahn unterbunden, welche bei Säuglingen mit einer Beeinträchtigung des Immunsystems sowie einer höheren Neigung zur Entwicklung von Atemwegserkrankungen assoziiert wurde. Ob eine Supplementierung mit 5-CH₃-H₄folat das Auftreten von Neuralrohrdefekten im selben Maß reduziert wie eine Folsäuresupplementierung, muss allerdings erst noch in klinischen Langzeitstudien getestet werden. [Obeid et al. 2013; Scaglione und Panzavolta 2014]

2.4 Aktueller Stand der Folatanalytik

Die Folatanalytik unterlag seit ihren Anfängen in den 1940er Jahren [Arcot und Shrestha 2005] stetiger Verbesserung. Es wurde eine Vielzahl verschiedener Verfahren entwickelt, welche nachfolgend kurz erläutert werden. Hauptaugenmerk liegt auf den für diese Arbeit relevanten Techniken.

2.4.1 Probenvorbereitung

Die Extraktion von Folaten aus homogenisierten Probenmatrices beinhaltet üblicherweise einen Erhitzungsschritt. Dieser dient zum einen der Denaturierung von FBP und Enzymen, die andernfalls eine Folatdegradation oder Interkonversionen begünstigen würden. Zudem werden dadurch Strukturproteine präzipitiert, was zur Freisetzung der meist gebunden vorliegenden Folate führt. [Gregory 1989; Arcot und Shrestha 2005] Die Erhitzungstemperaturen reichen von 40 °C [Azevedo et al. 2016] bis zu üblicherweise verwendeten 100 °C [Tamura et al. 1997; Konings 1999; Bagley und Selhub 2000; Pawlosky und Flanagan 2001; Freisleben et al. 2003a; Patring und Jastrebova 2007; Verlinde et al. 2008; Chandra-Hioe et al. 2011]. Die Erhitzungszeit beträgt meist fünf bis zehn Minuten. Da Folate einerseits hitzelabil sind und andererseits unter bestimmten Extraktionsbedingungen vermehrt zu Interkonversionsreaktionen neigen, ist die Zusammensetzung des verwendeten Extraktionspuffers von enormer Bedeutung für reproduzierbare Ergebnisse. Um die Vitamere während des Erhitzungsschrittes zu stabilisieren, wird üblicherweise das Antioxidans Ascorbinsäure in Kombination mit Thiolen wie β -Mercaptoethanol (MCE), Dithiothreitol (DTT) oder 2,3-Dimercapto-1-propanol verwendet. [Lucock, Mark D. et al. 1993; Indrawati et al. 2004; Patring et al. 2005] Bei Abwesenheit von Thiolen würde das während der Oxidation von Ascorbinsäure freigesetzte Formaldehyd Folatinterkonversionen verursachen. [Wilson und Horne 1983] Ein weiterer wichtiger einzustellender Parameter ist der pH-Wert des Extraktionspuffers, welcher für gewöhnlich in Bereichen zwischen pH 5 und pH 7 eingestellt wird. Dies entspricht dem Bereich, in welchem der

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

Großteil der Folatvitamere höchste Stabilitäten aufweist. [Brouwer et al. 2007] Üblicherweise werden Ammoniumacetat- oder Ammoniumformiatpuffer [Pfeiffer et al. 2004; Kirsch et al. 2010; Azevedo et al. 2016], CHES/HEPES-Puffer (N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure/4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure) [Konings 1999; Freisleben et al. 2003a], Phosphatpuffer [Pawlosky und Flanagan 2001; Patring et al. 2005; Camara et al. 2013] oder MES-Puffer (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) [Büttner et al. 2011; Mönch und Rychlik 2012] mit Konzentrationsbereichen zwischen 0,1 bis 0,2 M verwendet.

Die hohe Vielfalt der Folatvitamere auf Grund unterschiedlicher Polyglutamylierungsgrade [Garratt et al. 2005] sowie ein Mangel an authentischen Standards [Selhub 1989] führt dazu, dass mit herkömmlichen Quantifizierungsmethoden meist lediglich Folatgehalte in Proben nach Umwandlung der Polyglutamatvitamere zu den entsprechenden Monoglutamatformen bestimmt werden. [Arcot und Shrestha 2005; Quinlivan et al. 2006] Zur Dekonjugation der Polyglutamate werden hierbei entweder Trienzymbehandlungen oder nur Behandlungen mit Konjugasen angewendet. In den 1990er Jahren wurde berichtet, dass eine Behandlung der Probe mit Folatkonjugasen alleine für eine vollständige Dekonjugation nicht ausreichend ist. Das Verfahren der Wahl war folglich eine Kombination aus Protease-, α -Amylase- und Folatkonjugasebehandlung. [Martin et al. 1990; Tamura et al. 1997; Shrestha et al. 2000] Darauf folgende Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass die für eine vollständige Dekonjugation benötigten Enzyme stark von der Probenmatrix abhängen. So konnte für nicht stärkehaltige Lebensmittelproben gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Hühnerpankreatin und Rattenserum vergleichbare Ergebnisse liefert wie eine Trienzymbehandlung. [Iwatani et al. 2003; Ringling und Rychlik 2017] Es wird vermutet, dass das verwendete Hühnerpankreatin weitere Enzyme wie Amylasen und α -Amylasen besitzt. [Pedersen 1988] Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Enzyme tierischen Ursprungs durch ein rekombinantes Enzym pflanzlichen Ursprungs (GGH aus *Arabidopsis thaliana*) unter Erzielung vergleichbarer Ergebnisse ersetzt werden können. [Ramos-Parra et al. 2013b; Ložnjak et al. 2019]

2.4.2 Probenaufreinigung

Viele Analysemethoden, darunter hauptsächlich die chemisch-instrumentellen Methoden, benötigen einen Aufreinigungs- und Aufkonzentrierungsschritt mittels Festphasenextraktion (SPE, solid phase extraction). Im Allgemeinen werden hierfür Sorbensmaterialien auf Basis von Umkehrphasen (RP, reversed phase) verwendet. Die zusätzliche Aufreinigung dient der Langlebigkeit von Chromatographiesäulen sowie verbesserter Detektion durch Abtrennung von Matrixbestandteilen des Probenmaterials.

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

Während zu Beginn der Folatanalytik hauptsächlich Affinitätssäulen unter Verwendung von FBP Anwendung fanden [Selhub 1989; Selhub 1989; Seyoum und Selhub 1993; Konings 1999; Ndaw et al. 2001; Nelson et al. 2004], wird mittlerweile am häufigsten mittels Anionentauschermaterialien aufgereinigt [Doherty und Beecher 2003; Freisleben et al. 2003a; Ginting und Arcot 2004; Nilsson et al. 2004; Patring und Jastrebova 2007; Stea et al. 2007; Vishnumohan et al. 2011; Mönch und Rychlik 2012]. Affinitätssäulen wurden zu Gunsten des verringerten Materialaufwandes und den damit verbundenen Analysekosten durch Ionentauschermaterialien ersetzt. Zudem können hiermit im Gegensatz zu Affinitätsmaterialien racemische Gemische aufgereinigt werden und eine vergleichbarere Bindungskapazität der verschiedenen Vitamere wird angenommen. [Freisleben et al. 2003a; Quinlivan et al. 2006] Meist werden starke Ionentauscher (SAX, strong anion exchange) in Kombination mit salzlastigen Elutionspuffern (üblicherweise 5 bis 10 % NaCl) verwendet. Es wurde aber auch von der Verwendung von schwachen Ionentauschern berichtet. [Rebello 1987] Des Weiteren finden RP-Materialien Anwendung, darunter hauptsächlich C18- und Phenyl-basierte Materialien. [Stokes und Webb 1999; Nelson et al. 2001; Pawlosky et al. 2001; Pawlosky und Flanagan 2001; Nilsson et al. 2004; Pfeiffer et al. 2004; Huang et al. 2008; Chandra-Hioe et al. 2013; Fazili et al. 2013] Weniger verbreitet sind Aufreinigungen mit Hilfe von bifunktionellen Kartuschenmaterialien wie gemischte Anionentauscher (MAX, mixed-anion exchange) [Kirsch et al. 2010] oder polymerbasierten Materialien (HLB, Hydrophilic-Lipophilic-Balanced) [Kok et al. 2004; Luo et al. 2017]. Allen genannten Materialien ist gemeinsam, dass Polyglutamate auf Grund ihrer höheren Anzahl an Carboxylgruppen höhere Affinitäten bezüglich der Sorbensmaterialien aufweisen und somit erschwert vom Kartuschenmaterial eluiert werden können. Manche Forschungsgruppen berichten daher auch von der Anwendung einer Ultra-Filtration, um Matrixbestandteile ab einem bestimmten Molekulargewicht abzutrennen und gleichzeitig eine Diskriminierung zwischen den verschiedenen Folatvitameren zu unterbinden. Eine Aufkonzentrierung des Probeneluats zur verbesserten Detektion ist damit allerdings nicht möglich. [Zhang et al. 2005; Wang et al. 2010; Shohag et al. 2017]

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

2.4.3 Analysenmethoden

Seit Beginn der Folatanalytik wurden viele verschiedene Methoden zur Quantifizierung des Folatgehaltes in biologischen Proben entwickelt. Unterschiede sowie Vor- und Nachteile werden im Folgenden kurz erläutert.

2.4.3.1 Mikrobiologische Assays

Der Mikrobiologische Assay macht sich die Tatsache zu Nutze, dass bestimmte Stämme von Milchsäurebakterien erst unter Zugabe externer Folate wachsen können. Üblicherweise werden hierzu die Spezies *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus hirae* oder *Pediococcus acidilactici* verwendet. [Phillips und Wright 1982; Newman und Tsai 1986; Picciano et al. 1990; Quinlivan et al. 2006] Die zertifizierte Standardmethode (DIN EN 14131) verwendet *L. rhamnosus* [Höppner et al. 2018], da diese Gattung die verschiedenen Folatvitamere ähnlich gut verstoffwechseln kann [Horne und Patterson 1988]. Zwar wurde von einer verringerten Reaktion gegenüber 5-CH₃-H₄folaten berichtet, welche allerdings auf den höheren pH-Wert des Assays von pH > 6,8 zurückzuführen waren. [Phillips und Wright 1982] Dieser sollte üblicherweise auf einen Wert von pH 6,2 gepuffert sein. [Ringling und Rychlik 2017] Zudem ist auf eine ausreichende Dekonjugation der Polyglutamate zu achten, da das mikrobielle Wachstum mit steigender Kettenlänge rasch abnimmt und ab dem Tetraglutamat nicht mehr gegeben ist. [Tamura et al. 1972; Goli und Vanderslice 1992]

Die Quantifizierung der Folate erfolgt turbidimetrisch unter photometrischer Messung der Trübung der mit dem Mikroorganismus versehenen Probe und Bestimmung über externe Kalibrierung von synthetischen Standards. [Newman und Tsai 1986; Horne und Patterson 1988; Molloy und Scott 1997; Quinlivan et al. 2006] Der Mikrobiologische Assay besticht vor allem durch seine sehr geringen Nachweisgrenzen im fmol-Bereich. [Newman und Tsai 1986] Allerdings kann mit Hilfe dieses Analyseverfahrens lediglich eine Aussage über den Gesamtfolatgehalt, nicht aber über die Vitamerenverteilung und deren quantitative Anteile gemacht werden. Bedingt durch die geringe Nachweisgrenze benötigt die Analytik mittels Mikrobiologischem Assay eine höchst akkurate Arbeitsweise. Bereits geringste Verunreinigungen mit externen Folaten sowie mikrobielle Kontamination führen demnach zur Überbestimmung des Folatgehaltes. [Quinlivan et al. 2006] Andererseits bedingen die Anwesenheit von Folat-Antagonisten oder Antibiotika eine Unterbestimmung des Gesamtfolatgehaltes. [Beard und Allen 1967; Carmel 1978] Ringling und Rychlik [2017] konnten zudem beobachten, dass je nach verwendetem Kalibrierstandard die Folatgehalte einer Probe teilweise zwischen 7 % und 37 % variieren können. Wurde allerdings das in einer Lebensmittelprobe jeweils mengenmäßig

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

meistvertretene Folatvitamer für die Kalibrierung herangezogen, so waren die Ergebnisse konsistent. Dafür jedoch muss dieses zunächst mit Hilfe von chemisch-instrumentellen Methoden identifiziert werden.

2.4.3.2 Proteinbindungsassays

Entwickelt in den 1970er und 1980er als schnelle Alternative zum Mikrobiologischen Assay, hat der Proteinbindungsassay mittlerweile stark an Bedeutung verloren [Pfeiffer et al. 2010], soll an dieser Stelle der Vollständigkeit halber aber kurz erläutert werden. Während ursprünglich mit radioaktiven Markierungen (typischerweise ^{125}I -PteGlu oder ^{75}Se -PteGlu) gearbeitet wurde [Shane et al. 1980; Hendel 1981], kommen heute nur noch Chemilumineszenz- oder Fluoreszenzdetektion zum Einsatz [Quinlivan et al. 2006; Pfeiffer et al. 2010]. Meistverwendet ist der Einsatz aus Milch und Milchfraktionen isolierter FBPs [Shane et al. 1980], wobei auch gelegentlich folatspezifische Antikörper zum Einsatz kommen [Hendel 1981]. Zu beachten ist auch beim Proteinbindungsassay, dass Monoglutamate je nach C_1 -Substituent, Oxidationsstatus oder Stereoisomer verschiedene Affinitäten gegenüber den FBPs aufweisen. Zudem zeigen Polyglutamate deutlich höhere Affinitäten, weshalb diese idealerweise zunächst zu den entsprechenden Monoglutamaten dekonjugiert werden sollten. [Shane et al. 1980; Pfeiffer et al. 2010] Prinzipiell existieren zwei Anwendungsformen des Proteinbindungsassays: der nicht-kompetitive und der kompetitive Assay, wobei letzterer den weiter verbreiteten Assay darstellt. Die Detektion der Folate erfolgt mittels Chemilumineszenz der gebundenen, markierten Folatstandards, welche in beiden Varianten durch die Zugabe einer Triggerlösung generiert wird. [Arcot und Shrestha 2005; Quinlivan et al. 2006] Im Falle des Immunoassays werden statt FBPs folatspezifische Antikörper eingesetzt. Die Detektion erfolgt nach Binden von markierten Antigenen mittels Fluoreszenz. Mit Hilfe von externer Kalibrierung an Hand von Folatstandards kann in allen erläuterten Typen von Assay eine Quantifizierung erfolgen. [Iyer und Tomar 2009]

2.4.3.3 Chemisch-instrumentelle Methoden

Im Gegensatz zu den bereits genannten Analysemethoden ermöglichen chemisch-instrumentelle Methoden mittels Flüssigchromatographie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) die Auftrennung und Quantifizierung verschiedener Folatvitamere. Die Auftrennung erfolgt für gewöhnlich an RP-Phasen wie C18 oder Phenylphasen, die Analyse mittels UV- (Ultra Violett) [Pfeiffer et al. 1997], Fluoreszenz- [Konings 1999; Ruggeri et al. 1999; Ndaw et al. 2001; Póo-Prieto et al. 2006; Azevedo et al. 2016] oder MS-Detektion (Massenspektrometrie) [Freisleben et al. 2003a; Kok et al. 2004; Nelson et al. 2004; Pfeiffer et al. 2004; Patring und Jastrebova 2007; Kirsch et al. 2010; Camara et al. 2013; Chandra-Hioe et al. 2013; Fazili

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

et al. 2013]. Die chromatographische Trennung an RP-Materialien benötigt saure pH-Werte, um Ladungen der Carboxylgruppen der Folatvitamere zu neutralisieren. [Pfeiffer und Gregory 1996; Pfeiffer et al. 2010] Allerdings werden dadurch Interkonversionsreaktionen auf der Säule begünstigt [Patring und Jastrebova 2007], wie sie bereits eingehend im Kapitel 2.1.2 erläutert wurden. Um dies zu unterbinden, kann alternativ mit Ionenpaar-Reagenzien gearbeitet werden [Selhub 1989; Breithaupt 2001; Garratt et al. 2005], welche aber wiederum vor allem bei der Kopplung mit der Massenspektrometrie Probleme hervorrufen und daher kaum Anwendung finden.

Die Kopplung mit der Tandem-Massenspektrometrie besticht vor allem durch die hohe Empfindlichkeit und Selektivität. Zudem erlaubt diese Kopplung die Anwendung der Stabilisotopen-Verdünnungsanalytik (SIVA) und ist somit die aktuelle Methode der Wahl. [Pawlosky und Flanagan 2001; Freisleben et al. 2003b; Nelson et al. 2004; Pfeiffer et al. 2004; Kirsch et al. 2010; Ringling und Rychlik 2013; Kopp et al. 2016; Striegel et al. 2018b; Ložnjak et al. 2019] Durch Zugabe von isotopenmarkierten Standards vor der Aufarbeitung können zum einen Verluste während der Aufarbeitung und zum anderen Ionisationsunterschiede während der Messung durch Matrixinterferenzen ausgeglichen werden. [Rychlik und Asam 2009] Grund hierfür ist das identische chemische und physikalische Verhalten von isotopenmarkierten Standards im Vergleich zu ihren unmarkierten Analoga. Durch das unterschiedliche Molekulargewicht können sie allerdings im Massenspektrum voneinander unterschieden werden. [Pickup und McPherson 1976] Des Weiteren kann durch den sogenannten *Carrier-Effekt* eine erhöhte Sensitivität hervorgerufen werden. Durch „Verschleppen“ des Analyten gemeinsam mit dem zugesetzten internen Standard kann somit eine Extraktion des Analyten begünstigt werden, wenn dessen Gehalte im Normalfall zu gering für eine erfolgreiche Analytik wären. [Rychlik und Asam 2009]

2.4.3.4 Methoden zur Bestimmung des Polyglutamatgehaltes

Chemisch-instrumentelle Methoden ermöglichen aber nicht nur die Unterscheidung einzelner Vitamerformen, sondern erlauben auch eine Auftrennung und Identifizierung der jeweiligen Polyglutamatformen eines Vitamers. Zu Beginn der Folatanalytik konnte der Polyglutamatgehalt einer Probe lediglich abgeschätzt werden als die Differenz des Gesamtfolatgehaltes vor und nach enzymatischer Dekonjugation. Später war durch reduktive Umwandlung aller Polyglutamatformen zu den jeweiligen 5-CH₃-H₄PteGlu-Formen und anschließende chromatographische Trennung immerhin eine Quantifizierung auf Ebene der Polyglutamate möglich, nicht aber für jedes einzelne Vitamer. [Ndaw et al. 2001; Verlinde et al. 2008; Munyaka et al. 2009; Munyaka et al. 2010; Wang et al. 2010]. Mangels authentischer Standards und bedingt durch

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

geringe Gehalte in Proben wurde bisher nur selten von der Analytik aller bekannter Folatvitamere mit deren jeweiligen Polyglutamatformen berichtet. [Garratt et al. 2005; Leung et al. 2013] Hierbei konnten aber deutliche Unterschiede in der Polyglutamatverteilung der verschiedenen Folatvitamere gefunden werden. Die Weiterentwicklung dieser Methoden bietet also gutes Potential für weitere Aufschlüsse über den gesamten Metabolismus der Folate.

2.5 Grundlagen der (ultra-)hochauflösenden Massenspektrometrie

„Das Grundprinzip der Massenspektrometrie (MS) ist es, aus anorganischen oder organischen Substanzen in geeigneter Weise Ionen zu erzeugen, diese Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) zu trennen und sie mit einem Registriersystem nach ihrem spezifischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnis qualitativ und quantitativ zu erfassen.“ [Budzikiewicz 1969] Trotz der stetigen Weiterentwicklung von Ionisierungsmethoden sowie Detektorsystemen ist im Grunde diese im Jahr 1968 formulierte Definition noch heute gültig. Generell müssen Substanzen als isolierte Ionen in der Gasphase vorliegen, um mittels Massenspektrometrie an Hand ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses analysiert werden zu können. Mit diesen Informationen können anschließend Rückschlüsse auf die Struktur sowie quantitative Aussagen der Substanz getroffen werden. [Budzikiewicz und Schäfer 2013]

Eine der häufigsten Ionisierungsmethoden in der analytischen Chemie ist die Elektrospray Ionisation (ESI), welche den sogenannten „sanften Ionisierungsmethoden“ bei Atmosphärendruck zugeordnet wird. Hierbei wird eine (Analyt-)Lösung mit einer Sprühkapillare zu einem feinen Nebel versprüht. Durch Wirkung eines starken elektrischen Feldes entsteht ein elektrostatisch hoch geladenes Aerosol, aus welchem nach vollständiger Desolvatation isolierte Ionen freigesetzt werden. Diese werden mit Hilfe von differenziell gepumpten Systemen bis zum Hochvakuum transportiert. [Gross 2013] Die anschließende Analyse der generierten Ionen kann je nach zu erfüllender Anforderung mit einer Vielzahl von Massenanalysatoren erfolgen. Diese unterscheiden sich vor allem in ihrer Auflösung sowie der Massengenauigkeit. Die Auflösung R (resolution) wird hierbei definiert als der Quotient aus Masse m und der Signaltbreite Δm bei 50 % der Peakintensität (FWHM, full width at half maximum) und gibt an, wie gut zwei Signale voneinander getrennt werden können:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (1)$$

Die Massengenauigkeit hingegen beschreibt die Differenz zwischen experimentell ermitteltem Masse-zu-Ladungsverhältnis m/z_{exp} und dem theoretisch berechneten m/z_{theo} als absoluter Wert oder als relative Massengenauigkeit in ppm (parts per million):

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

$$\Delta m/z = m/z_{exp} - m/z_{theo} \quad (2)$$

$$\delta \frac{m}{m} = \frac{\Delta m/z}{m/z} \quad (3)$$

Ab einer Auflösung von $R \approx 10.000$ spricht man von Hochauflösung, welche eine Auftrennung von C,H,N,O-Multipletts ermöglicht. Hiermit können Massengenauigkeiten bis zu $\pm 0,5 - 5$ ppm erzielt werden. [Budzikiewicz und Schäfer 2013; Gross 2019]

Im Nachfolgenden werden kurz die Prinzipien verschiedener Massenanalytoren mit Fokus auf deren Besonderheiten erläutert, welche für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind.

2.5.1 Quadrupol-Massenspektrometer und Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (QqQ)

Quadrupol-Massenspektrometer sind die am häufigsten verwendeten Massenanalytoren in der Kopplung mit Flüssigchromatographie. [Gross 2013] Ein Quadrupol besteht aus vier achsenparallelen Stabelektroden, welche im Quadrat angeordnet werden. An die jeweils gegenüberliegenden Stäbe wird dasselbe Potential bestehend aus Gleichstrom und Wechselstrom angelegt (s. Abbildung 2.8). Eine schnelle Umpolung der Elektroden in Kombination mit der angelegten Gleichspannung ermöglicht den eintretenden Ionen durch wechselnde Anziehungs- und Abstoßungskräfte ein Durchqueren des Quadrupols in z-Richtung. Die zusätzliche Gleichspannung dient zudem der Massenselektion durch Einstellen von Durchlassbedingungen für den gewünschten zu selektierenden m/z -Bereich. [Yost und Enke 1978; Yost und Enke 1979] Ein Quadrupol-Massenanalysator stellt also vielmehr einen Massenfilter dar, der nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Wert passieren lässt. Mit diesem Analysator sind lediglich Einheitsauflösungen realisierbar, womit benachbarte Peaks mit unterschiedlicher nomineller Masse gerade noch getrennt werden können. [Gross 2013]

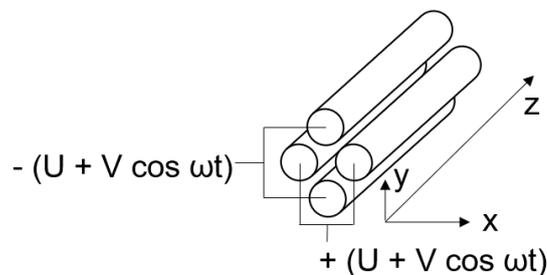


Abbildung 2.8 Aufbau eines Quadrupolanalytators nach Gross [2013].

Werden mindestens zwei Analysatoren miteinander gekoppelt, so spricht man von Tandem-Massenspektrometrie. Im Falle des Quadrupolanalytators werden meist drei Quadrupole in

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

Reihe angeordnet. Im ersten Quadrupol findet ein Vorläuferionenscan statt, der nur bestimmte zu untersuchende Vorläuferionen passieren lässt. Nach der Selektion der Ionen fliegen diese durch eine mit Inertgas (Helium, Stickstoff oder Argon) befüllte Stoßkammer (Quadrupol 2), wo es zum stoßinduzierten Zerfall kommt. Im dritten Quadrupol letztlich wird ein Produktionenscan durchgeführt. Die recht geringen Auflösungen eines Quadrupolanalysators werden im Falle der Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie kompensiert von sehr hoher Sensitivität durch selektive Wahl von Vorläufer- und Fragmention der zu untersuchenden Analyten. [Budzikiewicz und Schäfer 2013; Gross 2019]

2.5.2 Quadrupol Flugzeit-Massenspektrometer (Q-ToF-MS)

In der Flugzeit-Massenspektrometrie (Time of Flight Mass Spectrometry, ToF-MS) macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass Ionen mit unterschiedlichem Masse-zu-Ladungsverhältnis in einem elektrischen Feld verschiedene Geschwindigkeiten aufweisen und demnach für eine identische Strecke eine unterschiedlich lange Zeit benötigen. [Wolff und Stephens 1953] Folglich lässt sich aus der Flugzeit unter Kenntnis der Flugstrecke sowie der Beschleunigungsspannung das spezifische Masse-zu-Ladungsverhältnis berechnen. [Gross 2013] Um das für exakte Messungen nötige zeitgleiche Verlassen der generierten Ionen zu garantieren, werden die Ionen nach Verlassen der Ionenquelle fokussiert und mittels eines orthogonalen Beschleunigers in Richtung Massenanalysator beschleunigt. [Dawson und Guilhaus 1989] Durch Verwendung von elektrostatischen Ionenspiegeln werden die Ionen im ToF-Analysator nach Passieren der Driftregion im Reflectron nochmals refokussiert und Richtung Detektor reflektiert, was eine erhebliche Verbesserung der Auflösung zur Folge hat. [Guilhaus 1995]

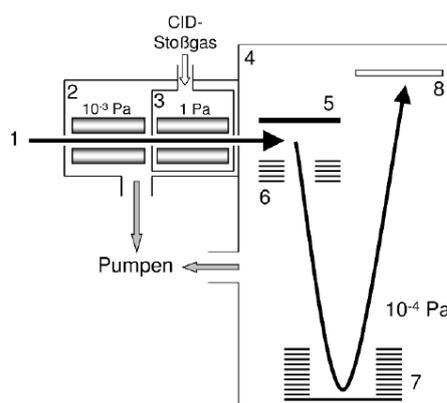


Abbildung 2.9 Aufbau eines Q-ToF-Massenspektrometers aus Budzikiewicz und Schäfer [2013].
(1) Ionenstrahl, (2) Quadrupol zur Ionenselektion, (3) Stoßkammer, (4) ToF-Analysator mit Reflektron, (5) orthogonaler Beschleuniger, (6) Beschleunigungssystem, (7) Reflektron, (8) Detektor.

Abbildung 2.9 zeigt die üblicherweise verwendete Kopplung von Quadrupolanalysatoren mit ToF-Geräten. Fokussierung des Ionenstrahls (1) und Selektion der Vorläuferionen erfolgt im Quadrupol (2), Stoßaktivierung zur Fragmentierung in der Stoßkammer (3), welche einem

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

Quadrupol 2 entspricht. Die generierten Produktionen werden anschließend mittels ToF-MS (4) analysiert. Dieser Aufbau ermöglicht hohe Massengenauigkeiten von 3 – 5 ppm sowie eine Auflösung von $R \geq 20.000$. [Budzikiewicz und Schäfer 2013]

2.5.3 Fourier-Transformation Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS)

Höchste Massengenauigkeiten von 0,1 – 1 ppm sowie Auflösungen von bis zu $R \geq 1.500.000$ können mittels Fourier-Transformation Ionenzyklotronresonanz-Spektrometern (FT-ICR) erzielt werden. [Gross 2013] Abbildung 2.10 zeigt den schematischen Aufbau einer ICR-Zelle bestehend aus sechs kubisch zueinander angeordneten Plattenelektroden, in der die generierten Ionen gehalten werden. Voraussetzung für diese Falle ist das Vorhandensein eines transversalen elektrischen Feldes (angelegt an die Trappingplatten) senkrecht zu einem Magnetfeld. In dieser Konstellation verursacht die auf die Ionen wirkende Lorentzkraft eine Rotation der Ionen senkrecht zum Magnetfeld. Diese induzierte Zyklotronfrequenz der Rotation ist abhängig von der Magnetfeldstärke sowie der Masse und der Ladung der Ionen. [Sommer et al. 1951; Amster 1996] Demnach kann bei konstanter Magnetfeldstärke das Masse-zu-Ladungsverhältnis durch Messung der Zyklotronfrequenz bestimmt werden. [Amster 1996] Durch Anlegen eines kurzen Radiofrequenzimpulses an die Emitterplatten werden die Ionen angeregt und in Phase gebracht. Ist die Zyklotronfrequenz der Ionen in Resonanz mit der angelegten Radiofrequenz, so bewegen sich diese spiralförmig nach außen. Die so entstandenen kreisenden Ionenpakete induzieren Wechselspannungen in den Kondensatorplatten ober- und unterhalb der ICR-Zelle. Die in diesen Detektorplatten induzierten Frequenzen werden gemessen und mittels Fourier-Transformation in m/z Werte umgewandelt. Durch Anlegen eines Frequenzbandes an die Emitterplatten kann die simultane Detektion vieler Ionen erfolgen und so letztlich das Massenspektrum berechnet werden. [Amster 1996; Nikolaev et al. 2016]

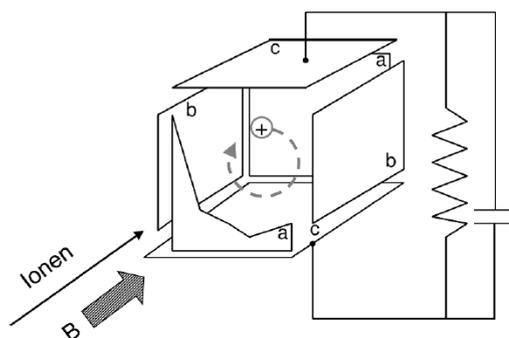


Abbildung 2.10 Schema einer ICR-Zelle aus Budzikiewicz und Schäfer [2013].
(a) Trapping-Platten, (b) Emitterplatten, (c) Detektorplatten, B: Magnetfeld.

2.6 Grundlagen zu Metabolomics

Mit Einführen von ESI-Quellen zu Beginn der 1990er Jahre etablierte sich die Kopplung der Flüssigchromatographie mit Massenanalysatoren. [Hiraoka und Kudaka 1990] Somit konnten entscheidende Fortschritte gemacht werden hinsichtlich Selektivität und Sensitivität der Analytik verschiedener Komponentenklassen in biologischen Matrices. [Hiraoka und Kudaka 1990; Siuzdak 1994; Hutton und Major 1995] Durch ein stetiges Ausweiten der zu analysierenden Analyten(klassen) auf ein möglichst breites Spektrum unter Anwendung von hochauflösenden Massenspektrometern war 2001 erstmals die Rede vom Begriff „*Metabolomics*“. [Fiehn 2001; Fiehn 2002; Fiehn und Weckwerth 2003] Während im Jahr 2001 zehn Veröffentlichungen zu dem Thema „*Metabolomics*“ zu finden waren, waren es innerhalb der ersten beiden Monate des Jahres 2020 bereits 663 (gefunden bei Web of Knowledge am 26.02.2020, 21:15 Uhr). Dies entspricht einer Steigerung um mehr als 600 bzw. 3600 %, wenn man diese Zahl auf den Rest des Jahres extrapoliert und verdeutlicht die aktuelle Relevanz dieses Forschungsgebietes. Daher sollen im Folgenden kurze Grundlagen hierzu erläutert werden.

2.6.1 Begriffsdefinition

Der Begriff „*Metabolomics*“ beschreibt allgemein die vollständige Identifizierung und Quantifizierung des Metaboloms in einem biologischen System zum Verständnis der Zusammenhänge von biochemischen Transformationswegen. Das Metabolom stellt hierbei die Gesamtheit aller Metaboliten mit einem Molekulargewicht $< 1.000 - 1.500$ Da dar. [Fiehn 2002; Fiehn und Weckwerth 2003; Vuckovic 2012] Voraussetzung für die Identifizierung ist die Verwendung von (ultra-)hochauflösenden Massenanalysatoren, um exakte Massen der Metaboliten zu ermitteln. Zudem ist die Anwendung von Tandem-Massenspektrometrie nötig, um zusätzliche Strukturinformationen zu generieren. Nur dadurch ist eine Bestimmung der Elementarzusammensetzung und eine Strukturaufklärung der Metaboliten möglich. [Fiehn 2002; Herrero et al. 2012] Alternativ können Identifizierung und Quantifizierung auch durch Anwendung von magnetischer Kernspinresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) erfolgen. [Sotelo und Slupsky 2013; Wishart 2019b]

Neben diesem allgemeinen Ansatz der „*ungezielten (untargeted) Metabolomics*“ werden noch drei weitere Methoden dem Begriff „*Metabolomics*“ zugeordnet.

Bei der „*target Analyse*“ werden nur bestimmte, bekannte Substrate oder Produkte biochemischer Transformationen untersucht. Somit ordnet man auch alle klassischen Quantifizierungsmethoden für bestimmte Analyten den sogenannten „*gezielten (targeted) Metabolomics*“ zu. [Fiehn 2001; Fiehn und Weckwerth 2003]

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

Richtet sich die Analytik lediglich auf eine Substanzklasse eines biochemischen Transformationsweges, spricht man von der „*Metabolitenprofilierung*“ (*metabolite profiling*). [Fiehn 2001; Fiehn und Weckwerth 2003] Eigenschaften der Metaboliten der Substanzklasse sind hierbei bekannt. Ziel dieser Untersuchungen ist es meist, Ursachen für Änderungen in Biotransformationswegen zu eruieren oder bislang unbekannte Metaboliten dieser Substanzklasse zu identifizieren. [Fiehn 2002]

In der Genomik oder der klinischen Anwendung ist es oftmals nicht nötig, alle Metaboliten einer Probe individuell zu klassifizieren. Vielmehr ist man meist nur an einer Klassifizierung auf Grundlage des biologischen Ursprungs und der biologischen Relevanz der Unterschiede interessiert. In diesem Fall spricht man von der „*Analyse des metabolischen Fingerabdruckes*“ (*metabolic fingerprinting*). [Fiehn 2001; Fiehn und Weckwerth 2003] Untersucht werden hierbei die Veränderungen des Metabolitenmusters in biologischen Proben unter Einfluss verschiedener Faktoren wie etwa der Einnahme eines Arzneimittels im Vergleich zum Placebo.

2.6.2 Vorbereitung, Durchführung und Anwendung metabolomischer Untersuchungen

Die Probenvorbereitung für spätere metabolomische Untersuchungen zielt darauf ab, das Metabolom der zu untersuchenden Proben möglichst wenig zu beeinflussen und eine Enzymaktivität währenddessen zu unterbinden. Daher werden für gewöhnlich Extraktionen mit eiskalten Lösungsmittelgemischen oder kurzzeitiges Sieden in Ethanol bevorzugt angewendet. [Fiehn 2001; Fiehn 2002; Álvarez-Sánchez et al. 2010; Vuckovic 2012; Mushtaq et al. 2014] Alle weiteren Extraktionsschritte werden üblicherweise auf Eis durchgeführt. Allgemein wird versucht, die Probenaufarbeitung so kurz wie möglich zu halten, um externe Einflüsse auf das Metabolom so gering wie möglich zu halten (sogenannte „*dilute and shoot*-Methoden“). [Vuckovic 2012] Auch wenn versucht wird, die Extraktion so wenig selektiv wie möglich durchzuführen, sollte berücksichtigt werden, dass kein universelles Verfahren zur gesamtheitlichen Analyse des Metaboloms existiert. Dazu sind die Diversität der Metaboliten sowie deren Konzentrationen in biologischen Proben schlichtweg zu vielfältig. [Vuckovic 2012; Mushtaq et al. 2014; Ramirez-Gaona et al. 2017] Die analysierbaren Metabolitenklassen sowie deren Erfassungsgrenzen werden hierbei entscheidend durch die Wahl von Extraktions- und Trennverfahren sowie des (Massen-) Analysators beeinflusst. [Herrero et al. 2012]

Metabolomische Untersuchungen finden in vielen Forschungsgebieten Anwendung. So dienen diese Untersuchungen unter anderem dem tiefergehenden Verständnis von diversen angeborenen oder chronischen Erkrankungen [Ellis et al. 2007; Grainger 2007; Gowda et al. 2008; Wishart 2019a] oder der Analyse von biologischen Prozessen wie Wachstum [Fanos et

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

al. 2013; Pereira et al. 2018] oder Stress [Shulaev et al. 2008; Lankadurai et al. 2013; Parihar et al. 2015]. Die Aufklärung biologischer Transformationswege [Rahman und Hasan 2014; Garavito et al. 2015] sowie die Nachverfolgung von Wirkmechanismen und Toxizität verschiedener Arzneimittel und Naturstoffe in einer Vielzahl von Organismen [Griffin und Bollard 2004; Schlotterbeck et al. 2006; Lindon et al. 2007; Wishart 2008] stellen weitere Anwendungsmöglichkeiten von *Metabolomics* dar.

2.6.3 Identifizierungslevel von Metaboliten

Ziel metabolomischer Untersuchungen ist es, die in einer Probe detektierbaren Metaboliten möglichst vollständig zu identifizieren, um die analysierten Proben möglichst ganzheitlich zu charakterisieren. [Blaženović et al. 2019]

Tabelle 2.1 Identifizierungslevel wie von der MSI vorgeschlagen [Sumner et al. 2007], verändert nach Blaženović et al. [2018] unter Berücksichtigung der aktuellsten Überarbeitungen der MSI (<http://metabolomicssociety.org/board/scientific-task-groups/metabolite-identification-task-group>).

Konfidenz-level	Bekannte Eigenschaften	Unbekannte Eigenschaften	Beispielhafte Metabolitenklasse
Level A	Summenformel Strukturformel Stereochemie, falls vorhanden Chiralität, falls vorhanden	keine	Einzelnes Enantiomer oder Achiraler Metabolit
Level B	Summenformel Strukturformel Stereochemie, falls vorhanden	Chiralität	Eines von zwei Enantiomeren
Level C	Summenformel Strukturformel	Relative Stereochemie Chiralität	Eines von mehreren Stereoisomeren
Level D	Summenformel Funktionelle Gruppe	Strukturformel Relative Stereochemie Chiralität	Eines von mehreren Positionsisomeren
Level E	Summenformel	Strukturformel Relative Stereochemie Chiralität	Einer von mehreren möglichen Metaboliten mit bekannter Summenformel
Level F	Strukturklasse	Summenformel Strukturformel Relative Stereochemie Chiralität	Strukturelle Klasse definiert durch spektrale Eigenschaften
Level G	Spezifische spektrale Eigenschaften	Summenformel Strukturformel Relative Stereochemie Chiralität	Unbekannte mit spezifischen spektralen Eigenschaften

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

Je nachdem, welche experimentellen Daten zur Verfügung stehen und welche Übereinstimmungen für Metaboliten von Interesse gefunden werden können, kann eine Identifizierung auf verschiedenen Identifizierungsebenen erfolgen. Bereits im Jahr 2007 wurde von der Metabolomics Standards Initiative (MSI) eine Abstufung der Metabolitenidentifizierung in verschiedene Konfidenzlevel eingeführt [Sumner et al. 2007], welche seitdem mehrmals überarbeitet wurde [Viant et al. 2017]. Erst kürzlich wurden von der Metabolomics Society neue Identifizierungslevel vorgeschlagen. Diese Level reichen von einem vollständig identifizierten Metaboliten klassifiziert als Level A bis hin zu Unbekannten mit spezifischen spektralen Eigenschaften in einer Probe, welche als Level G klassifiziert werden. Die Abstufungen sowie die dafür benötigten und bekannten Daten sind Tabelle 2.1 zu entnehmen.

2.6.4 Auswertung metabolomischer Untersuchungen

Die großen Datenmengen, die mittels metabolomischer Untersuchungen generiert werden, bedürfen einiger bioinformatischer Anwendungen zur Unterstützung der Auswertung. Die hohe Massengenauigkeit von Messungen mittels hochauflösender Massenspektrometrie ermöglicht es hierbei, gemessenen Masse-zu-Ladungsverhältnissen zugehörige Summenformeln zuzuordnen, d.h. sogenannte Annotationen vorzunehmen. [Marshall et al. 1998; Aharoni et al. 2002; Brown et al. 2005] Durch Anwendung von kombinatorischen Berechnungen kann mit Hilfe der exakten Elementarmasse von biologisch relevanten Elementen (üblicherweise H, C, N und O mit individueller Erweiterung um S und P) die Zahl möglicher Annotationen eingegrenzt werden. [Kind und Fiehn 2007] Unter Berücksichtigung diverser Filtermöglichkeiten können die generierten Massenspektren unter anderem um Isotopenpeaks oder Adduktpeaks (generiert in der ESI-Quelle) und Peaks derselben Spezies in verschiedenen Ladungszuständen bereinigt werden. Letzteres wird auch als Dekonvolution bezeichnet. [Windig et al. 1996; Windig und Smith 2007] Trotz dieser Reduktion der Datenmengen ist selbst eine Massengenauigkeit von < 1 ppm, wie sie mittels FT-ICR-MS erzielt wird, nicht ausreichend, um eindeutige Annotationen vorzunehmen. [Kind und Fiehn 2006] Die mathematisch generierten möglichen Summenformeln eines jeden Signals im Massenspektrum müssen folglich weiteren Filterungskriterien unterzogen werden. Ein weiterer Ansatz ist hier die Berücksichtigung der biologisch sinnvollen Elementarzusammensetzung. Hierbei werden die generierten Summenformeln um solche mit biologisch nicht sinnvollen Valenzen oder H/C- und O/C-Verhältnissen reduziert. [Kind und Fiehn 2007] Dennoch ist eine korrekte Annotation oft nur unter Kenntnis der groben Probenzusammensetzung und einiger Expertise in der Auswertung von Massenspektren möglich.

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

2.6.5 Netzwerkanalyse von Metaboliten

Wie vorangehend ausführlich erläutert, sind selbst Massenungenauigkeiten von < 1 ppm nicht ausreichend für eine eindeutige Annotation. Folglich sind Massenungenauigkeiten von bis zu 10 ppm, wie sie beispielsweise mittels Flugzeit-Massenspektrometern generiert werden, vollkommen unzureichend für eine zuverlässige Annotation. Vorteile der Q-ToF-Technologie allerdings sind die Generierung orthogonaler Spektren. Durch die Kopplung mit vorgeschalteter Chromatographie wird über die Retentionszeit eine zusätzliche Information der eluierten Substanzen erhalten. [Swartz 2005; Bowen und Northen 2010] Des Weiteren ermöglichen ToF-Geräte in Kombination mit einem Quadrupol die Fragmentierung ausgewählter Vorläuferionen. Durch die so entstandenen, hochaufgelösten Fragmentierungsmuster kann ein gezielter Abgleich mit Datenbankspektren und somit eine Strukturaufklärung vorgenommen werden. [Wishart 2009; Boccard et al. 2010]

Für die Auswertung der Fragmentspektren (auch MS/MS- oder MS²-Spektren genannt) stehen auch hier einige bioinformatische Softwarelösungen zur Verfügung. [Smith et al. 2006; Benton et al. 2008; Pluskal et al. 2010; Kuhl et al. 2012; Gerlich und Neumann 2013; Dührkop et al. 2019] Ein Ansatz bedient sich dabei der Tatsache, dass strukturähnliche Metaboliten ähnliche Fragmentierungsmuster aufweisen werden. Durch Abgleich der MS²-Spektren eines Datensatzes können somit Verknüpfungen zwischen Metaboliten über übereinstimmende oder ähnliche Fragmente und/oder Neutralverluste hergestellt werden. [Yang et al. 2013; Wang et al. 2016] Die gefundenen Übereinstimmungen können grafisch über ein Netzwerk dargestellt werden mit Abbildung der Metaboliten als Verknüpfungspunkten. Die Verbindungslinien repräsentieren einfache Biotransformationen wie Glykosylierungen, Alkylierungen, Reduktions- oder Oxidationsreaktionen. [Traxler und Kolter 2012] Je größer die Übereinstimmungen sind, desto näher aneinander werden entsprechend die Verknüpfungspunkte dargestellt. [Ernst et al. 2019; Nothias et al. 2019; Rogers et al. 2019] Auf diese Art und Weise können strukturähnliche und potentiell bislang unbekannte Metaboliten visuell schnell erfasst werden. Strukturaufklärung kann anschließend zum einen über Abgleich mit Datenbankspektren oder Anwendung weiterer bioinformatischer Algorithmen erfolgen. Dabei wird versucht, den experimentellen Fragmentmassen mögliche Substrukturen zuzuordnen und somit Strukturvorschläge für das gesamte Molekül zu generieren. [Ernst et al. 2019; Rogers et al. 2019]

Zwar sind Massenungenauigkeiten von 1 ppm nicht ausreichend für eine eindeutige Annotation, aber sie ermöglichen eine andere Herangehensweise der computergestützten Netzwerkanalyse. Für diese Netzwerkanalyse werden einige mit Hilfe des Isotopenpatterns verifizierbare Signale als Startpunkte eines rechenbasierten Netzwerkes gesetzt. Das auf den Startpunkten basierend generierte Netzwerk beruht auf möglichen Biotransformationsreaktionen

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

wie Oxidations-, Reduktions- oder Wasserabspaltungsreaktionen. Diese Biotransformationsreaktionen müssen je nach untersuchtem Organismus und dessen zu erwartenden Biotransformationen angepasst werden. Für die Transformationen wird für gewöhnlich ein maximaler Fehler von 0,2 ppm akzeptiert. Wird nach Berechnung der theoretischen Biotransformation ein experimentell ermitteltes Signal mit einer Massenungenauigkeit < 1 ppm gefunden, so kann für dieses eine Annotation (Ausgangssignal unter Berücksichtigung der Biotransformation) akzeptiert werden und basierend darauf das Netzwerk weiter aufgespannt werden. Mehrmalige Rechendurchläufe erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer eindeutigen Annotation zusätzlich. [Moritz et al. 2019]

2.7 Grundlagen zu Hefen und deren Folatmetabolismus

Bereits die alten Ägypter wussten Hefen für sich zu nutzen. So finden sich Nachweise der Verwendung von Hefen zum Brotbacken, dem Brauen von Bier oder der Herstellung von Wein bereits 4000 v. Chr. [Kreger-van Rij 1987; Spencer und Spencer 1997] Auch heute noch finden Hefen weiterhin in der Lebensmittelindustrie zur Produktion von Brot, Bier, Wein oder diversen fermentierten Lebensmitteln Anwendung. Auch die Bioethanolproduktion wäre ohne den Einsatz von Hefen undenkbar. Zudem werden Hefen in der Biotechnologie zur Produktion von Aminosäuren, Vitaminen, Enzymen oder Peptiden eingesetzt. In der Biologie dienen Hefen als Modellorganismen zur Erforschung von Krankheiten und Stoffwechselwegen. [Reed und Nagodawithana 2012; Souza Varize et al. 2019]

2.7.1 Klassifizierung und Taxonomie von Hefen

Bis heute sind mehr als 1500 Hefespezies bekannt, welche sich wiederum in 69 Gattungen gliedern. [Spencer und Spencer 1997; Kurtzman und Fell 2006] Im Allgemeinen handelt es sich bei Hefen um eukaryontische, einzellige Mikroorganismen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 3 bis 4 µm, welche sich für gewöhnlich asexuell durch Zellknospung oder Zellteilung vermehren. Als Gesamtheit gehören Hefen zur Pilzklasse der Eumycota, den Echten oder Höheren Pilzen. Die Einteilung von Hefen erfolgt an Hand der Ähnlichkeit der DNS in Ascomyceten, Basidiomyceten und Deuteromyceten (*Fungi imperfecti*). [Spencer und Spencer 1997]

Als Vertreter der Ascomyceten spielte lange Zeit die Gattung *Saccharomyces* durch die Verwendung zum Brot backen, Brauen und Wein keltern eine entscheidende Rolle. Heutzutage wird diese Gattung zudem industriell genutzt, wie etwa zur pharmazeutischen Produktion von diversen Proteinen. Auf Grund des hohen Bedarfes an Zucker für die Fermentation wird die

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

Gattung *Saccharomyces* allerdings zunehmend von anderen, „nicht-konventionellen“ Gattungen mit höherer Toleranz für weniger extreme Substratbedingungen ersetzt. [Johnson und Echavarri-Erasun 2011; Mattanovich et al. 2014; Souza Varize et al. 2019]

Die Gattung *Saccharomyces* unterteilt sich in acht Spezies, wovon die Spezies *S. cerevisiae* und *S. pastorianus* (früher *S. carlsbergensis* genannt) die bekanntesten Vertreter für den Brauprozess sind [Kurtzman et al. 2010] *S. cerevisiae* stellt hierbei einen Wildtyp dar, wohingegen *S. pastorianus* durch Hybridisierung von *S. cerevisiae* und dem kältetoleranten Wildtyp *S. eubayanus* entstand und bislang nicht in der Natur vorkommend nachgewiesen werden konnte. [Bird und Smith 2016; Budroni et al. 2017] Die beiden Spezies unterscheiden sich unter anderem in ihren Temperaturoptima. So fermentiert *S. cerevisiae* zwischen 18 und 24 °C und schwimmt nach der Fermentation auf der Oberfläche des Jungbieres auf, weshalb sie daher als obergärige Hefe bezeichnet wird. Der alternative Name „Ale Hefe“ rührt von der klassischen Verwendung bei der Produktion von Ale. Die klassische Bäckerhefe gehört ebenfalls dieser Spezies an. Im Gegensatz dazu fermentiert die Spezies *S. pastorianus* zwischen 8 und 14 °C. Nach dem Fermentationsprozess sinkt diese Hefe auf den Boden des Gärgefäßes ab, was die Bezeichnung als untergärige Hefe erklärt. Auf Grund der benötigten Lagerung zur Reifung des Bieres wird diese Spezies auch als „Lager Hefe“ bezeichnet. [Bird und Smith 2016] Beiden Spezies gemein ist der nachweislich hohe Gehalt an essentiellen Mineralien und Vitaminen. [Spencer und Spencer 1997]

2.7.2 Folatproduktion in Hefen

Wie bereits in Kapitel 2.2 erläutert, findet die Folatbiosynthese in Hefen cytosolisch statt, wohingegen der C₁-Metabolismus sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien nachgewiesen werden konnte. Im C₁-Metabolismus von Hefen werden aktuell zwei Reaktionen beschrieben, welche der Bereitstellung von Methionin dienen. Katalysiert werden diese von Methyltetrahydrofolat Reduktase bzw. Methioninsynthase. Letztere benötigt für eine optimale Funktion zwar wie in allen anderen Organismen eine ausreichende Folatzufuhr, nicht aber gezwungenermaßen den Cofaktor B₁₂. [Schirch und Strong 1989; Cherest et al. 2000] Daher ist dieses Vitamin lediglich in Hefen essentiell nötig, welche Mutationen von Genen aufweisen, die dieses Enzym kodieren. Der Folsäuremetabolismus ist in Hefen also nicht unweigerlich an Vitamin B₁₂ gekoppelt.

Wie für alle Enzyme des Folatmetabolismus stellen auch in Hefen die Polyglutamatformen die aktive Cofaktorform dar. [Schirch und Strong 1989; Cherest et al. 2000] Die optimale Länge

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

des Glutamatrestes allerdings scheint ein Kompromiss zu sein zwischen erhöhter Enzymaffinität und der noch gegebenen Möglichkeit, zwischen verschiedenen katalytischen Zentren transportiert werden zu können. [Scott et al. 2000]

Bislang wurden wenig Untersuchungen zu Folaten in Hefen unter Berücksichtigung der Polyglutamatverteilung angestellt. Schertel et al. [1965] konnten in Hefen Polyglutamate mit einem Glutaminsäurerest von maximal sieben Glutaminsäureeinheiten identifizieren. Allerdings erfolgte diese Identifizierung lediglich mittels Mikrobiologischem Assay unter Vergleich der Ergebnisse vor und nach enzymatischer Dekonjugation der Folate in der Hefeprobe. Die verschiedenen Polyglutamate wurden auf unterschiedliche Elutionsfraktionen einer Aufreinigung mittels Festphasenextraktion zurückgeführt, weshalb mit modernen chemisch-analytischen Methoden verlässlichere Ergebnisse erwartet werden. Mit Hilfe derer konnten Hjortmo et al. [2008a] 5-CH₃-H₄folate als die Hauptvitamere in Hefen identifizieren, gefolgt von H₄folaten sowie 5-CHO-H₄folaten. Die Polyglutamatverteilung wurde aber auch mittels der hier verwendeten HPLC in Kombination mit Fluoreszenzdetektion nicht ermittelt. Diese wiederum wurde von Ndaw et al. [2001] untersucht, welche das Hexa-, Hepta- und Okttaglutamat als die Hauptvitamere in Hefen identifizierten. Allerdings konnte mit der dazu verwendeten Methodik die Vitamerenverteilung der Polyglutamate nicht analysiert werden. Vor Analyse mittels HPLC-Fluoreszenz wurden hier alle Vitamere in die entsprechende 5-CH₃-H₄folat Polyglutamatform überführt, sodass die Information über die ursprüngliche Vitamerenform verloren ging.

2.7.3 Einflüsse auf die Folatproduktion in Hefen

Während wenig zur Verteilung der Folatvitamere in Hefen untersucht wurde, wurden einige Bestrebungen angestellt, die generelle Folatproduktion in Hefen positiv zu beeinflussen.

Ein erster Ansatz von Hjortmo et al. [2008a] beschäftigte sich mit der Auswirkung verschiedener Wachstumsphasen sowie verschiedener Kulturmedien auf die Folatproduktion. Diese Untersuchungen konnten zeigen, dass vor allem während der respiro-fermentativen Wachstumsphase der Hefen bevorzugt Folate gebildet werden bis zu Konzentrationsbereichen von 125 µg/g Trockengewicht. Mit Beginn einer Übergangsphase hin zum stationären Wachstum allerdings wird dieses wieder sukzessive abgebaut, bis letztlich ein Folatgehalt von etwa 10 µg/g Trockengewicht erreicht wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass die in Vollmedien enthaltenen Peptone inhibierende Wirkung hinsichtlich der Folatproduktion aufweisen. Die darin vorkommenden Aminosäuren Serin, Glutamin und Histidin konnten unter anderem für die verringerte Folatbildung verantwortlich gemacht werden, wohingegen durch Glycin- und Methioninzugabe eine Anreicherung von H₄folaten bzw. 5-CH₃-H₄folaten induziert wurde. Durch Bereitstellung dieser am C₁-Metabolismus beteiligten Aminosäuren wird eine Akkumulation

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

der entsprechenden Zwischenstufen hervorgerufen, welche üblicherweise unter Bildung dieser Aminosäuren weiterreagieren. [Hjortmo et al. 2008a]

Neben der Anwendung optimaler Bedingungen für ideales Hefewachstum konnte durch Verwendung von spezifischen Hefestämmen der Folatgehalt in einigen fermentierten Produkten wie etwa Brot, Gemüse und Milchprodukten um den Faktor zwei bis vier gesteigert werden. [Jägerstad et al. 2005; Hjortmo et al. 2008b]

Weitere Möglichkeiten zur Steigerung der Folatproduktion stellen biotechnologische Eingriffe in den Hefemetabolismus dar. In Hefen konnten bislang drei Gene identifiziert werden, welche die Folatproduktion hauptsächlich steuern: FOL2, FOL3 und DFR1, welche der Guanosinriphosphat Cyclohydrolase I (GTPCHI), DHFS und DHFR in Pflanzen ähneln. [Goncerzewicz und Misiewicz 2015] Durch Überexprimierung des Pteridinzwertes in Hefen mit Hilfe der Überexprimierung von FOL2 konnten dreifach höhere Folatgehalte erzielt werden im Vergleich zu Kontrollstämmen. Dagegen konnten durch Überexprimierung aller weiteren, für den Folatmetabolismus verantwortlichen Gene, keinerlei weitere Steigerung des Folatgehaltes erreicht werden. [Walkey et al. 2015; Liu et al. 2016] Im Allgemeinen führen Mutationen wie Einzelnucleotid-Polymorphismen (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) zu Funktionseinbußen der entsprechend codierten Enzyme. Technologische Hefestämme sind durch ihre Polyploidie und erhöhte genetische Stabilität an diese spontan auftretenden SNPs angepasst. Bei modifizierten Hefestämmen dagegen kann eine verringerte Enzymeffizienz die Folge sein. Daher wurden die höchsten Folatgehalte in Hefestämmen mit der höchsten genetischen Stabilität beobachtet. [Goncerzewicz und Misiewicz 2015] Zudem finden diese Hefestämme höhere Akzeptanz beim Verbraucher, da dieser genetisch modifizierten Organismen zunehmend kritischer gegenübersteht.

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

2.8 Arbeitsansatz und Aufgabenstellung

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Methodenentwicklung zur tiefergehenden Analyse der Folatmetaboliten in Hefen und deren Anwendung auf Hefekultivierungen. Somit gliederte sich diese Arbeit in die nachfolgend erläuterten Teilbereiche.

2.8.1 Weiterentwicklung und Optimierung von Methoden zur ganzheitlichen Analyse der Folatmetaboliten mittels LC-MS/MS

Wie bereits ausführlich erläutert wurde, fokussiert sich die Folatanalytik größtenteils auf quantitative Untersuchungen der Folatvitamere nach enzymatischer Dekonjugation. Wenige Methoden erfassen die natürlicherweise im Organismus vorliegende Polyglutamatform. [Garratt et al. 2005; Kopp et al. 2016] Grund hierfür sind vor allem der Mangel an verfügbaren Polyglutamatstandards sowie die hohe strukturelle Vielfalt der Folate. Methoden der *untargeted Metabolomics* dagegen versuchen, alle in einer Probe vorliegenden Metaboliten zu erfassen ohne vorhergehende Methodenoptimierung auf einen oder mehrere Metabolite. [Fiehn 2001; Fiehn 2002] Demnach bieten diese Methoden einen vielversprechenden Ansatzpunkt, um die Folatmetaboliten in der im Organismus vorliegenden Polyglutamatform nähergehend zu untersuchen.

Um die Veränderung der Metabolitenzusammensetzung während der Probenaufarbeitung zu unterbinden, erfolgt die Probenaufarbeitung für *untargeted Metabolomics* unter sehr schonenden Bedingungen. Zum Unterbinden von enzymatischen Reaktionen wird meist mit Extraktion in eiskalten Lösungsmitteln oder kurzzeitigem Sieden in gepufferter Ethanollösung gearbeitet. [Gonzalez et al. 1997; Fiehn 2001] Die klassische Extraktionsmethode zur Analyse der Folate dagegen beinhaltet üblicherweise einen oder mehrere Erhitzungsschritte zur Enzymdenaturierung einerseits sowie zur Freisetzung gebundener Folate andererseits. [Quinlivan et al. 2006; Saini et al. 2016b] Demnach soll zunächst eine optimale Methode gefunden werden, welche einerseits möglichst ganzheitlich und unverändert das Hefemetabolom wiedergibt und andererseits einen möglichst umfassenden Einblick in den Folatmetabolismus gewährt. Somit sollen spätere Aussagen des Folatmetabolismus im Kontext des Gesamtmetabolismus der Hefe gemacht werden können.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, verschiedene Extraktionsmethoden wie etwa das Sieden in gepufferter Ethanollösung [Gonzalez et al. 1997] sowie verschiedene Festphasenaufreinigungen hinsichtlich deren Extraktionseffektivität und deren Einfluss auf die Zusammensetzung der Folatmetaboliten zu untersuchen. Aus Versuchen mit Standardlösungen ist bereits bekannt, dass

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

die Vitamerenzusammensetzung stark von äußeren Einflüssen wie pH-Wert und Hitze abhängig ist. [Brouwer et al. 2007] Demnach sollen die Erkenntnisse dieser Untersuchungen für die spätere Anwendung auf Messungen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie angewendet werden. Dazu sollen zunächst quantitative und semi-quantitative Analysen der bereits bekannten Folatvitamere mittels LC-MS/MS durchgeführt werden. Zur Einschätzung von auftretenden Oxidationsreaktionen während der Probenaufarbeitung soll zudem das Oxidationsprodukt MeFox in die LC-MS/MS Methode von Striegel et al. [2018b] integriert werden.

2.8.2 Quantifizierung verschiedener Folat Mono- und Polyglutamate während der Kultivierung von Brauhefen

Untersuchungen von Hefekultivierungen konnten zeigen, dass hohe Folatgehalte mit der exponentiellen Wachstumsphase von Hefezellen korrelieren. [Hjortmo et al. 2008a] Allerdings wurden diese lediglich für die Hauptvitamere 5-CH₃-H₄folat sowie H₄folat nach enzymatischer Dekonjugation durchgeführt. Die Polyglutamate in Hefen wurden bislang nur nach Interkonversion aller Vitamere in das entsprechende 5-CH₃-H₄folat Polyglutamat analysiert. [Ndaw et al. 2001] Informationen bezüglich der allgemeinen Vitamerenverteilung sowie deren Polyglutamatverteilung fehlen bis dato. Diese Erkenntnisse allerdings sind beispielsweise von großer Bedeutung für die mögliche Anwendung in Supplementen auf Hefebasis. Dadurch könnte sodann der Kultivierungsprozess positiv beeinflusst werden, um möglichst hohe Folatgehalte der biologisch aktiven Folatvitamere zu erzielen.

Zum einen sollen somit die generellen Kultivierungsbedingungen optimiert werden, um eine erhöhte Folatproduktion in Brauhefen zu begünstigen. Andererseits sollen Erkenntnisse der Vitamerenzusammensetzung und deren Gehalte in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer erlangt werden. Dazu sollen verschiedene LC-MS/MS Methoden zur Untersuchung der Vitamerenzusammensetzung sowie der Polyglutamatverteilung angewendet werden. [Striegel et al. 2018b]

2.8.3 Entwicklung und Anwendung von Methoden zur Analyse der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

(Ultra-)hochauflösende Massenspektrometrie bietet auf Grund der hohen Auflösung und Massengenauigkeit die Möglichkeit der systematischen Identifikation unbekannter Metaboliten. Eine einzige Methodik ist dabei für die zweifelsfreie Strukturaufklärung aber nicht ausreichend. [Fiehn und Weckwerth 2003] Daher sollen nachfolgend Methoden für die orthogonale Analyse von Folatmetaboliten in Hefen mittels FT-ICR-MS sowie Q-ToF-MS entwickelt werden. Die FT-

2. Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

ICR-MS besticht durch extrem hohe Massengenauigkeit von < 1 ppm und Auflösungen von $R > 1.000.000$, welche unter Berücksichtigung verschiedener Kriterien für die Berechnung der Elementarzusammensetzung ausreichend sind. [Kind und Fiehn 2007] Die Q-ToF-MS dagegen gleicht schlechtere Massengenauigkeit und Auflösung durch zusätzliche Generierung von Fragmentierungsinformationen aus, welche bei der Strukturaufklärung helfen können.

Im Allgemeinen versuchen *untargeted Metabolomics* Studien die Probenvorbereitung auf ein Minimum zu reduzieren, wodurch ein hoher Probendurchsatz möglich ist. Zudem wird dadurch der Einfluss auf die Probe so gering wie möglich gehalten. *Targeted Metabolomics* dagegen bedienen sich oftmals verschiedener Aufreinigungs- und Aufkonzentrationsschritte der Metaboliten von Interesse. [Fiehn 2002] Für die Anwendung auf die Untersuchung der Folatmetaboliten in Hefen soll daher vergleichend ein „*dilute and shoot*“-Ansatz der klassischen Folatextraktion gegenübergestellt werden. Sowohl für die Analytik mittels FT-ICR-MS als auch für die Analytik mittels Q-ToF-MS soll sodann die Methode der Wahl herausgearbeitet werden. Die beiden Methoden sollen auf ihre Eignung zur Anwendung im Feld der Folatanalytik geprüft werden. Die Erkenntnisse sollen für die tiefergehende Analyse der Folatmetaboliten in Brauhefen während des Kultivierungsprozesses verwendet werden.

2.8.4 Identifizierung bislang unbekannter, folatähnlicher Metaboliten in Hefen mittels Metabolic Networking

Zur Aufklärung unbekannter Metaboliten bedient sich das Feld der *Metabolomics* einer Vielzahl an softwaregestützter Datenauswertung. Ein Ansatz vergleicht dabei Gemeinsamkeiten zwischen den generierten, hochaufgelösten Fragmentspektren und versucht darauf basierend Korrelationen zwischen den experimentell ermittelten Metaboliten herzustellen. Somit ist eine (Teil-)Strukturaufklärung unbekannter Metabolite möglich. [Wishart 2009; Wang et al. 2016] Diese Methodik soll auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Brauhefen angewendet werden. Potentielle, folatähnliche Metaboliten sollen dadurch herausgearbeitet, annotiert und soweit möglich identifiziert werden. Dazu sollen unter anderem verschiedene Standards synthetisiert und zu Hilfe genommen werden.

Teil II ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3 Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

Die Probenvorbereitung zur Analyse der Folate sollte optimiert werden, um spätere Untersuchungen mit (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie zu ermöglichen. Dazu wurden zum einen verschiedene Methoden zur Extraktion der Folate aus dem Modellorganismus Bäckerhefe (*S.cerevisiae*) getestet. Zum anderen wurde nach alternativen Aufreinigungsmethoden mittels Festphasenextraktion gesucht. Um die oxidativen Einflüsse während der Probenvorbereitung besser beurteilen zu können, wurde zunächst die Methode zur Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes erweitert um das oxidative Abbauprodukt s-Pyrazino-triazin (MeFox) des Hauptvitameres im Hefeorganismus 5-CH₃-H₄folat. Eine Validierung der Integration des Analyten MeFox in die bestehende SIVA-Methode wurde durchgeführt.

3.1 Erweiterung der SIVA-Methode zur Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes um das Oxidationsprodukt MeFox

Die Methode zur Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes wurde zunächst um das Oxidationsprodukt MeFox erweitert und einer Validierung unterzogen.

3.1.1 Auswahl einer geeigneten MeFox-freien Matrix

Für die Validierung der Methode musste zunächst eine MeFox-freie Matrix gefunden werden. Dazu wurde der Modellorganismus Hefe einigen Methoden zur Zerstörung der Folate unterzogen. Stabilitätsstudien hatten eine Reduktion bei Licht- und Hitzeeinfluss gezeigt. [Blair und Pearson 1974; Reed und Archer 1980; Jägerstad und Jastrebova 2013; Delchier et al. 2014] Demnach wurden exzessiver Lichteinfluss (UV-Licht sowie Tageslicht) und eine mehrstündige Hitzebehandlung gewählt. Die Signale der übrigen Folate konnten dadurch erfolgreich reduziert werden. Wie vermutet, erhöhte sich allerdings im Gegenzug die Intensitätsstärke des MeFox-Signales (vgl. Anhang 1). Da alle Versuche der Zerstörung vorhandener Folate zu vermehrter Bildung des Oxidationsproduktes MeFox führten, wurde auf die Verwendung einer Modellmatrix zurückgegriffen. Diese basierte auf Cellulose, welcher die Hauptaminosäuren Isoleucin, Threonin, Leucin, Valin und Lysin sowie die Hauptfettsäure Ölsäure in den natürlicherweise in Hefezellen vorkommenden Verhältnissen beigemischt wurden. Selbst in dieser

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

Matrix waren geringfügige MeFox-Signale detektierbar. Daher wurde mit allen Validierungsproben sowie während jeder Probenaufarbeitung eine Blankaufarbeitung mitgeführt, um die MeFox-Signale der Proben durch spätere Subtraktion der Blanksignale zu eliminieren.

3.1.2 Kalibrierfunktionen

Um mittels SIVA und LC-MS/MS quantitative Ergebnisse zu erzielen, müssen zunächst Kalibrierfunktionen aufgenommen werden. Die Konzentration der für die Response verwendeten Referenzanalyten wurde bei jeder Aufarbeitung neu bestimmt, da auch für diese Analyten ein Abbau während der Lagerung bei -20 °C angenommen wird. Daher wurde zunächst eine Kalibrierfunktion für MeFox unter Verwendung von PteGlu als internem Standard erstellt. Es wurden verschiedene Stoffmengenverhältnisse $n(A)/n(ISTD)$ zwischen 0,1 und 1 erstellt und mittels HPLC-DAD vermessen.

Die Quantifizierung der Folatvitamere in Lebensmittelproben erfolgte über die Zugabe eines isotopologen Standards. Da für MeFox kein [$^{13}C_5$] isotopenmarkierter Standard zur Verfügung stand, wurde alternativ der isotopenmarkierte Standard [$^{13}C_5$]-5-CHO-H₄folat herangezogen. Es wurde eine Kalibrierfunktion im Stoffmengenverhältnis $A(A)/A(ISTD)$ zwischen 0,06 und 20 erstellt und mittels LC-MS/MS vermessen. Die Linearität beider Kalibrierfunktionen wurde mit Hilfe des Tests auf Linearität nach Mandel [1984] überprüft. Die Kalibrierbereiche und zugehörigen Kalibrierfunktionen sind nachfolgend in Tabelle 3.1 gelistet.

Tabelle 3.1 Kalibrierfunktionen zur Bestimmung der Konzentration des Analyten MeFox in Hefeproben.

Analysegerät	Kalibrierfunktion	Bestimmtheitsmaß	Linearität $n(A)/n(ISTD)$
HPLC-DAD	$y = 0,3200x - 0,0001$	$R^2 = 0,9999$	0,32 – 5,27
LC-MS/MS	$y = 0,4900x + 0,0008$	$R^2 = 0,9999$	0,05 – 8,49

3.1.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NWG, BG) wurden nach der von Vogelgesang und Hädrich [1998] veröffentlichten Methode bestimmt. Dazu wurde die MeFox-freie Matrix aufsteigend mit verschiedenen Mengen des Analyten dotiert und nach Abschnitt 13.3 analysiert. Die Dotierniveaus begannen dabei bei der erwarteten Nachweisgrenze (abgeschätzt über das Signal/Rausch-Verhältnis von 3) und wurden erweitert bis zum zehnfachen Wert. Jedes Dotierniveau wurde in Dreifachbestimmung und Dreifachinjektion analysiert. Nach Vogelgesang und Hädrich [1998] wurden drei verschiedene Methoden zur Berechnung der Bestimmungsgrenze

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

herangezogen, wobei der höchste der drei Werte als tatsächliche Bestimmungsgrenze angenommen wurde. Die Nachweisgrenze wurde damit auf 0,80 µg/100 g bestimmt, die Bestimmungsgrenze zu 2,53 µg/100 g.

Diskussion von NWG und BG

Verglichen mit den übrigen Analyten waren NWG und BG des Analyten MeFox um Faktor 2 bis 5 höher. Die NWG dieser übrigen Analyten liegt zwischen dem Wert 0,17 und 0,33 µg/100 g, während die BG zwischen Werten von 0,51 und 0,96 µg/100 g liegt. [Striegel et al. 2018b] Diese Abweichungen waren vermutlich der unvermeidbaren MeFox-Belastung der für die Validierung verwendeten MeFox-freien Matrix geschuldet. Des Weiteren ist anzumerken, dass die Bestimmung von NWG und BG für die übrigen Analyten mit einer Einwaage von 50 – 300 mg durchgeführt wurde, während hier beim Analyten MeFox eine Einwaage von 10 mg gewählt wurde. Es finden sich kaum vergleichbare Validierungsparameter anderer Arbeitsgruppen von MeFox. Einzig Fazili und Pfeiffer [2013] schätzten die NWG von MeFox an Hand der dreifachen Standardabweichung einer Blankprobe ab. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit der Matrixeffekt durch Verwendung und Aufarbeitung einer dotierten MeFox-freien Matrix berücksichtigt. Daher kann diese NWG nicht als Vergleich herangezogen werden. In der Literatur finden sich ermittelte Nachweisgrenzen bis zu einer Höhe von 4,0 µg/100 g für die übrigen Folatanalyten. [Chandra-Hioe et al. 2011] Somit lag die im Zuge dieser Arbeit ermittelte NWG für MeFox nochmals um Faktor 5 tiefer als die Werte anderer Arbeitsgruppen. Demnach sprach der ermittelte Wert der NWG für die generelle Empfindlichkeit der Methode auch zur Quantifizierung des Analyten MeFox.

3.1.4 Wiederfindung

Für die Bestimmung der Wiederfindung wurde die MeFox-freie Matrix mit drei verschiedenen Konzentrationsniveaus des Analyten MeFox versetzt und nach Abschnitt 13.3 analysiert. Die Niveaus wurden dabei so gewählt, dass die Konzentrationen unterhalb, innerhalb und oberhalb des vermuteten MeFox-Gehaltes in Hefen lag. Die ermittelten Wiederfindungen sind in der nachfolgenden Tabelle 3.2 gelistet.

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

Diskussion der Wiederfindung

Die Wiederfindungen des Analyten MeFox lagen im Bereich zwischen 97,6 % und 113 % und befanden sich damit in dem von Vogelgesang und Hädrich [1998] als zulässig definierten Bereich von 70 % bis 120 %. Somit konnte die Richtigkeit der SIVA-Methode bestätigt werden.

Tabelle 3.2 Wiederfindung des Analyten MeFox nach Bestimmung mittels LC-MS/MS nach Vogelgesang und Hädrich [1998].

Dotierniveau [$\mu\text{g}/100 \text{ g}$]	Experimentell ermittelte Konzentration [$\mu\text{g}/100 \text{ g}$]	Wiederfindung [%]
1,91	1,89	97,6 \pm 7,67
47,9	53,7	111 \pm 2,33
141	161	113 \pm 4,74

3.1.5 Präzision

Zur Bestimmung der Inter-day Präzision wurde die Hefeprobe in Vierfachbestimmung an drei verschiedenen Tagen innerhalb von drei Wochen aufgearbeitet und vermessen. Für die Bestimmung der Intra-day Präzision wurde eine Hefeprobe in Vierfachbestimmung aufgearbeitet und mittels LC-MS/MS analysiert. Zur Bestimmung der Gerätepräzision wurde die Hefeprobe aufgearbeitet und in Zehnfachinjektion mittels LC-MS/MS analysiert. Alle ermittelten Präzisionen sind zusammenfassend in Tabelle 3.3 aufgelistet.

Tabelle 3.3 Präzisionen des Analyten MeFox nach Bestimmung mittels LC-MS/MS; STDA = Standardabweichung.

Intra-day Präzision [% STDA] (n=4, i=12)	Inter-day Präzision [% STDA] (n=12, i=36)	Gerätepräzision [% STDA] (n=1, i=10)
2,75	6,03	4,60

Diskussion der Präzisionen

Im Vergleich mit den übrigen Analyten zeigten sich für alle Präzisionen sehr ähnliche Werte. Die Intra-day Präzision liegt für die übrigen Analyten in einem Bereich zwischen 2,44 % und 4,60 %, womit die Intra-day Präzision von MeFox in diesen Bereich fiel. Die Inter-day Präzision für die restlichen Analyten liegt zwischen 3,04 % und 5,06 %. Somit fiel die für den Analyten MeFox bestimmte Präzision nur geringfügig schlechter aus. Der ermittelte Wert der Gerätepräzision mit 4,60 % lag ebenfalls im Bereich von 1,92 % bis 4,46 % der übrigen Analyten. Insgesamt konnte also eine gute Reproduzierbarkeit der MeFox-Quantifizierung angenommen werden.

3.2 Entwicklung einer alternativen Probenextraktion von Folaten aus Hefen

Ziel metabolomischer Untersuchungen ist es, die Metabolitenzusammensetzung in einem Organismus möglichst unverändert abzubilden. Daher kommt der Probenvorbereitung in diesen Studien eine hohe Bedeutung zu. Diese sollte eine möglichst vollständige Extraktion der Metaboliten unter Vermeidung von Abbaureaktionen ermöglichen. [Koning und van Dam 1992; Gonzalez et al. 1997; Villas-Boas et al. 2005; Canelas et al. 2009] Beide Faktoren stellen hinsichtlich der Folate eine große Herausforderung dar. Das liegt zum einen daran, dass Folate hauptsächlich intrazellulär gebunden vorliegen und somit eine vollständige Extraktion dieser Vitamere erschwert wird. [Seyoum und Selhub 1998b; Hjortmo et al. 2005] Andererseits handelt es sich um eine Gruppe von Vitaminen, welche empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen wie Licht, Sauerstoff oder Hitze sind und recht schnell Oxidations- und Abbaureaktionen eingehen. [Indrawati et al. 2005; Delchier et al. 2014; Gazzali et al. 2016]

Die Probenvorbereitung in metabolomischen Studien bedient sich für gewöhnlich recht schonender Methoden wie einer Extraktion in eiskalten Lösungsmittelgemischen. [Vuckovic 2012] Zur Extraktion der Metaboliten aus Hefen hat sich auch ein Sieden in ethanolischen Lösungsmitteln etabliert. [Gonzalez et al. 1997; Canelas et al. 2009] Im Gegensatz dazu beinhaltet die klassische Folatextraktion Erhitzungsschritte zur Denaturierung von Konjugasen einerseits sowie andererseits zur vollständigen Freisetzung intrazellulär gebundener Folatderivate. [Wilson und Horne 1984; Arcot und Shrestha 2005; Quinlivan et al. 2006] Diese Erhitzungsschritte aber begünstigen eben jene Oxidations- und Abbaureaktionen, die in metabolomischen Analysen so gut wie möglich vermieden werden. Demnach war es Ziel, eine Methode zu entwickeln, welche effektiv die Folatvitamere extrahiert und zugleich möglichst schonende Bedingungen verwendet, zum Schutz der tatsächlichen Metabolitenzusammensetzung im Organismus.

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

3.2.1 Optimierung der alternativen Probenextraktion

Als Kompromiss zwischen schonender Probenaufarbeitung und effektiver Folatextraktion stellte die Methode des Siedens in Ethanol eine vielversprechende Alternative zur klassischen Folatextraktion dar. [Gonzalez et al. 1997; Canelas et al. 2009] Ethanol verändert nachweislich die Struktur von Zellmembranen und erhöht die Permeabilität dieser. [Goldstein 1986; Patra et al. 2006] Demnach lag die Vermutung nahe, dass die Erhitzungsschritte zur Freisetzung gebunden vorliegender Folate durch einen Siedeschritt in ethanolischen Pufferlösungen ersetzt werden können.

Zunächst wurde die Extraktion basierend auf der Vorschrift von Gonzalez et al. [1997] schrittweise optimiert und mit der klassischen Folatextraktionsmethode zur Analyse der Polyglutamate (Kapitel 13.5) verglichen, um die Effektivität der Extraktion abschätzen zu können. Um ein erweitertes Polyglutamatspektrum zu erfassen, wurde die LC-MS/MS-Methode um die zugehörigen Massenübergänge der Polyglutamate (1-8) der metabolisch aktiven Analyten 5-CHO-H₄folat sowie H₄folat erweitert. Das Messzeitfenster von 5-CHO-H₄PteGlu₁₋₈ wurde zudem so angepasst, dass auch eine Detektion der Oxidationsprodukte MeFox-Glu₁₋₈ möglich war.

Für die Methodenoptimierung wurde den Proben zu Beginn eine definierte Menge des internen Standards (ISTD) [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat zugegeben, um über das Peakflächenverhältnis A(A)/A(ISTD) eine Vergleichbarkeit der getesteten Methoden zu ermöglichen. Hauptunterschied der Methoden bestand im Folatextraktionsschritt. Dieser wurde durch Sieden bei 80 °C in gepufferter Ethanollösung im Falle der alternativen Probenextraktion erreicht, während bei der klassischen Extraktion ein zehnminütiger Erhitzungsschritt bei 100 °C durchgeführt wurde. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der Methoden zu erreichen, wurde nach dem Siedeschritt der Ethanolanteil der gepufferten Ethanollösung am Rotationsverdampfer entfernt und die Probe in 10 mL Extraktionspuffer (Phosphatpuffer) aufgenommen. Alle weiteren Aufarbeitungsschritte wurden von der klassischen Extraktionsmethode (Kapitel 13.5) übernommen.

Es wurden verschiedene Ansätze zur Extraktion mittels des Siedens in Ethanol getestet, welche in Tabelle 3.4 zusammengefasst sind. Zum einen wurde der anteilige Puffer in der gepufferten Ethanollösung variiert. Getestete Puffer waren 0,1 M HEPES-Puffer (Extraktionspuffer 3, Ansatz 1 – 5) sowie 0,1 M Phosphatpuffer (Extraktionspuffer 4, Ansatz 6 – 7). Im Gegensatz zur klassischen Extraktion der Polyglutamate wurde bei letzterem auf die Zugabe von EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) aus Gründen der Unlöslichkeit in Ethanol verzichtet. Bei der klassischen Polyglutamataextraktionsmethode wird dieses als chemisches Zellaufschlussmittel

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

zugegeben. [Elferink 1974] Da auch Ethanol die Permeabilität von Zellmembranen erhöht, konnte auf diesen Zusatz verzichtet werden. Neben der Pufferlösung wurden zudem verschiedene Volumina der gepufferten Ethanollösung (Ansatz 1 – 3) sowie verschiedene Extraktionslängen (Ansatz 1 und Ansatz 4 – 5 sowie Ansatz 6 – 7) getestet und mit der klassischen Extraktion der Polyglutamate verglichen (Referenz).

Tabelle 3.4 Getestete Ansätze zur Folatextraktion mittels des Siedens in gepufferter Ethanollösung.

Ansatz	Anteilige Pufferlösung in gepufferter Ethanollösung	Gesamtvolumen Extraktionspuffer [mL]	Siedezeit [min]
Ansatz 1	0,1 M HEPES-Puffer	21	3
Ansatz 2	0,1 M HEPES-Puffer	30	3
Ansatz 3	0,1 M HEPES-Puffer	40	3
Ansatz 4	0,1 M HEPES-Puffer	21	5
Ansatz 5	0,1 M HEPES-Puffer	21	7
Ansatz 6	0,1 M Phosphatpuffer	21	3
Ansatz 7	0,1 M Phosphatpuffer	21	5

Bei Betrachtung des Flächenverhältnisses $A(A)/A(ISTD)$ konnten von den getesteten Methoden mit Ansatz 7 die besten Ergebnisse erzielt werden, wie aus Abbildung 3.1 hervorgeht. Die Erhöhung des Volumens der Extraktionslösung von 21 mL (Ansatz 1) auf 30 mL (Ansatz 2) und 40 mL (Ansatz 3) hatte für alle metabolisch aktiven Analyten (H_4 folate, $5-CH_3-H_4$ folate und $5-CHO-H_4$ folate) eine leicht verbesserte Extraktion zur Folge. Allerdings waren die erzielten Unterschiede gering und rechtfertigten die damit verbundene Verlängerung des Abrotierungsschrittes der gepufferten Ethanollösung nicht. Somit wurde das Extraktionsvolumen bei 21 mL belassen. Eine Verlängerung der Siedezeit auf 5 min resultierte in erhöhter Folatextraktion sowohl für die Verwendung von HEPES-Puffer (Ansatz 1 im Vergleich zu Ansatz 4) als auch für die Verwendung von Phosphatpuffer (Ansatz 6 im Vergleich zu Ansatz 7). Eine weitere Verbesserung durch Erhöhung auf 7 min (Ansatz 5) konnte nicht erzielt werden, weshalb eine Siedezeit von 5 min gewählt wurde. Eine weitere Verbesserung brachte die Verwendung von Phosphatpuffer statt HEPES-Puffer (Ansatz 7 im Vergleich zu Ansatz 4), weshalb dieser für alle weiteren Untersuchungen gewählt wurde. Letztlich wurde eine Siedezeit von 5 min bei 80 °C in 21 mL gepufferter Ethanollösung, bestehend aus 2 mL Phosphatpuffer und 19 mL Ethanol, gewählt.

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

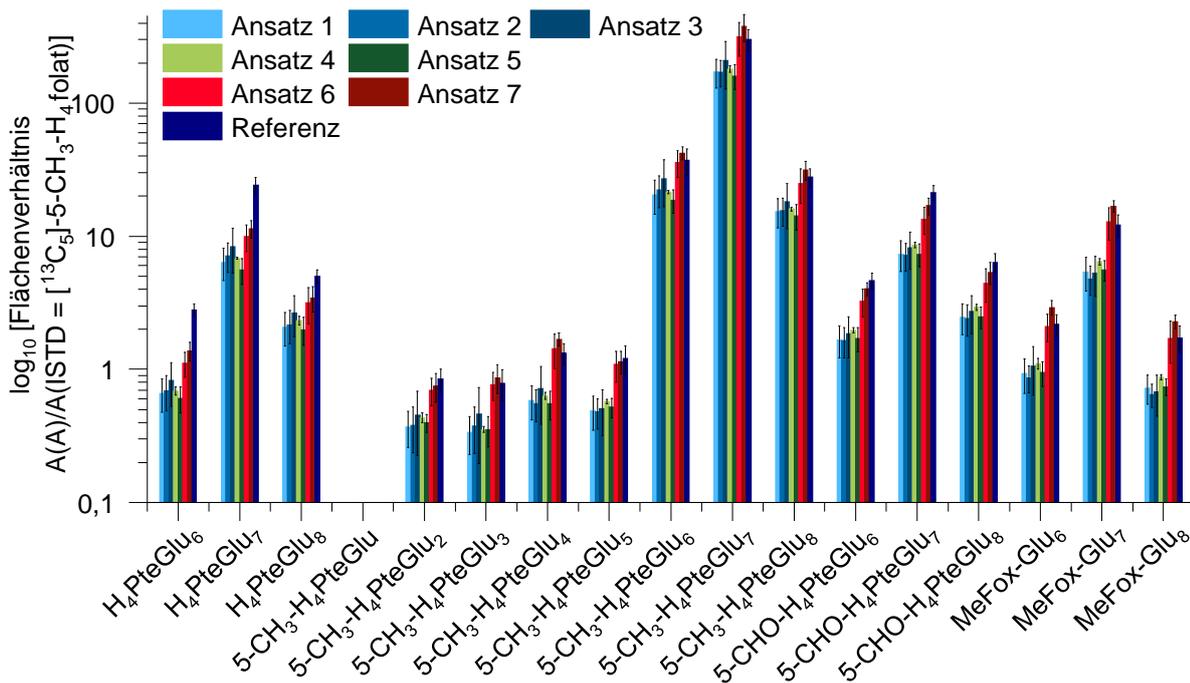


Abbildung 3.1 Flächenverhältnisse $A(A)/A(ISTD = [^{13}C_5]-5-CH_3-H_4folat)$ für verschiedene Folatvitamere mit den getesteten Ansätzen (vgl. Tabelle 3.4) zur Folatextraktion mittels des Siedens mit gepufferter Ethanol-lösung.

Um die Einflüsse auf das Metabolom der zu untersuchenden Probe so gering wie möglich zu halten, wurde in einem nächsten Schritt auf die Entfernung des Ethanolanteils der gepufferten Ethanol-lösung verzichtet. Stattdessen wurde letztere Lösung zentrifugiert und der Überstand für die Aufreinigung und Aufkonzentrierung mittels Festphasenkartuschen (SAX-Kartuschen) verwendet. Allerdings konnten in den so aufgereinigten Eluaten keinerlei Folatvitamere mehr detektiert werden. Auch in den Probenauftragungs- und Wascheluatn der Festphasenextraktion fanden sich keine Folatvitamere. Demnach wurde für alle nachfolgenden Untersuchungen der Ethanolanteil der gepufferten Ethanol-lösung nach erfolgreicher Folatextraktion am Rotationsverdampfer entfernt und die verbleibende Probe in 10 mL Phosphatpuffer aufgenommen.

Diskussion der Optimierung der alternativen Probenextraktion

Durch schrittweises Anpassen der Methode nach Gonzalez et al. [1997] konnte eine alternative Methode zur Folatextraktion aus Hefeproben basierend auf Sieden in gepufferter Ethanol-lösung entwickelt werden. Im Vergleich zur klassischen Extraktionsmethode durch zehnmütiges Erhitzen auf 100 °C in Pufferlösungen konnte für die Polyglutamate des Hauptvitameres $5-CH_3-H_4folat$ mittels des Siedens in gepufferter Ethanol-lösung eine geringfügig höhere Extraktion der Folate erzielt werden. Allerdings zeigte sich diese erhöhte Extraktion auch bei Betrachtung der Oxidationsprodukte ($MeFox-Glu_n$) dieser Vitamere. Prozentual betrug dieser

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

Anteil von MeFox am entsprechenden 5-CH₃-H₄folat im Mittel 6,2 % bei der entwickelten Siedemethode. Bei der klassischen Aufarbeitung betrug dieses Verhältnis dagegen durchschnittlich 5,3 %. Demnach konnte nicht ausgeschlossen werden, dass mit der entwickelten Methode – entgegen der Zielsetzung – Oxidationsreaktionen während der Probenaufarbeitung zusätzlich begünstigt wurden.

Für die verbleibenden Hauptvitamere konnte mit der entwickelten alternativen Methode allerdings nicht die Effektivität der klassischen Methode erreicht werden. Um diese Effektivität der Siedemethode genauer abschätzen zu können, wurde eine absolute Quantifizierung des Gesamtfolatgehaltes sowie eine relative Quantifizierung der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate (1-7) durchgeführt, welche nachfolgend erörtert wird.

3.2.2 Bewertung der alternativen Probenextraktion im Vergleich zu den Standardmethoden durch (Semi-)Quantifizierungen

Zur Bewertung der entwickelten alternativen Methode mittels des Siedens in gepufferter Ethanollösung wurden quantitative und semi-quantitative Bestimmungen der Folatgehalte herangezogen.

3.2.2.1 Vergleich der Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes mit der Standardmethode

Die entwickelte alternative Probenextraktion mittels des Siedens in Ethanol wurde vordergründig entwickelt, um eine schonendere Extraktion des gesamten Folatspektrums auf Polyglutamatebene zu ermöglichen. Daher war eine direkte Übertragung der Methode zur Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes nicht ohne weiteres möglich. Um dennoch die Vitamerverteilung und deren quantitative Gehalte zwischen den beiden Methoden – der Standardmethode sowie der alternativen Siedemethode – abschätzen zu können, wurde die neu entwickelte Methode geringfügig modifiziert. Bei der standardmäßigen Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes wird die Folatextraktion wie bei der klassischen Bestimmung der Polyglutamate durch einen zehnmütigen Erhitzungsschritt auf 100 °C erreicht. Dieser Schritt wurde – analog zur Siedemethode – ersetzt durch fünfminütiges Sieden in Ethanol. Wie bei der entwickelten Siedemethode wurde für die Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes anschließend der Ethanolanteil am Rotationsverdampfer entfernt und das verbleibende Probeneluat in Elutionspuffer 1 aufgenommen. Zur Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes nach der klassischen Methode werden den Proben üblicherweise Konjugasen in Form von Hühnerpankreatin und Rattenserum zugesetzt. Diese dekonjugieren die im Organismus als Polyglutamate vorliegenden Folate zu

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

den entsprechenden Monoglutamaten. Demnach musste dieser Schritt auch für die Siedemethode übernommen werden, um eine Quantifizierung des Gesamtfolatgehaltes zu erreichen. Dieser Schritt erfolgte nach Entfernen des anteiligen Ethanols und Wiederaufnahme des verbleibenden Probeneluates in Elutionspuffer 1. Nach Inkubation über Nacht wurden die Konjugasen durch zehnmütiges Erhitzen bei 100 °C denaturiert und anschließend mittels Festphasenextraktion aufgereinigt. Dieser Erhitzungsschritt musste ebenfalls für die alternative Bestimmung des Folatgehaltes nach Folatextraktion durch Sieden in gepufferter Ethanollösung übernommen werden. Folglich konnten bei der Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes nach der Siedemethode die Erhitzungsschritte nicht komplett vermieden werden.

