

***Cannabis sativa* L.:**
Aufreinigung eines Phytat-abbauenden Enzyms und
Untersuchungen zum Metabolismus von Inositolpolyphosphaten

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
***doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)**



Bergische Universität Wuppertal
Fachbereich C – Mathematik und Naturwissenschaften
Physiologische Chemie der Pflanzen / Organische Chemie

vorgelegt von
Dipl. Biol. Tim Malolepszy

Wuppertal
Oktober 2010

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20101217-100223-3

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20101217-100223-3>]

Inhalt

•	Inhaltsverzeichnis	I
•	Abkürzungsverzeichnis	IV
•	Abbildungsverzeichnis	VI
•	Tabellenverzeichnis	VII
•	Zusammenfassung	VIII
•	Summary	IX
1.	Einleitung	1
1.1	Inositolphosphate	1
1.1.1	Allgemeine Einführung zu Inositol und Inositolphosphaten	1
1.1.2	Metabolismus von Inositolhexakisphosphat	4
1.1.3	Phytasen – Enzyme des Inositolphosphatabbaus	10
1.1.4	Biologische Funktionen der Inositolphosphate	13
1.1.5	Inositolphosphate in der Landwirtschaft	16
1.2	<i>Cannabis sativa</i> L. - Hanf	18
1.2.1	Systematische Einordnung und Habitus	18
1.2.2	Hanf als Nutzpflanze	20
1.3	Zielsetzung	21
2.	Material und Methoden	22
2.1	Verzeichnis verwendeter Geräte und Verbrauchsmaterialien	22
2.1.1	Geräte	22
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	23
2.2	Feinchemikalien	24
2.3	Organismen	25
2.3.1	Pflanzematerial	25
2.4	Anzucht des biologischen Materials	25
2.4.1	Medien	25
2.4.2	Pflanzenanzucht	25
2.4.3	Anlage von Gewebekalluskulturen	25
2.4.4	Suspensionskulturen	25
2.4.5	Behandlung der Suspensionskulturen	26
2.4.6	Kultivierung und Ernte von <i>Dictyostelium discoideum</i>	26

2.5	Proteinanalytik	27
2.5.1	Bestimmung des Proteingehalts	27
2.5.2	Chloroform-Methanol-Fällung	27
2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.5.4	Coomassiefärbung von Proteinen	27
2.6	Enzymtests	28
2.6.1	Aktivitätsnachweis für saure Phosphatasen	28
2.6.2	Aktivitätsnachweis für Phosphohydrolasen	28
2.7	Aufreinigung eines Phytat-abbauenden Enzyms	29
2.7.1	Aufschluss des Pflanzenmaterials	29
2.7.2	(NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung	29
2.7.3	Biochromatographie	29
2.7.3.1	Hydrophobe Interaktionschromatographie	29
2.7.3.2	Lektinchromatographie	30
2.7.3.3	Affinitätschromatographie an Heparin-Agarose	30
2.7.3.4	Größenausschlusschromatographie	30
2.8	HPLC-MDD-Analytik	31
2.8.1	Präparation des Pflanzenmaterials	31
2.8.2	Analytik der Inositolphosphate mittels HPLC-MDD	31
2.8.2.1	HPLC-MDD – Messprinzip und Aufbau	31
2.8.2.2	Elution mit einem pH- und Chlorid-Gradienten (HCl-System)	33
2.8.2.3	Identifizierung der Inositolphosphatisomere und Herkunft der Referenzsubstanzen	33
2.8.2.4	Bestimmung der Stereochemie von Inositolphosphaten	33
3.	Ergebnisse	34
3.1	Untersuchungen zum Metabolismus von Inositolpolyphosphaten in Pflanzen	34
3.1.1	Quantifizierung von Inositolpentakis- und Inositolhexakisphosphat in ausgewählten Zellkulturen	34
3.1.2	Untersuchung des zeitabhängigen Metabolismus von Inositolphosphaten in Suspensionskulturen in <i>Cannabis sativa</i> L.	36
3.1.3	Identifizierung des dominanten Inositolpentakisphosphats in ausgewählten Cannabaceae	42

3.1.4	Einfluss des abiotischen Faktors Licht auf den endogenen Gehalt von Inositolpolyphosphaten in Keimlingen von <i>Cannabis sativa</i> L.	45
3.1.5	Organspezifische Veränderungen der Gehalte von Inositolpolyphosphaten in ausgewählten Pflanzen	47
3.2	Aufreinigung eines Phytat-abbauenden Enzyms aus Kotyledonen von <i>Cannabis sativa</i> L.	53
3.2.1	Bestimmung des idealen Erntezeitpunkts zur Enzymgewinnung	53
3.2.2	Chromatographische Aufreinigung eines Phytat-abbauenden Enzyms	55
3.2.3	Charakterisierung des Phytat-abbauenden Enzyms	58
4.	Diskussion	61
4.1	Metabolismus der Inositolpolyphosphate in <i>Cannabis sativa</i>	61
4.2	Lichtabhängige Mobilisierung von Inositolphosphaten in Keimlingen von <i>Cannabis sativa</i>	71
4.3	Aufreinigung eines Phytat-abbauenden Enzyms aus Kotyledonen von <i>Cannabis sativa</i>	75
5.	Literaturverzeichnis	87

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5´-diphosphat
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
Bis-Tris	Bis-(2-hydroxyethyl)-amino-tris-(hydroxymethyl)-methan
BSA	Rinderserumalbumin
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fg	Frischgewicht
HAP	Histidin-Saure Phosphatase
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
InsP	Inositolphosphat
InsP ₆	Inositolhexakisphosphat
MDD	Metall-Indikator-Detektion (metal-dye-detection)
PAP	Purpur-Saure Phosphatase
p.A.	„pro analysis“
pH	Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration in mol/l
PLC	Phospholipase C
PtdIns	Phosphatidylinositol
SDS	Natriumdodecylsulfat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	„unit“, Einheit der enzymatischen Aktivität; 1 U = µmol/min
Upm	Umdrehung pro Minute
(v/v)	Volumen bezogen auf Gesamtvolumen
(w/v)	Masse bezogen auf Gesamtvolumen

Erläuterungen zu den definierten Entwicklungsphasen von *Cannabis sativa*

- Phase I** Primärwurzel ausgebildet; Spross und Kotyledonen in Samenschale
- Phase II** Primärwurzel ausgebildet; Kotyledonen in Samenschale; Spross bis 1,5 cm lang
- Phase III** wie Phase II, Spross jedoch über 1,5 cm lang
- Phase IV** wie Phase III; Kotyledonen voll entwickelt
- Phase V** wie Phase IV; zusätzlich Primärblätter ausgebildet
- Phase VI** wie Phase V; zusätzlich erstes Laubblattpaar ausgebildet
- Phase VII** wie Phase VI; insgesamt zwei Paar Laubblätter und Triebspitze vorhanden
- Phase VIII** wie Phase VII; insgesamt sechs Laubblattpaare und Triebspitze ausgebildet
- Phase IX** wie Phase VIII; insgesamt neun Laubblattpaare und Triebspitze ausgebildet; keine Keim- und Primärblätter vorhanden

Begriffserklärungen

- Triebspitze:** Apikalmeristem mit den neu gebildeten Blattpaaren sowie das anschließende Internodium
- Primärblätter:** erstes gebildetes Blattpaar nach den Kotyledonen, wurde hier nicht als erstes Laubblattpaar gezählt, da sie relativ schnell abgeworfen wurden

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1 : Isomere des Inositols
- Abb. 1.2 : Räumliche und planare Darstellung von *myo*-Inositol
- Abb. 1.3 : Biosynthese von Inositolhexakisphosphat
- Abb. 1.4 : Dephosphorylierung von Inositolhexakisphosphat durch unterschiedliche Phytat-abbauende Enzyme
- Abb. 2.1 : Schematischer Aufbau der HPLC-MDD-Anlage
- Abb. 3.1 : Nachweis verschiedener Inositolphosphate in Zellen von *Cannabis sativa* aus Suspensionskultur
- Abb. 3.2 : Entwicklung der Gehalte an Inositolpolyphosphaten in Suspensionskulturen von *Cannabis sativa* in unterschiedlichen Medien
- Abb. 3.3 : Gehalte an Inositolpentakis- und Inositolhexakisphosphat in Medien mit unterschiedlichen Konzentrationen an Inositolhexakisphosphat in *Cannabis sativa*
- Abb. 3.4 : Inositolphosphate in Jungpflanzen von *Humulus japonicus*
- Abb. 3.5 : Abbau von isolierten Inositolpentakisphosphaten verschiedener Pflanzen zur Bestimmung der absoluten Konfiguration
- Abb. 3.6 : Vergleichende Darstellung der Gehalte an Inositolphosphaten in oberirdischen Organen von *Cannabis sativa*
- Abb. 3.7 : Schematische Darstellung der Gehalte an Inositolpolyphosphaten in *Cannabis sativa* in verschiedenen Entwicklungsphasen
- Abb. 3.8 : Verteilung der Inositolpolyphosphate in subadulten Pflanzen von *Cannabis sativa*
- Abb. 3.9 : Inositolpolyphosphate in ausgewählten Organen von *Humulus japonicus*
- Abb. 3.10 : Untersuchung der organspezifischen Phytaseaktivität in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand der Keimlinge von *Cannabis sativa*
- Abb. 3.11 : Aufreinigung eines Phytat-abbauenden Enzyms aus Kotyledonen von *Cannabis sativa*
- Abb. 3.12 : Größendeterminierung des Phytat-abbauenden Enzyms aus *Cannabis sativa*

- Abb. 3.13 : Temperaturabhängigkeit des isolierten Enzyms aus *Cannabis sativa*
- Abb. 3.14 : pH-Abhängigkeit des isolierten Enzyms aus *Cannabis sativa*
- Abb. 3.15 : Graphische Bestimmung der kinetischen Parameter des Phytat-abbauenden Enzyms aus *Cannabis sativa*

Tabellenverzeichnis

- Tab. 3.1 : Gehalte der Inositolpentakis- und Inositolhexakisphosphate in ausgewählten Zellkulturen
- Tab. 3.2 : Lichtabhängige Mobilisierung der Inositolpolyphosphate in Keimlingen von *Cannabis sativa*
- Tab. 3.3 : Aufreinigung eines Phytat-abbauenden Enzyms aus Kotyledonen von *Cannabis sativa*

Zusammenfassung

Inositolphosphate sind wichtige Komponenten der pflanzlichen Signaltransduktion. Sie fungieren in der Zelle zusätzlich als Antioxidanz und Speichersubstanz. Das mengenmäßig häufigste Inositolphosphat stellt Inositolhexakisphosphat (InsP_6) dar. Im Samen ist es das häufigste Inositolphosphat und dient als Phosphat- und Mineralienspeicher. Bei der Untersuchung verschiedener Suspensionskulturen zeigte sich durchweg ein Grundniveau an freiem InsP_6 in den Zellen. InsP_5 war entweder nicht oder nur in sehr geringen Mengen nachweisbar. Lediglich in Zellen von *Cannabis sativa* lag der Gehalt an InsP_5 deutlich höher als die nachgewiesene Menge an InsP_6 . Diese Beobachtung konnte an Jungpflanzen von *Cannabis sativa*, *Humulus lupulus* und *H. japonicus* bestätigt werden. Auch hier fand sich ein deutlich erhöhter Gehalt an InsP_5 , wobei jeweils nur ein Isomer nachgewiesen werden konnte. Die unabhängige Identifizierung der Isomere ergab, dass es sich in allen drei Fällen um D- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ handelte. Nach den gängigen Ansichten in der Literatur handelt es sich bei diesem Isomer wohl um ein Abbauprodukt von InsP_6 in den Cannabaceae. Möglicherweise fungiert es als metabolische Drehscheibe, um benötigte Isomere schnell bereitstellen zu können. In Vertretern der Cannabaceae zeigte sich eine vom Apikalmeristem ausgehende Abnahme des Gesamtgehalts an Inositolpolyphosphaten. Darüber hinaus konnte zwischen $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ und InsP_6 ein charakteristisches Verhältnis in Abhängigkeit vom Differenzierungsstand des jeweiligen Gewebes beobachtet werden. In jungen Organen liegt der Gehalt an InsP_6 erheblich höher, während sich das Verhältnis in ausdifferenzierten Geweben zu Gunsten von $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ verschiebt. InsP_6 scheint also mit Wachstum und Differenzierung der Pflanzenorgane verknüpft zu sein. Das Auftreten eines neuen InsP_5 , nämlich $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$, deutet auf einen bisher unbekanntem Abbauweg hin. Wichtige Enzyme des Metabolismus der Inositolphosphate sind Phytasen. Diese spezielle Gruppe der Phosphatasen katalysieren den Abbau von InsP_6 durch sukzessive Hydrolyse der Phosphatgruppen. Aus den Keimblättern von *Cannabis sativa* konnte ein Enzym aufgereinigt werden, dass viele Charakteristika einer typischen Phytase zeigt. Das monomere Protein von 45 kDa Größe zeigte ein pH-Optimum von 5,0 sowie ein Temperaturoptimum zwischen 30 und 40 °C. Die Affinität zu InsP_6 war mit einem K_m -Wert von 9,36 μM im Vergleich mit anderen bekannten Phytasen sehr hoch. Spezifische Inhibitortests zeigen, dass es sich bei dem isolierten Enzym um eine Histidin-Saure Phosphatase handelt.