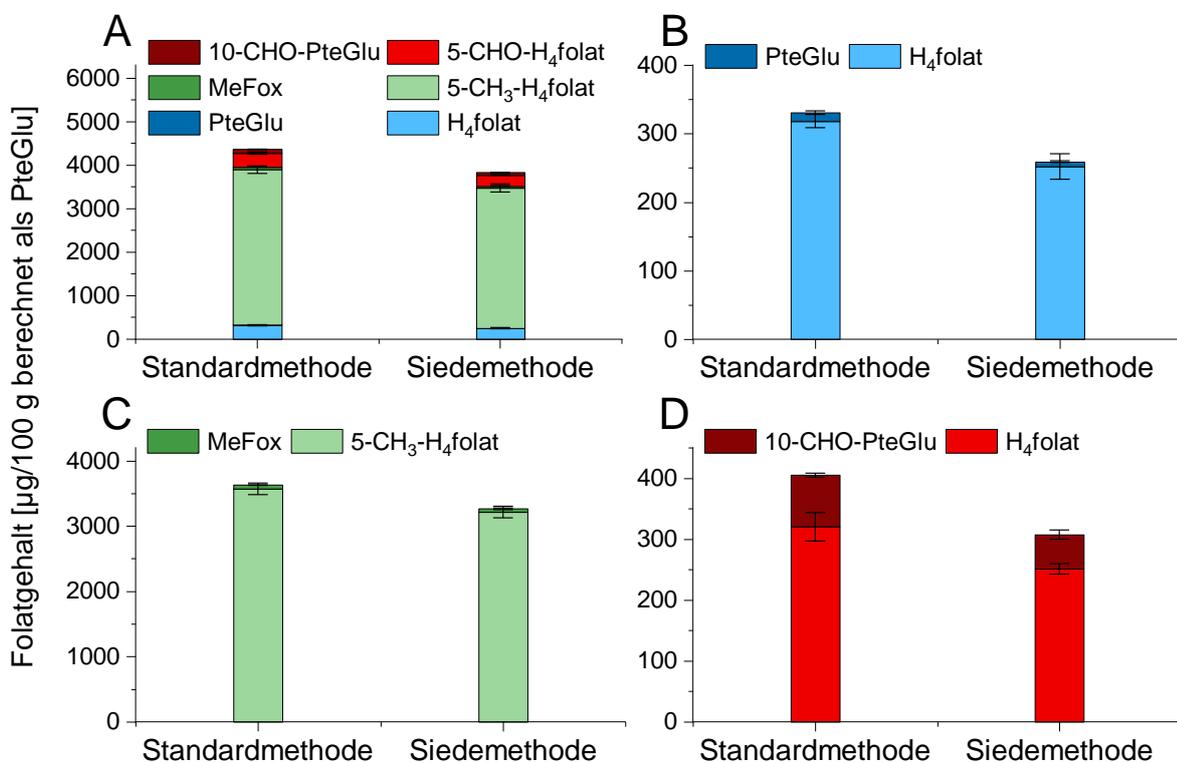


Abbildung 3.2 Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes in Bäckerhefe mit der Standardmethode im Vergleich zur Folatextraktion durch Sieden in gepufferter Ethanollösung.

Diskussion der Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes im Vergleich mit der Standardmethode

Im direkten Vergleich der beiden Methoden (Abbildung 3.2) zeigten sich für alle Vitamere deutlich geringere Folatgehalte für die Siedemethode im Vergleich zur Standardmethode. Im Mittel wurden mit der Siedemethode 25 % geringere Folatgehalte detektiert (Tabelle 3.5). Diese Unterschiede fielen mit einer Differenz von lediglich 10 % beim mengenmäßig dominierenden Hauptvitamer 5-CH₃-H₄folat am geringsten aus. Somit wich die Summe aller Vitamere nur um 12 % von der Standardmethode ab. Die Optimierung der Siedemethode wurde vordergründig

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

hinsichtlich der Polyglutamate des Vitameres 5-CH₃-H₄folat vorgenommen, was die relativ zur Standardmethode gesehen besten Ergebnisse für dieses Vitamer erklären würde. Generell konnte aber von einer verringerten Extraktion der Folate mit Hilfe der Siedemethode ausgegangen werden.

Tabelle 3.5 Prozentuale Differenz der Gesamtfolatgehalte bestimmt nach der Siedemethode im Vergleich zur Standardmethode.

	PteGlu	H₄folat	5-CH₃- H₄folat	MeFox	5-CHO- H₄folat	10- CHO- PteGlu
Differenz der Siedemethode zur Standardmethode [%]	- 44	- 21	- 10	- 19	- 22	- 34

3.2.2.2 Bestimmung der relativen Wiederfindung der Polyglutamate durch Quantifizierung der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate (1-7) und deren absoluter Wiederfindung

Um die Effektivität der Folatextraktion mittels des Siedens in gepufferter Ethanollösung besser abschätzen zu können, wurde ein weiterer Ansatz gewählt. Da die Siedemethode als alternative Aufreinigung zur Ermittlung des gesamten Folatpolyglutamatspektrums entwickelt und optimiert worden war, wurde dazu die relative Wiederfindung der Polyglutamate 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₇ bestimmt. Mangels ausreichender Mengen an verfügbaren Polyglutamatstandards konnte die Wiederfindung nicht direkt an Hand geeigneter Responsegeraden für die alternative Siedemethode bestimmt werden. Daher wurde die relative Wiederfindung als Quotient aus absoluter Wiederfindung und der Quantifizierung mittels SIVA-Methode bestimmt. Die absolute Wiederfindung wurde dabei durch Zugabe des internen Standards direkt vor der Messung mittels LC-MS/MS ermittelt, wohingegen bei der Quantifizierung der ISTD bereits zu Beginn der Probenaufarbeitung zugesetzt wurde. Für diese Bestimmungen konnten die Responsegeraden der Standardmethode für die alternative Siedemethode übernommen werden, da letztlich nur relative Werte von Interesse waren. Zudem wurde bei beiden Methoden derselbe Elutionspuffer verwendet, wodurch ähnliche Matrixeffekte in den Probenextrakten angenommen werden konnten. Die Bestimmung der absoluten Wiederfindung sowie die Quantifizierung der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate erfolgte demnach nur unter Vorbehalt, um ein relatives Verhältnis der beiden Werte ermitteln zu können. Daher wird an dieser Stelle auf die Nennung der quantifizierten Werte verzichtet.

Zur Bestimmung der relativen Wiederfindung wurde zunächst der Gehalt der Vitamere 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₇ nach der Standardmethode (Kapitel 13.4) bestimmt. Vergleichend wurde diese Quantifizierung für die Siedemethode durchgeführt (Kapitel 13.7). Für die Ermittlung der absoluten Wiederfindung wurde bei beiden Aufarbeitungen der interne Standard erst vor der

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

Messung mittels LC-MS/MS zugegeben. Damit konnte die absolut extrahierte Menge an Polyglutamat für beide Methoden bestimmt werden. Die relative Wiederfindung letztlich stellte den Quotienten beider Werte dar und wurde für jedes Polyglutamat sowie deren Gesamtsumme bestimmt (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6 Relative Wiederfindung der 5-CH₃H₄folat Polyglutamate nach Folatextraktion mittels der Standard- und Siedemethode.

	Relative Wiederfindung [%]							
	n = 1	n = 2	n = 3	n = 4	n = 5	n = 6	n = 7	n = 1 - 7
Standardmethode	54,6	60,5	25,6	22,9	14,9	29,9	28,2	29,1
Siedemethode	2,3	7,4	3,1	4,5	0,23	0,5	4,9	5,7

Diskussion der Bestimmung der relativen Wiederfindungen der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate

Der Vergleich der relativen Wiederfindungen zeigte deutliche Einbußen der Folatextraktion mittels des Siedens in gepufferter Ethanollösung im Vergleich zur Standardmethode. Diese lag für die Summe der Polyglutamate 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₇ bei 19 % der Effizienz verglichen mit der klassischen Folatextraktion durch Erhitzen auf 100 °C (Tabelle 3.7). Analog zur Bestimmung der Gesamtfolatgehaltes zeigte sich auch hier eine verminderte Extraktion der Folate mittels des Siedens in gepufferter Ethanollösung.

Tabelle 3.7 Effizienz der Extraktion der Polyglutamate 5-CH₃-H₄PteGlu_n mit Hilfe des Siedens in gepufferter Ethanollösung im Verhältnis zur klassischen Folatextraktion.

Effizienz der Extraktion von 5-CH ₃ -H ₄ PteGlu _n [%]							
n = 1	n = 2	n = 3	n = 4	n = 5	n = 6	n = 7	n = 1 - 7
4,3	12	12	20	1,6	1,8	17	19

3.2.3 Vergleichendes Fazit und Diskussion der alternativen Probenextraktion

Durch schrittweise Optimierung der Methode nach Gonzalez et al. [1997] konnte eine alternative Methode zur Extraktion der Folate unter Vermeidung des zehnmütigen Erhitzungsschrittes entwickelt werden. Dieser Erhitzungsschritt wurde ersetzt mit fünfminütigem Sieden bei 80 °C in gepufferter Ethanollösung. Die semi-quantitative Bestimmung des Flächenverhältnisses der Polyglutamatanalyten gegenüber dem zugesetzten internen Standard ([¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat) zeigte eine vergleichbare und sogar geringfügig bessere Extraktion der 5-CH₃-H₄PteGlu Polyglutamate für diese alternative Folatextraktion.

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

Die Effizienz der Methode wurde untersucht an Hand der Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes und der relativen Wiederfindung der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate. Es wurde versucht, die ursprünglich zur Extraktion von Polyglutamaten entwickelte Methode so gut wie möglich auf die Methode zur Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes zu übertragen. Eine vollständige Vermeidung aller Erhitzungsschritte konnte dabei allerdings nicht vermieden werden, da eine Denaturierung der zugesetzten Konjugasen vor Aufreinigung mittels Festphasenextraktion erreicht werden musste. Im Vergleich mit der klassischen Folatextraktion zeigten sich für alle Vitamere deutlich geringere Folatgehalte nach Folatextraktion mittels des Siedens in gepufferter Ethanollösung.

Diese Annahme wurde zusätzlich auf Polyglutamatebene durch Bestimmung der relativen Wiederfindung beider Methoden untersucht. Der Methodenvergleich zeigte nochmals deutlich reduzierte Effizienz der Siedeextraktion. Während bei der Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes mit der Siedemethode im Mittel noch 75 % der Folatanalyten extrahiert werden konnten, lag dieser Wert für die Polyglutamate nur bei 19 %. Dies zeigte, dass bei der Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes der zweite, unvermeidbare Erhitzungsschritt nochmals einen deutlichen Beitrag zur vollständigeren Folatextraktion leistete. Dieser Schritt war notwendig, um eine Enzymdenaturierung der Konjugasen zu erreichen. Zudem ist bekannt, dass die eingesetzten Konjugasen auch andere Enzyme wie etwa Amylasen enthalten, welche eine Freisetzung gebunden vorliegender Folatvitamere ermöglichen. [Pedersen 1988] Demnach könnte die geringere Abweichung des Gesamtfolatgehaltes im Vergleich zur Bestimmung der Polyglutamate nach Aufarbeitung durch Sieden in gepufferter Ethanollösung dieser erhöhten Freisetzung gebunden vorliegender Folatvitamere zuzuschreiben sein.

Im Allgemeinen wurde deutlich, dass die Folatextraktion mittels Siedemethode noch weiterer Optimierung bedarf, um die Effizienz der klassischen Folatextraktion zu erreichen. Ein möglicher Ansatz hierfür wäre etwa die Erhöhung des Puffervolumens, wie dies bereits zu Beginn der Methodenoptimierung versucht wurde. Allerdings ist damit ein erheblicher zeitlicher Mehraufwand verbunden. Mit erhöhtem Puffervolumen steigt auch der Ethanolanteil, welcher nach der Folatextraktion durch Sieden wieder entfernt werden muss. Zudem war die Effizienz der alternativen Siedemethode mit 19 % verglichen zur klassischen Folatextraktion deutlich reduziert. Um mit der alternativen Siedemethode eine annähernd gute Extraktion zu erreichen, wären noch einige Optimierungsschritte notwendig gewesen. Eine weitere, zusätzliche Beeinflussung der Metabolitenzusammensetzung in der untersuchten Hefe verglichen mit dem zehnminütigen Erhitzungsschritt konnte dadurch aber nicht ausgeschlossen werden.

Zudem hatte der Vergleich des prozentualen Anteils des Oxidationsproduktes MeFox-Glu_n am entsprechenden 5-CH₃-H₄PteGlu_n vermehrte Oxidationsreaktionen bei der Siedemethode auf-

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

gezeigt. Entgegen der ursprünglichen Zielsetzung konnte also eine Begünstigung von Oxidationsreaktionen bei der alternativen Siedemethode nicht ausgeschlossen werden. Demnach war anzunehmen, dass das Metabolitenprofil stärker beeinflusst wurde als mit der klassischen Methode. Letztendlich wurde zwischen dem Mehrgewinn der alternativen Probenextraktion und deren Effizienz abgewogen. Deutliche Einbußen bei der Extraktion der Metaboliten von Interesse rechtfertigten eine möglicherweise schonendere Extraktion nicht. Folate stellen generell Minorkomponenten in Lebensmitteln dar. Daher wurde für alle weiteren Untersuchungen die klassische Folatextraktion zu Gunsten erhöhter Folatgehalte in den Probenextrakten gewählt. Eine mögliche Veränderung der allgemeinen Metabolitenzusammensetzung musste somit in Kauf genommen werden, war aber auch mit der alternativen Siedemethode nicht auszuschließen.

3.3 Entwicklung alternativer Aufreinigungsmethoden der Probenextrakte mittels Festphasenextraktion zur Analyse von Folaten in Hefe

Um eine geeignete Probenvorbereitung für spätere Untersuchungen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie (UHR-MS) zu finden, mussten verschiedene Aufreinigungsmethoden mittels Festphasenextraktion getestet werden. Ziel war es, eine effektive Aufreinigung sowie Aufkonzentrierung der Probeneluat zu erreichen. Es galt, universellere Festphasenmaterialien zu finden, welche eine weniger selektive Aufreinigung der Probenextrakte ermöglichen. Dies sollte in späteren UHR-MS Messungen das tatsächliche Metabolitenprofil der Probe besser widerspiegeln. Zudem sollte möglichst auf die Verwendung von Puffersalzen zur Elution der Folate vom Festphasenmaterial verzichtet werden. Dies hatte zum einen den Zweck, eine Messung mittels Direktinjektion am FT-ICR-MS zu ermöglichen. Andererseits sollte dadurch eine zu starke Belastung der ESI-Quelle am Q-ToF-MS vermieden werden, da ein Schalten einer Wartezeit nicht möglich war. Somit konnten die zu Beginn der chromatographischen Auftrennung eluierenden Puffersalze einzig durch das vorhandene Sprayshield der ESI-Quelle zurückgehalten werden, um nicht in das Massenspektrometer zu gelangen.

3.3.1 Auswahl und Optimierung verschiedener Festphasenextraktionsmethoden

Wie bereits in Kapitel 2.4.2 erwähnt, werden die Probenextrakte im Zuge der Folatanalytik üblicherweise mittels Festphasenmaterialien aufgereinigt. Hierbei haben sich vor allem starke Anionentauschermaterialien (SAX, Strong Anion Exchange) unter Verwendung von salzlastigen Pufferlösungen für die Elution der am Festphasenmaterial gebundenen Analyten etabliert.

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

Folate binden bedingt durch die negativen Ladungen der Carboxylreste des Glutamates an die positiv geladenen quaternären Amin-Gruppen des SAX-Materials. Die Elution der Analyten kann einerseits durch Verdrängung der Analyten mit Ionen einer höheren Affinität zum Festphasenmaterial erfolgen. Im Falle der Folate werden hierzu Salzlösungen bestehend aus Natriumacetat und Natriumchlorid verwendet. Andererseits wäre eine alternative Elution gebundener Analyten vom Festphasenmaterial theoretisch durch Protonierung der Analyten und somit dem Bruch ionischer Wechselwirkungen zwischen stationärer Phase und Analyt möglich. Hierzu wäre eine Erniedrigung des pH-Wertes nötig, welcher üblicherweise durch Säurezugabe im Elutionsmittel erreicht wird.

3.3.1.1 Selektion von Kartuschenmaterialien für die alternative Probenaufreinigung

Um eine pufferfreie Aufreinigung der Probenextrakte zu ermöglichen, wurden zunächst verschiedene Festphasenmaterialien unter Verwendung von Monoglutamat-Standardlösungen (10-CHO-PteGlu, 5-CH₃-H₄folat, 5-CHO-H₄folat und H₄folat) getestet. Für eine ideale Simulation der Probenextrakte wurden die Standardlösungen analog zur Extraktion von Realproben mit derselben Menge (10 mL) Acetonitril versetzt. Neben einer alternativen Probenelution von SAX-Kartuschen wurden weitere Festphasenmaterialien (Tabelle 3.8) getestet und mit 2 mL der entsprechenden Elutionslösung eluiert. Nach Messung mittels LC-MS/MS (vgl. Kapitel 11.2.4) erfolgte der Peakflächenvergleich der Analyten gegen die Aufreinigung mittels SAX-Kartuschen unter Verwendung von Elutionspuffer 1 (SAX E). Für letztere Aufreinigung wurde als Referenz eine Effektivität von 100 % angenommen.

Die Auswahl der Festphasenmaterialien erfolgte an Hand literaturbekannter sowie weiterer vielversprechender Retentionsmechanismen. [Nelson et al. 2004; Pfeiffer et al. 2004; Kirsch et al. 2010; Luo et al. 2017] Als Alternative zum starken Ionentauscher wurde mit Aminopropyl-Kartuschen (NH₂) ein schwacher Anionentauscher erprobt. Analog zu den quaternären Aminen der starken Ionentauscher adsorbieren die (deprotonierten) Analyten im Falle der NH₂-Kartuschen an die protonierte Form der primären Aminfunktion. Die Elution wurde zum einen durch Neutralisation der funktionellen Aminopropylgruppen mittels des Zusatzes von Ammoniak in der Elutionslösung (Ansatz NH₂ I) versucht. Somit sollte eine Desorption der gebundenen (deprotonierten) Säuren hervorgerufen werden. Andererseits wurde eine Neutralisation der adsorbierten Analyten durch Säurezugabe in der Elutionslösung (Ansatz NH₂ II) versucht. Des Weiteren wurden die Umkehrphasen C18 (Ansatz C18 I-III) sowie Phenyl (Phe) getestet. Beim Umkehrmechanismus erfolgt die Retention der Analyten durch die Ausbildung von Dispersionskräften wie van der Waals-Kräften und Wasserstoffbrückenbindungen. Diese bilden sich zwischen den unpolaren Seitenketten des (C18- oder Phenyl-) modifizierten Kieselgels

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

sowie unpolaren Molekülstrukturteilen der Analyten aus. Die Desorption erfolgt unter Lösen dieser Dispersionskräfte und Elution mit Hilfe eines unpolaren Lösungsmittels. Die Verwendung von Mixed-Mode Materialien (MAX, Mixed-Anion Exchange) vereint die funktionellen Gruppen eines Ionentauscher- sowie eines Umkehrphasenmaterials. Entsprechend wird eine hohe Funktionalität sowohl für hydrophobe als auch für hydrophile Molekülstrukturen angenommen. Die Elution erfolgt mit Hilfe von mittel- bis unpolaren Lösungsmitteln unter Säurezusatz. Letzterer dient dem Brechen ionischer Bindungen durch Protonierung der adsorbierten Analyten.

Tabelle 3.8 Getestete alternative Festphasenmaterialien zur Aufreinigung von Folatextrakten.

Getestetes Kartuschenmaterial	Ansatz	pH-Wert der Probe	Verwendete Elutionslösung	Zu Grunde liegender Bindungsmechanismus
SAX (Strong Anion Exchange)	SAX A	5	Methanol + 1 % Ameisensäure	Anionentauscher (stark)
NH ₂ (Aminopropyl)	NH ₂ I	5	Methanol + 1 % NH ₃	Anionentauscher (schwach)
	NH ₂ II	5	Methanol + 1 % Ameisensäure	
C18	C18 I	5	ACN/MeOH/H ₂ O (26/14/60)	Umkehrphase
	C18 II	5	50 % MeOH	
	C18 III	3,4	50 % MeOH	
Phenyl	Phe	3,4	40 % ACN	Umkehrphase
MAX (Mixed Anion Exchange)	MAX	5	Methanol + 1 % Ameisensäure	Umkehrphase-Mixed-Mode Anionentauscher

Diskussion der Selektion der Kartuschenmaterialien für die alternative Probenaufreinigung

Wie Anhang 2 zu entnehmen ist, konnte für keine der Alternativen auch nur annähernd dieselbe Effektivität gemessen an der Standardmethode SAX E festgestellt werden. Diese lag bei höchstens 3,5 % für Ansatz C18 III. Zu berücksichtigen ist allerdings die Tatsache, dass die alternativen Aufreinigungsparameter nicht optimiert wurden. Es wurden die vom Hersteller empfohlenen oder in der Literatur beschriebenen Parameter übernommen. Lediglich bei der Verwendung der C18-Kartuschen wurden erste vergleichende Optimierungen getestet und die Analyten durch Anpassen des pH-Wertes auf pH 3,4 protoniert aufgetragen.

Dennoch konnten aus den vergleichenden Untersuchungen erste Rückschlüsse gezogen werden. Bei den Anionentauschern (SAX und NH₂) war der starke Ionentauscher (SAX) für alle

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

getesteten Analyten dem schwachen Ionentauscher (NH_2) deutlich überlegen. Dieser wiederum lieferte bis zu 4-fach höhere Peakflächen für eine alkalische (Ansatz NH_2 I) im Vergleich zu einer sauren Elution (Ansatz NH_2 II) der Analyten. Von den getesteten Umkehrphasen konnte unter vergleichbaren Bedingungen (Anpassung des pH-Wertes der Proben auf pH 3,4) für das C18-Material (Ansatz C18 III) eine doppelt so hohe Effektivität festgestellt werden wie für das Phenyl-Material. Zudem zeigte sich eine verbesserte Retention der Analyten bei Auftragung im protonierten Zustand bei pH 3,4 (Ansatz C18 III) im Vergleich zum anionischen Zustand bei pH 5 (Ansatz C18 II). Die Verwendung von 50 % Methanol (Ansatz C18 II) statt einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus Acetonitril, Methanol und Wasser (Ansatz C18 I) wirkte sich hauptsächlich für die Analyten 10-CHO-PteGlu und 5- CH_3 -H₄folat negativ aus. Diese Beeinflussung konnte allerdings durch Anpassen des pH-Wertes der Probe vor der Probenauftragung (Ansatz C18 III) vermieden werden. Das Mixed-Mode Material MAX lieferte für keinen der getesteten Analyten eine verbesserte Elution im Vergleich zu der Wahl von nur einem Retentionsmechanismus (Ionentauscher oder Umkehrphase). Daher wurde dieses Material für weitere Tests verworfen. Ebenso wurde mit dem Phenyl-Material verfahren, da mit dem alternativen Umkehrphasenmaterial (Ansatz C18 III) für alle untersuchten Analyten bessere Ergebnisse erzielt werden konnten.

3.3.1.2 Allgemeine Optimierung der selektierten Kartuschenmaterialien an Hand des Modellorganismus Bäckerhefe

Da der Fokus für die spätere Anwendung auf dem im Modellorganismus ursprünglich vorliegenden Metabolom der Folate lag, wurde für die weiteren Optimierungen gefriergetrocknete Bäckerhefe herangezogen. Diese wurde analog zur Gesamtfolatgehaltsbestimmung aufgearbeitet. Allerdings wurde auf die Enzymzugabe verzichtet, um die intakten Polyglutamatanalyten untersuchen zu können. Eine Verwendung von Standardlösungen war mangels verfügbarer Polyglutamatstandards nicht möglich. Um eine verbesserte Vergleichbarkeit zu erzielen, wurde den Proben vor der Extraktion dieselbe Menge des internen Standards [¹³C₅]-5- CH_3 -H₄folat zugesetzt. Somit war eine semi-quantitative Bestimmung der Flächenverhältnisse $A(A)/A(\text{ISTD})$ möglich. Für eine verbesserte Retention der Analyten auf dem Umkehrphasenmaterial (C18) wurde auf die im Zuge der Vorselektion der Kartuschenmaterialien durchgeführten Zugabe von Acetonitril vor der Probenauftragung verzichtet. Dieses wurde stattdessen mit Extraktionspuffer ersetzt, um für alle Aufreinigungen vergleichbare Probenvolumina auf die Kartuschen aufzutragen. Zudem wurde ein pH-Wert von pH 2 eingestellt, um die vollständige Protonierung aller Analyten in der Probe zu gewährleisten. Neben den aus dem vorhergehenden Experiment selektierten Festphasenmaterialien SAX, NH_2 und C18

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

wurde zudem mit dem HLB-Material (Hydrophilic-Lipophilic Balanced) ein polymerbasiertes Material getestet. Die Zusammensetzung dieses Materials ermöglicht eine sehr generelle Retention von Analyten an die hydrophoben und hydrophilen Funktionalitäten des Polymermaterials. Auch hier wurde analog zur Umkehrphase ein pH-Wert der Probe von pH 2 eingestellt und die Proteinfällung mit Acetonitril durch saure Fällung mit Extraktionspuffer 2 (eingestellt auf pH 2) ersetzt. Um eine verbesserte Löslichkeit der generell wasserlöslichen Folate in den verwendeten Elutionspuffern der SAX-Alternative, der NH₂- sowie der C18-Kartuschen zu gewährleisten, wurden die methanolischen Elutionslösungen durch 50 % Methanollösungen ersetzt. Zur vollständigen Protonierung und somit der verbesserten Desorption der Analyten vom Festphasenmaterial wurden die Elutionslösungen der SAX- und C18-Alternativen zudem mit 1 % Ameisensäure versetzt.

Mangels verwendbarer Antioxidantien in den pufferfreien Elutionslösungsmitteln war eine lösungsmittelfreie Lagerung die Methode der Wahl, um eine möglichst hohe Lagerstabilität zu garantieren. Gleichzeitig konnte somit eine Aufkonzentration der Eluate ermöglicht werden. Vor der Messung mittels LC-MS/MS wurden diese eingeeengten Eluate in Elutionspuffer 3 aufgenommen. Die Messung erfolgte mit Hilfe der von Schaller et al. [2018] entwickelten Methode zur Quantifizierung der Polyglutamate 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₇ wie unter Abschnitt 13.4 erläutert.

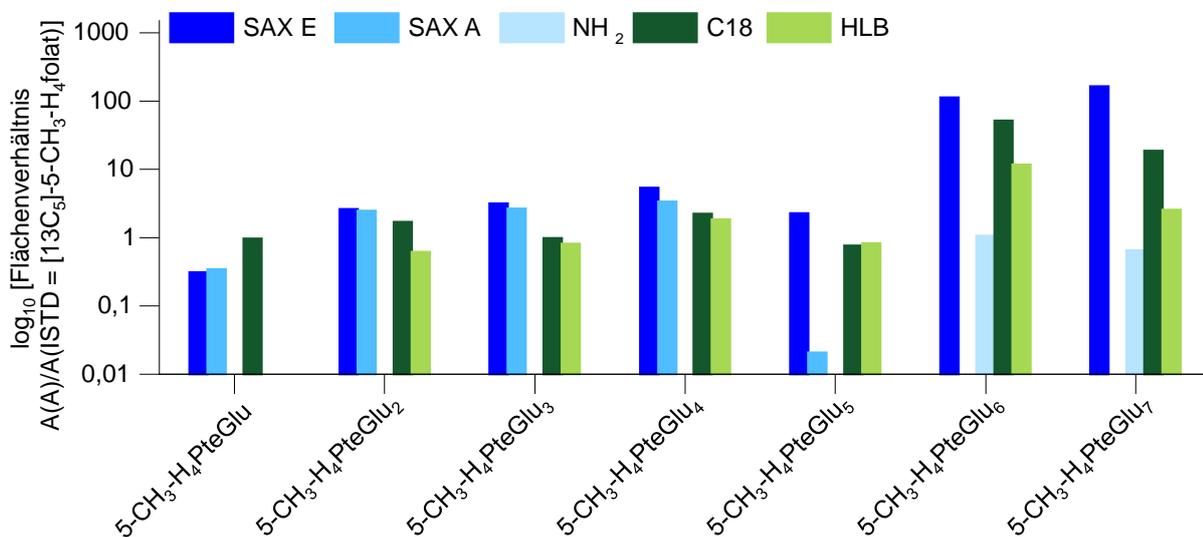


Abbildung 3.3 Peakflächenverhältnis der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate (1-7) im Verhältnis zum zugesetzten internen Standard [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat für verschiedene, getestete Festphasenkartuschen zur Probenaufreinigung; logarithmische Darstellung der Flächenverhältnisse.

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

Diskussion der Optimierung der selektierten Kartuschenmaterialien

Wie in Abbildung 3.3 veranschaulicht, zeigten sich bei Betrachtung der Verteilung der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate deutliche Unterschiede zwischen den selektierten Festphasenmaterialien. Weiterhin wurden die meisten Folate angereichert durch Aufreinigung mittels SAX-Kartuschen unter Verwendung von Elutionspuffer 2. Zudem konnte eine verminderte Elution der längerkettigen Polyglutamate bei Verwendung der alternativen Festphasenmaterialien festgestellt werden, was weiteren Optimierungsbedarf verdeutlichte. Durch Aufreinigung mittels schwachem Ionentauscher (NH₂) konnte nicht annähernd das vollständige Polyglutamatspektrum abgebildet werden. Unter Berücksichtigung der Flächenverhältnisse A(A)/A(ISTD) konnten lediglich die zwei Hauptvitamere Hexa- und Heptaglutamat in geringen Mengen von < 1 % im Vergleich zur SAX-Standardmethode detektiert werden. Auch nach Optimierung dieser Methode wurde keine Steigerung um mehrere Größenordnungen erwartet, um als akzeptable Alternative in Frage zu kommen. Daher wurde dieses Festphasenmaterial in den nachfolgenden Optimierungen ausgeschlossen.

Die verbleibenden Alternativen SAX (unter Verwendung von sauren Elutionslösungen), C18 sowie HLB wurden daraufhin sukzessive optimiert. Die Zugabe des internen Standards wurde für semi-quantitative Abschätzungen des Verhältnisses A(A)/A(ISTD) beibehalten. Zudem wurden die Optimierungen in Dreifachbestimmung durchgeführt, um eine unterschiedliche Effektivität der Aufarbeitungen sowie Messschwankungen besser ausgleichen zu können. Das Elutionsvolumen wurde entsprechend auf 6 mL erhöht, um eine vollständige Elution der Polyglutamatanalyten zu gewährleisten. Um das gesamte Polyglutamatspektrum zu erfassen, wurde die LC-MS/MS-Methode erweitert um die zugehörigen Massenübergänge der Polyglutamate (1-8) der Analyten 10-CHO-PteGlu, 5-CHO-H₄folat, H₄folat sowie PteGlu. Das Messzeitfenster von 5-CHO-H₄PteGlu₁₋₈ wurde zudem so angepasst, dass auch eine Detektion der Oxidationsprodukte MeFox-Glu₁₋₈ möglich war.

3.3.1.3 Optimierung der alternativen SAX-Aufreinigung

Die Optimierung der 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₇ Quantifizierung nach Schaller et al. [2018] hatte gezeigt, dass durch Erhöhung des Bettvolumens von 500 mg auf 1 g im Falle der SAX-Kartuschen Analytverluste bei der Probenauftragung unterbunden werden konnten. Analog dazu wurden die nachfolgenden Optimierungen unter Verwendung des erhöhten Bettvolumens durchgeführt.

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

Zunächst musste ein optimiertes Elutionslösungsmittel gefunden werden. Dazu wurden verschiedene Säureanteile in der bisherigen Elutionslösung der alternativen SAX-Aufreinigung (50 % Methanol) getestet. Neben den bereits verwendeten 1 % Säurezugabe wurde der Anteil vergleichend auf 5 % erhöht. Somit sollte gezeigt werden, welche Menge für eine vollständige Protonierung der am Ionentauschermaterial adsorbierten Analyten von Nöten war, um diese effektiv eluieren zu können. Eine weitere Erhöhung der Säurekonzentration in der Elutionslösung wurde nicht vorgenommen, um Interkonversions- und Abbaureaktionen der Analyten nicht weiter zu begünstigen.

Tabelle 3.9 Semi-quantitative Optimierung des Säureanteils der alternativen SAX-Aufreinigung an Hand der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate unter Angabe des Flächenverhältnisses A(A)/A(ISTD); ISTD = [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat, n.d. = nicht detektierbar.

Verwendete Elutionslösung	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu _n							
	n = 1	n = 2	n = 3	n = 4	n = 5	n = 6	n = 7	n = 8
50 % MeOH + 1 % Ameisensäure	0,4 ±	3,6 ±	7,7 ±	50,8 ±	2,2 ±	n.d.	n.d.	n.d.
	0,1	0,2	0,7	4,9	1,1			
50 % MeOH + 5 % Ameisensäure	3,1 ±	4,3 ±	5,6 ±	17,8 ±	4,4 ±	293 ±	3.922	475 ±
	1,5	2,8	2,3	7,9	1,6	105	± 1.394	137

Wie Tabelle 3.9 zu entnehmen ist, konnte lediglich für einen Säureanteil von 5 % eine Elution der Hauptvitamere 5-CH₃-H₄PteGlu₆₋₈ erreicht werden. Als weitere Polyglutamate waren lediglich bei 5 % Säurekonzentration das Hexa- und Heptaglutamat des Vitameres 5-CHO-H₄folat detektierbar (vgl. Anhang 3). Wegen unzureichender Desorption der Analyten bei einer geringeren Säurekonzentration wurde für die weiteren Optimierungsschritte eine Säureanteil von 5 % gewählt.

Folate sind generell bevorzugt wasserlöslich. Um die Löslichkeit der Folate im gewählten Elutionspuffer zu begünstigen, wurde vergleichend der Organikanteil von 50 % auf 20 % reduziert. Der Säureanteil wurde bei 5 % belassen. 20 % Organikanteil entsprechen etwa dem Organikanteil, bei welchem Folate während der chromatographischen Auftrennung mit Hilfe analytischer Säulen eluieren. Auch wenn hierfür üblicherweise C18-Materialien verwendet werden, konnte eine verbesserte Elution respektive Löslichkeit der Folate bei erhöhtem Wasseranteil angenommen werden. Eine weitere Reduktion des Organikanteils wurde nicht vorgenommen, um den notwendigen Einengungsschritt des Eluates nicht unnötig zu verlängern. Dieser Schritt war unvermeidlich, um einerseits eine Aufkonzentrierung und andererseits eine erhöhte Lagerstabilität der Analyten zu gewährleisten. Wie bereits unter 2.1.2 erörtert, wird in der Literatur von einer erhöhten Instabilität der Folate unter sauren Bedingungen berichtet. [Brouwer et al. 2007] Daher war es Ziel, die Eluate nur so lange wie nötig sauren Bedingungen auszusetzen und sie stattdessen vollständig eingeeengt zu lagern. Neben 20 % Methanol wurden analog zu

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

den üblicherweise verwendeten Fließmitteln der säulenchromatographischen Auftrennung zu dem vergleichend 20 % Acetonitril für die Elution getestet. Auch hier erfolgte eine Zugabe von 5 % Ameisensäure.

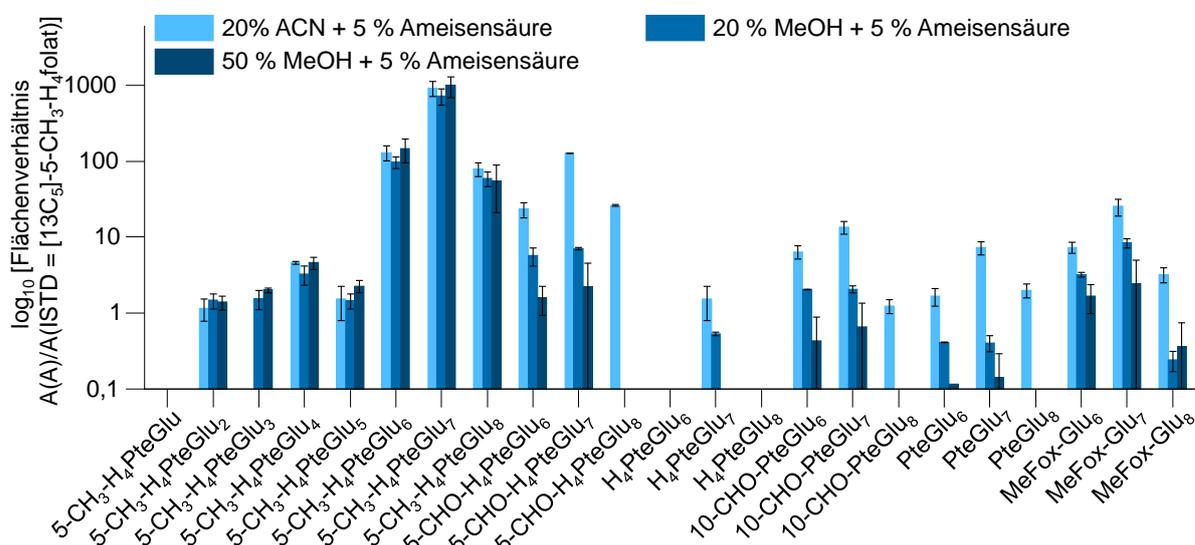


Abbildung 3.4 Semi-quantitative Optimierung des Organikanteils der alternativen SAX-Aufreinigung. Logarithmische Darstellung der Flächenverhältnisse $A(A)/A(ISTD=[^{13}C_5]-5-CH_3-H_4folat)$.

Diskussion der stufenweisen Optimierung der alternativen SAX-Aufreinigung

Wie Abbildung 3.4 zu entnehmen ist, konnten für die 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate nur geringfügige Unterschiede zwischen den getesteten Elutionslösungen festgestellt werden. Zu beachten ist, dass eine logarithmische Darstellung gewählt wurde, um die zu wesentlich geringeren Anteilen eluierenden restlichen 5-CH₃-H₄folat Vitamere im direkten Vergleich mit den Hauptvitameren erfassen zu können. Für alle weiteren Folatvitamere führte die Reduktion des Organikanteils auf 20 % allerdings zu einer deutlich verbesserten Elution. Im direkten Vergleich der beiden Lösungsmittel zeigte sich durchwegs eine höhere Löslichkeit aller Folatvitamere in 20 % Acetonitril im Vergleich zu 20 % Methanol.

Das Elutionslösungsmittelgemisch bestehend aus 20 % Acetonitril und 5 % Ameisensäure wurde entsprechend für die alternative Festphasenaufreinigung mittels SAX-Kartuschen für alle weiteren Aufarbeitungen verwendet. Um das Elutionsvolumen zu optimieren, wurde dieses auf 10 mL erhöht und fraktioniert aufgefangen. Die verschiedenen Fraktionen wurden mittels LC-MS/MS vermessen und die Methode somit auf eine vollständige Elution überprüft. In den Fraktionen ab einem Elutionsvolumen von 9 mL konnten keinerlei Folate mehr detektiert werden, wie in Anhang 4 an Hand der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate gezeigt ist. Daher wurde für alle weiteren Untersuchungen der Polyglutamate ein Elutionsvolumen von 8 mL gewählt.

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

3.3.1.4 Optimierung der alternativen C18-Aufreinigung

Analog zu den SAX-Kartuschen wurde auch für die C18-Kartuschen das Elutionslösungsmittel optimiert. Dazu wurde zu Beginn der üblicherweise verwendete Gradient der chromatographischen Auftrennung auf C18-Säulenmaterial simuliert. Wasser und Acetonitril dienen hierbei als Eluenten A und B, wobei beide Eluenten mit 0,1 % Ameisensäure versetzt werden. Die Elution der Folatvitamere erfolgt typischerweise bei einer Fließmittelzusammensetzung von 10 – 20 % B. Daher wurde auf den C18-Kartuschen eine fraktionierte Elution mit 2 mL 10 % Acetonitril, 2 mL 15 % Acetonitril sowie 2 mL 20 % Acetonitril durchgeführt. Alle verwendeten Elutionslösungsmittel wurden – analog zu den Eluenten A und B der chromatographischen Auftrennung – mit 0,1 % Ameisensäure versetzt. Vor allem für die weniger polaren Analytgruppen 5-CHO-H₄folat, 10-CHO-PteGlu und PteGlu konnte für alle detektierbaren Polyglutamate (6-8) erst ab einem Acetonitrilanteil von 20 % eine zufriedenstellende Elution erreicht werden (Anhang 5). Die einzige Analytgruppe, welche bereits vollständig nach Auftragung von 10 und 15 % Acetonitril eluierte, waren die unsubstituierten H₄folate. Die Hauptvitamere 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₈ dagegen waren in allen Fraktionen von 10 bis 20 % Acetonitril nachweisbar, vermutlich begründet durch das mengenmäßig hohe Vorkommen der Analyten. Um möglichst alle Folatvitamere zu erfassen und dennoch den notwendigen Einengungsschritt nach der Kartuschenaufreinigung so kurz wie möglich zu halten, wurde ein Acetonitrilanteil von 20 % für die weiteren Optimierungsschritte gewählt. Wie bereits bei den alternativen SAX-Eluaten war das Abdampfen des Elutionslösungsmittels notwendig, um durch den Säureanteil in den Eluaten begünstigte Interkonversions- und Oxidationsreaktionen zu unterbinden.

Die Einflüsse der Fließmittelzusammensetzung einer säulenchromatographischen Auftrennung unter isokratischen Bedingungen auf verschiedene Folatvitamere wurden bereits von Azevedo et al. [2016] eingehend untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass ein verringerter pH-Wert der Eluenten für eine erhöhte Löslichkeit der Folatvitamere in der mobilen Phase notwendig ist. Um diese Erkenntnisse auf die C18-Festphasenaufreinigung zu übertragen, wurde vergleichend der pH-Wert des Elutionslösungsmittels (20 % Acetonitril) durch Zugabe von 0,1 %, 1 % sowie 5 % Ameisensäure gesenkt. Des Weiteren wurde, analog zu den SAX-Kartuschen, eine Erhöhung des Bettvolumens auf 1 g untersucht. Letztendlich wurden somit sechs Ansätze (Tabelle 3.10) miteinander verglichen.

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

Tabelle 3.10 Getestete Ansätze zur Optimierung der Elutionslösungsmittel der alternativen C18-Aufreinigung.

Ansatz	Getestetes Elutionslösungsmittel	Getestetes Bettvolumen der Kartusche
Ansatz 1	20 % Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure	1 g
Ansatz 2	20 % Acetonitril + 1 % Ameisensäure	1 g
Ansatz 3	20 % Acetonitril + 5 % Ameisensäure	1 g
Ansatz 4	20 % Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure	500 mg
Ansatz 5	20 % Acetonitril + 1 % Ameisensäure	500 mg
Ansatz 6	20 % Acetonitril + 5 % Ameisensäure	500 mg

Azevedo et al. [2016] berichteten zudem von einer verbesserten Elution von Folaten vom C18-Säulenmaterial bei Verwendung von Methanol anstelle von Acetonitril als organische Komponente. Abschließend wurde daher zusätzlich der Acetonitrilanteil durch Methanol ersetzt. Beide Elutionslösungsmittel wurden mit einem Ameisensäureanteil von 0,1 % versetzt.

Diskussion der stufenweisen Optimierung der alternativen C18-Aufreinigung

Hinsichtlich der Beeinflussung der Elutionskraft des Lösungsmittelgemisches konnten für fast alle Analyten nur geringfügige Unterschiede zwischen den getesteten Ansätzen 1 – 6 unter Verwendung von 20 % Acetonitrilanteil festgestellt werden (Abbildung 3.5). Für die metabolisch aktiven Folatvitamere 5-CH₃-H₄folat, 5-CHO-H₄folat sowie H₄folat konnten unter Zugabe von 0,1 % Ameisensäure (Ansatz 1 und Ansatz 4) ähnlich gute Ergebnisse erzielt werden wie bei einer Erhöhung des Säureanteils auf 1 % (Ansatz 2 und Ansatz 5) oder 5 % (Ansatz 3 und Ansatz 6). Bei den als Folge von Oxidationsreaktionen entstehenden metabolisch inaktiven Vitamerformen 10-CHO-PteGlu, PteGlu und MeFox konnte allerdings eine vermehrte Bildung mit Steigerung des Säureanteils beobachtet werden. Daher wurde für weitere Untersuchungen von einer Erhöhung der Säurezugabe abgesehen. Beim Vergleich der Bettvolumina wurden mit 500 mg Bettvolumen (Ansatz 4) vor allem für die Polyglutamate (6-8) im Vergleich zu 1 g Bettvolumen (Ansatz 1) höhere Werte erzielt. Ein Bettvolumen von 500 mg schien also im Falle der C18-Kartuschen für eine vollständige Retention der hauptsächlich als Hexa- bis Oktaglutamate vorliegenden Folatvitamere ausreichend zu sein und wurde für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

Wie bereits bei der SAX-Aufreinigung festzustellen war, konnte auch im Falle der C18-Kartuschen eine verminderte Elution bei Verwendung von Methanol beobachtet werden (vgl. Anhang 6). Daher wurden 20 % Acetonitril unter Zusatz von 0,1 % Ameisensäure als Elutionslösungsmittel für alle weiteren Untersuchungen beibehalten.

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

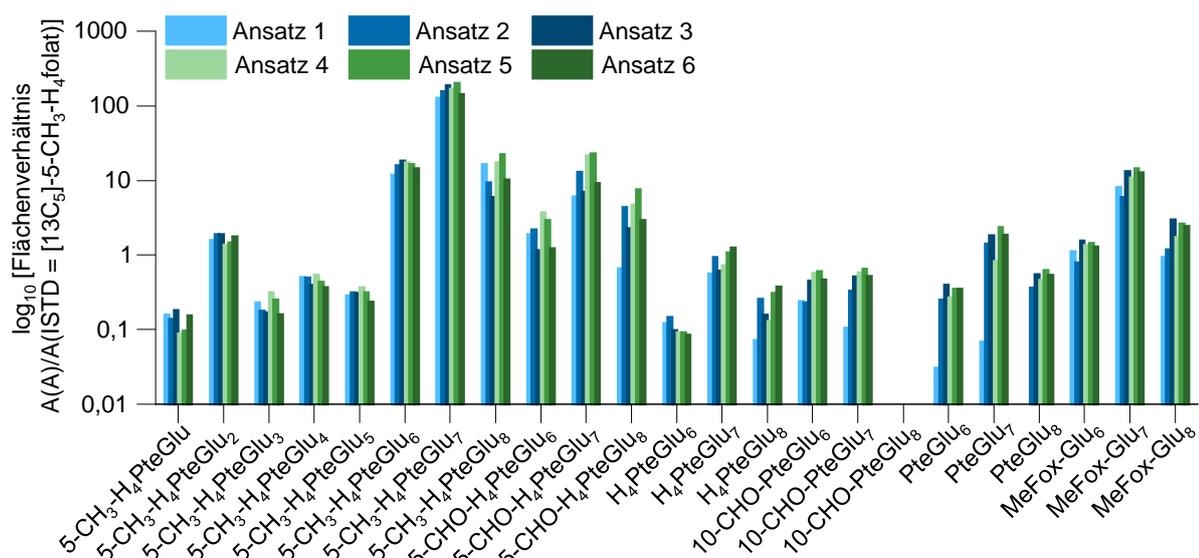


Abbildung 3.5 Semi-quantitative Optimierung des Säureanteils und des Bettvolumnes der alternativen C18-Aufreinigung. Beschreibung der Ansätze vgl. Tabelle 3.10. Logarithmische Darstellung der Flächenverhältnisse $A(A)/A(ISTD=[^{13}C_5]-5-CH_3-H_4folat)$.

Auch für die alternative C18-Aufreinigung wurde das Elutionsvolumen optimiert durch fraktionierte Elution. Dazu wurde das Elutionslösungsmittelgemisch bestehend aus 20 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure auf 14 mL erhöht und die einzelnen Fraktionen mittels LC-MS/MS vermessen. Ab einem Elutionsvolumen von 14 mL konnte auch das Hauptvitamer $5-CH_3-H_4PteGlu_7$ nicht mehr nachgewiesen werden (vgl. Anhang 7), weshalb für alle weiteren Untersuchungen der Polyglutamate ein Elutionsvolumen von 13 mL gewählt wurde.

3.3.1.5 Optimierung der alternativen HLB-Aufreinigung

Das HLB-Festphasenmaterial ist im Gegensatz zu SAX- und C18-Materialien polymerbasiert und besitzt mit Vinylpyrrolidon- und Divinylbenzoleinheiten sowohl hydrophile als auch lipophile Strukturbestandteile. Die Adsorption von Analyten beruht hier ebenso wie bei Umkehrphasenmaterialien auf Dispersionskräften wie van der Waals Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen. Die Elution erfolgt üblicherweise mit mittel- bis unpolaren Lösungsmitteln. Da sich sowohl bei der alternativen SAX- als auch bei der C18-Aufreinigung Acetonitril als das Lösungsmittel der Wahl herausgestellt hatte und dieses zudem eine geringere Polarität als Methanol aufweist, wurde dieses vergleichend zu Methanol zur Elution der Folatanalyten von den HLB-Kartuschen getestet. Eine weitere Zugabe von Ameisensäure wurde nicht vorgenommen.

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

Diskussion der Optimierung der alternativen HLB-Aufreinigung

Im Gegensatz zu den vorhergehenden Optimierungen konnte eine deutlich schlechtere Elution der Analyten unter Verwendung von Acetonitril beobachtet werden. Wie Abbildung 3.6 zu entnehmen ist, konnten nach Elution mit Acetonitril lediglich die 5-CH₃-H₄folate detektiert werden. Die Informationen der anderen Vitamere gingen gänzlich verloren, weshalb für alle nachfolgenden Untersuchungen weiterhin Methanol als Lösungsmittel verwendet wurde. Von einer weiteren Erhöhung des Bettvolumens wurde abgesehen, da sich das HLB-Material generell durch erhöhte Ladungskapazität auszeichnet. Analog zum C18-Material wurde nachfolgend mit 500 mg Bettvolumen gearbeitet.

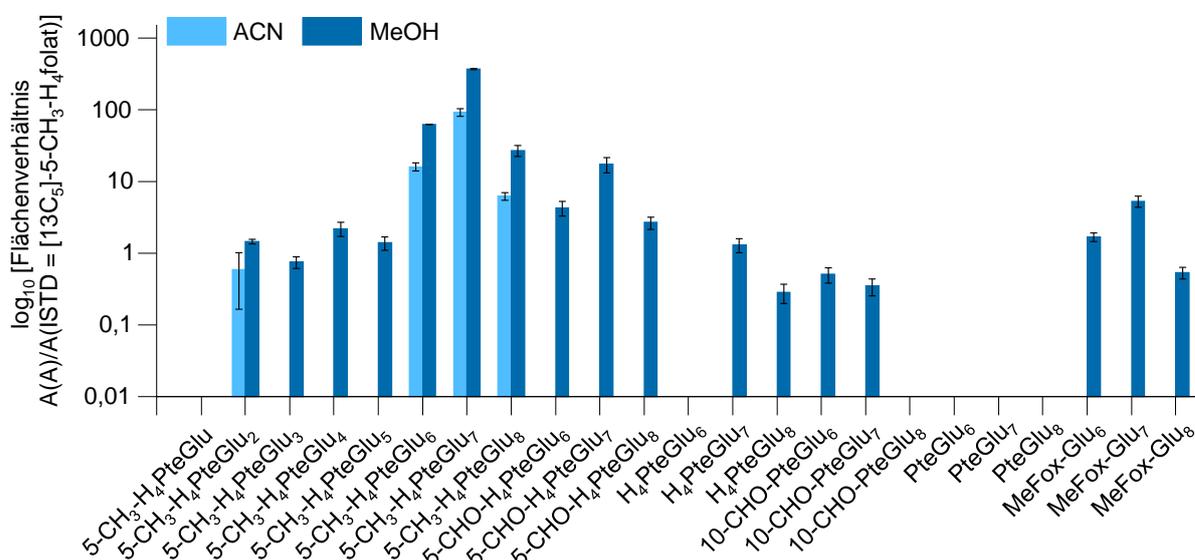


Abbildung 3.6 Semi-quantitative Optimierung des Lösungsmittels der alternativen HLB-Aufreinigung. Logarithmische Darstellung der Flächenverhältnisse A(A)/A(ISTD=[¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat).

Abschließend wurde wie für die vorhergehenden alternativen Aufreinigungsmethoden das Elutionsvolumen optimiert. Dazu wurde ein Elutionsvolumen von 22 mL Methanol fraktioniert aufgefangen und die einzelnen Fraktionen mittels LC-MS/MS untersucht (vgl. Anhang 8). Ab einem Elutionsvolumen von 21 mL konnten keinerlei Folatvitamere mehr detektiert werden, weshalb für alle weiteren Untersuchungen ein Elutionsvolumen von 20 mL gewählt wurde.

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

3.3.2 Quantitativer Vergleich alternativer Aufreinigungsmethoden mit der Standardaufreinigung

Nach erfolgreicher Optimierung der alternativen Kartuschaufreinigungsmethoden sollten diese mit der standardmäßig verwendeten SAX-Aufreinigung unter Verwendung pufferbasierter Elutionsgemische (SAX E, Standardmethode) verglichen werden. Für die spätere Anwendung auf Untersuchungen des Metabolitenprofils sollte somit zum einen herausgearbeitet werden, ob durch die alternative Behandlung der Probenextrakte eine Verschiebung der Vitamereverteilung zu beobachten war. Andererseits sollte festgestellt werden, ob eine Diskriminierung auf Grund der Polyglutamatrestlänge zu beobachten war. Unterschiede in der Vitamereverteilung bedingt durch verschiedene pH-Werte während der Probenaufarbeitung sowie der Abwesenheit von Folat-stabilisierenden Antioxidantien (üblicherweise Ascorbinsäure in Kombination mit Thiolen wie DTT oder Mercaptoethanol) in den Elutionslösungen wurden vermutet. Folglich wurde eine vermehrte Beobachtung von Oxidations- und Interkonversionsreaktionen angenommen. Eine Diskriminierung in Abhängigkeit der Polyglutamatrestlänge wurde bereits von Kopp et al. [2016] für SAX-, Phenyl- sowie schwache Anionentauschermaterialien beobachtet. Mit Verlängerung des Glutamatrestes werden zum einen vermehrt Carboxylgruppen eingeführt, welche bei entsprechendem pH-Wert die Anzahl an anionischen Bindungsstellen erhöhen. Zum anderen geht mit der Verlängerung des Glutamatrestes eine Verlängerung der Kohlenstoff-Seitenkette einher, welche den unpolaren Charakter des Moleküls erhöht. Beide Effekte führen zu einer bevorzugten Retention längererkettiger Polyglutamate. Erstgenannter ist von Bedeutung im Falle des Anionentauschermaterials, während letztgenannter bei Umkehrphasen- und polymerbasierten Materialien zu Tragen kommt.

3.3.2.1 Untersuchung der Vitamereverteilung durch Quantifizierung der Gesamtfolatgehalte

Die Zusammensetzung der einzelnen Vitamere nach Aufreinigung mit den alternativen Festphasenmaterialien wurde an Hand der Quantifizierung des Gesamtfolatgehaltes bestimmt. Dazu wurde dieselbe Hefe verschiedenen SPE-Aufreinigungen unterworfen (Kapitel 13.3) und nach Abschnitt 11.2.4 mittels LC-MS/MS analysiert. Das Volumen der Elutionslösungen wurde im Gegensatz zur Methodenoptimierung (Kapitel 3.3.1) für alle Methoden auf 2 mL reduziert. Im Gegenzug wurde mit einer deutlich verringerten Einwaage gearbeitet.

Der Gesamtfolatgehalt wurde mit allen Methoden auf einen Wert zwischen $4.188 \pm 206 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ (C18) und $4.396 \pm 89 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ (SAX A) bestimmt (Abbildung 3.7.A, Anhang 9). Somit konnten in der Summe aus allen analysierten Folatvitameren keine Unter-

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

schiede zwischen den Kartuschaufreinigungen festgestellt werden. Die Betrachtung der metabolisch aktiven Vitamere H₄folat (Abbildung 3.7.B) sowie 5-CH₃-H₄folat (Abbildung 3.7.C) zeigte geringfügige Schwankungen zwischen den getesteten Aufreinigungsverfahren. Diese konnten auch nicht durch Berücksichtigung der entsprechenden Oxidationsprodukte PteGlu sowie MeFox ausgeglichen werden. Entsprechend musste davon ausgegangen werden, dass neben diesen weitere Interkonversions- und Oxidationsprodukte gebildet wurden, welche mit der quantitativen Methode nicht erfasst werden konnten. Im Allgemeinen ließ sich aber sagen, dass durch Verwendung von isotopenmarkierten internen Standards mögliche Verluste während der Aufarbeitung gut ausgeglichen werden konnten.

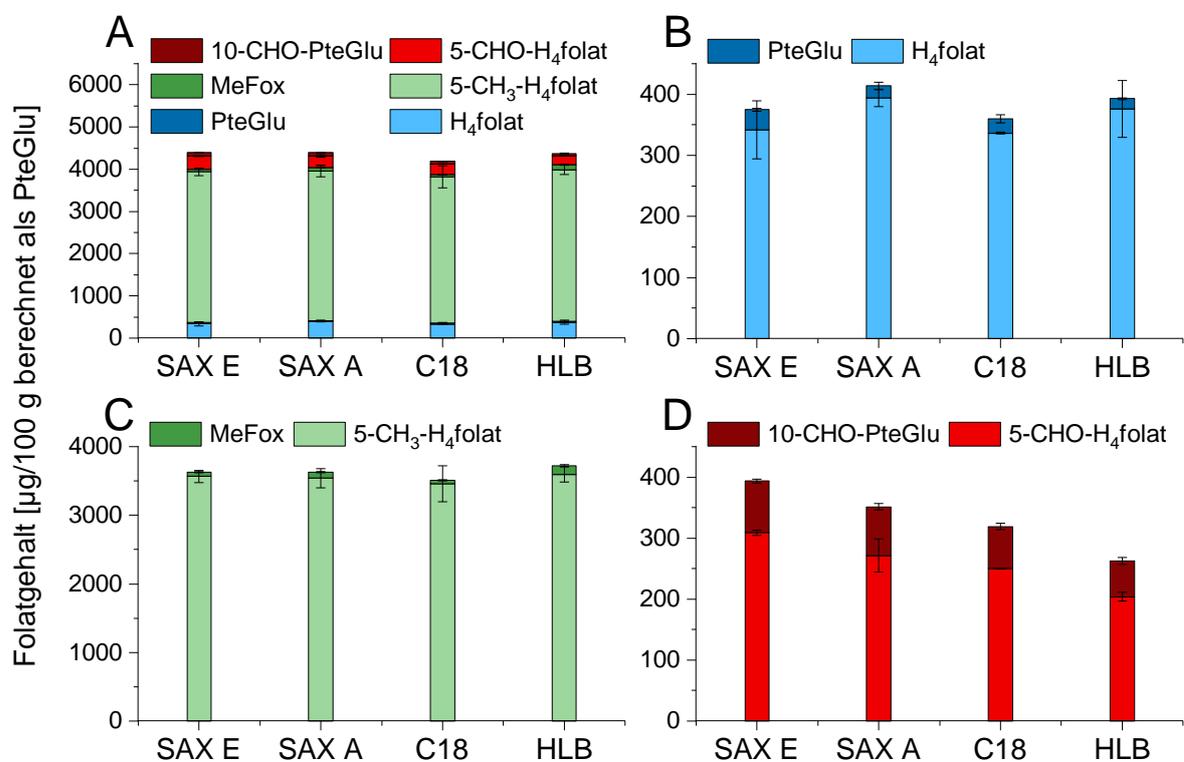


Abbildung 3.7 Quantitative Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes in Bäckerhefe in Abhängigkeit der Festphasenaufreinigung.

Auffällig dagegen war die deutliche Abnahme des 5-CHO-H₄folat-Gehaltes von $308,8 \pm 4,1 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ bei der Standardmethode auf $203,9 \pm 7,2 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ nach Aufreinigung mit HLB-Kartuschen. Die alternative SAX-Methode (SAX A) sowie die C18-Aufreinigung (C18) befanden sich zwischen diesen Werten, aber auch klar innerhalb der abnehmenden Tendenz $\text{SAX E} > \text{SAX A} > \text{C18} > \text{HLB}$.

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

Diskussion der Quantifizierung des Gesamtfolatgehaltes

Als Ursache für die beobachteten Trends wurden Interkonversionsreaktionen angenommen. Speziell für die Formylvitamere wird von einer verstärkten Konversion zum 5,10-CH⁺-H₄folat mit sinkendem pH-Wert berichtet. [Baggott 2000; Brouwer et al. 2007; Jägerstad und Jastrebova 2013] Bei pH-Werten über pH 4,8 dagegen wird von einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen 5-CHO-H₄folat und 5,10-CH⁺-H₄folat zu Gunsten des 5-CHO-H₄folates berichtet. [Jastrebova et al. 2013] Dieser Effekt konnte für das Aufreinigungsverfahren SAX E beobachtet werden, welcher sich durch die höchsten 5-CHO-H₄folat-Gehalte von den restlichen Aufreinigungsmethoden abhob. Der pH-Wert der bei dieser Methode verwendeten Extraktions- und Elutionspuffer lag bei pH 5 und somit oberhalb des für Interkonversionsreaktionen kritischen Wertes von pH 4,8. Folglich konnte eine vollständige Interkonversion aller Formylvitamere in die unter diesen Bedingungen stabile 5-CHO-H₄folat-Form angenommen werden. Im Gegensatz zur Methode SAX E wurden die Folate bei Methode SAX A unter sauren Bedingungen vom Kartuschenmaterial eluiert. Entsprechend wurden die zuvor vollständig zum 5-CHO-H₄folat konvertierten Formylvitamere teilweise zum 5,10-CH⁺-H₄folat interkonvertiert. Anders als bei den Ionentauschern wurde für die Aufreinigung mittels C18- und HLB-Material der pH-Wert des Probenextraktes bereits vor Auftragung auf das Festphasenmaterial auf einen pH-Wert von pH 2 eingestellt. Entsprechend fielen die Interkonversionsreaktionen für diese beiden Methoden drastischer aus, was sich in verringerten 5-CHO-H₄folat-Gehalten widerspiegelte. Da bei der Methode HLB die geringsten Werte analysiert wurden, konnte von einer verringerten Stabilität von 5-CHO-H₄folat in methanolischer Lösung im Vergleich zur C18-Elutionslösung bestehend aus 20 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure ausgegangen werden.

3.3.2.2 Untersuchung der Polyglutamatverteilung durch prozentuale Quantifizierung der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate (1-7)

Zur Untersuchung der Diskriminierung der Polyglutamate am Festphasenmaterial in Abhängigkeit der Glutamatrestlänge wurde der prozentuale Gehalt der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate bestimmt. Dies wurde semi-quantitativ als Summe der Vitamere 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₇ nach der von Schaller et al. [2018] entwickelten Methode (Kapitel 13.4) durchgeführt. Mangels ausreichender Mengen an vorhandenen 5-CH₃-H₄folat Polyglutamaten konnte nicht für jede Aufreinigungsmethode eine matrixkorrelierte Response erstellt werden. Eine absolute Quantifizierung der Polyglutamate für die verschiedenen Kartuschaufreinigungen war folglich nicht möglich. Unterschiedliche Response der untersuchten Polyglutamate bei der Messung mittels LC-MS/MS wurden durch die Verwendung der matrixkorrelierten Response der Standard SAX-

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

Methode (SAX E) ausgeglichen. Dies war möglich, da alle eingegangenen Eluate vor der Messung in demselben Elutionspuffer 2 aufgenommen wurden, mit welchem die Analyten bei Methode SAX E eluiert wurden. Demnach konnten bei den LC-MS/MS Messungen für alle Aufreinigungen ähnliche Matrixeffekte angenommen werden. Als interner Standard wurde für alle Aufreinigungsmethoden isopenmarkiertes [$^{13}\text{C}_5$]-5-CH₃-H₄folat vor der Probenextraktion zugesetzt, um Verluste während der Probenextraktion zu kompensieren. Die Menge an internem Standard wurde entsprechend angepasst, um Flächenverhältnisse von A(A)/A(ISTD) innerhalb des linearen Kalibrierbereiches der Responsegeraden zu erhalten. Die so ermittelten quantitativen Werte konnten aufsummiert und als prozentuale Anteile der Summe aus 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₇ angegeben werden.

Tabelle 3.11 Prozentuale Quantifizierung der Polyglutamate 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₇ nach verschiedenen Kartuschenaufreinigungen; n.q. = nicht quantifizierbar.

	Anteil an der Summe 5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₁₋₇						
	5-CH ₃ -H ₄ folat	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₂	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₃	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₄	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₅	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₆	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₇
SAX E	0,11 ± 0,02	0,61 ± 0,04	n,q,	0,42 ± 0,11	n.q.	8,04 ± 0,24	90,8 ± 6,8
SAX A	0,37 ± 0,02	2,05 ± 0,15	n,q,	0,53 ± 0,06	n.q.	9,22 ± 0,43	87,8 ± 4,5
C18	0,05 ± 0,01	0,39 ± 0,03	n,q,	0,26 ± 0,03	n.q.	7,27 ± 0,28	92,0 ± 2,6
HLB	0,10 ± 0,01	0,86 ± 0,04	n,q,	0,45 ± 0,04	n.q.	10,6 ± 0,63	88,0 ± 5,3

Mit allen Aufreinigungsmethoden wurden das Hexa- und Heptaglutamat als Hauptvitamere identifiziert (Tabelle 3.11). Die Summe dieser beiden Vitamere lag zwischen 97,0 % (SAX A) und 99,3 % (HLB) und war somit annähernd identisch für alle vier getesteten Methoden. Lediglich die Verteilung variierte geringfügig zwischen den analysierten Aufreinigungsmethoden. Allerdings lagen diese Schwankungen innerhalb der Messungenauigkeit. Die Vitamere 5-CH₃-H₄PteGlu₃ und 5-CH₃-H₄PteGlu₅ wurden für alle Methoden in Werten unterhalb der Bestimmungsgrenze detektiert. 5-CH₃-H₄folat, 5-CH₃-H₄PteGlu₂ und 5-CH₃-H₄PteGlu₄ wurden in ähnlichen prozentualen Werten ≤ 2 % nachgewiesen. Mit allen Methoden konnte das Oktaglutamat 5-CH₃-H₄PteGlu₈ detektiert werden, welches allerdings mit dem gewählten Ansatz nicht semi-quantitativ erfasst werden konnte.

Diskussion der prozentualen Quantifizierung der Polyglutamate 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₇

Zusammenfassend ließ sich festhalten, dass für die 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate keine Diskriminierung hinsichtlich der Polyglutamatrestlänge beobachtet werden konnte. Die geringfügigen Varianzen der Polyglutamatverteilung zwischen den verschiedenen Aufreinigungsmethoden bewegten sich im Bereich der Messungenauigkeit. Die erfolgreiche Optimierung der alternativen Kartuschenaufreinigungsmethoden konnte somit bestätigt werden.

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

3.3.2.3 Untersuchung der Polyglutamatverteilung durch semi-quantitative Bestimmung aller Polyglutamate

Um auch für alle weiteren Polyglutamate eine Diskriminierung auf Grund der Glutamatrestlänge ausschließen zu können, wurden diese in einem qualitativen Ansatz unter Bezug auf den zugesetzten internen Standard [$^{13}\text{C}_5$]-5- CH_3 - H_4 folat bestimmt. Dazu wurden die Polyglutamate nach der zuvor verwendeten Methode (Kapitel 13.5) aufgearbeitet und mittels LC-MS/MS vermessen (Kapitel 13.5). Die Polyglutamatverteilung wurde für jede Vitamerengruppe an Hand des Flächenverhältnisses $A(A)/A(\text{ISTD})$ bestimmt und als prozentuale Verteilung innerhalb einer Vitamerengruppe berechnet. Zudem wurde der prozentuale Anteil an der Summe aller detektierbaren Vitamere ermittelt.

Für alle Aufreinigungsmethoden wurden die Hexa-, Hepta- und Oktaglutamate als Hauptvitamere identifiziert (Anhang 10). Größtenteils konnte auch hier für alle Kartuschaufreinigungen eine ähnliche Polyglutamatverteilung innerhalb der Vitamergruppen nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildeten die PteGlu_n -Vitamere, welche mit der HLB-Methode nicht identifiziert werden konnten. Da es sich hierbei allerdings um ein metabolisch inaktives Vitamer handelt, wurde dies nicht näher erörtert.

Wie bei der Bestimmung der Gesamtfolatgehalte konnten allerdings deutliche Unterschiede der detektierbaren Menge an Formylvitameren beobachtet werden. Berechnet als prozentualer Anteil an allen detektierbaren Polyglutamate zeigte sich auch hier eine Abnahme von 5- CHO - H_4 PteGlu_{6-9} der alternativen Methoden im Vergleich zur Standardmethode SAX E. Zugleich ging die Verringerung der 5- CHO - H_4 folat Polyglutamate mit einer erhöhten Detektion von 5,10- CH^+ - H_4 PteGlu_{6-7} einher, wie in Abbildung 3.8 dargestellt. Die Summe beider Formylvitamere allerdings blieb nicht konstant zwischen den verschiedenen Aufreinigungsmethoden.

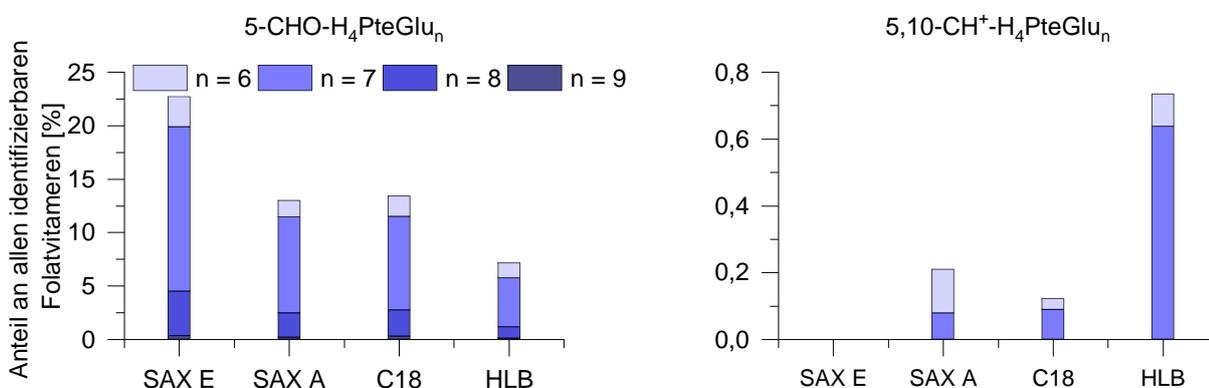


Abbildung 3.8 Qualitativer Anteil der 5-CHO-H₄folat und 5,10-CH⁺-H₄folat Polyglutamate an der Summe aus nachweisbaren Polyglutamaten.

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

Diskussion der semi-quantitativen Bestimmung aller Polyglutamate

Auch für alle weiteren, untersuchten Vitamere konnte keine Diskriminierung der Polyglutamate beobachtet werden, da sich für alle untersuchten Kartuschaufreinigungen eine ähnliche Verteilung der Hauptpolyglutamate (Hexa-, Hepta- und Okttaglutamate) nachweisen ließ. Eine fehlende Detektion der PteGlu-Vitamere nach Aufreinigung mittels HLB-Kartuschen wurde auf Grund der Tatsache, dass es sich hierbei lediglich um das Oxidationsprodukt eines metabolisch aktiven Vitameres (H_4 folat) handelt, nicht weitergehend untersucht. Für die Formylvitamere konnten auf Polyglutamatebene ähnliche Beobachtungen gemacht werden wie zuvor im Rahmen der Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes für die Monoglutamate. Für alle alternativen Kartuschaufreinigungen waren im Vergleich zur Standardmethode SAX E sinkende prozentuale Gesamtanteile der Formylvitamere bei steigender Detektion von 5,10- CH^+ - H_4 folaten zu verzeichnen. Eine vollständige Interkonversion der 5-CHO- H_4 folate in die 5,10- CH^+ - H_4 folatform allerdings konnte auf Basis der Aufsummierung beider Vitamere nicht festgestellt werden, welche Schwankungen zwischen den gewählten Festphasenmaterialien unterlag. Dies könnte zum einen Verlusten während der Aufarbeitung geschuldet sein. Zum anderen war von einer verschiedenen Response der beiden Vitamere bei der massenspektrometrischen Analyse auszugehen, welche durch die Verwendung eines nicht idealen internen Standards (Monoglutamat) nicht vollständig ausgeglichen werden konnten. Auch eine unterschiedliche Weiteroxidation der Vitamere in Abhängigkeit der gewählten Aufreinigungsbedingungen wäre denkbar. Da keine isotopenmarkierten Polyglutamatstandards zur Verfügung standen, konnte dies nicht weiter erörtert werden.

3.3.3 Vergleichendes Fazit und Diskussion der alternativen Kartuschaufreinigung

Durch schrittweise Optimierung verschiedener Aufreinigungsmethoden mittels Festphasenextraktion konnten gute Alternativen zur Standardmethode gefunden werden, welche eine pufferfreie Elution der Folatvitamere ermöglichten. Neben einer alternativen Elution von SAX-Kartuschen wurden zudem C18- und HLB-Kartuschen als verwendbare Alternativen identifiziert. Es wurden Untersuchungen angestellt, ob durch eine Veränderung der Elutionsbedingungen die Vitamerenverteilung beeinflusst wird. Zudem wurde überprüft, ob an den alternativen Kartuschenmaterialien Diskriminierungen auf Grund der Polyglutamatrestlänge beobachtet werden konnten. Die Vitamerenverteilung wurde durch Quantifizierung des Gesamtfolatgehaltes nach enzymatischer Dekonjugation der Polyglutamate bestimmt. Eine potentielle Diskriminierung von Polyglutamaten wurde durch prozentuale Quantifizierung der Hauptvitamere

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₇ überprüft. Zusätzlich wurde die Verteilung der Polyglutamate innerhalb einer Vitamergruppe sowie deren Anteil an allen nachweisbaren Polyglutamaten semi-quantitativ bestimmt.

Die Bestimmung der Vitamerenverteilung zeigte vergleichbare Summen der untersuchten Analyten im Vergleich der getesteten Kartuschenaufreinigungen. Auch die Quantifizierung von H₄folat und 5-CH₃-H₄folat sowie deren Oxidationsprodukten PteGlu und MeFox ergaben ähnliche Folatgehalte in der untersuchten Bäckerhefe. Für das Formylvitamer 5-CHO-H₄folat sowie dessen Oxidationsprodukt 10-CHO-PteGlu konnten verringerte Werte in der Folge SAX E > SAX A > C18 > HLB beobachtet werden. Die zu Grunde liegende Interkonversionsreaktion 5-CHO-H₄folat ↔ 5,10-CH⁺-H₄folat je nach pH-Wert des Probenextraktes wurde als Ursache dafür vermutet. Demnach musste je nach Verwendung einer Aufreinigungsmethode berücksichtigt werden, dass entweder alle Formylvitamere in Form von 5-CHO-H₄folat vorliegen (SAX E) oder das Gleichgewicht eher zu Gunsten des 5,10-CH⁺-H₄folat verschoben wurde (SAX A, C18 und HLB). Ein Abbilden der tatsächlichen Zusammensetzung dieser beiden Formylvitamere gestaltete sich als schwierig.

Hinsichtlich einer möglichen Diskriminierung von Polyglutamaten am Kartuschenmaterial konnten allerdings keine nennenswerten Unterschiede zwischen den getesteten Methoden festgestellt werden. Folglich konnte die Polyglutamatverteilung der Folatvitamere mit jeder der vier Aufreinigungsmethoden gut abgebildet werden. Allerdings konnten auch auf Polyglutamatabene Interkonversionsreaktionen der Formylvitamere nachgewiesen werden. Die Summe zwischen den Vitaminen 5-CHO-H₄folat und 5,10-CH⁺-H₄folat jedoch zeigte ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den Kartuschen auf. Mangels verfügbarer isotope markierter Standards aber konnten diese Unterschiede nicht näher untersucht werden. Weitere Verluste der Formylvitamere in Form von Oxidationsreaktionen je nach verwendeter Kartuschenaufreinigung scheinen an dieser Stelle am plausibelsten.

Zusammenfassend ließ sich dennoch festhalten, dass unter Berücksichtigung der Interkonversion der Formylvitamere eine pufferfreie Elution der Analyten für die spätere Anwendung auf UHR-MS Messungen gefunden werden konnte.

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

3.4 Zusammenfassung und Diskussion der alternativen Aufarbeitungs- und Aufreinigungsmethoden

Für die detailliertere Quantifizierung von Oxidationsreaktionen während der Probenaufarbeitung wurde zunächst das Vitamer MeFox in die bestehende SIVA-Methode integriert. Neben den Analyten PteGlu und 10-CHO-PteGlu kann dieses Oxidationsprodukt des Vitameres 5-CH₃-H₄folat nun zusätzlich als Marker für Oxidationsreaktionen herangezogen werden. Die Integration des Analyten wurde einer Validierung nach Vogelgesang und Hädrich [1998] unterzogen. Durch Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze zeigte sich eine etwas geringere Empfindlichkeit des Analyten MeFox im Vergleich mit den übrigen Analyten 10-CHO-PteGlu, 5-CH₃-H₄folat, 5-CHO-H₄folat, H₄folat sowie PteGlu. NWG und BG lagen im Bereich zwischen Faktor 2 und 4 höher als für die bereits validierten Analyten. [Striegel et al. 2018b] Die geringere Empfindlichkeit von MeFox könnte auf die verringerte Probeneinwaage und die nicht Analyt-freie Matrix zurückgeführt werden. Im Vergleich mit anderen Methoden konnte die Methode dennoch als empfindlich bewertet werden. [Brouwer et al. 2008; Chandra-Hioe et al. 2011] Die Reproduzierbarkeit und Richtigkeit der Methode wurden gezeigt durch Bestimmung der Wiederfindung sowie Intra-day, Inter-day und Gerätepräzision. Die Reproduzierbarkeit war mit durchschnittlich 107 % als sehr gut zu bewerten. Die Richtigkeit verschiedener Aufarbeitungen zeigte größere Schwankungen innerhalb eines Tages als zwischen den einzelnen Aufarbeitungstagen. Demnach konnte gezeigt werden, dass durch Mehrfachaufarbeitung und Mehrfachinjektion diese Schwankungen (Intra-day- und Gerätepräzision) deutlich reduziert werden können.

Für spätere Untersuchungen des gesamten Hefemetaboloms mit Fokus auf den Metabolismus der Folate wurde versucht, die Probenextraktion schonender zu gestalten. Die klassische Folateextraktion bedient sich für gewöhnlich eines Erhitzungsschrittes auf 100 °C zwischen fünf und zehn Minuten, um gebunden vorliegende Proteine durch Präzipitation von Strukturproteinen freizusetzen. [Gregory 1989; Arcot und Shrestha 2005] Dagegen zielen Aufarbeitungen für metabolomische Untersuchungen generell drauf ab, möglichst jegliche Veränderung der Metabolitenzusammensetzung eines Organismus zu vermeiden. Einen Ansatz hierzu bietet die Methode des Siedens in gepufferter Ethanollösung, wie er bereits von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich durchgeführt wurde. [Gonzalez et al. 1997; Canelas et al. 2009] Basierend darauf wurde diese Methode für die Extraktion der Folate optimiert und mit der klassischen Folateextraktion durch Erhitzen verglichen. Sowohl der Vergleich der Gesamtfolatgehalte sowie die relativen Wiederfindungen der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate machten allerdings eine verminderte Folateextraktion mittels des Siedens in gepufferter Ethanollösung deutlich. Lag die Effizienz der Extraktion bei der Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes noch bei durchschnittlich

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

75 % im Vergleich zum Erhitzen, konnten für die Polyglutamate lediglich 19 % der Analyten extrahiert werden. Ein Unterschied in der Extraktion zwischen den einzelnen Polyglutamatvimeren konnte nicht gezeigt werden.

Demnach waren die gravierenden Differenzen zwischen der Bestimmung der Monoglutamate nach enzymatischer Dekonjugation (75 % Effizienz) und der Polyglutamate (19 % Effizienz) auf methodische Unterschiede zurückzuführen. Im Gegensatz zur Extraktion der Polyglutamate konnte für die Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes nicht gänzlich auf Erhitzungsschritte verzichtet werden. Die für die Reduktion der Polyglutamate zu den entsprechenden Monoglutamaten zugegebenen Konjugasen mussten durch Erhitzen denaturiert werden. Diese Schritte schienen also nochmals einen erheblichen Beitrag zur vollständigeren Folatextraktion zu leisten. Sowohl enzymatische als auch thermische Freisetzung gebunden vorliegender Folatderivate wurden als Ursachen vermutet. Insgesamt konnte mit Hilfe der alternativen Siedemethode keine zufriedenstellende Extraktion der Polyglutamate erreicht werden. Zudem zeigte die Abschätzung der Polyglutamate geringfügig höhere Anteile an MeFox-Polyglutamaten im Vergleich zu den jeweils entsprechenden 5-CH₃-H₄folat Polyglutamaten, welche als deren Vorläufer angenommen werden können. [Verlinde et al. 2009; Ringling und Rychlik 2017] Entgegen der eigentlichen Intention konnte demnach nicht garantiert werden, dass die alternative Siedemethode eine schonender Probenextraktion ermöglicht. Vielmehr musste davon ausgegangen werden, dass die Probe ähnlichen oxidativen Belastungen ausgesetzt war wie bei der Extraktion durch Erhitzen. Des Weiteren führte die Extraktion durch Sieden zu deutlichen Einbußen in der Effizienz der Extraktion, weshalb im Folgenden auf die weitere Verwendung der alternativen Probenextraktion verzichtet wurde. Für spätere Anwendungen auf die Untersuchung des Metabolitenprofils von Hefe musste folglich die mögliche Veränderung dieses Metabolitenprofils durch den Erhitzungsschritt angenommen werden. Da der Hauptfokus dieser Arbeit allerdings auf dem Metabolismus der Folate lag, welches dieser härteren Extraktion bedarf, wurden diese Metabolitenveränderungen zu Gunsten einer verbesserten Folatextraktion in Kauf genommen.

Bedingt durch die geringen Gehalte in Lebensmitteln werden Probenextrakte zur Analyse der Folate meist mittels Festphasenextraktion aufgereinigt. Üblicherweise finden dazu starke Anionenaustauschermaterialien ihre Verwendung. [Nilsson et al. 2004; Patring und Jastrebova 2007; Mönch und Rychlik 2012] Für eine vollständige Elution der ans Kartuschenmaterial gebundenen Folate bedient man sich hierzu meist stark salzlastiger Puffergemische. Für die spätere Analyse der Folatmetaboliten mittels UHR-MS war dieser Elutionspuffer allerdings nur beschränkt verwendbar. Während das Sprayshield der Ionenquelle des Q-ToF-MS Instrumentes größtenteils ein Abfangen der Puffersalze sicherstellte, musste für Messungen mittels FT-ICR-MS gänzlich auf den Zusatz von Puffersalzen verzichtet werden. Demnach mussten alternative

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

Aufreinigungen mittels Festphasenextraktion gefunden werden, um dennoch folatreiche Probenextrakte zu erhalten. Dazu wurden verschiedene Festphasenmaterialien auf deren Eignung hin überprüft und schrittweise die Zahl möglicher, alternativer Materialien reduziert. Letztendlich wurde eine Aufreinigungsmethode mittels starker Anionentauscher unter Verwendung von säurehaltigen Lösungsmittelgemischen zur Elution der Analyten optimiert. Des Weiteren wurden mit C18- und HLB-Kartuschen Aufreinigungen basierend auf Umkehrphasen- sowie polymerbasierten Mischphasen entwickelt und optimiert.

Die drei alternativen Aufreinigungsverfahren wurden mit der standardmäßigen Aufreinigung hinsichtlich mehrerer Parameter verglichen. Zum einen wurde die Vitamerenverteilung durch Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes untersucht. Zum anderen wurde ein relativer Vergleich der Polyglutamatverteilung sowie die semi-quantitative Bestimmung der Polyglutamat-Vitamerenverteilung durchgeführt. Sowohl die Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes als auch die Vitamerenverteilung der Polyglutamate offenbarte eine Verschiebung der Vitamerenverteilung je nach verwendeter Aufreinigungsmethode. Besonders stark betroffen waren hiervon vor allem die Formylvitamere. Mittels SAX-Kartuschen und Elution mit einem Puffergemisch konnten die höchsten 5-CHO-H₄folat Gehalte – sowohl für die Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes als auch der Polyglutamatverteilung – analysiert werden. Zugleich konnte der Interkonversionspartner 5,10-CH⁺-H₄folat gar nicht identifiziert werden. Der Vergleich mit den alternativen Kartuschenaufreinigungen zeigte sinkende Gehalte der Formylvitamere in der Folge SAX (Puffergemisch) > SAX (angesäuertes Lösungsmittelgemisch) > C18 > HLB. Die Abstufung konnte ebenfalls sowohl bei der Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes als auch bei der Polyglutamatverteilung beobachtet werden. Diese Entwicklung des Vitameres 5-CHO-H₄folat konnte auf Veränderungen des pH-Wertes während der Probenaufarbeitung zurückgeführt werden. Wie Untersuchungen von Jägerstad und Jastrebova [2013] sowie Baggott [2000] gezeigt haben, wird mit sinkendem pH-Wert die Interkonversion zwischen 5-CHO-H₄folat und 5,10-CH⁺-H₄folat zu Gunsten des 5,10-CH⁺-H₄folates verschoben. Bei pH > 4,8 allerdings liegt dieses zu Gunsten von 5-CHO-H₄folat. Demnach waren in den hier durchgeführten Untersuchungen beide Effekte zu beobachten. Zum einen lagen bei der Aufreinigung mittels SAX-Kartuschen und Verwendung des Puffergemisches zur Elution alle Formylvitamere als 5-CHO-H₄folat vor. Zum anderen wurde mit Verwendung von sauren Elutionslösungen (SAX Alternative und C18-Kartuschen) oder dem Ansäuern der Probenextraktes vor der Kartuschenaufreinigung (C18- und HLB-Kartuschen) die Verschiebung des Gleichgewichtes zum 5,10-CH⁺-H₄folat begünstigt. Allerdings war auch die Summe aller Polyglutamate der Formylvitamere (5-CHO-H₄folat, 5,10-CH⁺-H₄folat sowie 10-CHO-PteGlu) der abnehmenden Tendenz unterworfen. Bei der Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes wurden lediglich die Vitamere 5-CHO-H₄folat und 10-CHO-PteGlu quantifiziert. Doch auch diese Summe zeigte absteigende

3. Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Analyse des ganzheitlichen Folatmetabolismus in Hefen mittels LC-MS/MS

Gehalte in der bereits genannten Reihenfolge. Demnach war von einem weiteren Abbau der Formylvitamere mit sinkendem pH-Wert während der Probenaufarbeitung auszugehen. Alle weiteren Vitamere waren von diesem pH-abhängigen Abbau weniger stark betroffen beziehungsweise zeigten zwischen den Kartuschenaufreinigungen kaum Unterschiede.

Eine generelle Diskriminierung der Polyglutamate je nach verwendeter Kartuschenaufreinigung wie von Kopp et al. [2016] beobachtet, konnte nicht festgestellt werden. Die relative Verteilung der Polyglutamate blieb über die verschiedenen Festphasenmaterialien hinweg konstant. Unter Berücksichtigung der Verschiebung der Formylvitamere konnten also alternative Aufreinigungsmethoden gefunden werden, mit welchen das Polyglutamatspektrum gut abgebildet werden konnte. Hinsichtlich der Formylvitamere ließ sich allerdings schwer eine Aussage zur ursprünglich in der Probe vorhandenen Verteilung treffen. Alle Proben wurden zunächst bei pH 5,0 extrahiert. Somit wurden vorerst alle Formylvitamere ins 5-CHO-H₄folat umgewandelt, um dann während der Festphasenextraktion teilweise ins 5,10-CH⁺-H₄folat und teilweise in Oxidations- und Abbauprodukte umgewandelt zu werden. Das tatsächliche Verhältnis aller beteiligten Formylvitamere wäre also nur durch direkte Messung im Organismus, beispielsweise per MALDI-ToF, oder durch *dilute and shoot* Methoden möglich. Dass dieser Ansatz bedingt durch die geringen Folatgehalte im µM Bereich nicht durchführbar war, zeigte sich im späteren Verlauf der Arbeit (Kapitel 5.1 sowie Kapitel 5.2).

4 Kultivierungsexperimente zur quantitativen Analyse von Folatmetaboliten in Hefen

Die Zielsetzung war es, den Folatmetabolismus in Hefen detaillierter zu untersuchen. Dazu wurde die obergärige Weizenbierhefe LeoBavaricus – TUM 68® (*S.cerevisiae*) als Modellorganismus gewählt, da dieser Hefestamm gut charakterisiert und sequenziert ist. [Hutzler 2009] Für eine kontrollierte und reproduzierbare Kultivierung wurde zunächst ein geeignetes Kultivierungsmedium gewählt, welches möglichst hohe Folatgehalte in der gezüchteten Hefe begünstigte. Anschließend wurden weitere Kultivierungsbedingungen wie die Kultivierungsdauer optimiert. Mit Hilfe der gewählten Parameter wurde der Folatgehalt im zeitlichen Verlauf der Kultivierung bestimmt. Neben dem Gesamtfolatgehalt wurden zudem die Polyglutamate des Hauptvitameres 5-CH₃-H₄folat quantifiziert sowie die restlichen Polyglutamatvitamere semi-quantitativ im Verhältnis zum zugesetzten ISTD [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat erfasst.

4.1 Auswahl geeigneter Kultivierungsbedingungen

Um ein gezieltes und vor allem reproduzierbares Wachstum des gewählten Hefestammes LeoBavaricus – TUM 68® zu ermöglichen, wurde die Anzucht auf synthetischem Minimalmedium gewählt. Nur so konnte die Bereitstellung aller für das Hefewachstum notwendigen Nährstoffe definiert erfolgen. Synthetische Minimalmedien setzen sich aus den Komponenten zusammen, welche mindestens für ein Wachstum der Zellen von Interesse benötigt werden. Diese Komponenten sind unter anderem eine Kohlenstoffquelle wie Glucose, eine Stickstoffquelle, Phosphat- und Schwefelquellen sowie Mineralstoffe und Spurenelemente wie Magnesium und Mangan. Des Weiteren werden essentielle Vitamine bereitgestellt. [Lodish 2002] Im Gegensatz zu Minimalmedien enthalten Vollmedien neben den benötigten Nährstoffen auch Stoffe, welche der Organismus selbst produzieren kann, um ein schnelleres und besseres Wachstum zu ermöglichen. [Lodish 2002] So setzt sich ein universelles Vollmedium zur Kultivierung von Hefen für gewöhnlich aus Hefeextrakt, bakteriellem Pepton sowie Glucose (Yeast – Peptone – Glucose, YPD) zusammen. Hefen und Bakterien sind beides Organismen, welche Folate *de novo* synthetisieren können. [Schertel et al. 1965; LeBlanc et al. 2007] Demnach wird in Vollmedien dem Organismus bereits Folsäure zur Verfügung gestellt, was für eine Nachverfolgung der vollkommenen *de novo* Synthese von Folaten nicht zielführend war. Daher wurde eine Kultivierung in Minimalmedium gewählt.

4. Kultivierungsexperimente zur quantitativen Analyse von Folatmetaboliten in Hefen

4.1.1.1 Wahl eines geeigneten Minimalmediums zur Kultivierung

Zu Beginn wurden verschiedene Minimalmedien getestet. Diese beruhten auf der Zusammensetzung, wie sie von Zonneveld [1986] verwendet wurde und wurde teilweise angepasst. Beispielsweise wurde auf die Zugabe von Folsäure und deren Vorläufer *p*-Aminobenzoesäure als Bestandteil der zugegebenen Vitaminlösung verzichtet.

Zunächst wurde eine direkte Inokulation ins Minimalmedium getestet. Mit diesem Ansatz konnte allerdings kein Hefewachstum beobachtet werden. Daher wurde ein Teil der Hefestammkultur vom Kultivierungsagar abgenommen, in Vollmedium überimpft und für 48 h bei 30 °C kultiviert, womit ein gutes Wachstum erreicht werden konnte. Um alle Reste des Vollmediums für alle weiteren Kultivierungen zu eliminieren, wurden drei zeh-prozentige Verdünnungsschritte in Minimalmedium vorgenommen und analog kultiviert. Von dieser so generierten Vorkultur wiederum wurde 1 % in die getesteten Minimalmedien überimpft, sodass der potentielle Rückstand des Vollmediums auf einen vernachlässigbaren Wert von $\leq 0,1 \text{ ‰}$ gesenkt werden konnte.