Summary

Inositol phosphates are important components in plant signaling. They also function in the cell as a storage compound and as antioxidants. The most common inositol phosphate is inositol hexakisphosphate (InsP₆). In seeds it is the predominant inositol phosphate and serves mainly for the storage of phosphate and minerals. In the examination of suspension-cultured cells of different species InsP₆ was always, to some extent, detectable. In contrast, InsP₅ which was not detectable or only in low amounts. Only the cells of *Cannabis sativa* showed a significantly higher level of InsP₅ which was many times higher than the detected amounts of InsP₆. This observation was verified by analysis of plants from *Cannabis sativa*, *Humulus lupulus* and *H. japonicus*. These plants showed a much higher level of InsP₅ of which, as in cell cultures only one isomere was detected. The independent identification of the three isomeres showed that all of them were the D-Ins(2,3,4,5,6)P₅. According to most common opinion in the literature this isomere is probably a degradation product of InsP₆ in the Cannabaceae. It may function as a metabolic hub and enables the cell to build required signal compounds rapidly. In growing plants there is a reduction of the concentration inositol polyphosphates from the apical meristem downwards to the roots. The concentration decrease topdown. Furthermore there was a characteristic ratio between Ins(2,3,4,5,6)P₅ und InsP₆ depending on the grade of differentiation of the tissue. In young organs the level of InsP₆ was distinct higher while in fully differentiated tissues the level of Ins(2,3,4,5,6)P₅ was higher. There seems to be a connection between the growth and differentiation and the level of InsP₆ in the cells of plants. The occurrence of Ins(2,3,4,5,6)P₅ indicates a previously unknown degradation pathway of InsP₆ in Cannabaceae.

Phytases are important enzymes in the metabolism of inositol phosphates. They are a special group of phosphatases that catalyse the degradation of InsP₆ by successive hydrolysis of the phosphate groups. From the cotyledones of *Cannabis sativa* an enzyme was isolated that shows many characteristics of a typical phytase. The monomeric enzyme has a size of 45 kDa. The pH-optimum is about 5,0 and the ideal temperature for degradation was determined between 30 and 40 °C. It showed a very high affinity to InsP₆ compared with other phytases indicated by a K_m-value of 9,36 µM. Tests with specific inhibitors suggest that the isolated enzyme belongs to the large group of histidin acid phosphatases.

1. Einleitung

1.1 Inositolphosphate

1.1.1 Allgemeine Einführung zu Inositol und Inositolphosphaten

Inositole sind Hexahydroxycyclohexane und werden der Gruppe der Cyclitole zugeordnet. Entdeckt wurden Inositole bereits 1850, als sie erstmalig aus dem menschlichen Herzmuskel isoliert wurden. Inositol besitzt neun Stereoisomere von denen sieben optisch inaktive *meso*-Verbindungen darstellen (siehe Abb. 1) [Billington, 1993].

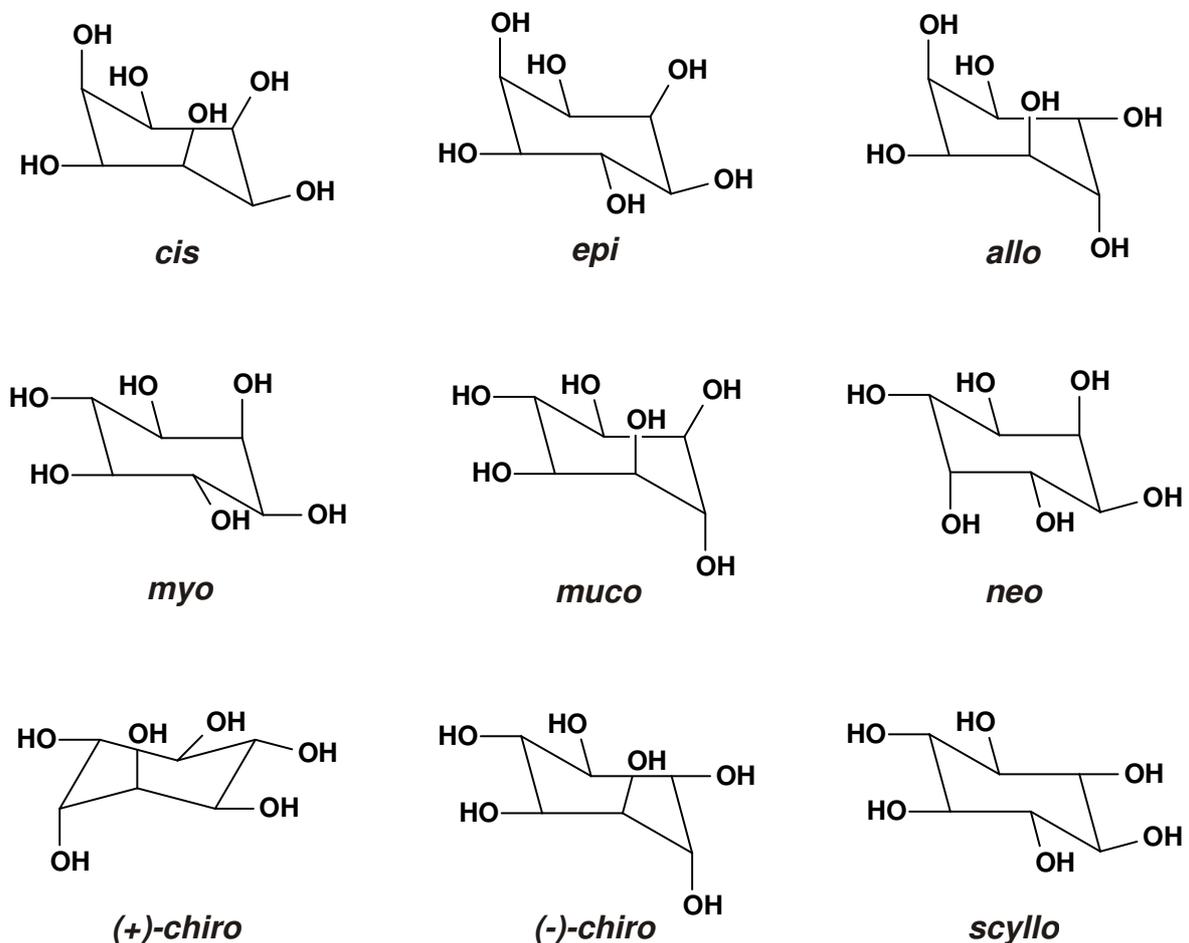


Abb. 1.1: Isomere des Inositols

Die Abbildung zeigt die neun vorkommenden Isomere des Inositols. Zu sehen sind die sieben optisch inaktiven *meso*-Verbindungen (*allo*, *cis*, *epi*, *muco*, *myo*, *neo* und *scyllo*), als auch das Enantiomerenpaar aus (+)- und (-)-*chiro* [Darstellung nach Billington, 1993].

Mit Ausnahme von *cis*-, *epi*- und *allo*-Inositol kommen alle Stereoisomere auch in der Natur vor [Mayr, 1987]. Das häufigste Isomer in allen untersuchten Organismen stellt das *myo*-Inositol dar [Cosgrove, 1980]. Ihm kommt eine besondere Stellung zu, da es

als einziges Stereoisomer *de novo* aus D-Glucose-6-phosphat synthetisiert werden kann. Alle übrigen in der Natur vorkommenden Inositole werden durch Umwandlung aus *myo*-Inositol aufgebaut (siehe Abb. 1.1) [Loewus 1990b; Loewus & Murthy, 2000]. Da es sich bei *myo*-Inositol um das ubiquitäre Inositol handelt, wird in der Folge, wenn nicht explizit erwähnt, ausschließlich von diesem Inositol-Isomer die Rede sein.

myo-Inositol zeichnet sich durch eine einzelne axiale Hydroxylgruppe an der Position 2 (nach IUPAC-Konvention) und fünf äquatoriale Hydroxylgruppen aus. In Abbildung 1.2 sind sowohl die stabilere Sesselkonformation als auch die planare Darstellung zu sehen. In der Sesselkonformation ist die axiale Stellung der Hydroxylgruppe an Position 2 zu erkennen. Die Orientierung der Hydroxylgruppen führt zu einer Spiegelebene, die durch die Positionen 2 und 5 verläuft. Diese ist besonders klar in der planaren Darstellung zu erkennen (siehe Abb. 1.2). Bei den übrigen Hydroxylgruppen, an der Position 1 und 3 bzw. 4 und 6, handelt es sich um enantiotope funktionelle Gruppen.

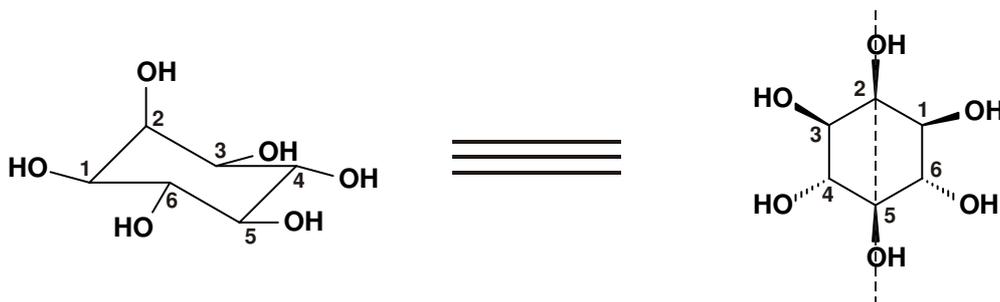


Abb. 1.2: Räumliche und planare Darstellung von *myo*-Inositol

Links ist die Sesselkonformation mit der axialen Hydroxylgruppe an Position 2 abgebildet. Die übrigen Gruppen stehen äquatorial. Die rechte Projektionsformel ist planar in die Ebene gelegt. Hier ist die Symmetrieebene durch Striche angedeutet, welche durch die Kohlenstoffe der Positionen 2 und 5 verläuft.

Zu den physiologisch bedeutsamsten Derivaten des Inositols zählen die Inositolphosphate. In Abhängigkeit des jeweiligen Phosphorylierungsgrades werden Mono-, Bis-, Tris-, Tetrakis-, Pentakis- und Hexakisphosphate unterschieden. Zur Vereinfachung wird eine verkürzte Schreibweise der Form $\text{Ins}(a,b,\dots)\text{P}_x$ verwendet (InsP: Substanzklasse; a,b,...: phosphorylierte Positionen; tief gestellter Index: Anzahl der Phosphatgruppen). Für die Zählweise ergeben sich zwei Möglichkeiten: mit dem Uhrzeigersinn (L-Reihe) oder gegen den Uhrzeigersinn (D-Reihe). Nach der Empfehlung der NC-IUB wird bei natürlich auftretenden Inositolphosphaten konsequent die D-Nummerierung eingehalten [NC-IUB, 1989]. Diese Konvention wird

soweit möglich auch im Folgenden angewandt. Falls bei einer Verbindung die absolute Konfiguration nicht bekannt ist, wird ausdrücklich darauf hingewiesen oder die Möglichkeit durch Anführen beider Enantiomere verdeutlicht (z.B. D-/L-Ins(2,3,4,5,6)P₅).

1.1.2 Metabolismus von Inositolhexakisphosphat

InsP₆ ist auch als Phytinsäure bekannt und ein in allen Eukaryoten vorkommendes Inositolderivat [Sasakawa et al., 1995]. Die Synthese von Inositol, als Ausgangspunkt der Synthese der Inositolphosphate, verläuft in Eukaryoten als auch in Prokaryoten identisch ab. Der erste Schritt der Biosynthese von *myo*-Inositol besteht in der Umsetzung von D-Glucose-6-phosphat zu D-*myo*-Inositol(3)P₁ durch die 1L-*myo*-Inositol-1-phosphatsynthase (MIPS; EC 5.5.1.4) [Majumder et al., 1997]. Dieses Zwischenprodukt wird durch die *myo*-Inositolmonophosphatase (IMPase; 3.1.3.25) [Parthasarathy et al., 1994] zu *myo*-Inositol dephosphoryliert. Neben der Synthese der Inositolphosphate dient Inositol auch als Ausgangspunkt für eine Reihe weiterer Stoffwechselwege. So ist Inositol u.a. an der Synthese verschiedener Polysaccharide der Zellwand beteiligt [Loewus & Murthy, 2000].