Die veränderten Parameter der getesteten Minimalmedien sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Eine detaillierte Zusammensetzung der Medien findet sich in Abschnitt 10.4.

Tabelle 4.1 Getestete Medien zur Entwicklung des optimalen Kultivierungsmediums der Hefe TUM 68®.

Medium	Glucose-anteil [mM]	Stickstoffquelle	Ammonium-anteil [mM]	Weitere Zusätze
M1	55,5	(NH ₄) ₂ SO ₄	10,3	keine
M2	110	(NH ₄) ₂ SO ₄	10,3	keine
M3	55,5	NH ₄ Cl	31,5	keine
M4	55,5	NH ₄ Cl	31,5	63,7 nM Ölsäure
M5	55,5	NH ₄ Cl	31,5	63,7 nM Ölsäure 37,8 nM Ergosterin
M6	55,5	(NH ₄) ₂ SO ₄	20,6	keine
M7	55,5	(NH ₄) ₂ SO ₄	10,3	63,7 nM Ölsäure 37,8 nM Ergosterin gelöst in 3 mL Tergitol/Ethanol (50/50, v/v)

4. Kultivierungsexperimente zur quantitativen Analyse von Folatmetaboliten in Hefen

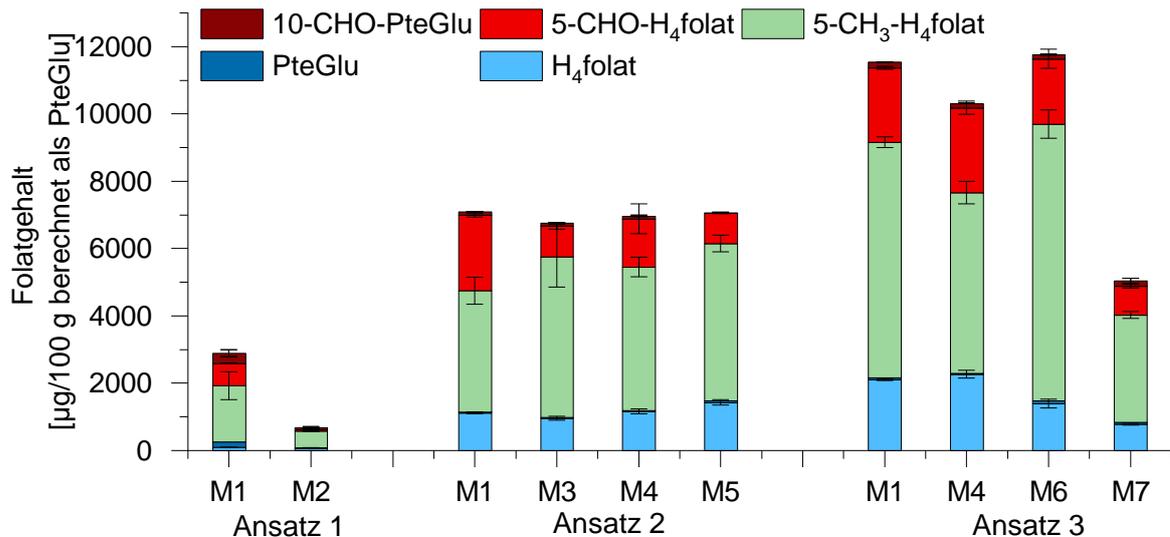


Abbildung 4.1 Optimierung des Minimalmediums zur Kultivierung von TUM 68®.

Abbildung 4.1 zeigt zusammenfassend die Optimierung des Minimalmediums, welche in drei Schritten durchgeführt wurde. Zunächst wurde die Verdoppelung der Kohlenstoffquelle auf 110 mM Glucose getestet (M2), welche im Vergleich zum Ausgangsmedium M1 in deutlich geringeren Folatgehalten resultierte. Im zweiten Schritt wurde zum einen die Stickstoffquelle verändert und Ammoniumsulfat (M1) mit derselben Masse an Ammoniumchlorid (M3) ersetzt. Vorteil an Ammoniumchlorid ist der höhere molare Anteil (31,5 mM) an der eigentlichen Stickstoffquelle Ammonium im Vergleich zu Ammoniumsulfat (10,3 mM). Entgegen der Erwartung konnten aber mit der Verwendung von Ammoniumchlorid sogar leicht verminderte Folatgehalte erzielt werden. Nahezu unverändert im Vergleich dazu blieb dagegen der Gesamtfolatgehalt durch die zusätzliche Verwendung von Ölsäure (M4) sowie Ölsäure und Ergosterin (M5). In einem abschließenden Schritt wurde wieder die ursprüngliche Stickstoffquelle Ammoniumsulfat verwendet und diese Stickstoffquelle weiter optimiert. Es wurde nochmals überprüfend die Verwendung Ammoniumchlorid (5 g/L, 31,5 mM, M4) statt Ammoniumsulfat (5 g/L, 10,3 mM, M1) getestet. Zudem wurde die Menge an Ammoniumsulfat von 10,3 mM auf 20,6 mM erhöht (M6). Trotz Verdopplung der Ammoniumsulfatmenge (M6 im Vergleich zu M1) konnte keine Verbesserung des Folatgehaltes erzielt werden. Zusätzlich wurde die Zugabe von Ölsäure und Ergosterin zusammen mit dem Emulsionsvermittler Tergitol getestet (M7), um eine optimale Durchmischung der lipophilen (Ölsäure und Ergosterin) und wässrigen Phase (restliches Minimalmedium) zu ermöglichen. Auch hiermit konnte keine Verbesserung des Gesamtfolatgehaltes erzielt werden, weshalb für alle weiteren Kultivierungsexperimente Medium M1 verwendet wurde.

4. Kultivierungsexperimente zur quantitativen Analyse von Folatmetaboliten in Hefen

Diskussion der Wahl des Minimalmediums zur Kultivierung

Pietercelie et al. [2011] konnten eine gesteigerte Folatproduktion durch Zugabe von Aktivatoren wie Ölsäure beobachten. Im Gegensatz dazu wurde das Hefewachstum sowie die Folatproduktion eingeschränkt durch ethanolischen Stress. Landolfo et al. [2010] wiederum konnten zeigen, dass durch die Supplementierung von Hefemedien mit Ölsäure und Ergosterin die Marker für oxidativen Stress deutlich reduziert werden konnten. Dieser war besonders hoch in Fermentationsmedien, welchen es an Lipidnährstoffen mangelte. Eine deutliche Verbesserung des Hefewachstums konnte allerdings mit keinem der in der hier vorliegenden Studie verwendeten Zusätze (M4 und M5) beobachtet werden. Daher wurde im einem weiteren Schritt zusätzlich der Emulsionsvermittler Tergitol verwendet, wie dies auch von Landolfo et al. [2010] beschrieben wird. Dieser soll eine optimale Vermischung der lipophilen (Ölsäure und Ergosterin) und wässrigen Phase (restliches Minimalmedium) ermöglichen. Vermutlich begründet durch den notwendigen höheren Ethanolanteil von 1 % zum Lösen von Tergitol, Ölsäure und Ergosterin im Medium M7 im Vergleich zu Medium M1, konnte hier eine drastische Reduktion des Gesamtfolatgehaltes detektiert werden. Demnach wurde auf den Zusatz von lipophilen Aktivatoren verzichtet. Die Erhöhung des Anteils der Kohlenstoffquelle (M2) resultierte in verringerten Folatgehalten, wohingegen die Erhöhung des Anteils der Stickstoffquelle (M6) gleichbleibende Folatgehalte erzielt. Daher wurde für die weiteren Studien das Ausgangsmedium M1 beibehalten.

4.1.1.2 Wahl der geeigneten Kultivierungszeitspanne

Wie Abbildung 4.1 zu entnehmen ist, schwankten auch die Gesamtfolatgehalte bei Kultivierung im selben Minimalmedium M1 enorm. Diese Schwankungen waren deutlich ausgeprägter als die Unterschiede zwischen den verschiedenen verwendeten Kultivierungsmedien. Die Varianz der Gesamtfolatgehalte konnte zurückgeführt werden auf unterschiedliche Kultivierungszeiten. So betrug diese bei Ansatz 1 (M1, M2) 96 h, bei Ansatz 2 (M1, M3 – M5) 48 h und bei Ansatz 3 (M1, M4, M6, M7) lediglich 32 h. Insgesamt zeichnete sich ein indirekt proportionaler Zusammenhang zwischen der Länge der Kultivierungszeit und dem Gesamtfolatgehalt ab.

Bereits Hjortmo et al. [2008a] konnten in Kultivierungsexperimenten mit Hefen eine deutlich reduzierte Folatproduktion mit Übergang in die stationäre Wachstumsphase beobachten. Die Phase mit den höchsten Folatgehalten dagegen war die exponentielle Wachstumsphase. Der Vergleich der Kultivierungszeiten der Ansätze 1 – 3 ließ ähnliche Rückschlüsse zu. So war der Ansatz mit der kürzesten Kultivierungsdauer auch jener, der die höchsten Gesamtfolatgehalte aufwies.

4. Kultivierungsexperimente zur quantitativen Analyse von Folatmetaboliten in Hefen

Um diese Vermutung nochmals zu bestätigen und den Zeitpunkt für maximale Gesamtfolatgehalte in der Hefe TUM 68[®] zu eruieren, wurde eine Kultivierung in Medium M1 mit verschiedenen Kultivierungslängen vorgenommen. Die Bestimmung erfolgte für die Zeitpunkte 28 – 32 h mangels größerer Biomasse in Einfachbestimmung. Daher konnten diese Werte nur als Orientierungswerte angesehen werden. Die Zeitpunkte 34 – 84 h dagegen wurden in Dreifachbestimmung analysiert.

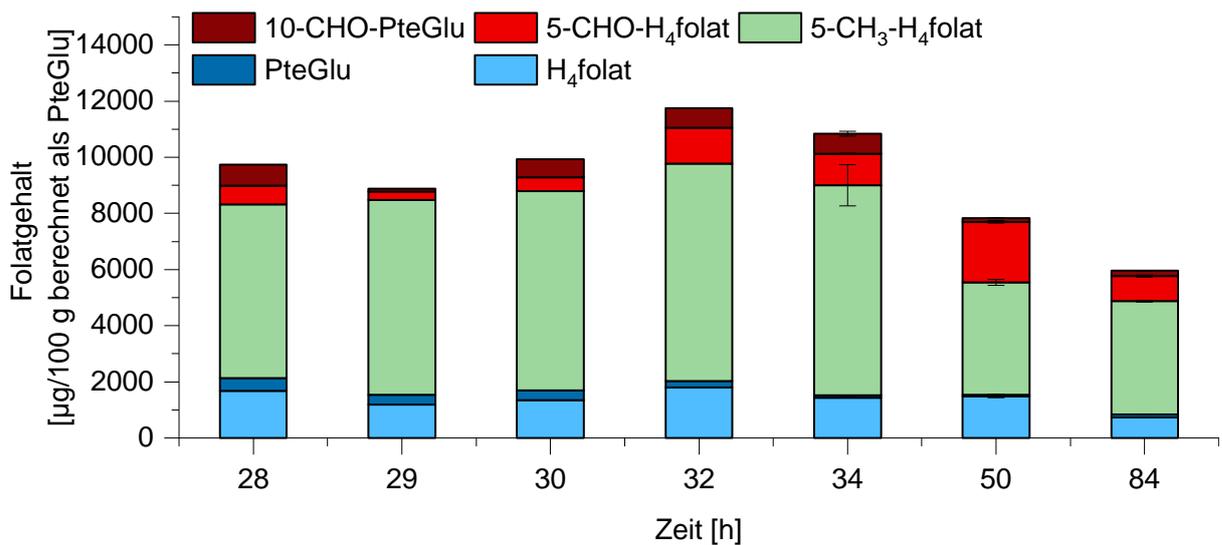


Abbildung 4.2 Optimierung der geeigneten Kultivierungszeitspanne von TUM 68[®] in Minimalmedium.

Diskussion der Wahl der geeigneten Kultivierungszeitspanne

Abbildung 4.2 veranschaulicht die sinkende Tendenz des Gesamtfolatgehaltes mit Verlängerung der Kultivierungszeit, was die Ergebnisse von Hjortmo et al. [2008a] bestätigte. Zudem zeichnete sich eine Verschiebung der Vitamerenverteilung zum Ende der Kultivierung hin ab. Des Weiteren zeigte die Quantifizierung zwei lokale Maxima der Gesamtfolatgehalte, wie dies ebenso von Hjortmo et al. [2008a] analysiert worden war. Um die sich abzeichnenden Tendenzen zu verifizieren, wurde daher eine erneute Kultivierung zwischen 20 h und 80 h Kultivierungsdauer in größerem Maßstab durchgeführt, welche im nachfolgenden Abschnitt detailliert beleuchtet wird.

4. Kultivierungsexperimente zur quantitativen Analyse von Folatmetaboliten in Hefen

4.2 Folatgehalte in TUM 68® als Varianz der Kultivierungsdauer

Wie sich im Vorversuch (Kapitel 4.1) bereits gezeigt hatte, konnte mit Verlängerung der Kultivierungszeit von Hefen im Minimalmedium eine Abnahme des Gesamtfolatgehaltes nachgewiesen werden. Um dieses Phänomen detaillierter zu beleuchten, wurde die Hefe TUM 68® in definiertem Minimalmedium im Zeitraum von 20 bis 80 Stunden kultiviert. Neben der Vitamenzusammensetzung wurde zudem die Polyglutamatverteilung des Hauptvitameres 5-CH₃-H₄folat quantifiziert. Alle übrigen Polyglutamatvitamere wurden an Hand des Verhältnisses zum zugesetzten internen Standard (ISTD) semi-quantitativ erfasst. Für die Identifizierung der jeweiligen Wachstumsphase wurde vor dem Abzentrifugieren des Mediums die optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm (OD₆₀₀) bestimmt.

4.2.1 Quantifizierung des Gesamtfolatgehaltes als Funktion des zeitlichen Kultivierungsverlaufes

Die Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes der kultivierten Hefe erfolgte wie unter Kapitel 13.3 erläutert nach enzymatischer Dekonjugation zu den entsprechenden Monoglutamaten. Abbildung 4.3 zeigt den zeitlichen Verlauf der verschiedenen Vitamere sowohl für die metabolisch aktiven Vitamere H₄folat, 5-CH₃-H₄folat sowie 5-CHO-H₄folat (Abbildung 4.3.A) als auch für die metabolisch inaktiven Abbauprodukte PteGlu, MeFox sowie 10-CHO-PteGlu (Abbildung 4.3.B).

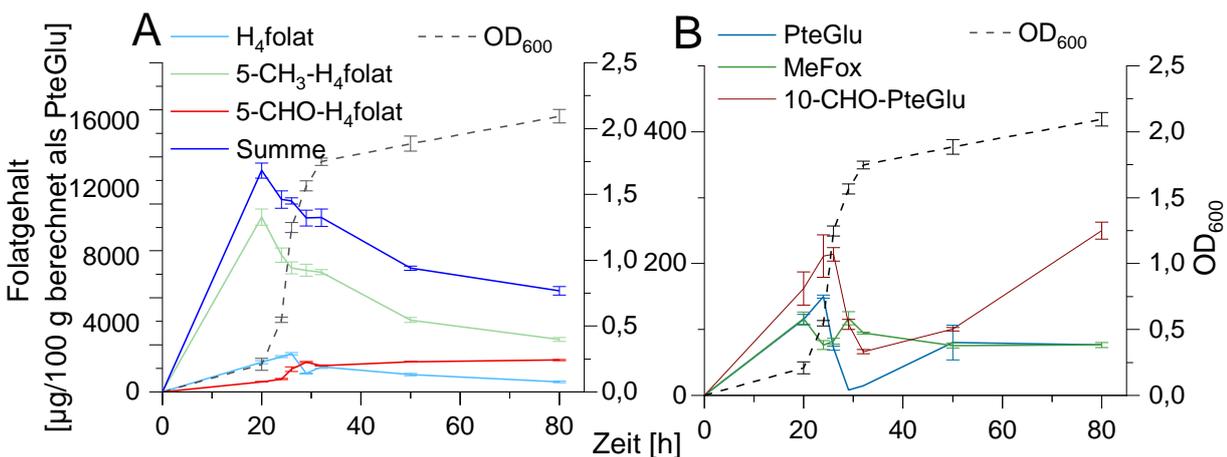


Abbildung 4.3 Gesamtfolatgehalte in TUM 68® nach Kultivierung in Minimalmedium für 20 bis 80 h.

Es zeigte sich, dass im Verlauf der Kultivierung der Folatgehalt von 13.200 µg/100 g nach 20 h auf 6.000 µg/100 g nach 80 h Kultivierungszeit sank. Die exakten quantitativen Ergebnisse sind Anhang 12 zu entnehmen. Die höchsten Folatgehalte konnten während der respiratorischen Wachstumsphase analysiert werden. Das Hauptvitamer mit einem Anteil von etwa 80 % war 5-CH₃-H₄folat (vgl. Abbildung 4.3.A), wobei dessen Gehalte bereits während der

4. Kultivierungsexperimente zur quantitativen Analyse von Folatmetaboliten in Hefen

exponentiellen Wachstumsphase begannen abzunehmen. H₄folat zeigte einen ähnlichen Verlauf wie das Hauptvitamer 5-CH₃-H₄folat, allerdings mit einer gewissen Versatzzeit von etwa vier Stunden. Generell konnten auch für dieses Vitamer steigende Gehalte während der exponentiellen Wachstumsphase beobachtet werden, welche mit Beginn der stationären Phase wieder abnahmen. Im Gegensatz zu 5-CH₃-H₄folat und H₄folat dagegen konnte für 5-CHO-H₄folat eine kontinuierliche Zunahme der Gehalte im Kultivierungsverlauf beobachtet werden. Der prozentuale Verlust von 5-CH₃-H₄folat wurde durch die Zunahme von 5-CHO-H₄folat ausgeglichen, sodass die Summe dieser beiden Vitamere gemessen am Gesamtfolatgehalt konstant bei etwa 84 % verblieb.

Verglichen mit den entsprechenden metabolisch aktiven Formen H₄folat und 5-CHO-H₄folat zeigten die Oxidationsprodukte PteGlu und 10-CHO-PteGlu dieselbe zeitliche Entwicklung während der Kultivierung (vgl. Abbildung 4.3.B). Folglich schienen Oxidation und Degradation kontinuierlich im selben Ausmaß zu erfolgen. Lediglich MeFox zeigte ein zweites lokales Maximum, bevor es ebenfalls zu sinken begann. Damit ähnelte MeFox im Verlauf eher dem Polyglutamat 5-CH₃-H₄PteGlu₇, weshalb darauf im nachfolgenden Abschnitt ausführlicher eingegangen wird.

Diskussion des Gesamtfolatgehaltes im zeitlichen Verlauf der Hefekultivierung

Bereits Hjortmo et al. [2008a] hatten zeigen können, dass maximale Folatgehalte in kultivierten Hefen in Zusammenhang standen mit dem Übergang des Hefewachstums von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase. Verglichen mit den maximalen Gesamtfolatgehalten von Hjortmo et al. [2008a] von 12.500 µg/100 g lagen die Gesamtfolatgehalte der Kultivierung der Hefe TUM 68[®] im erwarteten Bereich. Allerdings konnten bei den Studien dieser Autoren höchste Folatgehalte nach zehn Stunden Kultivierung quantifiziert werden, während dies in der untersuchten Hefe TUM 68[®] erst nach 20 h Kultivierung der Fall war. Ob eine kürzere Kultivierungsdauer in noch höheren Folatgehalten resultiert hätte, konnte mangels ungenügender Mengen an Biomasse zu früheren Kultivierungszeitpunkten nicht untersucht werden.

In beiden Studien konnte mit einem Anteil von etwa 80 % das Vitamer 5-CH₃-H₄folat als das Hauptvitamer identifiziert werden. Wird die Entwicklung dieses Vitameres im Verlauf der Kultivierung von TUM 68[®] mit den Ergebnissen von Hjortmo et al. [2008a] verglichen, konnten in beiden Studien höchste Gehalte während der exponentiellen Wachstumsphase nachgewiesen werden. Mit Übergang in die stationäre Wachstumsphase begannen die Gehalte an 5-CH₃-H₄folat deutlich zu fallen. Verglichen mit der Studie von Hjortmo et al. [2008a] begann diese Abnahme bei der analysierten TUM 68[®] bereits während der exponentiellen Wachstumsphase, was durch die Verwendung verschiedener Hefestämme begründet werden

4. Kultivierungsexperimente zur quantitativen Analyse von Folatmetaboliten in Hefen

könnte. H₄folat dagegen zeigte in beiden Studien steigende Gehalte bis zum Ende der respiro-fermentativen Wachstumsphase. Ähnliche Beobachtungen konnten von Woortman et al. [2019] für die Kultivierung von Mikroalgen gemacht werden. Auch hier korrelierten die höchsten Folatgehalte mit dem exponentiellen Wachstum. Entsprechend konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass das Bedürfnis für die Bereitstellung von C₁-Einheiten – vor allem in Form des Methyl donors 5-CH₃-H₄folat – im Speziellen während dieser Wachstumsphase besonders hoch ist. Der Versatz des Vitameres H₄folat von etwa vier Stunden im Vergleich zu 5-CH₃-H₄folat könnte darauf hindeuten, dass hier der Bedarf an C₁-Einheiten in der Zelle extrem hoch ist. Durch schnelle Metabolisierung von 5-CH₃-H₄folat zu H₄folat kann dieser Bedarf gedeckt werden. Kann dieses wiederum nicht ausreichend schnell weitermetabolisiert werden, so findet eine Akkumulation von H₄folat statt.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Hjortmo et al. [2008a] mittels HPLC-Fluoreszenz Methode konnten mit der in der vorliegenden Studie verwendeten LC-MS/MS Methode neben 5-CH₃-H₄folat und H₄folat noch weitere Vitamere quantifiziert werden. So war des Weiteren eine Anreicherung des Vitameres 5-CHO-H₄folat zu beobachten. Dieses stellt die H₄folat nachfolgende Zwischenstufe im C₁-Metabolismus dar. Während die 5-CH₃-H₄folat-Gehalte in TUM 68[®] bereits während der respiro-fermentativen Wachstumsphase fielen, stiegen die Gehalte von 5-CHO-H₄folat im gesamten Kultivierungsverlauf kontinuierlich an. Von diesem Vitamer wird berichtet, dass es das einzig stabile, aber metabolisch inaktive Formylvitamer im Organismus ist. [Field et al. 2006] Demnach konnte vermutet werden, dass der Überschuss an Folatcoenzymen (vor allem von 5-CH₃-H₄folat) in Form dieses Formylvitameres im Hefeorganismus gespeichert wird. Durch MTHFS kann dieses leicht zum 5,10-CH⁺-H₄folat reaktiviert werden und so wieder dem C₁-Metabolismus zugeführt werden. Bemerkenswert war außerdem die Tatsache, dass während des gesamten Kultivierungszeitraumes die Summe aus 5-CH₃-H₄folat und 5-CHO-H₄folat konstant bei etwa 84 % des Gesamtfolatgehaltes verblieb. Dies bestärkte die These weiter, dass der Überschuss an 5-CH₃-H₄folat in Form von 5-CHO-H₄folat gespeichert wird.

4. Kultivierungsexperimente zur quantitativen Analyse von Folatmetaboliten in Hefen

4.2.2 Quantifizierung der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate als Funktion des zeitlichen Kultivierungsverlaufes

Die zeitliche Entwicklung der Polyglutamylierung während der Hefekultivierung wurde an Hand des Hauptvitameres 5-CH₃-H₄folat untersucht. Dazu wurden die Polyglutamate 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₇ mit der unter Kapitel 13.4 beschriebenen Methode quantifiziert. Die detaillierten quantitativen Ergebnisse finden sich in Anhang 14.

Die Summe der Polyglutamate 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₅ trug während des gesamten Kultivierungsverlaufes mit maximal 4 % nur geringfügig zu den hohen Gesamtgehalten an 5-CH₃-H₄folat in der untersuchten Hefe bei. Als Hauptvitamere konnten dagegen das Hexa- und Heptaglutamat identifiziert werden. Zudem wurde das Oktaglutamat detektiert. Mangels eines vorhandenen Standards sowie Informationen zur Response dieses Polyglutamates bei der Messung mittels LC-MS/MS konnten zu diesem Vitamer allerdings keine quantitativen Einschätzungen gemacht werden.

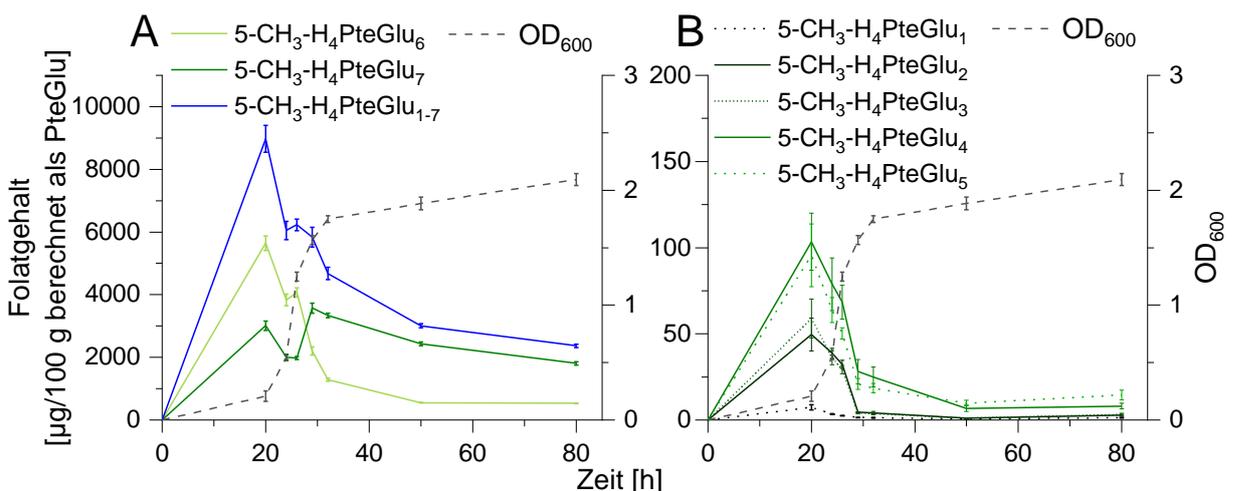


Abbildung 4.4 Gehalte der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate (1-7) in TUM 68® nach Kultivierung in Minimalmedium für 20 bis 80 h.

Wie Abbildung 4.4.A zu entnehmen ist, war ein Wechsel des Hauptpolyglutamates zwischen einer Kultivierungszeit von 26 und 29 h zu beobachten. Während bis zu 26 h Kultivierung das Hexaglutamat das Hauptpolyglutamat darstellte, war dies ab einer Kultivierung von 29 h das Heptaglutamat. Das Verhältnis dieser beiden Vitamere betrug bis zu einer Kultivierungszeit von 29 h etwa 2:1 zwischen dem mengenmäßig häufigsten und zweithäufigsten Polyglutamat. Ab einer Kultivierung von 32 h dagegen verschob sich dieses Verhältnis zu Gunsten des häufigsten Polyglutamates auf 3:1. Diese Beobachtung korrelierte mit der Abnahme des aufsummierten Gehaltes an 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₇ (Abbildung 4.4.A, blaue Kurve) sowie der Bestimmung des Gesamtgebietes an 5-CH₃-H₄folat (Abbildung 4.3.A, blaue Kurve) nach Durchlaufen des zweiten lokalen Maximums. Dieses lokale Maximum wiederum korrelierte mit einem Abflachen

4. Kultivierungsexperimente zur quantitativen Analyse von Folatmetaboliten in Hefen

der Wachstumskurve, gemessen an der optischen Dichte OD_{600} . Mit Verringerung des Folatbedarfes im Organismus steigerte dieser entsprechend die Polyglutamylierungsrate hin zu länger-kettigen Polyglutamaten. Die Folge wäre die beobachtete drastische Abnahme des Hexaglutamates und eine Zunahme des Heptaglutamatgehaltes. Dies spiegelte sich nicht nur im Verlauf der beiden quantitativen Kurven wider, sondern wurde auch durch die Tatsache untermauert, dass das Verhältnis zu Gunsten des Heptaglutamates verschoben wurde. Dieses wiederum zeigte identisches Verhalten wie das zuvor im Zuge der Gesamtfolatgehaltsbestimmung untersuchte MeFox. Wurde der Kurvenverlauf von MeFox (Abbildung 4.3.B, grüne Kurve) mit dem Verlauf von 5-CH₃-H₄PteGlu₇ (Abbildung 4.4.A, dunkelgrüne Kurve) verglichen, so stimmten deren Verläufe gut überein.

Diskussion der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamatgehalte als Funktion des zeitlichen Kultivierungsverlaufes

Im Verlauf der Kultivierung der TUM 68[®] hatte sich eine Verlängerung des Glutamatrestes des Hauptvitameres 5-CH₃-H₄folat gezeigt. Mit Übergang in die stationäre Wachstumsphase konnte ein Wechsel des Hauptpolyglutamates vom Hexa- zum Heptaglutamat beobachtet werden. Eine Verlängerung der Glutamatkette während des Wachstums- und Reifeprozesses wurde bislang lediglich in pflanzlichen Matrices untersucht. In Papaya konnte eine deutliche Zunahme des 5-CH₃-H₄folates mit 17 Glutamatresten während der Reifephase beobachtet werden. [Ramos-Parra et al. 2013a] In Goabohnen verlagerte sich die Verteilung der Polyglutamate ebenfalls zu Gunsten der länger-kettigen Polyglutamate im Verlauf des Wachstums. Während in frühen Wachstumsphasen noch > 90 % der 5-CH₃-H₄folate als Mono- und Diglutamat vorlagen, verschob sich der Anteil im fortgeschrittenen Wachstum zu etwa 70 % in Form des Pentaglutamates. [Luo et al. 2017] Auch Wawire et al. [2012] verzeichneten eine Verlängerung des Glutamatrestes während des pflanzlichen Wachstums in den von ihnen untersuchten Blättern der Augenbohne.

Von der aus Schweineleber extrahierten FPGS ist bekannt, dass diese erhöhte Substratspezifität für länger-kettige Polyglutamate zeigt. Gleichzeitig aber verringerte sich die Umsatzrate mit Verlängerung der Polyglutamatkette, was allerdings lediglich bis zu einem Polyglutamylierungsgrad von sechs Glutaminsäureeinheiten analysiert wurde. [Matthews et al. 1987] Die Untersuchungen an der TUM 68[®] zeigten, dass bis Ende der exponentiellen Wachstumsphase das Hexaglutamat die Hauptpolyglutamatform darstellte, was mit Übergang in die stationäre Wachstumsphase zu Gunsten des Heptaglutamates verschoben wurde. Folglich ist anzunehmen, dass es sich bei dem Hexaglutamat um die Polyglutamatform mit einer relativ hohen Bindungskapazität gegenüber der FPGS handelt, welche aber die Enzymaktivität dras-

4. Kultivierungsexperimente zur quantitativen Analyse von Folatmetaboliten in Hefen

tisch reduziert. Die Weitermetabolisierung zum Heptaglutamat dagegen kann erst dann erfolgen, wenn der C₁-Metabolismus auf Grund sinkender Folatgehalte reduziert wird. Damit stehen weniger kürzerkettige Folatvitamere in Konkurrenz zur Polyglutamylierung der längerketigen Folate, wodurch letztere bevorzugt verlängert werden, wie dies bereits in Tierexperimenten gezeigt werden konnte. [Shane 2001] Dies würde den Wechsel des Hauptpolyglutamates gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase und die relative Zunahme des Heptaglutamates am Gesamtfolatanteil erklären. Die Enzymaktivität der FPGS nach Binden der Heptaglutamatform scheint vergleichsweise gering zu sein, sodass nur geringe Mengen des Oktaglutamates gebildet werden. Allerdings scheint die Heptaglutamatform auch diejenige Polyglutamatform zu sein, welche am anfälligsten für Oxidationsreaktionen ist. Dies würde erklären, weshalb die Oxidation von 5-CH₃-H₄folat zu MeFox hauptsächlich von der Oxidation des Heptaglutamates bestimmt zu sein schien.

Der Polyglutamatgehalt in Hefen wurde bislang kaum untersucht. Ndaw et al. [2001] quantifizierten den Polyglutamatgehalt mittels HPLC-Fluoreszenz nach Interkonversion aller Polyglutamatvitamere zum entsprechenden 5-CH₃-H₄PteGlu_n. Die Quantifizierung erfolgte an Hand externer Kalibration. Dazu wurden die entsprechenden PteGlu_n Standards ebenfalls in die 5-CH₃-H₄PteGlu_n-Form überführt. Ihren Ergebnissen zu Folge konnten das Hexa-, Hepta- und Oktaglutamat als die Hauptvitamere identifiziert werden mit Gehalten von 610 µg/100 g, 3.900 µg/100 g sowie 1.750 µg/100 g. Eine Untergliederung in die einzelnen Vitamere war mit der dazu verwendeten Methodik allerdings nicht möglich. Ein Vergleich der Ergebnisse mit der in dieser Arbeit durchgeführten Hefekultivierung gestaltet sich aus mehreren Gründen schwierig. Im Allgemeinen vermag es der von Ndaw et al. [2001] verwendeten Methodik an Sensitivität fehlen. So konnte in deren Untersuchungen zwar das Hexa-, Hepta- und Oktaglutamat quantifiziert werden, andere Polyglutamate konnten allerdings nicht identifiziert werden. Mit der in dieser Arbeit angewendeten LC-MS/MS-Methode allerdings waren die Polyglutamate 5-CH₃-H₄-PteGlu₁₋₇ quantifizierbar. Mangels eines verfügbaren Standards aber konnte das Oktaglutamat zwar identifiziert, nicht aber quantifiziert werden. Die Aufarbeitung zur Messung mittels LC-MS/MS bietet im Gegensatz zur Methodik von Ndaw et al. [2001] jedoch die Möglichkeit, alle weiteren Polyglutamatvitamere zu untersuchen, welche im nachfolgenden Kapitel 4.2.3 semi-quantitativ diskutiert werden.

4. Kultivierungsexperimente zur quantitativen Analyse von Folatmetaboliten in Hefen

4.2.3 Semi-Quantifizierung verschiedener Polyglutamate als Funktion des zeitlichen Kultivierungsverlaufes

Die Polyglutamate der Folatvitamere sind außer der PteGlu_n nicht käuflich erwerblich und müssten zunächst aus den entsprechenden PteGlu_n Standards synthetisiert werden, wie dies für die 5-CH₃-H₄folate vorgenommen wurde. [Schaller et al. 2018] Dies wäre aber mit einem hohen materiellen und finanziellen Aufwand verbunden. Die Tatsache, dass alle weiteren Vitamere in wesentlich geringeren Mengen als das Hauptvitamer 5-CH₃-H₄folat nachzuweisen waren, rechtfertigte deren Synthese allerdings nicht. Um dennoch Informationen über die Verteilung der übrigen Polyglutamatvitamere im Hefeorganismus zu generieren, wurde das relative Verhältnis der Analytflächen zum vor der Messung zugesetzten internen Standard (ISTD) [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat berechnet. Somit war eine Normierung auf diesen ISTD und ein Ausgleich von Intensitätsschwankungen während der massenspektrometrischen Messung möglich.

Bei allen detektierbaren Polyglutamatvitameren waren – analog zu den 5-CH₃-H₄folaten – das Hexa- und Heptaglutamat die mengenmäßig häufigsten Polyglutamate. Für 5-CHO-H₄PteGlu_n sowie 5,10-CH⁺-H₄PteGlu_n konnten Polyglutamate von n = 2 bis n = 8 detektiert werden. H₄PteGlu_n wurde dagegen nur mit einer Kettenlänge von n = 6 bis n = 8 gefunden. Die oxidativen Abbauprodukte wurden mit einer Polyglutamatrestlänge von n = 4 bis n = 7 (MeFox-Glu_n) respektive n = 6 und n = 7 (10-CHO-PteGlu_n) sowie n = 5 bis n = 7 (PteGlu_n) qualitativ erfasst. Innerhalb jeder Vitamerengruppe wurde der prozentuale Anteil an der Summe der semi-quantitativen Anteile aus A(A)/A(ISTD) berechnet (vgl. Anhang 14). Das semi-quantitative Flächenverhältnis zum ISTD belief sich für alle weiteren Polyglutamatvitamere außer dem Hexa- und Heptaglutamat auf < 5 % und hatte damit keinen größeren Einfluss auf die Polyglutamatverteilung. Wurden die prozentualen Anteile innerhalb der Vitamerengruppe der Hexa- und Heptaglutamatvitamere betrachtet, so zeigten alle Vitamerformen ähnliche Verhältnisse zwischen den beiden Polyglutamatformen im Verlauf des exponentiellen Wachstums.

Abbildung 4.5 zeigt, dass dieser Anteil zunächst deutlich auf Seiten des Hexaglutamates lag. Mit Eintritt in die stationäre Wachstumsphase (gemessen an OD₆₀₀) allerdings konnte für alle Polyglutamatvitamere eine Verlagerung des Verhältnisses zu Gunsten des Heptaglutamates beobachtet werden. Dies entspricht der zuvor aufgestellten These (vgl. Kapitel 4.2.2), dass mit sinkenden C₁-Metabolismus bevorzugt längererkettige Polyglutamate gebildet werden.

4. Kultivierungsexperimente zur quantitativen Analyse von Folatmetaboliten in Hefen

Diskussion der Semi-Quantifizierung verschiedener Polyglutamate

Auch für alle weiteren, untersuchten Folatvitamere wurden die Hexa- und Heptaglutamatform als die Hauptpolyglutamate identifiziert. Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen des Wechsels des Hauptpolyglutamates vom Hexa- zum Heptaglutamat und des Überganges des Hefewachstums in die stationäre Wachstumsphase festgestellt werden. Demnach konnte gezeigt werden, dass bei sinkender Aktivität des Folatmetabolismus bevorzugt Polyglutamylierung zu längererkettigen Polyglutamaten stattfindet. Denkbar wäre eine Polyglutamylierung des H₄folates, welches anschließend in die verschiedenen Vitamerformen überführt wird, was den bisherigen Annahmen des Folatmetabolismus entspricht. [Iwai et al. 1977] Dies würde auch erklären, weshalb die verschiedenen, metabolisch aktiven Vitamere gleichermaßen von dem Wechsel des Hauptpolyglutamates betroffen waren. Auffallend aber war die Tatsache, dass die Verlagerung des Verhältnisses vom Hexa- zum Heptaglutamat bei den oxidativen Abbauprodukten (Abbildung 4.5.B) deutlich geringer ausfiel als bei den metabolisch aktiven Vitameren (Abbildung 4.5.A).

Zwei Thesen sind als mögliche Erklärung hierfür denkbar. Zum einen könnten die längererkettigen unter den metabolisch aktiven Polyglutamaten stabiler sein als die kürzererkettigen Polyglutamate und folglich weniger von Oxidationsreaktionen betroffen sein. Zum anderen könnten die längererkettigen Polyglutamate nach Oxidation zu den entsprechenden Abbauprodukten PteGlu_n, MeFox-Glu_n sowie 10-CHO-PteGlu_n anfälliger für weitere Abbaureaktionen sein.

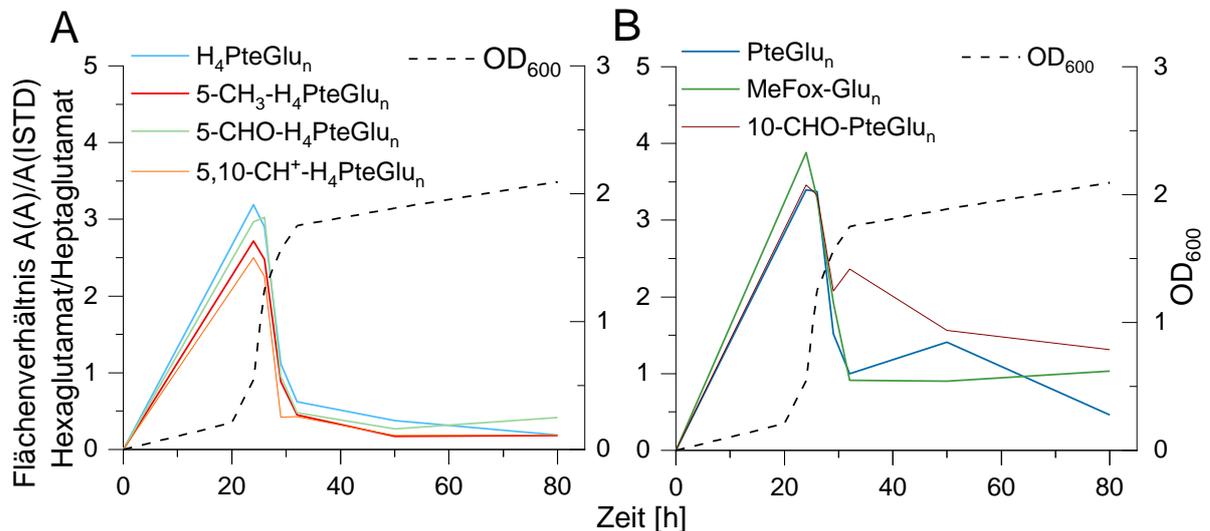


Abbildung 4.5 Verhältnis der Hexa- und Heptaglutamatformen der Polyglutamate in kultivierter TUM 68[®] gemessen am relativen Flächenverhältnis der Analyten zum internen Standard (ISTD) [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat nach Messung mittels LC-MS/MS.

Beide Theorien hätten zur Folge, dass vermehrt Hexaglutamate in oxidierter Form auftreten. Theorie 1 allerdings ist im Widerspruch zu der in den vorangehenden Kapiteln 4.2.1 sowie 4.2.2 aufgestellten These, dass zumindest 5-CH₃-H₄PteGlu₇ anfälliger war für Oxidationsreaktionen als das entsprechende Hexaglutamat. Dies wurde vermutet, da der

4. Kultivierungsexperimente zur quantitativen Analyse von Folatmetaboliten in Hefen

Verlauf des Gesamt MeFox-Gehaltes dem Verlauf des 5-CH₃-H₄PteGlu₇ Vitameres entsprach statt dem des mengenmäßig häufigeren 5-CH₃-H₄PteGlu₆. Demnach scheint Theorie 2 und somit eine bevorzugte Weiteroxidation beziehungsweise ein Abbau von bereits oxidierten längerkettigen Polyglutamaten plausibler. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die oxidierten Polyglutamate in deutlich geringeren Anteilen in den Hefeproben detektiert wurden als ihre entsprechenden metabolisch aktiven Vorläufer. Messschwankungen könnten demnach einen erhöhten Einfluss auf die Ergebnisse haben. Zudem ist von einer abnehmenden Response während der massenspektrometrischen Messung mit Verlängerung des Polyglutamatrestes und damit einhergehend einer zunehmenden molekularen Masse der Moleküle auszugehen. Dies jedoch müsste die metabolisch aktiven sowie die inaktiven Vitamere in einem vergleichbaren Ausmaß betreffen. Zudem war die relative Verteilung aller 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate an Hand der semi-quantitativen Ergebnisse bestimmt in guter Übereinstimmung mit den quantitativen Werten der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate. Demnach konnte von recht validen Ergebnissen an Hand der semi-quantitativen Abschätzung ausgegangen werden. Abschließend konnte also nicht eindeutig eruiert werden, weshalb verhältnismäßig mehr kürzerkettige Polyglutamate in oxidiert Form vorlagen als dies bei den metabolisch aktiven, reduzierten Polyglutamatvitameren der Fall war.

4.2.4 Fazit und Diskussion der Kultivierungsstudien

Die Optimierungen des für die Hefekultivierung verwendeten Minimalmediums zeigten, dass sowohl die Erhöhung der Kohlenstoff- als auch der Stickstoffquelle keine Erhöhung des Folatgehaltes zur Folge hatten. Zudem konnte die Folatproduktion durch die Verwendung von Aktivatoren wie Ölsäure und Ergosterin nicht gesteigert werden. Wesentlich höheren Einfluss auf den Folatgehalt aber hatte die Dauer der Kultivierungszeit. Daher wurden detailliertere Studien zur Entwicklung des Folatgehaltes im zeitlichen Verlauf der Kultivierung angestellt.

Die Analyse des Gesamtfolatgehaltes ergab die höchsten Gesamtfolatgehalte von 13.200 µg/100 g berechnet als PteGlu nach 20 h Kultivierung, welcher im Verlauf der Kultivierung auf 6.000 µg/100 g nach 80 h Kultivierung sank. Die Entwicklung der einzelnen Vitamere nach enzymatischer Dekonjugation war generell in guter Übereinstimmung mit den Wachstumsphasen der Hefe gemessen an der Entwicklung der optischen Dichte (OD₆₀₀). So konnten im Verlauf der exponentiellen Wachstumsphase sehr hohe Folatgehalte für die metabolisch aktiven Vitamere 5-CH₃-H₄folat, 5-CHO-H₄folat sowie H₄folat detektiert werden. Als Hauptvitamere mit durchgehend 84 % Anteil konnten 5-CH₃-H₄folat und 5-CHO-H₄folat identifiziert werden. Während der Gehalt von 5-CH₃-H₄folat im zeitlichen Verlauf stetig abnahm, war eine Zunahme des 5-CHO-H₄folat-Anteiles zu verzeichnen. Dies könnte auf eine mögliche Art der

4. Kultivierungsexperimente zur quantitativen Analyse von Folatmetaboliten in Hefen

Folatspeicherung im Hefeorganismus deuten. Die oxidativen Abbauprodukte PteGlu und 10-CHO-PteGlu zeigten analoge Verläufe im Vergleich zu deren metabolisch aktiver Form H₄folat und 5-CHO-H₄folat. Lediglich die MeFox-Gehalte schienen eher der Entwicklung des 5-CH₃-H₄PteGlu₇ zu folgen als dem Gesamtfolatgehalt von 5-CH₃-H₄folat, was einer höheren Anfälligkeit für Oxidationsreaktionen dieses Vitameres zugeschrieben werden könnte.

Die Analyse der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate (1-7) zeigte eine übereinstimmende Verlagerung des Hauptvitameres vom Hexaglutamat zum Heptaglutamat mit Übergang der exponentiellen Wachstumsphase in die stationäre Wachstumsphase. Analoge Ergebnisse konnten erzielt werden für die übrigen Polyglutamatvitamere. Anders als bei den 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₇ Vitameren konnte hier nur eine semi-quantitative Abschätzung des Peakflächenverhältnisses im Vergleich zum zugesetzten ISTD durchgeführt werden. Generell konnte eine gute Übereinstimmung der prozentualen Ergebnisse zwischen der Quantifizierung der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate sowie der semi-quantitativen Abschätzung aller weiteren Polyglutamate festgestellt werden. Eine unterschiedliche Response der Polyglutamate während der Messung mittels LC-MS/MS schienen demnach keine signifikanten Auswirkungen auf die Ergebnisse zu haben. Die Korrelation des Wechsels des Hauptpolyglutamates mit einem Wechsel der Wachstumsphasen sowie gleichzeitig sinkenden Gesamtfolatgehalten deutete auf eine Form der Regulation des Folatmetabolismus hin. Folglich muss das Hexaglutamat eine extrem hohe Bindungskapazität zur FPGS aufweisen, deren Aktivität allerdings drastisch reduzieren. Erst mit Abnahme des C₁-Metabolismus kann eine Weitermetabolisierung zu länger-kettigen Polyglutamaten erfolgen, was den Folatmetabolismus nochmals zu drosseln scheint. Nachdem alle metabolisch aktiven Vitamere gleichermaßen von dem Wechsel des Hauptpolyglutamates betroffen waren, kann vermutet werden, dass dieser lediglich bei der gemeinsamen Vorstufe H₄folat stattfindet. Dieses wiederum würde dann metabolisiert werden in alle weiteren Vitamerformen. Weshalb der Wechsel des Hauptpolyglutamates für die oxidativen Abbauprodukte MeFox-Glu_n, 10-CHO-PteGlu_n sowie PteGlu_n weniger ausgeprägt stattfand, konnte nicht abschließend geklärt werden. Denkbar wäre unter anderem eine vermehrte Weiteroxidation der länger-kettigen Polyglutamate, welche mit der verwendeten Methode mittels LC-MS/MS allerdings nicht überprüft werden konnte. Des Weiteren verbleibt zu klären, weshalb Organismen mit zunehmendem Wachstum eine weitere Polyglutamylierung der Folatvitamere vornehmen.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

5 Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

Untargeted Metabolomics mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie (UHR-MS) sind ein vielversprechendes Anwendungsfeld, um neue Erkenntnisse von Stoffwechselwegen zu erlangen. Folate sind hinsichtlich ihres Metabolismus – vor allem hinsichtlich ihrer Polyglutamate – bislang wenig erforscht. Daher wurden im Zuge dieser Arbeit Methoden entwickelt, um Folatmetabolite mittels UHR-MS näher zu charakterisieren. Zum einen wurden Methoden für die Messung mittels FT-ICR-MS und zum anderen für die Messung mittels Q-ToF-MS entwickelt.

5.1 Untersuchungen mittels FT-ICR-MS

Fourier-Transformation Ionenzyklotronresonanz Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) ermöglicht massenspektrometrische Messungen mit höchster Auflösung von $R > 1.500.000$ sowie höchster Massengenauigkeit von 0,1 – 1,0 ppm. [Gross 2013] Daher wurden Methoden zur Analyse der Folate mittels FT-ICR-MS entwickelt und auf die Untersuchung von käuflicher Bäckerhefe sowie kultivierter Brauhefe angewendet. Ein weiterer Vorteil dieser Methodik besteht darin, dass die Proben ohne vorherige Auftrennung mittels Direktinjektion in die Ionisierungsquelle injiziert werden. Somit kann die ursprüngliche Zusammensetzung der Probe ohne Beeinflussung durch vorgeschaltete chromatographische Auftrennung bestmöglich untersucht werden.

5.1.1 Methodenentwicklung

Zu Beginn der Untersuchungen musste eine geeignete Methode für die Analyse der Folate mittels FT-ICR-MS gefunden werden. Dazu wurden schrittweise die Messparameter an Hand der Messung von Standardlösungen optimiert. Repräsentativ für Monoglutamate wurde das Vitamin 5-CH₃-H₄folat gewählt, während stellvertretend für Polyglutamate PteGlu₄ verwendet wurde. Optimierungen wurden jeweils gemessen an der absoluten Peakintensität des Molekülmassenpeaks.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

5.1.1.1 Auswahl des Ionisierungsmodus

Zunächst wurden beide Ionisierungsmodi auf deren Eignung getestet. Da die *targeted* Messungen mittels LC-MS/MS für gewöhnlich in ESI positiv Ionisierung durchgeführt werden, war von einer erhöhten Sensitivität im positiven Modus auszugehen.

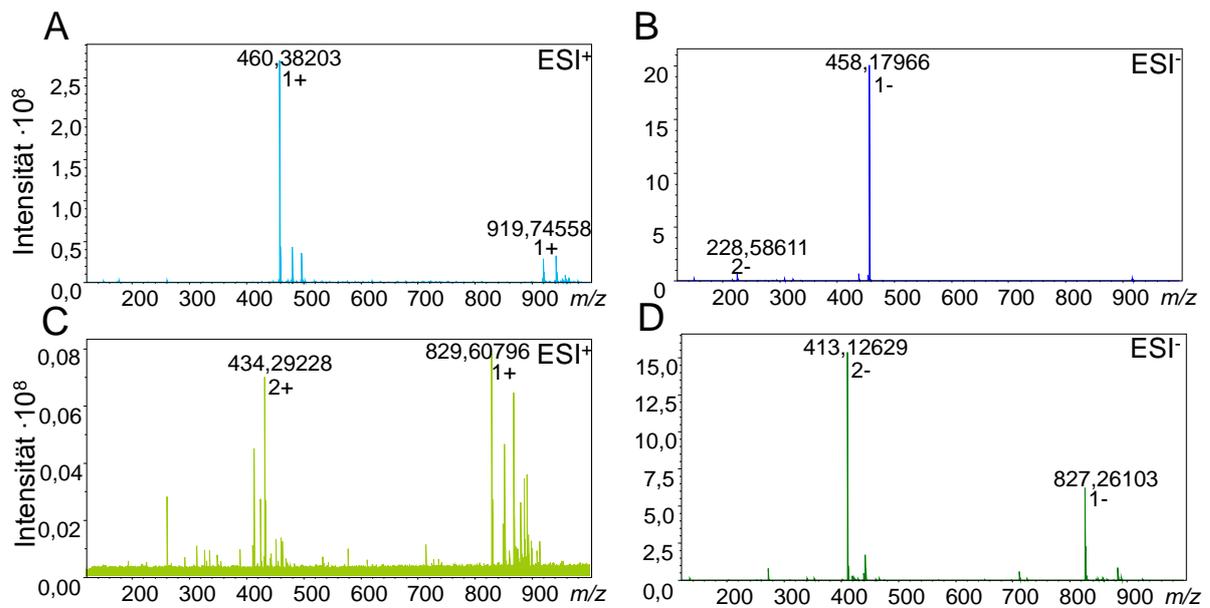


Abbildung 5.1 Intensitätsvergleich ausgewählter Folatstandards ($c = 1 \mu\text{g/mL}$) in ESI⁺ sowie ESI⁻ gemessen mittels FT-ICR-MS.

- (A) 5-CH₃-H₄folat gemessen in ESI⁺.
- (B) 5-CH₃-H₄folat gemessen in ESI⁻.
- (C) PteGlu₄ gemessen in ESI⁺.
- (D) PteGlu₄ gemessen in ESI⁻.

Diskussion der Wahl des Ionisierungsmodus

Wie Abbildung 5.1 zu entnehmen ist, konnten entgegen der Vermutung im positiven Modus zehnfach geringere Intensitäten detektiert werden verglichen mit dem negativen Modus. Dies war sowohl für das gemessene 5-CH₃-H₄folat (Abbildung 5.1.A und Abbildung 5.1.B) sowie das PteGlu₄ (Abbildung 5.1.C und Abbildung 5.1.D) der Fall. Zudem war an Hand des PteGlu₄ ersichtlich, dass mit zunehmender Molekülmasse vermehrt der zweifach geladene Molekülionenpeak an Intensität zunahm. Bei diesem belief sich der Unterschied zwischen positiver und negativer Ionisierung sogar auf Faktor 40. Demnach wurden alle weiteren Optimierungen im negativen Modus weiterverfolgt.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

5.1.1.2 Optimierung der Messmethode

Die softwaregestützten Skripte zur Auswertung der mittels FT-ICR-MS generierten Daten basieren ausschließlich auf einfach geladenen Spezies. So gestaltet sich beispielsweise eine Netzwerkanalyse unter Berücksichtigung von Biotransformationen von mehrfach geladenen Spezies äußerst schwierig. Zudem wird die Komplexität der Auswertung um eine Dimension erweitert, da für jedes instrumentell ermittelte Masse-zu-Ladungs-Verhältnis folglich nicht nur verschiedenste molekulare Zusammensetzungen, sondern auch verschiedene Ladungszustände berücksichtigt werden müssten. Somit wären deutlich mehr Auswertedurchgänge nötig, um jeden Ladungszustand abzudecken, wodurch sich das Auftreten möglicher Fehlerquellen drastisch erhöhen würde. Demnach wurde an Hand der PteGlu₄ versucht, die Ionisierung der einfach geladenen Spezies durch Anpassen der Messmethode zu steigern. Schrittweise wurden die Parameter RF Amplitude sowie ToF Zeit erhöht, um einen vermehrten Transport höhermolekularer Ionen in die ICR-Zelle zu ermöglichen. Die optimierten Parameter sind Tabelle 11.19 zu entnehmen.

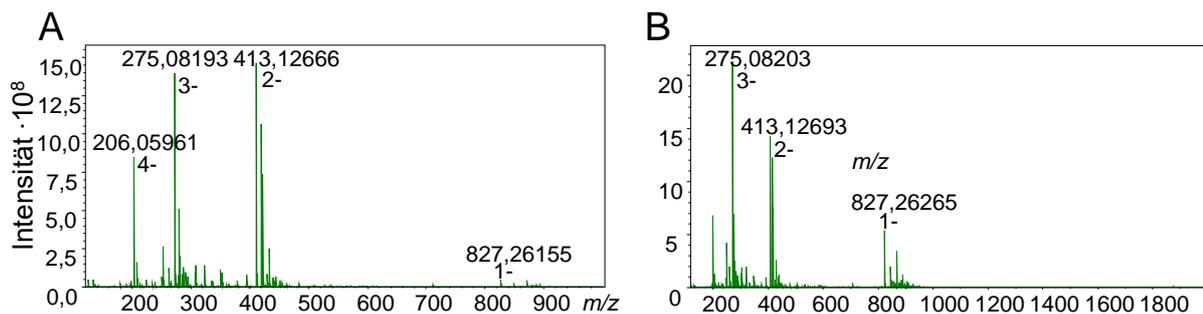


Abbildung 5.2 Intensitätsvergleich der PteGlu₄ ($c = 1 \mu\text{g/mL}$) am FT-ICR-MS in ESI-Modus.
(A) Vor Optimierung der Messparameter.
(B) Nach Optimierung der Messparameter.

Diskussion der Optimierung der Messmethode

Abbildung 5.2 verdeutlicht, dass für die zweifach geladene Spezies ($m/z = 413,126$) keine Veränderung erzielt werden konnte und die dreifach geladene Spezies ($m/z = 275,082$) sogar mit leicht verschlechterten Intensitäten detektiert wurde. Die einfach geladenen Spezies ($m/z = 827,262$) dagegen wies zehnfach höhere Intensitäten auf. Für alle weiteren Optimierungen wurde demnach die optimierte Methode verwendet.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

5.1.1.3 Verbesserung der Ionisierung durch Zugabe von Ionisierungsverstärkern

Um die Ionisierung höhermolekularer Analyten zusätzlich zu begünstigen, wurden verschiedenen Ionisierungsverstärker auf deren Anwendbarkeit getestet. Da durch die externe Zugabe von ionisierungsverstärkenden Zusätzen die ursprüngliche Probenzusammensetzung beeinflusst wurde, musste die Probe hinsichtlich möglicher Clusterbildung und Suppressionseffekten untersucht werden.

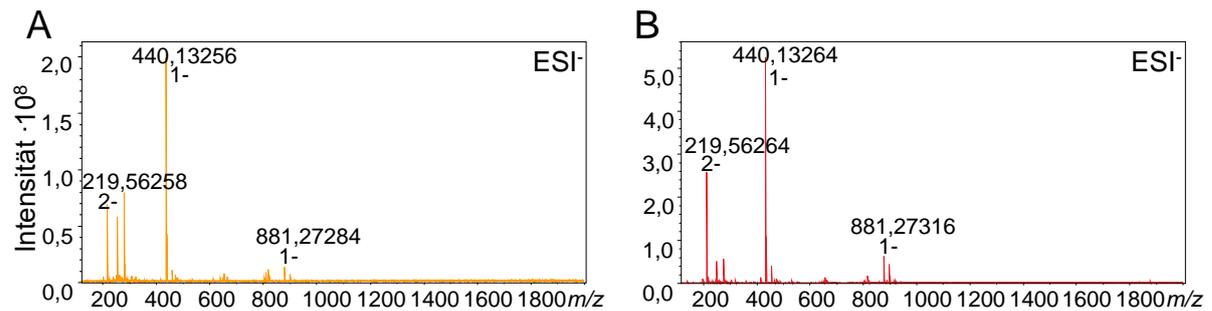


Abbildung 5.3 Ionisierungsvergleich der PteGlu ($c = 1 \mu\text{g/mL}$) am FT-ICR-MS gemessen in ESI⁻-Modus.
(A) Ohne Zugabe eines Ionisierungsverstärkers.
(B) Nach Zugabe von NH_3 als Ionisierungsverstärker.

Diskussion der Verbesserung der Ionisierung durch Zugabe von Ionisierungsverstärkern

An Hand des PteGlu-Standards (vgl. Abbildung 5.3) konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von NH_3 die Peakintensitäten nochmals verdreifachte (Abbildung 5.3.B). Eine NH_3 -Clusterbildung sowie Suppressionseffekte konnten bis zu einem Anteil in der gemessenen Probe von 0,025 % NH_3 nicht festgestellt werden. Dieser Anteil schien folglich zum einen ausreichend zu sein für eine Erhöhung des pH-Wertes der Probe und somit eine Begünstigung der Ionisierung. Zum anderen war die Konzentration offensichtlich gering genug, um eine Ammonium-Clusterbildung und Suppressionseffekte zu unterbinden. Die geringfügige Bildung von Folatclustern (m/z 881,27) war im Vergleich zur deutlich verbesserten Ionisierung der Folatanalyten vernachlässigbar. Die Zugabe von 0,025 % NH_3 wurde für alle weiteren Messungen übernommen.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

5.1.1.4 Diskussion der Methodenentwicklung zur Analyse von Folatmetaboliten mittels FT-ICR-MS

Untersuchungen an Folatstandards hatten die ESI negativ Ionisierung als die deutlich überlegene Ionisierung zur Analyse von Folatvitameren mittels FT-ICR-MS herausgearbeitet. Die gemessenen Monoglutamatstandards konnten mit einer zehnfach höheren Intensität im negativen Modus detektiert werden. Der analysierte Polyglutamatstandard zeichnete sich sogar um Faktor 40 höhere Intensitäten im negativen Modus im Vergleich zum positiven Ionisierungsmodus aus.

Mit zunehmender Molekularmasse der Folatvitamere konnten vermehrt zweifach und dreifach geladenen Spezies identifiziert werden. Da diese die Datenauswertung erheblich erschweren, wurde die Messmethode optimiert, um eine Ionisierung von einfach geladenen Spezies zu begünstigen. Durch Erhöhung von RF Amplitude sowie ToF Zeit (Details s. Kapitel 11.2.6) konnte eine Intensitätserhöhung der einfach geladenen Spezies um den Faktor 10 erreicht werden. Mehrfach geladenen Spezies dagegen waren von dieser Optimierung der Messmethode kaum betroffen.

Mit Hilfe des Zusatzes von 0,025 % NH₃ zu den zu vermessenden Proben konnte nochmals eine Intensitätssteigerung um Faktor 3 erzielt werden.

Insgesamt konnte mit einigen Anpassungen eine Methode entwickelt werden, mit welcher Folatstandards in guten Intensitäten im ESI negativ Modus detektiert werden konnten. Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der entwickelten Methode wurden nachfolgend Hefeproben verschiedenen Extraktionsmethoden unterzogen und mittels FT-ICR-MS vermessen.

5.1.2 Optimierung der Folatdetektion in Hefen mittels FT-ICR-MS

Die unter Kapitel 5.1.1 entwickelte Messmethode am FT-ICR-MS wurde zur Messung von Realproben herangezogen. Dazu wurde käuflich erwerbliche Bäckerhefe als Modellorganismus verwendet und an Hand dessen die Probenvorbereitung optimiert.

5.1.2.1 Durchführung verschiedener *dilute and shoot* Methoden

Zu Beginn wurden Extraktionen in verschiedenen Lösungsmittelgemischen nach Kapitel 14.1 versucht und verschiedene Extraktionstemperaturen (0 °C, 20 °C sowie 80 °C) getestet.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

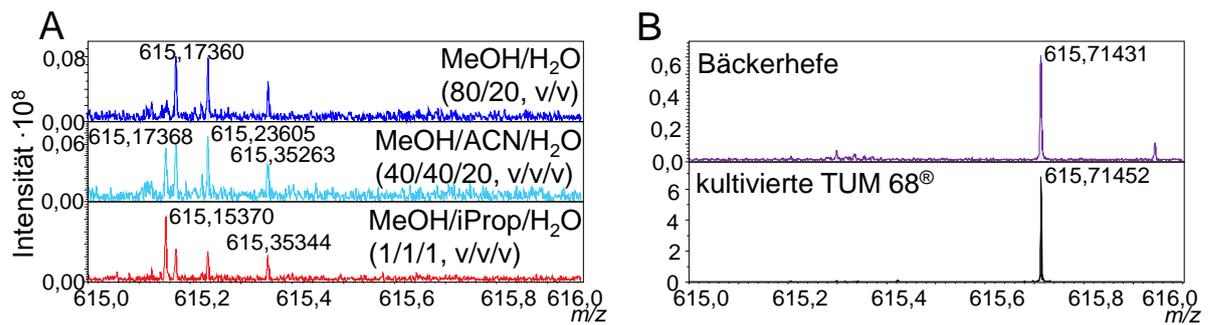


Abbildung 5.4 FT-ICR-MS Spektren aufgearbeiteter Hefeprouben im Massenbereich von m/z 615 – 616.
(A) Vergleich verschiedener Shotgun Methoden ohne SPE-Aufreinigung
(B) Vergleich von Bäckerhefe sowie kultivierter TUM 68® nach Aufreinigung mittels SPE.

Diskussion der Durchführung verschiedener *dilute and shot* Methoden

Abbildung 5.4.A zeigt exemplarisch den Massenbereich zwischen m/z 615 und m/z 616. Das mit Hilfe der quantitativen Methoden (vgl. Kapitel 4.2.2) ermittelte Hauptvitamer der Hefe 5-CH₃-H₄PteGlu₇ mit m/z 615,71382 sollte erwartungsgemäß innerhalb dieses Bereiches auftreten. Wie Abbildung 5.4.A zu entnehmen ist, konnten keine Peaks identifiziert werden, welche auf die Anwesenheit dieses Hauptvitameres in den untersuchten Hefeprouben schließen ließ. Weder die Verwendung verschiedener Lösungsmittelgemische (Lösungsmittelgemisch 1 – 4, vgl. Kapitel 14.1) noch die Extraktion bei verschiedenen Temperaturen oder die zusätzliche Anwendung eines Extraktionsschrittes mittels Zellaufschluss hatten eine Detektion von Folaten im FT-ICR-MS Spektrum zur Folge. In den Probenextrakten ergaben sich letztlich Folatgehalte im μM Bereich. Demnach war davon auszugehen, dass die Probenextrakte zu gering konzentriert waren für eine erfolgreiche Detektion der Folate. Matrixeffekte schienen die Sensitivität der verschiedenen Lösungsmittelextrakte zusätzlich zu reduzieren. Auch eine Verdünnung der Extrakte zur Reduktion dieser Matrixeffekte brachte keine Verbesserung bezüglich der Folatdetektion.

5.1.2.2 Durchführung einer folatspezifischen Extraktion und Aufreinigung

In einem zweiten Ansatz wurde die Folatextraktion durch Erhitzen in Pufferlösungen sowie eine Aufreinigung mittels SPE gewählt, um Matrixeffekte zu reduzieren und gleichzeitig eine Aufkonzentration der Probenextrakte zu erreichen. Von den entwickelten alternativen Aufreinigungsmethoden (vgl. Kapitel 3.3.1) versprach lediglich die HLB-Aufreinigung ausreichende Kompatibilität für die FT-ICR-MS Messung im negativen Ionisierungsmodus. Alle weiteren Eluate beinhalteten Ameisensäurezusätze. Die Erhöhung des pH-Wertes für die Messung mittels FT-ICR-MS hatte sich aber zuvor als notwendig herausgestellt (vgl. hierzu 5.1.1). In einem Modellansatz wurde daher zunächst die Menge an Ammoniak ermittelt, welche notwendig

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

wäre, um den pH-Wert in den alternativen SPE-Eluaten auf einen Wert von $\text{pH} > 9$ zu bringen. Der dafür benötigte Anteil an Ammoniak allerdings war zu groß, als dass die Eluate am FT-ICR-MS noch messbar gewesen wären. Daher wurde von der Messung dieser alternativen Eluate abgesehen und lediglich die Aufreinigung mittels HLB-Kartuschen gewählt. Die Entwicklung einer alternativen Folatextraktion mittels des Siedens in gepufferter Ethanollösung (vgl. Kapitel 3.2) hatte sich als nicht zielführend erwiesen, weswegen nachfolgend die klassische Folatextraktion in Kombination mit HLB-Festphasenaufreinigung gewählt wurde.

Diskussion der Durchführung der folatspezifischen Extraktion und Aufreinigung

Abbildung 5.4.B zeigt denselben Ausschnitt des FT-ICR-MS-Spektrum zwischen m/z 615 und m/z 616 für die mittels HLB-Kartuschen aufgearbeitete Bäckerhefe sowie die kultivierte TUM 68®. Im Gegensatz zu der Extraktion mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen waren hier allerdings deutliche Signale mit dem erwarteten Masse-zu-Ladungsverhältnis des $5\text{-CH}_3\text{-H}_4\text{PteGlu}_7$ von m/z 615,71382 identifizierbar. Die Massenungenauigkeit beider detektierbarer Signale betrug $< 1,2$ ppm in Bezug auf die erwartete theoretische Masse. Demnach konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem detektierbaren Signal um das entsprechende Folat handeln muss.

5.1.2.3 Diskussion der Optimierung der Folatdetektion mittels FT-ICR-MS

Für eine zufriedenstellende Folatdetektion mittels FT-ICR-MS hatte sich im Verlauf der Untersuchungen lediglich eine zusätzliche Aufreinigung sowie Aufkonzentration mittels Festphasenextraktion als zielführend herausgestellt. Die Anwendung von einfachen *dilute and shoot* Methoden dagegen resultierte in Probenextrakten mit zu geringen Folatkonzentrationen einerseits und zu hohen Matrixeffekten andererseits. Castrillo et al. [2003] hatten gezeigt, dass die Konzentrationen von Analyten, welche üblicherweise von untargeted Ansätzen erfasst werden, sich im mM Bereich befinden. Nach Probenaufarbeitung mittels *dilute and shoot* Methode allerdings befand sich dieser für die Folatextrakte aber nur im μM Bereich. Wird die theoretische Folatkonzentration in den Lösungsmittelextrakten der *dilute and shoot* Aufarbeitung mit denen der SPE-Eluate verglichen, so waren letztere lediglich um Faktor 2 höher konzentriert. Die Konzentration lag weiterhin im Bereich zwischen $1 - 10 \mu\text{M}$. Demnach konnten zwei Schlussfolgerungen gezogen werden. Zum einen konnte gezeigt werden, dass durch entsprechende Probenaufarbeitung eine Detektion von Analyten im μM Bereich durchaus auch mit Profiling-Studien möglich ist. Zum anderen wurde deutlich, dass andere Ursachen als eine mangelnde

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

Analytkonzentration eine Folatdetektion nach Extraktion mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen nicht möglich machten. Es war davon auszugehen, dass die nicht vorhandene Folatdetektion einer unzureichenden Extraktionskraft der Lösungsmittelgemische sowie zu hohen Matrixeffekten zuzuschreiben war. Für gewöhnlich werden für die Folatextraktion Puffergemische wie Phosphatpuffer oder MES-Puffer verwendet, da diese die Löslichkeit der Folate erhöhen. [Quinlivan et al. 2006; Saini et al. 2016b] Die reine Extraktion in Lösungsmittelgemischen mit einem maximalen Wasseranteil von 50 % war demnach vermutlich unzureichend für eine zufriedenstellende Extraktion der wasserlöslichen Vitamere. Auf Grund fehlender Aufreinigung der Extrakte musste zudem davon ausgegangen werden, dass Matrixeffekte eine nicht zu vernachlässigende Rolle spielten.

5.1.3 Folatdetektion in Hefeproben mittels FT-ICR-MS – Möglichkeiten und Grenzen

Nachfolgend wurde die Extraktionsmethode der Wahl vergleichend angewendet auf käuflich erworbene Bäckerhefe sowie auf für 26 Stunden kultivierte TUM 68[®], um Möglichkeiten und Grenzen der Methodik auszuloten. Weitere Proben der kultivierten Hefen konnten mangels ausreichender Probenmenge nicht analysiert werden.

5.1.3.1 Analyse detektierbarer Folatvitamere in verschiedenen Ladungszuständen

Die im vorangehenden Abschnitt bereits untersuchten Hefeproben wurden näher hinsichtlich der detektierbaren Folatvitamere untersucht. Wie Abbildung 5.4.B zeigt, konnte in der kultivierten Brauhefe (TUM 68[®]) eine zehnfach höhere Ionisierung des 5-CH₃-H₄PteGlu₇ bei ansonsten identischen Messparametern verzeichnet werden. Zwar zeichnete die kultivierte Hefe sich aus durch deutlich höhere Folatgehalte, allerdings befanden sich diese lediglich im Bereich von Faktor 2 – 3. Demnach war hier von einer geringeren Matrixbelastung der kultivierten Hefe im Vergleich zur käuflich erworbenen Bäckerhefe auszugehen. Verringerte Matrixeffekte würden folglich zu geringeren Suppressionseffekten führen und eine bessere Ionisierung der restlichen Signale begünstigen.

Abbildung 5.5 zeigt den Vergleich identifizierbarer Folatvitamere in der untersuchten Bäckerhefe sowie in der kultivierten TUM 68[®]. Eine Identifizierung wurde angenommen, wenn das experimentell ermittelte Masse-zu-Ladungsverhältnis mit einer Massenungenauigkeit von < 1 ppm dem theoretischen, monoisotopischen Wert eines entsprechenden Folatvitameres entsprach. Die für den Massenabgleich verwendete Datenbankliste unter Berücksichtigung verschiedener Ladungszustände findet sich in Anhang 17. Auf diese Art wurden in der Bäcker-

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

hefe 13, in der TUM 68[®] 49 potentielle Folatsignale detektiert. Für eine zusätzliche Verifizierung wurde das Isotopenmuster der detektierten Signale untersucht. Nur bei Übereinstimmung des experimentell ermittelten und des theoretischen Isotopenpatterns der potentiellen Folatsignale wurde eine Identifizierung akzeptiert, was in Abbildung 5.5 durch die zusätzliche schwarze Umrandung veranschaulicht wurde. In der Bäckerhefe konnten somit 42 % der detektierten Folatsignale verifiziert werden, während es bei der untersuchten TUM 68[®] 59 % waren. In der kultivierten TUM 68[®] konnten im Vergleich zur käuflich erworbenen Bäckerhefe generell mehr als doppelt so viele Folatvitamere detektiert sowie auf Grund ihres Isotopenpatterns identifiziert werden. Dies war zu großen Teilen der erhöhten Peakintensität der Folatsignale in der kultivierten Hefe zuzuschreiben, welche in Anhang 18 für die mit Hilfe des Isotopenpatterns identifizierbaren Folatsignale dargestellt ist. Ob diese erhöhte Signalintensität in der kultivierten Hefe auf die zwei- bis dreifach höheren Folatgehalte oder reduzierte Matrixeffekte zurückzuführen war, konnte nicht abschließend festgestellt werden.

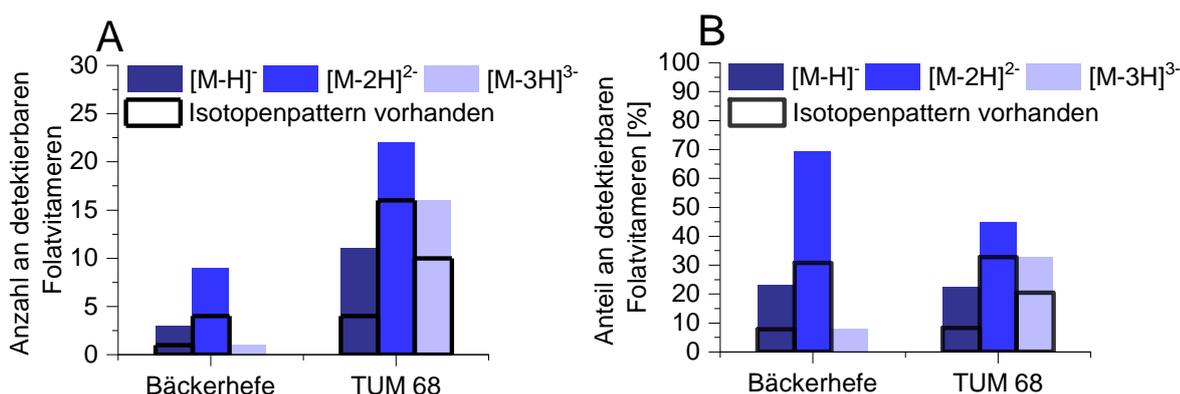


Abbildung 5.5 Anzahl detektierbarer und an Hand des vorhandenen Isotopenpatterns identifizierbarer Folatsignale in Bäckerhefe und kultivierter TUM 68[®] nach Analyse mittels FT-ICR-MS. 100 % repräsentieren die Aufsummierung aller detektierbaren Signale.

Alle detektierbaren Signale wurden zu 100 % aufsummiert und somit die prozentuale Verteilung für die verschiedenen geladenen Spezies berechnet. Die prozentuale Verteilung detektierbarer und davon identifizierbarer Folatsignale zwischen den untersuchten Hefen (abgebildet in Abbildung 5.5.B) zeigte zudem deutlich, dass in der TUM 68[®] vermehrt dreifach geladene Spezies detektiert und auch identifiziert werden konnten. Abbildung 5.6 verdeutlicht außerdem, dass in der untersuchten Bäckerhefe (Abbildung 5.6.A) im Vergleich zur TUM 68[®] (Abbildung 5.6.B) keines der identifizierten Signale in einem weiteren Ladungszustand detektiert werden konnte. In der untersuchten TUM 68[®] dagegen waren 35,3 % sowohl zweifach als auch dreifach, 23,5 % sogar zusätzlich einfach geladen detektierbar. Entsprechend konnten in der TUM 68[®] knapp 59 % der identifizierten Folatsignale in mindestens einem weiteren Ladungszustand detektiert werden, was die Identifizierung zusätzlich bestätigte. Diese Beobachtung

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

war vermutlich größtenteils der geringen Anzahl an identifizierbaren Folatvitameren von lediglich fünf im Falle der Bäckerhefe verglichen mit 17 Vitameren im Falle der TUM 68® geschuldet.

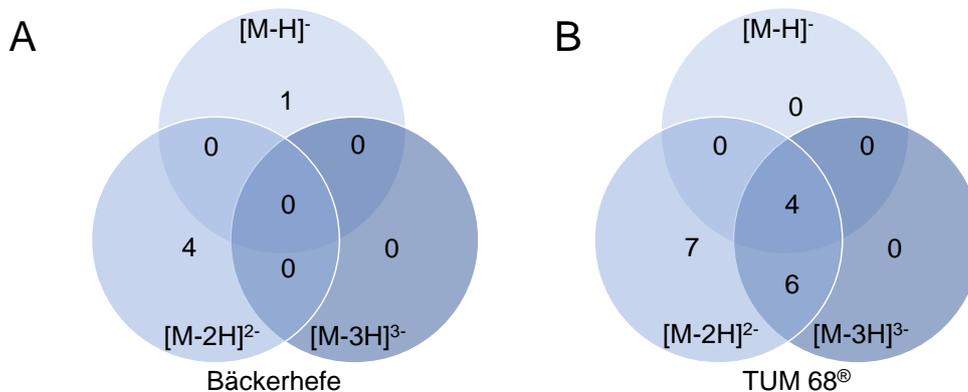


Abbildung 5.6 Verteilung der zum Teil in verschiedenen Ladungszuständen identifizierbaren Folatvitamere in den untersuchten Hefepflanzen nach Analyse mittels FT-ICR-MS.

Diskussion der Analyse detektierbarer Folatvitamere

Die Analyse von zwei Hefepflanzen zeigte, dass lediglich 20-25 % der identifizierten Folatsignale in einfach geladenem Zustand detektierbar waren. Die vermehrte Detektion von mehrfach geladenen Spezies erschwerte aber die Auswertung mit Hilfe der unter Kapitel 2.6.5 erläuterten Netzwerkanalyse beruhend auf Biotransformationen erheblich, da diese lediglich einfach geladene Spezies berücksichtigt. Zudem konnten in beiden Hefen generell nur die Hauptpolyglutamate (Hexa- und Heptaglutamate) identifiziert werden, was zu generell einer recht geringen Anzahl an detektierbaren Folatvitameren und allgemein sehr hohen Masse-zu-Ladungsverhältnissen führte. Letztere wiederum erschweren auf Grund der sinkenden Massengenauigkeit die Auswertung mittels Biotransformationsnetzwerken zusätzlich.

5.1.3.2 Transformation mehrfach geladener Spezies für die Datenauswertung mittels softwaregestützter Netzwerkanalyse

Um das Problem der mehrfach geladenen Spezies zu umgehen, wurde die experimentell generierte Datenmatrix mehrfach prozessiert. Zunächst wurden in zwei separaten Durchläufen alle zwei- und dreifach geladenen Spezies extrahiert, welche ein eindeutiges Isotopenmuster zur Bestätigung der Mehrfachladung aufwiesen. Diese extrahierten m/z wurden anschließend umgerechnet auf einfach geladenen Spezies. Die ursprünglich in der Datenmatrix enthaltenen (mehrfach geladenen) m/z wurden abschließend mit den auf diese Art ermittelten einfach geladenen m/z ersetzt. Diese theoretisch berechnete (einfach geladene) Datenmatrix wurde so dann für die Netzwerkanalyse verwendet.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

Diskussion der Analyse der transformierten, mehrfach geladenen Spezies mittels softwaregestützter Netzwerkanalyse

Die Netzwerkanalyse der berechneten (einfach geladenen) Datenmatrix der TUM 68[®] offenbarte nicht annähernd so viele Folatvitamere wie die bereits durch den Datenbankabgleich und mittels ihres Isotopenpatterns bestätigten ermittelten Signale. Von den zuvor identifizierten 17 Folatspezies konnten lediglich 8 durch die Netzwerkanalyse bestätigt werden, was einem Anteil von knapp 50 % entsprach. Trotz fehlendem Isotopenpattern konnten sechs weitere (von vornherein einfach geladene) Folatspezies identifiziert werden, was einer Erweiterung um 35 % entsprach. Letztendlich konnten somit durch die Kombination beider Auswertungen 23 Folatspezies der ursprünglich 49 potentiellen Folatsignale identifiziert werden, was einem Anteil von 47 % entsprach.

5.1.3.3 Diskussion der Möglichkeiten und Grenzen der Folatanalytik mittels FT-ICR-MS am Beispiel der untersuchten TUM 68[®]

Die Untersuchungen der Bäckerhefe sowie der kultivierten TUM 68[®] mittels FT-ICR-MS verdeutlichten, dass sich für diese Analytik einige Schwierigkeiten aufzeigten. Generell konnten für beide Hefen hauptsächlich die Hauptpolyglutamate in Form des Hexa- und Heptaglutamates detektiert werden. Bedingt durch deren hohes Molekulargewicht waren diese größtenteils in mehrfach geladenem Zustand analysierbar. Dieser wiederum erschwerte die Datenauswertung deutlich, da die üblicherweise verwendeten Skripte angepasst und mehrere Schritte der Datenauswertung und -transformation durchgeführt werden mussten. Generell ist mit Erhöhung des Masse-zu-Ladungsverhältnisses aber auch von einer Zunahme des Massenfehlers auszugehen, sodass eine Annotation auf Grund einer Massenungenauigkeit < 1 ppm für hohe m/z nicht mehr angenommen werden kann. [Marshall et al. 1998] Genau in diesen Bereich aber fielen alle detektierbaren und umgerechneten einfach geladenen Folatspezies. Dies würde also erklären, weshalb lediglich 47 % der potentiellen Folatsignale durch die Kombination aus Isotopenpattern und Netzwerkanalyse identifiziert werden konnten. Eine Erhöhung der für eine eindeutige Identifizierung maximal akzeptierbaren Massenungenauigkeit wurde als nicht zielführend erachtet, da somit zwar möglicherweise mehr Signale identifiziert hätten werden können, aber die Unsicherheit dieser Annotation gleichermaßen gestiegen wäre. Ein weiteres Problem stellten Isomere dar. So besitzen beispielsweise die MeFox-Vitamere dieselbe Masse wie 5-CHO-H₄folate oder 5,10-CH₂-H₄folate dieselbe Masse wie 5-CH₃-H₂folate. Mangels chromatographischer Auftrennung konnte mit Hilfe der Analyse mittels DI-FT-ICR-MS (Direktinjektion FT-ICR-MS) nicht zwischen diesen Isomeren unterschieden werden.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

Auf Grund der Vielzahl an Schwierigkeiten der Analyse der Folatmetaboliten mittels FT-ICR-MS wurden daher vergleichend Untersuchungen mittels UHPLC-Q-ToF-MS (Ultra High Performance Liquid Chromatography) angestellt.

5.2 Untersuchungen mittels UHPLC-Q-ToF-MS

Vergleichend zu Analysen mittels FT-ICR-MS wurden Messungen mittels UHPLC-Q-ToF-MS durchgeführt. Im Gegensatz zur Analyse mittels FT-ICR-MS können damit zwar nur geringere Auflösungen von $R \geq 40.000$ und eine Massengenauigkeit von ≤ 5 mDa erreicht werden. Die Analyse mittels Q-ToF-MS aber besticht durch die chromatographische Trennung vor dem Massenanalysator und ermöglicht somit eine deutliche Reduktion von Matrixeffekten. Die Auftrennung der Analyten je nach deren Polarität erlaubt zudem Aussagen über deren strukturelle Molekülbestandteile. Des Weiteren ist eine Fragmentierung der eluierten Analyten möglich, sodass auch diese in Hochauflösung gemessen werden. Die so generierten Tandem-MS-Daten in Kombination mit der Retentionszeit ermöglichen somit im besten Fall eine Identifizierung auf Level C (vgl. Kapitel 2.6.3), während die FT-ICR-MS-Messungen lediglich Rückschlüsse auf die Summenformel und somit eine Identifizierung auf Level E zulassen.

Bezüglich der Nomenklatur sei angemerkt, dass im Nachfolgenden von MS^1 -Spektren die Rede ist, wenn diese mit einer Scanrate von 5 Hz nach der Elution von der chromatographischen Säule aufgenommen wurden. Wurde aus diesem Spektrum ein Vorläuferion selektiert und fragmentiert, ist im Nachfolgenden von einem MS^2 - oder MS/MS -Spektrum die Rede.

5.2.1 Methodenentwicklung

Vor der Durchführung von Probenmessungen wurde eine Methode zur Analyse der Folate mittels UHPLC-Q-ToF-MS entwickelt. Der Fokus lag hierbei hauptsächlich auf der Entwicklung einer UHPLC-Methode, für die massenspektrometrische Analyse wurden größtenteils Standardparameter übernommen. Für die Methodenentwicklung wurde ein Mix aus Monoglutamatstandards (10-CHO-PteGlu, 5- CH_3H_4 folat, 5-CHO- H_4 folat, H_4 folat und PteGlu) sowie ein Mix der Polyglutamatstandards 5- CH_3-H_4 PteGlu₂₋₇ mittels UHPLC-Q-ToF-MS vermessen.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

5.2.1.1 Wahl eines geeigneten Säulenmaterialies

Zunächst wurden verschiedenen Säulenmaterialien auf deren Eignung zur Analyse der Folate untersucht. Als Fließmittel dienten Wasser und Acetonitril, jeweils mit einem Ameisensäureanteil von 0,1 %. Als Startgradient wurde ein Standardgradient (von 5 auf 99,6 % Acetonitril innerhalb von 8 min) um eine langsame Steigerung auf 25 % Acetonitril innerhalb der ersten sechs Minuten erweitert (Gradient 1, vgl. Kapitel 14.3). Verwendete Säulenmaterialien waren zum einen standardmäßig verwendete RP-Materialien sowie zusätzlich mit positiven Ladungen modifizierte RP-Materialien, welche eine verbesserte Peakshape speziell bei Verwendung von Fließmitteln mit geringer ionischer Stärke versprechen. Des Weiteren wurden vollporöse Materialien mit Materialien mit einer porösen Hülle verglichen. Letztere sollten eine geringere Bandenverbreiterung und somit schärfere Peaks liefern. Tabelle 5.1 gibt einen Überblick über die zunächst verwendeten Säulenmaterialien. Genauere Details der Säulenmaterialien sind Kapitel 14.3 zu entnehmen.

Tabelle 5.1 Getestete Säulenmaterialien während der Methodenentwicklung zur Folatanalyse mittels UHPLC-Q-ToF-MS.

Säulenmaterial	Material	Modifizierung	Materialstruktur
Acquity UPLC BEH C18	C18	Keine	Vollporös
Acquity UPLC CSH C18	C18	Positive Ladungen	Vollporös
Cortecs UPLC C18	C18	Keine	Poröse Hülle (core shell)
Cortecs UPLC C18+	C18	Positive Ladungen	Poröse Hülle (core shell)
Restek Rapor™, ARC-18	C18	Methylpropyl geschützte Silanolgruppe	Poröse Hülle (core shell)

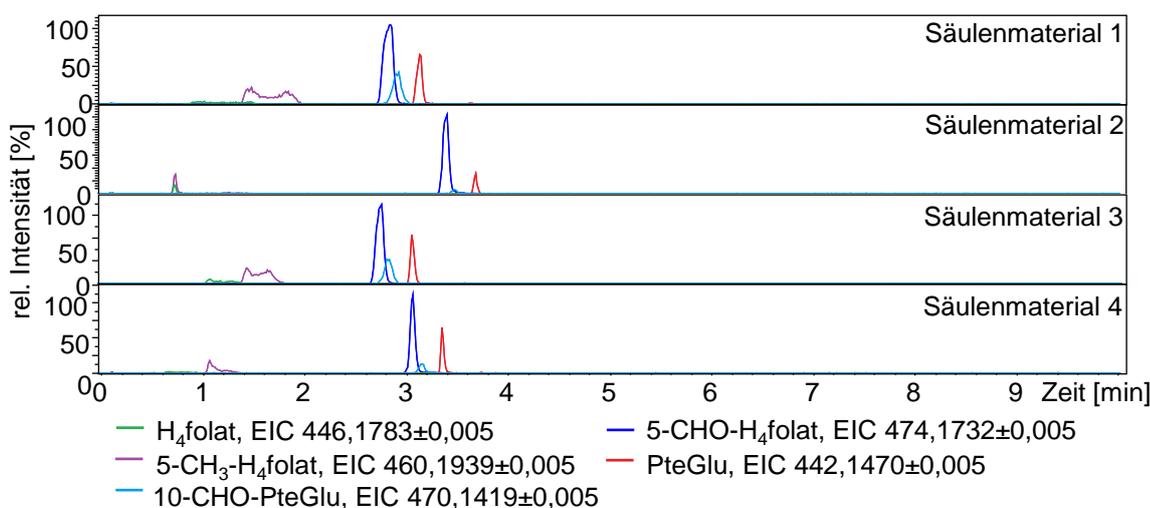


Abbildung 5.7 Extrahierte Ionen Chromatogramme (EIC) der Monoglutamatstandards getestet auf verschiedenen UHPLC-Säulenmaterialien und Messung mittels Q-ToF-MS.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

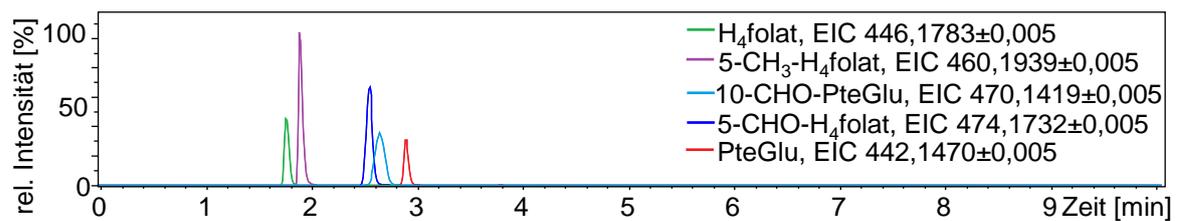


Abbildung 5.8 Chromatogramm der Monoglutamatstandards nach Trennung auf Restek Raptor ARC-18 UHPLC-Material und Messung mittels Q-ToF-MS.

Diskussion der Wahl des geeigneten Säulenmaterials

Hinsichtlich der Peakform lieferte keine der getesteten Säulenmaterialien (Säulenmaterial 1 – 4) akzeptable Ergebnisse, wie in Abbildung 5.7 exemplarisch für die Monoglutamatstandards gezeigt ist. Daher wurde in einem weiteren Schritt ein Säulenmaterial ähnlich dem der quantitativen LC-MS/MS Methode zur Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes gewählt (Säulenmaterial 5). Abbildung 5.8 zeigt, dass hiermit die Chromatographie deutlich verbessert werden konnte. Dieses Material zeichnet sich aus durch eine Modifizierung der Silanolgruppen durch Einführen sterischer Schutzgruppen. Diese Modifikationen ermöglichten hierbei vor allem für die recht polaren Analyten H₄folat sowie 5-CH₃-H₄folat schärfere Peaks. Für alle weiteren Optimierungen wurde daher dieses Säulenmaterial verwendet.