Die Synthese von Inositolphosphaten kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen. Zum einen auf einem Phospholipase C (PLC)-unabhängigen Syntheseweg und zum anderen auf einem PLC-abhängigen Syntheseweg (siehe Abb. 1.3). Der PLC-unabhängige Syntheseweg besitzt ausschließlich freie Intermediate, während die initialen Phosphorylierungsschritte des PLC-abhängigen Synthesewegs direkt an einem Phosphatidylinositid erfolgen. Gemeinsam haben beide Wege das InsP₅-Isomer als letztes Intermediat, es handelt sich dabei um Ins(1,3,4,5,6)P₅ [Sun et al., 2007]. Die Synthese von InsP₆ auf dem PLC-unabhängigen Weg beginnt mit freiem Inositol oder Ins(3)P₁. In Mungobohnen (*Vigna radiata*) ist das erste Substrat InsP(3)P₁, welches mittels sequentieller Phosphorylierung in Ins(1,3,4,5,6)P₅ überführt wird [Biswas et al., 1978a]. Andere untersuchte Organismen beginnen die Synthese von InsP₆ unmittelbar mit Inositol. Dies trifft auf den Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* [Stephens & Irvine, 1990] und die monokotyledone Pflanze *Spirodela polyrhiza* [Brearley & Hanke, 1996a] zu. Der erste Syntheseschritt ist hier die Phosphorylierung durch eine Inositol-3-Kinase (EC 2.7.1.6.4) [Loewus et al., 1982] (siehe Abb. 1.3). Anschließend erfolgt eine schrittweise Phosphorylierung bis zum Ins(1,3,4,5,6)P₅. Beide Organismen zeigen neben dem InsP₅ nur beim InsP₃, dem Isomer Ins(3,4,6)P₃, Übereinstimmungen. Die gebildeten InsP₂ und InsP₄ sind hingegen nicht identisch. So zeigt *Dictyostelium* die Isomere Ins(3,6)P₂ und Ins(1,3,4,6)P₄ während in *Spirodela* Ins(3,4)P₂ und Ins(3,4,5,6)P₄ zu finden sind (siehe Abb. 1.3). Den finalen Phosphorylierungsschritt stellt die Synthese von InsP₆ durch eine InsP₅-Kinase dar.

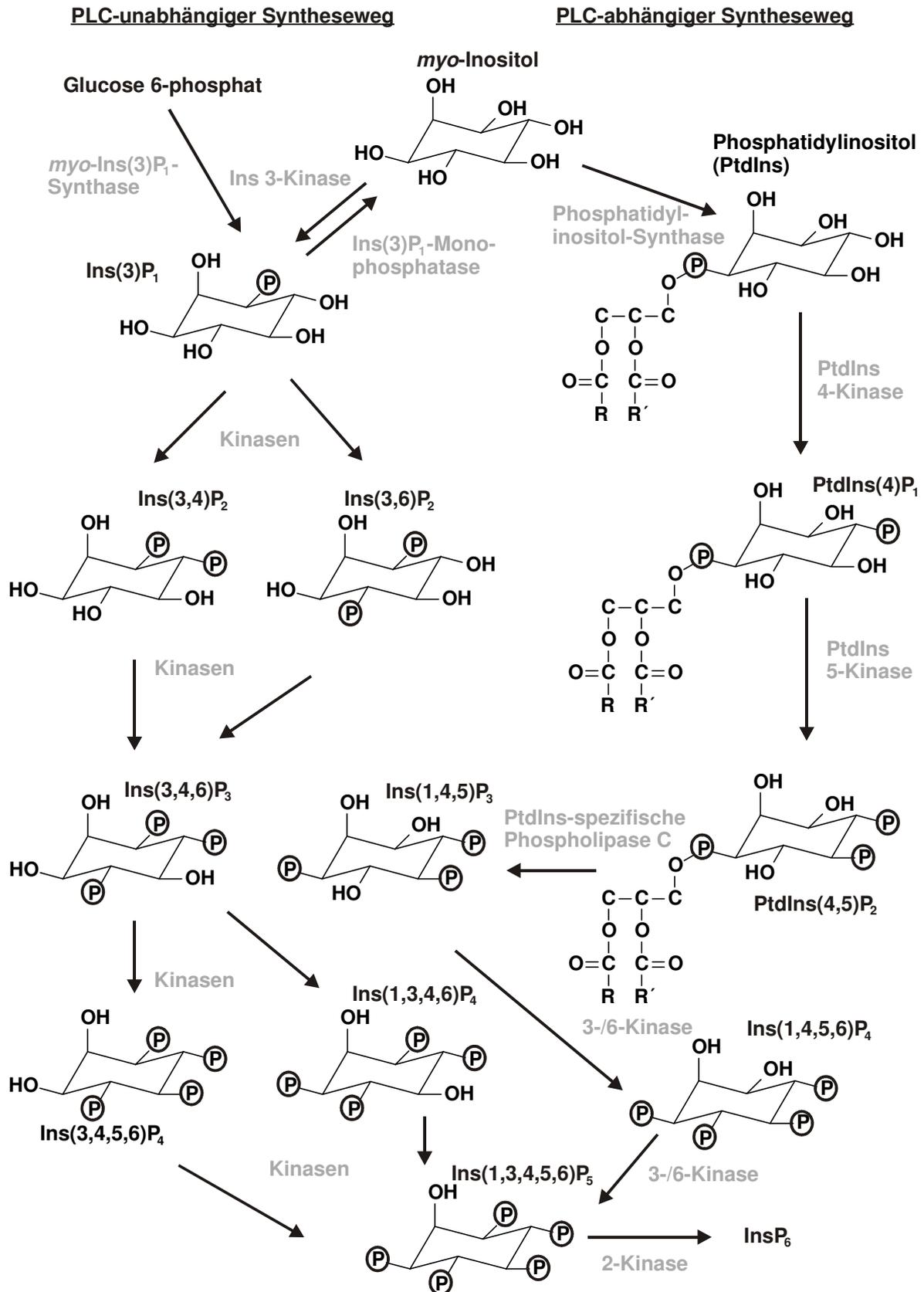


Abb. 1.3: Biosynthese von Inositolhexakisphosphat

Rechts ist der PLC-abhängige Weg mit den zunächst gebundenen Vorstufen, wie er aus *Saccharomyces cerevisiae* bekannt ist, dargestellt. Auf der linken Seite sind die PLC-unabhängigen Synthesewege zu sehen, wie sie für *Dictyostelium discoideum* und *Spirodela polyrhiza* beschrieben wurden. Die Synthese beginnt, abhängig vom Organismus, mit Inositol bzw. Ins(3)P₁ und liefert InsP₆ als Endprodukt.

In *Zea mays* ist, ebenso wie aus *Vigna radiata*, eine $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase nachgewiesen worden [Sun et al., 2007], was $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ als letztes Intermediat der PLC-unabhängigen Synthese von InsP_6 bestätigt.

Der PLC-abhängige Syntheseweg wurde für *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben [York et al., 1999]. Dieser Weg beginnt mit der Synthese von Phosphatidylinositol (PtdIns) durch eine PtdIns-Synthase. Durch zwei nachfolgende Phosphorylierungsschritte, welche von einer PtdIns-4- und einer PtdIns-5-Kinase katalysiert werden, entsteht $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$. Eine PtdIns-spezifische Phospholipase C setzt dann $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ frei. Bis zu diesem Punkt entspricht die Synthese dem anerkannten Signaltransduktionsweg zum Signalmolekül $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ [Berridge & Irvine, 1989]. Im Nukleus der Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wird $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ anschließend durch eine 3-/6-Kinase direkt zu $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ phosphoryliert [York et al., 1999]. Die Syntheseschritte erfolgen ab dem freigesetzten $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ mit freien Intermediaten. Allerdings sind die in der Bierhefe entstehenden InsP_3 - und InsP_4 -Isomere andere als jene die bereits aus *Dictyostelium discoideum* und *Spirodela polyrhiza* bekannt sind. Erst das InsP_5 ist mit $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ in allen bekannten Synthesewegen identisch. Die zusammengetragenen Indizien deuten darauf hin, dass $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ als letztes Intermediat der InsP_6 -Synthese in Tieren, Pflanzen, Hefen und Schleimpilzen weit verbreitet ist [Stephens & Irvine, 1990; Ongusaha, et al., 1998; Phillipy et al., 1994; Fujii & York, 2005; Seeds et al., 2004]. Den letzten Schritt hin zum InsP_6 katalysiert, auch im PLC-abhängigen Weg, eine $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase. Das entsprechende Enzym aus Mungobohnen war in der Lage, nicht nur die Phosphorylierung zu katalysieren, sondern auch unter Anwesenheit von ADP und InsP_6 die Rückreaktion unter Bildung von ATP durchzuführen [Biswas et al., 1978b; Phillipy et al., 1994].

Dieser Umstand stützt die These, dass InsP_6 über ein ausreichendes Transferpotential verfügt, um als Phosphatdonor für die ATP-Regeneration im Samen zu dienen. Eine solche Option müsste bestehen, da viele Zellen im Pflanzensamen noch nicht über die notwendige Membranintegrität zur ATP-Synthese verfügen [Morton & Raison, 1963].

Neben der Synthese ist der zweite Weg der katabole Metabolismus der Inositolphosphate. Den Abbau der Inositolphosphate zu einer niedriger phosphorylierten Stufe katalysieren spezifische Phosphatasen, die Phosphohydrolasen oder kurz Phytasen genannt werden (siehe 1.1.3). Die meisten

Untersuchungen zu diesem Thema wurden mit isolierten Enzymen durchgeführt. Durch diese sind bereits einige Abbauewege *in vitro* bekannt. Wie die Regulation bzw. das Zusammenwirken verschiedener Isoenzyme *in vivo* funktioniert, ist hingegen nur unzureichend geklärt worden. Daher ist es durchaus möglich, dass Enzyme die *in vitro* InsP_6 abbauen, *in vivo* eine andere Funktion besitzen. Deshalb werden die Begriffe Phytase und Phytat-abbauendes Enzym (PAE) hier äquivalent verwendet, um darauf hinzuweisen, dass die Funktion *in vivo* der im folgenden erwähnten Enzyme in den meisten Fällen noch nicht abschließend geklärt sind.

Die identifizierten Abbauewege sind in einzelnen Organismen recht unterschiedlich. Die meisten Phytat-abbauenden Enzyme zeigen die Gemeinsamkeit, dass sie die Phosphatgruppe an der Position 2, wenn überhaupt, dann als letztes hydrolysieren. Phytasen aus verschiedenen Getreidearten sind 4-Phytase. Sie setzen $\text{Ins}(1,2,3,5,6)\text{P}_5$ als erstes Intermediat frei [Greiner & Larsson-Alminger, 2001]. *Saccharomyces cerevisiae* bildet $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ als erstes Zwischenprodukt [Greiner et al., 2001]. Der weitere Abbau läuft dann bei Phytasen aus Getreide und Bierhefe identisch ab, so dass als Endprodukt $\text{Ins}(2)\text{P}_1$ entsteht (siehe Abb. 1.4). Den gleichen Abbauweg zeigen auch Phytasen aus *Vicia faba* und *Lupinus albus* [Greiner et al., 2002]. Bei den bekannten Phytasen aus *Escherichia coli* und *Paramecium* handelt es sich um 6-Phytasen, sie bilden beim Abbau zuerst $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ [Greiner et al., 2000; Van der Kaay & Van Haastert, 1995]. Die Phytase aus *Paramecium* bildet anschließend $\text{Ins}(1,2,3,4)\text{P}_4$ und $\text{Ins}(1,2,3)\text{P}_3$. Das Endprodukt des Abbaus ist hier allerdings nicht ein Inositolmonophosphat sondern bereits $\text{Ins}(2,3)\text{P}_2$.