5.2.1.2 Wahl von geeigneten Fließmitteln sowie deren Gradienten

Die Messung der Polyglutamatstandards unter den gewählten Bedingungen (Gradient 1, Kapitel 14.3 sowie Wasser und Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäureanteil) zeigte keine zufriedenstellende chromatographische Trennung der Analyten. Daher wurden die verwendeten Fließmittel und deren Gradient optimiert. Der Gradient wurde leicht abgeflacht, um eine spätere Elution und eine verbesserte Trennung vor allem der Polyglutamate zu ermöglichen. Abbildung 5.9 zeigt den Vergleich zwischen 0,1 % und 1 % Ameisensäureanteil in den Fließmitteln bei Verwendung dieses Gradienten.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

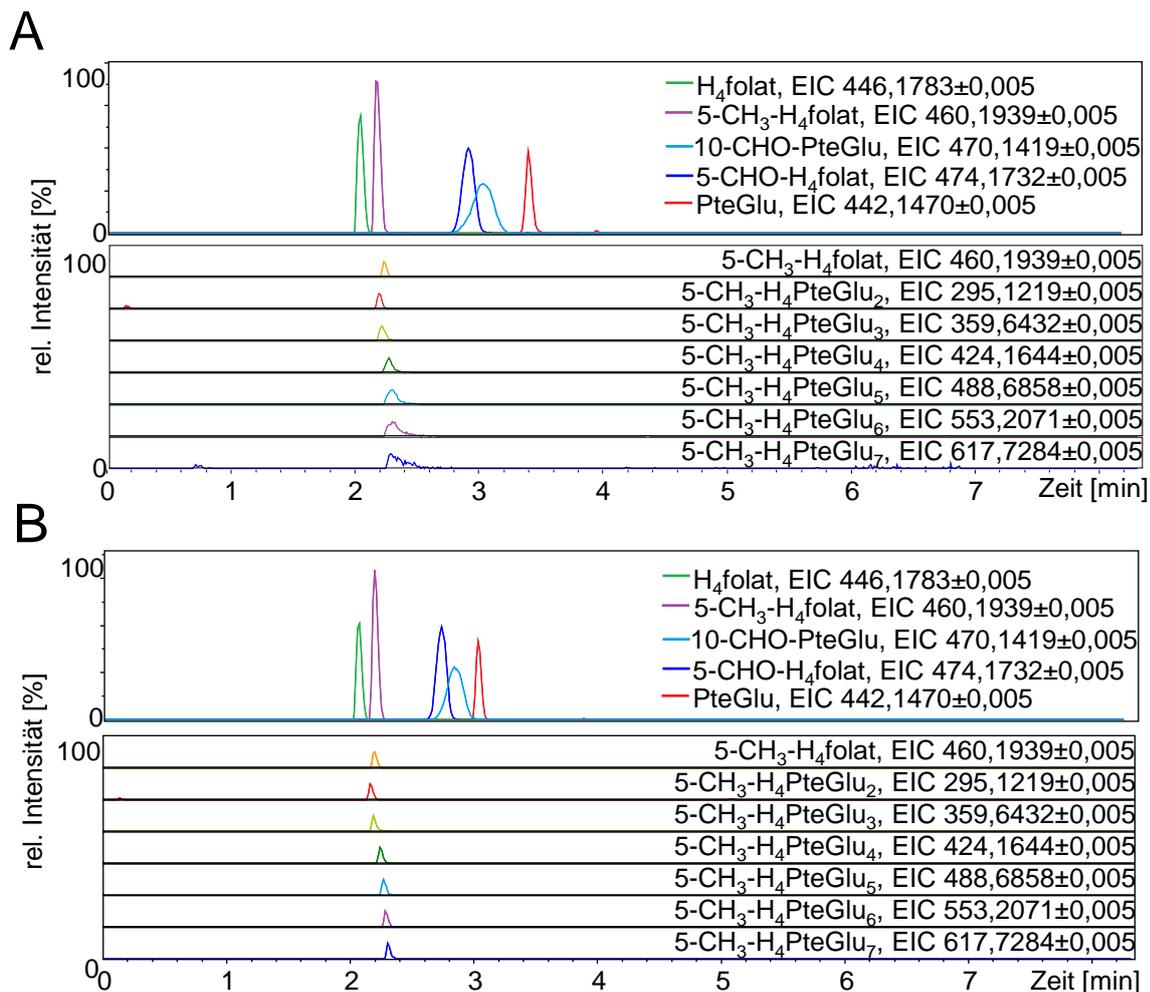


Abbildung 5.9 Chromatogramme der Monoglutamat- und Polyglutamatstandards nach Trennung auf Restek Raptor ARC-18 UHPLC-Material und Messung mittels Q-ToF-MS.

(A) Verwendung von 0,1 % Ameisensäure in den Fließmitteln Wasser und Acetonitril.

(B) Verwendung von 1 % Ameisensäure in den Fließmitteln Wasser und Acetonitril.

Diskussion der Wahl der geeigneten Fließmittel

Für die Monoglutamatstandards zeigte sich lediglich eine etwas frühere Elution von 10-CHO-PteGlu, 5-CHO-H₄folat sowie PteGlu bei 1 % Ameisensäureanteil (Abbildung 5.9.B) im Vergleich zu 0,1 % Ameisensäureanteil (Abbildung 5.9.A). Bei den Polyglutamaten allerdings war vor allem mit zunehmender molekularer Masse der Analyten eine verbesserte Peakschärfe unter Verwendung von 1 % Ameisensäureanteil ersichtlich. Die Verwendung von 0,1 % Ameisensäure schien folglich nicht ausreichend zu sein für eine vollständige Protonierung der Analyten, sodass diese verschlechtertes Retentionsverhalten auf der Säule zeigte. Zudem schien die Erhöhung des Ameisensäureanteils in den Fließmitteln die Ionisierung im positiven Modus zu begünstigen. Für alle weiteren Messungen wurde daher der modifizierte Gradient (Gradient

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

3, Kapitel 14.3) unter Verwendung von 1 % Ameisensäureanteil in den Fließmitteln Wasser und Acetonitril gewählt.

5.2.1.3 Wahl der geeigneten MS-Parameter

Im Zuge der Optimierungen wurden verschiedene Quellentemperaturen von 200 °C sowie 300 °C getestet. Die Erhöhung brachte allerdings hauptsächlich geringfügige Verbesserungen der Peakintensität für die höhermolekularen Polyglutamate, während die Intensität der kürzerkettigen Polyglutamate abnahm (vgl. Anhang 15).

Diskussion der Wahl der geeigneten MS-Parameter

Die quantitativen Untersuchungen hatten zuvor gezeigt, dass die längerkettigen Polyglutamate die Hauptvitamere in den untersuchten Proben darstellten (vgl. Kapitel 4.2.2 sowie Kapitel 4.2.3). Von diesen konnte folglich eine ausreichende Intensität auf Grund der mengenmäßig höheren Anteile im Vergleich zu den kürzerkettigen Polyglutamaten angenommen werden. Zur Intensitätsverbesserung der ohnehin zu wesentlich geringeren Anteilen vorkommenden, kürzerkettigen Polyglutamate wurde daher eine Quellentemperatur von 200 °C beibehalten, um deren Ionisierung im Vergleich zu einer Quellentemperatur von 300 °C zu begünstigen.

5.2.1.4 Überprüfung des Fragmentierungsverhaltens von Mono- und Polyglutamatstandards

Die zur Verfügung stehenden Mono- und Polyglutamatstandards wurden mittels der entwickelten Methode am Q-ToF-MS im Auto-MS(n)-Modus vermessen. Dieser Modus selektiert pro Scan die drei intensivsten Peaks und fragmentiert diese. Dadurch konnten neben Informationen zur Retentionszeit der Analyten zudem Erkenntnisse zum Fragmentierungsverhalten der Folatstandards generiert werden. Besonders wichtig war dabei vor allem das Elutions- und Fragmentierungsverhalten der Polyglutamate, da diese – wie in den vorangehenden Kapiteln untersucht – die im Organismus vorliegende Vitamerform darstellen.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

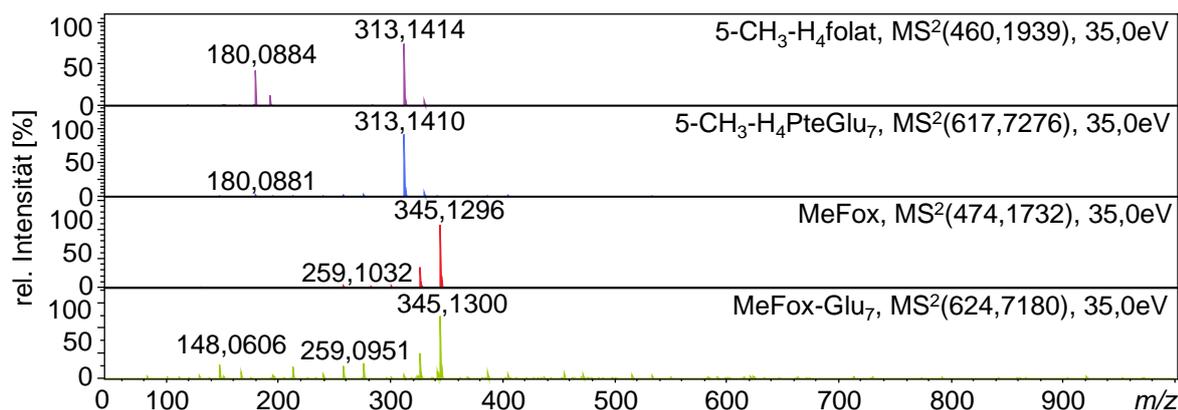


Abbildung 5.10 MS/MS Spektren von 5-CH₃-H₄folat, 5-CH₃-H₄PteGlu₇, MeFox sowie MeFox-Glu₇ nach Messung mittels Q-ToF-MS.

Zur Identifizierung des Fragmentierungsverhaltens der Polyglutamate wurden zum einen die zur Verfügung stehenden, synthetisierten 5-CH₃-H₄PteGlu₂₋₇ Standards vermessen. Zudem wurde ausgehend vom 5-CH₃-H₄PteGlu₇ das dazugehörige Oxidationsprodukt MeFox-Glu₇ generiert (vgl. Kapitel 15.3).

Diskussion des Fragmentierungsverhalten von Mono- und Polyglutamaten

Wie Abbildung 5.9 zu entnehmen ist, war mit Verlängerung des Glutamatrestes eine längere Retention am Säulenmaterial zu beobachten, was zu einer Retentionszeitverlängerung der Polyglutamate im Vergleich zum Monoglutamat führte. Die Verlängerung der Glutaminsäurekette schien somit den unpolaren Charakter des Moleküls zu erhöhen. Erhöhte Polarität auf Grund zusätzlich eingeführter Carboxylgruppen konnte nicht beobachtet werden.

Abbildung 5.10 zeigt die Fragmentierungsspektren von 5-CH₃-H₄folat, 5-CH₃-H₄PteGlu₇, MeFox sowie MeFox-Glu₇. Es ist deutlich ersichtlich, dass die Hauptfragmente zwischen den Mono- und Polyglutamatstandards identisch sind, welche vom Pteridinsäurerest resultieren. Folglich konnte davon ausgegangen werden, dass bereits bei recht geringen Kollisionsenergien zunächst die Glutaminsäurereste der Polyglutamate abgespalten werden und die verbleibenden Fragmente identisch sind mit denen der Monoglutamate. Somit konnten zwei Annahmen getroffen werden, welche bei der späteren Identifizierung in Realproben helfen sollten. Zum einen sollte ein Polyglutamat charakterisiert sein durch leicht verlängerte Retentionszeit im Vergleich zum entsprechenden Monoglutamat. Zum anderen sollte das Polyglutamat dasselbe Fragmentierungsspektrum wie das entsprechende Monoglutamat aufweisen.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

5.2.1.5 Optimierung der MS-Methode zur Generierung von Tandem-MS-Daten

Im letzten Schritt wurde die Kollisionsenergie angepasst, um eine vollständige Fragmentierung der Metaboliten zu unterbinden. Ziel war es, das Vorläuferion nach Möglichkeit zu gewissen Teilen zu behalten und eine vollständige Fragmentierung zu unterbinden. Auf diese Weise sollten für die spätere softwaregestützte Auswertung notwendige Informationen zum Vorläuferion beibehalten werden. Dazu wurden an Hand der Polyglutamatstandards 5-CH₃-H₄PteGlu₂₋₇ Kollisionsenergien zwischen 10 eV und 40 eV in 5 eV Schritten getestet und die zugehörigen Fragmentierungsspektren miteinander verglichen.

Diskussion der Optimierung der MS-Methode zur Generierung von Tandem-MS-Daten

Beste Fragmentierungsspektren konnten mit 20 eV generiert werden, sodass die MS-Methode entsprechend angepasst wurde. Zudem wurde die Methode erweitert um eine sogenannte „preference list“. Diese Präferenzliste beinhaltet die erwarteten (und vermuteten) Folatvitamere und ermöglichte somit eine Selektion zur Fragmentierung auch bei geringen Peakintensitäten der Vorläuferionen im MS⁽¹⁾-Spektrum. Zudem wurde der Grenzwert herabgesetzt, welcher festlegt, ab wann ein Vorläuferion zur Fragmentierung selektiert wird. Dadurch konnte eine deutliche Verbesserung der Generierung von MS²-Spektrern erreicht werden.

5.2.2 Durchführung verschiedener *dilute and shoot* Methoden

Um eine geeignete Probenvorbereitung für die spätere Anwendung auf Profiling-Studien zu finden, wurden zunächst verschiedene sogenannte „*dilute and shoot*“-Methoden getestet. Diese Methoden beinhalten lediglich eine Extraktion des Probenmaterials in Lösungsmittelgemischen. Oftmals wird die Extraktion durch Behandlung mittels Zellaufschluss-Aufschluss oder Ultraschallbehandlung verbessert. Analog zur Methodenentwicklung am FT-ICR-MS wurden dieselben nach Kapitel 14.1 aufgearbeiteten Bäckerhefen verwendet und mit der zuvor entwickelten Methodik mittels UHPLC-Q-ToF-MS vermessen.

Diskussion der Durchführung verschiedener *dilute and shoot* Methoden

Wie Abbildung 5.11 verdeutlicht, waren bei allen gewählten Lösungsmittelgemischen in der dem Hauptvitamer 5-CH₃-H₄PteGlu₇ zugehörigen Massenspur keine Signale detektierbar. Da sowohl die Faktoren Injektionsvolumen sowie die allgemeine Konzentration der Probe (gemessen am TIC, Total Ion Current) bereits am Maximum lagen, musste eine andere Probenvorbereitung gewählt werden. Somit sollte eine Aufkonzentration der Folatanalyten bei gleichzeitiger Reduktion der allgemeinen Matrixbelastung erreicht werden. Analog zur Analyse mittels

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

FT-ICR-MS wurde die alternative Folatextraktion durch Sieden in gepufferter Ethanollösung als nicht effizient genug bewertet (vgl. Kapitel 3.2). Daher wurde auch für die Analyse mittels UHPLC-Q-ToF-MS die klassische Folatextraktion in Kombination mit verschiedenen Materialien zur Festphasenaufreinigung gewählt.

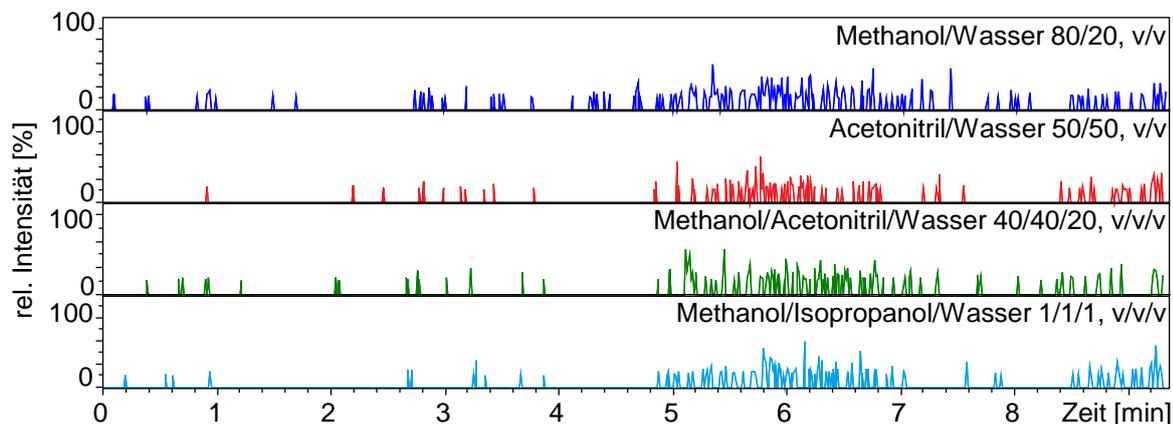


Abbildung 5.11 EICs (Extracted Ion Chromatogram) des Hauptvitameres 5-CH₃-H₄PteGlu₇ nach Extraktion mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen und Messung mittels UHPLC-Q-ToF-MS.

5.2.3 Anwendung auf vergleichende Untersuchungen verschiedener Probenaufreinigungen

Unter Kapitel 3.3 wurden verschiedene Festphasenaufreinigungsprotokolle für die Analyse von Folaten entwickelt. Hierbei konnte bereits gezeigt werden, dass die Wahl des Festphasenmaterials und der zugehörigen Elutionsparameter deutliche Auswirkungen auf die Vitamerenverteilung hatte. Eine Diskriminierung der Polyglutamate am Festphasenmaterial allerdings wurde nicht festgestellt.

5.2.3.1 Allgemeiner Vergleich der extrahierten Metabolite

Für die Anwendung auf Messungen der Probenextrakte mittels UHPLC-Q-ToF-MS war nun von Interesse, inwieweit das allgemeine Metabolitenspektrum der Hefeprobe durch die Wahl des Aufreinigungsmechanismus beeinflusst wurde. Dazu wurden die nach Kapitel 14.3 aufgearbeiteten Proben mit der zuvor entwickelten Methode mittels UHPLC-Q-ToF-MS vermessen.

Die Daten wurden zunächst wie in Kapitel 14.3 erläutert vorprozessiert. Diese Vorprozessierung beinhaltete unter anderem eine Subtraktion von Hintergrundsignalen, verschiedene Kalibrierungsschritte und weitere Säuberungsschritte (u.a. von verschiedenen Ladungszuständen derselben Spezies) der experimentell ermittelten Spektren. So wurden beispielsweise nur

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

Signale als valide behalten, wenn diese in mindestens 50 % der gemessenen Proben in Mehrfachinjektion detektiert werden konnten. Insgesamt konnten somit 2145 experimentelle Spezies für die Methode SAX E detektiert werden, während die Zahl der detektierten Spezies 3153 für die Methode SAX A betrug. Mittels C18-Aufreinigung konnten 9095 experimentelle Spezies detektiert werden, was mittels HLB-Aufreinigung mit 8316 Spezies geringfügig weniger waren.

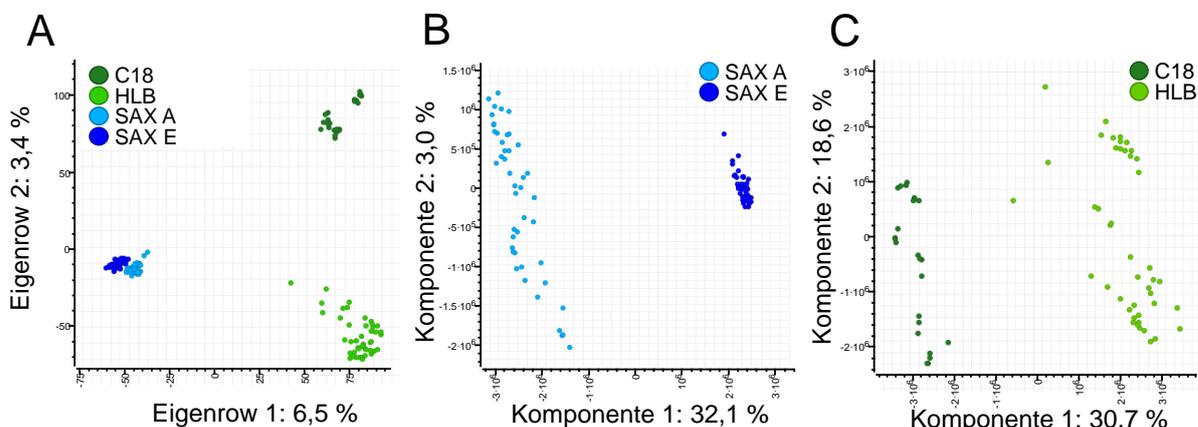


Abbildung 5.12 Multivariate statistische Auswertung mittels UHPLC-Q-ToF-MS analysierter Hefen nach Aufreinigung mit verschiedenen Festphasenmaterialien.

(A) Hauptkomponentenanalyse.

(B) Regression der partiellen kleinsten Quadrate der Aufreinigung mittels SAX-Kartuschen.

(C) Regression der partiellen kleinsten Quadrate der Aufreinigung mittels C18- sowie HLB-Kartuschen.

Somit offenbarte bereits die Anzahl der detektierten Spezies deutliche Unterschiede zwischen den gewählten Festphasenmaterialien. Um diese näher zu untersuchen, wurden die vorprozessierten Daten multivariaten statistischen Auswertungen unterworfen. Somit sollte die allgemeine Trennung der extrahierten Metaboliten je nach Verwendung der verschiedenen Festphasenaufreinigungen ohne Berücksichtigung der jeweiligen Molekülstruktur abgeschätzt werden. Um die hauptverantwortlichen Metaboliten für die Trennung in der Hauptkomponentenanalyse zu identifizieren, wurde ein weiteres Klassifizierungsmodell herangezogen. Die Regression der partiellen kleinsten Quadrate (PLS, Partial Least Squares) wurde angewendet, um die Separierung der beiden SAX-Methoden SAX E und SAX A sowie der C18- und HLB-Kartuschen zu maximieren (Abbildung 5.12.B und Abbildung 5.12.C). Um einen Einblick in die molekularen Unterschiede der aus den Hefen extrahierten Metabolite in Abhängigkeit der verwendeten Festphasenmaterialien zu bekommen, wurden die am stärksten diskriminierenden Metaboliten jeder Kartuschenaufreinigung weitergehend untersucht. Aus den Loadings Plots der Regression der partiellen kleinsten Quadrate wurden dazu die Top 100 der diskriminierenden m/z selektiert und mit Hilfe von ClassyFire vorläufig klassifiziert. Diese Anwendung erlaubt eine Klassifizierung basierend auf den zugehörigen InChiKeys. Diese wiederum wurden generiert aus den experimentell ermittelten m/z mit Hilfe des CEU Mass Mediators. Die genaue Vorgehensweise der Klassifizierung ist in Kapitel 14.3 beschrieben.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

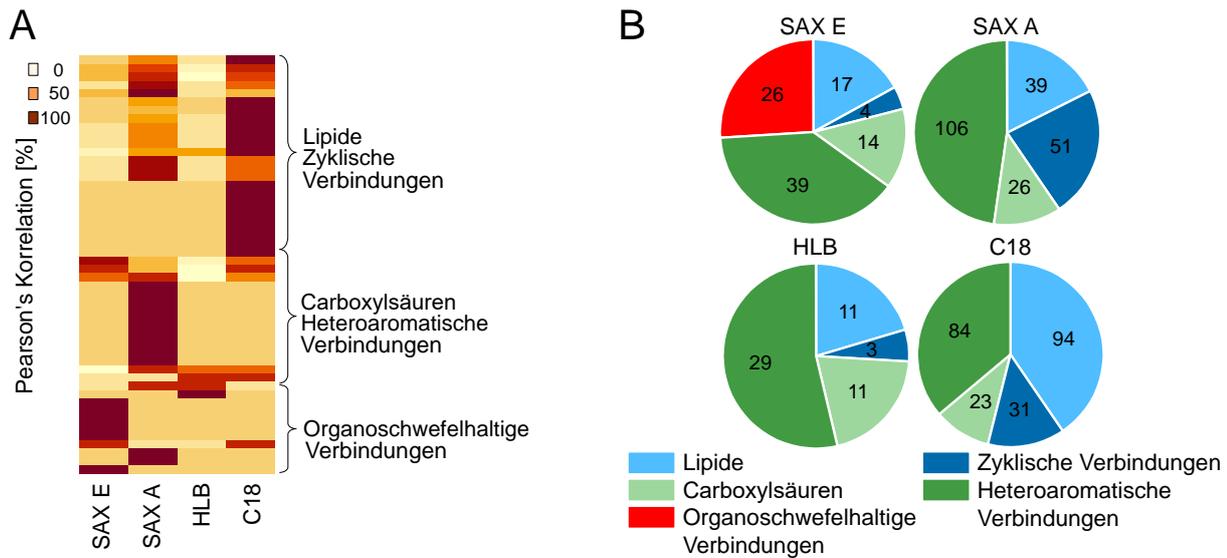


Abbildung 5.13 Identifizierung der Metabolitenklassen der aus den Regressionen der partiellen kleinsten Quadrate extrahierten 100 diskriminierendsten der experimentell ermittelten Spezies der mittels UHPLC-Q-ToF-MS analysierten Hefen nach Aufreinigung mit verschiedenen Festphasenmaterialien. Gesamte Anzahl an detektierten Spezies: 2145 (SAX E), 3153 (SAX E), 9095 (C18), 8316 (HLB). (A) Heatmap der diskriminierendsten Metabolitenklassen nach Normierung der Daten auf die Gesamtzahl an identifizierbaren Metaboliten pro Metabolitenklasse. Die Pearson's Korrelation gibt Auskunft über die Signifikanz des Unterschiedes zwischen den verwendeten Festphasenmaterialien. (B) Aufsummierung der identifizierten Metabolitenklassen unter Nennung der gemeinsamen Oberklasse. Mehrfachnennung bedeutet eine uneindeutige Zuordnung zu mehreren Metabolitenklassen.

Die identifizierten Metabolitenklassen wurden an Hand einer Heatmap miteinander verglichen (Abbildung 5.13.A). Um eine zu starke Beeinflussung stärker verteilter Metabolitenklassen zu unterbinden, wurden für jede analysierte Metabolitenklasse die Ergebnisse auf die Gesamtanzahl an Metaboliten der untersuchten Metabolitenklasse normiert und für die Erstellung der Heatmap verwendet. Die identifizierten Metabolitenklassen wurden zudem unter Berücksichtigung der Anzahl an experimentellen Spezies, welcher dieser Metabolitenklasse zugeordnet werden konnten, miteinander verglichen (Abbildung 5.13.B). Die Auflistung der identifizierten Metabolitenklassen findet sich in Anhang 19.

Diskussion der multivariaten statistischen Auswertung des Vergleiches der Festphasenmaterialien

Die multivariaten statistischen Auswertungen des Vergleiches der extrahierten Metabolite zeigten eine deutliche Trennung der Daten in Abhängigkeit der gewählten Aufreinigung. Mit Hilfe der Regression der partiellen kleinsten Quadrate wurden die 100 diskriminierendsten experimentellen Spezies einer jeden Aufreinigungsmethode identifiziert und diese weitergehend analysiert. Dazu wurden die zugehörigen Metabolitenklassen identifiziert und die generierten Daten mittels einer Heatmap analysiert sowie die Summe an identifizierbaren Spezies einer jeden Metabolitenklasse ermittelt. Für beide Analysen schien die HLB-Aufreinigung eine große

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

Bandbreite an Analyten abzudecken mit Tendenz zur Präferenz von Heteroaromaten und Carboxylsäuren, wohingegen die C18-Aufreinigung Spezifität zeigte für Lipide, Steroide und zyklische Verbindungen. SAX-Extrakte dagegen waren besonders reich an Purinen, Pyrimidinen und Carboxylsäuren. Des Weiteren konnten mit Hilfe der SAX-Aufreinigung unter Verwendung von Elutionspuffer (SAX E) besonders viele schwefelhaltige Verbindungen identifiziert werden. Die Präferenzen der verschiedenen Aufreinigungsmethoden konnten folglich auf die Zusammensetzung des jeweiligen Kartuschenmaterials zurückgeführt werden. So sind HLB-Kartuschen gekennzeichnet durch eine geringere Selektivität für bestimmte Metabolitenklassen. Die Zusammensetzung des Kartuschenmaterials – bestehend aus sowohl hydrophilen als auch lipophilen Strukturbestandteilen – ermöglicht ein Abdecken eines breiten Metabolitenspektrums in der Probe. Dennoch schien eine Präferenz für heteroaromatische Verbindungen im Gegensatz zu lipophilen Substanzen vorhanden zu sein. C18-Kartuschen dagegen sind gekennzeichnet durch deren hohen lipophilen Charakter bedingt durch die langen Kohlenstoffseitenketten. Die hohe Zahl an Lipiden, Steroiden und zyklischen Verbindungen in den Probeneluat nach Aufreinigung mit diesem Festphasenmaterial war daher nicht weiter verwunderlich. Auch die Selektivität der SAX-Aufreinigung konnte erklärt werden durch die Zusammensetzung des SPE-Kartuschenmaterials. Die quaternäre Aminfunktion bindet bevorzugt anionische Verbindungen wie Carboxylsäuren oder heteroaromatische Verbindungen. Bedingt durch den pH-Wert bei der Probenauftragung lagen diese in ionischer Form im Probenextrakt vor und konnten bevorzugt ans SAX-Festphasenmaterial binden. Die höhere Selektivität der SAX-Eluate für schwefelhaltige Verbindungen unter Verwendung von Elutionspuffer konnte auf die Zusammensetzung dieses Elutionspuffers zurückgeführt werden. Als stabilisierende Komponente war in diesem neben Ascorbinsäure zusätzlich DTT enthalten. Es konnte vermutet werden, dass es zu Interaktionen des zur Metabolitenstabilisierung verwendeten DTT mit den eluierten Metaboliten im SAX-Extrakt kam.

5.2.3.2 Vergleich der extrahierten Folatmetabolite

Der Fokus dieser Arbeit lag hauptsächlich auf der tiefergehenden Analyse der Folatmetaboliten. Daher wurde im nachfolgenden Schritt die Matrix aus experimentell ermittelten Daten eingegrenzt auf den Retentionsbereich der Folate. Dieser wurde definiert als der Bereich, in welchem die unter Kapitel 5.2.1 vermessenen Folatstandards eluierten und zusätzlich erweitert um jeweils 10 Sekunden vor und nach des definierten Retentionszeitfensters. Innerhalb dieses Bereiches wurde gescreent auf bereits bekannte C₁-Metaboliten, deren Vorläufer sowie Abbauprodukte, welche in Anhang 17 zusammengefasst sind. Alle Metaboliten wurden gescreent

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

vom zugehörigen Monoglutamat bis zum zugehörigen Decaglutamat. Für die vorläufige Identifizierung wurde zum einen das Retentionsverhalten, bekannt durch die vermessenen Monoglutamatstandards, sowie geringfügig verlängerte Retention mit zunehmender Kettenlänge des Glutaminsäurerestes herangezogen. Eine eindeutige Identifizierung erfolgte durch Abgleich der experimentell ermittelten Fragmentspektren (MS²-Spektren) mit dem Fragmentierungsverhalten der Monoglutamatstandards. Stimmt diese in den Hauptfragmenten überein, so wurde eine eindeutige Identifizierung angenommen.

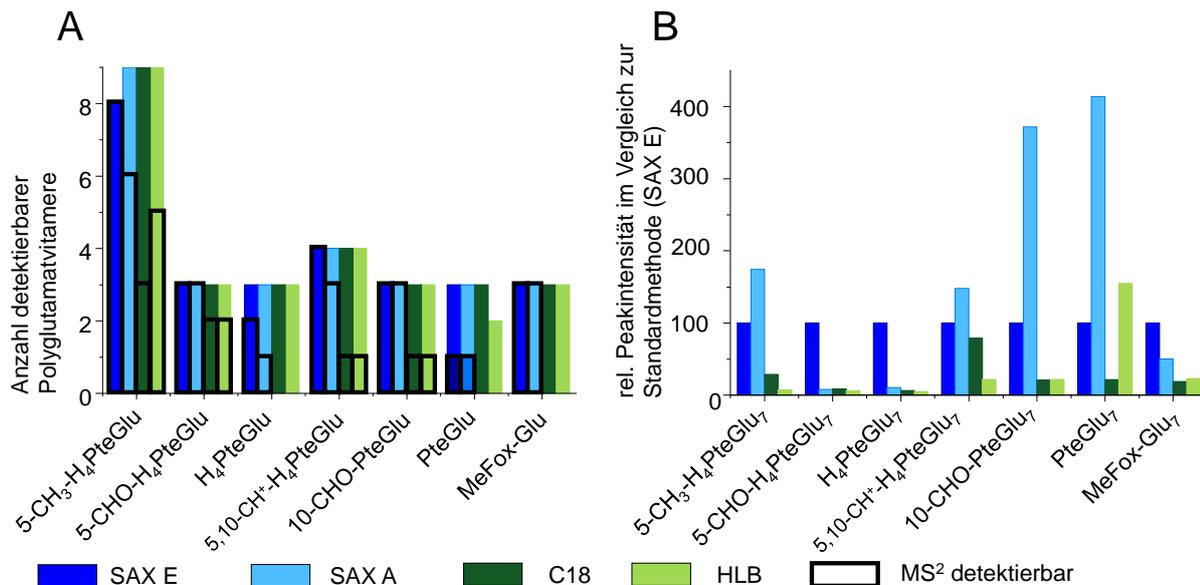


Abbildung 5.14 Mittels UHPLC-Q-ToF-MS identifizierbare Folatvitamere in Abhängigkeit des zur Aufreinigung verwendeten Festphasenmaterials. Darstellung nach Gmelch et al. [2020].

(A) Anzahl identifizierbarer Polyglutamate auf MS¹ Level (farbige Balken) sowie auf MS² Level (schwarze Umrandung).

(B) Relative Peakintensität der Heptaglutamate im Vergleich zur Aufreinigung mittels SAX-Kartuschen unter Verwendung von Elutionspuffer.

Abbildung 5.14.A zeigt die Anzahl identifizierbarer Polyglutamate, welche an Hand der zugehörigen Massenspektren im erwarteten Retentionszeitfenster zugeordnet werden konnten. Auffallend war die Tatsache, dass auf MS¹-Ebene kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Aufreinigungsmethoden verzeichnet werden konnten. Lediglich von den 5-CH₃-H₄folat Polyglutamaten konnten nur acht statt neun Vitamere detektiert werden bei Anwendung von Aufreinigungsmethode SAX E. Zudem waren bei der HLB-Methode lediglich drei statt vier PteGlu Polyglutamate detektierbar. Die Anzahl identifizierbarer Folatpolyglutamate aber, welche auf Basis von zugehörigen Fragmentspektren verifiziert werden konnten, variierte stark zwischen den einzelnen Kartuschaufreinigungen. Dies ist gekennzeichnet durch die schwarze Umrandung in Abbildung 5.14.B. Wurde auf eine alternative Kartuschaufreinigung unter Verwendung von C18- oder HLB-Kartuschen zurückgegriffen, konnte eine deutliche Reduktion der verifizierbaren Folatpolyglutamate beobachtet werden. Dies wird auch deutlich an Hand von Abbildung 5.14.B. Diese zeigt eine drastische Abnahme der Peakintensität der

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

Hauptpolyglutamate (Heptaglutamate) gemessen an der jeweiligen Peakintensität nach Aufreinigung mittels Methode SAX E. Die Mehrzahl der untersuchten Polyglutamatvitamere zeigte stark verringerte Peakintensitäten bei jeder der untersuchten alternativen Aufreinigungsmethoden. Eine Ausnahme bildete hierbei Methode SAX A, welche zum Teil höhere Peakintensitäten verzeichnete. Dies betraf allerdings größtenteils die metabolisch inaktiven Oxidationsprodukte, weshalb dies auf entsprechende Oxidationsreaktionen zurückgeführt werden könnte.

Diskussion des Vergleiches der extrahierten Folatmetabolite

Der Vergleich der extrahierten Folatmetabolite in Abhängigkeit der gewählten Festphasenaufreinigung zeigte, dass im Allgemeinen von einer deutlich verminderten Detektion beziehungsweise Extraktion der Folatpolyglutamate unter Verwendung der alternativen Aufreinigungsmethoden ausgegangen werden konnte. Folglich konnte von diesen geringer konzentrierten Vitaminen nur schwer ein Fragmentspektrum generiert werden. Somit stand diese Beobachtung in direktem Zusammenhang mit der verringerten Anzahl an zugehörigen Fragmentspektren bei den alternativen Aufreinigungsmethoden. Als Methode der Wahl für weitergehende Untersuchungen hatte sich auf Grund höchster Peakintensitäten also die Standardmethode SAX E bestätigt. Allerdings musste auf regelmäßige Reinigungsvorgänge der ESI-Quelle geachtet werden, um eine unnötige Kontamination des Massenspektrometers zu unterbinden. Eine Diskriminierung der Polyglutamate basierend auf der verwendeten Aufreinigungsmethode konnte nicht festgestellt werden. Analog zu den Untersuchungen mittels LC-MS/MS war die prozentuale Verteilung annähernd identisch zwischen den verschiedenen Aufreinigungsmethoden (vgl. Anhang 20). Entsprechend konnte auch hinsichtlich einer möglichen Diskriminierung der Polyglutamate auf die Aufreinigung mittels SAX-Kartuschen unter Verwendung von Elutionspuffer 2 zurückgegriffen werden.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

5.2.4 Anwendungen auf die Analyse von Folatmetaboliten als Funktion des zeitlichen Kultivierungsverlaufes

Die in Kapitel 4.2 hinsichtlich der Folatgehalte im Verlauf der Kultivierung analysierten Hefeprouben wurden zusätzlich nach Abschnitt 14.3 aufgearbeitet und mittels UHPLC-Q-ToF-MS untersucht. Dies ermöglichte tiefergehende Aussagen, als dies mittels LC-MS/MS möglich war. Neben den bereits bekannten Polyglutamatvitameren konnten somit zudem weitere Oxidationsprodukte wie beispielsweise 5-CH₃-H₂folat oder 10-CHO-H₂folat untersucht werden.

Die identifizierten Hauptvitamere waren sowohl bei den metabolisch aktiven Vitameren als auch deren inaktiven Oxidationsprodukten die Hexa- und Heptaglutamatform, wie in Anhang 21 sowie Anhang 22 veranschaulicht ist. Analog zu den Untersuchungen mittels LC-MS/MS (vgl. Kapitel 4.2.3) spielten die kürzerkettigen Polyglutamate lediglich eine untergeordnete Rolle und die Ergebnisse dieser Analysen konnten bestätigt werden. Im Folgenden soll daher nur auf die Hauptpolyglutamate mit sechs und sieben Glutaminsäureeinheiten detailliert eingegangen werden.

5.2.4.1 Untersuchung der Umwandlungsrate der identifizierten Polyglutamate

In Kapitel 4.2.3 hatte sich zudem gezeigt, dass im Verlauf der Kultivierung ein Wechsel des Hauptpolyglutamates zu verzeichnen war, welcher korrelierte mit dem Übergang des Hefewachstums in die stationäre Wachstumsphase. So stellte bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase das Hexaglutamat das Hauptvitamer dar, wohingegen dieses mit Beginn der stationären Phase zum Heptaglutamat verlagert wurde. Daraus konnte gefolgert werden, dass das Hexaglutamat eine hohe Bindungsaffinität zur FPGS unter gleichzeitiger Verringerung der Enzymaktivität aufweisen muss. Erst mit Abnahme des C₁-Metabolismus erfolgt sodann eine vermehrte Weitermetabolisierung zum Heptaglutamat. Um auch die mit Hilfe von UHPLC-Q-ToF-MS generierten Daten hinsichtlich der Umwandlungsrate der Polyglutamate zu untersuchen, wurde analog zu Kapitel 4.2.3 auch an Hand der UHPLC-Q-ToF-MS Daten das Verhältnis des Hexaglutamates gegenüber dem Heptaglutamatgehalt berechnet.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

Diskussion der Umwandlungsrate der identifizierten Polyglutamate

Wie Abbildung 5.15 zu entnehmen ist, zeigte sich ein analoger Wechsel des Hauptpolyglutamates sowohl für die metabolisch aktiven Vitamere (Abbildung 5.15.A) als auch für die oxidativen Abbauprodukte (Abbildung 5.15.B). Auch die Polyglutamate 5,10-CH₂-H₄PteGlu_n, 4-OH-5-CH₃-H₄PteGlu_n, 5-CH₃-H₂PteGlu_n, H₂PteGlu_n sowie 10-CHO-H₂PteGlu_n, welche mittels LC-MS/MS nicht erfasst werden konnten, zeigten somit eine identische Transformation des Hexaglutamates zum Heptaglutamat. Die mittels UHPLC-Q-ToF-MS analysierten, intermediären Zwischenstufen waren somit im selben Maße von dem Wechsel des Hauptpolyglutamates betroffen, wie die bereits mittels LC-MS/MS analysierten Vitamere. Auch diese Untersuchungen bestätigten somit die zuvor getätigte Annahme, dass FBPs eine besonders hohe Bindungskapazität bezüglich der Hexaglutamate aufweisen, wodurch aber gleichzeitig die Enzymaktivität drastisch reduziert wird. Da alle analysierbaren Vitamere im selben Maß von der Transformation betroffen waren, konnte zudem die Vermutung bestätigt werden, dass die Polyglutamylierung auf Ebene einer gemeinsamen Vorstufe stattfindet, welche anschließend in die verschiedenen Vitamerformen weiter metabolisiert wird. Im Allgemeinen wird angenommen, dass H₄folat diese gemeinsame Vorstufe darstellt. [Iwai et al. 1977]

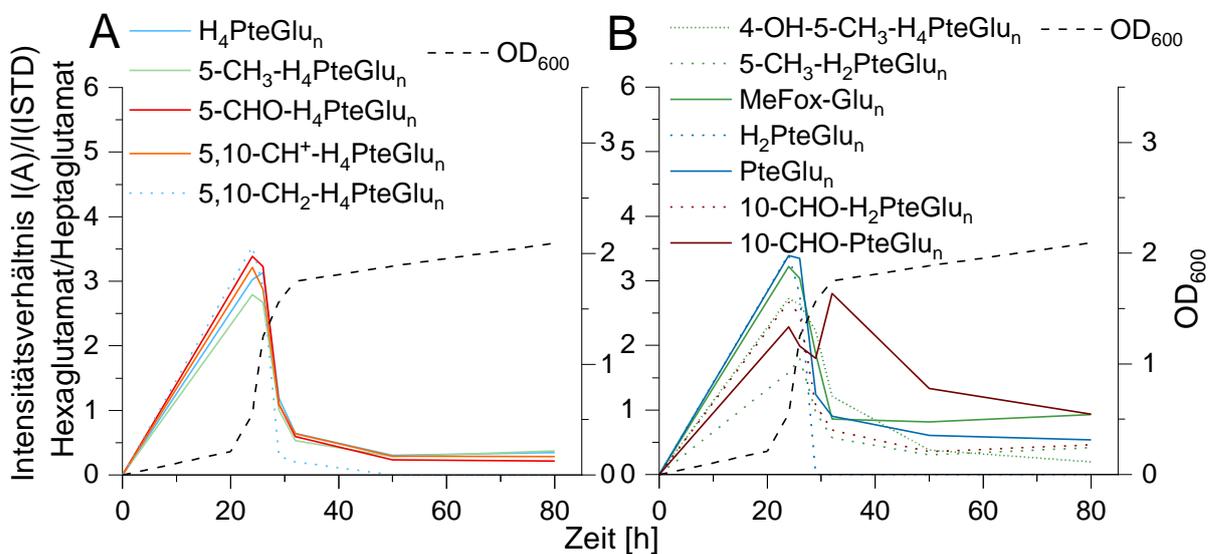


Abbildung 5.15 Verhältnis der Hexa- und Heptaglutamatformen der Polyglutamate in kultivierter TUM 68[®] nach Analyse mittels UHPLC-Q-ToF-MS gemessen am relativen Flächenverhältnis der Analyten zum internen Standard [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

5.2.4.2 Untersuchung von Oxidations- und Interkonversionsreaktionen der identifizierten Polyglutamate

Wie in Kapitel 2.1.2 bereits ausführlich erläutert wurde, sind für die metabolisch aktiven Folatvitamere eine Vielzahl von Interkonversions- und Oxidationsreaktionen bekannt. So oxidieren die Methyl-derivate zu 5-CH₃-H₂PteGlu_n, welches zum 4-OH-5-CH₃-H₄PteGlu_n sowie zu MeFox-Glu_n weiteroxidiert werden kann (Abbildung 2.5, [Gapski et al. 1971]). Die Formyl-derivate unterliegen einer Vielzahl von Interkonversions- und Oxidationsreaktionen je nach vorliegenden Bedingungen, welche in Abbildung 2.3 zusammenfassend dargestellt wurden. Bereits die quantitativen Untersuchungen in Kapitel 3.3.2 hatten den Einfluss des pH-Wertes während der Probenaufarbeitung als kritischen Faktor für die Interkonversionsreaktionen offenbart. Mit Hilfe der mittels UHPLC-Q-ToF-MS generierten Daten konnten nun zudem Oxidationsreaktionen im Verlauf der Hefekultivierung näher betrachtet werden durch Analyse aller daran beteiligter Vitamere 5-CHO-H₄PteGlu_n, 5,10-CH⁺-H₄PteGlu_n, 10-CHO-H₂PteGlu_n sowie 10-CHO-H₄PteGlu_n. [Baggott 2000; Jägerstad und Jastrebova 2013] Auf Seiten der unsubstituierten Vitamere ist eine Oxidation der relativ labilen H₄PteGlu_n Vitamere über H₂PteGlu_n zur stabilen PteGlu_n bekannt. [Blair und Pearson 1974] Zudem kann sich aus H₄PteGlu_n bei Anwesenheit von Formaldehyd (gebildet durch Oxidationsreaktionen bedingt durch die Anwesenheit von Ascorbinsäure im Extraktionsgemisch) 5,10-CH₂-H₄PteGlu_n bilden. [Wilson und Horne 1983; Brouwer et al. 2007] Die Verwendung von Thiolen im Extraktionspuffer allerdings soll diese Interkonversion durch Weiterreaktion des intermediär gebildeten Formaldehyds unterbinden. Demnach war davon auszugehen, dass die identifizierten 5,10-CH₂-H₄PteGlu_n Vitamere dem C₁-Metabolismus der untersuchten Hefen und nicht der Reaktion mit Formaldehyd entstammten.

Um die zu verzeichnenden Oxidationsreaktionen näher betrachten zu können, wurden Untersuchungen für die Methyl-, Formyl- sowie die unsubstituierten Vitamere angestellt. Zur Untersuchung der Oxidationsreaktionen wurde für die Methylvitamere der prozentuale Anteil des jeweiligen durch Oxidationsreaktionen entstandenen Polyglutamates im Vergleich zum metabolisch aktiven 5-CH₃-H₄PteGlu Polyglutamat berechnet. Die Formylvitamere wurden analog im Verhältnis zum metabolisch aktiven 5-CHO-H₄PteGlu Polyglutamat und die unsubstituierten Vitamere im Verhältnis zum H₄PteGlu Polyglutamat analysiert. Die prozentualen Anteile gemessen am metabolisch aktiven Vitamer sind zusammenfassend in Abbildung 5.16 für die Hexa- und Heptaglutamate dargestellt.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

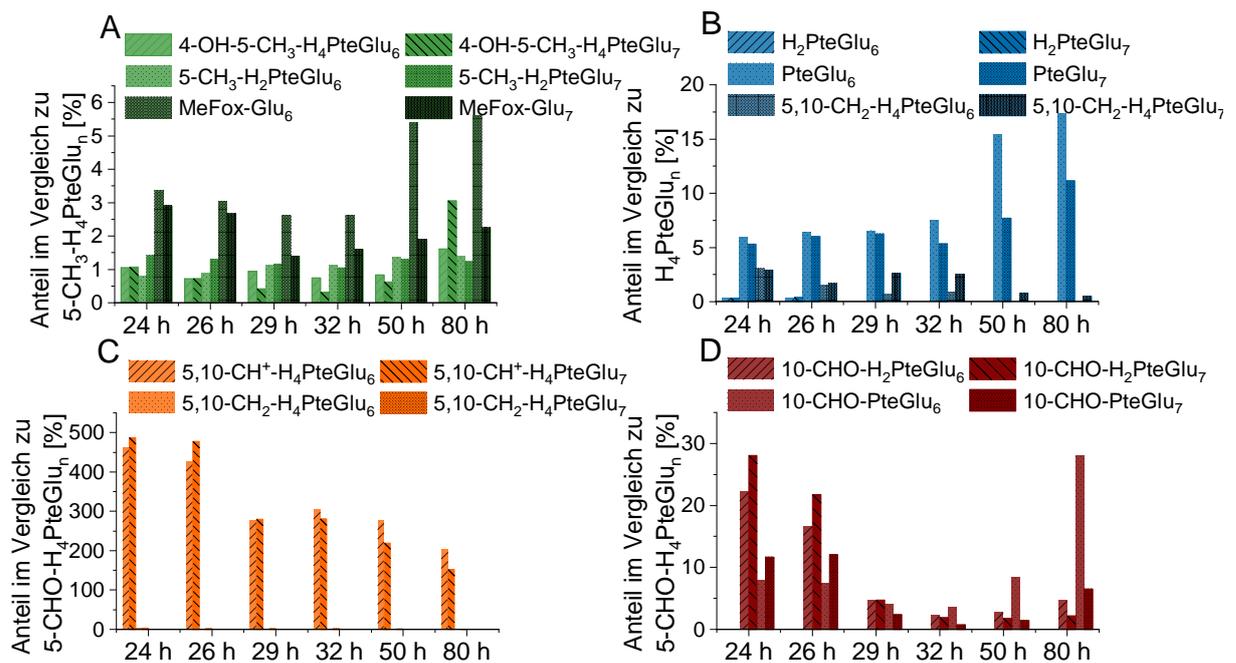


Abbildung 5.16 Anteil der Interkonversions- und Oxidationsvitamere gemessen am entsprechenden metabolisch aktiven Vitamer.

Die prozentualen Anteile der Methylvitamere (Abbildung 5.16.A) zeigten, dass die Oxidationsprodukte während des gesamten Kultivierungsverlaufes vermehrt in Form von MeFox vorlagen. 5-CH₃-H₂PteGlu_n sowie 4-OH-5-CH₃-H₄PteGlu_n schienen dagegen primär Intermediate darzustellen, die nur in geringen Mengen nachweisbar waren. Zudem konnte eine prozentuale Zunahme des Anteils der Oxidationsprodukte im Verhältnis zum 5-CH₃-H₄PteGlu_n mit Verlängerung der Kultivierungsdauer beobachtet werden.

Die prozentualen Anteile der Oxidations- und Interkonversionsprodukte der unsubstituierten Vitamere (Abbildung 5.16.B) zeigte, dass ebenfalls primär das stabile Oxidationsprodukt PteGlu_n gebildet wurde. Das Intermediat H₂PteGlu_n dagegen konnte nur während der frühen exponentiellen Wachstumsphase (bis zu 26 h Kultivierung) analysiert werden. Diese Beobachtung stand wiederum in Zusammenhang mit einer vermehrten Bildung der PteGlu_n gemessen am H₄PteGlu_n sowie generell verminderten H₄PteGlu_n Gehalten.

Die Formylvitamere zeigten, dass die aktiven Formylvitamere in großen Mengen in Form der 5,10-CH⁺-H₄PteGlu_n Vitamere analysiert wurden (vgl. Abbildung 5.16.C). 5,10-CH₂-H₄PteGlu_n dagegen konnte nur zu geringen Anteilen zwischen 1 % und 3 % identifiziert werden. Die Gehalte von 5,10-CH⁺-H₄PteGlu_n aber lagen zwischen Faktor 2 und 4,5 über dem Anteil von 5-CHO-H₄PteGlu_n. Im Gegensatz zur Entwicklung der 5-CHO-H₄folate zeigte die zeitliche Entwicklung der aufsummierten 5,10-CH⁺-H₄PteGlu₁₋₈ Vitamere zunächst sehr hohe Gehalte, welche im Verlauf der Hefekultivierung stetig abnahmen.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

Hinsichtlich der Oxidationsreaktionen der Formylvitamere zeigte die intermediäre Zwischenstufe 10-CHO-H₂PteGlu_n höhere Stabilität als die Intermediate bei den Methyl- und unsubstituierten Vitameren. Die zeitliche Entwicklung dieses Vitameres schien den Verlauf der 5,10-CH⁺-H₄PteGlu_n Vitamere widerzuspiegeln, wie in Abbildung 5.16.D zu sehen ist. Mit verlängerter Kultivierungszeit und konstanten 5-CHO-H₄folat Gehalten verschob sich sodann dieses Oxidationsprodukt zur stabilen 10-CHO-PteGlu_n.

Diskussion der untersuchten Oxidations- und Interkonversionsreaktionen der identifizierten Polyglutamate

Die quantitativen Untersuchungen der Hefekultivierung in Kapitel 4 hatten gezeigt, dass mit Beginn der stationären Wachstumsphase der Hefe eine deutliche Reduktion des Folatmetabolismus zu verzeichnen war. Der steigende Anteil an Oxidationsprodukten im Falle der Methylvitamere schien neben der verringerten metabolischen Aktivität zudem eine erhöhte Anfälligkeit für Oxidationsreaktionen zu offenbaren. Die Tatsache, dass die Methylvitamere nicht im selben Ausmaß wie während der exponentiellen Wachstumsphase weiter metabolisiert wurden, würde folglich ein vermehrtes Auftreten von Oxidationsreaktionen mit Beginn der stationären Wachstumsphase nach sich ziehen.

Analog zu den Methylvitameren konnte auch für die unsubstituierten Vitamere eine Zunahme der Oxidationsprodukte bei gleichzeitiger Abnahme der metabolisch aktiven Vitamere verzeichnet werden. Demnach konnte auch für diese Folatvitamere von einer verringerten Metabolisierung der aktiven Vitamere und somit einer erhöhten Oxidationsanfälligkeit ausgegangen werden.

Im Gegensatz zu Methylvitameren sowie unsubstituierten Vitameren waren für die Oxidations- und Interkonversionsprodukte der Formylvitamere sinkende Anteile im Vergleich zum 5-CHO-H₄folat analysierbar. Die intermediäre Zwischenstufe 10-CHO-H₂PteGlu_n zeigte zudem höhere Stabilität als die Intermediate bei den Methyl- und unsubstituierten Vitameren, verschob sich aber letztendlich analog zu den bereits diskutierten Vitameren im Verlauf der Hefekultivierung zur stabilen volloxydierten Form (10-CHO-PteGlu_n). Folglich konnte angenommen werden, dass die Oxidationsreaktionen der Formylvitamere langsamer von Statten gehen als bei den Methyl- und unsubstituierten Vitameren. Vermutlich war dies hauptsächlich den auftretenden Interkonversionsreaktionen zuzuschreiben, welche generell eine Analyse der Formylvitamere erschwerten.

5,10-CH₂-H₄PteGlu_n konnte nur in geringen Anteilen bestimmt werden. Dies war in Übereinstimmung mit der bereits beschriebenen Instabilität dieses Vitameres bei pH-Werten von pH < 8 [Brouwer et al. 2007], wie sie bei der Probenaufarbeitung durchwegs vorlagen.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

5,10-CH⁺-H₄PteGlu_n Vitamere dagegen waren in wesentlich höheren Anteilen als 5-CHO-H₄folate detektierbar. Unerwartet war hierbei die zeitliche Entwicklung dieses Vitameres im Vergleich zum 5-CHO-H₄PteGlu_n. In Kapitel 3.3.2 konnte eine Abhängigkeit des 5-CHO-H₄folat Gehaltes je nach verwendeter Probenaufreinigung festgestellt werden. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass mit Ansäuerung des Probenextraktes bevorzugt Interkonversion der Formylvitamere in die Form des 5,10-CH⁺-H₄folates zu verzeichnen war. Wird nun diese Beobachtungen auf die hier diskutierte Bestimmung der Polyglutamate im zeitlichen Hefekultivierungsverlauf übertragen, so müsste sich ein konstantes Verhältnis zwischen der Summe 5-CHO-H₄PteGlu₁₋₈ sowie der Summe 5,10-CH⁺-H₄PteGlu₁₋₈ im zeitlichen Verlauf der Kultivierung einstellen. Die zeitliche Entwicklung dieser aufsummierten 5,10-CH⁺-H₄PteGlu₁₋₈ Vitamere aber zeigte vielmehr sehr hohe Gehalte, welche im Verlauf der Hefekultivierung stetig abnahmen. Verdeutlicht wird dies in Anhang 23. Zudem wird dort der zeitliche Verlauf der aufsummierten 5-CHO-H₄PteGlu₁₋₈ Vitamere aufgezeigt. Dieser Verlauf war in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Quantifizierung nach enzymatischer Dekonjugation (vgl. Kapitel 4.2.1), bei welcher kein 5,10-CH⁺-H₄folat detektiert werden konnte. Beide Analysen (LC-MS/MS sowie UHPLC-Q-ToF-MS) zeigten eine zunächst ansteigende Entwicklung des 5-CHO-H₄folat Gehaltes, welcher mit Übergang in die stationäre Wachstumsphase abflachte. Demnach schien es vielmehr, als würde der Verlauf der 5,10-CH⁺-H₄PteGlu_n Polyglutamate nicht die Bildung aus den entsprechenden 5-CHO-H₄PteGlu_n Polyglutamaten abbilden, sondern den tatsächlichen Gehalt dieser Formylvitamere im Hefeorganismus. Die Tatsache, dass beide Aufarbeitungen (für die Messung mittels LC-MS/MS sowie mittels UHPLC-Q-ToF-MS) durchwegs bei einem pH-Wert von pH 5 durchgeführt wurden, bestätigt diese Annahme zusätzlich. Geringe Anteile der detektierten 5,10-CH⁺-H₄PteGlu_n könnten den azideren Bedingungen von 1 % Ameisensäure während der chromatographischen Trennung bei der Analyse mittels UHPLC-Q-ToF-MS zuzuschreiben sein im Vergleich zu 0,1 % Ameisensäure bei der Analyse mittels LC-MS/MS. Der Großteil allerdings schien auch während der Probenextraktion stabil zu sein.

5,10-CH⁺-H₄folat wird durch zwei verschiedene Reaktionswege im Organismus gebildet, sodass zwei Erklärungen für die hohen analysierten Gehalte denkbar sind. Wie bereits in Kapitel 2.3.2 erläutert, wird 5,10-CH⁺-H₄folat zum einen gebildet durch Reduktion von 10-CHO-H₄folat und zum anderen aus dem Katabolismus von Histidin und Purin über das intermediär gebildete 5-Formimino-H₄folat. Das gebildete 5,10-CH⁺-H₄folat wird sodann weiter metabolisiert zum 5,10-CH₂-H₄folat, als welches es zum einen an der Thymidylatsynthese und zum anderen nach Konversion zum 5-CH₃-H₄folat an der Remethylierung von Homocystein beteiligt ist. Bedingt durch das reduzierende Milieu im Cytoplasma von Hefezellen wird eine Konversion von 5,10-CH⁺-H₄folat zum 10-CHO-H₄folat nicht begünstigt. [Christensen und

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

MacKenzie 2006] Demnach schien vielmehr die Weiterreaktion zu 5,10-CH₂-H₄folat der limitierende Faktor zu sein und eine Akkumulation von 5,10-CH⁺-H₄folat im Organismus hervorzurufen. Über die zu Grunde liegenden Ursachen allerdings kann an dieser Stelle keine endgültige Aussage getroffen werden. Denkbare wäre beispielsweise eine unzureichende Enzymbindungskapazität von MTHFD und MTHFR, welche erst mit abnehmenden 5-CH₃-H₄folat Gehalten (bei längerer Kultivierung) erhöht wird.

Denkbar war allerdings auch eine deutlich erhöhte Response bei der Messung mittels UHPLC-Q-ToF-MS der bereits geladenen 5,10-CH⁺-H₄PteGlu_n Vitamere im Vergleich zu den ungeladenen 5-CHO-H₄PteGlu_n Vitameren. Die Verwendung von 1 % Ameisensäure in den Fließmitteln allerdings sollte ausreichend azides Milieu für die Protonierung der zuvor ungeladenen Polyglutamate zur Verfügung stellen.

5.3 Vergleichendes Fazit der beiden Methoden unter Einbezug der Analytik mittels LC-MS/MS

Die Methoden der (ultra-)hochauflösenden Massenspektrometrie versprachen eine tiefergehende Analyse der Folatmetaboliten in Hefen. Dazu wurden Methoden für die Analyse mittels FT-ICR-MS sowie mittels UHPLC-Q-ToF-MS entwickelt, welche nachfolgend miteinander verglichen werden sollen. Um die geeignetere der beiden Methoden für die Analyse der Folatmetaboliten zu identifizieren, sollen diese nachfolgend hinsichtlich verschiedener Aspekte vergleichend gegenübergestellt werden. Zudem sollen beide Methoden mit der *targeted* Analytik mittels LC-MS/MS verglichen werden.

5.3.1 Allgemeine Gegenüberstellung von FT-ICR-MS und UHPLC-Q-ToF-MS zur Analyse von Folatmetaboliten

Tabelle 5.2 gibt eine allgemeine Einschätzung der beiden Methoden unter Berücksichtigung verschiedener Parameter.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

Tabelle 5.2 Vergleichende Gegenüberstellung von FT-ICR-MS und UHPLC-Q-ToF-MS hinsichtlich verschiedener Parameter.

Parameter	FT-ICR-MS	UHPLC-Q-ToF-MS
Massengenauigkeit	1 ppm bis ca. m/z 500 - 600	10 ppm bis ca. m/z 1000
Massenauflösung	> 400.000	40.000 – 100.000
Sensitivität	Hoch	Vergleichsweise geringer
Messbarer Konzentrationsbereich	μM bis mM	μM bis mM
Einfluss von Matrixeffekten	Groß, da Direktinjektion	Relativ gering, da chromatographische Auftrennung vorgeschaltet
Beeinflussung der Metabolitenzusammensetzung der Probe	Klein, da Direktinjektion	Relativ groß, da chromatographische Auftrennung durch UHPLC vorgeschaltet
Kompatibilität mit Pufferlösungen	Keine	Bis zu gewissem Maße
Datenverarbeitung mehrfach geladener Spezies	Nicht in Workflows implementiert	Nicht in klassischen Workflows implementiert, Methoden des Proteomics Bereiches z.T. übertragbar
Möglichkeit der Fragmentierungsinformation	Nur für mit ± 1 Da isolierbare Peaks	3 Fragmentspektren pro Scan möglich
Identifizierung von Isomeren	Nein	Ja, wenn verschiedenes chemisch-physikalisches Verhalten
Mögliches erreichbares Identifizierungslevel	Level E	Level C

Mit Fokus auf die Folatmetaboliten können diese Parameter zu den nachfolgenden Vor- und Nachteilen einer jeden Methodik ausformuliert werden.

5.3.1.1 Vor- und Nachteile der Folatanalytik mittels FT-ICR-MS

- Die ultrahohe Auflösung ermöglicht eine extrem hohe Massengenauigkeit und damit beispielsweise eine Auftrennung des zweiten ^{13}C -Isotopes von $5,10\text{-CH}^+\text{-H}_4\text{PteGlu}_n$ und $5,10\text{-CH}_2\text{-H}_4\text{PteGlu}_n$ (vgl. Massenspektrum in Anhang 24).
- Messungen im negativen Ionisierungsmodus benötigen alkalisches Milieu zur ausreichenden Ionisierung der Folatmetaboliten, welches Interkonversionsreaktionen der Formylvitamere zu Gunsten des $10\text{-CHO-H}_4\text{PteGlu}_n$ verschiebt. Zugleich ist im alkalischen Milieu eine erhöhte Stabilität von $5,10\text{-CH}_2\text{-H}_4\text{PteGlu}_n$ gewährleistet.
- Direktinjektion begünstigt Matrixeffekte, was eine Probenaufreinigung mittels Festphasenextraktion notwendig macht.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

- Generell geringe Folatkonzentrationen im μM -Bereich machen eine Aufkonzentration mittels Festphasenextraktion unumgänglich.
- Direktinjektion erlaubt keine Kompatibilität mit der Verwendung von Pufferlösungen zur Festphasenaufreinigung, was der Verwendung weniger effektiver Aufreinigungsprotokolle (z.B. HLB-Kartuschen, vgl. dazu Kapitel 5.2.3) hinsichtlich der Folatextraktion bedarf.
- Direktinjektion erlaubt keine Unterscheidung zwischen Isomeren, welche aber bei den Folaten oftmals vorkommen. So haben beispielsweise $5\text{-CH}_3\text{-H}_4\text{PteGlu}_n$ und $5,10\text{-CH}_2\text{-H}_4\text{PteGlu}_n$ bzw. MeFox-Glu_n und $5\text{-CHO-H}_4\text{PteGlu}_n$ dieselbe molekulare Zusammensetzung.
- Hohe molare Massen der Hauptvitamere in Form von Polyglutamaten sind auf Grund sinkender Massengenauigkeit im hohen Molmassenbereich schwieriger zu verifizieren.
- Hohe molare Massen der Hauptvitamere in Form von Polyglutamaten ionisieren bevorzugt in mehrfach geladenem Zustand, welche mit Hilfe der Skripte zur klassischen Netzwerkanalyse im Zuge der Datenbereinigung eliminiert würden. Dies macht zunächst mehrfache Transformationsschritte zur Generierung theoretisch einfach geladener Spezies notwendig, was die Analyse aber auf messbare Isotopenpatterns beschränkt.
- Fragmentierungsinformationen zur Strukturaufklärung können nur für gut isolierbare Peaks und Peaks mit einer hohen Signalintensität generiert werden, was im Falle der Folatvitamere nicht gegeben ist.
- Geringere Sensitivität verglichen mit der LC-MS/MS erschwert die Identifizierung geringkonzentrierter Folatvitamere in Form kürzerkettiger Polyglutamate. Im Gegenzug ermöglicht der Fullscan die Erweiterung der Analytik auf alle in der Probe enthaltenen Metaboliten.

5.3.1.2 Vor- und Nachteile der Folatanalytik mittels UHPLC-Q-ToF-MS

- Die geringere Auflösung verglichen mit der FT-ICR-MS ermöglicht lediglich eine Massengenauigkeit von 10 ppm.
- Die vorgeschaltete chromatographische Auftrennung beeinflusst die Vitamerenverteilung beispielsweise durch Begünstigung von Interkonversionsreaktionen der Formylvitamere.
- Die vorgeschaltete chromatographische Auftrennung reduziert Matrixeffekte durch Auftrennung der Matrixeinträge und Abtrennung früh eluierender Matrixbestandteile.
- Generell geringe Folatkonzentrationen im μM -Bereich machen eine Aufkonzentration mittels Festphasenextraktion unumgänglich.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

- Die vorgeschaltene chromatographische Auftrennung ermöglicht bis zu einem gewissen Maße eine Kompatibilität mit der Verwendung von Pufferlösungen und damit den Einsatz der effektivsten Festphasenaufreinigung (SAX-Kartuschen, vgl. dazu Kapitel 5.2.3) hinsichtlich der Folatextraktion.
- Die vorgeschaltene chromatographische Auftrennung ermöglicht die Auftrennung von isomeren Metaboliten. Die Retentionszeit ermöglicht zudem Rückschlüsse über generelle Struktureigenschaften der Metaboliten.
- Generierbare Fragmentierungsspektren erzeugen weitere Strukturinformationen. Die Anpassung der Fragmentierungsliste ermöglicht auch Fragmentspektren schwächer ionisierender Metaboliten.
- Generierte Fragmentierungsspektren ermöglichen einen Datenbankabgleich zur Aufklärung der molekularen Struktur, in welchen die Folatvitamere aber größtenteils nicht gelistet sind.
- Hohe molare Massen der Hauptvitamere in Form von Polyglutamaten ionisieren bevorzugt in mehrfach geladenem Zustand, welche in Datenbanken und Auswerteskripten kaum berücksichtigt werden. Die Übertragung von Erkenntnissen aus dem Proteomik-Bereich allerdings schafft Möglichkeiten der Datenauswertung.
- Geringere Sensitivität verglichen mit der LC-MS/MS erschwert die Identifizierung geringkonzentrierter Folatvitamere in Form kürzerkettiger Polyglutamate. Im Gegenzug ermöglicht der Fullscan die Erweiterung der Analytik auf alle in der Probe enthaltenen Metaboliten. Eine Optimierung auf jeden Analyten von Interesse und damit die Notwendigkeit des Vorhandenseins der Referenzverbindung entfällt.

5.3.1.3 Vergleichende Diskussion der Folatanalytik mittels FT-ICR-MS sowie UHPLC-Q-ToF-MS

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das FT-ICR-MS vor allem durch die extrem hohe Auflösung, Massengenauigkeit und die relativ zum UHPLC-Q-ToF-MS gesehene höhere Sensitivität besticht. Die Ultrahochauflösung beispielsweise ermöglicht eine Auftrennung des zweiten ^{13}C -Isotopenpeaks von $5,10\text{-CH}^+\text{-H}_4\text{PteGlu}_6$ (m/z 550,18050) und $5,10\text{-CH}_2\text{-H}_4\text{PteGlu}_6$ (m/z 550,18470), welche bei der UHPLC-Q-ToF-MS nur schwer aufgetrennt würden. Zudem ist bei der FT-ICR-MS die Beeinflussung der Metabolitenzusammensetzung in der Probe recht gering durch die Probeninjektion in Form von Direktinjektion, was allerdings zeitgleich den Einfluss von Matrixeffekten erhöht.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

Die vergleichsweise schlechtere Auflösung, Massengenauigkeit und Sensitivität bei der UHPLC-Q-ToF-MS dagegen wird kompensiert durch geringere Matrixeffekte bedingt durch die vorgeschaltete chromatographische Auftrennung. Diese allerdings kann eine Beeinflussung der Metabolitenzusammensetzung der Probe verursachen. Bis zu einem gewissen Maße aber ermöglicht diese die Kompatibilität mit Pufferlösungen, was im Folatbereich die Verwendung von ionenbasierten Festphasenmaterialien zur Probenaufreinigung (SAX) zulässt.

Hinsichtlich der Datenverarbeitung liegt bei beiden Methoden bei den klassischen Auswerteskripten der Fokus auf einfach geladenen Spezies. Bei der FT-ICR-MS werden mehrfach geladene Spezies sogar im Zuge der Datenbereinigung eliminiert. Dies bedeutet einen erhöhten Mehraufwand, sollen die mehrfach geladenen Spezies dennoch berücksichtigt werden. Zudem können für die Auswertung der Mehrfachladungen lediglich die Spezies einbezogen werden, welche ein Isotopenpattern aufweisen und somit die Mehrfachladung der Spezies belegen. Dies beschränkt die Analytik allerdings auf stärker ionisierende Metaboliten. Metaboliten geringer Intensität – wie es vor allem für die gering konzentrierten, kürzerkettigen Polyglutamate zu erwarten ist – werden davon weiterhin nicht erfasst. Im Bereich der UHPLC-Q-ToF-MS dagegen sind Erkenntnisse des Proteomik Bereiches zum Teil übertragbar für die Auswertung mehrfach geladener Spezies.

Für die Identifizierung werden bei der FT-ICR-MS die ultrahochauflösten m/z herangezogen, welche bis zu einer Höhe von m/z 500 – 600 eine Annotation der Summenformel zulässt. Mit zunehmendem Masse-zu-Ladungsverhältnis steigt die Massengenauigkeit, weshalb die Annotation vorwiegend auf diesen Bereich beschränkt ist. Mittels FT-ICR-MS kann somit eine Identifizierung auf Level E erfolgen. Bedingt durch die hohen Molekularmassen der Folat Polyglutamate allerdings überschreiten diese den Bereich von m/z 500 – 600 und/oder liegen als mehrfach geladenen Spezies vor. Die Identifizierung bei der UHPLC-Q-ToF-MS erfolgt an Hand verschiedener Parameter wie Retentionszeit, hochauflöstem m/z sowie dem zugehörigen MS/MS Spektrum. Letzteres ermöglicht einen Abgleich mit verschiedenen Datenbanken und erlaubt somit eine Identifizierung der Metaboliten auf Level C. Ein Datenbankabgleich der experimentellen UHPLC-Q-ToF-MS Daten mit Fokus auf die Folate ist mangels implementierter Referenzverbindungen sowohl im einfach als auch im mehrfach geladenen Zustand nicht möglich. Auf Grund des spezifischen Fragmentierungsverhaltens der Folate, welches bereits durch die Monoglutamatreferenzen bekannt ist, sind dennoch Rückschlüsse auf die entsprechenden Polyglutamate möglich.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

5.3.2 Vergleichende Gegenüberstellung verschiedener MS-Methoden zur Analyse von Folatmetaboliten in Hefen

Wie im vorangehenden Abschnitt detailliert beleuchtet wurde, besitzen sowohl die Analyse mittels FT-ICR-MS als auch mittels UHPLC-Q-ToF-MS einige Vor- und Nachteile, was eine Verwendung zur Analyse der Folatmetaboliten in Hefen rechtfertigte. An Hand der in den vorangehenden Kapiteln 5.1.3 sowie 5.2.4 identifizierten Folatvitamere in der kultivierten TUM 68[®] nach Aufreinigung mittels HLB-Kartuschen (vgl. hierzu Kapitel 14.2) sollen diese Vor- und Nachteile mit Fokus auf die Folatmetaboliten näher betrachtet werden. Zusätzlich soll ein Vergleich gezogen werden zu den Ergebnissen der *targeted* Analytik mittels LC-MS/MS (vgl. hierzu Kapitel 4.2.3).

5.3.2.1 Untersuchung der generellen Metabolitenzusammensetzung der Folate in Abhängigkeit der verwendeten Messmethodik LC-MS/MS, FT-ICR-MS sowie UHPLC-Q-ToF-MS

Um die generelle Zusammensetzung der Folatvitamere in Abhängigkeit der verwendeten Messmethodik zu untersuchen, wurde dieselbe kultivierte TUM 68[®] Hefeprobe sowohl mittels LC-MS/MS, als auch FT-ICR-MS sowie UHPLC-Q-ToF-MS analysiert. Die Peakflächen der identifizierten Methyl-, Formyl- und der unsubstituierten Folatvitamere wurden sodann für jede Messmethodik addiert und ins Verhältnis zur gesamten Summe aller Peakflächen gesetzt. Eine Normierung der Peakflächen konnte nicht vorgenommen werden, da bei der Analyse mittels FT-ICR-MS ohne die Zugabe von internem Standard gearbeitet wurde, um die Metabolitenzusammensetzung durch mögliche Verunreinigungen des Standards nicht zu verfälschen.

Abbildung 5.17 zeigt den Vergleich der relativen Anteile der Folatvitamere in Abhängigkeit der Substitutionsart und der gewählten Messmethodik. Auffallend war die vergleichsweise konstante Detektion der unsubstituierten Vitamere mit Anteilen zwischen 5 und 10 % an den insgesamt identifizierten Folatvitameren für alle drei Messmethoden. Methyl- und Formylvitamere wurden relativ ausgeglichen detektiert mit Hilfe von FT-ICR-MS. Dagegen zeigten die Methylvitamere mittels LC-MS/MS und die Formylvitamere mittels UHPLC-Q-ToF-MS mit jeweils etwa 70 % deutlich höhere Signalintensitäten im Vergleich zu den übrigen Vitameren.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

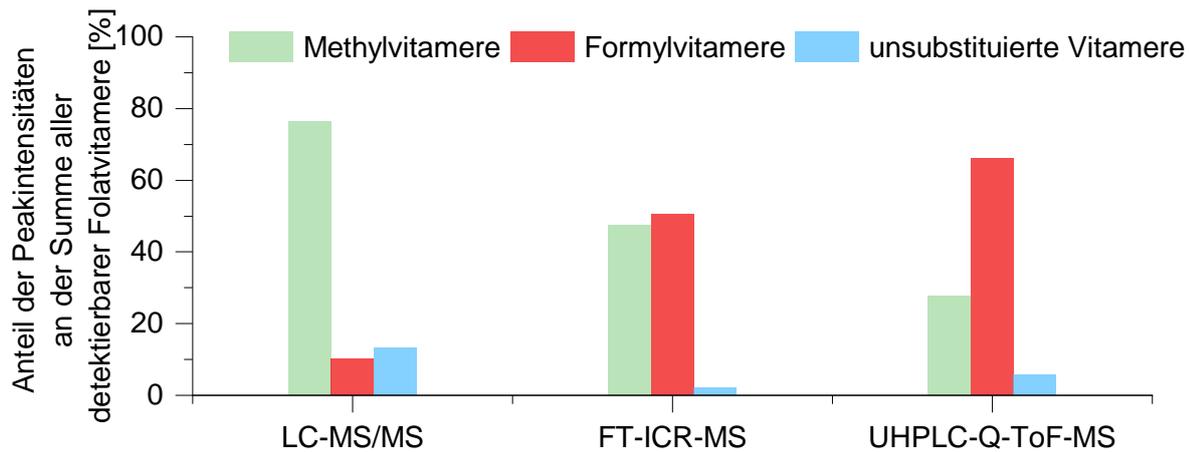


Abbildung 5.17 Relative Zusammensetzung der Folatvitamere in TUM 68® in Abhängigkeit der Substitutionsart und der gewählten Messmethodik.

Diskussion der Zusammensetzung der Folatmetabolite in Abhängigkeit der gewählten Analysemethoden

Der Vorteil der Analyse mittels FT-ICR-MS liegt unter anderem an der relativ geringen Beeinflussung der Metabolitenzusammensetzung einer Probe durch Direktinjektion der Probe in die ESI-Quelle. Bei der Analyse mittels UHPLC-Q-ToF-MS dagegen ist eine säulenchromatographische Trennung vorgeschaltet, welche diese Metabolitenzusammensetzung durchaus beeinflussen kann. Hinsichtlich der Folate ist vor allem für die Formylvitamere eine Verschiebung der Vitamerezusammensetzung bekannt. [Jastrebova et al. 2013] Allerdings sollte keine Verschiebung der Substitution in Form von Methyl- zu Formylgruppen und umgekehrt zu beobachten sein.

Der Vergleich der Analysemethoden zeigte, dass mit Hilfe von FT-ICR-MS von der ausgeglichensten Ionisierung der Folatvitamere in Abhängigkeit derer Substitution ausgegangen werden konnte. Dagegen konnten mittels LC-MS/MS vermehrt Methylvitamere, mittels UHPLC-Q-ToF-MS dagegen vermehrt Formylvitamere identifiziert werden. Es war zu vermuten, dass diese enorme Differenz mitunter auf mangelnde Optimierung der LC-MS/MS Methode auf die übrigen Folatvitamere zurückzuführen war. Letztere Methode wurde mangels weiterer Referenzverbindungen lediglich für die $5\text{-CH}_3\text{-H}_4\text{PteGlu}_n$ Vitamere optimiert, welche den Hauptanteil der Methylvitamere ausmachen. Die hohe Signalintensität der Formylvitamere der UHPLC-Q-ToF-MS Untersuchungen dagegen wurden hauptsächlich durch die hohen $5,10\text{-CH}^+\text{-H}_4\text{PteGlu}_n$ Gehalte beeinflusst. Wie bereits im vorangehenden Kapitel 5.2.4 diskutiert, könnte die bereits im Molekül vorhandene positive Ladung eine Ionisierung im positiven ESI-Modus begünstigen. Inwieweit die Unterschiede der Ionisierung die tatsächliche Verteilung im Hefeorganismus widerspiegeln, konnte allerdings ohne eine Möglichkeit der

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

Quantifizierung (durch mangelnde Referenzverbindungen) letztlich nicht abschließend geklärt werden.

5.3.2.2 Vergleich der identifizierbaren Folatvitamere in Abhängigkeit der verwendeten Messmethodik

Für die Wahl der geeigneten Messmethodik zur tiefergehenden Analyse der Folatmetaboliten in Hefen war letztendlich vor allem die möglichst vollständige Identifizierung aller in der Hefeprobe enthaltenen Folatmetaboliten von Bedeutung. Dazu wurde die bereits im vorangehenden Abschnitt untersuchte Hefeprobe herangezogen. Für alle bekannten und analysierbaren Vitamergruppen wurde letztlich die Zahl identifizierbarer Polyglutamate ermittelt und im Verhältnis zu den anderen Messmethoden gestellt. Für die Analyse mittels LC-MS/MS wurde eine Identifizierung angenommen, sobald die Peakintensität einen Wert von 1.000 überschritt, was in etwa einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3 entsprach. Für die Analyse mittels FT-ICR-MS wurden die in Kapitel 5.1.3 erläuterten Identifizierungsparameter gewählt. Eine Identifizierung mittels UHPLC-Q-ToF-MS wurde als valide betrachtet, wenn diese mit Hilfe eines generierten MS/MS-Spektrums bestätigt werden konnte.

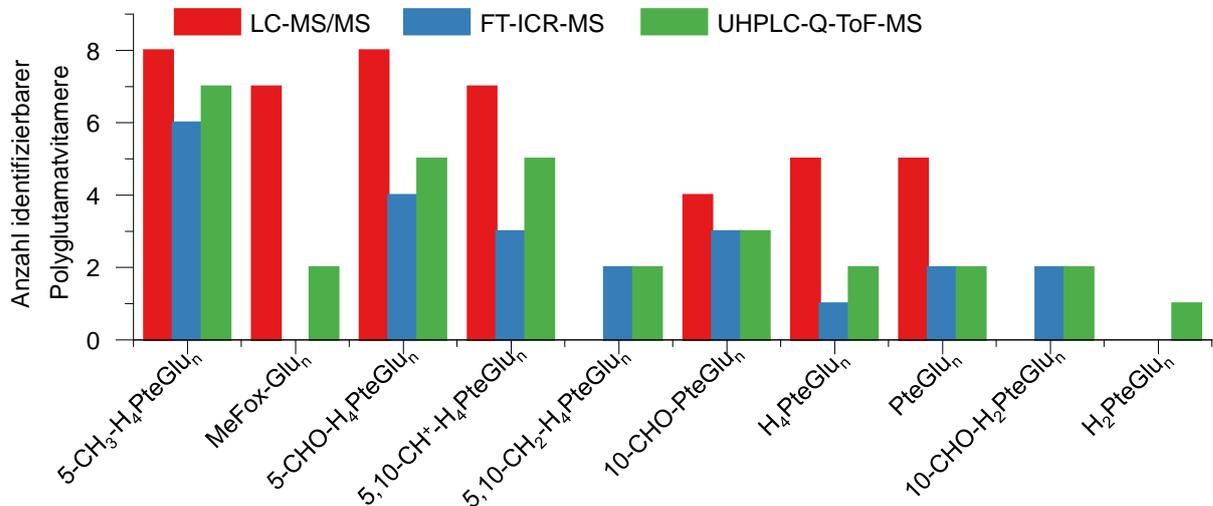


Abbildung 5.18 Anzahl der identifizierbaren Folatpolyglutamate in kultivierter TUM 68® in Abhängigkeit der gewählten Messmethodik.

5. Anwendung der Erkenntnisse auf Untersuchungen der Folatmetaboliten in Hefen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie

Diskussion der identifizierten Folatvitamere in Abhängigkeit der gewählten Messmethodik

Abbildung 5.18 zeigt den Vergleich der drei Messmethoden. Anhang 25 zeigt die Details aller identifizierten Metaboliten dargestellt an Hand der Biosynthese von Folaten in Hefen. Für alle bekannten metabolisch aktiven sowie den Hauptvertretern der Oxidationsprodukte konnten mittels LC-MS/MS die meisten Folatvitamere identifiziert werden. Auch die in geringen Mengen in der Hefe vorhandenen Polyglutamate konnten somit identifiziert werden, wie in Anhang 25 veranschaulicht wird. Diese Ergebnisse bestätigen die generell hohe Empfindlichkeit der Messung mittels Triple-Quadrupol, welche spezifisch nur die Massenübergänge von Interesse analysiert. Dadurch kann im Vergleich zu Fullscan-Methoden eine deutliche Steigerung der Sensitivität erreicht werden. Allerdings ist die Analyse nur auf die in der Messmethode hinterlegten Metaboliten beschränkt. Die Verwendung von Fullscan-Methoden in Form von FT-ICR-MS sowie UHPLC-Q-ToF-MS dagegen ermöglicht auch die Analyse weiterer, in der gemessenen Probe enthaltener Metaboliten, allerdings unter Einbußen der Empfindlichkeit. [Gross 2013] Im hier aufgezeigten Vergleich konnten mittels FT-ICR-MS um 25 % weniger Folatvitamere identifiziert werden als mittels UHPLC-Q-ToF-MS. Daher wäre für eine möglichst ganzheitliche Analyse der Folatmetaboliten letztere Methodik zu bevorzugen.

Letztendlich fiel die Wahl der Methodik auf die UHPLC-Q-ToF-MS bedingt durch die höhere Anzahl an identifizierbaren Folatvitameren. Die vorgeschaltete säulenchromatographische Auftrennung musste zwar eine Beeinflussung der Vitamerenzusammensetzung durch Begünstigung von Interkonversionsreaktionen annehmen lassen. Allerdings bot diese den enormen Vorteil der Auftrennung von isomeren Metaboliten und ermöglichte durch die Retentionszeitinformation Rückschlüsse auf die generelle molekulare Struktur. Die Tatsache, dass eine Generierung von Fragmentierungsspektren möglich war, bot im Folatbereich vielversprechende Möglichkeiten der Identifizierung durch Vergleich mit Fragmentspektren der kommerziell erhältlichen Monoglutamatstandards. Zudem wurde die Beeinträchtigung der Datenauswertung bedingt durch die Mehrfachladung der Polyglutamate im Falle der UHPLC-Q-ToF-MS als weniger gravierend eingeschätzt. Vielmehr überzeugte die Tatsache, dass alle Polyglutamate einer Vitamerengruppe identische Fragmente zeigten (vgl. Abbildung 5.10). Dies bot die Möglichkeit, dieses identische Fragmentierungsverhalten zur tieferehenden Analyse der Folatmetaboliten heranzuziehen, was im nachfolgenden Kapitel näher an Hand der kultivierten TUM 68[®] Hefen untersucht wird.

6 Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

Ziel der Arbeit war es, tiefere Informationen über den Metabolismus der Folate in Hefen zu erlangen. Deshalb werden im nachfolgenden die Proben der Hefekultivierungsreihe der Brauhefe TUM 68[®] hinsichtlich folatähnlicher Verbindungen untersucht. Dazu wurde das Verfahren des „Metabolic Networking“ gewählt. Im Zuge dieses Verfahrens wird nach Gemeinsamkeiten innerhalb der experimentell generierten Fragmentierungsspektren der gemessenen Proben gesucht. Basierend auf Übereinstimmungen im Fragmentierungsverhalten der verschiedenen Vorläuferionen wird ein Netzwerk erstellt. Dieses beinhaltet diejenigen Spezies, welche eine Ähnlichkeit im Fragmentierungsmuster oberhalb eines gewählten Grenzwertes zum Messen dieser Ähnlichkeit zeigen. [Yang et al. 2013; Wang et al. 2016] Innerhalb der generierten Netzwerke wurden Identifizierungsversuche derjenigen Spezies unternommen, welche folatähnliches Verhalten zeigten. Dazu wurden diese mit dem chemisch-physikalischen Verhalten von synthetisierten Monoglutamat Referenzverbindungen mittels LC-MS/MS sowie UHPLC-Q-ToF-MS verglichen.

6.1 Anwendung der Plattform GNPS

Die unter Kapitel 5.2.4 hinsichtlich der bereits bekannten Folatverbindungen untersuchte kultivierte TUM 68[®] wurde für die tiefere Analyse mittels Metabolic Networking herangezogen. Für jeden Kultivierungszeitpunkt wurden unabhängige Metabolitennetzwerke erstellt, sodass letztlich sechs solcher Netzwerke generiert wurden, welche die folatrelevanten Metaboliten enthielten. Zum Erstellen der Metabolitennetzwerke wurde die Plattform GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) verwendet. Die gewählten Parameter finden sich unter Kapitel 14.3. Wie bereits in Kapitel 2.6.5 erläutert, repräsentieren die Verknüpfungspunkte innerhalb des Netzwerkes ein Vorläuferion, wohingegen die Verbindungen eine Ähnlichkeit im Fragmentierungsmuster darstellen. Die Breite der Verbindungen gibt die Signifikanz der Ähnlichkeit wieder. Mit anderen Worten, je größer die Signifikanz, desto breiter wird die Verbindungslinie dargestellt. Verschiedene Addukte eines Metaboliten – beispielsweise doppelt und dreifach geladene Ionen – werden als voneinander unabhängige Verknüpfungspunkte abgebildet.

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

6.1.1 Prozessierung der Metabolitennetzwerke

Zwar wurden zur Erstellung der Metabolitennetzwerke bereits einige Filterungskriterien gesetzt, dennoch mussten die mittels GNPS generierten Metabolitennetzwerke für die weitere Analyse vor- und weiterprozessiert werden.

6.1.1.1 Generierung und weitergehende Prozessierung der Metabolitennetzwerke

Zunächst wurde für jeden untersuchten Kultivierungszeitpunkt das jeweilige Netzwerk extrahiert, welches die folatrelevanten Metaboliten enthielt. Dieses wurde an Hand des sich darin befindenden Hauptmetaboliten 5-CH₃-H₄PteGlu₆ identifiziert. Abbildung 6.1 veranschaulicht die schrittweise Prozessierung der Metabolitennetzwerke an Hand der gemessenen Proben nach 26 h Kultivierung. Zunächst wurde das folatrelevante Metabolitennetzwerk (Abbildung 6.1.A) eingeschränkt auf den folatrelevanten Retentionszeitbereich von 3,0 min bis 4,0 min. Dieser war bekannt durch die vermessenen Folatstandards (vgl. Kapitel 5.2.3). Zudem wurden nur diejenigen Verknüpfungspunkte im Netzwerk behalten, welche Vorläuferionen repräsentierten, die in mindestens 50 % der untersuchten Spektren innerhalb eines Kultivierungszeitpunktes ermittelt werden konnten (blau hervorgehobene Spezies in Abbildung 6.1.B). Nur so konnte eine ausreichende Validität der Verknüpfungspunkte sichergestellt werden.

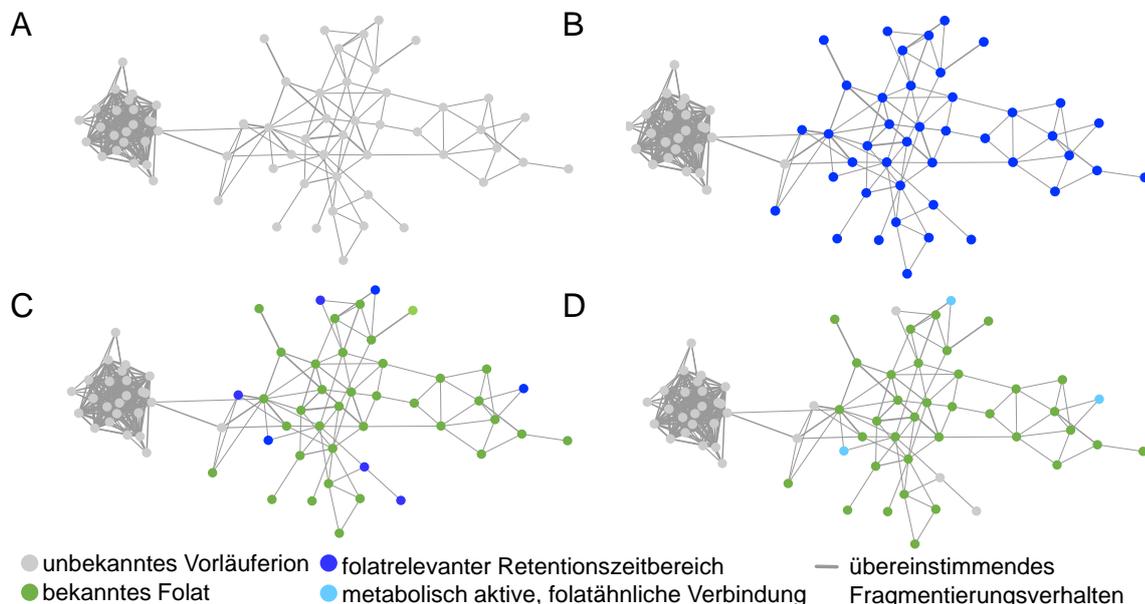


Abbildung 6.1 Prozessierung der folatrelevanten Metabolitennetzwerke generiert mit Hilfe der Plattform GNPS an Hand der Hefeproben nach 26 h Kultivierungszeit.