Die Phytase aus *Escherichia coli* zeigt im Vergleich zum Enzym aus *Paramecium* einen anderen Verlauf der Hydrolyse. Es wird zunächst $\text{Ins}(2,3,4,5)\text{P}_4$ und danach $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ gebildet. Über $\text{Ins}(2,5)\text{P}_2$ als Zwischenschritt entsteht schließlich $\text{Ins}(2)\text{P}_1$ als Endprodukt (siehe Abb. 1.4). Es existieren auch Enzyme, die beim Abbau von InsP_6 einen Haupt- und einen Nebenabbauweg zeigen. In *Triticum aestivum* wurde ein Phytat-abbauendes Enzym nachgewiesen, welches neben dem bereits oben beschriebenen Abbauweg für Getreide noch einen Zusätzlichen besitzt. Die dabei gebildeten Isomere $\text{Ins}(1,2,3,6)\text{P}_4$ und $\text{Ins}(1,2,3)\text{P}_3$ machen allerdings nur einen geringen Teil des gesamten Substratdurchsatzes aus [Nakano et al., 1999]. Auch ein aus dem Bakterium *Megasphaera elsdenii* isoliertes Enzym zeigte, neben dem Hauptabbauweg über $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$, $\text{Ins}(1,2,5,6)\text{P}_4$, $\text{D-Ins}(1,2,6)\text{P}_3$ einen

Nebenweg der etwa ein Drittel des gesamten Substratumsatzes ausmachte und über $\text{Ins}(1,2,3,5,6)\text{P}_5$, $\text{Ins}(1,2,3,6)\text{P}_4$ und $\text{Ins}(1,2,3)\text{P}_3$ verlief [Puhl et al., 2009].

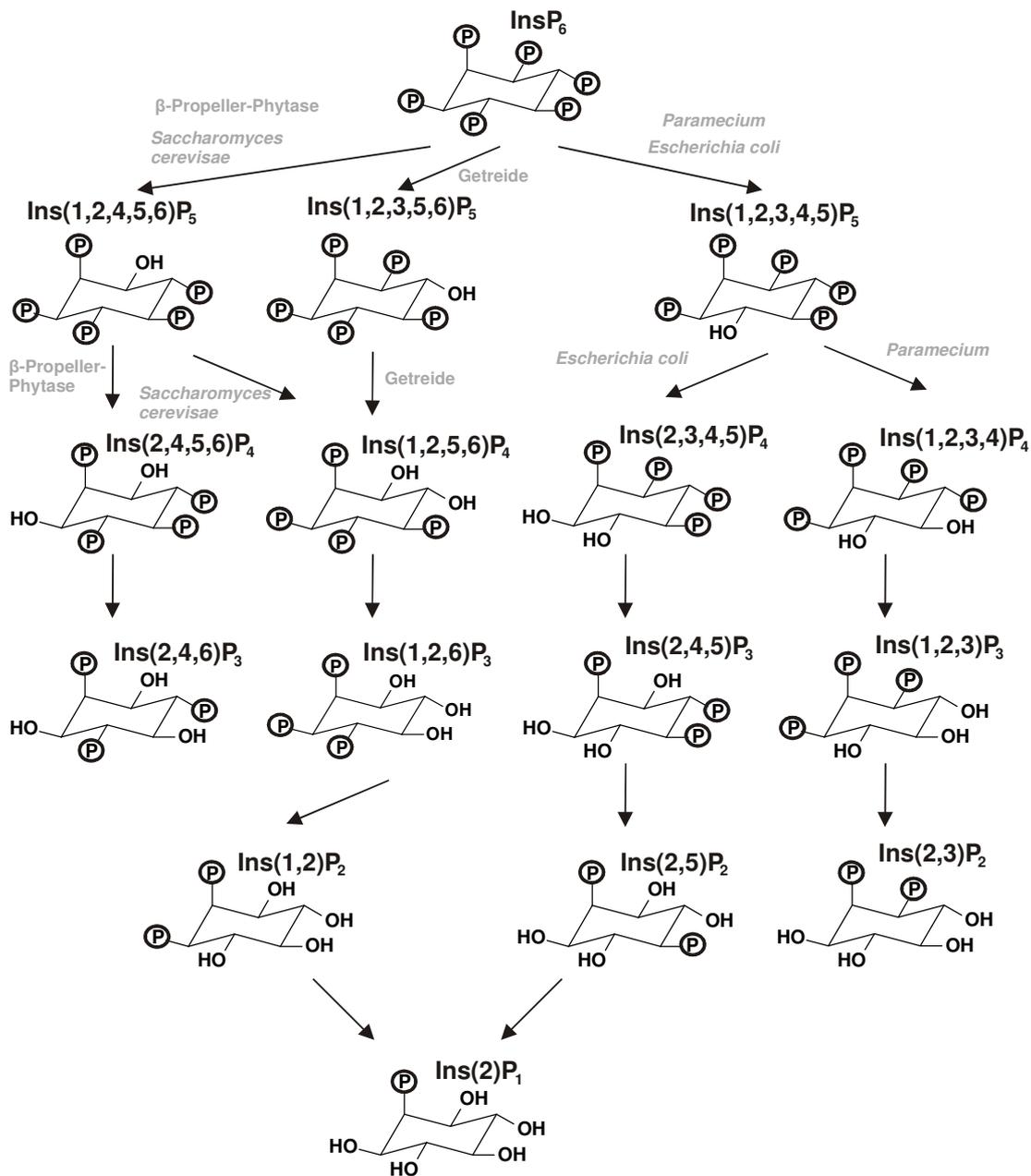


Abb. 1.4: Dephosphorylierung von Inositolhexakisphosphat durch unterschiedliche Phytat-abbauende Enzyme

Die Abbildung zeigt einige stereospezifische Abbaureihenfolgen isolierter Phytat-abbauender Enzyme. Die jeweiligen Organismen bzw. Phytasetypen sind am Anfang des Abbaureihenlaufes blau dargestellt. Die Endprodukte sind $\text{Ins}(2)\text{P}_1$ bzw. bei *Paramecium* $\text{Ins}(2,3)\text{P}_2$.

Des Weiteren existieren auch Phytasen mit unterschiedlichen Abbaureihenfolgen in der gleichen Pflanze. Dies konnte in Samen von *Lupinus alba* nachgewiesen werden. Hier konnten sowohl eine 3- als auch eine 4-Phytase identifiziert werden. Dabei unterschieden sich die Abbaureihenfolgen der beiden Enzyme nur im gebildeten InsP_5 , alle

übrigen Isomere waren identisch [Greiner et al., 2002]. Beide Varianten, ob nun zwei Isoenzyme oder ein Enzym mit unterschiedlichen Abbauwegen, ermöglichen die Bereitstellung verschiedener Isomere, die im Organismus für unterschiedliche Reaktionen verantwortlich sein könnten und so dem Lebewesen eine fein regulierbare Signaltransduktion ermöglichen.