(A) Rohspektrum.

(B) Selektion der Metaboliten im folatrelevanten Retentionszeitbereich.

(C) Identifizierung der bereits bekannten Folatverbindungen.

(D) Identifizierung metabolisch aktiver, folatähnlicher Verbindungen.

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

Innerhalb dieses eingegrenzten Netzwerkes erfolgte sodann ein Abgleich mit bereits bekannten Folatmetaboliten (Abbildung 6.1.C). Auf diese Art und Weise konnten für alle Kultivierungszeitpunkte mindestens 60 % der Verknüpfungspunkte bereits bekannten Folatverbindungen zugewiesen werden – hauptsächlich in Form der Hauptmetaboliten (vgl. Kapitel 5.2.4) der Hexa-, Hepta- und Oktaglutamate. Tabelle 6.1 gibt einen Überblick über die Anzahl der clusternden Verknüpfungspunkte für jeden untersuchten Kultivierungszeitpunkt sowie deren Reduktion durch weitere Prozessierung.

Tabelle 6.1 Anzahl der innerhalb der GNPS-Metabolitennetzwerke clusternden Verbindungen und deren Eingrenzung auf den folatrelevanten Kontext.

Anzahl der Verknüpfungspunkte	Kultivierungszeitpunkt [h]					
	24	26	29	32	50	80
insgesamt	57	67	98	47	43	51
innerhalb des folatrelevanten Retentionszeitbereiches	41	42	50	45	40	47
bekannte Folatvitamere	35	37	35	29	30	28
bekannte Folatvitamere [%]	85,4	88,1	70,0	64,4	75,0	59,6
metabolisch aktive, folatähnliche Verbindungen	4	5	8	9	8	10

6.1.1.2 Herausarbeiten folatähnlicher Spezies durch den Vergleich zwischen den Metabolitennetzwerken

Innerhalb der verbleibenden 12 – 40 % an unbekanntem Spezies wurde weiter basierend auf metabolischer Signifikanz und folatähnlichem Verhalten selektiert. Dazu wurden nur diejenigen Spezies in den Netzwerken behalten, deren Vorläuferionen zu mindestens vier der untersuchten sechs Kultivierungszeitpunkten als Signale oberhalb der Signalintensität des Grundrauschens (entspricht einer Signalintensität von 1.000) nachgewiesen werden konnten. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die selektierten Spezies Relevanz zeigten für den Großteil des Hefekultivierungsverlaufes und es sich nicht um zufällig generierte Fragmentierungsartefakte bereits bekannter Folatvitamere handelte. Letztlich konnten somit drei Metabolitenklassen bestehend aus jeweils zwei Spezies identifiziert werden (Abbildung 6.1.D, Tabelle 6.2). Anhang 26 zeigt dazu die für die verschiedenen Kultivierungszeitlängen generierten Metabolitennetzwerke und deren Weiterprozessierung unter Hervorhebung der drei Metabolitenklassen. Indiz für folatähnliches Verhalten dieser selektierten Metabolitenklassen stellte die Tatsache dar, dass die Differenz von 64,52 Da zwischen den beiden zweifach geladenen Spe-

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

zies innerhalb einer Metabolitenklasse jeweils der zusätzlichen Einführung einer Glutaminsäureeinheit unter Berücksichtigung der Zweifachladung der Vorläuferionen entsprach. Die experimentell ermittelten Masse-zu-Ladungsverhältnisse legten die Vermutung nahe, dass es sich bei den selektierten Metabolitenklassen jeweils um das entsprechende Hexa- und Heptaglutamatvitamer handelte. Zur Bestätigung dieser Vermutung wurden die Fragmentierungsspektren betrachtet. Diese zeigten einen Neutralverlust von sechs beziehungsweise sieben Glutaminsäureeinheiten, womit diese Vermutung bestätigt werden konnte. Zur Veranschaulichung werden die identifizierten Metabolitenklassen mit dem jeweiligen Hexa- und Heptaglutamat als deren extrahierte Chromatogrammspuren (EIC, Extracted Ion Chromatogram) in Anhang 27.A gezeigt. Anhang 27.B demonstriert stellvertretend den schrittweisen Neutralverlust einer Glutaminsäureeinheit.

Tabelle 6.2 Masse-zu-Ladungsverhältnisse der sich metabolisch aktiv verhaltenden Metabolitenklassen mit folatähnlichem Fragmentierungsverhalten in den untersuchten Hefeprouben.

	<i>m/z Vorläufer 1</i>	<i>m/z Vorläufer 2</i>
Metabolitenklasse 1	558,1993	622,7205
Metabolitenklasse 2	567,2045	631,7258
Metabolitenklasse 3	589,7153	654,2365

Folatähnliches Verhalten wurde analog zu den bereits bekannten Folatverbindungen in Kapitel 5.2.4 definiert an Hand des Verhältnisses des Analyten zum zugesetzten internen Standard A(A)/A(ISTD) im Verlauf der Kultivierung. Anhang 28 zeigt, dass zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase mit Ausnahme der Metabolitenklasse 1 alle Verbindungen bevorzugt in Form des Hexaglutamates vorlagen. Alle drei Metabolitenklassen zeigten sodann deutliche Zunahmen in deren Gehalten mit Durchlaufen der exponentiellen Wachstumsphase, wie dies auch bei den Folatvitameren festgestellt werden konnte (vgl. hierzu Kapitel 5.2.4). Die Metabolitenklassen 2 und 3 (Anhang 28.B und Anhang 28.C) verhielten sich auch dahingehend folatähnlich, als dass sie mit Übergang in die stationäre Wachstumsphase wiederum verringerte Gehalte verzeichneten. Lediglich Metabolitenklasse 1 stellte diesbezüglich eine Ausnahme dar, da sowohl das Hexa- als auch das Heptaglutamat im Verlauf der Hefekultivierung kontinuierlich ihren Gehalt steigerten. Dieses Verhalten entsprach vielmehr demjenigen, welches bei den quantitativen Untersuchungen zuvor für die Formylvitamere beobachtet wurde (Abbildung 4.3 sowie Anhang 20).

Diskussion der herausgearbeiteten, folatähnlichen Spezies

An Hand von metabolischer Relevanz im zeitlichen Verlauf der Hefekultivierung und folatähnlichem Retentionsverhalten konnten innerhalb der untersuchten Metabolitennetzwerke drei Metabolitenklassen als jeweils in der Hexa- und Heptaglutamatform vorkommend herausgearbeitet werden. Für diese hatte sich ein Zusammenhang mit den Wachstumsphasen der Hefe herausgestellt. Analog zu den Untersuchungen bereits bekannter Folatvitamere wurde das Verhältnis aus Hexa- und Heptaglutamat für jede der drei Metabolitenklassen gebildet. Für alle untersuchten Metabolitenklassen konnte ein ähnlicher Verlauf analysiert werden. Dieser zeigte ein zunächst steigendes Verhältnis zu Gunsten des Hexaglutamates bis etwa zur Beendigung der exponentiellen Wachstumsphase. Mit Übergang in die stationäre Wachstumsphase sank dieses Verhältnis wiederum, wie aus Abbildung 6.2 hervorgeht. Für die Metabolitenklassen 1 und 3 entsprach die Verschiebung des Verhältnisses zu Gunsten des Heptaglutamates mit Beginn der stationären Wachstumsphase in etwa den Beobachtungen der bereits untersuchten Folatvitamere (vgl. Abbildung 5.15). Für die Metabolitenklasse 2 dagegen war nach wie vor das Hexaglutamat doppelt so intensiv detektierbar wie das Heptaglutamat, wenn auch mit geringeren mengenmäßigen Anteilen im Vergleich zur exponentiellen Wachstumsphase. Demnach zeigten die untersuchten Metabolitenklassen zwar zu großen Teilen folatähnliches Verhalten, vor allem Metabolitenklasse 2 aber zeigte einen ungewöhnlich hohen Anteil des Hexaglutamates auch während der stationären Wachstumsphase.

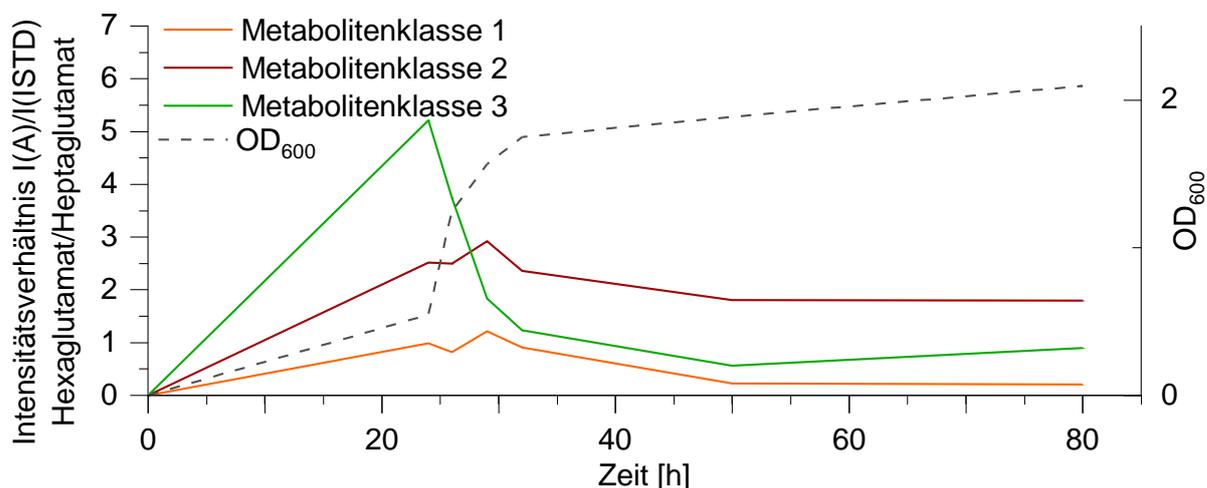


Abbildung 6.2 Verlauf der folatähnlichen Metabolitenklassen im zeitlichen Verlauf der Hefekultivierung im Verhältnis des Hexaglutamates zum Heptaglutamat bestimmt an Hand des Intensitätsverhältnisses der Analyten zum internen Standard [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat.

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

6.1.2 Annotation der folatähnlichen Metabolitenklassen

Zur Annotation der Summenformeln der potentiell folatähnlichen Metabolitenklassen 1-3 wurden deren Massenspektren und die zugehörigen Fragmentspektren (MS²-Spektren) untersucht. Die MS¹-Massenspektren wurden auf Massendifferenzen zu bereits bekannten Folatvitameren überprüft, welcher der Einführung oder des Verlustes bestimmter Strukturbestandteile zugeordnet werden konnten. Die mit den folatähnlichen Metabolitenklassen in Zusammenhang stehenden, bereits bekannten Folatvitamere wurden sodann für einen Vergleich des Fragmentierungsverhaltens herangezogen.

6.1.2.1 Annotation der Metabolitenklasse 1

Die Metabolitenklasse 1 wies sowohl für das Hexa- (m/z 558,1993) als auch für das Heptaglutamat (m/z 622,7205) im MS¹-Spektrum eine Massendifferenz von etwa 7,007 zum bereits bekannten 5,10-CH⁺-H₄PteGlu (m/z 551,1914 sowie m/z 615,7127) auf, wie Abbildung 6.3.A zu entnehmen ist. Diese Massendifferenz entspräche unter Berücksichtigung der Zweifachladung einer zusätzlich eingeführten CH₂-Gruppe bei Metabolitenklasse 1 im Vergleich zum 5,10-CH⁺-H₄PteGlu. Auch der Abgleich des Fragmentierungsverhalten im MS²-Spektrum mit diesem Vitamer (Abbildung 6.3.B) zeigte eine hohe Übereinstimmung. Demnach konnte für die Metabolitenklasse 1 eine Annotation von [C₄₆H₅₉N₁₂O₂₁]⁺ für das Hexaglutamat sowie von [C₅₁H₆₆N₁₃O₂₄]⁺ für das Heptaglutamat vorgenommen werden. Zusammenfassend ist diese Annotation nochmals dargestellt in Tabelle 6.3.

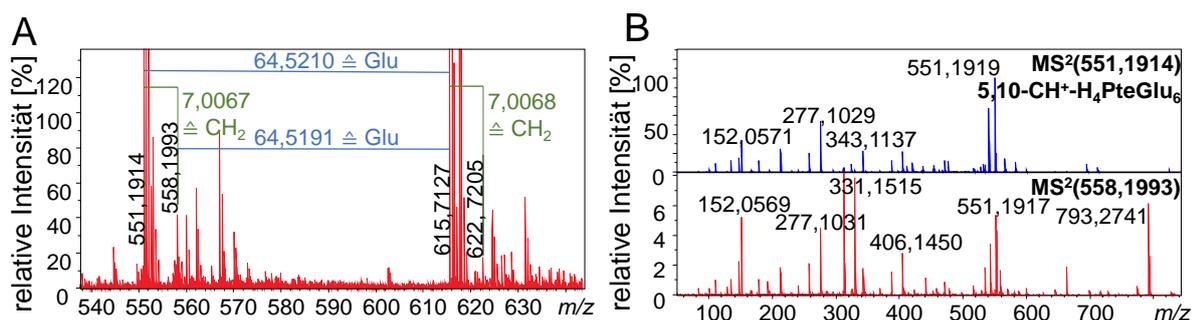


Abbildung 6.3 Annotation der potentiell folatähnlichen Metabolitenklasse 1.

(A) Identifizierung von Massendifferenzen zu bereits bekannten Folatvitameren im MS¹-Spektrum bei einer Retentionszeit von 3,38 min mit m/z 551,1914 = 5,10-CH⁺-H₄PteGlu₆ und m/z 615,7127 = 5,10-CH⁺-H₄PteGlu₇. Die farblich hinterlegten Massendifferenzen stellen die zusätzliche Einführung einer Glutaminsäureeinheit (zwischen Hexa- und Heptaglutamat, blau hervorgehoben) sowie einer CH₂-Gruppe (grün hervorgehoben) dar.

(B) Abgleich des Fragmentierungsverhaltens mit dem im Zusammenhang stehenden bekannten Folatvitamer 5,10-CH⁺-H₄PteGlu, gezeigt auf Ebene der Hexaglutamate.

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

6.1.2.2 Annotation der Metabolitenklasse 2

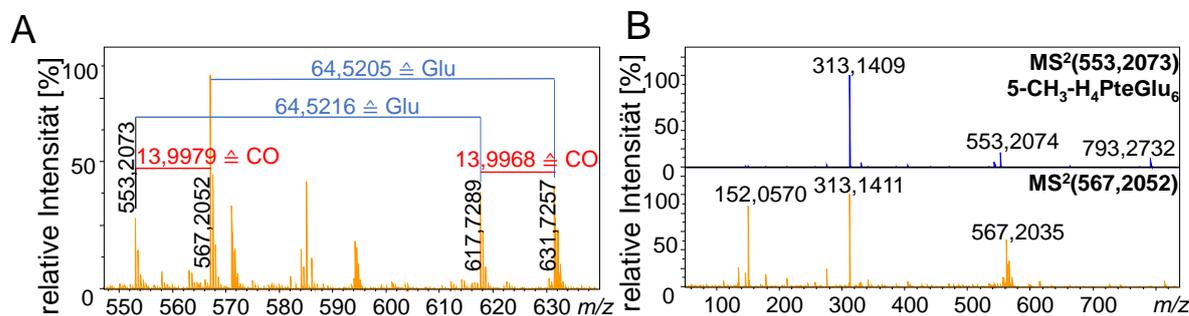


Abbildung 6.4 Annotation der potentiell folatähnlichen Metabolitenklasse 2.

(A) Identifizierung von Massendifferenzen zu bereits bekannten Folatvitameren im MS¹-Spektrum bei einer Retentionszeit von 3,30 min mit m/z 553,2073 = 5-CH₃-H₄PteGlu₆ sowie m/z 617,7289 = 5-CH₃-H₄PteGlu₇. Die farblich hinterlegten Massendifferenzen stellen die zusätzliche Einführung einer Glutaminsäureeinheit (blau hervorgehoben) sowie einer CO-Gruppe (rot hervorgehoben) dar.

(B) Abgleich des Fragmentierungsverhaltens mit dem im Zusammenhang stehenden bekannten Folatvitamer 5-CH₃-H₄PteGlu, gezeigt auf Ebene der Hexaglutamate.

Die Metabolitenklasse 2 war charakterisiert von einer Massendifferenz von etwa 13,997 von den jeweiligen 5-CH₃-H₄PteGlu Polyglutamaten (m/z 553,2072 sowie m/z 617,7289) sowohl für das Hexaglutamat (m/z 567,2052) als auch für das Heptaglutamat (m/z 631,7257), wie in Abbildung 6.4.A veranschaulicht wird. Unter Berücksichtigung der Zweifachladung entspräche dies einer zusätzlich eingeführten CO-Gruppe ins Molekül der Metabolitenklasse 2 im Vergleich zum 5-CH₃-H₄folat Polyglutamat. Für diese Metabolitenklassen konnten weitere Massendifferenzen zu bereits bekannten Folatvitameren detektiert werden, wie in Abbildung 6.5 aufgezeigt wird. Die beiden Metaboliten dieser Metabolitenklasse standen zudem in Zusammenhang mit jenen der Metabolitenklasse 1 über einen Wasserverlust von etwa 9,006. Außerdem konnte eine zusätzlich eingeführte CH₂-Gruppe (Massendifferenz von etwa 7,007) im Vergleich mit dem 5-CHO-H₄PteGlu Polyglutamat verzeichnet werden. Da dieses isomer ist zum MeFox Polyglutamat, konnte auch zu diesem der Zusammenhang über die zusätzlich eingeführte CH₂-Gruppe hergestellt werden. Eine Annotation von C₄₆H₆₀N₁₂O₂₂ für das Hexaglutamat sowie C₅₁H₆₇N₁₃O₂₅ für das Heptaglutamat der Metabolitenklasse 2 konnte unabhängig von der Wahl des Bezugspunktes für die Ermittlung der Massendifferenz vorgenommen werden. Der Abgleich der Fragmentspektren (Abbildung 6.4.B) verdeutlichte allerdings die Ähnlichkeit im Fragmentierungsverhalten der Metaboliten aus Metabolitenklasse 2 mit dem der 5-CH₃-H₄PteGlu Polyglutamate. Die Zusammenfassung der Annotation und der entsprechenden Massendifferenzen findet sich in Tabelle 6.3.

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

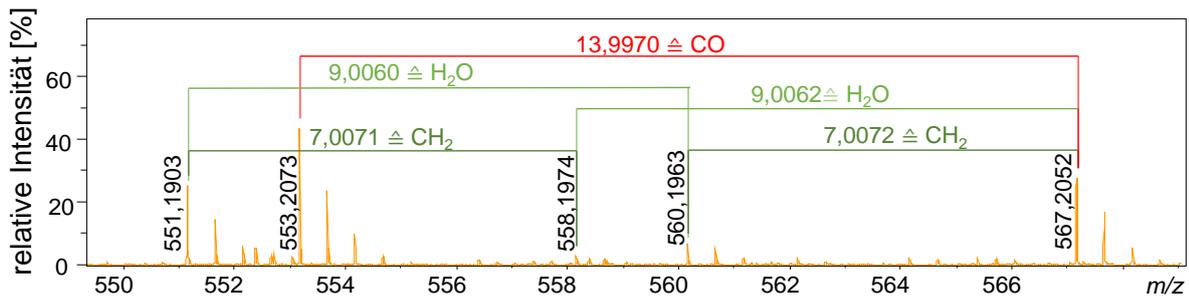


Abbildung 6.5 Analyse weiterer Massendifferenzen bekannter Folatvitamere und des Hexaglutamates der Metabolitenklasse 2.

Mit m/z 551,1903 = 5,10-CH⁺-H₄PteGlu₆, m/z 553,2073 = 5-CH₃-H₄PteGlu₆, m/z 558,1974 = Metabolitenklasse 1 Glu₆, m/z 560,1963 = 5-CHO-H₄PteGlu₆, m/z 567,2052 = Metabolitenklasse 2 Glu₆.

6.1.2.3 Annotation der Metabolitenklasse 3

Abbildung 6.6.A ist zu entnehmen, dass die Metabolitenklasse 3 sich auszeichnete durch eine Massendifferenz von etwa 43,515 des Hexaglutamates (m/z 589,7151) und Heptaglutamates (m/z 654,2345) im Vergleich mit den jeweiligen Polyglutamaten der H₄folate (m/z 546,1983 sowie m/z 610,7193). Unter Berücksichtigung der Zweifachladung entsprach dies einer zusätzlich eingeführten C₃H₅NO₂-Einheit. Entgegen der Metabolitenklasse 1 und 2 konnte diese Massendifferenz auch im Vergleich der Fragmentierungsspektren beobachtet werden. Abbildung 6.6.B veranschaulicht, dass auch für das Hauptfragment des Hexaglutamates der Metabolitenklasse 3 (m/z 386,1570) verglichen mit dem Hauptfragment des H₄PteGlu₆ (m/z 299,1252) die Zunahme um die C₃H₅NO₂-Einheit analysiert werden konnte. Demnach konnte für diese Metabolitenklasse eine Annotierung zu C₄₇H₆₃N₁₃O₂₃ für das Hexaglutamat sowie zu C₅₂H₇₀N₁₄O₂₆ für das Heptaglutamat vorgenommen werden, was nochmals zusammenfassend in Tabelle 6.3 festgehalten wird.

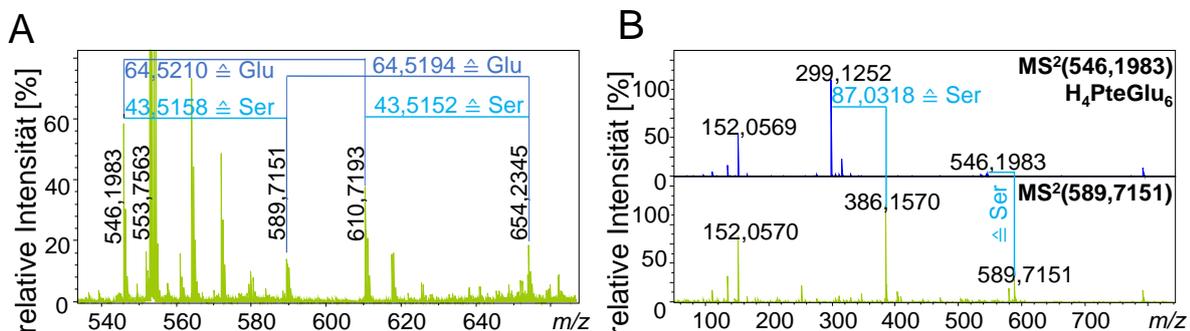


Abbildung 6.6 Annotation der potentiell folatähnlichen Metabolitenklasse 3.

(A) Identifizierung von Massendifferenzen zu bereits bekannten Folatvitameren im MS¹-Spektrum bei einer Retentionszeit von 3,20 min. Die farblich hinterlegten Massendifferenzen stellen die zusätzliche Einführung einer Glutaminsäureeinheit (dunkelblau hervorgehoben) sowie einer Serin-Einheit (hellblau hervorgehoben) dar.

(B) Abgleich des Fragmentierungsverhaltens mit dem im Zusammenhang stehenden bekannten Folatvitamer H₄PteGlu, zeigt auf Ebene der Hexaglutamate.

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

6.1.2.4 Zusammenfassung der Annotationen

Tabelle 6.3 gibt eine Übersicht über die Annotationen der Metabolitenklassen 1-3 sowie die Differenzen zum damit in Zusammenhang stehenden Folatvitamer, auf welcher diese Annotation beruhen. Für alle Annotationen konnte eine Massengenauigkeit von $\pm 0,005$ Da zwischen experimentellem und theoretischem Masse-zu-Ladungsverhältnis erreicht werden, sodass von einer korrekten Annotation auszugehen war.

Tabelle 6.3 Annotation der folatähnlichen Metabolitenklassen.

		Annotation	Im Zusammenhang stehendes Folatvitamer	Unterschied zum in Zusammenhang stehenden Folatvitamer
Metabolitenklasse 1	GLU ₆	[C ₄₆ H ₅₉ N ₁₂ O ₂₁] ⁺	5,10-CH ⁺ -H ₄ PteGLU ₆	+CH ₂
Metabolitenklasse 1	GLU ₇	[C ₅₁ H ₆₆ N ₁₃ O ₂₄] ⁺	5,10-CH ⁺ -H ₄ PteGLU ₆	+CH ₂
Metabolitenklasse 2	GLU ₆	C ₄₆ H ₆₀ N ₁₂ O ₂₂	5-CH ₃ -H ₄ PteGLU ₆	+CO
Metabolitenklasse 2	GLU ₆	C ₄₆ H ₆₀ N ₁₂ O ₂₂	5-CHO-H ₄ PteGLU ₆	+CH ₂
Metabolitenklasse 2	GLU ₆	C ₄₆ H ₆₀ N ₁₂ O ₂₂	Metabolitenklasse 1 GLU ₆	-H ₂ O
Metabolitenklasse 2	GLU ₇	C ₅₁ H ₆₇ N ₁₃ O ₂₅	5-CH ₃ -H ₄ PteGLU ₇	+CO
Metabolitenklasse 2	GLU ₇	C ₅₁ H ₆₇ N ₁₃ O ₂₅	5-CHO-H ₄ PteGLU ₇	+CH ₂
Metabolitenklasse 2	GLU ₇	C ₅₁ H ₆₇ N ₁₃ O ₂₅	Metabolitenklasse 1 GLU ₇	-H ₂ O
Metabolitenklasse 3	GLU ₆	C ₄₇ H ₆₃ N ₁₃ O ₂₃	H ₄ PteGLU ₆	+C ₃ H ₅ NO ₂
Metabolitenklasse 3	GLU ₇	C ₅₂ H ₇₀ N ₁₄ O ₂₆	H ₄ PteGLU ₇	+C ₃ H ₅ NO ₂

6.1.3 Theorien zur Identifizierung der Molekularstruktur der annotierten Metabolitenklassen

Nach erfolgreicher Annotation war sodann das Ziel, eine Identifizierung unter Berücksichtigung der Molekularstruktur zu erreichen.

6.1.3.1 Mögliche Substitutionspositionen der zu Grunde liegenden Folatvitamere

Dazu sind in Abbildung 6.7 mögliche Substitutionspositionen derjenigen Monoglutamatgrundstrukturen dargestellt, welche zuvor als in Zusammenhang stehend mit den potentiell folatähnlichen Metaboliten identifiziert wurden. Die Zugänglichkeit der Positionen wurde abgeschätzt und mit einer entsprechenden Nummerierung in absteigender Zugänglichkeit versehen.

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

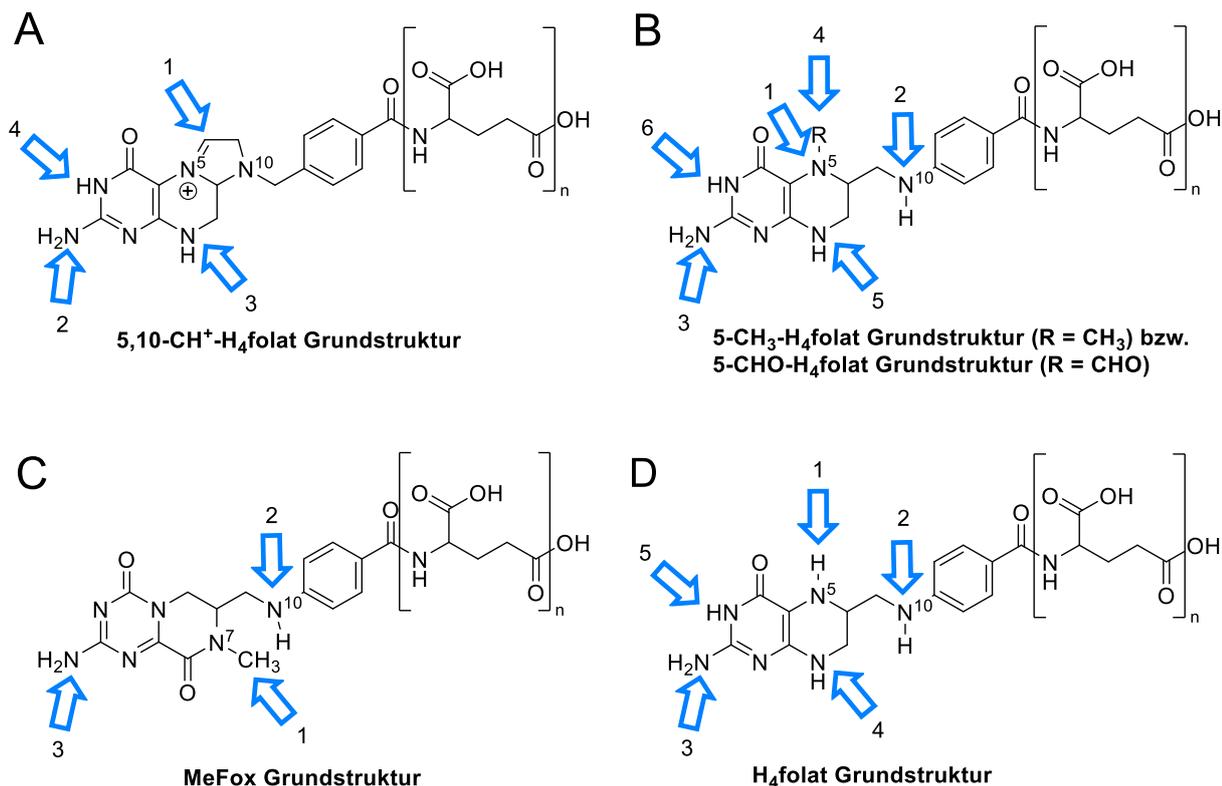


Abbildung 6.7 Mögliche Substitutionspositionen der Folatgrundstrukturen unter Einschätzung der Zugänglichkeit der Position dargestellt durch die absteigende Nummerierung.

Abbildung 6.7.A zeigt die 5,10-CH⁺-H₄folat Grundstruktur, aus welcher die Metabolitenklasse 1 hervorzugehen schien. Für diese kamen vier verschiedenen Substitutionspositionen für die Einführung der zusätzlichen Methylgruppe in Frage, von welcher die Substitution zwischen N⁵ und N¹⁰ am plausibelsten erschien.

Für die Identität der Metabolitenklasse 2 kamen drei verschiedenen Grundstrukturen in Frage. Zum einen war eine zusätzliche Einführung einer Carbonylgruppe in die 5-CH₃-H₄folat Grundstruktur denkbar, was das Analogon zur Einführung einer Methylgruppe in die 5-CHO-H₄folat Grundstruktur darstellt (Abbildung 6.7.B). Zum anderen war die Einführung einer Methylgruppe in die MeFox-Grundstruktur denkbar (Abbildung 6.7.C). Zudem standen die Metabolitenklassen 1 und 2 über einen Wasserverlust von Metabolitenklasse 2 hin zur Metabolitenklasse 1 in Verbindung miteinander. Für die Substitution der 5-CH₃-H₄folat bzw. der 5-CHO-H₄folat Grundstruktur erschien Position N⁵ auf Grund der generell sehr hohen Reaktivität innerhalb der Folatgrundstruktur als am plausibelsten. Für die MeFox-Grundstruktur schien eine Ethylgruppe anstatt einer Methylgruppe an Position N⁷ am wahrscheinlichsten.

Analog zur 5-CH₃-H₄folat und 5-CHO-H₄folat Grundstruktur erfolgt die Substitution an die H₄folat Grundstruktur (Abbildung 6.7.D) vermutlich bevorzugt an Position N⁵, sodass auch für die Metabolitenklasse 3 die Substitution an dieser Position als generell am zugänglichsten bewertet werden konnte. Die Addition von C₃H₅NO₂ an die H₄folat Grundstruktur würde unter

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

Berücksichtigung der dafür möglichen Konstitutionsisomere vermutlich einer Kondensation mit Serin entsprechen.

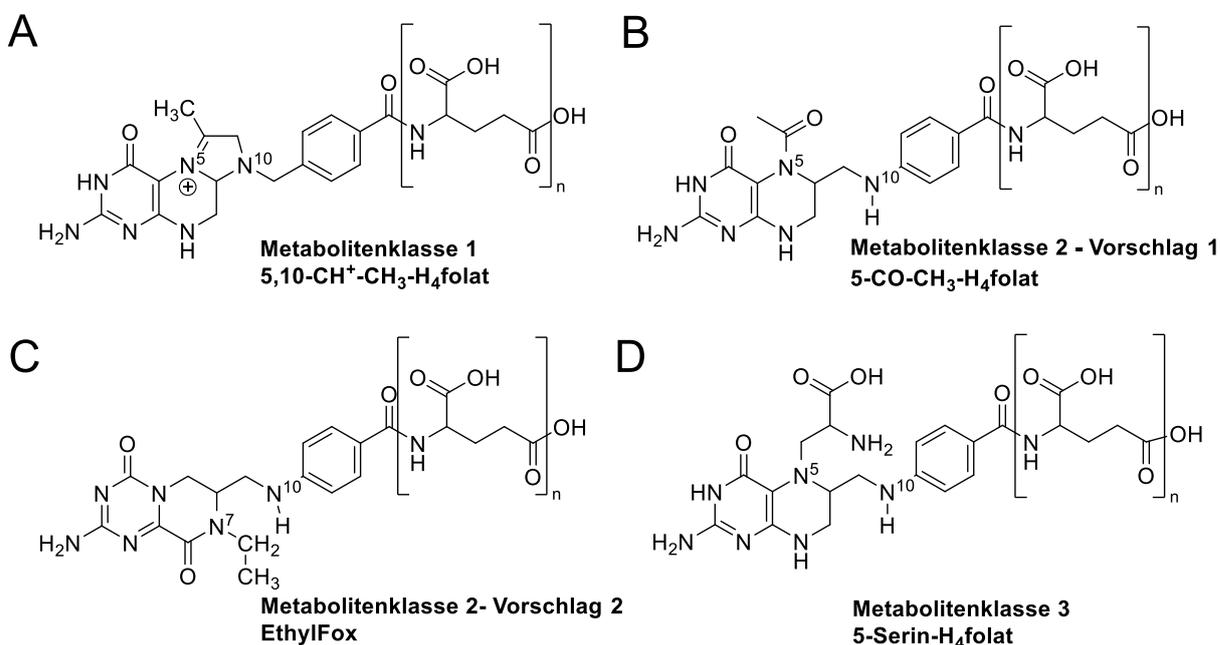


Abbildung 6.8 Zusammenfassung der plausibelsten Strukturformelvorschläge der Metabolitenklassen 1-3.

Anhang 29 bis Anhang 32 geben eine Zusammenstellung der möglichen Strukturvorschläge für die Metabolitenklassen 1-3 unter Hervorhebung des jeweils plausibelsten Vorschlages. Letztere sind nochmals zusammenfassend in Abbildung 6.8 dargestellt, welche im Nachfolgenden unter anderem unter Zuhilfenahme der extrahierten Chromatogrammspuren (Abbildung 6.9) detailliert erörtert werden sollen.

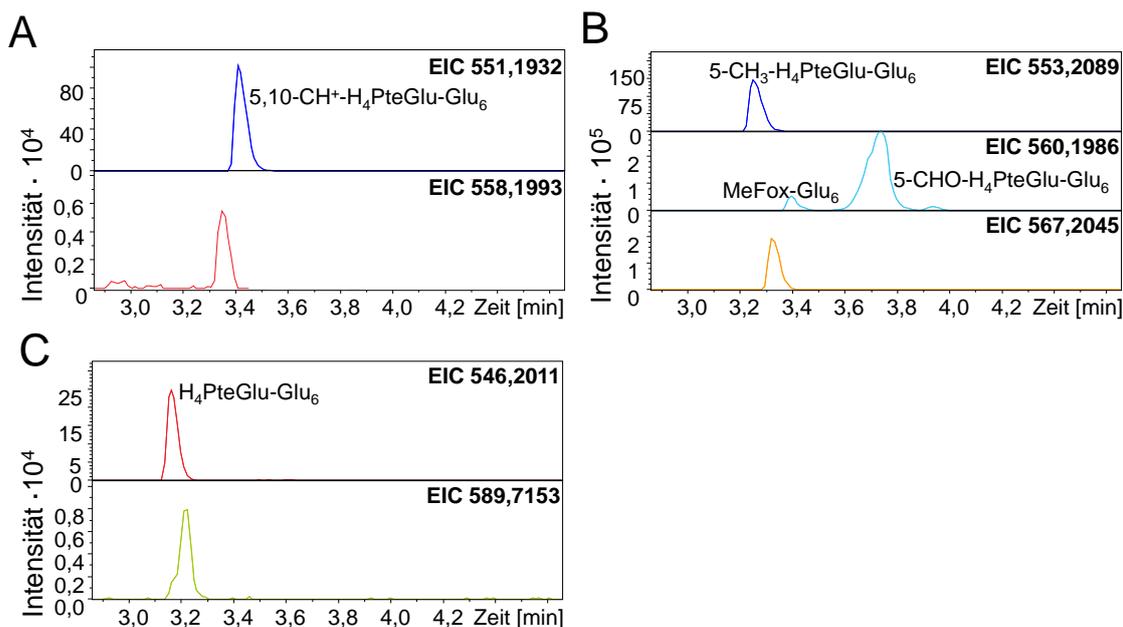


Abbildung 6.9 Extrahierte ionische Chromatogrammspuren (EIC) der Hexaglutamate der Metabolitenklasse 1-3 im Vergleich zu den damit in Zusammenhang stehenden Folat-Hexaglutamaten.
(A) Metabolitenklasse 1, (B) Metabolitenklasse 2, (C) Metabolitenklasse 3.

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

6.1.3.2 Diskussion des Strukturvorschlages für Metabolitenklasse 1

Die Metaboliten der Metabolitenklasse 1 wurden annotiert als ein Äquivalent zum 5,10-CH⁺-H₄folat mit einer zusätzlichen Methylgruppe. Abbildung 6.8.A zeigt den plausibelsten Strukturformelvorschlag hierfür, bei dem es sich um den C₂-Metaboliten 5,10-Ethenyl-tetrahydrofolat (5,10-CH⁺-CH₃-H₄folat) handelt. Mehrere Gründe sprachen für diesen Vorschlag. Wurden die chemisch-physikalischen Eigenschaften des Hexaglutamates (*m/z* 558,1993; Abbildung 6.9.A) mit denen von 5,10-CH⁺-H₄PteGlu₆ (*m/z* 551,1932; Abbildung 6.9.A) verglichen, so wurde ersteres kurz vor dem Methenyl-Folatvitamer eluiert. Ursache hierfür ist vermutlich die sterische Hinderung bedingt durch die zusätzliche Alkylgruppe und somit ein leicht verschlechtertes Retentionsverhalten am C18-Säulenmaterial. Generell aber zeigten beide Metaboliten sehr ähnliches Retentionsverhalten. Auch die Fragmentspektren (Abbildung 6.3.B) wiesen große Ähnlichkeiten auf, was den Zusammenhang beider Metaboliten untermauerte. Die Tatsache, dass keine Fragmente mit einer zusätzlichen Methylgruppe gefunden werden konnten, ließ darauf schließen, dass die Methylgruppe bereits durch moderate Ionisationsspannungen von 20 eV abgespalten wurde und folglich nicht mehr im Massenspektrum nachweisbar war. Für die Identifizierung der Metabolitenklasse 1 als 5,10-Ethenyl-tetrahydrofolat sprach zudem die Tatsache, dass sowohl das Hexa- als auch das Heptaglutamat im Verlauf der Hefekultivierung stetig zuzunehmen schienen (vgl. Anhang 28.A), wie dies bei den (semi-)quantitativen Untersuchungen zuvor für die Formylvitamere und im Speziellen auch für die 5,10-CH⁺-H₄folate (Anhang 21.D) beobachtet wurde.

Diskussion eines möglichen C₂-Metabolismus

Bereits seit langem ist die Tatsache bekannt, dass unter physiologischen Bedingungen Acetaldehyd und H₄folat zum 5,10-Ethylen-tetrahydrofolat (5,10-CH⁺-CH₃-H₄folat) kondensieren können. [Guynn et al. 1982; LaBaume und Guynn 1985] Letzteres entspricht dem C₂-Homolog von 5,10-CH₂-H₄folat, welches wiederum durch die Kondensation von Formaldehyd und H₄folat entsteht. [Wilson und Horne 1983; Wilson und Horne 1984] Die weitere Transformation von 5,10-CH₂-H₄folat zum 5,10-CH⁺-H₄folat sowie 5-CH₃-H₄folat ist ebenfalls bekannt. [Ndaw et al. 2001] Folglich könnte das unter physiologischen Bedingungen gebildete 5,10-CH-CH₃-H₄folat zum 5,10-CH⁺-CH₃-H₄folat reduziert werden. Fraglich bleibt dabei aber der Ursprung von Acetaldehyd im Organismus.

Plausibler erscheint demnach die Bildung analog zum C₁-Metabolismus, welcher in Abbildung 6.10 entsprechend zum C₂-Metabolismus angepasst wurde. In Übereinstimmung mit dieser Theorie würden zunächst H₄folat und Essigsäure zum 10-Acetyl-tetrahydrofolat

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

(10-CO-CH₃-H₄folat) reagieren. Dieses würde anschließend zum 5,10-CH⁺-CH₃-H₄folat reduziert werden. Im weiteren Verlauf des C₂-Metabolismus würde 5,10-CH⁺-CH₃-H₄folat über 5,10-CH-CH₃-H₄folat weiter zum 5-Ethyl-tetrahydrofolat (5-CH₂-CH₃-H₄folat) reduziert werden. Letzteres wiederum würde – analog zur Funktion von 5-CH₃-H₄folat – als C₂-Transporter fungieren und unter Regeneration von H₄folat eine Ethyleinheit auf Homocystein übertragen, wodurch Ethionin entstünde. Demnach würden alle Zwischenstufen zuvor anstatt der für Folate üblichen C₁-Transportfunktion der Übertragung einer C₂-Einheit dienen.

Ob dieselben Enzyme wie im C₁-Metabolismus die Reaktionen katalysieren würden, kann an dieser Stelle lediglich vermutet, nicht aber schlussendlich nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt, konnte aber für 5,10-Methylen-tetrahydrofolat Reduktase sowie 5,10-Methylen-tetrahydrofolat Dehydrogenase Aktivität bezüglich des C₂-Metaboliten 5,10-CH-CH₃-H₄folat nachgewiesen werden. [Guynn et al. 1982; LaBaume und Guynn 1985] Somit sind nachgewiesenermaßen einige Enzyme des C₁-Metabolismus zur Katalyse von C₂-Metaboliten fähig. Zudem stellten Röth et al. [2019] Untersuchungen mit *Lactobacillus reuteri* an, welchen sie in Medien unter Zugabe verschiedener kurzkettiger Fettsäuren wie Acetat, Butyrat und Propionat kultivierten und mit einer Kultivierung ohne weitere Zusätze verglichen. Die Zugabe von Acetat verstärkte die Produktion eines Folatvitameres, welches die Autoren mit Hilfe von Kernspinresonanz-Spektroskopie als 5,10-CH⁺-CH₃-H₄folat identifizieren konnten. Unter normalen Kultivierungsbedingungen konnte dieser C₂-Metabolit – wenn auch zu geringeren Anteilen – ebenfalls nachgewiesen werden. Unter normalen physiologischen Bedingungen scheinen Laktobazillen also in der Lage zu sein, diesen C₂-Metaboliten zu generieren. Dies lässt eine Substratspezifität der am C₁-Metabolismus beteiligten Enzyme nur für C₁-Metaboliten eher ausschließen. Die Fähigkeit von Hefen zur Synthese des C₂-Metaboliten 5,10-CH⁺-CH₃-H₄folat ist demnach physiologisch denkbar.

Ein weiteres Indiz für die Existenz des C₂-Metabolismus stellt die Tatsache dar, dass ebenfalls kürzlich Ethionin in Durian nachgewiesen werden konnte [Fischer und Steinhaus 2019], einer Frucht, welche für ihren hohen Folatgehalt bekannt ist. [Striegel et al. 2018a]

Generell erscheint der C₂-Metabolismus in Organismen und im Speziellen im Hefeorganismus möglich. Eine potentielle Bedeutung dieses Metabolismus wird in Kapitel 6.4 näher diskutiert.

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

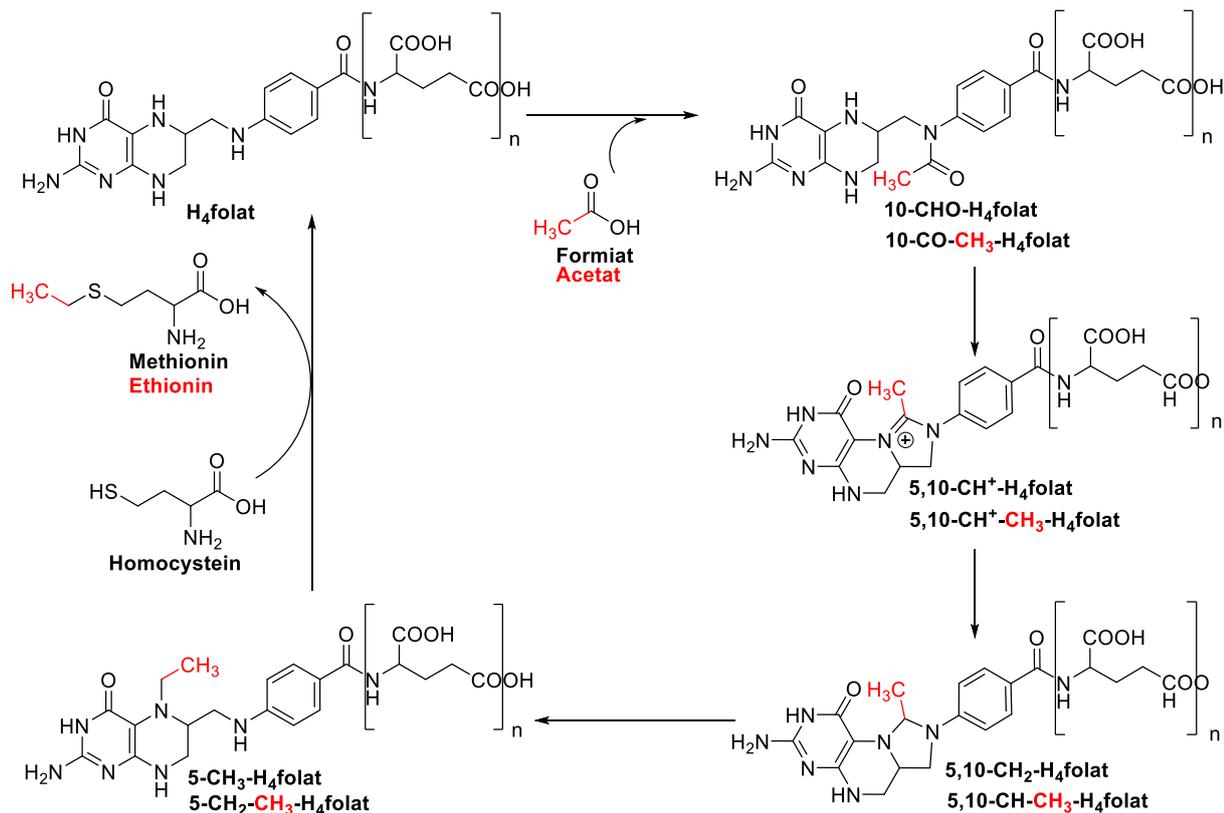


Abbildung 6.10 Anpassung des C₁-Metabolismus und Postulierung des C₂-Metabolismus (C₂-Metaboliten gezeigt in roter Farbe).

6.1.3.3 Diskussion des Strukturvorschlages der Metabolitenklasse 2

Zur Strukturzuordnung der Metabolitenklasse 2 standen mehrere Theorien zur Debatte, welche an Hand des Massenspektrums in Abbildung 6.5 hervorgingen.

Zum einen war eine zusätzliche Einführung eines C₁-Metaboliten in Form einer Carbonylgruppe in die Grundstruktur von 5-CH₃-H₄folat denkbar. Dies wäre mit einer zusätzlichen Methylgruppe in die Grundstruktur von 5-CHO-H₄folat gleichzusetzen. Unabhängig von der zu Grunde liegenden Struktur wäre ein Strukturvorschlag in Form von 5-Acetyl-tetrahydrofolat (5-CO-CH₃-H₄folat) oder dessen isomerer Form 10-CO-CH₃-H₄folat am wahrscheinlichsten, wovon erstere in Abbildung 6.8.B dargestellt ist. Diese Theorie stünde des Weiteren in Einklang mit der für die Metabolitenklasse 1 erfolgten Identifizierung des 5,10-CH⁺-CH₃-H₄folates. 10-CO-CH₃-H₄folat würde demnach die Vorstufe innerhalb des C₂-Metabolismus darstellen, wie dies in Abbildung 6.10 aufgezeigt wird. Somit wäre der Nachweis eines weiteren C₂-Metaboliten in den untersuchten Hefeproben ein weiteres Indiz für die Existenz des C₂-Metabolismus und würde die Identifizierung von 5,10-CH⁺-CH₃-H₄folat weiter bekräftigen.

Unter Berücksichtigung der massenspektrometrischen Information würde das Hauptfragment mit *m/z* 313,14 aus dem Bindungsbruch zwischen dem Benzolring und der Carbonylgruppe

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

des aus der *p*-Aminobenzoessäure stammenden Strukturteiles hervorgehen. Es ist anzunehmen, dass das Retentionsverhalten von 5-CO-CH₃-H₄folat dem von 5-CHO-H₄folat ähneln würde. Analog zum 5,10-CH⁺-CH₃-H₄folat kann auf Grund der sterischen Hinderung von einer geringfügig verminderten Retention am C18-Material im Vergleich mit dem C₁-Homolog ausgegangen werden. Da aber das Retentionsverhalten des unbekanntes Metaboliten C₄₆H₆₀N₁₂O₂₂ eher dem Retentionsverhalten von 5-CH₃-H₄folat als dem von 5-CHO-H₄folat entsprach (vgl. Abbildung 6.9.B), schien dieser Strukturformelvorschlag nicht vollkommen schlüssig zu sein.

Demnach war eine zweite Theorie in Betracht zu ziehen. Der Vergleich des Retentionsverhalten des unbekanntes Hexaglutamates mit dem Verhalten von bereits bekannten Hexaglutamaten (dargestellt in Abbildung 6.9.B) offenbarte ein ähnliches Retentionsverhalten wie MeFox-Glu₆. Analog zum bereits identifizierten C₂-Metaboliten 5,10-CH⁺-CH₃-H₄folat wurde auch das Hexaglutamat der Metabolitenklasse 2 geringfügig vor dem C₁-Analog MeFox-Glu₆ eluiert. MeFox stellt ein Isomer zum 5-CHO-H₄folat dar, weswegen auch MeFox an Stelle von 5-CHO-H₄folat als Grundstruktur für die unbekanntes Metabolitenklasse in Frage käme. Letztere würde demnach aus der zusätzlichen Einführung einer Methylgruppe in die MeFox-Grundstruktur hervorgehen.

In Kapitel 2.1.2 wurde bereits der Bildungsmechanismus von MeFox detailliert beleuchtet. MeFox stellt das Oxidationsprodukt von 5-CH₃-H₄folat dar und wird entweder über das intermediär gebildete Hydroperoxid oder 5-CH₃-H₂folat gebildet. Wird nun das C₂-Analog von 5-CH₃-H₄folat, nämlich 5-CH₂-CH₃-H₄folat, denselben, theoretischen Oxidationsreaktionen unterworfen (dargestellt in Abbildung 6.11), wäre die in Abbildung 6.9.C gezeigte Struktur für das daraus hervorgehende „EthylFox“ denkbar. Für diese Theorie spricht das sehr ähnliche Retentionsverhalten im Vergleich zu MeFox. Das Hauptfragment mit *m/z* 313,14 würde auch aus dieser Struktur nach Bindungsbruch zwischen dem Benzolring und der Carbonylgruppe des aus der *p*-Aminobenzoessäure stammenden Strukturteiles hervorgehen. Gegen diese Theorie allerdings spricht die Tatsache, dass das zugehörige metabolisch aktive Vitamer 5-CH₂-CH₃-H₄folat nicht in den analysierten Hefen nachgewiesen werden konnte. Möglich wäre, dass letzteres Vitamer sehr instabil ist und daher zur Metabolitenklasse 2 weiteroxidiert wird. Allerdings erschien dies unwahrscheinlich.

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

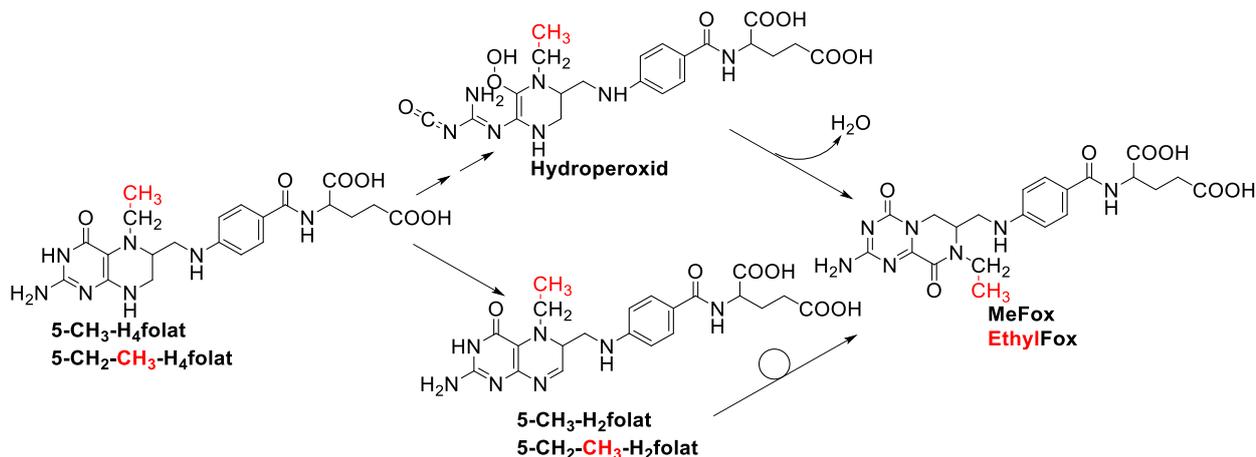


Abbildung 6.11 Abwandlung der Oxidationsreaktionen von 5-CH₃-H₄folat zu MeFox unter Berücksichtigung von C₂-Metaboliten.

Damit verblieb eine letzte Theorie zur Strukturaufklärung von Metabolitenklasse 2. Wie ebenfalls in Abbildung 6.5 und Tabelle 6.3 gezeigt, stand Metabolitenklasse 2 über einen Wasserverlust mit Metabolitenklasse 1 in Verbindung. Aus dem Strukturvorschlag von 5,10-CH⁺-CH₃-H₄folat in Abbildung 6.9.D ging keine Position für einen offensichtlichen Wasserverlust hervor. Viel wahrscheinlicher erschien daher der Verlust oder die Addition von Wasser – je nachdem welche Struktur man als die zu Grunde liegende wählt – während der Ionisierung des Moleküls in der Ionenquelle. Wurden allerdings die Gehalte von Metabolitenklasse 1 und 2 im Verlauf der Hefekultivierung in Anhang 28.B betrachtet, so verliefen vor allem die Kurven der entsprechenden Heptaglutamate sehr konträr. Während Metabolitenklasse 2 mit zunehmender Kultivierungsdauer wieder abnahm, stieg der Gehalt der als 5,10-CH⁺-CH₃-H₄folat identifizierten Metabolitenklasse 1 bis zum letzten Zeitpunkt der Probenahme stark an. Würde Metabolitenklasse 1 aus Metabolitenklasse 2 nach Wasserabspaltung hervorgehen oder umgekehrt Metabolitenklasse 2 das Wasseraddukt von Metabolitenklasse 1 darstellen, so müssten beide Kurven während der Hefekultivierung den gleichen Verlauf aufweisen. Da dies offensichtlich nicht der Fall war, konnte diese Theorie verworfen werden.

Letztlich blieb zu klären, ob die Metabolitenklasse 2 den C₂-Metaboliten 5-CO-CH₃-H₄folat, das Oxidationsprodukt EthylFox oder einen noch nicht diskutierten Strukturvorschlag darstellte. Keiner der hier postulierten Strukturvorschläge konnte bislang *in vivo* nachgewiesen werden. Eine experimentelle Aufreinigung zur Strukturaufklärung wurde auf Grund der Vielzahl der sich strukturell ähnlich verhaltenden Folatvitamere und generell geringen Folatkonzentrationen im Organismus als nicht durchführbar erachtet. Um dennoch einen Identifizierungsversuch vornehmen zu können, wurden die vorgeschlagenen Strukturen 5-CO-CH₃-H₄folat sowie EthylFox in der entsprechenden Monoglutamatform synthetisiert. Diese Ergebnisse werden in den nachfolgenden Kapiteln 6.2 sowie Kapitel 6.3 weiter diskutiert.

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

6.1.3.4 Diskussion des Strukturvorschlages der Metabolitenklasse 3

Die Metabolitenklasse 3 konnte als ein $C_3H_5NO_2$ -Addukt von H_4 folat annotiert werden. Unter Berücksichtigung der in Frage kommenden Konstitutionsisomere von $C_3H_5NO_2$ und der biologischen Relevanz der möglichen Strukturvorschläge, kam letztlich die Kondensation mit Serin in Frage. Das Fragmentspektrum (Abbildung 6.6.B) zeigte, dass die Substitution auch im Hauptfragment zu finden war. Nachdem generell N^5 die reaktivste Stelle im Folatmolekül darstellt, erschien der in Abbildung 6.8.D postulierte Strukturvorschlag des 5-Serin- H_4 folates am wahrscheinlichsten. Bei Betrachtung des in Abbildung 2.7 schematisierten C_1 -Metabolismus fand sich schnell eine biologische Relevanz für diese Metabolitenklasse, welche zudem die postulierte Substitution untermauerte. So wird Serin mit Hilfe von SHMT zunächst ans H_4 folat gebunden. Nach Abspaltung von Glycin wird sodann 5,10- CH_2 - H_4 folat generiert. [Fox und Stover 2008; Stover 2010] Letzteres Vitamer ist unter den Bedingungen der Probenextraktion instabil [Brouwer et al. 2007], weswegen es unter den gewählten experimentellen Bedingungen nur zu geringen Anteilen nachgewiesen werden konnte. Demnach könnte 5-Serin- H_4 folat das stabilere Intermediat darstellen, welches im Gegensatz zu 5,10- CH_2 - H_4 folat gut analysierbar ist. Werden die analysierten Peakflächen der Hexa- und Heptaglutamate von 5-Serin- H_4 folat und 5,10- CH_2 - H_4 folat im Verhältnis zum zudotierten internen Standard betrachtet, so zeigte sich für beide Vitamere ein ähnlicher Verlauf während der Hefekultivierung. Dieser ist in Abbildung 6.12 veranschaulicht. Folglich schienen diese beiden Vitamere miteinander in Verbindung zu stehen. H_4 folat dagegen wies dazu gegenläufige Gehalte im Verlauf der Hefekultivierung auf. Entsprechend konnte dieser potentielle Biosyntheseweg von 5-Serin- H_4 folat nicht vollends bestätigt werden.

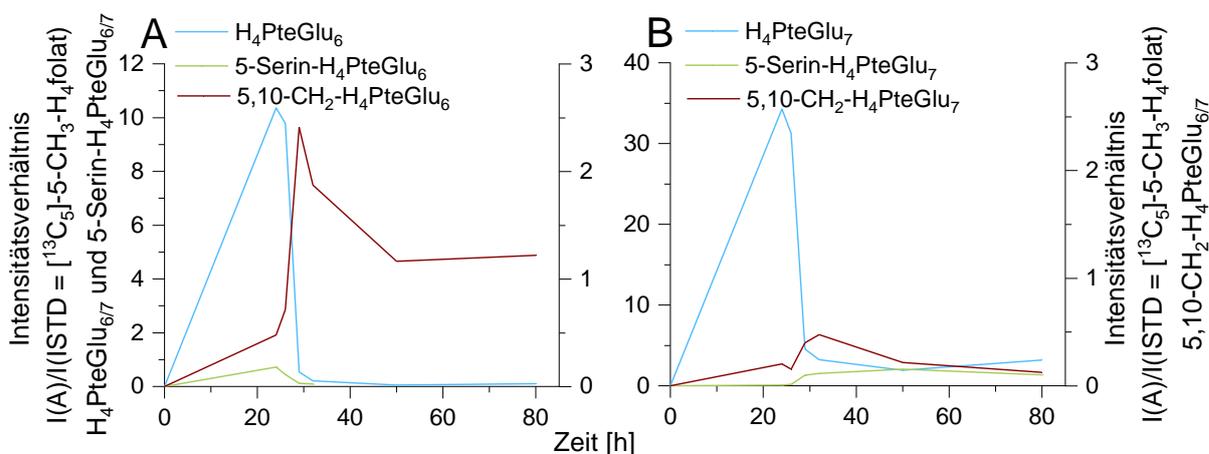


Abbildung 6.12 Verlauf der Gehalte von $H_4PteGlu$, 5-Serin- $H_4PteGlu$ sowie 5,10- CH_2 - $H_4PteGlu$ während der Hefekultivierung von TUM 68[®] gemessen an Hand des Intensitätsverhältnisses zum ISTD [$^{13}C_5$]-5- CH_3 - H_4 folat.
 (A) Verlauf der Hexaglutamate.
 (B) Verlauf der Heptaglutamate.

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

Bislang wurde die Existenz von 5-Serin-H₄folat nicht beschrieben. Eine präparative Aufreinigung zur Strukturaufklärung wurde ebenso als nicht machbar erachtet wie die Synthese unter Verwendung des entsprechenden Monoglutamatstandards H₄folat. Somit konnte an dieser Stelle keine weitere Identifizierung erfolgen und verblieb damit auf Level E.

6.2 Synthese verschiedener C₂-Monoglutamatstandards zur Verifizierung von deren Anwesenheit in Hefen

Um weitere Identifizierungen der annotierten Metabolitenklassen vornehmen zu können, wurden verschiedenen Syntheseansätze mit Monoglutamatstandards vorgenommen. Von den in Abbildung 6.8 aufgezeigten Strukturvorschlägen wurde 5,10-CH⁺-CH₃-H₄folat bereits *in vivo* beschrieben. Alle verbleibenden Vorschläge wurden bislang in der Fachöffentlichkeit noch nicht diskutiert. Für zwei der drei Vorschläge wurden für die weitergehende Identifizierung Synthesevorschriften unter Verwendung von Monoglutamatstandards entwickelt und optimiert. Die Strukturaufklärung erfolgte mit Hilfe der Kernspinresonanz-Spektroskopie. Nachdem die beiden isomeren Formylvitamere 5- und 10-CHO-H₄folat sehr ähnliches chemisch-physikalisches Verhalten aufweisen und chromatographisch nur schwer zu trennen sind, wurde selbiges Verhalten für die entsprechenden C₂-Metaboliten angenommen. Daher wurde nachfolgend statt der metabolisch aktiven Form 10-CO-CH₃-H₄folat das Isomer 5-CO-CH₃-H₄folat wegen der höheren Reaktivität der Position N⁵ synthetisiert.

6.2.1 Synthese von 5-Acetyl-tetrahydrofolat

Die Synthese von 5-CO-CH₃-H₄folat erfolgte nach der Vorschrift zur Synthese von 5-CHO-H₄folat aus H₄folat von Moran und Colman [1982]. Es wurden Adaptionen zur erfolgreichen Synthese des C₂-Metaboliten vorgenommen, welche in Kapitel 15.1 nachzuschlagen sind. Die Aufreinigung erfolgte mittels HPLC-DAD (vgl. Kapitel 11.2.1), bevor eine Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie erfolgen konnte.

Das experimentell ermittelte Masse-zu-Ladungsverhältnis stimmte exakt mit dem gesuchten Wert von m/z 488,189 überein. Die Fragmente nach Messung mittels UHPLC-Q-ToF-MS stimmten ebenfalls mit den postulierten Fragmenten überein (vgl. Anhang 33.A). Zudem konnten alle Signale im ¹H-Spektrum erfolgreich der Struktur von 5-CO-CH₃-H₄folat zugeordnet

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

werden. Das 2D-Spektrum bestätigte des Weiteren die erfolgreiche Substitution mit einer Acetylgruppe an Position N⁵. Die Signalzuordnungen unter Angabe der Kopplungskonstanten J sind in Tabelle 6.4 zusammengefasst.

Tabelle 6.4 Signalzuordnungen im ¹H-Spektrum von 5-CO-CH₃-H₄folat aufgenommen bei 500 Hz; δ = chemische Verschiebung in ppm; J = Kopplungskonstante.

δ [ppm]	Integral	Multiplizität	J [Hz]
7,63	2H	d	8,66
6,70	2H	d	8,71
4,34	1H	dd	9,04; 4,58
3,50	2H	m	-
3,40	1H	dd	13,24; 5,00
3,30	1H	m	-
3,16	1H	m	-
2,38	2H	m	-
2,19	1H	m	-
2,10	3H	s	-
2,02	1H	d	8,06

6.2.2 Synthese von 5-Ethyl-tetrahydrofolat und dessen Oxidationsprodukt EthylFox

Um EthylFox zu generieren, wurde zunächst das C₂-Analog von 5-CH₃-H₄folat synthetisiert. 5-CH₂-CH₃-H₄folat wurde nach der Vorschrift von Blair und Saunders [1970] aus PteGlu nach Reduktion zu H₄folat generiert. Optimierungen erfolgten nach Ndaw et al. [2001]. Zudem wurden Anpassungen vorgenommen, um den C₂-Metaboliten an Stelle des C₁-Metaboliten zu generieren (vgl. Kapitel 15.2). Der dadurch erhaltene Metabolit stimmte exakt mit dem erwarteten Masse-zu-Ladungsverhältnis von *m/z* 474,25 überein. Im Chromatogramm zeigte sich lediglich ein Peak, sodass von einer vollständigen Umsetzung des Eduktes ausgegangen werden konnte. Dieses Edukt wurde zunächst präparativ aufgereinigt (vgl. Kapitel 11.2.3) und anschließend analog zur MeFox-Generierung durch Zugabe von H₂O₂ oxidiert. Kapitel 15.3 listet die Details dieser Umsetzung auf. Die Aufreinigung erfolgte schlussendlich mit HPLC-DAD (vgl. Kapitel 11.2.1), bevor eine Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie erfolgen konnte.

Auch bei diesem Metaboliten stimmte das experimentell ermittelte Masse-zu-Ladungsverhältnis exakt mit dem gesuchten Wert von *m/z* 488,189 überein. Die Fragmente nach Messung mittels UHPLC-Q-ToF-MS stimmten ebenfalls mit den postulierten Fragmenten überein (vgl.

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

Anhang 33.B). Alle Signale im ^1H -Spektrum konnten erfolgreich der Struktur von EthylFox zugeordnet werden. Das 2D-Spektrum bestätigte des Weiteren die Position der Ethylgruppe an Position N⁷. Die Signalzuordnungen unter Angabe der Kopplungskonstanten J sind in Tabelle 6.5 zusammengefasst.

Tabelle 6.5 Signalzuordnungen im ^1H -Spektrum von 5-CO-CH₃-H₄folat aufgenommen bei 500 Hz; δ = chemische Verschiebung in ppm; J = Kopplungskonstante.

δ [ppm]	Integral	Multiplizität	J [Hz]
7,55	2H	d	9,00
6,51	2H	d	8,96
4,50	1H	d	14,42
4,42	1H	dd	8,25; 4,28
4,17	1H	m	-
3,95	1H	dq	14,29; 7,22
3,86	1H	m	-
3,54	1H	d	15,57
3,27	1H	dq	14,10; 7,18
2,43	2H	qt	15,77; 7,95
2,27	1H	dd	11,95; 6,65
2,09	1H	dt	16,69; 8,42
1,29	3H	t	7,26

6.3 Chemisch-physikalisches Verhalten der synthetisierten C₂-Monoglutamatstandards bei Messungen mittels LC-MS/MS und UHPLC-Q-ToF-MS

Zur Klärung der Identität der folatähnlichen Metabolitenklasse 2 wurden vergleichende Messungen von kultivierten Hefeproben und den synthetisierten Standards durchgeführt.

6.3.1 Analyse von kultivierter Hefe mittels LC-MS/MS

Zunächst wurden die Metabolitenklasse 2 in die quantitative Methode zur Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes mit aufgenommen und anschließend mit Messungen der synthetisierten Standards verglichen.

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

6.3.1.1 Integration der Metabolitenklasse 2 in die LC-MS/MS Methode zur Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes

Zunächst wurden Massenübergänge für das entsprechende Monoglutamat der Metabolitenklasse 2 in die Methode integriert (Tabelle 11.10). Dies konnte erfolgen, da durch die Probenmessungen mittels UHPLC-Q-ToF-MS das Fragmentierungsverhalten dieser Metabolitenklasse bereits bekannt war. Das in die LC-MS/MS Methode integrierte Monoglutamat zeigte im Vergleich zum 5-CH₃-H₄folat eine leicht verzögerte Elution vom Säulenmaterial. Dasselbe Elutionsverhalten konnte bei den Messungen mittels UHPLC-Q-ToF-MS für die Polyglutamate beobachtet werden (vgl. Anhang 34). Beide chromatographischen Trennungen erfolgten auf ARC-18 Säulenmaterial, sodass generell eine gute Vergleichbarkeit beider Trennverfahren angenommen werden konnte. Der Vergleich der Flächenverhältnisse zwischen Analyt und zugesetztem internen Standard zwischen Messungen mittels LC-MS/MS sowie UHPLC-Q-ToF-MS zeigte einen vergleichbaren Verlauf während der Hefekultivierung von TUM 68® (Abbildung 6.13). Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die Implementierung der Massenübergänge in die quantitative LC-MS/MS-Methode erfolgreich war und derselbe Analyt detektiert wurde.

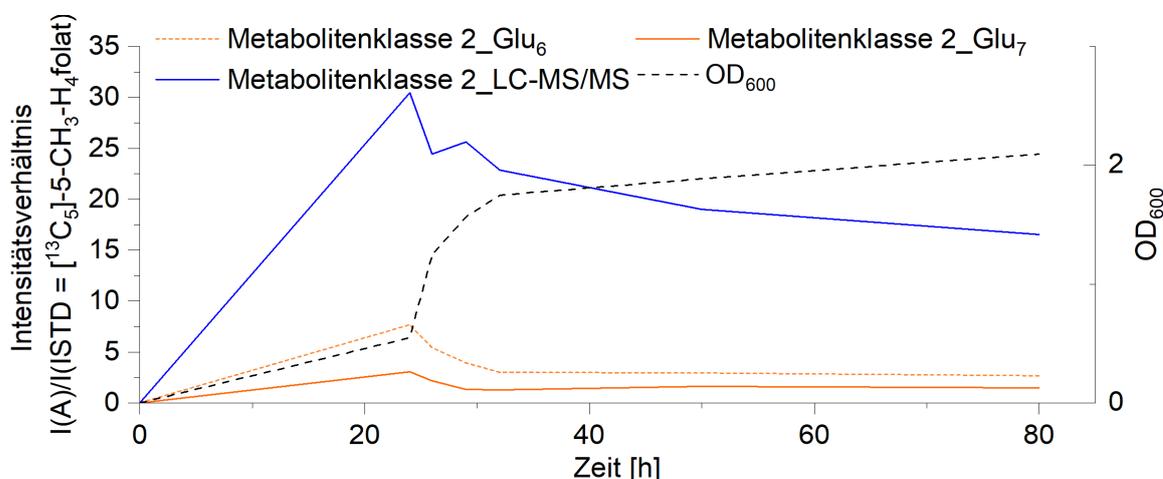


Abbildung 6.13 Vergleich der Flächenverhältnisse der Metabolitenklasse 2 im Verhältnis zum zugesetzten ISTD [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat im zeitlichen Verlauf der Hefekultivierung nach Messung mittels UHPLC-Q-ToF-MS und nach enzymatischer Dekonjugation mittels LC-MS/MS.

6.3.1.2 Vergleichende Messung der synthetisierten Standards und kultivierten Hefeproben

Nach erfolgreicher Integration des unbekanntes Metaboliten wurden ebenfalls die synthetisierten C₂-Metaboliten in die LC-MS/MS-Methode integriert (Tabelle 11.10). Der Vergleich mit den Messungen der Hefe allerdings ergab sowohl für 5-CO-CH₃-H₄folat sowie für EthylFox eine Retentionszeit von etwa 5,0 min. Der gesuchte Analyt hingegen eluierte bei knapp 3,0 min (Ab-

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

bildung 6.14). Demnach konnte es sich bei beiden synthetisierten Standards nicht um die gesuchte Substanz handeln. Zur Bestätigung der Widerlegung wurden die synthetisierten Standards ebenfalls mittels UHPLC-Q-ToF-MS vermessen. Anzumerken ist, dass das synthetisierte 5-CO-CH₃-H₄folat nicht die eigentlich metabolisch aktive Form im Organismus darstellt. Nimmt man jedoch ähnliches chemisch-physikalisches Verhalten an, wie es von den C₁-Formylvitameren bekannt ist, so werden unter den Bedingungen der Probenvorbereitung alle Acetylvitamere in die Form des 5-CO-CH₃-H₄folat interkonvertiert. Somit kann die Synthese des 5-CO-CH₃-H₄folates als ausreichend für eine Widerlegung der Identifizierung des Monoglutamates der Metabolitenklasse 2 angesehen werden.

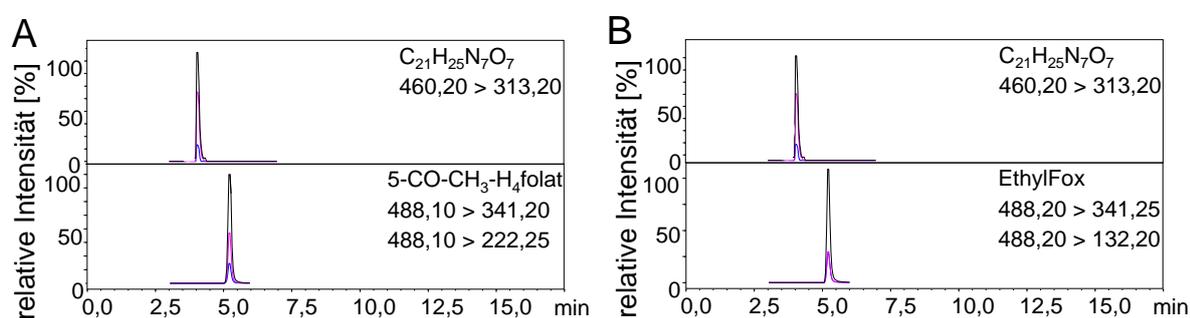


Abbildung 6.14 Chromatogramme der unbekannt Substanz nach enzymatischer Dekonjugation sowie der synthetisierten C₂-Metaboliten nach Messung mittels LC-MS/MS.

- (A) 5-CO-CH₃-H₄folat.
(B) EthylFox.

6.3.2 Vergleichende Analyse der synthetisierten Standards mittels UHPLC-Q-ToF-MS

Die Integration der unbekannt Metabolitenklasse 2 sowie der synthetisierten C₂-Standards in die Quantifizierung mittels LC-MS/MS hatte keine Übereinstimmung der chemisch-physikalischen Eigenschaften ergeben. Um eine zuverlässigere Widerlegung der Theorien zur Identifizierung der unbekannt Substanz zu erreichen, wurden die Standards unter denselben Bedingungen wie zuvor die Proben mittels UHPLC-Q-ToF-MS analysiert. Auch hier ergab sich für beide Standards keine Übereinstimmung im chromatographischen Verhalten im Vergleich zur Metabolitenklasse 2 in der Hexa- und Heptaglutamatform. Der Unterschied im Polyglutamatrest der Metaboliten in den Hefeproben und der synthetisierten Standards konnte die Retentionszeitverschiebung nicht erklären. Im Vergleich zu den Metaboliten in der Hefeprobe zeigten die C₂-Standards eine spätere Elution von + 0,4 min für 5-CO-CH₃-H₄folat sowie + 0,7 min für EthylFox (Abbildung 6.15). Bei den Messungen der synthetisierten 5-CH₃-H₄folat Polyglutamatstandards während der Optimierung der UHPLC-Q-ToF-MS Methode (Abbildung 5.9) aber hatte sich eine leicht verzögerte Elution im Bereich von 0,1 min mit zunehmender Polyglutamatrestlänge gezeigt. Das zugehörige Monoglutamat der Metabolitenklasse 2

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

müsste folglich kurz vor dem Hexa- und Heptaglutamat eluieren, was für beide synthetisierten C₂-Metaboliten nicht der Fall war. Insofern konnte auch mittels UHPLC-Q-ToF-MS gezeigt werden, dass es sich bei der zu identifizierenden Metabolitenklasse 2 weder um den C₂-Metaboliten 5-Acetyl-H₄folat noch um das Oxidationsprodukt EthylFox des C₂-Metaboliten 5-Ethyl-H₄folat handelte. Auch hier muss angemerkt werden, dass der synthetisierte C₂-Metabolit 5-CO-CH₃-H₄folat nicht der metabolisch aktiven Form entspricht. Allerdings ist von dem Isomer 10-CO-CH₃-H₄folat (analog zu den C₁ Formylvitameren) ein sehr identisches Elutionsverhalten anzunehmen, weswegen eine Identifizierung der Metabolitenklasse 2 als 10-CO-CH₃-H₄folat sehr unplausibel erscheint.

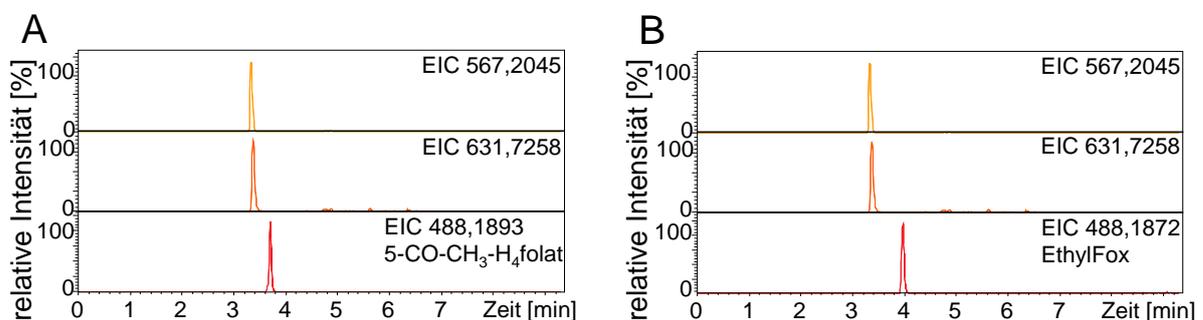


Abbildung 6.15 Chromatogrammspuren des Hexa- und Heptaglutamates der Metabolitenklasse 2 im Vergleich zu den synthetisierten C₂-Metaboliten nach Messung mittels UHPLC-Q-ToF-MS.
(A) 5-CO-CH₃-H₄folat.
(B) EthylFox.

6.4 Diskussion der möglichen Bedeutung des C₂-Metabolismus

Die potentielle Existenz eines Analogons zum C₁-Metabolismus, der dem Transfer von C₂-Einheiten dient, wurde bereits unter Kapitel 6.1.3 ausführlich diskutiert. Nachfolgend soll nun die mögliche Bedeutung dieses C₂-Metabolismus im Organismus unter Bezug auf die im Zuge dieser Arbeit identifizierten Metaboliten erörtert werden.

Analog zum C₁-Metabolismus würde der C₂-Metabolismus der Bereitstellung sowie dem Katabolismus verschiedener Aminosäuren dienen, darunter Alanin, Homoserin sowie Ethionin. Abbildung 6.16 gibt einen Überblick über den mitochondrialen C₁-Metabolismus in Hefenzellen unter Adaption zum C₂-Metabolismus.

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

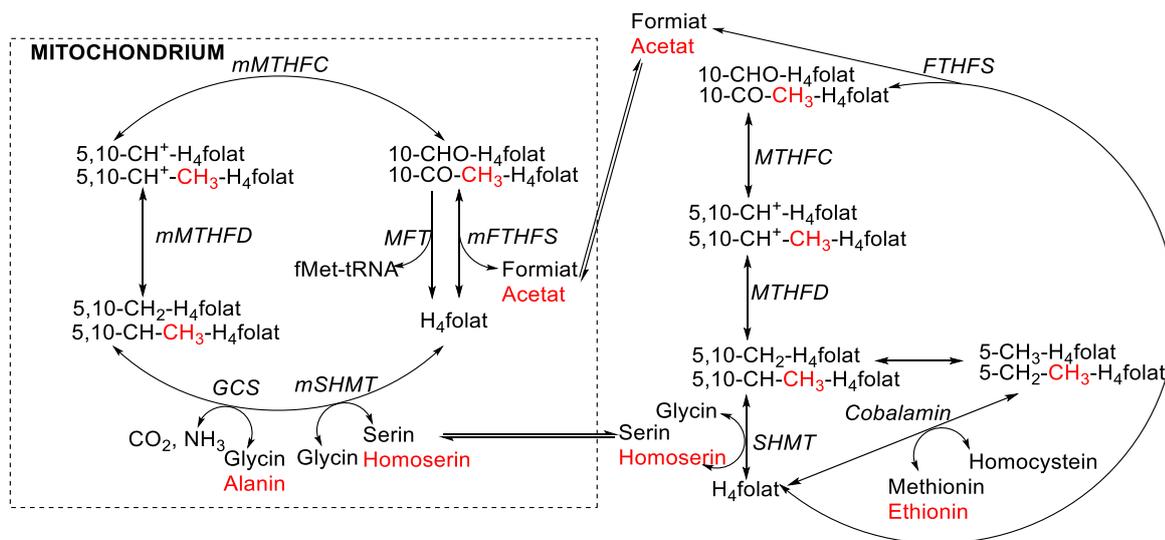


Abbildung 6.16 C₁-Metabolismus in Hefezellen nach Christensen und MacKenzie [2006] unter Adaption zum postulierten C₂-Metabolismus in roter Hervorhebung;

(m)MTHFD = (mitochondrielle) Methenyltetrahydrofolat Dehydrogenase, (m)MTHFC = (mitochondrielle) Methenyltetrahydrofolat Cyclohydrolase, MFT = Methionyl-tRNA Formyltransferase, (m)SHMT = (mitochondrielle) Serin Hydroxymethyltransferase, GCS = Glycin Cleavage System, FTHFS = Formyltetrahydrofolat Synthetase.

Bei Alanin und Homoserin handelt es sich um Aminosäuren, welche im weiteren Sinne am Folatmetabolismus beteiligt sind und somit im Hefeorganismus vorzufinden sind. Im Zuge der Transaminierung von Alanin zu Pyruvat wird die Aminfunktion auf α -Ketoglutarat übertragen, wodurch Glutamat entsteht. [Rehner und Daniel 2010] Letzteres kann sodann mittels FPGS in die Glutamatseitenkette von H₄folat eingeführt werden. Homoserin dagegen stellt eine Zwischenstufe bei der Synthese von Methionin dar. [Matsuo und Greenberg 1955; Strathern et al. 1982] Dieses wiederum ist beteiligt an Methylierungsreaktionen im Organismus und der Regeneration von H₄folat.

Unerwartet aber ist die Beteiligung von Ethionin, welches bislang zwar in Bakterien, nicht aber in Eukaryonten nachgewiesen werden konnte. [Röth et al. 2019] In Hefen konnte gezeigt werden, dass Ethionin als AdoEt (Adenosylethionin), das Homolog von AdoMet aktiviert werden kann. [Colombani et al. 1975; Martínez-Force und Benítez 1994] Zudem konnte gezeigt werden, dass Ethionin im Hefeorganismus auf mitochondrielle RNS übertragen und consequenterweise in Proteine eingebaut werden kann. Die Syntheserate von Proteinen wurde dadurch aber beträchtlich reduziert. Des Weiteren konnte eine deutliche Inhibierung der DNS-Replikation beobachtet werden. [Colombani et al. 1975; Singer et al. 1978; Téllez et al. 1985] Unter Anwesenheit von Ethionin kultivierte Hefen zeigten zudem eine Reduktion von DNS-Reparaturmechanismen [Velloso et al. 1990] sowie eine Einschränkung des Einbaus von Methionin und Leucin in mitochondrielle Translationsprodukte gefolgt von einem eingeschränkten Zellwachstum. [Téllez et al. 1985] Zusammenfassend kann Ethionin als Repressor des Methionin Biosyntheseweges fungieren.

6. Identifizierungsversuche unbekannter Folatverbindungen mittels Metabolic Networking

Für Laktobazillen haben Röth et al. [2019] eine Beteiligung von Ethionin bei der Ethylierung von Histonen postuliert. Histonmodifikationen haben einen Einfluss auf die Genregulation. So inaktiviert eine Histonmethylierung beispielsweise die Genexpression und reduziert die DNS-Methylierung. [Grant 2001; Bannister et al. 2002; Goll und Bestor 2002] Der Einfluss der Histonethylierung aber verbleibt weiter zu untersuchen.

Außer 5,10-CH⁺-CH₃-H₄folat konnten keine weiteren Reaktionspartner des C₂-Metabolismus wie etwa 5-CO-CH₃-H₄folat oder Ethionin in den untersuchten Hefen gefunden werden. Auch Homoserin als mögliche Quelle von C₂-Metaboliten konnte nicht in den Hefen nachgewiesen werden. Lediglich Alanin konnte in Spuren in denjenigen Hefeproben analysiert werden, die während des exponentiellen Wachstums (24 bis 32 h Kultivierung) geerntet wurden. Alanin ist in die Glutamatsynthese und damit verbunden die Folatsynthese involviert. Der Bedarf dieser Aminosäure ist folglich an den erhöhten Folatbedarf während der logarithmischen Wachstumsphase gekoppelt, wodurch der Nachweis dieser Aminosäure während des exponentiellen Wachstums schlüssig erschien. Allerdings konnten mit Verlängerung der Kultivierungsdauer vermehrt 5,10-CH⁺-CH₃-H₄folat Metaboliten identifiziert werden (vgl. Anhang 20.D), was wiederum dem Alaninmaximum während der logarithmischen Wachstumsphase widersprach. Denkbar wäre aber, dass Alanin bevorzugt weitermetabolisiert wird zum 5,10-CH⁺-CH₃-H₄folat und somit mit steigenden Konzentrationen dieses C₂-Metaboliten nicht mehr nachweisbar ist. Demnach scheint von den möglichen C₂-Quellen Acetat, Homoserin und Alanin letzteres die plausibelste Quelle in den untersuchten Hefeproben zu sein.

Insgesamt bleibt die Existenz dieses Metabolismus in Hefen sowie die Herkunft des analysierten 5,10-CH⁺-CH₃-H₄folat weiter fraglich. Auch die zweite zu untersuchende Metabolitenklasse gab keine weiteren Hinweise für die Existenz des C₂-Metabolismus in Hefen. So konnte sowohl für 5-CO-CH₃-H₄folat als auch für EthylFox keine Übereinstimmung mit dem Retentionsverhalten der Metabolitenklasse 2 festgestellt werden. Somit bleibt die Struktur dieser Metabolitenklasse 2 ebenso zu identifizieren wie diejenige der Metabolitenklasse 3, welche als 5-Serin-H₄folat postuliert wurde.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Folate sind eine Gruppe von mehr als 150 strukturell ähnlichen Vitameren, welche den B-Vitaminen zugeordnet werden. Der menschliche Organismus ist nicht in der Lage, diese Vitamere selbst zu synthetisieren, weshalb auf eine ausreichende Zufuhr durch die Nahrung zu achten ist. Daher ist es von hoher Relevanz, zum einen folatreiche Lebensmittel zu identifizieren und zum anderen Synthese und Metabolismus der Folate in diesen Lebensmitteln aufzuklären. Die Folatanalytik stützt sich größtenteils auf die Quantifizierung der Monoglutamatvitamere nach enzymatischer Dekonjugation der entsprechenden Polyglutamate. Eben diese Polyglutamate stellen jedoch die im Organismus hauptsächlich vorkommende Form der Vitamere dar. Ebenso wurde der Folatmetabolismus bislang hauptsächlich auf Ebene der Monoglutamate untersucht. Demnach ist es von Interesse, den Metabolismus der Folate unter Berücksichtigung der Polyglutamate detailliert zu untersuchen. Dazu bieten sich Methoden der Metabolomics an, welche generell versuchen, alle von einem Organismus gebildeten Metaboliten zu untersuchen.

Für die Analyse mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie wurden daher zunächst verschiedene Methoden auf deren Eignung für die spätere Anwendung überprüft. Nach Entwicklung einer alternativen Extraktion mittels des Siedens in gepufferter Ethanolösung konnten allerdings lediglich knapp 20 % der Polyglutamate extrahiert werden. Daher musste diese Methodik als zu ineffizient verworfen werden und auf die klassische Extraktion durch Kochen in Pufferlösung zurückgegriffen werden. Abhängig von den Bedingungen der Probenextraktion wird in der Literatur zudem von Verschiebungen der Vitamerenverteilung sowie Oxidationsreaktionen berichtet. Um letztere zu untersuchen, wurde daher zunächst das Oxidationsprodukt MeFox in die bestehende SIVA-Methode zur Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes integriert. Anschließend wurden verschiedene Aufreinigungsmethoden mittels Festphasenextraktion auf deren Eignung für die Folatanalytik untersucht. Die Analyse der Polyglutamate ergab keine Diskriminierung basierend auf der Länge des Glutaminsäurerestes, obwohl auch davon in der Literatur berichtet wird. In Abhängigkeit des gewählten Festphasenmaterials und damit des pH-Wertes während der Probenaufreinigung konnte allerdings eine Verschiebung der Formylvitamere sowohl auf Monoglutamat- als auch auf Polyglutamatebene beobachtet werden. Es ist anzunehmen, dass diese Verschiebung Interkonversionsreaktionen zum 5,10-CH⁺-H₄folat zuzuschreiben ist, welche bei der klassischen Aufreinigung mittels Anionentauschern zugunsten des 5-CHO-H₄folates liegen. Zudem konnten mit Erniedrigung des pH-Wertes vermehrt Oxidationsreaktionen der Polyglutamate beobachtet werden.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Kultivierungsexperimente von Hefen hatten gezeigt, dass die höchsten Folatgehalte im Organismus während der exponentiellen Wachstumsphase zu beobachten sind. Allerdings mangelte es diesen Untersuchungen an der Analytik weiterer Vitamere neben den Hauptvitameren 5-CH₃-H₄folat sowie H₄folat. Im Zuge dieser Arbeit wurden des Weiteren das biologisch aktive 5-CHO-H₄folat sowie die Oxidationsprodukte MeFox, PteGlu und 10-CHO-PteGlu untersucht. Auch die Kultivierungen dieser Arbeit zeigten einen maximalen Gesamtfolatgehalt von 13.200 µg/100 g während des logarithmischen Wachstums der analysierten Brauhefe, welcher auf 6.000 µg/100 g nach 80 h Kultivierungsdauer sank. Entgegen aller anderen Vitamere nahm die Konzentration an 5-CHO-H₄folat im Verlauf der Kultivierung stetig zu, sodass für dieses Vitamer eine Akkumulation in Form eines Folatspeichers innerhalb des Organismus angenommen werden kann. Die Analyse der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate identifizierte das Hexa- und Heptaglutamat als die Hauptvitamere. Mit Übergang in die stationäre Wachstumsphase konnte eine Verschiebung des Hauptvitameres vom Hexa- zum Heptaglutamat beobachtet werden, was auch alle anderen Vitamere betraf. Folglich kann angenommen werden, dass mit sinkendem Folatbedarf in der Zelle eine weitere Verlängerung des Polyglutamates einhergeht. Dies könnte eine verringerte Aktivität von folatabhängigen Enzymen zur Folge haben und somit den Folatgehalt im Organismus herunterregulieren.

Die gewonnenen Erkenntnisse wurden angewandt auf Untersuchungen mittels (ultra-)hochauflösender Massenspektrometrie. Sowohl FT-ICR-MS als auch UHPLC-Q-ToF-MS Messungen benötigten die Probenaufreinigung und -konzentration mittels Festphasenextraktion. Einfache „*dilute and shoot*“ Methoden konnten keine ausreichende Folatextraktion gewährleisten. Zudem machten Matrixeffekte eine Folatdetektion unmöglich. FT-ICR-MS stellte sich aus mehreren Gründen als eine nicht geeignete Methodik für die Folatanalytik heraus. Zum einen war lediglich eine Kompatibilität mit der Aufreinigung mit HLB-Kartuschen gegeben, welche eine geringere Effektivität der Folatretention lieferten als die klassischen Anionentauscher. Gravierender allerdings war die Einschränkung der Datenauswertung. Hauptvertreter der Folate im Organismus sind Polyglutamate mit Molmassen oberhalb von 1100 Da. Mit steigender Masse der Ionen aber sinkt die Massengenauigkeit der FT-ICR-MS Messung. Eben diese aber stellt den entscheidenden Vorteil der FT-ICR-MS dar, welche für gewöhnlich bei < 1ppm liegt und somit Annotationen der Elementarzusammensetzung ermöglicht. Des Weiteren ionisierten die Polyglutamate bevorzugt mit Mehrfachladung. Zwar sank damit das experimentelle Masse-zu-Ladungsverhältnis, was im Gegenzug die Massengenauigkeit erhöhte. Jedoch berücksichtigen alle Auswertetools lediglich einfach geladene Spezies, während Mehrfachladungen im Zuge der Datenbereinigung entfernt werden. UHPLC-Q-ToF-MS dagegen liefert eine geringere Massengenauigkeit sowie Auflösung, generiert dafür allerdings Fragmentspektren, wel-

7. Zusammenfassung und Ausblick

che zur Strukturaufklärung herangezogen werden können. Die vorgeschaltete säulenchromatographische Trennung vermindert zudem Matrixeffekte und gibt weitere Auskünfte über mögliche Strukturbestandteile und deren Polarität. Ein weiterer Vorteil liegt in der Auftrennung von Isomeren, welche im Folatbereich vermehrt zu finden sind. Zudem ist eine Kompatibilität mit der klassischen Aufreinigung mit Anionentauschern gegeben. Diese konnte im Vergleich zu den alternativen Festphasenmaterialien durch die höchsten Signalintensitäten überzeugen. Daher wurde dieses Material für die Probenvorbereitung der kultivierten Brauhefe herangezogen. Neben den bereits bekannten Vitameren wurden in den Brauhefen mittels UHPLC-Q-ToF-MS zudem die Oxidationsprodukte 4-OH-5-CH₃-H₄folat, 5-CH₃-H₂folat, H₂folat, 5,10-CH₂-H₄folat sowie 10-CHO-H₂folat als Hexa- und Heptaglutamat identifiziert.

Zuletzt wurden anhand der hochaufgelösten, massenspektrometrischen Fragmentierungsdaten der kultivierten Brauhefe Netzwerkanalysen durchgeführt. Diese beruhten auf Gemeinsamkeiten im Fragmentierungsverhalten der gemessenen Metaboliten. Mit Hilfe der Plattform GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) konnte für jeden untersuchten Kultivierungszeitpunkt ein solches Netzwerk generiert werden, welches zwischen 60 und 90 % bekannter Folatvitamere enthielt. Innerhalb der verbleibenden Metaboliten konnten drei Metabolitenklassen als Hexa- und Heptaglutamate identifiziert werden, welche sich im Verlauf der Kultivierung folatähnlich verhielten. Diese konnten als der C₂-Metabolit 5,10-CH⁺-CH₃-H₄folat sowie ein weiterer potentieller C₂-Metabolit identifiziert werden. Letzterer unterscheidet sich von 5-CH₃-H₄folat durch eine weitere, eingeführte CO-Gruppe. Diese zweite Metabolitenklasse konnte allerdings weder als 5-CO-CH₃-H₄folat noch als EthylFox, dem Oxidationsprodukt von 5-CH₂-CH₃-H₄folat, identifiziert werden. Auch in den experimentellen Daten konnte letzteres nicht identifiziert werden, womit die Existenz des C₂-Metabolismus ungeklärt bleibt. Die dritte Metabolitenklasse wurde als 5-Serin-H₄folat annotiert, konnte allerdings nicht weiter identifiziert werden.

Die tiefergehende Untersuchung des C₂-Metabolismus sowie der metabolischen Zwischenstufe 5-Serin-H₄folat wird auch zukünftig Potential für weitere Analysen bieten, um den Metabolismus der Folate noch umfassender nachvollziehen zu können. Studien mit mikrobiologischen Assays könnten Aufschluss geben über die biologische Relevanz und Umsetzung dieser Metaboliten. Des Weiteren verbleibt die Identität der zweiten Metabolitenklasse zu klären. Durch Screening verschiedener Lebensmittel könnte ein Organismus mit hohen Konzentrationen dieses Metaboliten identifiziert werden. Aus diesem Organismus könnte sodann der unbekannt Metabolit extrahiert und strukturell aufgeklärt werden.

8 Summary

Folates are a group of more than 150 structurally similar vitamers which belong to the group of B-vitamins. The human organism is not capable of synthesizing this vitamin group. That is why it is important to ensure sufficient dietary supply. Therefore, it is of high significance, on the one hand, to identify foods rich in folate and, on the other hand, to unravel synthesis and metabolism of folates in these foods. Folate analysis mainly focuses on monoglutamates after enzymatic deconjugation of the corresponding polyglutamates. The latter, however, represent the major occurring form in the organism. Furthermore, the folate metabolism has mainly been examined on monoglutamate level. Consequently, it is of interest to analyze this metabolism in more detail with focus on the polyglutamates. To do so, the methods of metabolomics are a promising tool which generally aim at analyzing all metabolites generated by an organism.

For the latter analysis by (ultra-)high-resolution mass spectrometry, different methods were tested at the beginning. After development of an alternative extraction procedure applying simmering in buffered ethanol solution, only about 20% of the polyglutamates could be extracted. Thus, this method had to be discarded due to its inefficiency and had to be replaced by the classic extraction applying boiling in buffer solution. In dependence on the conditions during sample preparation, a shift of the vitamer distribution and the occurrence of oxidation reactions is being reported. To examine the latter, the oxidation product MeFox was integrated into the SIDA (stable isotope dilution analysis)-method. Afterwards, different solid phase extraction procedures were tested for their applicability for folate analysis. The polyglutamate analysis did not unravel any discrimination based on the length of the polyglutamate tail even though this has been reported in the literature. In dependence of the chosen solid phase extraction material and thus the pH during sample preparation, however, a shift of the formyl vitamers could be identified on both, monoglutamate and polyglutamate level. It has to be expected that this shift can be traced back to interconversion reactions into 5,10-CH⁺-H₄folate. Hence, the classical purification applying anion exchange cartridge shifts this interconversion towards the 5-CHO-H₄folate. Furthermore, lowering the pH resulted in an increase of oxidation reactions of polyglutamates occurring.

Cultivation experiments of yeast had shown that higher folate contents in organisms can be observed during the exponential growth phase. Those analyses, however, lacked in the determination other vitamers than the main vitamers 5-CH₃-H₄folat and H₄folate. Therefore, in course of this thesis further vitamers such as the metabolic active 5-CHO-H₄folate and the oxidation products MeFox, PteGlu, and 10-CHO-PteGlu were analyzed. A maximum of a total

8. Summary

folate content of 13.200 µg/100 g during logarithmic growth could be observed for these analyses as well. After 80 h of cultivation, those contents dropped to 6.000 µg/100 g in the analyzed brewer's yeasts. Unlike the other vitamers, concentrations of 5-CHO-H₄folate constantly increased during cultivation. Thus, an accumulation in form of a folate storage can be expected. The analysis of the 5-CH₃-H₄folate polyglutamates unraveled the hexa- and heptaglutamate as the mainly occurring folates. With transition into the stationary growth phase, a shift from the hexa- to the heptaglutamate could be observed for all the polyglutamate vitamers analyzed. Consequently, it can be suspected that decreasing need for folates within the cell corresponds with further elongation of the polyglutamate tail. This could result in reduced activity of folate dependent enzymes and thus could downregulate the folate content within the organism.

The generated knowledge was applied to analyses using (ultra-)high-resolution mass spectrometry. Both techniques, FT-ICR-MS as well as UHPLC-Q-ToF-MS, needed sample purification and concentration applying solid phase extraction. A simple "*dilute and shoot*" method could not provide sufficient folate extraction. Additionally, matrix effects made a folate detection impossible. Due to several reasons FT-ICR-MS turned out not to be a suitable method for folate analysis. For a start, only a compatibility with the HLB-cartridges was given which provided reduced efficiency of folate retention in comparison to the classic anion exchange cartridges. More severe, however, were the restrictions in data analysis. Main occurring folates in the organism are polyglutamates with molar masses above 1100 Da. Albeit, with increasing mass of the generated ions, the mass accuracy of the FT-ICR-MS measurement will drop significantly. Yet the latter represents the outstanding advantage of FT-ICR-MS usually ranging below 1 ppm and thus enabling annotations of elemental compositions. Furthermore, polyglutamates preferentially ionized in multiple charged state. As a result, the experimental mass-to-charge ratio was admittedly reduced resulting in increased mass accuracy. However, all data analysis tools only account for single charged states and multiple charged states will be removed during data clean-up. UHPLC-Q-ToF-MS, on the other hand, is characterized by a lower mass accuracy and resolution, but is able to generate fragmentation spectra. The latter can be used for structural identification. Additionally, the preceding chromatographic separation reduces matrix effects and provides further information about structural components and their polarity. Another advantage lies in the separation of isomers, which can increasingly be found in the field of folates. Moreover, compatibility with classical anion exchange cartridges was given. Due to the highest signal intensities after application of the latter material, this was used for sample preparation of the cultured brewer's yeast. Besides the already known vitamers, several more oxidation products such as 4-OH-5-CH₃-H₄folate, 5-CH₃-H₂folate, H₂folate,

5,10-CH₂-H₄folate as well as 10-CHO-H₂folate could be identified in the brewer's yeast as hexa- and heptaglutamates.

At last, the high-resolution fragmentation data of the cultured yeasts were used for network analyses searching for similarities within the fragmentation behavior of the measured metabolites. Applying the platform GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking), for each of the analyzed time points of cultivation, a networking could be generated consisting of 60 to 90% of already known folate vitamers. Within the remaining metabolites, three metabolite classes could be identified as hexa- and heptaglutamate showing folate like behavior during yeast cultivation. These could be identified as the C₂-metabolite 5,10-CH⁺-CH₃-H₄folate as well as a further potential C₂-metabolite differing from 5-CH₃-H₄folate by a further introduced CO-group. The second metabolite class, however, could neither be identified as 5-CO-CH₃-H₄folate nor as EthylFox, the oxidation product of 5-CH₂-CH₃-H₄folate. The latter could also not be found within the experimental data, rendering the existence of the C₂-metabolism questionable. The third metabolite class was annotated as 5-serine-H₄folate but could not be further identified.

The detailed analysis of the C₂-metabolism and the intermediate 5-serine-H₄folate gives potential for further analyses to unravel the metabolism of folates in more depth. Studies with microbiological assays could provide information about the biological relevance and turn-over of these metabolites. Moreover, the second metabolite class remains to be identified. By screening different foods an organism producing high amounts of this metabolite could be found. This organism could then be used to extract the unknown metabolite and help to elucidate its structural identity.

Teil III MATERIALIEN UND METHODEN

9 Chemikalien, Reagenzien, Testmaterialien

9.1 Chemikalien

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Hydrat (MES)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-Octanol	Alfa Aesar, Ward Hill, MS, USA
2-Propanol LiChrosolv (for LC-MS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
α -Cellulose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Acetaldehydlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril HiPerSolv CHROMANORM	VWR Chemicals International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril HiPerSolv CHROMANORM (LC-MS grade)	VWR Chemicals International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril LiChrosolv (for LC-MS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Aktivkohle	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ameisensäure ≥ 99 % HiPerSolv CHROMANORM (LC-MS grade)	VWR Chemicals International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure > 99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ammoniak 25 % (LC-MS grade)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Arginin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bacto Peptone	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Biotin	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Calciumdichlorid (anh.)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chicken Pancreas	Becton Dickinson & Co, Sparks, NJ, USA
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dithiothritol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
D-Pantothensäure-hemicalciumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eisensulfat Heptahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 99 % HiPerSolv CHROMANORM (LC-MS grade)	VWR Chemicals International GmbH, Darmstadt, Deutschland

9. Chemikalien, Reagenzien, Testmaterialien

Ethanol	VWR Chemicals International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumiodid	VWR Chemicals International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kupfersulfat Pentahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-Ascorbinsäure	VWR Chemicals International GmbH, Darmstadt, Deutschland
LC/MS tuning, mix, for ESI	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Leucin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Threonin	SERVA Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland
L-Valin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magnesiumsulfat Heptahydrat	VWR Chemicals International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mangansulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol HiPerSolv CHROMANORM	VWR Chemicals International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol HiPerSolv CHROMANORM (LC-MS-grade)	VWR Chemicals International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol CHROMASOLV™ (for LC-MS)	Honeywell International Inc. Morristown, NJ, USA
Myo-Inositol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumacetat-Trihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumborhydrid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	VWR Chemicals International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	VWR Chemicals International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriummolybdat Dihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Nicotinsäure	Supelco, Bellefonte, PA; USA
Ölsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Palladium (10 % Pd) Hydrierungskatalysator	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

9. Chemikalien, Reagenzien, Testmaterialien

Pyridoxin Hydrochlorid	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Rattenserum	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim, Deutschland
Riboflavin	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Salzsäure (37 %)	VWR Chemicals International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Thiamin Hydrochlorid	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Tris base (2-Amino-2-(hydroxymehtyl)-propan-1,3-diol)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Wasser HiPerSolv CHROMANORM	VWR Chemicals International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasser HiPerSolv CHROMANORM (LC-MS-grade)	VWR Chemicals International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasser (Milipore)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid (30 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Yeast extract for use in microbial growth medium	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Zinksulfat Monohydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

9.2 Referenzsubstanzen

(6S)-5,6,7,8-Tetrahydrofolat	Schircks Laboratories, Jona, Schweiz
(6R,S)-5-Methyl-5,6,7,8-Tetrahydrofolat-Calciumsalz	Schircks Laboratories, Jona, Schweiz
(6R,S)-5-Formyl-5,6,7,8-Tetrahydrofolat-Calciumsalz	Schircks Laboratories, Jona, Schweiz
(6R,S)-5,10-Methenyl-5,6,7,8-Tetrahydrofolat	Schircks Laboratories, Jona, Schweiz
10-Formyl-Pteroylmonoglutamat	Schircks Laboratories, Jona, Schweiz
L-Mefox	Merck & Cie, Schaffhausen, Schweiz
Pteroylmonoglutamat	Schircks Laboratories, Jona, Schweiz
Pteroyldi- γ -L-glutaminsäure, Ammoniumsalz	Schircks Laboratories, Jona, Schweiz
Pteroyltri- γ -L-glutaminsäure, Ammoniumsalz	Schircks Laboratories, Jona, Schweiz
Pteroyltetra- γ -L-glutaminsäure, Ammoniumsalz	Schircks Laboratories, Jona, Schweiz
Pteroylpenta- γ -L-glutaminsäure, Ammoniumsalz	Schircks Laboratories, Jona, Schweiz
Pteroylhexa- γ -L-glutaminsäure, Ammoniumsalz	Schircks Laboratories, Jona, Schweiz
Pteroylhepta- γ -L-glutaminsäure, Ammoniumsalz	Schircks Laboratories, Jona, Schweiz
[¹³ C ₅]-5-Formyltetrahydrofolat	Merck KGaA, Schaffhausen, Schweiz
[¹³ C ₅]-5-Methyltetrahydrofolat	Merck KGaA, Schaffhausen, Schweiz
[¹³ C ₅]-L-Pteroylmonoglutmat	Merck KGaA, Schaffhausen, Schweiz
[¹³ C ₅]-Tetrahydrofolat	Merck KGaA, Schaffhausen, Schweiz

10. Lösungen, Puffer, Standardlösungen, Enzyme, Kultivierungslösungen

9.3 Testmaterialien

Analysierte Lebensmittel

Biohefe, Rewe Bio, REWE Markt GmbH, Köln, Deutschland

Hefe, F.X. Wieninger GmbH, Passau, Deutschland

Trockenhefe, RUF, Quakenbrück, Deutschland

Kultivierter Hefestamm

TUM 68®, Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität (Technische Universität München), Deutschland

10 Lösungen, Puffer, Standardlösungen, Enzyme, Kultivierungslösungen

10.1 Lösungen und Puffer

Lösungen für die Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes in Hefen

Extraktionspuffer 1

4,265 g MES-Hydrat (200 mM) und 2 g Ascorbinsäure (114 mM) in destilliertem Wasser lösen, mit Natronlauge (5 M) auf pH 5 einstellen und nach Zugabe von 0,1 g DTT (6,5 mM) auf 100 mL auffüllen.

Phosphatpuffer

1,78 g Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (100 mM, Lösung A) sowie 1,36 g Kaliumdihydrogenphosphat (100 mM, Lösung B) jeweils in 100 mL destilliertem Wasser lösen. Anschließend Lösung A mit Lösung B auf einen pH-Wert von pH 7 ansäuern.

Equilibrierungspuffer 1 für die Kartuschenaufreinigung

Phosphatpuffer (100 mM) mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen (10 mM) und mit 0,02 g DTT (1,3 mM) versetzen.

Elutionspuffer 1

5 g NaCl (856 mM), 1,361 g Natriumacetat Trihydrat (100 mM), 0,1 g DTT (6,5 mM) und 1 g Ascorbinsäure (56,8 mM) auf 100 mL mit destilliertem Wasser auffüllen.

10. Lösungen, Puffer, Standardlösungen, Enzyme, Kultivierungslösungen

Lösungen für die Aufreinigung mittels verschiedener Festphasenmaterialien

Extraktionspuffer 2

0,87 g Dikaliumhydrogenphosphat (50 mM), 0,112 g EDTA (3,8 mM) und 2 g Ascorbinsäure (114 mM) in 100 mL destilliertem Wasser lösen. 0,1 g DTT (6,5 mM) zur Lösung geben und mit Natronlauge (5 M) einen pH-Wert von 5 einstellen.

Phosphatpuffer, Equilibrierungspuffer 1

Die Herstellung erfolgt analog zu den Pufferlösungen für die Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes.

Equilibrierungspuffer 2 (pH 2)

Den pH-Wert von Equilibrierungspuffer 1 mit konzentrierter Ameisensäure auf pH 2 einstellen.

Waschlösung 1 (Wasser pH 2)

Destilliertes Wasser (Milli-Q für HR-MS) mit Ameisensäure auf pH 2 einstellen.

Waschlösung 2 (Wasser pH 5)

Destilliertes Wasser (Milli-Q für HR-MS) mit Ameisensäure auf pH 5 einstellen.

Waschlösung 3

5 mL Methanol mit 100 µL Ameisensäure (0,1 %) versetzen und mit destilliertem Wasser (Milli-Q für HR-MS) auf 100 mL auffüllen.

Elutionslösung 1

20 mL Acetonitril mit 5 mL Ameisensäure (5 %) versetzen und mit destilliertem Wasser (Milli-Q für HR-MS) auf 100 mL auffüllen.

Elutionslösung 2

20 mL Acetonitril mit 100 µL Ameisensäure (0,1 %) versetzen und mit destilliertem Wasser (Milli-Q für HR-MS) auf 100 mL auffüllen.

Elutionslösung 3

Methanol (LC-MS grade) für die Elution verwenden.

Elutionslösung 4

20 mL Acetonitril mit 10 mL Ammoniak (25 %) versetzen und mit destilliertem Wasser (Milli-Q für HR-MS) auf 100 mL auffüllen.

10. Lösungen, Puffer, Standardlösungen, Enzyme, Kultivierungslösungen

Lösungen für die Bestimmung der Polyglutamate in Hefen

Extraktionspuffer 2

Die Herstellung erfolgt analog zur Aufreinigung mittels verschiedener Festphasenmaterialien.

Phosphatpuffer und Equilibrierungspuffer 1

Die Herstellung erfolgt analog zu den Pufferlösungen für die Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes.

Elutionspuffer 2

10 g NaCl (1,7 M), 1,361 g Natriumacetat Trihydrat (100 mM), 0,1 g DTT (6,5 mM) und 1 g Ascorbinsäure (56,8 mM) auf 100 mL mit destilliertem Wasser auffüllen.

Lösungen für die alternative Aufreinigung mittels des Siedens in gepufferter Ethanollösung

Extraktionspuffer 3 (gepuffert Ethanollösung mit HEPES-Puffer)

0,238 g 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES, 100 mM) und 0,2 g Ascorbinsäure (114 mM) in 10 mL destilliertem Wasser lösen. 0,01 g DTT (6,5 mM) zur Lösung geben mit Natronlauge (5 M) einen pH-Wert von pH 7,85 einstellen. Die hergestellte Pufferlösung mit 105 mL Ethanol mischen.

Extraktionspuffer 4 (gepufferte Ethanollösung mit Phosphatpuffer)

0,087 g Dikaliumhydrogenphosphat (50 mM) und 0,2 g Ascorbinsäure (114 mM) in 10 mL destilliertem Wasser lösen. 0,01 g DTT (6,5 mM) zur Lösung geben und mit Natronlauge (5 M) einen pH-Wert von pH 5 einstellen. Die hergestellte Pufferlösung mit 105 mL Ethanol mischen.

Phosphatpuffer, Equilibrierungspuffer 1 und Elutionspuffer 2

Die Herstellung erfolgt analog zu den Pufferlösungen für die Bestimmung der Polyglutamate in Hefen.

Lösungen der Methodenentwicklung der Aufreinigung mittels alternativer Festphasenmaterialien

Vor Verwendung die Festphasenmaterialien konditionieren durch Auftragen von zwei Säulenvolumina Methanol sowie zwei Säulenvolumina der entsprechenden verwendeten Waschlösung. Proben auf einen pH-Wert entsprechend der verwendeten Waschlösung einstellen durch Zugabe von konzentrierter Ameisensäure. Nach dem Waschen die Kartuschen trocken saugen und mit 2 – 6 mL Elutionslösung eluieren. In der nachfolgenden Tabelle 10.1 sowie Tabelle 10.2 sind die im Verlauf dieser Arbeit verwendeten Wasch- und Elutionslösungen gelistet.

10. Lösungen, Puffer, Standardlösungen, Enzyme, Kultivierungslösungen

Tabelle 10.1 Verwendete Testwaschlösungen während der Methodenentwicklung der Aufreinigung mittels verschiedener Festphasenmaterialien.

SPE-Material	Verwendete Testwaschlösung	Fortlaufende Bezeichnung
SAX	Equilibrierungspuffer 1	Testwaschlösung 1
C18	Equilibrierungspuffer 1	Testwaschlösung 2
C18	Equilibrierungspuffer 2	Testwaschlösung 3
NH ₂	Wasser	Testwaschlösung 4
NH ₂	Methanol	Testwaschlösung 5
MAX	5% Ammoniaklösung	Testwaschlösung 6
Phenyl	Equilibrierungspuffer 1	Testwaschlösung 7
HLB	Equilibrierungspuffer 2	Testwaschlösung 8

Tabelle 10.2 Verwendete Testwaschlösungen während der Methodenentwicklung der Aufreinigung mittels verschiedener Festphasenmaterialien.

SPE-Material	Verwendete Testwaschlösung	Fortlaufende Bezeichnung
SAX	Methanol + 1 % Ameisensäure	Testelutionslösung 1
SAX	50 % Methanol + 1 % Ameisensäure	Testelutionslösung 2
SAX	50 % Methanol + 0,1 % Ameisensäure	Testelutionslösung 3
SAX	50 % Methanol + 5 % Ameisensäure	Testelutionslösung 4
SAX	20 % Methanol + 5 % Ameisensäure	Testelutionslösung 5
SAX	20 % Acetonitril + 5 % Ameisensäure	Testelutionslösung 6
C18	Acetonitril/Methanol/Wasser (26/14/60, v/v/v)	Testelutionslösung 7
C18	50 % Methanol	Testelutionslösung 8
C18	50 % Acetonitril + 1 % Ameisensäure	Testelutionslösung 9
C18	10 % Acetonitril + 0,1% Ameisensäure	Testelutionslösung 10
C18	15 % Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure	Testelutionslösung 11
C18	20 % Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure	Testelutionslösung 12
C18	20 % Acetonitril + 1 % Ameisensäure	Testelutionslösung 13
C18	20 % Acetonitril + 5 % Ameisensäure	Testelutionslösung 14
C18	20 % Methanol + 0,1 % Ameisensäure	Testelutionslösung 15
NH ₂	Methanol + 1 % Ammoniak	Testelutionslösung 16
NH ₂	Methanol + 1 % Ameisensäure	Testelutionslösung 17
NH ₂	50 % Acetonitril + 1 % Ammoniak	Testelutionslösung 18
MAX	Methanol + 1 % Ameisensäure	Testelutionslösung 19
Phenyl	40 % Acetonitril	Testelutionslösung 20
HLB	Methanol	Testelutionslösung 21
HLB	Acetonitril	Testelutionslösung 22

10. Lösungen, Puffer, Standardlösungen, Enzyme, Kultivierungslösungen

Lösungen zur Synthese von 5-Acetyl-H₄folat

Synthesepuffer 1

0,89 g (50 mM) Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, 0,1 g (6,5 mM) DTT und 1 g (57 mM) Ascorbinsäure mit destilliertem Wasser auf 100 mL auffüllen (Lösung 1). 0,64 g (50mM) Kaliumdihydrogenphosphat, 0,1 g (6,5 mM) DTT und 1 g (57 mM) Ascorbinsäure mit destilliertem Wasser auf 100 mL auffüllen. Lösung 1 mit Lösung 2 auf pH 3,6 einstellen.

Eduktlösung 1

4,4 mg H₄folat in 10 mL Synthesepuffer 1 lösen.

Lösungen zur Synthese von 5-Ethyl-H₄folat

Synthesepuffer 2

1,78 g (100 mM) Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat mit destilliertem Wasser auf 100 mL auffüllen (Lösung A), 1,36 g (100 mM) Kaliumdihydrogenphosphat mit destilliertem Wasser auf 100 mL auffüllen (Lösung B). Lösung A mit Lösung B auf pH 7 ansäuern. 50 mL des so hergestellten Phosphatpuffers mit 20 g (2,28 M) Ascorbinsäure versetzen und mit Natronlauge (5 M) auf pH 7,8 einstellen.

Synthesepuffer 3

0,80 g (66 mM) Tris mit destilliertem Wasser auf 100 mL auffüllen und mit Salzsäure (5 M) auf pH 7,8 einstellen.

Essigsäure (5 M)

28,7 mL Eisessig mit destilliertem Wasser auf 100 mL auffüllen.

Eduktlösung 2

4,4 mg PteGlu einwiegen und in 15 mL Synthesepuffer 2 lösen.

Lösung zur Oxidation von 5-CH₃-H₄PteGlu₇ und 5-Ethyl-H₄folat

Natriumthiosulfatlösung

1,58 g (100 mM) Natriumthiosulfat in 100 mL destilliertem Wasser lösen.

10.2 Standardlösungen

Analytlösungen für die Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes

Die Analytlösungen werden an jedem Aufarbeitungstag frisch hergestellt. Dazu 10 mg PteGlu in 10 mL Phosphatpuffer lösen und mit Extraktionspuffer 1 auf 100 mL auffüllen. 2 mg der übrigen Analyten (10-CHO-PteGlu, 5-CH₃-H₄folat, 5-CHO-H₄folat, H₄folat, MeFox) jeweils in

10. Lösungen, Puffer, Standardlösungen, Enzyme, Kultivierungslösungen

3 mL Phosphatpuffer lösen und mit Extraktionspuffer 1 auf 10 mL auffüllen. Jeweils 400 µL der jeweiligen Analyt-Stammlösung mit 400 µL PteGlu-Stammlösung und 200 µL Extraktionspuffer 1 mischen und mittels HPLC-DAD vermessen. Die Konzentrationen über die jeweiligen Kalibrierfunktionen und die Einwaage von PteGlu bestimmen.

Analytlösung für die Erstellung der MeFox-Kalibrierfunktion mittels HPLC-DAD

10 mg PteGlu in 10 mL Phosphatpuffer lösen und mit Extraktionspuffer 1 auf 100 mL auffüllen. 2 mg MeFox in 3 mL Phosphatpuffer lösen und mit Extraktionspuffer 1 auf 10 mL auffüllen. Die Kalibrierfunktion für einen Bereich von $n(A)/n(ISTD)$ zwischen 0,1 – 1,0 erstellen. Dazu 200 µL der PteGlu-Stammlösung mit 100 – 800 µL der MeFox-Stammlösung mischen, mit Extraktionspuffer 1 auf 1 mL auffüllen und mittels HPLC-DAD vermessen.

Analytlösungen für die Bestimmung der Konzentration der synthetisierten 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate (2-7)

10 mg PteGlu in 100 mg sowie 2 mg 5-CH₃-H₄folat in 10 mL Synthesepuffer 3 lösen. 400 µL PteGlu und 400 µL 5-CH₃-H₄folat mit 200 µL Synthesepuffer 3 mischen und an der HPLC-DAD vermessen. Aus den Stammlösungen die Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 herstellen und die Kalibrierfunktionen an der HPLC-DAD vermessen.

Analytlösungen für die Methodenentwicklung der alternativen Festphasenaufreinigung

Die Analytlösungen der Monoglutamatstandards 10-CHO-PteGlu, 5-CH₃-H₄folat, 5-CHO-H₄folat sowie H₄folat herstellen wie für die Gesamtfolatgehaltsbestimmung erläutert. 50 µL einer jeden Analytlösung mischen und mit Extraktionspuffer 1 auf 10 mL auffüllen. Vor Aufreinigung mittels verschiedener Festphasenmaterialien 10 mL Acetonitril zugeben.

Lösungen der Mono- und Polyglutamatanalyten für die Methodenoptimierung am FT-ICR-MS

Jeweils 1 mg der Monoglutamatstandards (10-CHO-PteGlu, 5-CH₃-H₄folat, 5-CHO-H₄folat, H₄folat und PteGlu) sowie 1 mg des Polyglutamatstandards PteGlu₄ in 20 mL Acetonitril/Wasser (50/50, v/v) lösen und kurz vor der Messung mit Methanol 1: 50 verdünnen.

Lösungen der Mono- und Polyglutamatanalyten für die Methodenoptimierung am UHPLC-Q-ToF-MS

100 µL der verdünnten Analytlösungen ($c = 0,01$ mg/mL) von 10-CHO-PteGlu, 5-CH₃-H₄folat, 5-CHO-H₄folat, H₄folat sowie PteGlu mit 100 µL Elutionspuffer 1 mischen und mittels UHPLC-Q-ToF-MS vermessen. Die synthetisierten Polyglutamatstandards in einem Verhältnis miteinander mischen, sodass eine Konzentration eines jeden Analyten von 1 µg/mL erzielt wird und die Mischung ebenfalls mittels UHPLC-Q-ToF-MS vermessen.

10. Lösungen, Puffer, Standardlösungen, Enzyme, Kultivierungslösungen

Lösungen der internen Standards für die Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes

Einmalig die [¹³C₅]-markierten internen Standards [¹³C₅]-PteGlu, [¹³C₅]-H₄folat, [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat, [¹³C₅]-5-CHO-H₄folat in einer Konzentration 60,0 – 70,0 µg/mL in Extraktionspuffer 1 lösen. Verdünnungen der internen Standards zwischen 1,0 – 10,0 µg/mL mit Extraktionspuffer 1 herstellen und bei -20 °C aufbewahren. Die Konzentration der internen Standards wird an jedem Aufarbeitungstag überprüft. Die Analyt-Stammlösungen mit Extraktionspuffer 1 auf eine Konzentration von 0,01 mg/mL verdünnen (PteGlu 1:10; 10-CHO-PteGlu, 5-CH₃-H₄folat, 5-CHO-H₄folat, H₄folat und MeFox 1:20). Alle Analyten und internen Standards werden im Verhältnis innerhalb des linearen Kalibrierbereiches gemischt und die Konzentration mittels LC-MS/MS überprüft.

Lösungen zur Erstellung der MeFox-Kalibrierfunktion mittels LC-MS/MS

2 mg MeFox in 3 mL Phosphatpuffer lösen, mit Extraktionspuffer 1 auf 10 mL auffüllen und mit Extraktionspuffer 1 1:200 verdünnen. Die Lösung des internen Standards [¹³C₅]-5-CHO-H₄folat in einer Konzentration von 10,0 µg/mL verwenden. Die Kalibrierfunktion für einen Bereich von n(A)/n(ISTD) zwischen 0,06 – 20,0 erstellen. Dazu 50 µL des internen Standards mit 200 – 850 µL der MeFox-Stammlösung mischen, mit Elutionspuffer 1 auf 1 mL auffüllen und mittels LC-MS/MS vermessen.

Lösungen zur Erstellung der matrixkorrelierten Kalibrierfunktion der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate (2-7)

Die synthetisierten Polyglutamatstandards sowie den internen Standard [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat (c = 1,0 µg/mL) zu nach Kapitel 13.4 hergestellter polyglutamatfreier Matrix geben, um einen Bereich von n(ISTD)/n(A) zwischen 0,04 und 16,0 abzudecken. Dazu 100 µL des internen Standards sowie 2 – 400 µL der synthetisierten Polyglutamatstandards zu der polyglutamatfreien Hefematrix geben.

Lösungen des internen Standards für die Bestimmung der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate (1-7) in Hefen

Die verdünnte Analytlösung des 5-CH₃-H₄folates (c = 0,01 mg/mL) nochmalig 1:10 mit Elutionspuffer 1 verdünnen. Eine Mischung bestehend aus 200 µL [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat (c = 1,0 µg/mL) und 20 µL 5-CH₃-H₄folat Analytlösung (c = 0,001 mg/mL) sowie eine Mischung bestehend aus 10 µL [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat (c = 50 µg/mL) und 10 µL 5-CH₃-H₄folat Analytlösung (c = 0,01 mg/mL) erstellen, beide Mischungen mit Elutionspuffer 1 auf 1 mL auffüllen und mittels LC-MS/MS vermessen.

10. Lösungen, Puffer, Standardlösungen, Enzyme, Kultivierungslösungen

Lösungen des internen Standards für die semi-quantitative Analyse der Folatpolyglutamate in Hefen mittels LC-MS/MS

Eine Lösung von 10,0 µg/mL des internen Standards [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat gelöst in Elutionspuffer 1 verwenden und den Proben während der Aufarbeitung zusetzen.

Lösungen des internen Standards für die Analyse der Folatmetaboliten mittels UHPLC-Q-ToF-MS

Eine Lösung von 0,05 µg/mL des internen Standards [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat gelöst in Elutionspuffer 1 verwenden und den Proben direkt vor der Messung mittels UHPLC-Q-ToF-MS zusetzen.

10.3 Enzymlösungen

Rattenserum

Rattenserum unverdünnt in 1 mL Aliquoten bis zur Verwendung bei -20 °C lagern.

Hühnerpankreationsuspension

1 g Ascorbinsäure in 100 mL Phosphatpuffer (pH 7) lösen und mit Natronlauge (5 M) einen pH-Wert von pH 7 einstellen. Nach Zugabe von 100 mg gefriergetrocknetem Hühnerpankreatin 15 min suspendieren und in 2 mL Aliquoten bis zur Verwendung bei -20 °C lagern.

10.4 Lösungen zur Kultivierung und Aufreinigung von Hefe

Herstellung des Vollmediums zur Hefeanzucht

10 g Bactopepton, 5 g Hefeextrakt und 10 g Glucose mit 500 mL Wasser auffüllen und für 20 min bei 121 °C autoklavieren.

Herstellung der Minimalmedien zur Kultivierung von Hefe

Nachfolgende Chemikalien (Tabelle 10.3) in 1 L destilliertem Wasser lösen. pH-Wert des Mediums überprüfen und gegebenenfalls auf pH 5,3 (± 0,1) anpassen. Medium für 20 min bei 121 °C autoklavieren. Die Vitaminlösung (Tabelle 10.4) unter der Sterilbank in das autoklavierte Medium sterilfiltrieren.

10. Lösungen, Puffer, Standardlösungen, Enzyme, Kultivierungslösungen

Tabelle 10.3 Verwendete Chemikalien zur Herstellung des Basis Minimalmediums zur Hefekultivierung.

	Medium 1	Medium 2	Medium 3	Medium 4	Medium 5	Medium 6	Medium 7
Ammoniumsulfat [g]	5	5				10	5
Ammoniumchlorid [g]			5	5	5		
Borsäure [mg]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
CaCl ₂ [g]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Eisensulfat Heptahydrat [mg]	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Glucose	10	20	10	10	10	10	10
Inositol [mg]	2	2	2	2	2	2	2
Dinatriumhydrogensulfat Dihydrat [g]	0,106	0,106	0,106	0,106	0,106	0,106	0,106
Kaliumdihydrogensulfat [g]	2	2	2	2	2	2	2
Kaliumiodid [mg]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Kupfersulfat [mg]	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Magnesiumsulfat Heptahydrat [g]	1	1	1	1	1	1	1
Mangansulfat [mg]	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Natriumchlorid [g]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Natriummolybdat [mg]	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Zinksulfat Monohydrat [mg]	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Ergosterin [mg]					15		15
Methionin [mg]							
Ölsäure [mg]				18	18		18
Tergitol [g]							2

Tabelle 10.4 Vitaminlösung für die Herstellung der Minimalmedien zur Hefekultivierung.

Vitamin	Einwaage [µg]
D-Biotin	2
Calcium Pantothenat	400
Nicotinsäure	400
Pyridoxin Hydrochlorid	400
Riboflavin	200
Thiamin Hydrochlorid	400

11. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Herstellung von Agarplatten zur Anzucht der Hefe

15 g Bactopecton, 3 g Hefeextrakt, 6 g Natriumchlorid und 15 g Agar in 1 L destilliertem Wasser lösen und 20 min bei 121 °C autoklavieren. Die Lösung auf 60 °C abkühlen lassen und unter der Sterilbank portionsweise in Petrischalen füllen. Die Agarplatten bis zur Verwendung bei 4 °C lagern.

Herstellung von PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline) zum Waschen der kultivierten Hefe
8 g (1,37 mM) Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumiodid (1,2 mM), 1,78 g (10 mM) Dinatriumhydrogenphosphat und 0,27 g (2 mM) Kaliumdihydrogenphosphat in 1 L destilliertem Wasser lösen.

11 Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

11.1 Geräte

Laborgeräte

Autoklav Systec V 150	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5810 C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Feinwaage Satorius Basic	Satorius AG, Göttingen, Deutschland
Gefriertrocknung Christ-Alpha 1-2 LD Plus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Gewürz- und Kaffeemühle (EGK 200)	Rommelsbacher Elektrohausgeräte GmbH, Dinkelsbühl, Deutschland
Hei-VAP, Rotationsverdampfer	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Deutschland
Heizbad	BÜCHI Labortechnik, Falwil, Schweiz
Magnetrührer IKA – RCT basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen i. Breisgau, Deutschland
Mehrstellenmagnetrührer RO 15 power	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen i. Breisgau, Deutschland
Membranpumpe	PC 3001 Vario, Vaccubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
pH-Meter FE 20 – five easy-™	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Schüttelwasserbad GFL 1092	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Transferpette® 10 µL	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
Transferpette® 20 µL	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland

11. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Transferpette® 100 µL	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
Transferpette® 200 µL	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
Transferpette® 1000 µL	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
Transferpette® 5 mL	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
Transferpette® 10 mL	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex Super RK106	Bandelin electronic GmbH & Co. KG; Berlin, Deutschland
Umlaufkühler	Frigomix, B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Vakuum pump	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Waage Satorius Basic	Satorius AG, Göttingen, Deutschland
Thermo Scientific™ Reacti-Vap™ Verdampfer	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Analysengeräte

FT-ICR-MS	12T solariX FT-ICR-MS Software: DataAnalysis 4.4	Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland
HPLC-DAD	Degaser DGU-20A _{SR} Auto Sampler SIL-20A HAT Liquid chromatograph LC-20AD Detektor SPA-M20A LabSolutions Software 5.71	Shimadzu, Kyoto, Japan
LC-MS/MS	Degaser DGU-20A _{SR} Auto sampler Nexera X2 SIL-30AC Liquid chromatograph LC-30AD Säulenofen CTO-20AC Communication bus module CMB-20A Waste Ventil FCV-14 AH LC-MS-8050 LabSolutions Software 5.89	Shimadzu, Kyoto, Japan
NMR	Bruker AVII 500 MHz	Bruker, Rheinstetten, Deutschland
Präparative HPLC	Degaser Gastorr VG-25 Pumpe Besta Type HD 2-500 Detektor Sapphire Ecom	Besta, Wilhelmsfeld, Deutschland
UHPLC-Q-ToF-MS	Acquity UPLC System maXis qTOF-MS Software: DataAnalysis 4.4	Waters, Eschborn, Deutschland Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland

11.2 Geräteparameter

11.2.1 HPLC-DAD zur Bestimmung der Analytkonzentration

Die Analytkonzentration wurde mittels HPLC-DAD überprüft (11.2.1). Die Messparameter zur Bestimmung sind nachfolgend in Tabelle 11.1 und Tabelle 11.2 aufgelistet.

Tabelle 11.1 Messparameter zur Bestimmung der Analytkonzentrationen der Referenzverbindungen mittels HPLC-DAD.

Mobile Phase	A: 0,1 % Essigsäure, B: Methanol
Säule	Nucelosil 100-5 C18 EC 250/3, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Injektionsvolumen	10 µL
Fluss	0,4 mL/min
Gesamtdauer	35 min
Wellenlänge	272 nm (H ₄ folat, 10-CHO-PteGlu) 282 nm (MeFox) 290 nm (5-CH ₃ -H ₄ folat, 5-CHO-H ₄ folat)

Tabelle 11.2 Gradient zur Konzentrationsbestimmung der Folatreferenzverbindungen mittels HPLC-DAD.

Zeit [min]	% A	% B
0	90	10
7	50	50
21	0	100
23	0	100
24	90	10
26	90	10
35	90	10

11.2.2 HPLC-DAD zur Bestimmung der Konzentration der synthetisierten 5-CH₃-H₄folat Polyglutamatstandards

Die Konzentration der von Schaller et al. [2018] synthetisierten Polyglutamatstandards wurde wie unter Kapitel 11.2.2 beschrieben überprüft. Nachfolgend sind die Messparameter gelistet.

11. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11.3 Messparameter zur Konzentrationsbestimmung der synthetisierten 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate mittels HPLC-DAD.

Mobile Phase	A: Phosphatpuffer (50 mM, pH 4,6), B: Acetonitril
Säule	Nucelosil 100-5 C18 EC 250/3, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Injektionsvolumen	50 µL
Fluss	0,6 mL/min
Gesamtdauer	35 min

Tabelle 11.4 Gradient zur Konzentrationsbestimmung der synthetisierten 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate mittels HPLC-DAD.

Zeit [min]	% A	% B
0	100	0
15	90	10
20	80	20
25	80	20
27	100	0
35	100	0

11.2.3 Präparative HPLC

Das synthetisierte 5-Ethyl-tetrahydrofolat wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die Messparameter zur Aufreinigung finden sich in der nachfolgenden Tabelle 11.5 sowie Tabelle 11.6.

Tabelle 11.5 Messparameter zur Aufreinigung des synthetisierten 5-CH₂-CH₃-H₄folates mittels präparativer HPLC.

Mobile Phase	A: 0,1 % Essigsäure, B: Methanol
Säule	YMC-Actus, Triart C18, 150 x 20,0 mm I.D. S-5 µm, 12 nm; YMC, Dinslaken, Deutschland
Vorsäule	YMC-Guardpack Pro, C18, 30 x 10,0 mm I.D. S-5 µm, 12 nm; YMC, Dinslaken, Deutschland
Injektionsvolumen	1000 µL
Fluss	3 mL/min
Detektionswellenlänge	290 nm
Gesamtdauer	30 min

11. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11.6 Gradient zur Aufreinigung des synthetisierten 5-CH₂-CH₃-H₄folates mittels präparativer HPLC.

Gradient	Zeit [min]	% A	% B
	0	90	10
	14	50	50
	21	10	90
	23	0	90
	24	90	10
	30	90	10

11.2.4 LC-MS/MS zur Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes

Die Bestimmung der Folatkonzentration nach enzymatischer Dekonjugation in den untersuchten Proben erfolgte mittels LC-MS/MS. Die verwendeten Messparameter sind Tabelle 11.7 - Tabelle 11.8 zu entnehmen.

Tabelle 11.7 Messparameter zur Bestimmung der Folatvitamere nach enzymatischer Dekonjugation in den analysierten Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS.

Mobile Phase	A: 0,1 % Ameisensäure, B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure
Säule	Restek Raptor™, ARC-18, 2,7µm, 100 x 2,1 mm, Restek GmbH, Homburg, Deutschland
Vorsäule	Restek Raptor™, ARC-18, 2,7 µm, 5 x 2,1 mm, Restek GmbH, Homburg, Deutschland
Säulenofen	30 °C
Injektionsvolumen	10 µL
Fluss	0,4 mL/min
ESI-Modus	+ (MRM, Multiple Reaction Monitoring)
Interface Temperature	300 °C
Heat Block Temperature	400 °C
DL Temperature	250 °C
Heating Gas Flow	10 L/min
Drying Gas Flow	10 L/min
Nebulizing Gas Flow	3 L/min
CID Gas	270 kPA
Interface Voltage	4,00 kV
Dwell Time	50,0 ms
Gesamtdauer	17 min

11. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11.8 Massenübergänge und Parameter zur Bestimmung der Folatvitamere nach enzymatischer Dekonjugation in den untersuchten Proben mittels LC-MS/MS.

Analyt MRM	Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]	Dwell Time [ms]	Q1 (Pre Bias) [V]	CE [V]	Q3 (Pre Bias) [V]
PteGlu	442,30	295,15	70,0	-13,0	-16,0	-16,0
	442,30	176,20	70,0	-13,0	-37,0	-20,0
	442,30	120,05	70,0	-13,0	-35,0	-14,0
[¹³ C ₅]-PteGlu	447,20	295,15	70,0	-13,0	-16,0	-16,0
	447,20	176,20	70,0	-13,0	-37,0	-20,0
	447,20	120,05	70,0	-13,0	-35,0	-14,0
H ₄ folat	446,00	299,20	70,0	-22,0	-20,0	-16,0
	446,00	120,10	70,0	-22,0	-37,0	-14,0
	446,00	166,15	70,0	-22,0	-41,0	-19,0
[¹³ C ₅]-H ₄ folat	451,30	299,20	70,0	-22,0	-20,0	-16,0
	451,30	120,10	70,0	-22,0	-37,0	-14,0
	451,30	166,15	70,0	-22,0	-41,0	-19,0
5-CH ₃ -H ₄ folat	460,20	313,20	70,0	-13,0	-20,0	-17,0
	460,20	180,15	70,0	-13,0	-37,0	-14,0
	460,20	194,25	70,0	-23,0	-33,0	-22,0
[¹³ C ₅]-5-CH ₃ -H ₄ folat	465,30	313,20	70,0	-13,0	-20,0	-17,0
	465,30	180,15	70,0	-13,0	-37,0	-14,0
	465,30	194,25	70,0	-23,0	-33,0	-22,0
5-CHO-H ₄ folat	474,30	327,15	70,0	-14,0	-20,0	-17,0
	474,30	299,20	70,0	-14,0	-31,0	-16,0
	474,30	208,20	70,0	-18,0	-36,0	-24,0
[¹³ C ₅]-5-CHO-H ₄ folat	479,25	327,15	70,0	-14,0	-20,0	-17,0
	479,25	299,20	70,0	-14,0	-31,0	-16,0
	479,25	208,20	70,0	-18,0	-36,0	-24,0
10-CHO-PteGlu	470,00	295,15	70,0	-23,0	-26,0	-22,0
	470,00	176,20	70,0	-23,0	-40,0	-20,0
	470,00	120,15	70,0	-17,0	-39,0	-14,0
MeFox	474,20	327,20	50,0	-16,0	-23,0	-24,0
	474,20	132,10	50,0	-16,0	-45,0	-24,0
	474,20	284,15	50,0	-16,0	-37,0	-20,0

11. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11.9 Gradient zur Konzentrationsbestimmung der Folatvitamere nach enzymatischer Dekonjugation in den untersuchten Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS.

Zeit [min]	% A	% B
0	97	3
2,5	90	10
5	90	10
10	85	15
11	50	50
12	50	50
13	97	3
17	97	3

Tabelle 11.10 Massenübergänge und Parameter zur Bestimmung des unbekanntes Metaboliten der Metabolitenklasse 2 nach enzymatischer Dekonjugation in den untersuchten Proben mittels LC-MS/MS.

Analyt MRM	Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]	Dwell Time [ms]	Q1 (Pre Bias) [V]	CE [V]	Q3 (Pre Bias) [V]
C ₂₁ H ₂₅ N ₇ O ₇	488,20	313,20	70,0	-13,0	-20,0	-17,0
	488,20	180,15	70,0	-13,0	-37,0	-14,0
	488,20	194,25	70,0	-23,0	-33,0	-22,0
5-CO-CH ₃ - H ₄ folat	488,10	341,20	70,0	-24	-19	-18
	488,10	222,25	70,0	-24	-35	-26
	488,10	299,20	70,0	-14	-34	-36
EthylFox	488,20	341,25	70,0	-28	-21	-30
	488,20	132,20	70,0	-26	-46	-14
	488,20	298,20	70,0	-26	-37	-22

11. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

11.2.5 LC-MS/MS zur Bestimmung der Folat Polyglutamate

Die Bestimmung der Folat Polyglutamate erfolgte mittels LC-MS/MS. Die Messparameter finden sich in den nachfolgenden Tabellen.

Tabelle 11.11 Messparameter zur Bestimmung der Folat Polyglutamate in den analysierten Proben mittels LC-MS/MS.

Mobile Phase	A: 1 % Ameisensäure, B: Acetonitril mit 1 % Ameisensäure
Säule	YMC-Pack Pro C18 RP 150 x 3,0 mm, 3 µm, YMC, Dinslaken, Deutschland
Vorsäule	C18 4 x 2,0 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
Säulenofen	30 °C
Injektionsvolumen	20 µL
Fluss	0,3 mL/min
ESI-Modus	+ (MRM)
Interface Temperature	330 °C
Heat Block Temperature	300 °C
DL Temperature	180 °C
Heating Gas Flow	10 L/min
Drying Gas Flow]	10 L/min
Nebulizing Gas Flow	2 L/min
CID Gas	300 kPA
Interface Voltage	5,00 kV
Dwell Time	70,0 ms
Gesamtdauer	26 min

Tabelle 11.12 Gradient zur Bestimmung der Folat Polyglutamate in den untersuchten Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS.

Zeit [min]	% A	% B
0	95	5
2	90	10
11	90	10
15	85	15
17	10	90
19	10	90
21	95	5
26	95	5

11. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11.13 Massenübergänge und Parameter der PteGlu Polyglutamate (1-10) in den untersuchten Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS.

Analyt	MRM Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]	Dwell Time [ms]	Q1 (Pre Bias) [V]	CE [V]	Q3 (Pre Bias) [v]
PteGlu ₁	442,30	295,10	70,0	-13,0	-16,0	-16,0
	442,30	176,30	70,0	-13,0	-37,0	-20,0
	442,30	120,05	70,0	-13,0	-35,0	-14,0
PteGlu ₂	571,20	295,10	70,0	-28	-35,0	-28,0
	571,20	176,30	70,0	-38	-61,0	-28,0
PteGlu ₃	350,60	295,10	70,0	-20	-15,0	-22,0
	350,60	176,30	70,0	-20	-33,0	-20,0
PteGlu ₄	415,10	295,10	70,0	-12	-16,0	-21,0
	415,10	176,30	70,0	-12	-36,0	-13,0
PteGlu ₅	476,60	295,10	70,0	-28	-15,0	-34,0
	476,60	176,30	70,0	-28	-39,0	-20,0
PteGlu ₆	544,10	295,10	70,0	-18	-20,0	-34,0
	544,10	176,30	70,0	-18	-45,0	-20,0
PteGlu ₇	608,60	295,10	70,0	-34	-20,0	-36,0
	608,60	176,30	70,0	-34	-53,0	-20,0
PteGlu ₈	673,20	295,10	70,0	-34	-20,0	-36,0
	673,20	176,30	70,0	-34	-53,0	-20,0
PteGlu ₉	737,70	295,10	70,0	-34	-20,0	-36,0
	737,70	176,30	70,0	-34	-53,0	-20,0
PteGlu ₁₀	535,20	295,10	70,0	-34	-20,0	-36,0
	535,20	176,30	70,0	-34	-53,0	-20,0

11. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11.14 Massenübergänge und Parameter der H₄folat Polyglutamate (1-10) in den untersuchten Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS.

Analyt	MRM Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]	Dwell Time [ms]	Q1 (Pre Bias) [V]	CE [V]	Q3 (Pre Bias) [V]
H ₄ PteGlu ₁	446,00	299,20	70,0	-22,0	-20,0	-16,0
	446,00	120,10	70,0	-22,0	-37,0	-14,0
	446,00	166,15	70,0	-22,0	-41,0	-19,0
H ₄ PteGlu ₂	352,65	299,20	70,0	-28,0	-35,0	-28,0
	352,65	166,15	70,0	-38,0	-61,0	-28,0
H ₄ PteGlu ₃	357,60	299,20	70,0	-20,0	-15,0	-22,0
	357,60	166,15	70,0	-20,0	-33,0	-20,0
H ₄ PteGlu ₄	417,15	299,20	70,0	-12,0	-16,0	-21,0
	417,15	166,15	70,0	-12,0	-36,0	13,0
H ₄ PteGlu ₅	465,30	299,20	70,0	-28,0	-15,0	-34,0
	465,30	166,15	70,0	-28,0	-39,0	-20,0
H ₄ PteGlu ₆	546,15	299,20	70,0	-18,0	-20,0	-34,0
	546,15	166,15	70,0	-18,0	-45,0	-20,0
H ₄ PteGlu ₇	610,65	299,20	70,0	-34,0	-20,0	-36,0
	610,65	166,15	70,0	-34,0	-53,0	-20,0
H ₄ PteGlu ₈	675,20	299,20	70,0	-34,0	-20,0	-36,0
	675,20	166,15	70,0	-34,0	-53,0	-20,0
H ₄ PteGlu ₉	739,80	299,20	70,0	-34,0	-20,0	-36,0
	739,80	166,15	70,0	-34,0	-53,0	-20,0
H ₄ PteGlu ₁₀	536,60	299,20	70,0	-34,0	-20,0	-36,0
	536,60	166,15	70,0	-34,0	-53,0	-20,0

11. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11.15 Massenübergänge und Parameter der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate (1-10) in den untersuchten Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS.

Analyt	MRM [m/z]	Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]	Dwell Time [ms]	Q1 (Pre Bias) [V]	CE [V]	Q3 (Pre Bias) [v]
5-CH ₃ - H ₄ PteGlu ₁	460,20	313,20	70,0	-13,0	-20,0	-17,0	
	460,20	180,15	70,0	-13,0	-37,0	-14,0	
5-CH ₃ - H ₄ PteGlu ₂	460,20	194,25	70,0	-23,0	-33,0	-22,0	
	589,30	313,20	70,0	-28,0	-25,0	-25,0	
5-CH ₃ - H ₄ PteGlu ₃	589,30	180,15	70,0	-36,0	-65,0	-25,0	
	359,65	313,20	70,0	-20,0	-15,0	-22,0	
5-CH ₃ - H ₄ PteGlu ₄	359,65	180,15	70,0	-20,0	-33,0	-20,0	
	424,15	313,20	70,0	-15,0	-20,0	-21,0	
5-CH ₃ - H ₄ PteGlu ₅	424,15	180,15	70,0	-15,0	-40,0	-13,0	
	488,65	313,20	70,0	-30,0	-25,0	-34,0	
5-CH ₃ - H ₄ PteGlu ₆	488,65	180,15	70,0	-30,0	-62,0	-20,0	
	553,20	313,20	70,0	-18,0	-20,0	-34,0	
5-CH ₃ - H ₄ PteGlu ₇	553,20	180,15	70,0	-18,0	-45,0	-20,0	
	617,70	313,20	70,0	-34,0	-20,0	-36,0	
5-CH ₃ - H ₄ PteGlu ₈	617,70	180,15	70,0	-34,0	-53,0	-20,0	
	682,20	313,20	70,0	-12,0	-16,0	-21,0	
5-CH ₃ - H ₄ PteGlu ₉	682,20	180,15	70,0	-12,0	-36,0	-13,0	
	746,80	313,20	70,0	-34,0	-20,0	-36,0	
5-CH ₃ - H ₄ PteGlu ₁₀	746,80	180,15	70,0	-34,0	-53,0	-20,0	
	541,20	313,20	70,0	-34,0	-20,0	-36,0	
	541,20	180,15	70,0	-34,0	-53,0	-20,0	

11. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11.16 Massenübergänge und Parameter der 5-CHO-H₄folat Polyglutamate (1-10) in den untersuchten Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS.

Analyt	MRM Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]	Dwell Time [ms]	Q1 (Pre Bias) [V]	CE [V]	Q3 (Pre Bias) [V]
5-CHO- H ₄ PteGlu ₁	474,30	327,15	70,0	-14,0	-20,0	-17,0
	474,30	299,20	70,0	-14,0	-31,0	-16,0
	474,30	208,20	70,0	-18,0	-36,0	-24,0
5-CHO- H ₄ PteGlu ₂	603,20	327,15	70,0	-28,0	-25,0	-25,0
	603,20	299,20	70,0	-36,0	-65,0	-25,0
5-CHO- H ₄ PteGlu ₃	603,20	208,20	70,0	-36,0	-65,0	-25,0
	366,60	327,10	70,0	-20,0	-15,0	-22,0
5-CHO- H ₄ PteGlu ₄	366,60	299,10	70,0	-20,0	-33,0	-20,0
	431,10	327,10	70,0	-12,0	-16,0	-21,0
5-CHO- H ₄ PteGlu ₅	431,10	299,10	70,0	-12,0	-36,0	-13,0
	495,60	327,10	70,0	-28,0	-15,0	-34,0
5-CHO- H ₄ PteGlu ₆	495,60	299,10	70,0	-28,0	-39,0	-20,0
	560,10	327,10	70,0	-18,0	-20,0	-34,0
5-CHO- H ₄ PteGlu ₇	560,10	299,10	70,0	-18,0	-45,0	-20,0
	624,60	327,10	70,0	-34,0	-20,0	-36,0
5-CHO- H ₄ PteGlu ₈	624,60	299,10	70,0	-34,0	-53,0	-20,0
	689,20	327,10	70,0	-34,0	-20,0	-36,0
5-CHO- H ₄ PteGlu ₉	689,20	299,10	70,0	-34,0	-53,0	-20,0
	753,80	327,10	70,0	-34,0	-20,0	-36,0
5-CHO- H ₄ PteGlu ₁₀	753,80	299,10	70,0	-34,0	-53,0	-20,0
	545,90	327,10	70,0	-34,0	-20,0	-36,0

11. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11.17 Massenübergänge und Parameter der 5-CHO-H₄folat Polyglutamate (1-10) in den untersuchten Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS.

Analyt	MRM Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]	Dwell Time [ms]	Q1 (Pre Bias) [V]	CE [V]	Q3 (Pre Bias) [v]
10-CHO- PteGlu ₁	470,00	295,15	70,0	-23,0	-26,0	-22,0
	470,00	176,20	70,0	-23,0	-40,0	-20,0
	470,00	120,15	70,0	-17,0	-39,0	-14,0
10-CHO- PteGlu ₂	599,20	295,00	70,0	-28,0	-35,0	-28,0
	599,20	176,10	70,0	-38,0	-61,0	-28,0
10-CHO- PteGlu ₃	364,60	295,00	70,0	-20,0	-15,0	-22,0
	364,60	176,10	70,0	-20,0	-33,0	-20,0
10-CHO- PteGlu ₄	429,10	295,00	70,0	-12,0	-16,0	-21,0
	429,10	176,10	70,0	-12,0	-36,0	13,0
10-CHO- PteGlu ₅	493,60	295,00	70,0	-28,0	-15,0	-34,0
	493,60	176,10	70,0	-28,0	-39,0	-20,0
10-CHO- PteGlu ₆	558,10	295,00	70,0	-18,0	-20,0	-34,0
	558,10	176,10	70,0	-18,0	-45,0	-20,0
10-CHO- PteGlu ₇	622,60	295,00	70,0	-34,0	-20,0	-36,0
	622,60	176,10	70,0	-34,0	-53,0	-20,0
10-CHO- PteGlu ₈	687,20	295,00	70,0	-34,0	-20,0	-36,0
	687,20	176,10	70,0	-34,0	-53,0	-20,0
10-CHO- PteGlu ₉	751,70	295,00	70,0	-34,0	-20,0	-36,0
	751,70	176,10	70,0	-34,0	-53,0	-20,0
10-CHO- PteGlu ₁₀	544,50	295,00	70,0	-34,0	-20,0	-36,0
	544,50	176,10	70,0	-34,0	-53,0	-20,0

11. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11.18 Massenübergänge und Parameter der PteGlu Polyglutamate (1-10) in den untersuchten Proben zur Analyse mittels LC-MS/MS.

Analyt	MRM Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]	Dwell Time [ms]	Q1 (Pre Bias) [V]	CE [V]	Q3 (Pre Bias) [V]
5,10-CH ⁺ - H ₄ PteGlu ₁	456,30	412,00	50,0	-13,0	-20,0	-17,0
	456,30	282,00	50,0	-13,0	-37,0	-14,0
5,10-CH ⁺ - H ₄ PteGlu ₂	585,20	412,00	70,0	-28,0	-25,0	-25,0
	585,20	282,00	70,0	-36,0	-65,0	-25,0
5,10-CH ⁺ - H ₄ PteGlu ₃	357,60	412,00	70,0	-20,0	-15,0	-22,0
	357,60	282,00	70,0	-20,0	-33,0	-20,0
5,10-CH ⁺ - H ₄ PteGlu ₄	422,10	412,00	70,0	-12,0	-16,0	-21,0
	422,10	282,00	70,0	-12,0	-36,0	13,0
5,10-CH ⁺ - H ₄ PteGlu ₅	486,70	412,00	70,0	-28,0	-15,0	-34,0
	486,70	282,00	70,0	-28,0	-39,0	-20,0
5,10-CH ⁺ - H ₄ PteGlu ₆	551,20	412,00	70,0	-18,0	-20,0	-34,0
	551,20	282,00	70,0	-18,0	-45,0	-20,0
5,10-CH ⁺ - H ₄ PteGlu ₇	615,70	412,00	70,0	-34,0	-20,0	-36,0
	615,70	282,00	70,0	-34,0	-53,0	-20,0
5,10-CH ⁺ - H ₄ PteGlu ₈	680,20	412,00	70,0	-34,0	-20,0	-36,0
	680,20	282,00	70,0	-34,0	-53,0	-20,0
5,10-CH ⁺ - H ₄ PteGlu ₉	744,80	412,00	70,0	-34,0	-20,0	-36,0
	744,80	282,00	70,0	-34,0	-53,0	-20,0
5,10-CH ⁺ - H ₄ PteGlu ₁₀	539,90	412,00	70,0	-34,0	-20,0	-36,0
	539,90	282,00	70,0	-34,0	-53,0	-20,0

11.2.6 FT-ICR-MS

Die Probenvorbereitung erfolgt analog zu Kapitel 13.7 durch Verwendung der HLB-Kartuschen. Zur Analyse der Folatmetaboliten in Lebensmitteln mittels FT-ICR-MS wurden zunächst die Standardverbindungen PteGlu, 5-CH₃-H₄folat sowie PteGlu₄ (jeweils 1 µg/mL in MeOH gelöst) mittels der Ausgangsmethode vermessen und die Messparameter entsprechend angepasst (Methode 1), um eine verbesserte Ionisierung höhermolekularer Analyten zu erzielen. Zum Ende der Arbeit wurden die Parameter nochmals analog zu einer zwischenzeitlich etablierten Methode angepasst (Methode 2). Die Parameter der drei Methoden werden nachfolgend tabellarisch gegenübergestellt.

11. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11.19 Parameter zur Analyse der Folatmetaboliten in Lebensmitteln mittels FT-ICR-MS.

	Ausgangsmethode	Methode 1	Methode 2
ESI-Modus	- (Full Scan)	- (Full Scan)	- (Full Scan)
Flussrate	2 µL/min	2 µL/min	2 µL/min
Drying Gas Temperature	180 °C	180 °C	180 °C
Drying Gas Flow	4,0 L/min	4,0 L/min	4,0 L/min
Capillary Voltage	3,6 kV	3,6 kV	3,6 kv
Time Domain	4 MW	4 MW	4 MW
Accumulation Time	0,3 s	0,3 s	0,3 s
ToF Time	0,7 ms	0,9 ms	1,0 ms
RF Amplitude	100 Vpp	250 Vpp	400 Vpp
Scans	300	300	300
Mass Range	<i>m/z</i> 125 - 1000	<i>m/z</i> 125 - 2000	<i>m/z</i> 125 - 2000

11.2.7 UHPLC-Q-ToF-MS

Während der Methodenentwicklung zur Analyse der Folatmetaboliten mittels UHPLC-Q-ToF-MS wurden zunächst verschiedene Chromatographiesäulen, Gradienten, Fließmittel und Quellentemperaturen verglichen, um so die besten Parameter zu definieren. Dazu wurde ein Standardgemisch bestehend aus den Monoglutamaten 10-CHO-PteGlu, 5-CH₃H₄folat, 5-CHO-H₄folat, H₄folat und PteGlu sowie ein Standardgemisch bestehend aus den synthetisierten Standards 5-CH₃-H₄PteGlu₂₋₇ in einer Konzentration von 1 µg/mL in Elutionspuffer vermessen. Die getesteten Bedingungen finden sich unter Punkt 14.3.

Alle Parameter der Probenmessungen finden sich in den nachfolgenden Tabellen.

Tabelle 11.20 Parameter zur Analyse der Folatmetaboliten mittels UHPLC-Q-ToF-MS.

Mobile Phase	A: 1 % Ameisensäure, B: Acetonitril mit 1 % Ameisensäure
Säule	Restek Rapor™, ARC-18, 1,8 µm, 2,1 x 100 mm
Säulenofen	30 °C
Injektionsvolumen	15 µL (full loop)
Fluss	0,3 mL/min
ESI-Modus	+ (AutoMSn mit preference fragmentation list)
Dry Gas Temperature	200 °C
Drying Gas Flow/Nebulizer	10 L/min / 2,0 bar
End Plate Offset/Capillary	500 V / 4,5 kV
Gesamtdauer	9,3 min

11. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11.21 Gradient zur Analyse der Folatmetaboliten in den untersuchten Proben mittels UHPLC-Q-ToF-MS;
Pre run time: 3,7 min.

Zeit [min]	% A	% B
0	97	3
1	97	3
2,25	90	10
3,5	90	10
6,5	50	50
7	50	50
7,3	0,1	99,9
9	0,1	99,9
9,3	97	3

Tabelle 11.22 Preference Mass List zur Erweiterung der AutoMSn Fragmentierung mittels UHPLC-Q-ToF-MS.

m/z Bereich	m/z Bereich	m/z Bereich
292,60-293,60	486,17-487,17	624,21-625,21
294,62-295,62	488,18-489,18	672,72-673,72
301,61-302,61	495,17-496,17	674,74-675,74
357,12-358,12	543,68-544,68	679,73-680,73
359,14-360,14	545,69-546,69	681,74-682,74
366,13-367,13	550,69-551,69	686,72-687,72
416,65-417,65	552,70-553,70	688,73-689,73
421,64-422,64	557,68-558,68	737,24-738,24
423,66-424,66	559,69-560,69	739,26-740,26
430,65-431,65	608,20-609,20	744,25-745,25
455,66-456,66	611,22-612,22	746,27-747,27
459,69-460,69	615,21-616,21	751,24-752,24
473,67-474,67	617,22-618,22	753,26-754,26
481,17-482,17	622,20-623,20	

11. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

11.2.8 Software

HPLC-DAD:	LabSolutions 5.71, Shimadzu, Kyoto, Japan
LC-MS/MS:	LabSolutions 5.89, Shimadzu, Kyoto, Japan
FT-ICR-MS:	DataAnalysis 4.4, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland RStudio 3.6.1, Boston, MA, USA
UHPLC-Q-ToF-MS:	DataAnalysis 4.4, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland Genedata Refiner MS, Genedata GmbH, München, Deutschland RStudio 3.6.1, Boston, MA, USA CEU Mass Mediator (http://ceumass.eps.uspceu.es/mediator/ , CEU San Pablo, Madrid, Spanien) ClassyFire Batch (https://cfb.fiehnlab.ucdavis.edu/ , UC Davis, CA, USA) GNPS (https://gnps.ucsd.edu/ , UCSD, San Diego, CA, USA) Cytoscape (Cytoscape Consortium, Bethesda, MD, USA)

11.2.9 Verbrauchsmaterialien

Chromabond® HLB-Kartuschen (60 µm, 3 mL, 500 mg)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Chromafil® Xtra PVDF, Spritzenvorsatzfilter, Gehäuse PP; 13 mm; 0,20 µm	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Einmalinjektionskanüle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einmalspritzen, 2-teilig, 3 mL	Norm-Ject, Tuttlingen, Deutschland
Einmalspritzen, 2-teilig, 6 mL	Norm-Ject, Tuttlingen, Deutschland
Gewindeflasche ND13 Braunglas (4 mL)	Th. Geyer GmbH & Co KG, Renningen, Deutschland
Gewindeflasche ND8 Braunglas (1,5 mL)	Th. Geyer GmbH & Co KG, Renningen, Deutschland
HSW Norm-Ject® 6 mL	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Inlets für Gewindeflasche ND8	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Nitril Einmalhandschuhe	VWR International bvba, Leuven, Belgien
Nucleo Spin Bead Tubes Type A (0,6 – 0,6 mm)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Pasteurpipetten (Glas)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

11. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Pasteurpipetten (Plastik)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitze, 10 µL	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitze, 10 mL	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitze, 1000 µL	Th. Geyer GmbH & Co KG, Renningen, Deutschland
Pipettenspitze, 200 µL	Th. Geyer GmbH & Co KG, Renningen, Deutschland
Pipettenspitze, 5 mL	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
Schraubdeckel + Septum für HPLC-Vials	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter PTFE, Gehäuse PP; 25 mm; 0,20 µm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Strata® NH ₂ Kartuschen (55 µm, 70 Å) 500 mg/ 3 mL	Phenomenex, Aschaffenburg, Germany
Strata® C18-T Kartusche (55 µm, 140 Å) 500 mg/ 3 mL	Phenomenex, Aschaffenburg, Germany
Strata® SAX Kartuschen (55 µm, 70 Å) 1000 mg/ 6 mL	Phenomenex, Aschaffenburg, Germany
Strata® SAX Kartuschen (55 µm, 70 Å) 2000 mg/ 12 mL	Phenomenex, Aschaffenburg, Germany
Strata® SAX Kartuschen (55 µm, 70 Å) 500 mg/ 3 mL	Phenomenex, Aschaffenburg, Germany
Zentrifugenröhrchen (15 mL)	Th. Geyer GmbH & Co KG, Renningen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (50 mL)	Th. Geyer GmbH & Co KG, Renningen, Deutschland

12 Berechnungen

12.1 Berechnung einer linearen Kalibrierfunktion

$$\frac{n(A)}{n(ISTD)} = b \cdot \frac{A(A)}{A(ISTD)} + a$$

$n(A)$	<i>Stoffmenge Analyt [nmol]</i>
$n(ISTD)$	<i>Stoffmenge interner Standard [nmol]</i>
$A(A)$	<i>Peakfläche Analyt [AU]</i>
$A(ISTD)$	<i>Peakfläche interner Standard [AU]</i>
b	<i>Steigung</i>
a	<i>Ordinate</i>

12.2 Linearitätstest nach Mandel

$$PW = \frac{[(N - 2) \cdot (S_{y1})^2 - (N - 3) \cdot (S_{y2})^2]^2}{(S_{y2})^2}$$

N	<i>Anzahl der Messungen</i>
S_{y1}	<i>Reststandardabweichung der linearen Kalibrierfunktion</i>
S_{y2}	<i>Reststandardabweichung der quadratischen Kalibrierfunktion</i>

Vergleich des Prüfwertes PW mit dem kritischen F-Wert F_{krit} für die Anzahl N an Messungen (F-Wert-Tabelle) für ein Signifikanzniveau $\alpha = 0.95$.

Ist $PW \leq F_{\text{krit}}$, dann ist die quadratische Funktion nicht signifikant besser als die lineare Funktion

Ist $PW > F_{\text{krit}}$, dann ist die quadratische Funktion signifikant besser als die lineare Funktion

12.3 Berechnung der NWG über das Signal-Rausch-Verhältnis

$$NWG \left[\frac{\text{nmol}}{\text{L}} \right] = 3 \cdot \frac{I(N)}{I(S)} \cdot c(A)$$

$I(N)$	<i>Intensität des Rauschsignales</i>
$I(S)$	<i>Intensität des Analytsignales</i>
$c(A)$	<i>Konzentration des Analyten [nmol/L]</i>

12. Berechnungen

12.4 Berechnung der BG über das Signal-Rausch-Verhältnis

$$BG \left[\frac{\text{nmol}}{\text{L}} \right] = 3 \cdot NWG$$

12.5 Berechnung des Folatgehaltes in $\mu\text{g}/100 \text{ g}$, berechnet als PteGlu

$$\text{Folatgehalt} \left[\frac{\mu\text{g}}{100 \text{ g}} \right] = \frac{n(A) \cdot M(\text{PteGlu})}{1000} \cdot \frac{100}{E}$$

$n(A)$ *Stoffmenge Analyt [nmol]*

$M(\text{PteGlu})$ *Molare Masse PteGlu [g/mol]*

E *Einwaage [g]*

12.6 Berechnung der relativen Wiederfindung der 5- CH_3 - H_4 folat Polyglutamate

$$WF_{rel} = \frac{WF_{abs}}{\text{Folatgehalt}_{exp}}$$

WF_{rel} *relative Wiederfindung [%]*

WF_{abs} *absolute Wiederfindung [%], experimentell ermittelt durch
Zugabe des internen Standards vor der Messung*

Folatgehalt_{exp} *mittels SIVA-Methode ermittelter Folatgehalt [$\mu\text{g}/100 \text{ g}$]*

13 Quantitative Methoden

Nachfolgend werden alle während dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Quantifizierung verschiedenerer Folatgehalte erläutert.

13.1 Methodvalidierung des Analyten MeFox zur Bestimmung des Gesamt-MeFox-Gehaltes

Kalibrierfunktionen

Zum Erstellen der Kalibrierfunktion an der HPLC-DAD die Analytlösungen von MeFox und PteGlu wie unter Kapitel 10.2 beschrieben herstellen. Eine konstante Menge des internen Standards PteGlu mit unterschiedlichen Mengen des Analyten MeFox mischen und mit Extraktionspuffer 1 auf 1 mL auffüllen, sodass ein Stoffmengenverhältnis $n(A)/n(ISTD)$ von 0,1 – 1,0 erreicht wird. Messen der Kalibrierstandards an der HPLC-DAD wie unter Kapitel 11.2.1 beschrieben. Nach der Messung lineare Regression durchführen durch Auftragen der Stoffmengenverhältnisse gegen die Flächenverhältnisse $A(A)/A(ISTD)$. Die erhaltene Kalibrierfunktion verwenden, um die Konzentration der frisch hergestellten Analytlösungen an jedem Aufarbeitungstag neu zu bestimmen wie unter Punkt 10.2 erläutert.

Zum Erstellen der Kalibrierfunktion an der LC-MS/MS die MeFox-Analytlösung wie unter Kapitel 10.2 beschrieben verdünnen. Eine konstante Menge der 10,0 µg/mL Lösung des internen Standards [¹³C₅]-5-CHO-H₄folat mit variierenden Mengen der verdünnten MeFox-Analytlösung mischen und mit Elutionspuffer 1 auf 1 mL auffüllen, sodass ein Stoffmengenverhältnis $n(A)/n(ISTD)$ zwischen 0,06 – 20,0 eingestellt wird. Nach der Messung mittels LC-MS/MS (beschrieben unter Punkt 11.2.4) eine lineare Regression durchführen. Dazu die Stoffmengenverhältnisse gegen die Flächenverhältnisse $A(A)/A(ISTD)$ auftragen. Die Konzentration der verwendeten Lösung des internen Standards an jedem Aufarbeitungstag überprüfen durch Erstellen einer frischen Mischung aus Analyt und internem Standard innerhalb des linearen Bereiches.

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenze (BG) zunächst abschätzen über das Signal/Rausch-Verhältnis. Dazu einen Matrixblank herstellen wie in Tabelle 13.1 beschrieben und mit einer bekannten Konzentration Analyt versetzen. Anschließend NWG und BG nach Hädrich und Vogelgesang bestimmen. [Vogelgesang und Hädrich 1998] Dazu Matrixblank mit vier verschiedenen Dotierniveaus MeFox und einer konstanten Menge an internem Standard [¹³C₅]-5-CHO-H₄folat versetzen wie in Tabelle 13.2 erläutert. Dotierniveau 1 wird im Bereich

13. Quantitative Methoden

der geschätzten NWG angesetzt, Dotierniveau 4 zehnfach höher. Die Proben nach 13.3 aufarbeiten und an der LC-MS/MS vermessen wie unter 11.2.4 erläutert. Auf die Dekonjugasezugabe verzichten, da diese endogene Folate enthalten. Durch Subtraktion des aufgearbeiteten Probenblanks die Dotierniveaus um den MeFox Rest im Probenblank korrigieren.

Tabelle 13.1 Zusammensetzung des Matrixblanks zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze von MeFox.

Substanz	Einwaage [mg] bzw. Volumen [µL]
L-Leucin	13,0 mg
L-Lysin	12,6 mg
L-Valin	10,1 mg
L-Isoleucin	8,90 mg
L-Threonin	8,20 mg
α-Cellulose	942 mg
Ölsäure	7,00 µL

Tabelle 13.2 Dotierniveaus zur Bestimmung von NWG und BG des Analyten MeFox.

Zugesetzte Konzentration [µg/100 g]	Blank	Dotierniveau 1	Dotierniveau 2	Dotierniveau 3	Dotierniveau 4
MeFox	-	1,00	5,00	7,50	10,0
[¹³ C ₅]-5-CHO-H ₄ folat	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11

Wiederfindung

Zur Bestimmung der Wiederfindung drei verschiedene Dotierniveaus festlegen. Die Dotierniveaus wählen unterhalb, innerhalb und oberhalb des erwarteten MeFox-Gehaltes in der Hefeprobe. Einen Matrixblank (hergestellt nach Tabelle 13.1) mit den in Tabelle 13.3 gelisteten Stoffmengen versetzen und nach Kapitel 13.3 aufarbeiten.

Tabelle 13.3 Dotierniveaus zur Bestimmung der Wiederfindung des Analyten MeFox.

Zugesetzte Konzentration [µg/100 g]	Blank	Dotierniveau 1	Dotierniveau 2	Dotierniveau 3
MeFox	-	10,0	50,0	150
[¹³ C ₅]-5-CHO-H ₄ folat	0,11	0,11	0,11	0,11

Gerätepräzision

Für die Bestimmung der Gerätepräzision von MeFox eine Hefeprobe nach Kapitel 13.3 aufarbeiten und die Probe 10-mal hintereinander am LC-MS/MS nach Kapitel 11.2.4 vermessen. Aus den einzelnen Injektionen die relative Standardabweichung berechnen.

Wiederholpräzision

Für die Bestimmung der Wiederholpräzision dieselbe Hefeprobe innerhalb von drei Wochen in Vierfachbestimmung nach Kapitel 13.3 extrahieren und nach Kapitel 11.2.4 vermessen. Aus den Vierfachmessungen den Mittelwert und aus den Mittelwerten die relative Standardabweichung berechnen.

13.2 Bestimmung der Konzentration der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamatstandards

Die Konzentration der von Schaller et al. [2018] synthetisierten 5-CH₃-H₄folat Polyglutamatstandards (2-7) wie unter Kapitel 11.2.2 beschrieben bestimmen. Dazu die nach Kapitel 10.2 erstellte Kalibrierfunktion verwenden.

13.3 Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes in Hefen

Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung wird lichtgeschützt durchgeführt. Bei jeder Aufarbeitung wird ein Probenblank ohne Probeneinwaage während des gesamten Verlaufes der Probenaufarbeitung mitgeführt. 10 mg der homogenisierten gefriergetrockneten Hefe (5 mg der gefriergetrockneten kultivierten Hefe) werden in ein 30 mL Verschlussgläschen eingewogen und nach Zugabe von 10 mL Extraktionspuffer 1 für 15 min equilibriert. Die Zugabe der internen Standards erfolgt innerhalb des Kalibrierbereiches von $n(\text{ISTD})/n(\text{A})$ für die jeweiligen Analyten. Nach weiteren 15 min Equilibrierung werden die Proben für 10 min gekocht (100 °C) und sofort im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe der Enzymlösungen (1,8 mL Hühnerpankreatin und 300 µL Rattenserum) werden die Proben über Nacht bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach erneutem Erhitzen (10 min, 100 °C) gefolgt von Abkühlen im Eisbad werden jeweils 10 mL Acetonitril zugegeben und die Lösungen quantitativ in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Die Lösungen für 20 min bei 4 °C zentrifugieren (4.000 rpm) und den Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen abdekantieren.

13. Quantitative Methoden

Festphasenaufreinigung mittels SAX-Kartuschen (500 mg, 3 mL)

Festphasenkartuschen mit zwei Säulenvolumina Methanol sowie zwei Säulenvolumina Equilibrierungspuffer 1 konditionieren und die Proben auftragen. Kartuschen durch Zugabe von drei Säulenvolumina Equilibrierungspuffer 1 waschen und trocken saugen. Mit 2 mL Elutionspuffer 1 die Analyten von den Kartuschen eluieren, die Eluate membranfiltrieren und bis zur Analyse mittels LC-MS/MS (Punkt 11.2.4) bei -20 °C aufbewahren.

Bestimmung der Analytkonzentration mittels HPLC-DAD

Die unter Kapitel 10.2 beschriebenen Analytlösungen zur Bestimmung der Konzentrationen mit Hilfe der jeweiligen Kalibrierfunktionen wie unter Kapitel 11.2.1 erläutert an der HPLC-DAD bestimmen.

Bestimmung der Konzentration der internen Standards mittels LC-MS/MS

Die unter Kapitel 10.2 beschriebenen Lösungen der internen Standards zur Bestimmung der Konzentrationen mit Hilfe der jeweiligen Kalibrierfunktionen wie unter Kapitel 11.2.4 erläutert an der LC-MS/MS bestimmen.

13.4 Bestimmung des 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₇ Gehaltes in Hefen

Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung wird lichtgeschützt durchgeführt. Die gefriergetrocknete, homogenisierte Hefe (50 – 150 mg) wird in ein 30 mL Verschlussgläschen eingewogen, 10 mL Extraktionspuffer 2 zugegeben und für 15 min equilibriert. Die Zugabe der internen Standards [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat erfolgt innerhalb des Kalibrierbereiches von n(ISTD)/n(A). Nach weiteren 15 min Equilibrierung erfolgt ein 15-minütiger Zellzerstörungsschritt bestehend aus wechselseitigem Vortexen (30 s) und Abkühlen im Eisbad (30 s). Die Proben werden für 10 min gekocht (100 °C), sofort im Eisbad abgekühlt und mit 5 mL Acetonitril versetzt. Nach quantitativem Überführen in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen wird für 20 min bei 4 °C zentrifugiert (4.000 rpm) und der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen abdekantiert.

Erstellen der matrixkorrelierten Responsefunktion

Zunächst muss eine polyglutamatfreie Hefematrix erstellt werden. Dazu werden 100 mg gefriergetrocknete Bäckerhefe in ein 30 mL Verschlussgläschen eingewogen und nach Zugabe von 10 mL Extraktionspuffer 2 eine Stunde gekocht (100 °C). Nach kurzem Einfrieren und Auftauen werden Enzymlösungen (2 mL Hühnerpankreatinsuspension und 500 µL Rattenserum) zugegeben und die Proben über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach 10-minütigem Kochen

(100 °C) und Abkühlen der Proben werden 0,15 g Aktivkohle zugeben und die Proben für zwei Stunden auf Eis gerührt. Nach 15-minütiger Zellzerstörung (wechselseitig 30 s Vortexen und 30 s Kühlen im Eisbad) und 10 min Kochen (100 °C) werden die Proben abgekühlt und mit 10 mL Acetonitril versetzt. Nach quantitativem Überführen in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen die Proben zentrifugieren (20 min, 4 °C, 4.000 rpm). Die Zugabe des internen Standards [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat sowie der synthetisierten Polyglutamate erfolgt innerhalb eines Kalibrierbereiches $n(\text{ISTD})/n(\text{A})$ von 0,04 – 16,0 wie unter Kapitel 10.1 erläutert. Die Kartuschenaufreinigung erfolgt nach Homogenisieren der dotierten Proben mit SAX-Kartuschen (2 g, 12 mL) analog zu den Proben.

Festphasenaufreinigung mittels SAX-Kartuschen (1 g, 6 mL)

Festphasenkartuschen mit zwei Säulenvolumina Methanol sowie zwei Säulenvolumina Equilibrierungspuffer 1 konditionieren und die Proben auftragen. Kartuschen durch Zugabe von zwei Säulenvolumina Equilibrierungspuffer 1 waschen und trocken saugen. Mit 6 – 8 mL Elutionspuffer 1 die Analyten von den Kartuschen eluieren, die Eluate membranfiltrieren und bis zur Analyse mittels LC-MS/MS (0) bei -20 °C aufbewahren

Bestimmung der Analytkonzentration mittels HPLC-DAD

Die unter 10.2 beschriebenen Analytlösung (5-CH₃-H₄folat) zur Bestimmung der Konzentrationen mit Hilfe der Kalibrierfunktion wie unter Kapitel 11.2.1 erläutert an der HPLC-DAD bestimmen.

Bestimmung der Konzentration der internen Standards mittels LC-MS/MS

Die unter Kapitel 10.2 beschriebenen Lösungen der internen Standards zur Bestimmung der Konzentrationen mit Hilfe der Kalibrierfunktion wie unter Kapitel 11.2.4 erläutert an der LC-MS/MS bestimmen.

13.5 Bestimmung des Polyglutamatspektrums in Hefen mittels LC-MS/MS

Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung erfolgt wie unter Kapitel 13.4 beschrieben. Auf eine Konzentrationsbestimmung des internen Standards kann allerdings verzichtet werden, da lediglich eine Semi-Quantifizierung in Relation zum zugesetzten ISTD erfolgt. Es ist darauf zu achten, dass exakt dieselbe Menge an ISTD (5 µL der 10,0 µg/mL Lösung) zugegeben wird.

13. Quantitative Methoden

Semi-Quantifizierung mittels LC-MS/MS

Die Semi-Quantifizierung erfolgt wie unter Kapitel 0 erläutert.

13.6 Alternative Probenextraktion mittels des Siedens in gepufferter Ethanollösung

Methodenentwicklung für die alternative Probenextraktion mittels des Siedens in gepufferter Ethanollösung

Verschiedene Extraktionsansätze testen und mit der Standardaufarbeitung zur Bestimmung der Polyglutamate (Kapitel 13.5) vergleichen. Dazu verschiedene Extraktionspuffer, Extraktionsvolumina und Siedezeiten in Ethanol vergleichend untersuchen (Tabelle 13.4).

Zu 100 mg gefriergetrockneter, homogenisierter Hefe werden 21 – 40 mL Extraktionspuffer 3 bzw. 4 gegeben und die Proben 15 min equilibriert. Die Zugabe der internen Standards sowie der Zellzerstörungsschritt durch Vortexen erfolgen analog zu Kapitel 13.3. Die Proben werden für 3 – 7 min bei 80 °C gesiedet und im Eisbad abgekühlt. Das Ethanol wird am Rotationsverdampfer entfernt (30 °C, 30 mbar) und der Rückstand in 10 mL Extraktionspuffer 2 aufgenommen. 10 mL Acetonitril werden zugegeben, die Proben zentrifugiert (20 min, 4 °C, 4.000 rpm) und der Überstand abdekantiert. Die Probenaufreinigung erfolgt wie unter 13.4 beschrieben.

Tabelle 13.4 Getestete Ansätze zur Methodenentwicklung der Folatextraktion mittels des Siedens in gepufferter Ethanollösung.

Ansatz	Extraktionspuffer	Puffervolumen [mL]	Siedezeit [min]
Ansatz 1	Extraktionspuffer 3	20	3
Ansatz 2	Extraktionspuffer 3	30	3
Ansatz 3	Extraktionspuffer 3	40	3
Ansatz 4	Extraktionspuffer 3	20	5
Ansatz 5	Extraktionspuffer 3	20	7
Ansatz 6	Extraktionspuffer 4	20	3
Ansatz 7	Extraktionspuffer 4	20	5

Alternative Probenextraktion zur Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes

Die Aufarbeitung erfolgt nach Kapitel 13.3 mit einigen Anpassungen. Zu 10 mg gefriergetrockneter, homogenisierter Hefe werden 21 mL Extraktionspuffer 4 gegeben und die Proben 15 min equilibriert. Die Zugabe der internen Standards erfolgt analog zu Kapitel 13.3. Nach weiteren 15 min Equilibrierung werden die Proben für 5 min bei 80 °C gesiedet und im Eisbad abgekühlt. Das Ethanol wird am Rotationsverdampfer entfernt (30 °C, 30 mbar) und der Rückstand in 10 mL Extraktionspuffer 1 aufgenommen. Die Enzymzugabe, Inkubation, und Aufreinigung der Probenextrakte erfolgt analog zu Kapitel 13.3. Die Konzentrationsbestimmung der verwendeten Analytlösungen und internen Standards erfolgt ebenfalls wie unter Kapitel 13.3 erläutert.

Alternative Probenextraktion zur Quantifizierung der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate (1-7)

Die Aufarbeitung erfolgt nach Kapitel 13.4 mit einigen Anpassungen. Zu 50 – 150 mg gefriergetrockneter, homogenisierter Hefe werden 21 mL Extraktionspuffer 4 gegeben und die Proben 15 min equilibriert. Die Zugabe der internen Standards sowie der Zellzerstörungsschritt durch Vortexen erfolgen analog zu Kapitel 13.3. Die Proben werden für 5 min bei 80 °C gesiedet und im Eisbad abgekühlt. Das Ethanol wird am Rotationsverdampfer entfernt (30 °C, 30 mbar) und der Rückstand in 10 mL Extraktionspuffer 2 aufgenommen. 10 mL Acetonitril werden zugegeben, die Proben zentrifugiert (20 min, 4 °C, 4.000 rpm) und der Überstand abdekantiert. Die Probenaufreinigung erfolgt wie unter Kapitel 13.4 beschrieben.

Alternative Probenextraktion zur semi-quantitativen Bestimmung der Polyglutamate

Die Aufarbeitung erfolgt analog zur alternativen Extraktion zur Quantifizierung der 5-CH₃-H₄folate Polyglutamate. Auf eine Konzentrationsbestimmung des internen Standards kann allerdings verzichtet werden, da lediglich eine Semi-Quantifizierung in Relation zum zugesetzten ISTD erfolgt. Es ist darauf zu achten, dass exakt dieselbe Menge an ISTD (5 µL der 10,0 µg/mL Lösung) zugegeben wird.

13. Quantitative Methoden

13.7 Bestimmung der relativen Wiederfindung der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate

Bestimmung des Gehaltes der Polyglutamate 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₇ im Methodenvergleich

Die Quantifizierung durchführen wie unter Kapitel 13.4 beschrieben. Vergleichend die Probenextraktion durchführen wie unter Kapitel 13.6 beschrieben.

Bestimmung der absoluten Wiederfindung der Polyglutamate 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₇ im Methodenvergleich

Die Quantifizierung erfolgt nach Kapitel 13.4 mit geringfügigen Modifikationen. Der interne Standard wird erst vor Durchführung der Messung mittels LC-MS/MS (Kapitel 0) zugegeben und somit die absolute Menge der extrahierten Polyglutamate bestimmt. Vergleichend wird die Probenextraktion wie unter Kapitel 13.6 erläutert durchgeführt. Die Berechnung erfolgt nach Kapitel 12.6.

Bestimmung der relativen Wiederfindung

Ergebnisse der absoluten Wiederfindung und der Bestimmung des Polyglutamatgehaltes 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₇ nach Kapitel 12.6 in Relation zueinander setzen.

13.8 Methodenentwicklung für alternative Kartuschaufreinigungen

Zum Vergleich verschiedener Festphasenmaterialien zur Probenaufreinigung zunächst Standardgemische herstellen wie unter Kapitel 10.2 erläutert. Weitere Tests durchführen mit aufgearbeiteten Hefeproben. Dazu die Proben aufarbeiten wie unter Kapitel 13.5 beschrieben. Für die Probenaufreinigung verschiedene Festphasenmaterialien testen wie nachfolgend beschrieben.

Methodenentwicklung alternative SAX-Aufreinigung

Bei allen Methoden die Kartuschen konditionieren mit zwei Säulenvolumina Methanol und zwei Säulenvolumina Testwaschlösung 1. Nach der Probenauftragung die Kartuschen waschen durch Auftragung von zwei Säulenvolumina Testwaschlösung 1 und Säulen trocken saugen. Für die alternative SPE-Aufreinigung mittels SAX-Kartuschen verschiedene Elutionslösungen testen. Dazu die Testelutionslösungen 1 – 6 verwenden und mit jeweils 2 – 8 mL davon die aufgetragenen Proben eluieren.

Methodenentwicklung C18-Aufreinigung

Bei allen getesteten Methoden die Kartuschen konditionieren mit zwei Säulenvolumina Methanol und zwei Säulenvolumina Testwaschlösung 3. Je nach der zu testenden Aufreinigung die Proben auf pH 5 belassen oder durch Zugabe von konzentrierter Ameisensäure auf einen pH-Wert von pH 2 einstellen. Nach der Probenauftragung die Kartuschen waschen durch Auftragung von zwei Säulenvolumina Testwaschlösung 3 und Säulen trocken saugen. Testwaschlösung 2 verwenden für Konditionierung und Waschen, wo der pH-Wert der Probe auf pH 5 belassen wird. Für die SPE-Aufreinigung mittels C18-Kartuschen verschiedene Elutionslösungen testen. Dazu die Testelutionslösungen 7 – 15 verwenden und mit jeweils 2 – 8 mL davon die aufgetragenen Proben eluieren.

Methodenentwicklung NH₂-Aufreinigung

Bei allen Methoden die Kartuschen konditionieren mit zwei Säulenvolumina Methanol und zwei Säulenvolumina Testwaschlösung 4. Nach der Probenauftragung die Kartuschen waschen durch Auftragung von je einem Säulenvolumen Testwaschlösung 4 und 5 und Säulen trocken saugen. Für die SPE-Aufreinigung mittels NH₂-Kartuschen verschiedene Elutionslösungen testen. Dazu die Testelutionslösungen 16 – 18 verwenden und mit jeweils 2 – 8 mL davon die aufgetragenen Proben eluieren.

Methodenentwicklung MAX-Aufreinigung

MAX-Kartuschen konditionieren mit zwei Säulenvolumina Methanol und zwei Säulenvolumina destilliertem Wasser. Nach der Probenauftragung die Kartuschen waschen durch Auftragung von zwei Säulenvolumina Testwaschlösung 6 und Säulen trocken saugen. Für die Elution Testelutionslösung 19 verwenden und 2 mL zum Eluieren verwenden.

Methodenentwicklung Phenyl-Aufreinigung

Phenylkartuschen konditionieren mit zwei Säulenvolumina Methanol und zwei Säulenvolumina Testwaschlösung 7. Probe durch Zugabe von konzentrierter Ameisensäure auf pH 3,4 einstellen. Nach der Probenauftragung die Kartuschen waschen durch Auftragung von zwei Säulenvolumina Testwaschlösung 7 und Säulen trocken saugen. Für die Elution Testelutionslösung 20 verwenden und 2 mL zum Eluieren verwenden.

Methodenentwicklung HLB-Aufreinigung

HLB-Kartuschen konditionieren mit zwei Säulenvolumina Methanol und zwei Säulenvolumina Testwaschlösung 8. Nach der Probenauftragung die Kartuschen waschen durch Auftragung von zwei Säulenvolumina Testwaschlösung 8 und Säulen trocken saugen. Für die Elution Testelutionslösungen 21 oder 22 verwenden und 2 mL zum Eluieren verwenden.

13. Quantitative Methoden

13.9 Alternative Probenaufreinigungen mittels verschiedener Festphasenextraktionen

Probenaufarbeitung für alternative SAX-Aufreinigung

Die Probenaufarbeitung erfolgt wie unter Kapitel 13.4 beschrieben.

Probenaufarbeitung für C18-Aufreinigung

Die Probenaufarbeitung erfolgt wie unter Kapitel 13.4 beschrieben. Allerdings werden vor dem Zentrifugationsschritt 10 mL Extraktionspuffer 2 statt 10 mL Acetonitril zugegeben. Nach dem Zentrifugieren (20 min, 4 °C, 4.000 rpm) wird der pH-Wert der Probe mit konzentrierter Ameisensäure auf pH 2 gesenkt und die Probe nochmals zentrifugiert (20 min, 4 °C, 4.000 rpm). Der Überstand wird abdekantiert und für die alternative Probenaufreinigung wie nachfolgend erläutert verwendet.

Probenaufarbeitung für HLB-Aufreinigung

Die Probenaufarbeitung erfolgt analog zur Aufarbeitung für die C18-Aufreinigung.

Probenaufarbeitung für alternative NH₂-Aufreinigung

Die Probenaufarbeitung erfolgt wie unter Kapitel 13.4 beschrieben.

Alternative Festphasenaufreinigung mittels SAX-Kartuschen (1 g, 6 mL)

Festphasenkartuschen mit zwei Säulenvolumina Methanol sowie zwei Säulenvolumina Equilibrierungspuffer 1 konditionieren und die Proben auftragen. Kartuschen durch Zugabe von zwei Säulenvolumina Waschpuffer 2 waschen und trocken saugen. Mit 8 mL Elutionslösung 2 (2 mL Elutionslösung 1 bei der Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes) die Analyten von den Kartuschen eluieren. Die Eluate membranfiltrieren und in 500 µL Aliquoten unterm Stickstoffstrom bis zur Trockene einengen. Eingeengte Eluate bis zur Analyse mittels LC-MS/MS (Kapitel 0) bei -20 °C aufbewahren. Vor der Messung die Rückstände in 100 µL Elutionspuffer 2 aufnehmen.

Festphasenaufreinigung mittels C18-Kartuschen (500 mg, 3 mL)

Festphasenkartuschen mit zwei Säulenvolumina Methanol sowie zwei Säulenvolumina Equilibrierungspuffer 2 konditionieren und die Proben auftragen. Kartuschen durch Zugabe von je einem Säulenvolumen Waschpuffer 1 sowie Waschpuffer 2 waschen und trocken saugen. Mit 13 mL Elutionslösung 2 (2 mL für die Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes) die Analyten von den Kartuschen eluieren. Die Eluate membranfiltrieren und in 500 µL Aliquoten unterm Stickstoffstrom bis zur Trockene einengen. Eingeengte Eluate bis zur Analyse mittels LC-

14. Profiling der Folatmetaboliten mittels (U)HR-MS

MS/MS (Kapitel 0) bei -20 °C aufbewahren. Vor der Messung die Rückstände in 100 µL Elutionspuffer 2 aufnehmen.

Festphasenaufreinigung mittels HLB-Kartuschen (500 mg, 3 mL)

Festphasenkartuschen mit zwei Säulenvolumina Methanol sowie zwei Säulenvolumina Equilibrierungspuffer 2 konditionieren und die Proben auftragen. Kartuschen durch Zugabe von zwei Säulenvolumina Waschpuffer 1 waschen und trocken saugen. Mit 20 mL Elutionslösung 3 (2 mL bei der Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes) die Analyten von den Kartuschen eluieren. Die Eluate membranfiltrieren und in 500 µL Aliquoten unterm Stickstoffstrom bis zur Trockene einengen. Eingeengte Eluate bis zur Analyse mittels LC-MS/MS (Kapitel 0) bei -20 °C aufbewahren. Vor der Messung die Rückstände in 100 µL Elutionspuffer 2 aufnehmen.

Festphasenaufreinigung mittels NH₂-Kartuschen (500 mg, 3 mL)

Festphasenkartuschen mit zwei Säulenvolumina Methanol sowie zwei Säulenvolumina Equilibrierungspuffer 1 konditionieren und die Proben auftragen. Kartuschen durch Zugabe von einem Säulenvoluminen Waschpuffer 2 sowie einem Säulenvolumen Methanol waschen und trocken saugen. Mit 8 mL Elutionslösung 4 die Analyten von den Kartuschen eluieren. Die Eluate membranfiltrieren und in 500 µL Aliquoten unterm Stickstoffstrom bis zur Trockene einengen. Eingeengte Eluate bis zur Analyse mittels LC-MS/MS (Kapitel 0) bei -20 °C aufbewahren. Vor der Messung die Rückstände in 100 µL Elutionspuffer 2 aufnehmen.

14 Profiling der Folatmetaboliten mittels (U)HR-MS

Vor der Probenaufarbeitung alle zu verwendenden Glasgeräte dreimalig mit Wasser (LC-MS grade) sowie Methanol (LC-MS grade) waschen und über Nacht trocknen lassen. Alle Aufarbeitungen werden soweit möglich unter Lichtausschluss durchgeführt.

14.1 Test verschiedener *dilute and shoot* Methoden zur Probenvorbereitung

Verschiedene Lösungsmittelgemische testen zur Probenextraktion und anschließender Messung mittels HR-MS. Die getesteten Lösungsmittelgemische werden in der nachfolgenden Tabelle 14.1 gelistet:

14. Profiling der Folatmetaboliten mittels (U)HR-MS

Tabelle 14.1 Verwendete Lösungsmittelgemisch für die Probenextraktion mittels *dilute and shoot* Methode.

Lösungsmittelgemisch	Fortlaufende Bezeichnung
80 % Methanol	Lösungsmittelgemisch 1
50 % Acetonitril	Lösungsmittelgemisch 2
Methanol/Acetonitril/Wasser (40/40/20, v/v/v)	Lösungsmittelgemisch 3
Methanol/Isopropanol/Wasser (1/1/1, v/v/v)	Lösungsmittelgemisch 4

Jeweils 50 mg der gefriergetrockneten, homogenisierten Hefe in ein Bead Tube Gefäß einwiegen und mit 1 mL des zu testenden Lösungsmittelgemisches versetzen. Bead Tube Programm mit folgenden Parametern durchlaufen lassen: 4 °C, 4 x 30 s, 45 s Pause, 6800 rpm. Proben 10 min im Ultraschallbad behandeln und zentrifugieren (4 °C, 10 min, 20.000 rpm). Überstand abnehmen und die Proben nochmals mit 1 mL Lösungsmittelgemisch versetzen und erneut 10 min im Ultraschallbad behandeln. Proben zentrifugieren (4 °C, 10 min, 20.000 rpm) und die Überstände vereinen. Proben bis zur Trockene einengen und in exakt 500 µL Lösungsmittelgemisch 2 aufnehmen. Die Probenextraktion im Ultraschallbad unter veränderlichen Temperaturbedingungen durchführen. Dazu Extraktion auf Eis, bei Raumtemperatur sowie bei 80 °C durchführen und die Ergebnisse miteinander vergleichen.

14.2 Bestimmung des Folatspektrums in Lebensmitteln mittels FT-ICR-MS

Gerätekalibration

Vor Durchführung der Messung das Massenspektrometer extern kalibrieren durch eine 20 µg/mL Arginin-Lösung (gelöst in Methanol) unter Verwendung der Messparameter wie gelistet unter Kapitel 11.2.6.

Methodenentwicklung

Zur Methodenentwicklung die Standardlösungen wie unter Kapitel 10.2 erläutert herstellen.

Wahl des Ionisierungsmodus

Alle Standards sowohl im positiven als auch im negativen Modus messen und den Modus mit höheren Peakintensitäten wählen. Für jeden Analyten die Parameter RF-Amplitude, ToF Time und Accumulation Time schrittweise anpassen. Parameter mit den höchsten Peakintensitäten für die vermessenen Standards für zukünftige Probenmessungen verwenden.

Wahl der optimalen Probenverdünnung

Probeneluate der Aufreinigung mittels HLB-Kartuschen (hergestellt nach Kapitel 13.7) in verschiedenen Verdünnungen vermessen. Methanol für die Verdünnungen verwenden. Mit einer

14. Profiling der Folatmetaboliten mittels (U)HR-MS

1:100 Verdünnung beginnen und stufenweise die Verdünnung reduzieren, bis höhere Peakintensitäten der bekannten Folatpeaks erreicht werden. Verdünnung so wählen, dass eine Übersättigung der ICR-Zelle ausgeschlossen ist. Diese messen an Hand der Sättigung des FID (free induction decay, freier Induktionsabfall) und diesen unter einem Maximum von einer Intensität von 10.000 halten.

Wahl des optimalen Zusatzes zur Anpassung des pH-Wertes der Proben

Die optimal verdünnte Probe mit verschiedenen Zusätzen (zwischen 0,001 und 0,1 %) von Ammoniak und Natronlauge (5 M) versetzen, um den pH-Wert der Probe zu erhöhen und somit eine Ionisierung zu begünstigen. Den optimalen Anteil an Hand der gesteigerten Peakintensität festlegen und für die weiteren Probenmessungen beibehalten.

Kalibrierung von gemessenen Spektren

Im Verlauf der Arbeit wurde das Kalibrierverfahren der gemessenen Spektren verändert. Zu Beginn der Arbeit wurden diese extern kalibriert. Dazu das Massenspektrometer zu Beginn jedes Messtages extern an Hand einer Arginin-Lösung (20 µg/mL in Methanol) kalibrieren. Bekannte Metaboliten einer Probe festlegen, welche idealerweise die m/z des gewünschten Kalibrierbereiches abdecken. An Hand der zugehörigen m/z Werte eine Kalibrierliste erstellen und die gemessenen Spektren (Kapitel 11.2.6, Methode 1) mit Hilfe dieser Kalibrierliste extern kalibrieren.

Gegen Ende der Arbeit wurden die gemessenen Spektren (Kapitel 11.2.6, Methode 2) intern kalibriert. Dazu eine Stammlösung Arginin (20 µg/mL in Methanol) mit einer Anzahl von 20 Scans nach Kapitel 11.2.6, Methode 2 vermessen. Die ESI-Quelle nur grob mit Methanol reinigen und so einen Restanteil von Arginin in der Kapillare zurückbehalten. Die Probe injizieren und somit eine beabsichtigte Kontamination mit Arginin verursachen. Die erhaltenen Spektren intern auf die Peaks des Arginin-Clusters kalibrieren.

Datenprozessierung

Zur Datenprozessierung nach der Spektrenkalibrierung die Haus-internen Software Pakete des Programmes RStudio verwenden. Auf die Anwendung des Massendefekt-Filters verzichten, um keine mehrfach geladenen Molekülionenpeaks zu verlieren. Den Satellitenpeak-Filter zur Entfernung von Rauschsignalen, welche durch die Fourier-Transformation hervorgerufen werden, übernehmen, wie dieser hausintern üblicherweise angewendet wird. Den Isotopen-Filter anpassen an das Vorhandensein von doppelt und dreifach geladenen Spezies. Als doppelt und dreifach geladenen identifizierte Peaks separat extrahieren mittels eines RStudio Skriptes. Für diese Peaks kann eine erhöhte Validität angenommen werden auf Grund der Verifizierung des Ladungszustandes dieser Peaks.

14. Profiling der Folatmetaboliten mittels (U)HR-MS

Für den Abgleich mit bereits bekannten und vermuteten Folatspezies diverse m/z Werte berechnen. Dazu die bekannten Monoglutamatspezies transferieren bis hin zu Dekaglutamaten (vgl. Anhang 17). Die verwendeten Monoglutamatspezies zur Erstellung der Datenbankliste finden sich in Anhang 16. Mehrfachladungen und Addukt-Ionen bei der Berechnung berücksichtigen. Die nach Anwendung des Isotopen-Filters separat extrahierten doppelt und dreifach geladenen Spezies der gemessenen Hefeproben mit Hilfe eines RStudio Skriptes abgleichen mit der zuvor erstellten Datenbankliste. Die nach Anwendung von Satellitenpeak- und Isotopenpeak-Filter resultierende Peaks ebenfalls abgleichen mit dieser Datenbankliste. Für beide Abgleiche einen Fehler < 1 ppm wählen. Übereinstimmungen zwischen Datenbankeintrag und experimentell ermitteltem m/z innerhalb des gewählten Fehlerlimits für weitere Datenauswertung verwenden. Übereinstimmungen der doppelt und dreifach geladenen Spezies können als Folate angenommen werden, Übereinstimmungen der verbleibenden Peaks können lediglich als vermutliche Folate annotiert werden.

14.3 Bestimmung der Folatmetaboliten in Hefen mittels UHPLC-Q-ToF-MS

Gerätekalibration und Qualitätskontrolle

Zur Kalibration des Massenspektrometers zu Beginn einer jeden Messreihe einen Tune-Mix („Tune-Mix ESI pos“, Agilent Technologies) injizieren und das Massenspektrometer extern kalibrieren. Zur Qualitätskontrolle in beiden Polaritäten Auflösung und Intensitäten der Kalibrierpeaks aufzeichnen und dokumentieren.

Methodenentwicklung

Vor Durchführung von Messungen eine Methode entwickeln, um Folate optimal am UHPLC-Q-ToF-MS detektieren zu können. Dazu die Parameter Chromatographiesäulenmaterial, Gradient, Fließmittel und Quelltemperatur verändern und optimieren. Die getesteten Parameter werden nachfolgend gelistet. Die Optimierung durchführen an Hand der nach Kapitel 10.2 hergestellten Mono- und Polyglutamatreferenzen.

Getestete Chromatographiesäulen:

- Säule 1: Acquity UPLC BEH C18, 1,7 μm , 2,1 x 100 mm, Waters, Eschborn, Deutschland
- Säule 2: Acquity UPLC CSH C18, 1,7 μm , 2,1 x 1000 mm, Waters, Eschborn, Deutschland
- Säule 3: Cortecs UPLC C18, 1,6 μm , 2,1 x 100 mm, Waters, Eschborn, Deutschland
- Säule 4: Cortecs UPLC C18+, 1,6 μm , 2,1 x 100 mm, Waters, Eschborn, Deutschland
- Säule 5: Restek RaporTM, ARC-18, 1,8 μm , 2,1 x 100 mm, Restek GmbH, Bad Homburg, Deutschland

14. Profiling der Folatmetaboliten mittels (U)HR-MS

Getestete Gradienten (pre run time 3,7 min):

Tabelle 14.2 Getestete Gradiente während der Methodenentwicklung zur Analyse der Folatmetaboliten mittels UHPLC-Q-ToF-MS.

Zeit [min]	Gradient 1		Gradient 2		Gradient 3	
	% A	% B	% A	% B	% A	% B
0	95	5	97	3	97	3
1,00	95	5			97	3
1,12	95	5				
1,25			90	10		
2,25					90	10
2,50			90	10		
3,50					90	10
5,50			50	50		
6,00	75	25	50	50		
6,30			100	100		
6,50					50	50
6,41	0,4	99,6				
7,00					50	50
7,30					100	100
8,00			100	100		
8,30			97	3		
9,00					100	100
9,30					97	3
10,01	0,4	99,6				

Getestete Fließmittel:

- A: 0,1 % Ameisensäure, B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure
- A: 1 % Ameisensäure, B: Acetonitril mit 1 % Ameisensäure

Getestete Quellentemperaturen:

- 200 °C
- 300 °C

Von den getesteten Säulen konnte mit Säule 5 die beste chromatographische Trennung erzielt werden. Durch Erhöhung des Ameisensäureanteils in den Fließmitteln auf 1 % konnte bezüglich der Polyglutamate eine deutliche Verbesserung der Peakschärfe beobachtet werden. Gradient 2 wurde gewählt, da vor allem für die Polyglutamate eine bessere Auftrennung erzielt wurde. Um eine Elution von Metaboliten innerhalb der Totzeit zu verhindern, wurde der Gradi-

14. Profiling der Folatmetaboliten mittels (U)HR-MS

ent um eine einminütige Equilibrierung auf Startbedingungen erweitert (Gradient 3). Eine Erhöhung der Quelltemperatur ergab keine Veränderung, sodass diese bei 200 °C belassen wurde. Die letztendlich für die Messungen verwendeten Parameter finden sich unter Punkt 11.2.7.

Prozessierung von Rohdaten

Zur Prozessierung der Rohdaten die Software Genedata Refiner MS verwenden. Die Filter zur Reduktion von chemischen Hintergrundsignal (chemical noise subtraction), zum Setzen eines Intensitätsschwellenwertes (intensity cutoff filter), zur Kalibrierung („calibration“) sowie zum Abgleich der Retentionszeit (retention time alignment) entsprechend anpassen. Gesetzte Filter an Hand zugehöriger Folatsignale (bekannt durch Vermessen der entsprechenden Standardlösungen nach Kapitel 10.2) validieren und darauf achten, dass die Folatsignale auch nach Anwendung der Filter weiterhin in der Datenmatrix verbleiben. Mit den Optionen Peak Picking, Peak Clustering und Addukt Detektion ebenso verfahren.

Vorprozessierte Daten weiter filtern und nur valide Daten behalten, die in mindestens 50 % der gemessenen Proben detektiert werden können. Dafür jede nach Kapitel 13.5 sowie Kapitel 13.7 aufgearbeitete Probenreihe unabhängig voneinander betrachten.

Erstellen der bereinigten Datenmatrix

Zur weiteren Datenreduktion die vorprozessierte Datenmatrix verkürzen auf potentielle Folatvitamere. Dazu analog zur Auswertung der FT-ICR-MS Daten zunächst eine Folatdatenbank (für den positiven Modus) erstellen unter Berücksichtigung verschiedener Ladungszustände und Adduktionen. Die verwendeten Monoglutamatvitamere finden sich in Anhang 16. Diese wurden transferiert bis hin zu den Dodekaglutamaten (Anhang 17). Der Abgleich erfolgt mit Hilfe eines RStudio Skriptes unter Berücksichtigung der erwarteten oder experimentell an Hand der vermessenen Mono- und Polyglutamatstandards ermittelten Retentionszeiten. Eine Massengenauigkeit von < 10 ppm wird als oberes Limit gesetzt.

Statistische Auswertungen

Für die statistischen Auswertungen die vorprozessierte Datenmatrix verwenden. Alle verschiedenen Kartuschenaufreinigungen (SAX Standard- und SAX Alternativmethode, HLB Aufreinigung sowie C18 Aufreinigung) in einer Matrixprozessieren. Diese Datenmatrix in das Programm Genedata Analyst laden. Eine Hauptkomponentenanalyse mit allen Daten durchführen (Parameter: correlation matrix, valid values 0 %). Für die beiden SAX Aufreinigungen sowie C18 und HLB Aufreinigung jeweils eine Regression der partiellen kleinsten Quadrate durchführen. Die signifikantesten 100 Datenfeatures für jede Aufreinigungsmethode extrahieren. Die

14. Profiling der Folatmetaboliten mittels (U)HR-MS

zugehörigen m/z mit Hilfe von CEU Mass Mediator (<http://ceumass.eps.uspceu.es/mediator/>) möglichen InChiKeys zuordnen. Die so erhaltenen InChiKeys mit Hilfe von ClassyFire Batch (<https://cfb.fiehnlab.ucdavis.edu/>) den zugehörigen Molekülklassen zuordnen. Die Anzahl der identifizierten Molekülklassen pro Kartuschaufreinigung ermitteln und mit den Daten eine Heatmap unter Verwendung von RStudio erstellen. Zuvor jede Molekülklasse normieren auf die jeweilige Gesamtzahl, sodass prozentuale Werte miteinander verglichen werden. Des Weiteren die Anzahl der experimentellen Spezies für jede Molekülklasse ermitteln und die Werte für die verschiedenen Kartuschaufreinigungen miteinander vergleichen.

Targeted Auswertungen bekannter Folatvitamere

Zur gezielten Auswertung bekannter Folatvitamere die auf die Folatvitamere gekürzte Datenmatrix verwenden. Mit dieser Datenmatrix mit Hilfe eines RStudio Skriptes einen Datenbankabgleich durchführen. Zur zusätzlichen Verifizierung die MS^2 Daten berücksichtigen. Dazu mit den erhaltenen MS^2 Daten ebenfalls einen Datenbankabgleich unter Berücksichtigung von Retentionszeiten durchführen. Einen Intensitätsschwellenwert von 1.000 für die MS^2 Spektren annehmen. Potentielle übereinstimmende MS^2 Spektren an Hand ihres Fragmentierungsmusters zusätzlich verifizieren. Dieses muss übereinstimmen mit dem zugehörigen, experimentell durch Messen des entsprechenden Monoglutamatstandards (nach Kapitel 10.2) ermittelten Fragmentierungsspektrums.

Netzwerkanalysen auf Grundlage von MS^2 Daten

Experimentell ermittelte MS^2 Daten für die Netzwerkanalyse mittels GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/>) prozessieren. Die Einstellungen für die Vorläufer und Fragment Ionen Toleranz auf 0,02 Da setzen. Einen minimalen Cosine von 0,6 Da, ein Minimum an übereinstimmenden Fragmentionen von 5 und eine minimale Clustergröße von 2 akzeptieren. Das entsprechende Folatnetzwerk extrahieren. Mit dem extrahierten Folatnetzwerk ebenfalls einen Datenbankabgleich mit Hilfe eines RStudio Skriptes durchführen. Eine Massengenauigkeit von < 10 ppm akzeptieren.

Identifizierung unbekannter Folate innerhalb der Netzwerke

Nicht zugeordnete Peaks innerhalb des MS^2 Folatnetzes detaillierter betrachten, um deren Identität zu klären. Dazu die zugehörigen MS - und MS/MS -Spektren manuell in DataAnalysis betrachten und an Hand von Neutralverlusten zu bereits bekannten Folatvitameren versuchen, Zusammenhänge zu finden.

15. Synthese verschiedener Folatstandards

15 Synthese verschiedener Folatstandards

Zur Identifizierung gefundener Metaboliten wurden verschiedene C₂-Metaboliten synthetisiert.

15.1 5-Acetyl-tetrahydrofolat durch Umsetzung von H₄folat

1 mL der Eduktlösung 1 mit 43 mg EDC und 100 µL Eisessig versetzen. Lösung 30 min bei 80 °C suspendieren und mittels HPLC-DAD wie unter Kapitel 11.2.1 beschrieben aufreinigen. Für die Messung mittels NMR-Spektroskopie den aufgereinigten Metaboliten bis zur Trockene einengen, lyophilisieren und vor der Messung in D₂O aufnehmen.

15.2 5-Ethyl-tetrahydrofolat durch Umsetzung von PteGlu

Eduktlösung 2 mit 45 mL Synthesepuffer 3 versetzen. 3 Spatelspitzen Palladium als Katalysator und 2 mL 2-Octanol zugeben. Nach Zugabe von 4,5 g Natriumborhydrid das Reaktionsgemisch für 1 h equilibrieren. Durch Zugabe von Essigsäure (5 M) einen pH-Wert von pH 7,4 einstellen und 1,8 mL Acetaldehydlösung zugeben. Innerhalb einer Minute 4,5 g Natriumborhydrid zugeben und für eine 1 h inkubieren. Den pH-Wert durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure auf < 1 absenken. Nach 10 min Inkubation durch Zugabe von Natronlauge (5 M) den pH-Wert auf pH 5 erhöhen. Nach erneuter Zugabe von 4,5 g Natriumborhydrid für 1 h inkubieren. Die Lösung wie unter Kapitel 11.2.3 beschrieben aufreinigen und auf ein Gesamtvolumen von 2 mL einengen.

15.3 Oxidation von 5-CH₃-H₄PteGlu₇ und 5-Ethyl-H₄folat zu MeFox-Glu₇ und EthylFox

1 mL der 5-CH₃-H₄PteGlu₇ Lösung mit 50 µL Wasserstoffperoxidlösung (30 %) versetzen und für 2 h inkubieren. Überschüssiges Wasserstoffperoxid durch Zugabe von Natriumthiosulfatlösung (1 M) sowie einer Spatelspitze Natriumiodid entfernen. Lösung membranfiltrieren und mittels UHPLC-Q-ToF-MS vermessen.

15.4 Oxidation von 5-Ethyl-H₄folat zu EthylFox

Das präparativ aufgereinigte 5-Ethyl-H₄folat mit 200 µL Wasserstoffperoxidlösung (30 %) versetzen und für 2 h inkubieren. Überschüssiges Wasserstoffperoxid durch Zugabe von Natriumthiosulfatlösung (1 M) sowie einer Spatelspitze Natriumiodid entfernen. Die Lösung wie unter wie unter Kapitel 11.2.1 beschrieben aufreinigen. Für die Messung mittels NMR-Spektroskopie den aufgereinigten Metaboliten bis zur Trockene einengen, lyophilisieren und vor der Messung in D₂O aufnehmen.

16 Hefekultivierungen

Anzucht der Vorkultur

Alle Arbeiten werden steril durchgeführt. Zur Kultivierung der Hefe zunächst eine Vorkultur ziehen. Dazu mit Hilfe einer Impföse einen kleinen Teil einer Schrägagar Stammkultur abnehmen und in 10 mL Vollmedium (hergestellt nach Kapitel 10.4, Medium 1) überimpfen. Die erste Vorkultur für 48 h bei 30 °C auf einer Schüttlerplatte (150 rpm) hochziehen. 1 mL dieser ersten Vorkultur überimpfen in 9 mL Minimalmedium (hergestellt nach Kapitel 10.1, Medium 1) und erneut für 48 h inkubieren (30 °C, 150 rpm). Diesen Vorgang zwei weitere Male mit der jeweils frischesten (verdünnten) Vorkultur wiederholen. Die neueste Generation dieser so erhaltenen Vorkultur für alle weiteren Kultivierungen verwenden.

Kultivierung unter verschiedenen Kultivierungsparametern

Zum Vergleich verschiedener Kultivierungsparameter die unter Kapitel 10.4 genannten Medien testen. Dazu das gewählte Medium mit 1 % der hochgezogenen Vorkultur inokulieren und bei 30 °C und 150 rpm inkubieren. Verschiedene Kultivierungslängen testen.

Kultivierung mit veränderlicher Kultivierungsdauer

Das nach Kapitel 10.4 hergestellte Medium 1 mit 1 % der hochgezogenen Vorkultur inokulieren und bei 30 °C und 150 rpm inkubieren. Kultivierungslängen zwischen 20 und 80 Stunden wählen. Gegebenenfalls mehrere Ansätze parallel nach derselben Vorschrift durchführen, um ausreichend Biomasse zu generieren.

Überprüfung der Reinheit der kultivierten Hefe durch Anfertigen eines Agar-Abstriches

Vor dem Ernten der kultivierten Hefe mit einer sterilen Impföse etwas des Hefemediums abnehmen und auf einer Agarplatte abstreichen. Für 96 h bei 30 °C kultivieren und die Reinheit des Hefestammes mikroskopisch überprüfen.

16. Hefekultivierungen

Waschen der kultivierten Hefe

Nach Beendigung der Kultivierung das Medium zentrifugieren (5 min, 4 °C, 4.000 rpm) und das überstehende Medium abdekantieren. Parallele Kultivierungen derselben Kultivierungsdauer vereinen. Die Hefe dreimalig Waschen mit PBS-Puffer (hergestellt nach Kapitel 10.4) durch Zentrifugieren (5 min, 4 °C, 4.000 rpm) und Abdekantieren. Gewaschene Hefe einfrieren (- 0 °C), lyophilisieren, homogenisieren und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C lagern.

17 Literaturverzeichnis

- Aharoni, A.; Ric de Vos, C H; Verhoeven, Harrie A.; Maliepaard, Chris A.; Kruppa, Gary; Bino, Raoul et al. Nontargeted metabolome analysis by use of Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry, *OMICS* 2002, 6:217–234.
- Albert, A. The transformation of purines into pteridines, *Biochem. J.* 1957, 65:124–127.
- Álvarez-Sánchez, B.; Priego-Capote, F.; Luque de Castro, M. D. Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection, *Trends Analyt. Chem.* 2010, 29:120–127.
- Amster, I. J. Fourier Transform Mass Spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 1996, 31:1325–1337.
- Andersson, I. und Oeste, R. E. Loss of ascorbic acid, folacin and vitamin B12, and changes in oxygen content of UHT milk. II: Results and discussion, *Milk Sci. Int.* 1992, 47:299–302.
- Angier, R. B.; Boothe, J. H.; Hutchings, B. L.; Mowat, J. H.; Semb, J.; Stokstad, E. L. et al. Synthesis of a compound identical with the L.casei factor isolated from liver, *Science* 1945, 102:227–228.
- Appling, D. R. Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes, *FASEB J.* 1991, 5:2645–2651.
- Arcot, J. und Shrestha, A. Folate Methods of analysis, *Trends Food Sci. Technol.* 2005, 16:253–266.
- Azevedo, E. P. d. P.; Azevedo Filho, C. A. de; Santos, Beate Saegesser; da Silva, Lorena Trajano; Fai, Ana Elizabeth Cavalcante; da Paixão, José Almiro Proposition for Mechanism of Separation of Foliates by HPLC-DAD: Practical Application in New Zealand Spinach (*Tetragonia expansa*), *Food Anal. Methods* 2016, 9:1321–1332.
- Baggott, J. E. Hydrolysis of 5,10-Methenyltetrahydrofolate to 5-Formyltetrahydrofolate at pH 2.5 to 4.5, *Biochem. J.* 2000, 39:14647–14653.
- Bagley, P. J. und Selhub, J. Analysis of Folate Form Distribution by Affinity Followed by Reversed-Phase Chromatography with Electrochemical Detection, *Clin. Chem.* 2000, 46:404–411.
- Bannister, A. J.; Schneider, R.; Kouzarides, Tony Histone Methylation, *Cell* 2002, 109:801–806.
- Beard, M. E. und Allen, D. M. Effect of antimicrobial agents on the Lactobacillus casei folate assay, *Am. J. Pathol.* 1967, 48:401–404.
- Benton, H. P.; Wong, D. M.; Trauger, S. A.; Siuzdak, G. XCMS2: processing tandem mass spectrometry data for metabolite identification and structural characterization, *Anal. Chem.* 2008, 80:6382–6389.
- Bianchetti, R.; Lucchini, G.; Crosti, P.; Tortora, P. Dependence of mitochondrial protein synthesis initiation on formylation of the initiator methionyl-tRNA^f, *J. Biol. Chem.* 1977, 252:2519–2523.
- Bird, R. C. und Smith, B. F. The Impact of Yeast Genomics on Brewing, *J. Nutr. Food Sci.* 2016, 6:1.
- Blair, J. A. und Pearson, A. J. Kinetics and mechanism of the autoxidation of the 2-amino-4-hydroxy-5,6,7,8-tetrahydropteridines, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1974, 1:80–88.
- Blair, J. A. und Saunders, K. J. A convenient method for the preparation of dl-5-Methyltetrahydrofolic acid (dl-5-methyl-5,6,7,8-tetrahydropteroyl-l-monoglutamic acid), *Anal. Biochem.* 1970, 34:376–381.
- Blakley und Benkovic (1984), *Chemistry and biochemistry of folates*, New York, NY (Wiley).

16. Hefekultivierungen

Blaženović, I.; Kind, T.; Ji, Jian; Fiehn, Oliver Software Tools and Approaches for Compound Identification of LC-MS/MS Data in Metabolomics, *Metabolites* 2018, 8:31.

Blaženović, I.; Kind, T.; Sa, Michael R.; Ji, Jian; Vaniya, Arpana; Wancewicz, Benjamin et al. Structure Annotation of All Mass Spectra in Untargeted Metabolomics, *Anal. Chem.* 2019, 91:2155–2162.

Boccard, J.; Veuthey, J.-L.; Rudaz, Serge Knowledge discovery in metabolomics: an overview of MS data handling, *J. Sep. Sci.* 2010, 33:290–304.

Bottiglieri, T. und Reynold, E. (2010) "Folate and Neurological Disease: Basic Mechanisms", in *Folate in health and disease*, ed. Bailey, L. B. (Boca Raton: Taylor & Francis), 355–380.

Bowen, B. P. und Northen, T. R. Dealing with the unknown: metabolomics and metabolite atlases, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2010, 21:1471–1476.

Breithaupt, D. E. Determination of folic acid by ion-pair RP-HPLC in vitamin-fortified fruit juices after solid-phase extraction, *Food Chem.* 2001, 74:521–525.

Brouwer, I. und Verhoef, P. Folic acid fortification: is masking of vitamin B-12 deficiency what we should really worry about?, *Am. J. Clin. Nutr.* 2007, 86:897–898.

Brouwer, V. de; Storozhenko, S.; van de Steene, Jet C.; Wille, Sarah M. R.; Stove, Christophe P.; van der Straeten, Dominique et al. Optimisation and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for folates in rice, *J. Chromatogr. A* 2008, 1215:125–132.

Brouwer, V. de; Zhang, G.-F.; Storozhenko, Sergei; van der Straeten, Dominique; Lambert, Willy E. pH stability of individual folates during critical sample preparation steps in prevision of the analysis of plant folates, *Phytochem. Anal.* 2007, 18:496–508.

Brown, S. C.; Kruppa, G.; Dasseux, Jean-Louis Metabolomics applications of FT-ICR mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 2005, 24:223–231.

Budroni, M.; Zara, G.; Ciani, Maurizio; Comitini, Francesca (2017) "Saccharomyces and Non-Saccharomyces Starter Yeasts" (London: IntechOpen),

Budzikiewicz, H. H. Kienitz, Herausgeber: Massenspektrometrie. Verfaßt von F. Aulinger, G. Franke, K. Habfast, H. Kienitz und G. Spittler. Verlag Chemie, GmbH, Weinheim/Bergstr. 1968. XV + 883 Seiten mit 342 Abbildungen und 52 Tabellen im Text und einem Tabellenteil. Preis: DM 195,-, *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 1969, 73:114–115.

Budzikiewicz, H. und Schäfer, M. (2013), *Massenspektrometrie*, Weinheim (Wiley-VCH).

Bureau, S.; Mouhoubi, S.; Touloumet, Line; Garcia, Caroline; Moreau, Florie; Bédouet, Valérie et al. Are folates, carotenoids and vitamin C affected by cooking? Four domestic procedures are compared on a large diversity of frozen vegetables, *LWT* 2015, 64:735–741.

Burg, A. W. und Brown, G. M. The Biosynthesis of Folic Acid: VIII. Purification and Properties of the Enzyme that catalyzes the Production of Formate from Carbon Atom 8 of Guanosine Triphosphate, *J. Biol. Chem.* 1968, 243:2349–2358.

Büttner, B. E.; Ohrvik, V. E.; Witthoft, Cornelia M.; Rychlik, Michael Quantification of isotope-labelled and unlabelled folates in plasma, ileostomy and food samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, 399:429–439.

Camara, J. E.; Lowenthal, M. S.; Phinney, Karen W. Determination of fortified and endogenous folates in food-based Standard Reference Materials by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, 405:4561–4568.

Canelas, A. B.; Pierick, A. ten; Ras, Cor; Seifar, Reza M.; van Dam, Jan C.; van Gulik, Walter M. et al. Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics, *Anal. Chem.* 2009, 81:7379–7389.

- Canfield, M. A.; Collins, J. S.; Botto, Lorenzo D.; Williams, Laura J.; Mai, Cara T.; Kirby, Russell S. et al. Changes in the birth prevalence of selected birth defects after grain fortification with folic acid in the United States: findings from a multi-state population-based study, *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 2005, 73:679–689.
- Carmel, R. Effects of antineoplastic drugs on *Lactobacillus casei* and radioisotopic assays for serum folate, *Am. J. Physiol.* 1978, 69:137–139.
- Castenmiller, J. J.; van de Poll, C. J.; West, C. E.; Brouwer, I. A.; Thomas, C. M.; van Dusseldorp, M. Bioavailability of folate from processed spinach in humans. Effect of food matrix and interaction with carotenoids, *Ann. Nutr. Metab.* 2000, 44:163–169.
- Castorena-Torres, F.; Ramos-Parra, P. A.; Hernández-Méndez, Rogelio V.; Vargas-García, Andrés; García-Rivas, Gerardo; La Garza, Rocío I. Díaz de Natural folates from biofortified tomato and synthetic 5-methyl-tetrahydrofolate display equivalent bioavailability in a murine model, *Plant Foods Hum. Nutr.* 2014, 69:57–64.
- Castrillo, J. I.; Hayes, A.; Mohammed, Shabaz; Gaskell, Simon J.; Oliver, Stephen G. An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry, *Phytochemistry* 2003, 62:929–937.
- Chandler, C. J.; Wang, T. T.; Halsted, C. H. Pteroylpolyglutamate hydrolase from human jejunal brush borders. Purification and characterization, *J. Biol. Chem.* 1986, 261:928–933.
- Chandra-Hioe, M. V.; Bucknall, M. P.; Arcot, Jayashree Folate analysis in foods by UPLC-MS/MS: development and validation of a novel, high throughput quantitative assay; folate levels determined in Australian fortified breads, *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, 401:1035–1042.
- Chandra-Hioe, M. V.; Bucknall, M. P.; Arcot, Jayashree Folic Acid-fortified Flour Optimised and Fast Sample Preparation Coupled with a Validated High-Speed Mass Spectrometry Analysis Suitable for a Fortification Monitoring Program, *Food Anal. Methods* 2013, 6:1416–1423.
- Cherest, H.; Thomas, D.; Surdin-Kerjan, Y. Polyglutamylation of folate coenzymes is necessary for methionine biosynthesis and maintenance of intact mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 2000, 275:14056–14063.
- Chippel, D. und Scrimgeour, K. G. Oxidative degradation of dihydrofolate and tetrahydrofolate, *Can. J. Biochem.* 1970, 48:999–1009.
- Christensen, K. E. und MacKenzie, R. E. Mitochondrial one-carbon metabolism is adapted to the specific needs of yeast, plants and mammals, *Bioassays* 2006, 28:595–605.
- Ciappio, E. und Mason, J. B. (2010) "Folate and Carcinogenesis: Basic Mechanisms" (Boca Raton: Taylor & Francis), 235–262.
- Colombani, F.; Cherest, H.; Robichon-Szulmajster, H. de Biochemical and regulatory effects of methionine analogues in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* 1975, 122:375–384.
- Cook, J. W.; Taylor, L. M.; Orloff, Susan L.; Landry, Gregory J.; Moneta, Gregory L.; Porter, John M. Homocysteine and arterial disease: Experimental mechanisms, *Vascul. Pharmacol.* 2002, 38:293–300.
- Crider, K. S.; Bailey, L. B.; Berry, Robert J. Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions, *Nutrients* 2011, 3:370–384.
- Crider, K. S.; Yang, T. P.; Berry, Robert J.; Bailey, Lynn B. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role, *Adv. Nutr.* 2012, 3:21–38.
- Dansky, L. V.; Andermann, E.; Rosenblatt, D.; Sherwin, A. L.; Andermann, F. Anticonvulsants, folate levels, and pregnancy outcome: a prospective study, *Ann. Neurol.* 1987, 21:176–182.
- Dawson, J. H. J. und Guilhaus, M. Orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1989, 3:155–159.

16. Hefekultivierungen

- Delchier, N.; Herbig, A.-L.; Rychlik, Michael; Renard, Catherine M.G.C. Folates in Fruits and Vegetables Contents, Processing, and Stability, *Comp. Rev. Food Sci. Food Safe.* 2016, 15:506–528.
- Delchier, N.; Ringling, C.; Cuvelier, Marie-Elisabeth; Courtois, Francis; Rychlik, Michael; Renard, Catherine M. G. C. Thermal degradation of folates under varying oxygen conditions, *Food Chem.* 2014, 165:85–91.
- Department of Health and Human Services Food Standards: Amendment of Standards of Identity for Enriched Grain Products to Require Addition of Folic Acid, *FDA* 1996, 61:8781–8797.
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. 13. DGE-Ernährungsbericht, *BMEL* 2017.
- Doherty, R. F. und Beecher, G. R. A method for the analysis of natural and synthetic folate in foods, *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51:354–361.
- Dührkop, K.; Fleischauer, M.; Ludwig, Marcus; Aksenov, Alexander A.; Melnik, Alexey V.; Meusel, Marvin et al. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information, *Nat. Methods* 2019, 16:299–302.
- Duthie, S. J.; Narayanan, S.; Blum, S.; Pirie, L.; Brand, G. M. Folate deficiency in vitro induces uracil misincorporation and DNA hypomethylation and inhibits DNA excision repair in immortalized normal human colon epithelial cells, *Nutr. Cancer* 2000, 37:245–251.
- Elferink, J. G. The effect of ethylenediaminetetraacetic acid on yeast cell membranes, *Protoplasma* 1974, 80:261–268.
- Ellis, D. I.; Dunn, W. B.; Griffin, Julian L.; Allwood, J. William; Goodacre, Royston Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool, *Pharmacogenomics* 2007, 8:1243–1266.
- Ernst, M.; Kang, K. B.; Caraballo-Rodríguez, Andrés Mauricio; Nothias, Louis-Felix; Wandy, Joe; Chen, Christopher et al. MolNetEnhancer: Enhanced Molecular Networks by Integrating Metabolome Mining and Annotation Tools, *Metabolites* 2019, 9:144.
- Fanos, V.; Antonucci, R.; Atzori, Luigi Metabolomics in the developing infant, *Curr. Opin. Pediatr.* 2013, 25:604–611.
- Fazili, Z. und Pfeiffer, C. M. Accounting for an isobaric interference allows correct determination of folate vitamers in serum by isotope dilution-liquid chromatography-tandem MS, *J. Nutr.* 2013, 143:108–113.
- Fazili, Z.; Whitehead, R. D., JR; Paladugula, Neelima; Pfeiffer, Christine M. A high-throughput LC-MS/MS method suitable for population biomonitoring measures five serum folate vitamers and one oxidation product, *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, 405:4549–4560.
- Fernández-García, E.; Carvajal-Lérida, I.; Pérez-Gálvez, Antonio In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency, *Nutr. Res.* 2009, 29:751–760.
- Fiehn, O. Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks, *Comp. Funct. Genomics* 2001, 2:155–168.
- Fiehn, O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes, *Plant Mol. Biol.* 2002, 48:155–171.
- Fiehn, O. und Weckwerth, W. Deciphering metabolic networks, *Eur. J. Biochem.* 2003, 270:579–588.
- Field, M. S.; Szebenyi, D. M. E.; Stover, Patrick J. Regulation of de novo purine biosynthesis by methenyltetrahydrofolate synthetase in neuroblastoma, *J. Biol. Chem.* 2006, 281:4215–4221.
- Finglas, P. M. und Wright, A. J.A. Folate bioavailability and health, *Phytochem. Rev.* 2002, 1:189–198.
- Fischer, N. S. und Steinhaus, M. Identification of an Important Odorant Precursor in Durian: First Evidence of Ethionine in Plants, *J. Agric. Food Chem.* 2019:1–5.

- Fox, J. T. und Stover, P. J. (2008) " Chapter 1 Folate-Mediated One-Carbon Metabolism" (London: Academic Press), 1–44.
- Freisleben, A.; Schieberle, P.; Rychlik, Michael Comparison of folate quantification in foods by high-performance liquid chromatography–fluorescence detection to that by stable isotope dilution assays using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 2003a, 315:247–255.
- Freisleben, A.; Schieberle, P.; Rychlik, Michael Specific and sensitive quantification of folate vitamers in foods by stable isotope dilution assays using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 2003b, 376:149–156.
- Gapski, G. R.; Whiteley, J. M.; Huennekens, F. M. Hydroxylated derivatives of 5-methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolate, *Biochemistry* 1971, 10:2930–2934.
- Garavito, M. F.; Narváez-Ortiz, H. Y.; Zimmermann, Barbara H. Pyrimidine Metabolism: Dynamic and Versatile Pathways in Pathogens and Cellular Development, *J. Genet. Genomics* 2015, 42:195–205.
- Garratt, L. C.; Otori, C. A.; Tucker, Gregory A.; Sablitzky, Fred; Bennett, Malcolm J.; Barrett, David A. Comprehensive metabolic profiling of mono- and polyglutamated folates and their precursors in plant and animal tissue using liquid chromatography/negative ion electrospray ionisation tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19:2390–2398.
- Gazzali, A. M.; Lobry, M.; Colombeau, Ludovic; Acherar, Samir; Azaïs, Henri; Mordon, Serge et al. Stability of folic acid under several parameters, *Eur. J. Pharm. Sci.* 2016, 93:419–430.
- Gerlich, M. und Neumann, S. MetFusion: integration of compound identification strategies, *J. Mass Spectrom.* 2013, 48:291–298.
- Ginting, E. und Arcot, J. High-performance liquid chromatographic determination of naturally occurring folates during tempe preparation, *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52:7752–7758.
- Gmelch, L.; Wirtz, D.; Witting, Michael; Weber, Nadine; Striegel, Lisa; Schmitt-Kopplin, Philippe et al. Comprehensive Vitamer Profiling of Folate Mono- and Polyglutamates in Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Function of Different Sample Preparation Procedures, *Metabolites* 2020, 10:301.
- Goldstein, D. B. Effect of alcohol on cellular membranes, *Ann. Emerg. Med.* 1986, 15:1013–1018.
- Goli, D. M. und Vanderslice, J. T. Investigation of the conjugase treatment procedure in the microbiological assay of folate, *Food Chem.* 1992, 43:57–64.
- Goll, M. G. und Bestor, T. H. Histone modification and replacement in chromatin activation, *Genes Dev.* 2002, 16:1739–1742.
- Goncerzewicz, A. und Misiewicz, A. The sequence diversity and expression among genes of the folic acid biosynthesis pathway in industrial *Saccharomyces* strains, *Acta Biochim. Pol.* 2015, 62:841–850.
- Gonzalez, B.; François, J.; Renaud, Michel A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol, *Yeast* 1997, 13:1347–1355.
- Gowda, G. A. N.; Zhang, S.; Gu, Haiwei; Asiago, Vincent; Shanaiah, Narasimhamurthy; Raftery, Daniel Metabolomics-based methods for early disease diagnostics, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2008, 8:617–633.
- Grainger, D. J. (2007) " Chapter 12 - Metabolite Profiling and Cardiovascular Disease" (Amsterdam: Elsevier Science B.V), 327–343.
- Grant, P. A. A tale of histone modifications, *Genome Biol.* 2001, 2:reviews0003.1-0003.6.
- Green, R. Vitamin B12 deficiency from the perspective of a practicing hematologist, *Blood* 2017, 129:2603–2611.

16. Hefekultivierungen

- Gregory, J. F. (1989) " Chemical and Nutritional Aspects of Folate Research: Analytical Procedures, Methods of Folate Synthesis, Stability, and Bioavailability of Dietary Folates" (New York: Academic Press), 1–101.
- Griffin, J. L. und Bollard, M. E. Metabonomics: its potential as a tool in toxicology for safety assessment and data integration, *Eur. J. Clin. Nutr.* 2004, 5:389–398.
- Griffin, M. J. und Brown, G. M. The biosynthesis of folic acid. III. enzymatic formation of dihydrofolic acid from dihydroptericoic acid and of tetrahydropteroylpolyglutamic acid compounds from tetrahydrofolic acid, *J. Biol. Chem.* 1964, 239:310–316.
- Gross, J. H. (2013), *Massenspektrometrie*, Berlin, Heidelberg (Springer).
- Gross, J. H. (2019), *Massenspektrometrie*, Berlin, Heidelberg (Springer Berlin Heidelberg).
- Guelpen, van, B.; Hultdin, J.; Johansson, I.; Hallmans, G.; Stenling, R.; Riboli, E. et al. Low folate levels may protect against colorectal cancer, *Gut* 2006, 53:1461–1466.
- Guilhaus, M. Special feature: Tutorial. Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry. Physical and instrumental concepts, *J. Mass Spectrom.* 1995, 30:1519–1532.
- Guynn, R. W.; Labaume, L. B.; Henkin, Jack Equilibrium constants under physiological conditions for the condensation of acetaldehyde with tetrahydrofolic acid, *Arch. Biochem. Biophys.* 1982, 217:181–190.
- Halsted, C. H. The intestinal absorption of dietary folates in health and disease, *J. Am. Coll. Nutr.* 1989, 8:650–658.
- Halsted, C. H.; Villanueva, J. A.; Devlin, Angela M.; Chandler, Carol J. Metabolic interactions of alcohol and folate, *J. Nutr.* 2002, 132:2367S–2372S.
- Halsted, C. H.; Wong, D. H.; Peerson, Janet M.; Warden, Craig H.; Refsum, Helga; Smith, A. David et al. Relations of glutamate carboxypeptidase II (GCPII) polymorphisms to folate and homocysteine concentrations and to scores of cognition, anxiety, and depression in a homogeneous Norwegian population: the Hordaland Homocysteine Study, *Am. J. Clin. Nutr.* 2007, 86:514–521.
- Hanson, A. D. und Gregory, J. F. Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 2011, 62:105–125.
- Hendel, J. Radioimmunoassay for pteroylglutamic acid, *Clin. Chem.* 1981, 27:701–703.
- Herrero, M.; Simó, C.; García-Cañas, Virginia; Ibáñez, Elena; Cifuentes, Alejandro Foodomics: MS-based strategies in modern food science and nutrition, *Mass Spectrom. Rev.* 2012, 31:49–69.
- Hiraoka, K. und Kudaka, I. Electrospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1990, 4:519–526.
- Hjortmo, S.; Patring, J.; Andlid, Thomas Growth rate and medium composition strongly affect folate content in *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Microbiol.* 2008a, 123:93–100.
- Hjortmo, S.; Patring, J.; Jastrebova, Jelena; Andlid, Thomas Inherent biodiversity of folate content and composition in yeasts, *Trends Food Sci. Technol.* 2005, 16:311–316.
- Hjortmo, S.; Patring, J.; Jastrebova, Jelena; Andlid, Thomas Biofortification of folates in white wheat bread by selection of yeast strain and process, *Food Microbiol.* 2008b, 127:32–36.
- Ho, P. I.; Ashline, D.; Dhitavat, Sirikarnt; Ortiz, Daniela; Collins, Scott C.; Shea, Thomas B. et al. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine, *Neurobiol. Dis.* 2003, 14:32–42.
- Hof, van het, Karin H.; Tijburg, L. B. M.; Pietrzik, K.; Weststrate, Jan A. Influence of feeding different vegetables on plasma levels of carotenoids, folate and vitamin C. Effect of disruption of the vegetable matrix, *Br. J. Nutr.* 1999, 82:203–212.
- Hoffbrand, A. V. Folate absorption, *J. Clin. Path.* 1971, 24:66–76.

- Hoffbrand, A. V. und Weir, D. G. The history of folic acid, *Br. J. Haematol.* 2001, 113:579–589.
- Honein, M. A.; Paulozzi, L. J.; Mathews, T. J.; Erickson, J. David; Wong, Lee-Yang C. Impact of Folic Acid Fortification of the US Food Supply on the Occurrence of Neural Tube Defects, *JAMA* 2001, 285:2981–2986.
- Hoppner, K. und Lampi, B. Folate levels in human liver from autopsies in Canada, *Am. J. Clin. Nutr.* 1980, 33:862–864.
- Höppner, G.; Loeffler, M.; Marquardt, Kristin; Müller, Matthias; Resler, Tom; Salib, Barbara et al. Jahresbericht 2018DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), *DIN/NAL* 2018.
- Horne, D. W. und Patterson, D. Lactobacillus casei microbiological assay of folic acid derivatives in 96-well microtiter plates, *Clin. Chem.* 1988, 34:2357–2359.
- Horne, D. W.; Reed, K. A.; Hoefs, J.; Said, H. M. 5-Methyltetrahydrofolate transport in basolateral membrane vesicles from human liver, *Am. J. Clin. Nutr.* 1993, 58:80–84.
- Huang, Y.; Khartulyari, S.; Morales, Megan E.; Stanislawski-Sachadyn, Anna; Feldt, Joan M. von; Whitehead, Alexander S. et al. Quantification of key red blood cell folates from subjects with defined MTHFR 677CT genotypes using stable isotope dilution liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008, 22:2403–2412.
- Hutton, T. und Major, H. J. Characterizing biomolecules by electrospray ionization-mass spectrometry coupled to liquid chromatography and capillary electrophoresis, *Biochem. Soc. Trans.* 1995, 23:924–927.
- Hutzler, M. (2009), *Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von getränkerelevanten Hefen*, München,
- Indrawati, I.; van Loey, A.; Hendrickx, Marc Pressure and temperature stability of 5-methyltetrahydrofolic acid: a kinetic study, *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53:3081–3087.
- Indrawati, I.; Verlinde, P.; Ottoy, Frederik; van Loey, Ann; Hendrickx, Marc Implications of beta-mercaptoethanol in relation to folate stability and to determination of folate degradation kinetics during processing: a case study on 6S-5-methyltetrahydrofolic acid, *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52:8247–8254.
- Iwai, K.; Masamichi, I.; FUJINO, Shun-ichi Nutritional requirements for folate compounds and some enzyme activities involved in the folate biosynthesis, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1977, 23:95–100.
- Iwatani, Y.; Arcot, J.; Shrestha, Ashok K. Determination of folate contents in some Australian vegetables, *J. Food Compos. Anal.* 2003, 16:37–48.
- Iyer, R. und Tomar, S. K. Folate: a functional food constituent, *J. Food Sci.* 2009, 74:R114–22.
- Jackson, M. J. The assessment of bioavailability of micronutrients: introduction, *Eur. J. Clin. Nutr.* 1997, 51 Suppl 1:S1–2.
- Jägerstad, M. und Jastrebova, J. Occurrence, stability, and determination of formyl folates in foods, *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61:9758–9768.
- Jägerstad, M.; Piironen, V.; Walker, Caroline; Ros, Gaspar; Carnovale, Emilia; Holasova, Marie et al. Increasing natural food folates through bioprocessing and biotechnology, *Trends Food Sci. Technol.* 2005, 16:298–306.
- Jastrebova, J.; Axelsson, M.; Strandler, H. S.; Jägerstad, M. Stability of dietary 5-formyl-tetrahydrofolate and its determination by HPLCA pilot study on impact of pH, temperature and antioxidants on analytical results, *Eur. Food Res. Technol.* 2013, 237:747–754.
- Jennings, B. A. und Willis, G. How folate metabolism affects colorectal cancer development and treatment; a story of heterogeneity and pleiotropy, *Cancer Lett.* 2015, 356:224–230.

16. Hefekultivierungen

Jill, J. S.; Basnakian, A. G.; Miller, Barbara J. In Vitro Folate Deficiency Induces Deoxynucleotide Pool Imbalance, Apoptosis, and Mutagenesis in Chinese Hamster Ovary Cells, *Cancer Res.* 1994, 54:5075–5080.

Johnson, E. A. und Echavarri-Erasun, C. (2011) " Chapter 3 - Yeast Biotechnology" (London: Elsevier), 21–44.

Jones, T. H. und Brown, G. M. The biosynthesis of folic acid. VII. Enzymatic synthesis of pteridines from guanosine triphosphate, *J. Biol. Chem.* 1967, 242:3989–3997.

Kastanos, E. K.; Woldman, Y. Y.; Appling, D. R. Role of mitochondrial and cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase isozymes in de novo purine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry* 1997, 36:14956–14964.

Kim, Y. I.; Pogribny, I. P.; Basnakian, A. G.; Miller, J. W.; Selhub, J.; James, S. J. et al. Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene, *Am. J. Clin. Nutr.* 1997, 65:46–52.

Kind, T. und Fiehn, O. Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm, *BMC Bioinformatics* 2006, 7:234.

Kind, T. und Fiehn, O. Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry, *BMC Bioinformatics* 2007, 8:105.

Kirsch, S. H.; Knapp, J.-P.; Herrmann, Wolfgang; Obeid, Rima Quantification of key folate forms in serum using stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 2010, 878:68–75.

Kok, R. M.; Smith, D. E. C.; Dainty, J. R.; van den Akker, J. T.; Finglas, P. M.; Smulders, Y. M. et al. 5-Methyltetrahydrofolic acid and folic acid measured in plasma with liquid chromatography tandem mass spectrometry: applications to folate absorption and metabolism, *Anal. Biochem.* 2004, 326:129–138.

Koning, W. de und van Dam, K. A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH, *Anal. Biochem.* 1992, 204:118–123.

Konings, E. J. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour, *J. AOAC Int.* 1999, 82:119–127.

Kopp, M.; Durr, K.; Steigleder, Matthias; Clavel, Thomas; Rychlik, Michael Development of stable isotope dilution assays for the quantitation of intra- and extracellular folate patterns of *Bifidobacterium adolescentis*, *J. Chromatogr. A* 2016, 1469:48–59.

Kreger-van Rij (1987), *The yeasts*, Amsterdam (Elsevier).

Krumdieck, C. L.; Shaw, E.; Baugh, C. M. The biosynthesis of 2-amino-4-hydroxy-6-substituted pteridines. The origin of carbon atoms 6, 7, and 9 of folic acid, *J. Biol. Chem.* 1966, 241:383–387.

Kuhl, C.; Tautenhahn, R.; Böttcher, Christoph; Larson, Tony R.; Neumann, Steffen CAMERA: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets, *Anal. Chem.* 2012, 84:283–289.

Kurtzman et al. (2010), *The yeasts*, Amsterdam, Oxford (Elsevier).

Kurtzman, C. P. und Fell, J. W. (2006) " Yeast Systematics and Phylogeny — Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology" (Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg), 11–30.

LaBaume, L. B. und Guynn, R. W. Investigation into the substrate capacity of the acetaldehyde-tetrahydrofolate condensation product, *Prog. Clin. Biol. Res.* 1985, 183:189–200.

- Landolfo, S.; Zara, G.; Zara, Severino; Budroni, Marilena; Ciani, Maurizio; Mannazzu, Ilaria Oleic acid and ergosterol supplementation mitigates oxidative stress in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Int. J. Food Microbiol.* 2010, 141:229–235.
- Lankadurai, B. P.; Nagato, E. G.; Simpson, Myrna J. Environmental metabolomics: an emerging approach to study organism responses to environmental stressors, *Environ. Rev.* 2013, 21:180–205.
- LeBlanc, J. G.; Giori, G. S. d.; Smid, Eddy J.; Hugenholtz, Jeroen; Sesma, Fernando Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade microorganisms, *Communicating Curr. Res. Edu. Top. Trends Appl. Microbiol.* 2007, 1:329–339.
- Leung, K.-Y.; Castro, S. C. P. de; Cabreiro, Filipe; Gustavsson, Peter; Copp, Andrew J.; Greene, Nicholas D. E. Folate metabolite profiling of different cell types and embryos suggests variation in folate one-carbon metabolism, including developmental changes in human embryonic brain, *Mol. Cell. Biochem.* 2013, 378:229–236.
- Lin, Y.; Dueker, S. R.; Follett, Jennifer R.; Fadel, James G.; Arjomand, Ali; Schneider, Philip D. et al. Quantitation of in vivo human folate metabolism, *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 80:680–691.
- Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, Jeremy K. Metabonomics in pharmaceutical R&D, *FEBS J.* 2007, 274:1140–1151.
- Liu, Y.; Walkey, C. J.; Timothy J. Green; van Vuuren, Hennie J.J.; Kitts, David D. Enhancing the natural folate level in wine using bioengineering and stabilization strategies, *Food Chem.* 2016, 194:26–31.
- Lodish, H. (2002), *Molecular cell biology*, New York, NY (Freeman).
- Ložnjak, P.; García-Salinas, C.; La Díaz de Garza, Rocío Isabel; Bysted, Anette; Jakobsen, Jette The use of a plant enzyme for rapid and sensitive analysis of naturally-occurring folates in food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 2019, 1594:34–44.
- Luccock, Mark D.; Green, Martine; Hartley, Ronald; Levene, Malcolm I. Physicochemical and biological factors influencing methylfolate stability: use of dithiothreitol for HPLC analysis with electrochemical detection, *Food Chem.* 1993, 47:79–86.
- Luo, S.; Duan, H.; Zou, Yuchen; Qiu, Ruixia; Wang, Chao Quantification of Total Folate, Folate Species and Polyglutamyl Folate Distribution in Winged Beans (*Psophocarus tetragonolobus* (L) DC) from Different Cultivars and Growth Stages by Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2017, 63:69–80.
- Mandel, J. (1984), *The statistical analysis of experimental data*, New York (Dover Publ).
- Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L.; Jackson, George S. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer, *Mass Spectrom. Rev.* 1998, 17:1–35.
- Martin, J. I.; Landen, W. O.; Soliman, A. G.; Eitenmiller, R. R. Application of a tri-enzyme extraction for total folate determination in foods, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1990, 73:805–808.
- Martínez-Force, E. und Benítez, T. The SAM2 gene product catalyzes the formation of S-adenosyl-ethionine from ethionine in *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Microbiol.* 1994, 28:339–343.
- Mason, J. B.; Dickstein, A.; Jacques, Paul F.; Haggarty, Paul; Selhub, Jacob; Dallal, Gerard et al. A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2007, 16:1325–1329.
- Matsuo, Y. und Greenberg, D. M. Metabolic formation of homoserine and α -aminobutyric acid from methionine, *J. Biol. Chem.* 1955, 215:547–554.

16. Hefekultivierungen

- Mattanovich, D.; Sauer, M.; Gasser, Brigitte Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks 2014, 13:34.
- Matthews, R. G.; Ghose, C.; Green, Jacalyn M.; Matthews, Keith D.; Bruce Dunlap, R. Folylpolyglutamates as substrates and inhibitors of folate-dependent enzymes, *Adv. Enzyme Reg.* 1987, 26:157–171.
- McCully, K. S. Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention, *Am. J. Clin. Nutr.* 2007, 86:1563S-8S.
- McGuire, J. J. und Coward, J. K. (1984) " Pteroylpolyglutamates: Biosynthesis, degradation and function" (New York, NY: Wiley), 135–190.
- McNeil, J. B.; Bognar, A. L.; Pearlman, Ronald E. In vivo analysis of folate coenzymes and their compartmentation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 1996, 142:371–381.
- Mehrshahi, P.; Gonzalez-Jorge, S.; Akhtar, Tariq A.; Ward, Jane L.; Santoyo-Castelazo, Anahi; Marcus, Susan E. et al. Functional analysis of folate polyglutamylation and its essential role in plant metabolism and development, *Plant J.* 2010, 64:267–279.
- Melse-Boonstra, A.; Verhoef, P.; Konings, Erik J. M.; van Dusseldorp, Marijke; Matser, Ariette; Hollman, Peter C. H. et al. Influence of Processing on Total, Monoglutamate and Polyglutamate Folate Contents of Leeks, Cauliflower, and Green Beans, *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50:3473–3478.
- Milunsky, A.; Jick, H.; Jick, S. S.; Bruell, C. L.; MacLaughlin, D. S.; Rothman, K. J. et al. Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects, *JAMA* 1989, 262:2847–2852.
- Mitchell, H. K.; Snell, E. E.; Williams, Roger J. The concentration of folic acid, *J. Am. Chem. Soc.* 1941, 63:2284.
- Molloy, A. M. (2010) " Folate-Vitamin B12 Interrelationships: Links to Disease Risk" (Boca Raton: Taylor & Francis), 381–408.
- Molloy, A. M. und Scott, J. M. (1997) " Microbiological assay for serum, plasma, and red cell folate using cryopreserved, microtiter plate method" (New York: Academic Press), 43–53.
- Mönch, S.; Netzel, M.; Netzel, Gabriele; Ott, Undine; Frank, Thomas; Rychlik, Michael Folate bioavailability from foods rich in folates assessed in a short term human study using stable isotope dilution assays, *Food Funct.* 2015, 6:242–248.
- Mönch, S. und Rychlik, M. Improved folate extraction and tracing deconjugation efficiency by dual label isotope dilution assays in foods, *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60:1363–1372.
- Moran, R. G. und Colman, P. D. A simple procedure for the synthesis of high specific activity tritiated (6S)-5-formyltetrahydrofolate, *Anal. Biochem.* 1982, 122:70–78.
- Moritz, F.; Hemmler, D.; Kanawati, Basem; Schnitzler, Jörg-Peter; Schmitt-Kopplin, Philippe (2019) " Mass differences in metabolome analyses of untargeted direct infusion ultra-high resolution MS data" (San Diego: Elsevier), 357–405.
- Morrison, H. I.; Schaubel, D.; Desmeules, Marie; Wigle, Donald T. Serum Folate and Risk of Fatal Coronary Heart Disease, *JAMA* 1996, 275:1893–1896.
- Munyaka, A. W.; Oey, I.; Verlinde, Philippe; van Loey, Ann; Hendrickx, Marc Acidification, crushing and thermal treatments can influence the profile and stability of folate poly- γ -glutamates in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*), *Food Chem.* 2009, 117:568–575.
- Munyaka, A. W.; Verlinde, P.; Mukisa, Ivan Muzira; Oey, Indrawati; van Loey, Ann; Hendrickx, Marc Influence of thermal processing on hydrolysis and stability of folate poly- γ -glutamates in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), carrot (*Daucus carota*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*), *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58:4230–4240.
- Murphy, M.; Keating, M.; Boyle, P.; Weir, D. G.; Scott, J. M. The elucidation of the mechanism of folate catabolism in the rat, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976, 71:1017–1024.

- Mushtaq, M. Y.; Choi, Y. H.; Verpoorte, Robert; Wilson, Erica G. Extraction for metabolomics: access to the metabolome, *Phytochem. Anal.* 2014, 25:291–306.
- Ndaw, S.; Bergaentzlé, M.; Aoudé-Werner, D.; Lahély, S.; Hasselmann, C. Determination of folates in foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after precolumn conversion to 5-methyltetrahydrofolates, *J. Chromatogr. A* 2001, 928:77–90.
- Nelson, B. C.; Dalluge, J. J.; Margolis, Sam A. Preliminary application of liquid chromatography–electrospray-ionization mass spectrometry to the detection of 5-methyltetrahydrofolic acid monoglutamate in human plasma, *J. Chromatogr. B* 2001, 765:141–150.
- Nelson, B. C.; Pfeiffer, C. M.; Margolis, Sam A.; Nelson, Chad P. Solid-phase extraction–electrospray ionization mass spectrometry for the quantification of folate in human plasma or serum, *Anal. Biochem.* 2004, 325:41–51.
- Newman, E. M. und Tsai, J. F. Microbiological analysis of 5-formyltetrahydrofolic acid and other folates using an automatic 96-well plate reader, *Anal. Biochem.* 1986, 154:509–515.
- Ng, X.; Lucock, M.; Veysey, Martin Physicochemical effect of pH and antioxidants on mono- and triglutamate forms of 5-methyltetrahydrofolate, and evaluation of vitamin stability in human gastric juice: Implications for folate bioavailability, *Food Chem.* 2008, 106:200–210.
- Nikolaev, E. N.; Kostyukevich, Y. I.; Vladimirov, Gleb N. Fourier transform ion cyclotron resonance (FT ICR) mass spectrometry: Theory and simulations, *Mass Spectrom. Rev.* 2016, 35:219–258.
- Nilsson, C.; Johansson, M.; Yazynina, Elena; Strlsj, Lena; Jastrebova, Jelena Solid-phase extraction for HPLC analysis of dietary folates, *Eur. Food Res. Technol.* 2004, 219:199–204.
- Nothias, L. F.; Petras, D.; Schmid, Robin; Dührkop, Kai; Rainer, Johannes; Sarvepalli, Abinesh et al. Feature-based Molecular Networking in the GNPS Analysis Environment, *bioRxiv* 2019, 38:1–19.
- Obeid, R.; Holzgreve, W.; Pietrzik, Klaus Is 5-methyltetrahydrofolate an alternative to folic acid for the prevention of neural tube defects?, *J. Perinat. Med.* 2013, 41:469–483.
- Off, M. K.; Steindal, A. E.; Porojnicu, Alina Carmen; Juzeniene, Asta; Vorobey, Alexander; Johnsson, Anders et al. Ultraviolet photodegradation of folic acid, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 2005, 80:47–55.
- Pancharuniti, N.; Lewis, C. A.; Sauberlich, H. E.; Perkins, L. L.; Go, R. C.; Alvarez, J. O. et al. Plasma homocyst(e)ine, folate, and vitamin B-12 concentrations and risk for early-onset coronary artery disease, *Am. J. Clin. Nutr.* 1994, 59:940–948.
- Parihar, P.; Singh, S.; Singh, Rachana; Singh, Vijay Pratap; Prasad, Sheo Mohan Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2015, 22:4056–4075.
- Patanwala, I.; King, M. J.; Barrett, David A.; Rose, John; Jackson, Ralph; Hudson, Mark et al. Folic acid handling by the human gut: implications for food fortification and supplementation, *Am. J. Clin. Nutr.* 2014, 100:593–599.
- Patra, M.; Salonen, E.; Terama, Emma; Vattulainen, Ilpo; Faller, Roland; Lee, Bryan W. et al. Under the influence of alcohol: the effect of ethanol and methanol on lipid bilayers, *Biophys. J.* 2006, 90:1121–1135.
- Patring, J. D. M. und Jastrebova, J. A. Application of liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for determination of dietary folates: effects of buffer nature and mobile phase composition on sensitivity and selectivity, *J. Chromatogr. A* 2007, 1143:72–82.
- Patring, J. D.M.; Johansson, M. S.; Yazynina, Elena; Jastrebova, Jelena A. Evaluation of impact of different antioxidants on stability of dietary folates during food sample preparation and storage of extracts prior to analysis, *Anal. Chim. Acta* 2005, 553:36–42.

16. Hefekultivierungen

- Pawlosky, R. J. und Flanagan, V. P. A Quantitative Stable-Isotope LC–MS Method for the Determination of Folic Acid in Fortified Foods, *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49:1282–1286.
- Pawlosky, R. J.; Flanagan, V. P.; Pfeiffer, C. M. Determination of 5-methyltetrahydrofolic acid in human serum by stable-isotope dilution high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 2001, 298:299–305.
- Pedersen, J. C. Comparison of gamma-glutamyl hydrolase (conjugase; EC 3.4.22.12) and amylase treatment procedures in the microbiological assay for food folates, *Br. J. Nutr.* 1988, 59:261–271.
- Pereira, S.; Kildegaard, H. F.; Andersen, Mikael Rørdam Impact of CHO Metabolism on Cell Growth and Protein Production: An Overview of Toxic and Inhibiting Metabolites and Nutrients, *Biotechnol. J.* 2018, 13:1860-1878.
- Pfeiffer, C.; Diehl, J. F.; Schwack, W. Nahrungsfolate — Eine aktuelle Übersicht Stabilität, Physiologische Bedeutung, Bioverfügbarkeit, analytische Bestimmungsmethoden, Einfluß der Lebensmittelbehandlung, *Z. Ernährungswiss.* 1994, 33:85–119.
- Pfeiffer, C.; Fazili, Z.; Zhang, Mindy (2010) "Folate Analytical Methodology" (Boca Raton: Taylor & Francis), 517–574.
- Pfeiffer, C. M.; Fazili, Z.; McCoy, Les; Zhang, Ming; Gunter, Elaine W. Determination of folate vitamers in human serum by stable-isotope-dilution tandem mass spectrometry and comparison with radioassay and microbiologic assay, *Clin. Chem.* 2004, 50:423–432.
- Pfeiffer, C. M. und Gregory, J. F. Enzymatic deconjugation of erythrocyte polyglutamyl folates during preparation for folate assay: investigation with reversed-phase liquid chromatography, *Clin. Chem.* 1996, 42:1847–1854.
- Pfeiffer, C. M.; Rogers, L. M.; Gregory, Jesse F. Determination of Folate in Cereal-Grain Food Products Using Trienzyme Extraction and Combined Affinity and Reversed-Phase Liquid Chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45:407–413.
- Phillips, D. R. und Wright, A. J. Studies on the response of *Lactobacillus casei* to different folate monoglutamates, *Br. J. Nutr.* 1982, 47:183–189.
- Picciano et al. (1990), *Folic acid metabolism in health and disease*, New York (Wiley-Liss).
- Pickup, J. F. und McPherson, K. Theoretical considerations in stable isotope dilution mass spectrometry for organic analysis, *Anal. Chem.* 1976, 48:1885–1890.
- Pietercelie, A.; Allardin, D.; van Nederveelde, Laurence Effect of fermentation conditions of brewing yeasts on folate production, *Cerevisia* 2011, 36:41–45.
- Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, Alejandro; Oresic, Matej MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data, *BMC Bioinformatics* 2010, 11:395.
- Póo-Prieto, R.; Haytowitz, D. B.; Holden, Joanne M.; Rogers, Gail; Choumenkovitch, Silvina F.; Jacques, Paul F. et al. Use of the Affinity/HPLC Method for Quantitative Estimation of Folic Acid in Enriched Cereal-Grain Products, *J. Nutr.* 2006, 136:3079–3083.
- Qiu, A.; Jansen, M.; Sakaris, Antoinette; Min, Sang Hee; Chattopadhyay, Shrikanta; Tsai, Eugenia et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption, *Cell* 2006, 127:917–928.
- Quinlivan, E. P.; Hanson, A. D.; Gregory, Jesse F. The analysis of folate and its metabolic precursors in biological samples, *Anal. Biochem.* 2006, 348:163–184.
- Rahman, M. und Hasan, M. R. Pentose Phosphate Pathway in Disease and Therapy, *Adv. Mat. Res.* 2014, 995:1–27.
- Ramirez-Gaona, M.; Marcu, A.; Pon, Allison; Guo, An Chi; Sajed, Tanvir; Wishart, Noah A. et al. YMDB 2.0: a significantly expanded version of the yeast metabolome database, *Nucleic Acids Res.* 2017, 45:D440-D445.

- Ramos-Parra, P. A.; Garcia-Salinas, C.; Hernandez-Brenes, Carmen; La Garza, Rocio I. Diaz de Folate levels and polyglutamylation profiles of papaya (*Carica papaya* cv. Maradol) during fruit development and ripening, *J. Agric. Food Chem.* 2013a, 61:3949–3956.
- Ramos-Parra, P. A.; Urrea-López, R.; La Díaz de Garza, Rocio I. Folate analysis in complex food matrices Use of a recombinant *Arabidopsis* γ -glutamyl hydrolase for folate deglutamylation, *Food Res. Int.* 2013b, 54:177–185.
- Rebeille, F.; Ravanel, S.; Jabrin, Samuel; Douce, Roland; Storozhenko, Sergei; van der Straeten, Dominique Foliates in plants: biosynthesis, distribution, and enhancement, *Physiol Plant* 2006, 126:330–342.
- Rebello, T. Trace enrichment of biological folates on solid-phase adsorption cartridges and analysis by high-pressure liquid chromatography, *Anal. Biochem.* 1987, 166:55–64.
- Reed, G. und Nagodawithana, T. W. (2012), *Yeast Technology*, Dordrecht (Springer Netherlands).
- Reed, L. S. und Archer, M. C. Oxidation of tetrahydrofolic acid by air, *J. Agric. Food Chem.* 1980, 28:801–805.
- Rehner, G. und Daniel, H. (2010), *Biochemie der Ernährung*, Heidelberg (Spektrum Akademischer Verlag).
- Richey, D. P. und Brown, G. M. The biosynthesis of folic acid. IX. Purification and properties of the enzymes required for the formation of dihydroptericoic acid, *J. Biol. Chem.* 1969, 244:1582–1592.
- Ringling, C. und Rychlik, M. Analysis of seven folates in food by LC–MS/MS to improve accuracy of total folate data, *Eur. Food Res. Technol.* 2013, 236:17–28.
- Ringling, C. und Rychlik, M. Origins of the difference between food folate analysis results obtained by LC-MS/MS and microbiological assays, *Anal. Bioanal. Chem.* 2017, 409:1815–1825.
- Robinson, K.; Arheart, K.; Refsum, H.; Brattström, L.; Boers, G.; Ueland, P. et al. Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. European COMAC Group, *Circulation* 1998, 97:437–443.
- Rogers, S.; Ong, C. W.; Wandy, Joe; Ernst, Madeleine; Ridder, Lars; van der Hooft, Justin J. J. Deciphering complex metabolite mixtures by unsupervised and supervised substructure discovery and semi-automated annotation from MS/MS spectra, *Faraday Discuss.* 2019, 218:284–302.
- Rosenberg, I. H. A history of the isolation and identification of folic acid (folate), *Ann. Nutr. Metab.* 2012, 61:231–235.
- Röth, D.; Chiang, A. J.; Hu, Weidong; Gugiu, Gabriel B.; Morra, Christina N.; Versalovic, James et al. Two-carbon folate cycle of commensal *Lactobacillus reuteri* 6475 gives rise to immunomodulatory ethionine, a source for histone ethylation, *FASEB J.* 2019, 33:3536–3548.
- Ruggeri, S.; Vahteristo, L. T.; Aguzzi, A.; Finglas, P.; Carnovale, E. Determination of folate vitamers in food and in Italian reference diet by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1999, 855:237–245.
- Rychlik, M. und Asam, S. Stabilisotopenverdünnungsanalysen zur Quantifizierung organischer Spurenkomponenten in der Lebensmittelanalytik, *Environ Sci Eur* 2009, 21:470–482.
- Saini, R. K.; Manoj, P.; Shetty, N. P.; Srinivasan, K.; Giridhar, P. Relative bioavailability of folate from the traditional food plant *Moringa oleifera* L. as evaluated in a rat model, *J. Food Sci. Technol.* 2016a, 53:511–520.
- Saini, R. K.; Nile, S. H.; Keum, Young-Soo Foliates Chemistry, analysis, occurrence, biofortification and bioavailability, *Food Res. Int.* 2016b, 89:1–13.

16. Hefekultivierungen

- Scaglione, F. und Panzavolta, G. Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing, *Xenobiotica* 2014, 44:480–488.
- Schaller, F.; Striegel, L.; Rychlik, Michael, *Methodenentwicklung für Polyglutamatformen von Folaten in Hefe*, München,
- Scheer, J. B.; Mackey, A. D.; Gregory, Jesse F. Activities of hepatic cytosolic and mitochondrial forms of serine hydroxymethyltransferase and hepatic glycine concentration are affected by vitamin B-6 intake in rats, *J. Nutr.* 2005, 135:233–238.
- Schertel, M. E.; Boehne, J. W.; Libby, David A. Folic Acid Derivatives in Yeast, *J. Biol. Chem.* 1965, 240:3154–3158.
- Schirch, V. und Strong, W. B. Interaction of folylpolyglutamates with enzymes in one-carbon metabolism, *Arch. Biochem. Biophys.* 1989, 269:371–380.
- Schlotterbeck, G.; Ross, A.; Dieterle, Frank; Senn, Hans Metabolic profiling technologies for biomarker discovery in biomedicine and drug development, *Pharmacogenomics* 2006, 7:1055–1075.
- Scott, J.; Rébeillé, F.; Fletcher, John Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods, *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80:795–824.
- Selhub, J. Determination of tissue folate composition by affinity chromatography followed by high-pressure ion pair liquid chromatography, *Anal. Biochem.* 1989, 182:84–93.
- Seyoum, E. und Selhub, J. Combined affinity and ion pair column chromatographies for the analysis of food folate, *J. Nutr. Biochem.* 1993, 4:488–494.
- Seyoum, E. und Selhub, J. Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase action, *J. Nutr.* 1998a, 128:1956–1960.
- Seyoum, E. und Selhub, J. Properties of Food Folates Determined by Stability and Susceptibility to Intestinal Pteroylpolyglutamate Hydrolase Action, *J. Nutr.* 1998b, 128:1956–1960.
- Shane, B. (1989) "Folypolyglutamate Synthesis and Role in the Regulation of One-Carbon Metabolism" (San Diego: Academic Press), 263–335.
- Shane, B. Folate Chemistry and Metabolism, *Clin. Res. Regul. Aff.* 2001, 18:137–159.
- Shane, B. Folate and vitamin B₁₂ metabolism: Overview and interaction with riboflavin, vitamin B₆, and polymorphisms 2008, 29:S5-S16.
- Shane, B.; Tamura, T.; Stokstad, E. L. Robert Folate assay: A comparison of radioassay and microbiological methods, *Clin. Chim. Acta* 1980, 100:13–19.
- Shohag, M. J. I.; Yang, Q.; Wei, Yanyan; Zhang, Jie; Khan, Farhana Zerine; Rychlik, Michael et al. A rapid method for sensitive profiling of folates from plant leaf by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole mass spectrometer, *J. Chromatogr. B* 2017, 1040:169–179.
- Shrestha, A. K.; Arcot, J.; Paterson, Janet Folate assay of foods by traditional and tri-enzyme treatments using cryoprotected *Lactobacillus casei*, *Food Chem.* 2000, 71:545–552.
- Shulaev, V.; Cortes, D.; Miller, Gad; Mittler, Ron Metabolomics for plant stress response, *Physiol. Plant.* 2008, 132:199–208.
- Singer, R. A.; Johnston, G. C.; Bedard, D. Methionine analogs and cell division regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1978, 75:6083–6087.
- Siuzdak, G. The Emergence of Mass Spectrometry in Biochemical Research, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994, 91:11290–11297.
- Smith, C. A.; Want, E. J.; O'Maille, Grace; Abagyan, Ruben; Siuzdak, Gary XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification, *Anal. Chem.* 2006, 78:779–787.

- Sommer, H.; Thomas, H. A.; Hipple, J. A. The Measurement of eM by Cyclotron Resonance, *Phys. Rev.* 1951, 82:697–702.
- Sotelo, J. und Slupsky, C. M. (2013) "Metabolomics using nuclear magnetic resonance (NMR)" (Oxford: Woodhead Publ), 29–43.
- Souza Varize, C. de; Maria Christofoleti-Furlan, R.; Souza Miranda Muynarsk, Elisangela de; Vinícius de Melo Pereira, Gilberto; Dantas Lopes, Lucas; Carlos Basso, Luiz (2019) "Biotechnological Applications of Nonconventional Yeasts" (London: IntechOpen),
- Spencer, J. F. T. und Spencer, D. M. (1997a) "Historical Introduction: Yeasts and Man in the Past" (Berlin, New York: Springer), 2–10.
- Spencer, J. F. T. und Spencer, D. M. (1997b) "Taxonomy: The Names of the Yeasts" (Berlin, New York: Springer), 11–32.
- Stea, T. H.; Johansson, M.; Jägerstad, Margaretha; Frølich, Wenche Retention of folates in cooked, stored and reheated peas, broccoli and potatoes for use in modern large-scale service systems, *Food Chem.* 2007, 101:1095–1107.
- Stokes, P. und Webb, K. Analysis of some folate monoglutamates by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. I, *J. Chromatogr. A* 1999, 864:59–67.
- Stokstad, E. L. Early work with folic acid, *Fed. Proc.* 1979, 38:2696–2698.
- Stolzenberg-Solomon, R. Z.; Chang, S.-C.; Leitzmann, Michael F.; Johnson, Karen A.; Johnson, Christine; Buys, Sandra S. et al. Folate intake, alcohol use, and postmenopausal breast cancer risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial, *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, 83:895–904.
- Stover, P. J. (2010) "Folate Biochemical Pathways and Their Regulation" (Boca Raton: Taylor & Francis), 49–74.
- Strandler, H. S.; Patring, J.; Jagerstad, Margaretha; Jastrebova, Jelena Challenges in the determination of unsubstituted food folates: impact of stabilities and conversions on analytical results, *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63:2367–2377.
- Strathern, J. N.; Jones, E. W.; Broach, James R. (1982), *The molecular biology of the yeast saccharomyces*, Cold Spring Harbor, NY (Cold Spring Harbor Laboratory).
- Striegel, L.; Chebib, S.; Dumler, Caroline; Lu, Yuyun; Huang, Dejian; Rychlik, Michael Durian Fruits Discovered as Superior Folate Sources, *Front. Nutr.* 2018a, 5:114.
- Striegel, L.; Chebib, S.; Netzel, Michael E.; Rychlik, Michael Improved Stable Isotope Dilution Assay for Dietary Folates Using LC-MS/MS and Its Application to Strawberries, *Front. Chem.* 2018b, 6:11.
- Suh, J. R.; Herbig, A. K.; Stover, P. J. New perspectives on folate catabolism, *Annu. Rev. Nutr.* 2001, 21:255–282.
- Sumner, L. W.; Amberg, A.; Barrett, Dave; Beale, Michael H.; Begger, Richard; Daykin, Clare A. et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI), *Metabolomics* 2007, 3:211–221.
- Suzuki, Y. und Brown, G. M. The biosynthesis of folic acid. XII. Purification and properties of dihydroneopterin triphosphate pyrophosphohydrolase, *J. Biol. Chem.* 1974, 249:2405–2410.
- Swartz, M. E. UPLC™ : An Introduction and Review, *J. Liq. Chromatogr.* 2005, 28:1253–1263.
- Tamura, T.; Mizuno, Y.; Johnston, Kelley E.; Jacob, Robert A. Food Folate Assay with Protease, α -Amylase, and Folate Conjugase Treatments, *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45:135–139.
- Tamura, T.; Shin, Y. S.; Buehring, K. U.; Stokstad, E. L. The availability of folates in man: effect of orange juice supplement on intestinal conjugase, *Br. J. Haematol.* 1976, 32:123–133.

16. Hefekultivierungen

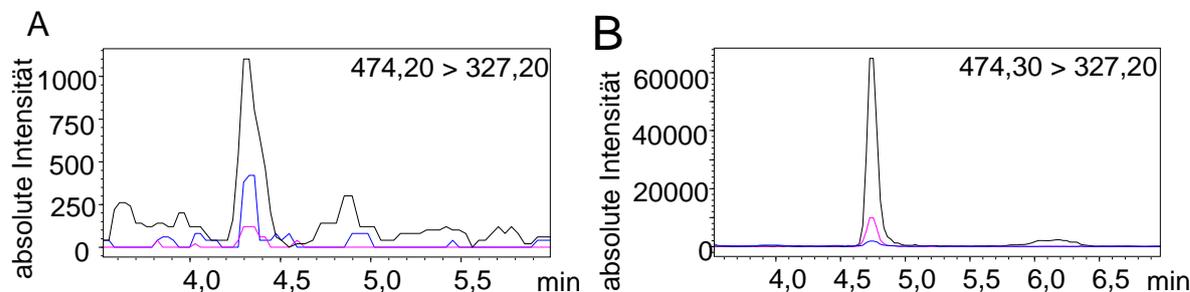
- Tamura, T.; Shin, Y. S.; Williams, M. A.; Stokstad, E.L.R. Lactobacillus casei response to pteroylpolyglutamates, *Anal. Biochem.* 1972, 49:517–521.
- Tan, L. U.; Drury, E. J.; MacKenzie, R. E. Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase. A multifunctional protein from porcine liver, *J. Biol. Chem.* 1977, 252:1117–1122.
- Télez, R.; Jacob, G.; Basilio, Carlos; George-Nascimento, Carlos Effect of ethionine on the in vitro synthesis and degradation of mitochondrial translation products in yeast, *FEBS Lett.* 1985, 192:88–94.
- Tibbetts, A. S. und Appling, D. R. Compartmentalization of Mammalian folate-mediated one-carbon metabolism, *Annu. Rev. Nutr.* 2010, 30:57–81.
- Traxler, M. F. und Kolter, R. A massively spectacular view of the chemical lives of microbes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012, 109:10128–10129.
- Trinh, B. N.; Ong, C.-N.; Coetzee, Gerhard A.; Yu, Mimi C.; Laird, Peter W. Thymidylate synthase: a novel genetic determinant of plasma homocysteine and folate levels, *Hum. Genet.* 2002, 111:299–302.
- VanderMeer, J. E.; Carter, T. C.; Pangilinan, Faith; Mitchell, Adam; Kurnat-Thoma, Emma; Kirke, Peadar N. et al. Evaluation of proton-coupled folate transporter (SLC46A1) polymorphisms as risk factors for neural tube defects and oral clefts, *Am. J. Med. Genet. A* 2016, 470A:1007–1016.
- Vellosi, R.; Volpe, V.; Fiorio, R.; Cundari, E.; Galli, A.; Bronzetti, G. Effects of l-ethionine on gene conversion and point mutation induced by alkylating agents in yeast, *Mut. Res./Environ. Mutagen. Rel. Sub.* 1990, 234:406.
- Verlinde, P.; Oey, I.; Hendrickx, Marc; van Loey, Ann High-pressure treatments induce folate polyglutamate profile changes in intact broccoli (*Brassica oleraceae* L. cv. *Italica*) tissue, *Food Chem.* 2008, 111:220–229.
- Verlinde, P. H. C. J.; Oey, I.; Deborggraeve, Wim M.; Hendrickx, Marc E.; van Loey, Ann M. Mechanism and related kinetics of 5-methyltetrahydrofolic acid degradation during combined high hydrostatic pressure-thermal treatments, *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57:6803–6814.
- Viant, M. R.; Kurland, I. J.; Jones, Martin R.; Dunn, Warwick B. How close are we to complete annotation of metabolomes?, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2017, 36:64–69.
- Villas-Boas, S. G.; Hojer-Pedersen, J.; Akesson, Mats; Smedsgaard, Jorn; Nielsen, Jens Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods, *Yeast* 2005, 22:1155–1169.
- Vishnumohan, S.; Arcot, J.; Pickford, Russell Naturally-occurring folates in foods Method development and analysis using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS), *Food Chem.* 2011, 125:736–742.
- Vogelgesang, J. und Hädrich, J. Limits of detection, identification and determination: a statistical approach for practitioners, *Accred. and Qual. Assur.* 1998, 3:242–255.
- Vuckovic, D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 403:1523–1548.
- Wagner, C. Biochemical role of folate in cellular metabolism, *Clin. Res. Regul. Aff.* 2001, 18:161–180.
- Wald, N.; Sneddon, J.; Frost, C.; Stone, R. Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study, *Lancet* 1991, 338:131–137.
- Walkey, C. J.; Kitts, D. D.; Liu, Yazheng; van Vuuren, Hennie J.J. Bioengineering yeast to enhance folate levels in wine, *Process Biochem.* 2015, 50:205–210.

- Wang, C.; Riedl, K. M.; Schwartz, Steven J. A liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for quantitative determination of native 5-methyltetrahydrofolate and its polyglutamyl derivatives in raw vegetables, *J. Chromatogr. B* 2010, 878:2949–2958.
- Wang, C.; Riedl, K. M.; Somerville, Jeremy; Balasubramaniam, V. M.; Schwartz, Steven J. Influence of high-pressure processing on the profile of polyglutamyl 5-methyltetrahydrofolate in selected vegetables, *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59:8709–8717.
- Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, Vanessa V.; Sanchez, Laura M.; Garg, Neha; Peng, Yao et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking, *Nat. Biotechnol.* 2016, 34:828–837.
- Wawire, M.; Oey, I.; Mathooko, Francis M.; Njoroge, Charles K.; Shitanda, Douglas; Sila, Daniel et al. Effect of harvest age and thermal processing on poly- γ -glutamate folates and minerals in African cowpea leaves (*Vigna unguiculata*), *J. Food Compost. Anal.* 2012, 25:160–165.
- Wei, M. M.; Bailey, L. B.; Toth, J. P.; Gregory, J. F. 3rd Bioavailability for humans of deuterium-labeled monoglutamyl and polyglutamyl folates is affected by selected foods, *J. Nutr.* 1996, 126:3100–3108.
- Weisman, R. A. und Brown, G. M. The Biosynthesis of Folic Acid: V. Characteristics of the enzyme system that catalyzes the synthesis of dihydroptericoic acid, *J. Biol. Chem.* 1964, 239:326–331.
- Werler, M. M.; Shapiro, S.; Mitchell, A. A. Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects, *JAMA* 1993, 269:1257–1261.
- West, R. L.; Lee, J. M.; Maroun, L. E. Hypomethylation of the amyloid precursor protein gene in the brain of an Alzheimer's disease patient, *J. Mol. Neurosci.* 1995, 6:141–146.
- Wien, T. N.; Pike, E.; Wisløff, Torbjørn; Staff, Annetine; Smeland, Sigbjørn; Klemp, Marianne Cancer risk with folic acid supplements: a systematic review and meta-analysis, *Br. Med. J.* 2012, 2:e000653.
- Wills, L. Production of pernicious anaemia (bartonella anaemia) in rats by deficient feeding, *Br. Med. J.* 1930, 1:1167–1168.
- Wills, L. Treatment of pernicious anaemia of pregnancy and tropical anaemia with special reference to yeast extract as a curative agent. By Lucy Wills, *Br. Med. J.* 1931, 1:1059–1064.
- Wilson, S. D. und Horne, D. W. Evaluation of ascorbic acid in protecting labile folic acid derivatives, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1983, 80:6500–6504.
- Wilson, S. D. und Horne, D. W. High-performance liquid chromatographic determination of the distribution of naturally occurring folic acid derivatives in rat liver, *Anal. Biochem.* 1984, 142:529–535.
- Windig, W.; Phalp, J. M.; Payne, Alan W. A Noise and Background Reduction Method for Component Detection in Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 1996, 68:3602–3606.
- Windig, W. und Smith, W. F. Chemometric analysis of complex hyphenated data: Improvements of the component detection algorithm, *J. Chromatogr. A* 2007, 1158:251–257.
- Winkels, R. M.; Brouwer, I. A.; Siebelink, Els; Katan, Martijn B.; Verhoef, Petra Bioavailability of food folates is 80% of that of folic acid, *Am. J. Clin. Nutr.* 2007, 85:465–473.
- Wishart, D. S. Applications of Metabolomics in Drug Discovery and Development, *Drugs R. D.* 2008, 9:307–322.
- Wishart, D. S. Computational strategies for metabolite identification in metabolomics, *Bioanalysis* 2009, 1:1579–1596.
- Wishart, D. S. Metabolomics for Investigating Physiological and Pathophysiological Processes, *Physiol. Rev.* 2019a, 99:1819–1875.

16. Hefekultivierungen

- Wishart, D. S. NMR metabolomics: A look ahead, *J. Magn. Reson.* 2019b, 306:155–161.
- Wolff, M. M. und Stephens, W. E. A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion, *Rev. of Sci. Instr.* 1953, 24:616–617.
- Woortman, D. V.; Fuchs, T.; Striegel, Lisa; Fuchs, Monika; Weber, Nadine; Brück, Thomas B. et al. Microalgae a Superior Source of Folates: Quantification of Folates in Halophile Microalgae by Stable Isotope Dilution Assay, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019, 7:481.
- Wright, A. J. A.; Finglas, P. M.; Dainty, Jack R.; Wolfe, Caroline A.; Hart, David J.; Wright, Dawn M. et al. Differential kinetic behavior and distribution for pteroylglutamic acid and reduced folates: a revised hypothesis of the primary site of PteGlu metabolism in humans, *J. Nutr.* 2005, 135:619–623.
- Yang, J. Y.; Sanchez, L. M.; Rath, Christopher M.; Liu, Xueting; Boudreau, Paul D.; Bruns, Nicole et al. Molecular networking as a dereplication strategy, *J. Nat. Prod.* 2013, 76:1686–1699.
- Yang, Q.; Botto, L. D.; Erickson, J. David; Berry, Robert J.; Sambell, Christie; Johansen, Helen et al. Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002, *Circulation* 2006, 113:1335–1343.
- Yost, R. A. und Enke, C. G. Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer, *J. Am. Chem. Soc.* 1978, 100:2274–2275.
- Yost, R. A. und Enke, C. G. Triple quadrupole mass spectrometry for direct mixture analysis and structure elucidation, *Anal. Chem.* 1979, 51:1251–1264.
- Zhang, G.-F.; Storozhenko, S.; van der Straeten, Dominique; Lambert, Willy E. Investigation of the extraction behavior of the main monoglutamate folates from spinach by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 2005, 1078:59–66.
- Zhao, R.; Diop-Bove, N.; Visentin, Michele; Goldman, I. David Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia, *Annu. Rev. Nutr.* 2011, 31:177–201.
- Zhao, R.; Matherly, L. H.; Goldman, I. David Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues, *Expert Rev. Mol. Med.* 2009, 11:e4.
- Zonneveld, B. J.M. Cheap and simple yeast media, *J. Microbiol. Methods* 1986, 4:287–291.

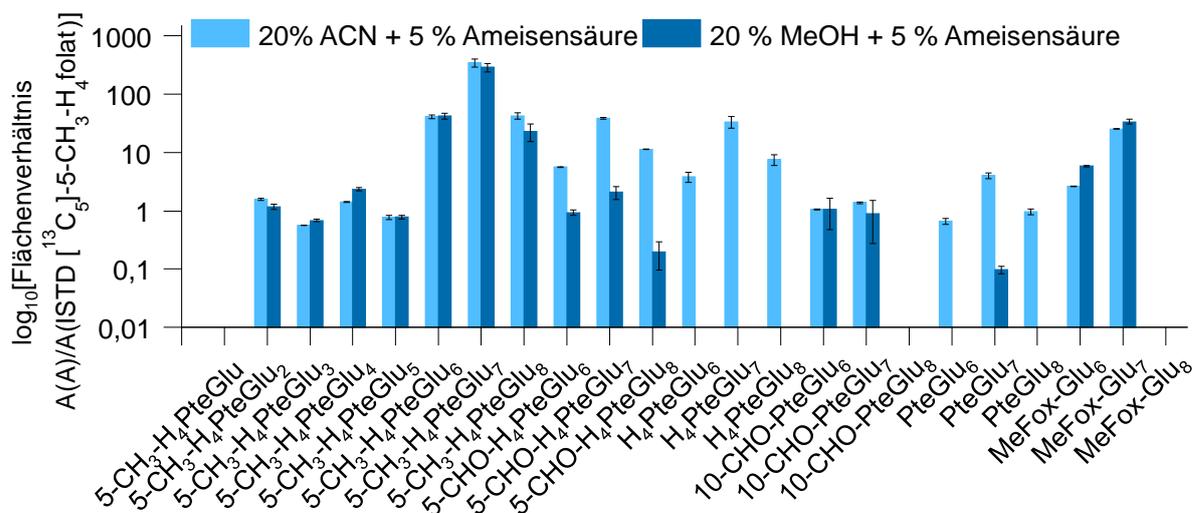
18 Anhang

Anhang 1 Chromatogrammspuren von MeFox in Bäckerhefe vor (A) und nach (B) Behandlung mit UV-Licht.**Anhang 2** Prozentuale Elution der getesteten Monoglutamatstandards von verschiedenen alternativen Festphasenmaterialien im Vergleich zur Standardmethode (SAX E).

Ansatz	Elutionslösung	pH-Wert der Probe	Peakfläche im Vergleich zur Standardmethode (SAX unter Verwendung von Elutionspuffer 1) [%]			
			10-CHO-PteGlu	5-CH ₃ -H ₄ folat	5-CHO-H ₄ folat	H ₄ folat
SAX A	Methanol + 1 % Ameisensäure	5	3,11	2,00	0,15	0,04
NH ₂ I	Methanol + 1 % NH ₃	5	0,47	1,64	0,76	0,07
NH ₂ II	Methanol + 1 % Ameisensäure	5	0,26	0,42	0,23	0,01
C18 I	ACN/MeOH/H ₂ O) (26/14/60)	5	1,52	2,73	0,77	0,29
C18 II	50 % MeOH	5	0,48	0,68	0,94	0,00
C18 III	50 % MeOH	3,4	2,23	3,34	3,43	0,24
Phenyl	40 % ACN	3,4	1,98	1,45	0,58	0,03
MAX	Methanol + 1 % Ameisensäure	5	0,14	0,23	0,13	0,00

Anhang 3 Semi-quantitative Optimierung der Säurekonzentration der SAX-Aufreinigung an Hand der Polyglutamate 1-8 der Vitamere 10-CHO-PteGlu, 5-CHO-H₄folat, H₄folat, PteGlu sowie MeFox. n.d. = nicht detektierbar.

Verwendete Elutionslösung	10-CHO-PteGlu			5-CHO-H ₄ PteGlu _n			H ₄ PteGlu _n			PteGlu _n			MeFox-Glu _n		
	6	7	8	6	7	8	6	7	8	6	7	8	6	7	8
50 % MeOH + 0,1 % Ameisensäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
50 % MeOH + 1 % Ameisensäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
50 % MeOH + 5 % Ameisensäure	n.d.	n.d.	n.d.	1,0	3,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
				±	±										
				0,2	0,5										

Anhang 6 Semi-quantitative Optimierung des verwendeten organischen Lösungsmittels der alternativen C18-Aufreinigung. Logarithmische Darstellung der Flächenverhältnisse A(A)/A(ISTD).**Anhang 7** Optimierung des Elutionsvolumens der alternativen C18-Aufreinigung an Hand der detektierbaren Peakflächen; n.d. = nicht detektierbar; AUC = area under the curve.

	Peakfläche [AUC]							
	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₂	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₃	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₄	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₅	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₆	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₇	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₈
1-10 mL	42.692	340.677	24.007	67.351	85.877	439.921	7.775.329	750.778
10-11 mL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30.962	n.d.
11-12 mL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18.486	n.d.
12- 13 mL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9.789	n.d.
13-14 mL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Anhang 8 Optimierung des Elutionsvolumens der alternativen HLB-Aufreinigung an Hand der detektierbaren Peakflächen; n.d. = nicht detektierbar; AUC = area under the curve.

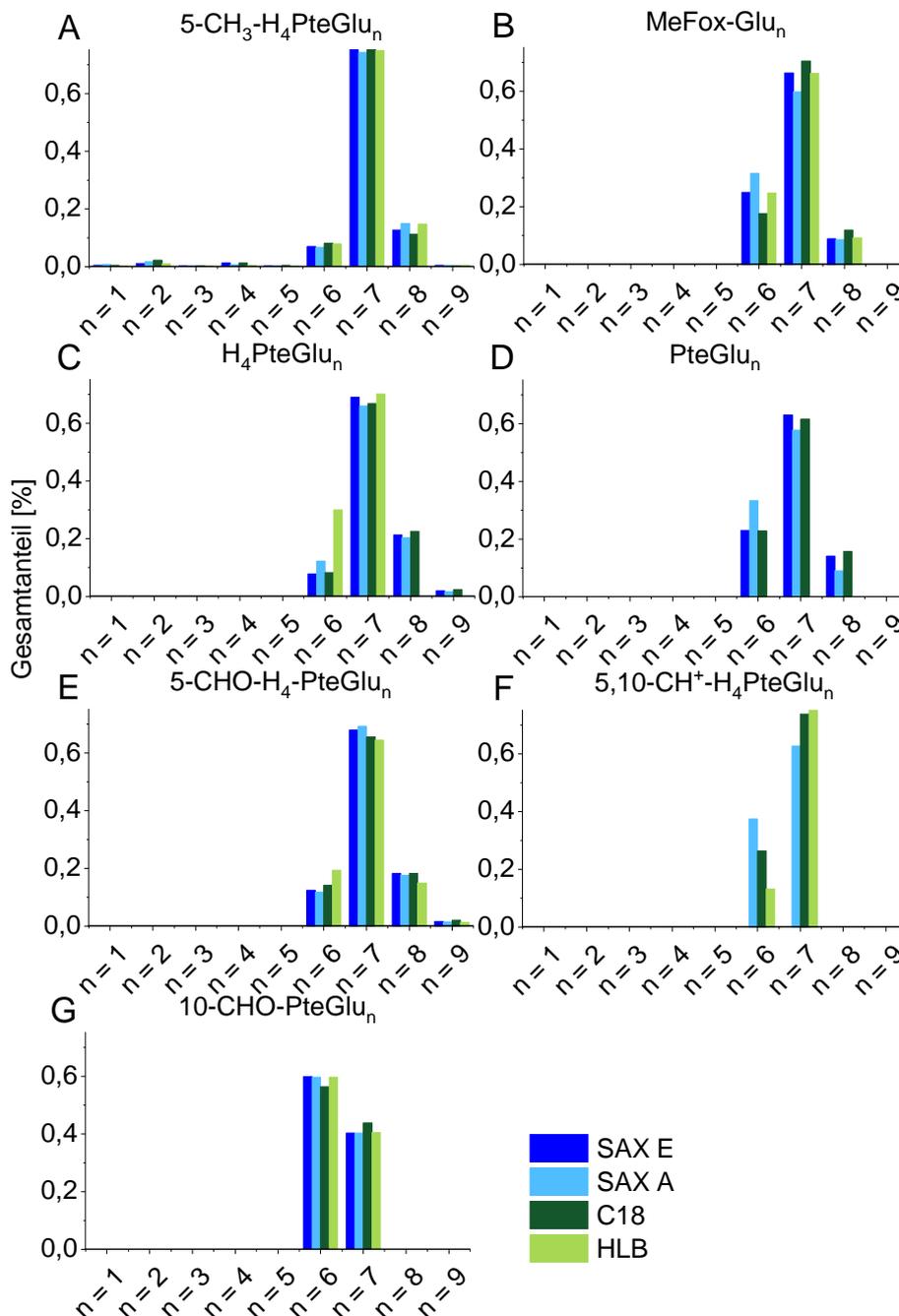
	Peakfläche [AUC]							
	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₂	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₃	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₄	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₅	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₆	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₇	5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₈
0-12 mL	83.044	345.071	40.146	122.227	125.317	379.837	3.264.822	138.025
12-13 mL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	86.663	691.607	20.877
13-14 mL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	56.724	630.032	16.912
14-15 mL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	73.961	784.557	20.195
15-16 mL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	34.031	334.418	8.237
16-18 mL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17.846	162.351	n.d.
18-20 mL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	20125	n.d.
20-22 mL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

18. Anhang

Anhang 9 Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes in Bäckerhefe mittels LC-MS/MS in Abhängigkeit der verwendeten Festphasenaufreinigung.

	Folatgehalt [$\mu\text{g}/100\text{ g}$ berechnet als PteGlu]					
	H ₄ folat	PteGlu	5-CH ₃ -H ₄ folat	MeFox	5-CHO-H ₄ folat	10-CHO-PteGlu
SAX E	342 ± 48	33 ± 2	3.567 ± 90	61 ± 5	309 ± 4	85 ± 3
SAX A	394 ± 14	20 ± 5	3.540 ± 138	88 ± 7	272 ± 3	80 ± 5
C18	336 ± 1	24 ± 7	3.462 ± 263	47 ± 8	250 ± 0	69 ± 5
HLB	376 ± 47	17 ± 12	3.598 ± 118	123 ± 16	204 ± 7	59 ± 6

Anhang 10 Prozentuale Verteilung der Polyglutamate in Bäckerhefe identifiziert an Hand des Verhältnisses A(A)/A(ISTD = [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat nach Aufreinigung des Probenextraktes mittels verschiedener Festphasenmaterialien und Analyse mittels LC-MS/MS.



Anhang 11 Folatgehalte in TUM 68® im zeitlichen Kultivierungsverlauf bestimmt mittels LC-MS/MS nach enzymatischer Dekonjugation.

Zeit [h]	H ₄ folat	PteGlu	Folatgehalt [$\mu\text{g}/100\text{ g}$ berechnet als PteGlu]				Summe	OD ₆₀₀
			5-CH ₃ -H ₄ folat	MeFox	5-CHO-H ₄ folat	10-CHO-PteGlu		
0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
20	1.769	115	10.357	116	599	162	13.119	0.21
24	2.091	150	8.110	76	762	211	11.400	0.55
26	2.263	72	7.343	82	1.343	214	11.318	1.25
29	1.096	8	7.207	117	1.765	108	10.300	1.57
32	1.489	14	7.095	95	1.563	66	10.322	1.75
50	1.020	80	4.261	76	1.789	101	7.327	1.89
80	590	77	3.113	77	1.888	250	5.995	2.09

Anhang 12 Folatgehalte der 5-CH₃-H₄folat Polyglutamate (1-7) in TUM 68® im zeitlichen Verlauf der Kultivierung bestimmt mittels LC-MS/MS.

Zeit [h]	Folatgehalt von 5-CH ₃ -H ₄ PteGlu _n [$\mu\text{g}/100\text{ g}$ berechnet als PteGlu]							
	n = 1	n = 2	n = 3	n = 4	n = 5	n = 6	n = 7	n = 1-7
0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	7	50	59	103	96	5.645	3.013	8.972
24	3	39	36	79	64	3.831	1.997	6.049
26	2	32	29	68	50	4.070	1.975	6.227
29	1	4	4	28	21	2.206	3.572	5.837
32	1	4	4	25	18	1.287	3.335	4.675
50	1	1	1	7	10	554	2.433	3.007
80	1	3	3	8	15	530	1.806	2.366

18. Anhang

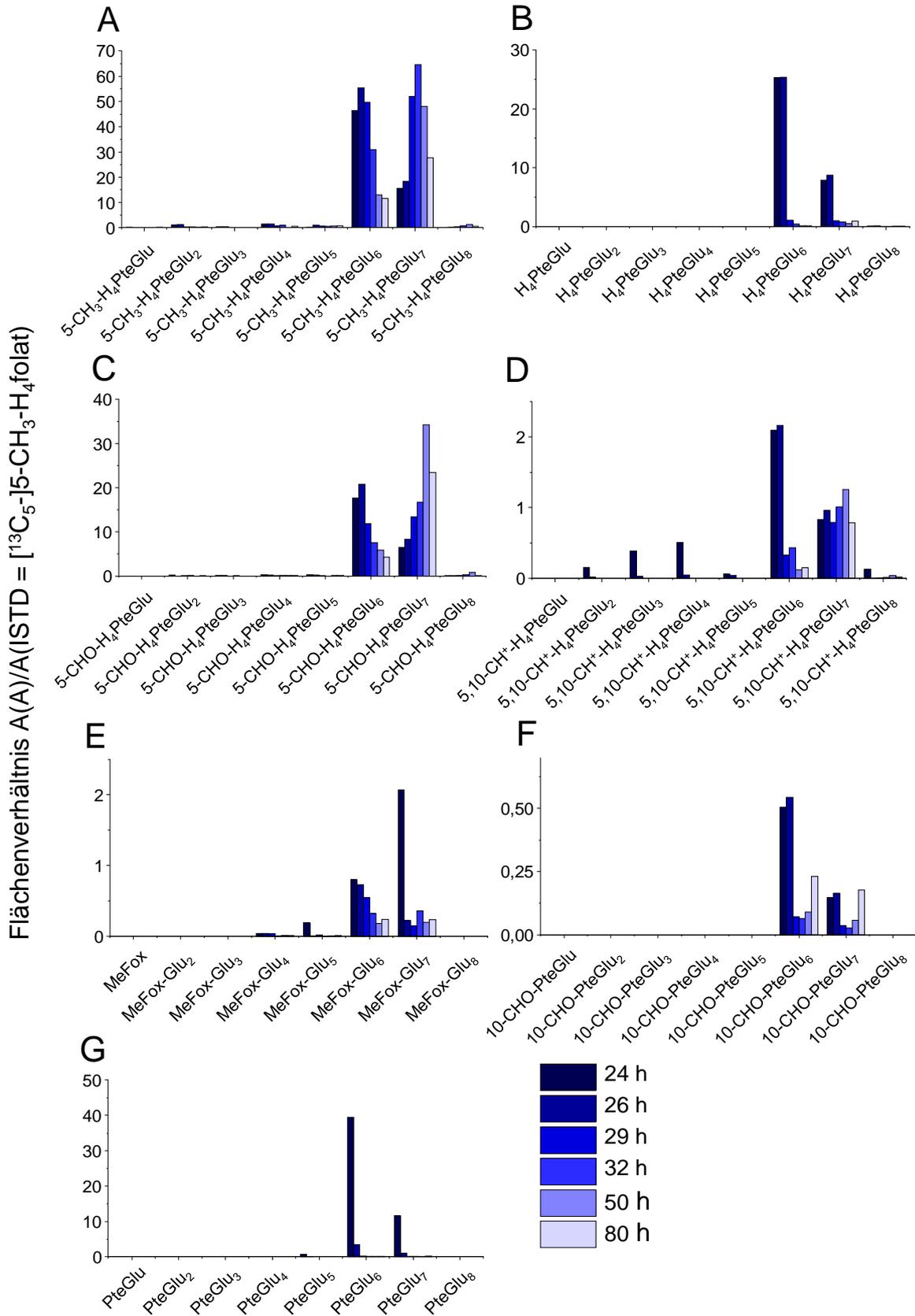
Anhang 13 Relative Verteilung der Polyglutamate in kultivierter Hefe zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten innerhalb einer Vitamerengruppe berechnet an Hand des Verhältnisses $A(A)/A(\text{ISTD}=[^{13}\text{C}_5]\text{-5-CH}_3\text{-H}_4\text{folat})$; n.d. = nicht detektierbar.

		Anteil an der Vitamerengruppe bestimmt durch semi-quantitatives Verhältnis zum ISTD [%]					
		24 h	26 h	29 h	32 h	50 h	80 h
5-CH ₃ -H ₄ PteGlu _n	n = 1	0,15	0,01	0,05	0,06	0,07	0,18
	n = 2	1,71	1,57	0,21	0,27	0,14	0,71
	n = 3	0,69	0,53	0,06	0,06	0,03	0,13
	n = 4	2,40	1,92	0,84	0,95	0,04	1,23
	n = 5	0,15	1,26	0,60	0,62	1,01	1,92
	n = 6	70,8	71,0	47,7	31,6	20,6	27,9
	n = 7	23,9	23,5	50,1	65,6	76,2	66,6
	n = 8	0,02	0,25	0,41	0,88	1,90	1,38
H ₄ PteGlu _n	n = 1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 6	75,0	73,5	52,3	37,9	25,9	15,3
	n = 7	23,5	25,4	46,6	60,7	69,2	81,6
	n = 8	0,40	0,51	1,08	1,43	4,84	3,10
5-CHO-H ₄ PteGlu _n	n = 1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 2	0,84	0,08	0,42	0,75	0,09	0,21
	n = 3	0,65	0,62	0,07	0,19	n.d.	n.d.
	n = 4	1,15	0,81	0,41	0,48	0,44	0,55
	n = 5	1,13	0,87	0,21	0,13	0,29	0,56
	n = 6	70,1	69,3	46,1	30,2	14,3	15,2
	n = 7	25,8	28,0	52,2	67,2	83,1	83,2
	n = 8	0,27	0,34	0,55	1,12	1,82	0,22
5,10-CH ⁺ -H ₄ PteGlu _n	n = 1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 2	4,83	5,65	7,54	7,76	1,61	1,00
	n = 3	1,21	1,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 4	1,59	1,38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 5	0,18	1,32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 6	65,6	62,7	27,2	27,3	15,0	15,5
	n = 7	26,2	27,8	64,5	63,8	80,9	81,4
	n = 8	0,40	0,36	0,81	1,06	2,44	2,06

		Anteil an der Vitamerengruppe bestimmt durch semi-quantitatives Verhältnis zum ISTD [%]					
		24 h	26 h	29 h	32 h	50 h	80 h
MeFox-Glu_n	n = 1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 4	3,74	3,75	3,86	2,22	3,84	2,77
	n = 5	1,80	1,16	2,68	1,33	2,47	2,45
	n = 6	75,1	72,9	61,5	46,1	44,4	48,1
	n = 7	19,4	22,2	32,0	50,4	49,2	46,7
	n = 8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10-CHO-PteGlu_n	n = 1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 6	77,6	76,9	67,5	70,3	61,0	56,7
	n = 7	22,4	23,1	32,5	29,7	39,0	43,3
	n = 8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PteGlu_n	n = 1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 5	1,26	0,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n = 6	76,3	76,4	60,3	50,0	58,5	31,6
	n = 7	22,4	22,6	39,7	50,0	41,5	68,4
	n = 8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

18. Anhang

Anhang 14 Polyglutamatverteilung in kultivierter TUM 68[®] Hefe bestimmt an Hand des Flächenverhältnisses zum zugesetzten internen Standard (ISTD) [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat nach Analyse mittels LC-MS/MS.



Anhang 15 Peakintensitäten der gemessenen Polyglutamatstandards 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₇ zur Optimierung der Quellentemperatur am UHPLC-Q-ToF-MS.

Vitamere	Peakintensität bei einer Quellentemperatur von	
	200 °C	300 °C
5-CH ₃ -H ₄ folat	40.000	40.000
5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₂	25.000	16.000
5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₃	17.000	12.500
5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₄	18.000	15.000
5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₅	26.000	37.000
5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₆	22.000	40.000
5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₇	12.500	25.000

Anhang 16 Verwendete Monoglutamatvitamere zur Erstellung der Folatdatenbank.

Vitamere	Summenformel
Folsäure	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆
Dihydrofolat	C ₁₉ H ₂₁ N ₇ O ₆
Tetrahydrofolat	C ₁₉ H ₂₃ N ₇ O ₆
5,10-Methenyl-tetrahydrofolat	C ₂₀ H ₂₂ N ₇ O ₆
5,10-Methylen-tetrahydrofolat	C ₂₀ H ₂₃ N ₇ O ₆
5-Methyl-tetrahydrofolat	C ₂₀ H ₂₅ N ₇ O ₆
5,10-Ethenyl-tetrahydrofolat	C ₂₁ H ₂₄ N ₇ O ₆
5,10-Ethylen-tetrahydrofolat	C ₂₁ H ₂₅ N ₇ O ₆
5-Ethyl-tetrahydrofolat	C ₂₁ H ₂₇ N ₇ O ₆
10-Formylfolsäure	C ₂₀ H ₁₉ N ₇ O ₇
5-Formimino-tetrahydrofolat	C ₂₀ H ₂₄ N ₈ O ₆
5-Formyl-tetrahydrofolat	C ₂₀ H ₂₃ N ₇ O ₇
5-Acetyl-tetrahydrofolat	C ₂₁ H ₂₅ N ₇ O ₇
5-Acetyl-dihydrofolat	C ₂₁ H ₂₃ N ₇ O ₇
5-Acetylfolsäure	C ₂₁ H ₂₁ N ₇ O ₇
10-Formyl-dihydrofolat	C ₂₀ H ₂₁ N ₇ O ₇
4-Hydroxy-5-methyltetrahydrofolat	C ₂₀ H ₂₅ N ₇ O ₇

18. Anhang

Anhang 17 Monoisotopische m/z der Folatpolyglutamate (Mono- bis Decaglutamat), deren Vorläufern und Abbauprodukte in ESI⁺ sowie ESI⁻.

Vitamin	Summenformel	[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺	[M+3H] ³⁺	[M-H] ⁻	[M-2H] ²⁻	[M-3H] ³⁻
Folsäure	C19H19N7O6	442,14696	221,57712	148,05384	440,13241	219,56257	146,03928
Dihydrofolat	C10H21N7O6	336,16261	168,58494	112,72572	334,14806	166,57039	110,71117
Tetrahydrofolat	C19H23N7O6	446,17826	223,59277	149,39760	444,16371	221,57822	147,38305
5,10-Methenyl-tetrahydrofolat	C20H22N7O6	456,16316	228,58522	152,72590	454,14806	226,57039	150,71117
5,10-Methylen-tetrahydrofolat	C20H23N7O6	458,17826	229,59277	153,39760	456,16371	227,57822	151,38305
5-Methyl-tetrahydrofolat	C20H25N7O6	460,19391	230,60059	154,06949	458,17936	228,58604	152,05493
10-Formyl-folsäure	C20H19N7O7	470,14187	235,57458	157,38548	468,12732	233,56002	155,37092
5-Formimino-tetrahydrofolat	C20H24N8O6	473,18916	237,09822	158,40124	471,17461	235,08366	156,38668
5-Formyl-tetrahydrofolat	C20H23N7O7	474,17317	237,59023	158,72924	472,15862	235,57567	156,71469
10-Formyl-dihydrofolat	C20H21N7O7	472,15752	236,58240	158,05736	470,14297	234,56785	156,04281
4-Hydroxy-5-methyltetrahydrofolat	C20H25N7O7	476,18882	238,59805	159,40113	474,17427	236,58350	157,38657
Folsäure-diglutamat	C24H26N8O9	571,18955	286,09841	191,06804	569,17500	284,08386	189,05348
Dihydrofolat-diglutamat	C15H28N8O9	465,20520	233,10624	155,73992	463,19065	231,09169	153,72537
Tetrahydrofolat-diglutamat	C24H30N8O9	575,22085	288,11406	192,41180	573,20630	286,09951	190,39725
5,10-Methenyl-tetrahydrofolat-diglutamat	C25H29N8O9	585,20575	293,10651	195,74010	583,19065	291,09169	193,72537
5,10-Methylen-tetrahydrofolat-diglutamat	C25H30N8O9	587,22085	294,11406	196,41180	585,20630	292,09951	194,39725
5-Methyl-tetrahydrofolat-diglutamat	C25H32N8O9	589,23650	295,12189	197,08369	587,22195	293,10734	195,06913
10-Formyl-folsäure-diglutamat	C25H26N8O10	599,18447	300,09587	200,39967	597,16992	298,08132	198,38512
5-Formimino-tetrahydrofolat-diglutamat	C25H31N9O9	602,23175	301,61951	201,41544	600,21720	299,60496	199,40088
5-Formyl-tetrahydrofolat-diglutamat	C25H30N8O10	603,21577	302,11152	201,74344	601,20122	300,09697	199,72889
10-Formyl-dihydrofolat-diglutamat	C25H28N8O10	601,20012	301,10370	201,07156	599,18557	299,08914	199,05700
4-Hydroxy-5-methyltetrahydrofolat-diglutamat	C25H32N8O10	605,23142	303,11935	202,41532	603,21687	301,10479	200,40077
Folsäure-triglutamat	C29H33N9O12	700,23215	350,61971	234,08223	698,21759	348,60516	232,06768
Dihydrofolat-triglutamat	C20H35N9O12	594,24780	297,62754	198,75412	592,23324	295,61298	196,73956
Tetrahydrofolat-triglutamat	C29H37N9O12	704,26345	352,63536	235,42600	702,24889	350,62081	233,41145
5,10-Methenyl-tetrahydrofolat-triglutamat	C30H36N9O12	714,24835	357,62781	238,75430	712,23324	355,61298	236,73956
5,10-Methylen-tetrahydrofolat-triglutamat	C30H37N9O12	716,26345	358,63536	239,42600	714,24889	356,62081	237,41145

18. Anhang

Vitamer	Summenformel	[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺	[M+3H] ³⁺	[M-H] ⁻	[M-2H] ⁻²	[M-3H] ⁻³
5-Methyl-tetrahydrofolat-triglutamat	C30H39N9O12	718,27910	359,64319	240,09788	716,26454	357,62863	238,08333
10-Formyl-folsäure-triglutamat	C30H33N9O13	728,22706	364,61717	243,41387	726,21251	362,60262	241,39932
5-Formimino-tetrahydrofolat-triglutamat	C30H38N10O12	731,27435	366,14081	244,42963	729,25979	364,12626	242,41508
5-Formyl-tetrahydrofolat-triglutamat	C30H37N9O13	732,25836	366,63282	244,75764	730,24381	364,61827	242,74309
10-Formyl-dihydrofolat-triglutamat	C30H35N9O13	730,24271	365,62499	244,08576	728,22816	363,61044	242,07120
4-Hydroxy-5-methyltetrahydrofolat-triglutamat	C30H39N9O13	734,27401	367,64064	245,42952	732,25946	365,62609	243,41497
Folsäure-tetraglutamat	C34H40N10O15	829,27474	415,14101	277,09643	827,26019	413,12646	275,08188
Dihydrofolat-tetraglutamat	C25H42N10O15	723,29039	362,14883	241,76831	721,27584	360,13428	239,75376
Tetrahydrofolat-tetraglutamat	C34H44N10O15	833,30604	417,15666	278,44020	831,29149	415,14211	276,42565
5,10-Methenyl-tetrahydrofolat-tetraglutamat	C35H43N10O15	843,29094	422,14911	281,76850	841,27584	420,13428	279,75376
5,10-Methylen-tetrahydrofolat-tetraglutamat	C35H44N10O15	845,30604	423,15666	282,44020	843,29149	421,14211	280,42565
5-Methyl-tetrahydrofolat-tetraglutamat	C35H46N10O15	847,32169	424,16448	283,11208	845,30714	422,14993	281,09753
10-Formyl-folsäure-tetraglutamat	C35H40N10O16	857,26966	429,13847	286,42807	855,25510	427,12391	284,41352
5-Formimino-tetrahydrofolat-tetraglutamat	C35H45N11O15	860,31694	430,66211	287,44383	858,30239	428,64756	285,42928
5-Formyl-tetrahydrofolat-tetraglutamat	C35H44N10O16	861,30096	431,15412	287,77184	859,28640	429,13956	285,75728
10-Formyl-dihydrofolat-tetraglutamat	C35H42N10O16	859,28531	430,14629	287,09995	857,27075	428,13174	285,08540
4-Hydroxy-5-methyltetrahydrofolat-tetraglutamat	C35H46N10O16	863,31661	432,16194	288,44372	861,30205	430,14739	286,42917
Folsäure-pentaglutamat	C39H47N11O18	958,31734	479,66231	320,11063	956,30278	477,64775	318,09608
Dihydrofolat-pentaglutamat	C30H49N11O18	852,33299	426,67013	284,78251	850,31843	424,65558	282,76796
Tetrahydrofolat-pentaglutamat	C39H51N11O18	962,34864	481,67796	321,45440	960,33408	479,66340	319,43984
5,10-Methenyl-tetrahydrofolat-pentaglutamat	C40H50N11O18	972,33353	486,67041	324,78270	970,31843	484,65558	322,76796
5,10-Methylen-tetrahydrofolat-pentaglutamat	C40H51N11O18	974,34864	487,67796	325,45440	972,33408	485,66340	323,43984
5-Methyl-tetrahydrofolat-pentaglutamat	C40H53N11O18	976,36429	488,68578	326,12628	974,34973	486,67123	324,11173
10-Formyl-folsäure-pentaglutamat	C40H47N11O19	986,31225	493,65976	329,44227	984,29770	491,64521	327,42771
5-Formimino-tetrahydrofolat-pentaglutamat	C40H52N12O18	989,35953	495,18341	330,45803	987,34498	493,16885	328,44348
5-Formyl-tetrahydrofolat-pentaglutamat	C40H51N11O19	990,34355	495,67541	330,78603	988,32900	493,66086	328,77148

18. Anhang

Vitamer	Summenformel	[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺	[M+3H] ³⁺	[M-H] ⁻	[M-2H] ²⁻	[M-3H] ³⁻
10-Formyl-dihydrofolat-pentaglutamat	C40H49N11O19	988,32790	494,66759	330,11415	986,31335	492,65304	328,09960
4-Hydroxy-5-methyltetrahydrofolat-pentaglutamat	C40H53N11O19	992,35920	496,68324	331,45792	990,34465	494,66869	329,44336
Folsäure-hexaglutamat	C44H54N12O21	1087,35993	544,18360	363,12483	1085,34538	542,16905	361,11027
Dihydrofolat-hexaglutamat	C35H56N12O21	981,37558	491,19143	327,79671	979,36103	489,17688	325,78216
Tetrahydrofolat-hexaglutamat	C44H58N12O21	1091,39123	546,19925	364,46859	1089,37668	544,18470	362,45404
5,10-Methenyl-tetrahydrofolat-hexaglutamat	C45H57N12O21	1101,37613	551,19170	367,79689	1099,36103	549,17688	365,78216
5,10-Methylen-tetrahydrofolat-hexaglutamat	C45H58N12O21	1103,39123	552,19925	368,46859	1101,37668	550,18470	366,45404
5-Methyl-tetrahydrofolat-hexaglutamat	C45H60N12O21	1105,40688	553,20708	369,14048	1103,39233	551,19253	367,12592
10-Formyl-folsäure-hexaglutamat	C45H54N12O22	1115,35484	558,18106	372,45647	1113,34029	556,16651	370,44191
5-Formimino-tetrahydrofolat-hexaglutamat	C45H59N13O21	1118,40213	559,70470	373,47223	1116,38758	557,69015	371,45767
5-Formyl-tetrahydrofolat-hexaglutamat	C45H58N12O22	1119,38614	560,19671	373,80023	1117,37159	558,18216	371,78568
10-Formyl-dihydrofolat-hexaglutamat	C45H56N12O22	1117,37049	559,18889	373,12835	1115,35594	557,17433	371,11380
4-Hydroxy-5-methyltetrahydrofolat-hexaglutamat	C45H60N12O22	1121,40179	561,20454	374,47212	1119,38724	559,18998	372,45756
Folsäure-heptaglutamat	C49H61N13O24	1216,40252	608,70490	406,13903	1214,38797	606,69035	404,12447
Dihydrofolat-heptaglutamat	C40H63N13O24	1110,41817	555,71272	370,81091	1108,40362	553,69817	368,79636
Tetrahydrofolat-heptaglutamat	C49H65N13O24	1220,43382	610,72055	407,48279	1218,41927	608,70600	405,46824
5,10-Methenyl-tetrahydrofolat-heptaglutamat	C50H64N13O24	1230,41872	615,71300	410,81109	1228,40362	613,69817	408,79636
5,10-Methylen-tetrahydrofolat-heptaglutamat	C50H65N13O24	1232,43382	616,72055	411,48279	1230,41927	614,70600	409,46824
5-Methyl-tetrahydrofolat-heptaglutamat	C50H67N13O24	1234,44947	617,72837	412,15468	1232,43492	615,71382	410,14012
10-Formyl-folsäure-heptaglutamat	C50H61N13O25	1244,39744	622,70236	415,47066	1242,38289	620,68780	413,45611
5-Formimino-tetrahydrofolat-heptaglutamat	C50H66N14O24	1247,44472	624,22600	416,48643	1245,43017	622,21145	414,47187
5-Formyl-tetrahydrofolat-heptaglutamat	C50H65N13O25	1248,42874	624,71801	416,81443	1246,41419	622,70345	414,79988
10-Formyl-dihydrofolat-heptaglutamat	C50H63N13O25	1246,41309	623,71018	416,14255	1244,39854	621,69563	414,12799
4-Hydroxy-5-methyltetrahydrofolat-heptaglutamat	C50H67N13O25	1250,44439	625,72583	417,48631	1248,42984	623,71128	415,47176
Folsäure-oktaglutamat	C54H68N14O27	1345,44512	673,22620	449,15322	1343,43056	671,21164	447,13867
Dihydrofolat-oktaglutamat	C45H70N14O27	1239,46077	620,23402	413,82511	1237,44621	618,21947	411,81055

18. Anhang

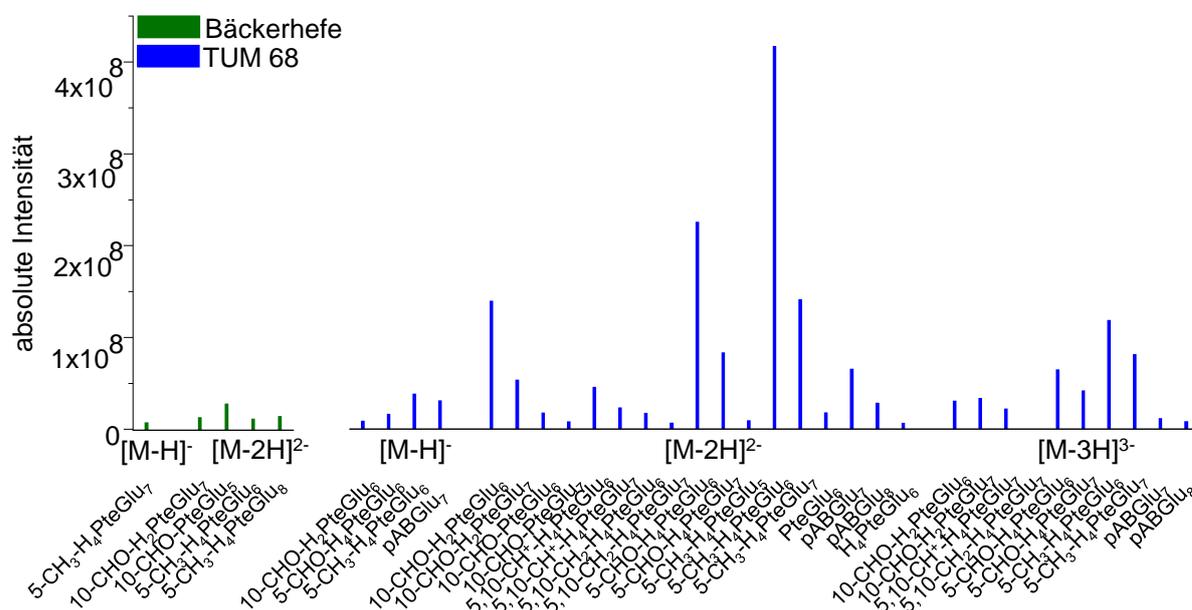
Vitamer	Summenformel	[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺	[M+3H] ³⁺	[M-H] ⁻	[M-2H] ²⁻	[M-3H] ³⁻
Tetrahydrofolat-oktaglutamat	C54H72N14O27	1349,47642	675,24185	450,49699	1347,46186	673,22729	448,48244
5,10-Methenyl-tetrahydrofolat-oktaglutamat	C55H71N14O27	1359,46132	680,23430	453,82529	1357,44621	678,21947	451,81055
5,10-Methylen-tetrahydrofolat-oktaglutamat	C55H72N14O27	1361,47642	681,24185	454,49699	1359,46186	679,22729	452,48244
5-Methyl-tetrahydrofolat-oktaglutamat	C55H74N14O27	1363,49207	682,24967	455,16887	1361,47751	680,23512	453,15432
10-Formyl-folsäure-oktaglutamat	C55H68N14O28	1373,44003	687,22365	458,48486	1371,42548	685,20910	456,47031
5-Formimino-tetrahydrofolat-oktaglutamat	C55H73N15O27	1376,48732	688,74730	459,50062	1374,47276	686,73274	457,48607
5-Formyl-tetrahydrofolat-oktaglutamat	C55H72N14O28	1377,47133	689,23930	459,82863	1375,45678	687,22475	457,81408
10-Formyl-dihydrofolat-oktaglutamat	C55H70N14O28	1375,45568	688,23148	459,15675	1373,44113	686,21693	457,14219
4-Hydroxy-5-methyltetrahydrofolat-oktaglutamat	C55H74N14O28	1379,48698	690,24713	460,50051	1377,47243	688,23258	458,48596
Folsäure-nona-glutamat	C59H75N15O30	1474,48771	737,74749	492,16742	1472,47316	735,73294	490,15287
Dihydrofolat-nonaglutamat	C50H77N15O30	1399,47712	700,24220	467,16389	1366,48881	682,74077	454,82475
Tetrahydrofolat-nonaglutamat	C59H79N15O30	1478,51901	739,76314	493,51119	1476,50446	737,74859	491,49664
5,10-Methenyl-tetrahydrofolat-nonaglutamat	C60H78N15O30	1488,50391	744,75559	496,83949	1486,48881	742,74077	494,82475
5,10-Methylen-tetrahydrofolat-nonaglutamat	C60H79N15O30	1490,51901	745,76314	497,51119	1488,50446	743,74859	495,49664
5-Methyl-tetrahydrofolat-nonaglutamat	C60H81N15O30	1492,53466	746,77097	498,18307	1490,52011	744,75642	496,16852
10-Formyl-folsäure-nonaglutamat	C60H75N15O31	1502,48263	751,74495	501,49906	1500,46807	749,73040	499,48451
5-Formimino-tetrahydrofolat-nonaglutamat	C60H80N16O30	1505,52991	753,26859	502,51482	1503,51536	751,25404	500,50027
5-Formyl-tetrahydrofolat-nonaglutamat	C60H79N15O31	1506,51393	753,76060	502,84283	1504,49937	751,74605	500,82827
10-Formyl-dihydrofolat-nonaglutamat	C60H77N15O31	1504,49828	752,75278	502,17094	1502,48372	750,73822	500,15639
4-Hydroxy-5-methyltetrahydrofolat-nonaglutamat	C60H81N15O31	1508,52958	754,76843	503,51471	1506,51502	752,75387	501,50016
Folsäure-decaglutamat	C64H82N16O33	1603,53031	802,26879	535,18162	1601,51575	800,25424	533,16707
Dihydrofolat-decaglutamat	C55H84N16O33	1528,51972	764,76350	510,17809	1495,53140	747,26206	497,83895
Tetrahydrofolat-decaglutamat	C64H86N16O33	1607,56161	804,28444	536,52539	1605,54705	802,26989	534,51083
5,10-Methenyl-tetrahydrofolat-decaglutamat	C65H85N16O33	1617,54650	809,27689	539,85369	1615,53140	807,26206	537,83895
5,10-Methylen-tetrahydrofolat-decaglutamat	C65H86N16O33	1619,56161	810,28444	540,52539	1617,54705	808,26989	538,51083
5-Methyl-tetrahydrofolat-decaglutamat	C65H88N16O33	1621,57726	811,29227	541,19727	1619,56270	809,27771	539,18272

18. Anhang

Vitamer	Summenformel	[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺	[M+3H] ³⁺	[M-H] ⁻	[M-2H] ²⁻	[M-3H] ³⁻
10-Formyl-folsäure-decaglutamat	C65H82N16O34	1631,52522	816,26625	544,51326	1629,51067	814,25170	542,49870
5-Formimino-tetrahydrofolat-decaglutamat	C65H87N17O33	1634,57250	817,78989	545,52902	1632,55795	815,77534	543,51447
5-Formyl-tetrahydrofolat-decaglutamat	C65H86N16O34	1635,55652	818,28190	545,85702	1633,54197	816,26735	543,84247
10-Formyl-dihydrofolat-decaglutamat	C65H84N16O34	1633,54087	817,27407	545,18514	1631,52632	815,25952	543,17059
4-Hydroxy-5-methyltetrahydrofolat-decaglutamat	C65H88N16O34	1637,57217	819,28972	546,52891	1635,55762	817,27517	544,51435
p-Amino-benzoylglutamat	C7H7NO2	138,05496	69,53112	46,68984	136,04040	67,51656	44,67528
p-Amino-benzoyldiglutamat	C12H14N2O5	267,09755	134,05241	89,70403	265,08300	132,03786	87,68948
p-Amino-benzoyltriglutamat	C17H21N3O8	396,14014	198,57371	132,71823	394,12559	196,55916	130,70368
p-Amino-benzoyltetraglutamat	C22H28N4O11	525,18274	263,09501	175,73243	523,16818	261,08045	173,71788
p-Amino-benzoylpentaglutamat	C27H35N5O14	654,22533	327,61630	218,74663	652,21078	325,60175	216,73208
p-Amino-benzoylhexaglutamat	C32H42N6O17	783,26793	392,13760	261,76083	781,25337	390,12305	259,74627
p-Amino-benzoylheptaglutamat	C37H49N7O20	912,31052	456,65890	304,77502	910,29597	454,64435	302,76047
p-Amino-benzoyloktaglutamat	C42H56N8O23	1041,35311	521,18019	347,78922	1039,33856	519,16564	345,77467
p-Amino-benzoylnonaglutamat	C47H63N9O26	1170,39571	585,70149	390,80342	1168,38115	583,68694	388,78887
Guanosintriphosphat	C10H16N5O14	523,99794	262,50261	175,33750	521,98339	260,48806	173,32295
Guanosinmonophosphat	C10H14N5O8	364,06528	182,53628	122,02661	362,05073	180,52172	120,01206
2,5-Diamino-4-oxo-6-(beta-D-ribofuranosylamino)pyrimidin	C9H18N5O14	514,01359	257,51043	172,00938	511,99904	255,49588	169,99483
7,8-Dihydroneopterintriphosphat	C9H16N5O13	496,00303	248,50515	166,00586	493,98847	246,49060	163,99131
7,8-Dihydroneopterinphosphat	C9H14N5O7	336,07036	168,53882	112,69497	334,05581	166,52427	110,68042
7,8-Dihydroneopterin	C9H13N5O4	256,10403	128,55565	86,03953	254,08948	126,54110	84,02498
6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin	C7H11N5O	182,10364	91,55546	61,37273	180,08908	89,54090	59,35818
Adenosintriphosphat	C10H14N5O7	348,07036	174,53882	116,69497	346,05581	172,52427	114,68042
Adenosinmonophosphat	C10H16N5O13	508,00303	254,50515	170,00586	505,98847	252,49060	167,99131
6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterindiphosphat	C7H11N5O8	356,01557	178,51142	119,34337	354,00101	176,49687	117,32882
Chorismat	C10H10O6	227,05502	114,03115	76,35652	225,04046	112,01659	74,34197
4-Amino-4-deoxychorismat	C10H11NO5	226,07100	113,53914	76,02852	224,05645	111,52459	74,01396
p-Aminobenzoessäure	C7H7NO2	138,05496	69,53112	46,68984	136,04040	67,51656	44,67528
7,8-Dihydropteroinsäure	C14H14N6O3	315,12002	158,06365	105,71152	313,10546	156,04909	103,69697

Vitamer	Summenformel	[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺	[M+3H] ³⁺	[M-H] ⁻	[M-2H] ²⁻	[M-3H] ³⁻
7,8-Dihydrofolat	C19H21N7O6	444,16261	222,58494	148,72572	442,14806	220,57039	146,71117
6-Pyruvoyllylterahydropterin	C9H11N5O3	238,09347	119,55037	80,03601	236,07891	117,53582	78,02145
Tetrahydrobiopterin	C9H15N5O3	242,12477	121,56602	81,37977	240,11021	119,55147	79,36522
Dihydrobiopterin	C9H13N5O3	240,10912	120,55820	80,70789	238,09456	118,54364	78,69334
6-Formyldihydropterin	C7H7N5O2	194,06725	97,53726	65,36060	192,05270	95,52271	63,34605
7,8-Dihydroxanthopterin	C6H7N5O2	182,06725	91,53726	61,36060	180,05270	89,52271	59,34605
7,8-Dihydropterin	C6H7N5O	166,07234	83,53981	56,02896	164,05778	81,52525	54,01441
6-Formyltetrahydropterin	C7H9N5O2	196,08290	98,54509	66,03248	194,06835	96,53054	64,01793
6-Hydroxytetrahydropterin	C6H9N5O2	184,08290	92,54509	62,03248	182,06835	90,53054	60,01793
Dihydroxanthopterin	C6H7N5O2	182,06725	91,53726	61,36060	180,05270	89,52271	59,34605
Xanthopterin	C6H7N5O2	182,06725	91,53726	61,36060	180,05270	89,52271	59,34605
Pterin	C6H5N5O	164,05669	82,53198	55,35708	162,04213	80,51743	53,34253
6-Formylpterin	C7H5N5O2	192,05160	96,52944	64,68872	190,03705	94,51489	62,67417
Carboxypterin	C7H5N5O3	208,04652	104,52690	70,02036	206,03196	102,51234	68,00580
Isoxanthopterin	C6H5N5O2	180,05160	90,52944	60,68872	178,03705	88,51489	58,67417
Hydropterin	C6H9N5O	168,08799	84,54763	56,70085	166,07343	82,53308	54,68629
6-Methylpterin	C7H7N5O	178,07234	89,53981	60,02896	176,05778	87,52525	58,01441

Anhang 18 Absolute Peakintensität von auf Grund ihres Isotopenpatterns verifizierbaren Folatvitameren in Bäckerhefe und TUM 68[®] nach Analyse mittels FT-ICR-MS.

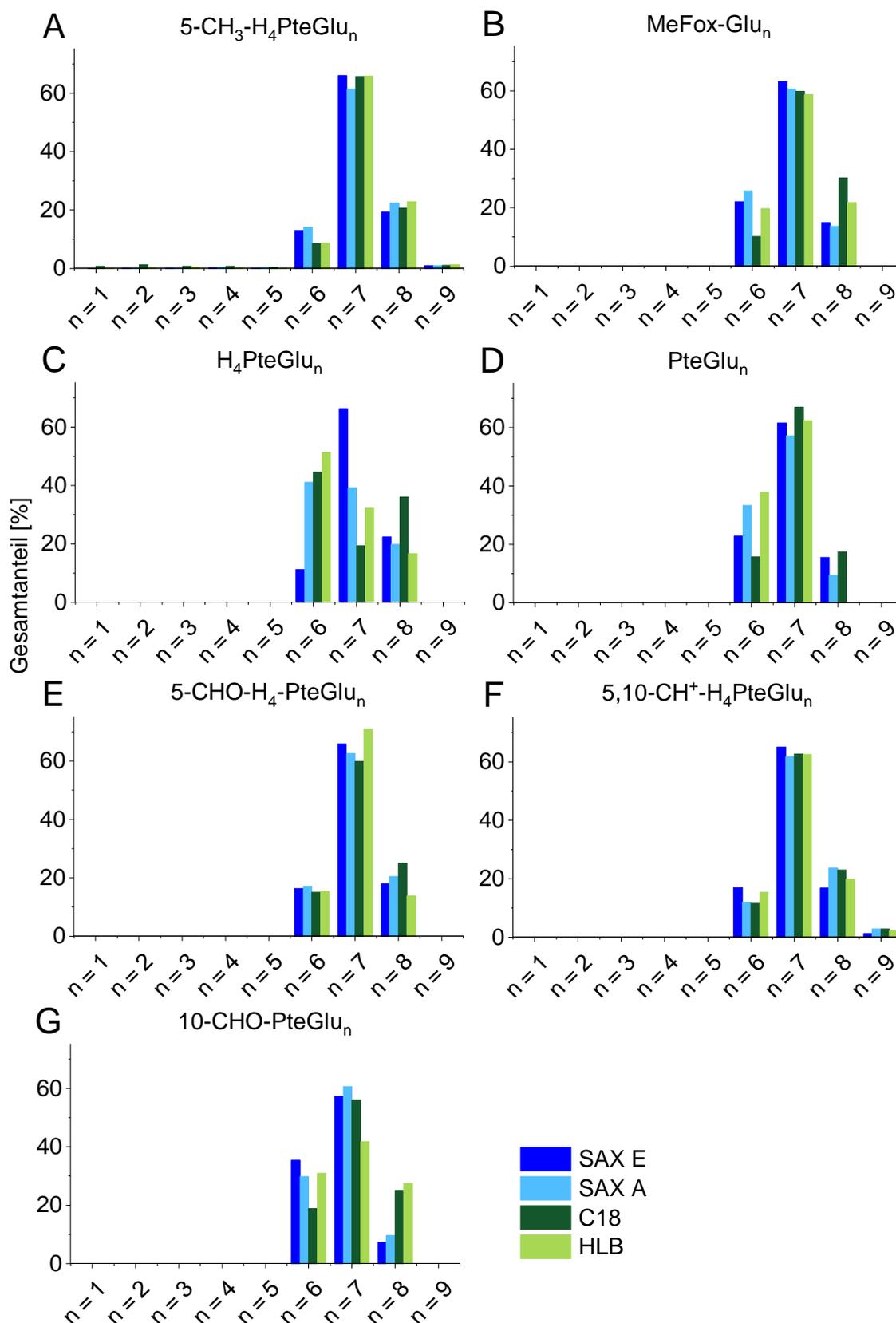


18. Anhang

Anhang 19 Auflistung der identifizierten Metabolitenklassen der 100 diskriminierendsten experimentellen Spezies in Hefen nach Analyse mittels UHPLC-Q-ToF-MS in Abhängigkeit des gewählten Festphasenmaterials zur Aufreinigung.

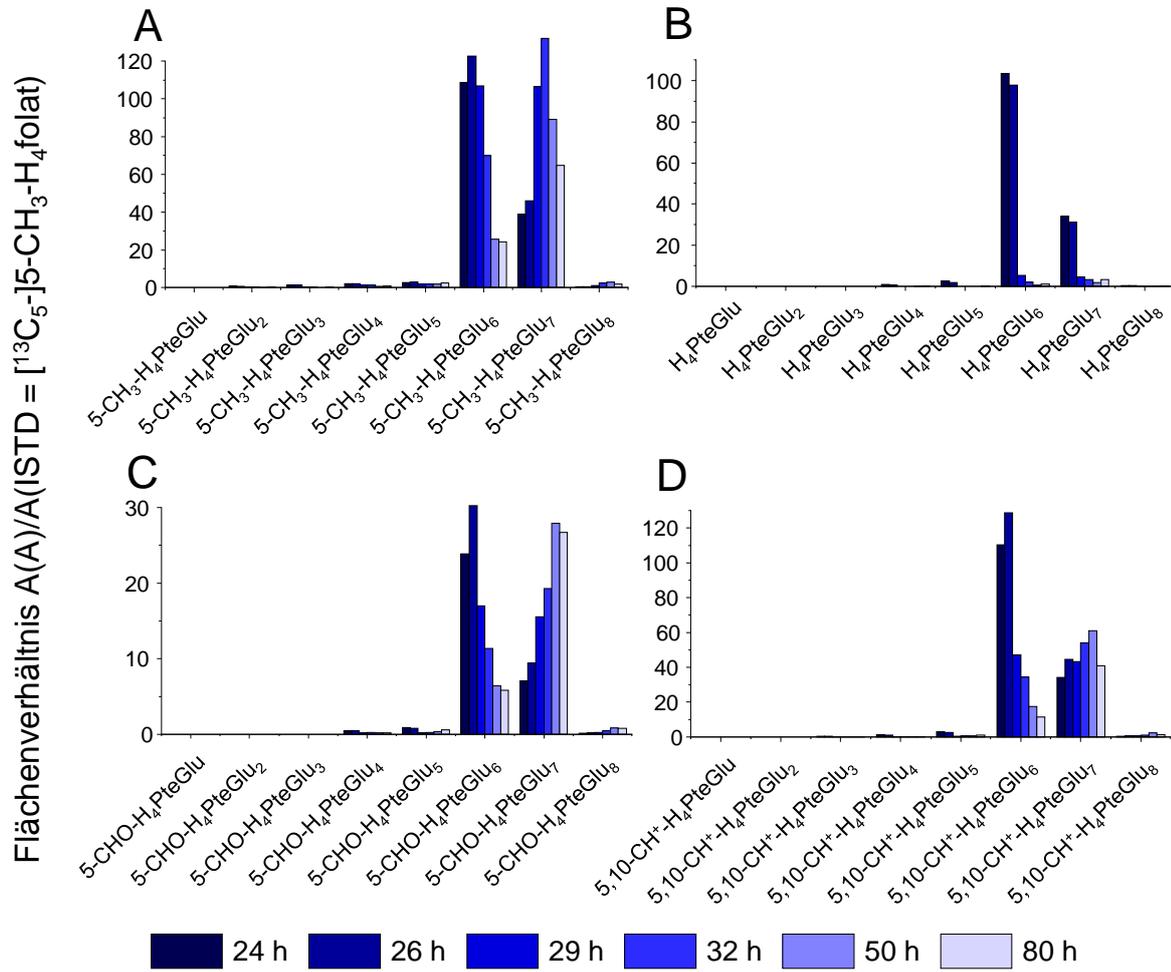
Oberklasse an Metaboliten	Metabolitenklasse	Anzahl an identifizierten zugehörigen Metaboliten in Abhängigkeit des gewählten Festphasenmaterials			
		SAX E	SAX A	HLB	C18
Lipide	Fettacycle	11	17	7	19
	Steroide und Steroidderivate	0	5	0	19
	Glycerophospholipide	0	3	0	21
	Prenollipide	6	10	4	24
	Glycerolipide	0	4	0	8
	Sphingolipide	0	0	0	3
zyklische Verbindungen	Flavonoide	4	21	0	5
	Zimtsäuren und Zimtsäurederivate	0	3	3	7
	Isoflavonoide	0	5	0	3
	Coumarine und Coumarinderivate	0	5	0	3
	Lineare 1,3-Diarylpropanoide	0	7	0	4
	Stilbene	0	0	0	3
	Macrolide und Analoga	0	0	0	6
	Tannine	0	10	0	0
Carboxylsäuren	Carboxylsäuren und Carboxylsäurederivate	14	22	8	20
	Ketonsäuren und Ketonsäurederivate	0	4	3	3
heteroaromatische Verbindungen	Organostickstoffverbindungen	5	4	3	5
	Organosauerstoffverbindungen	6	26	5	18
	Quinoline und Quinolinderivate	0	3	0	7
	Indole und Indolderivate	0	3	0	7
	Piperidine	0	0	0	3
	Pyrrolidine	0	0	0	3
	Benzopyrane	0	0	0	4
	Pyridine und Pyridinderivate	6	7	0	5
	Dihydrofurane	0	5	0	0
	Lactone	0	4	0	0
	Heteroaromatische Verbindungen	0	3	0	0
	Furane	0	3	0	0
	Oxepane	0	3	0	0
	Tetrapyrrole und Tetrapyrrolderivate	0	3	0	0
	Azole	0	2	0	0
	Imidazopyrimidine	0	3	3	0
	Diazanaphthalene	3	0	0	0
	Diazine	3	0	0	3
	(3'->5')-Dinukleotide und Analoga	0	5	0	0
	Pyrimidinnukleotide	0	3	0	0
	Purinnukleotide	0	11	0	0
	Phenole	6	4	3	5
	Phenoether	0	0	3	3
Phenanthrene und Derivate	0	0	3	0	
Organoschwefelhaltige Verbindungen	Organische Disulfide	3	0	0	0
	Organische Trisulfide	3	0	0	0
	Thioether	3	0	0	0
	Organische Sulfonsäuren und Sulfonsäurederivate	6	0	0	0

Anhang 20 Prozentuale Verteilung der Polyglutamate in Bäckerhefe identifiziert an Hand des Verhältnisses $A(A)/A(ISTD = [^{13}C_5]-5-CH_3-H_4\text{folat}$ nach Aufreinigung des Probenextraktes mittels verschiedener Festphasenmaterialien und Analyse mittels UHPLC-Q-ToF-MS.

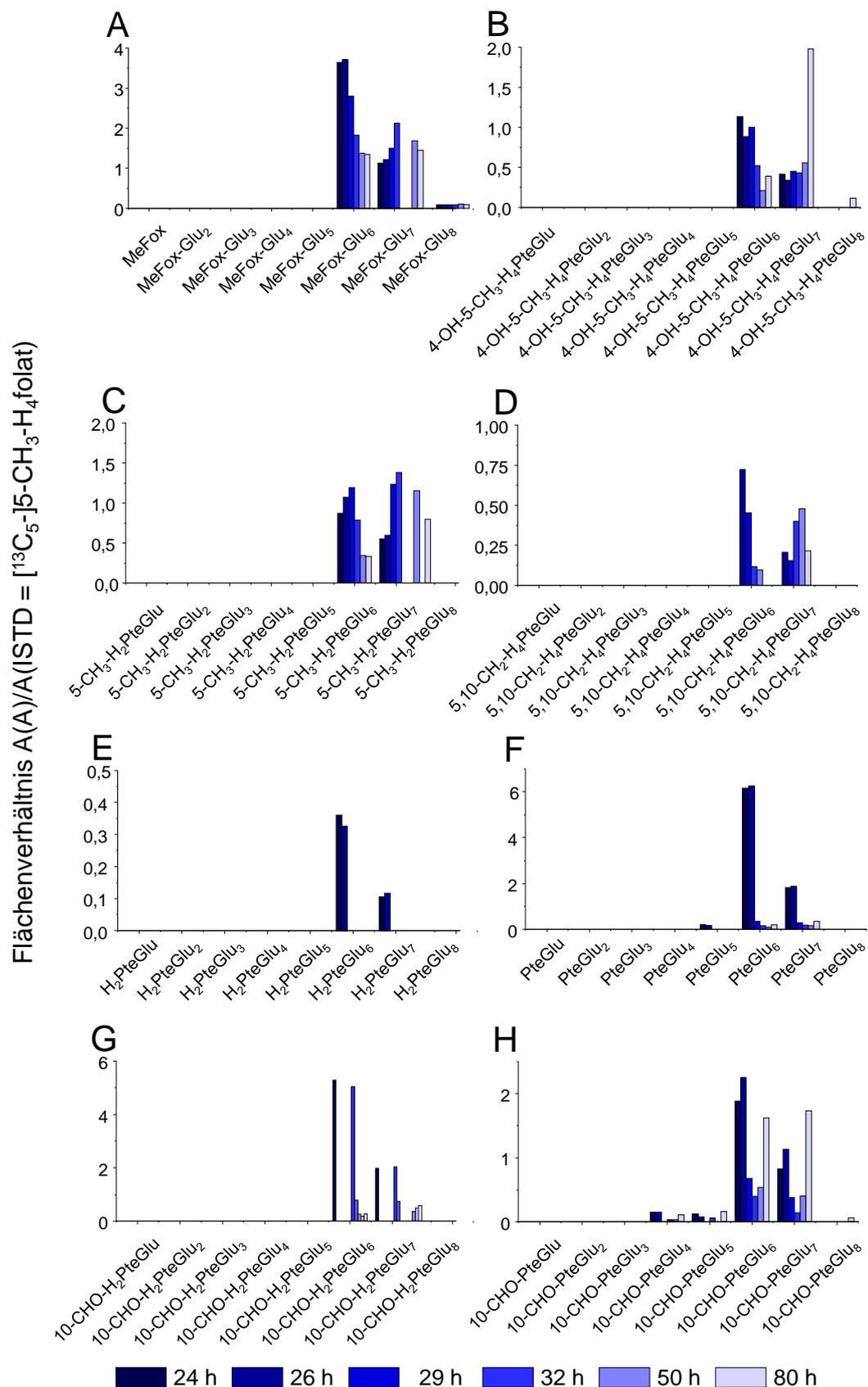


18. Anhang

Anhang 21 Flächenverhältnisse der metabolisch aktiven Polyglutamatvitamere im Verhältnis zum zugesetzten internen Standard [$^{13}\text{C}_5$]-5- CH_3 - H_4 folat im zeitlichen Kultivierungsverlauf von TUM 68[®] nach Analyse mittels UHPLC-Q-ToF-MS.

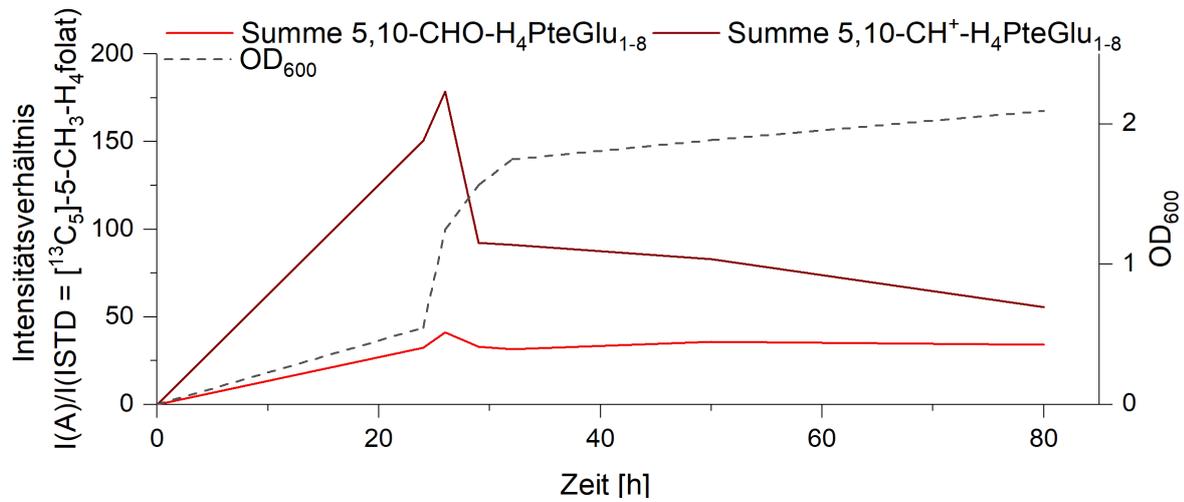


Anhang 22 Flächenverhältnisse der metabolisch inaktiven Polyglutamatvitamere im Verhältnis zum zugesetzten internen Standard [$^{13}\text{C}_5$]-5- CH_3 - H_4 folat im zeitlichen Kultivierungsverlauf von TUM 68[®] nach Analyse mittels UHPLC-Q-ToF-MS.

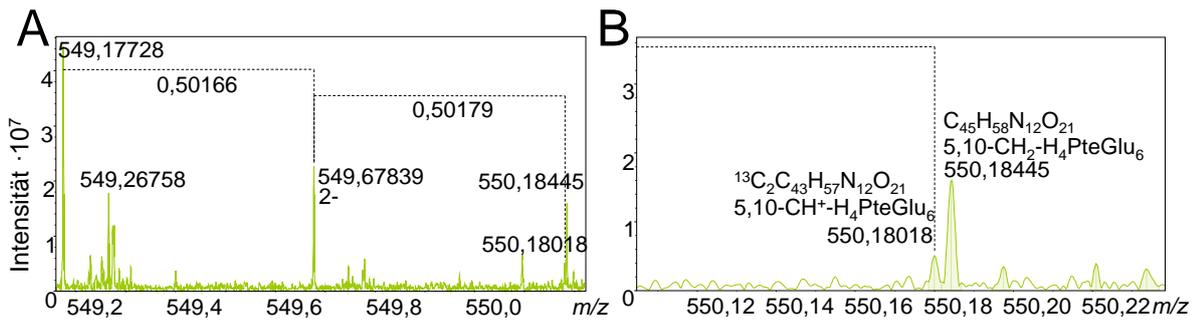


18. Anhang

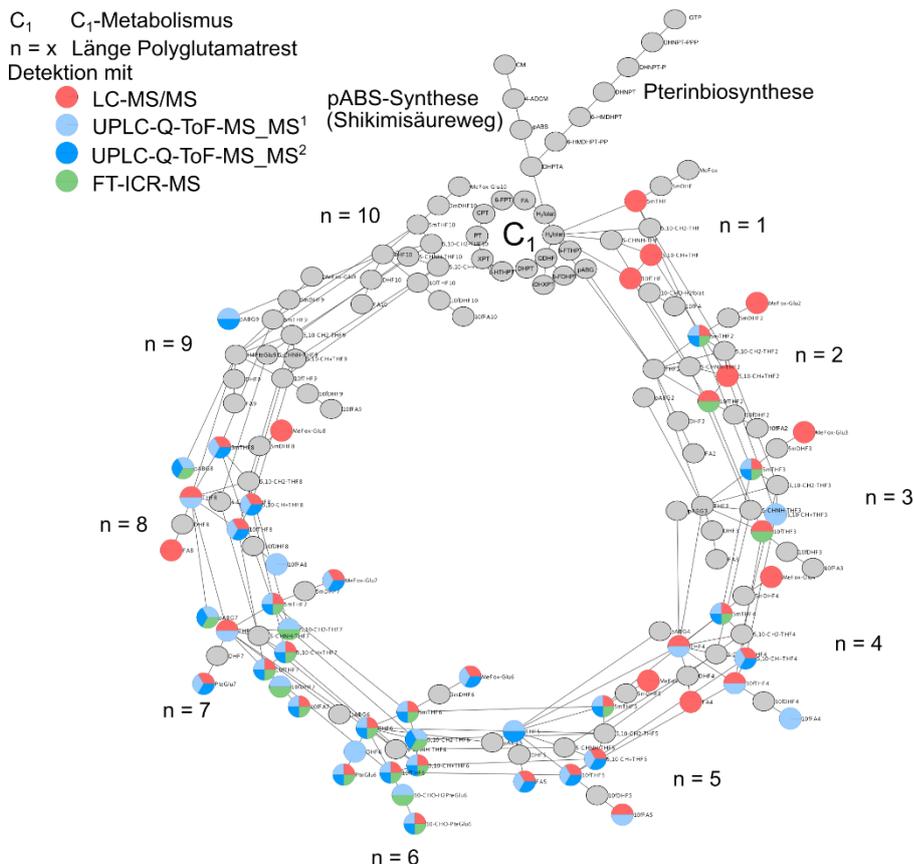
Anhang 23 Summe der Flächenverhältnisse der Formylvitamere 5-CHO-H₄PteGlu₁₋₈ sowie 5,10-CH⁺-H₄PteGlu₁₋₈ im Verhältnis zum zugesetzten internen Standard [¹³C₅]-5-CH₃-H₄folat nach Analyse mittels UHPLC-Q-ToF-MS.



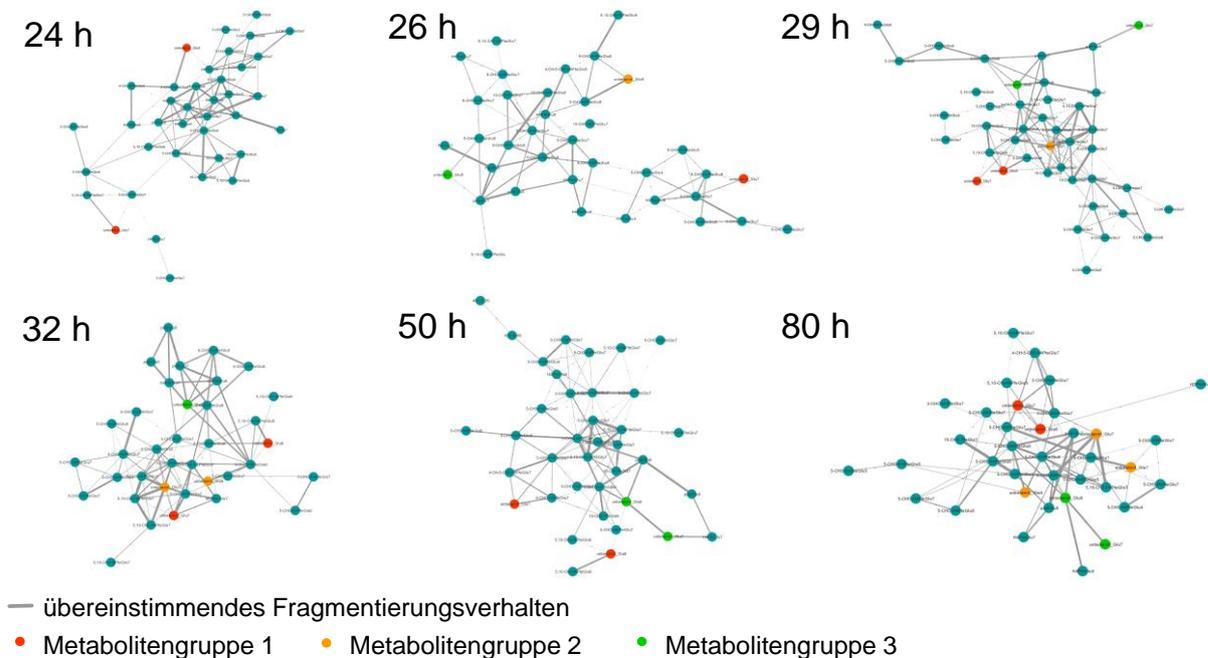
Anhang 24 Ausschnitt des Massenspektrums der gemessenen TUM 68[®] nach 26 h Kultivierung mit (A) 5,10-CH⁺-H₄PteGlu₆ mit dem identifizierbaren Isotopenpattern und (B) Trennung zwischen dem 2. Isotopenpeak von 5,10-CH⁺-H₄PteGlu₆ und 5,10-CH₂-H₄PteGlu₆ durch die Ultrahochoflösung.



Anhang 25 Darstellung der Folatbiosynthese bis zu den Decaglutamaten mit Kennzeichnung der mit verschiedenen MS-Methoden detektierbarer Vitamere in der untersuchten TUM 68®.

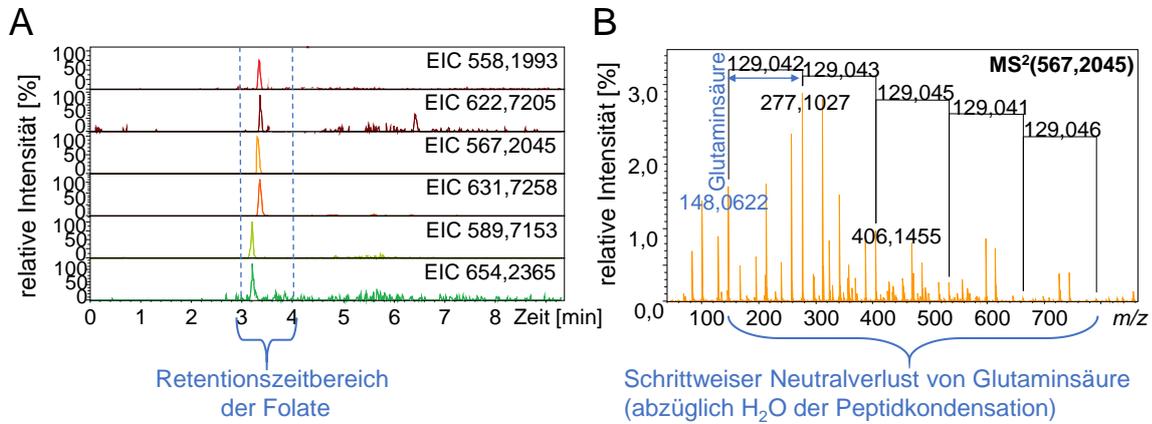


Anhang 26 Mittels GNPS generierte Metabolitennetzwerke der untersuchten TUM 68® und deren Prozessierung.

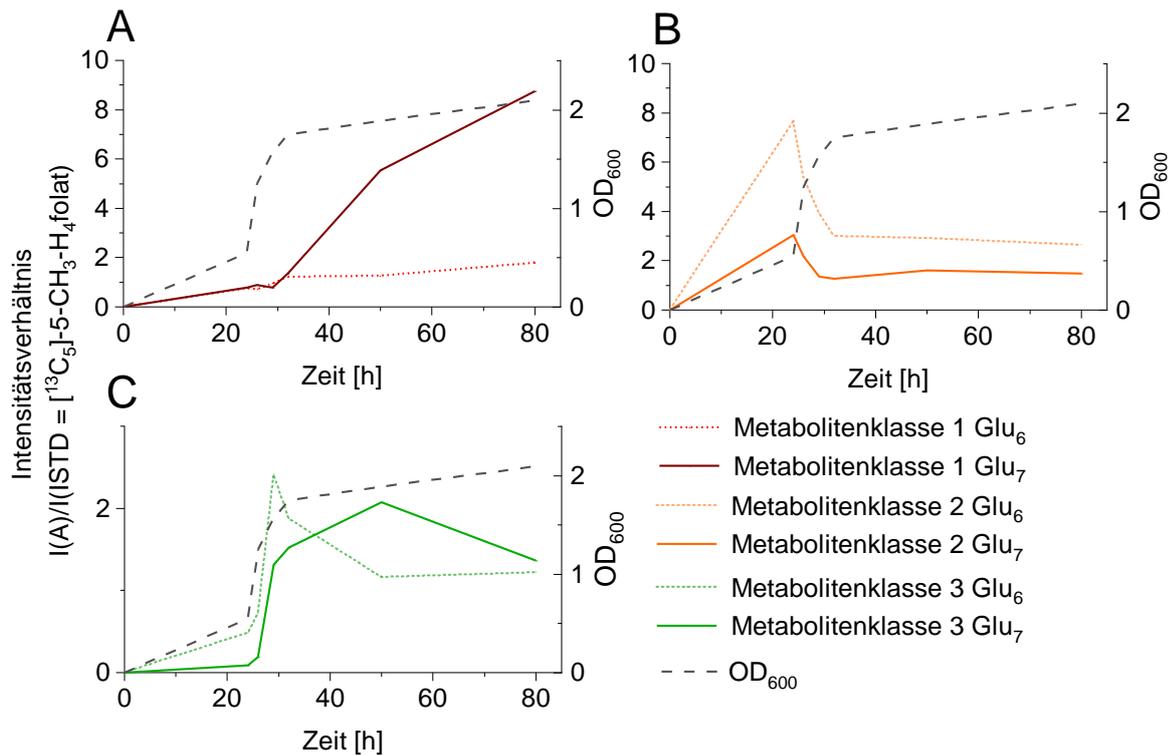


18. Anhang

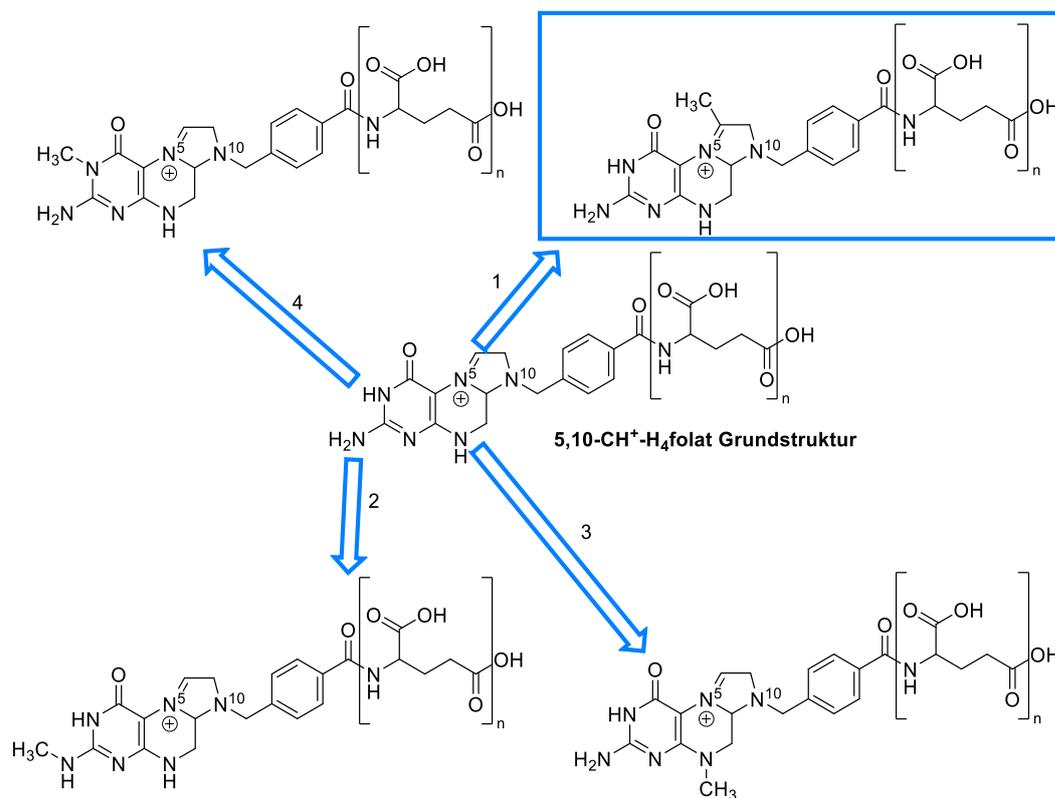
Anhang 27 Chromatogramme der sich ähnlich zu den Folaten verhaltenden Metaboliten in kultivierter TUM 68®.
 (A) EIC der Metaboliten.
 (B) Fragmentierungsspektrum des Vorläuferions m/z 567,2045 unter Markierung des schrittweisen Neutralverlustes einer Glutaminsäureeinheit.



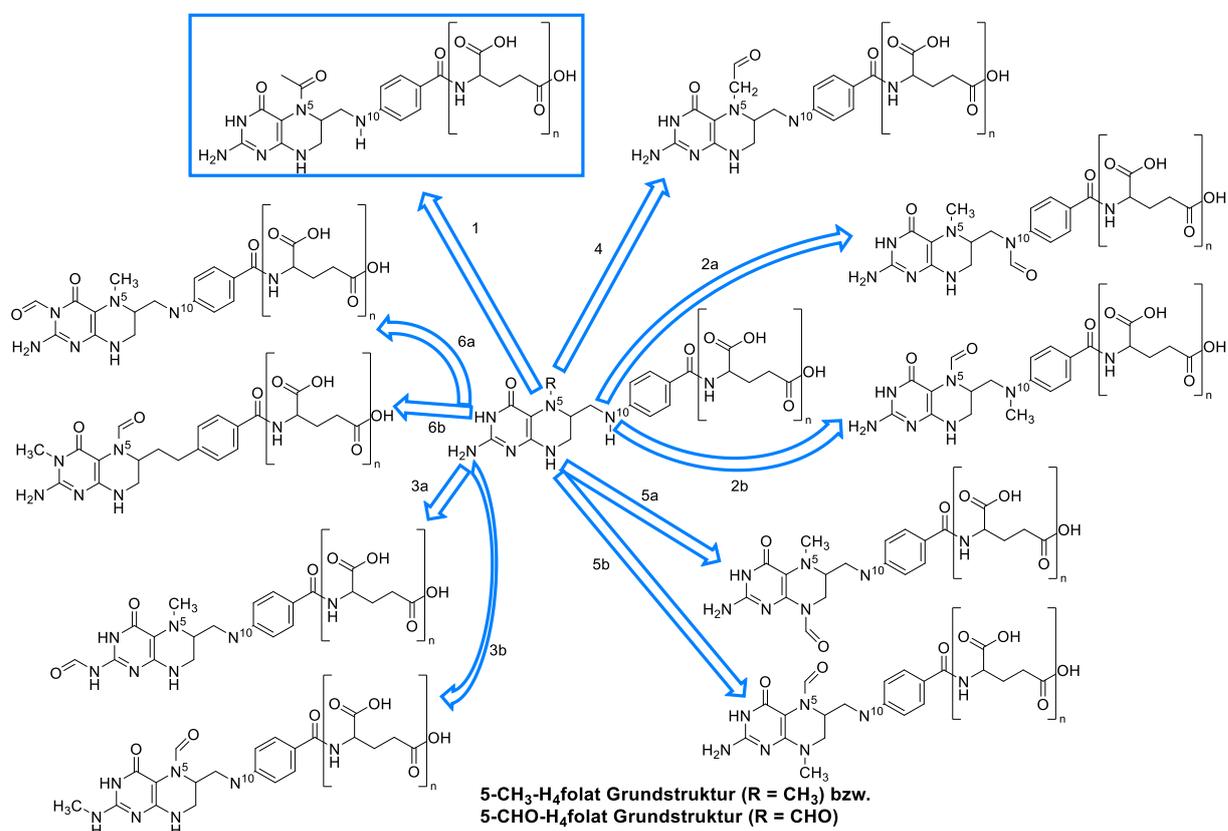
Anhang 28 Verlauf der folatähnlichen Metabolitenklassen 1-3 im zeitlichen Verlauf der Hefekultivierung als Hexa- und Heptaglutamat.



Anhang 29 Strukturformelvorschläge für die Metabolitenklasse 1 basierend auf der 5,10-CH⁺-H₄folat Grundstruktur unter Hervorhebung des plausibelsten Vorschlages.

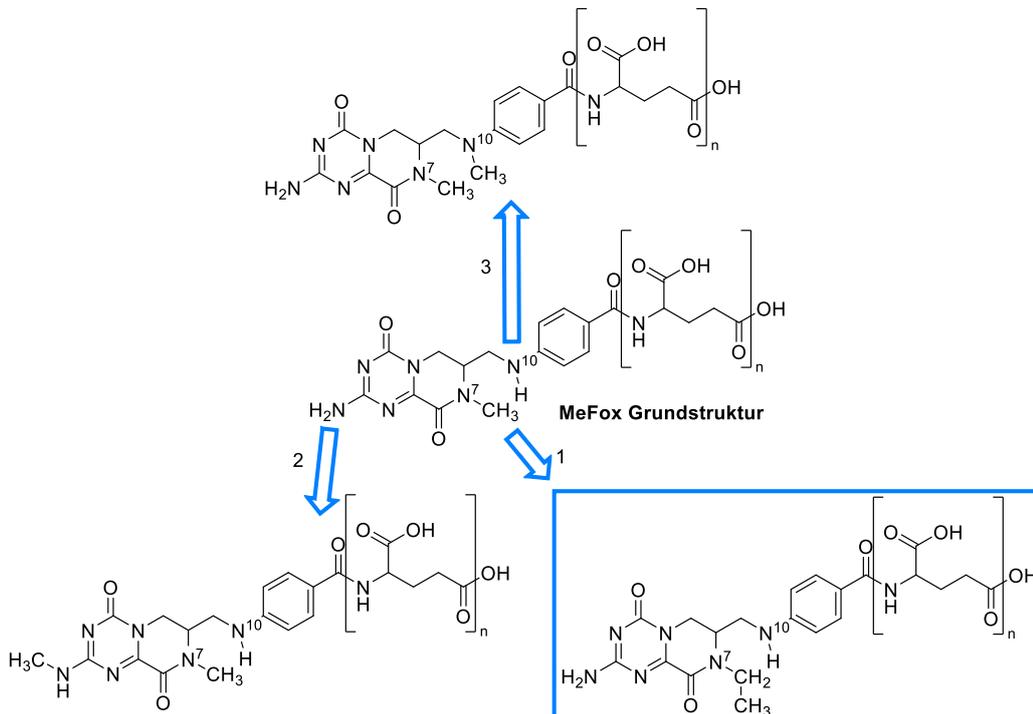


Anhang 30 Strukturformelvorschläge für die Metabolitenklasse 2 basierend auf der 5-CH₃-H₄folat bzw. 5-CHO-H₄folat Grundstruktur unter Hervorhebung des plausibelsten Vorschlages.



18. Anhang

Anhang 31 Strukturformelvorschläge für die Metabolitenklasse 2 basierend auf der MeFox Grundstruktur unter Hervorhebung des plausibelsten Vorschlages.



Anhang 32 Strukturformelvorschläge für die Metabolitenklasse 3 basierend auf der H₄folat Grundstruktur unter Hervorhebung des plausibelsten Vorschlages.