1.1.3 Phytasen – Enzyme des Inositolphosphatabbaus

Der Abbau von höher phosphorylierten Inositolphosphaten wird durch Phosphatasen katalysiert. Diese sind eine weit verbreitete Klasse von Enzymen, welche die Hydrolyse von Phosphomonoestern in biologischen Systemen katalysieren [Vincent et al., 1992]. Die Degradierung von InsP_6 wird dabei von einer speziellen Gruppe der Phosphatasen, den *myo*-Inositolhexakisphosphat-Phosphohydrolasen, kurz auch Phytasen genannt, katalysiert. Sie realisieren die Dephosphorylierung von InsP_6 zu einer niedriger phosphorylierten Vorstufe bzw. bis zum Inositol selbst. Sie sind ubiquitär in Pflanzen, Pilzen, Mikroorganismen und Tieren zu finden [Rao et al., 2009].

Phytasen werden nach zwei unterschiedlichen Kriterien differenziert. Zum einen anhand der Position der ersten hydrolysierten Phosphatgruppe und zum anderen nach auftretenden Sequenzhomologien.

Anhand des ersten Hydrolyseprodukts werden durch die IUPAC-IUB zwei Gruppen von Phytasen unterschieden. Dabei handelt es sich um 3-Phytasen (EC 3.1.3.8) und 6-Phytasen (EC3.1.3.28), die die Hydrolyse entweder an der D-3- oder der L-6-Position beginnen [Greiner, 2007]. Darüber hinaus sind auch Enzyme bekannt, die ihre Hydrolyse an der D-5- oder D-6-Position starten [Barrientos et al., 1994; Greiner et al., 2000a]. Unabhängig von ihrem Ursprung setzen die meisten Phytat-abbauende Enzyme fünf Phosphatgruppen frei und entlassen als Endprodukt der Dephosphorylierung $\text{Ins}(2)\text{P}_1$ [Konietzny & Greiner, 2002].

Anhand des gebildeten InsP_5 wurden bereits einige Phytat-abbauende Enzyme aus unterschiedlichen Organismen charakterisiert. Die 3-Phytasen sind relativ häufig zu finden und zum Beispiel aus *Saccharomyces cerevisiae* bekannt [Greiner et al., 2001]. Für *Escherichia coli* und *Paramecium* sind 6-Phytasen beschrieben worden [Greiner et al., 2000a; Van der Kaay & Van Haastert, 1995], während beispielsweise Enzyme aus *Medicago sativa* und *Phaseolus vulgaris* als 5-Phytasen charakterisiert wurden [Rao et al., 2009].

Bei der Klassifizierung im Hinblick auf Sequenzhomologien werden vier Gruppen unterschieden. Dies sind Histidin-Saure Phosphatasen (HAP), Violette-Saure Phosphatasen (PAP), β -Propeller Phytasen [Tye et al., 2002] und Cystein-Phosphatasen [Chu et al., 2004].

Der Gruppe der HAP werden Enzyme aus verschiedenen Gruppen von Organismen zugeordnet. Bekannt ist dieser Phytasetyp aus Schimmelpilzen wie z.B. *Aspergillus*

niger [Piddington et al., 1993; Ehrlich et al., 1993] und *Sporotrichum thermophile* [Singh & Satyanarayana, 2009]. Auch eine Reihe bakterieller HAP sind beschrieben worden. Neben dem Enzym aus dem Enterobakterium *Escherichia coli* [Greiner et al., 2000] sind noch weitere aus verschiedenen anderen Bakterien bekannt, z.B. aus den Stäbchenbakterien *Yersinia intermedia* [Huang et al., 2006] und *Klebsiella sp.* [Sajidan et al., 2004], dem phytopathogenen Einzeller *Pectobacterium wasabiae* [Shao et al., 2008] und *Dickeya paradisiaca* [Gu et al., 2009].

In Pflanzen wurden auch Enzyme dieses Typs nachgewiesen. Zu jenen Arten, in denen diese Enzymgruppe nachgewiesen wurde zählt u.a. *Zea mays* [Maugenest et al., 1997]. HAP zeichnen sich durch ein konserviertes Sequenzmotiv (RHGXRXP) im Aktiven Zentrum aus [Van Etten et al., 1991]. Des Weiteren besitzen sie ein ebenfalls konserviertes C-terminales HD-Motiv, sowie 10 Cysteinreste. Der Reaktionsmechanismus dieses Phytasetyps ist bereits seit längerem bekannt [Ostanin et al., 1992; Ostanin & Van Etten, 1993]. Ein wichtiger Faktor zum Verständnis des Reaktionsvorgangs bildete dabei die Aufklärung der Kristallstruktur eines Enzyms aus *Escherichia coli* [Lim et al., 2000]. Aufgrund dieser Ergebnisse wird davon ausgegangen, dass der Histidinrest des konservierten RHGXRXP-Motivs bei der Bildung eines kovalenten Phosphohistidinintermediats als Nukleophil dient. Der Aspartatrest des C-terminalen HD-Motivs dient als Protonendonator für das Sauerstoffatom des zu öffnenden Phosphomonoesters [Lindqvist et al., 1994; Porvari et al., 1994]. Der Großteil der bisher bekannten Phytasen wird zur Gruppe der HAP gezählt.

Die zweite Gruppe bilden die PAP. Vertreter dieser Gruppe sind aus *Arabidopsis thaliana* [Kuang et al., 2009], *Nicotiana tabacum* [Kaida et al., 2008; Lung et al., 2008] und *Glycine max* [Hegeman & Grabau, 2001] bekannt. Sie zeichnen sich durch zwei metallhaltige Zentren aus. In einem Zentrum liegt in der Regel Eisen vor, welches durch einen Charge-Transfer zu einem Tyrosinrest für die kräftige Färbung in konzentrierten Proteinlösungen verantwortlich ist [Vincent & Averill, 1990]. Das zweite, nicht chromophore Zentrum enthält bei Säugetieren ebenfalls Eisen, während in pflanzlichen Enzymen Zink oder Mangan dominieren [Vogel et al., 2002]. PAP verfügen über sieben konservierte Aminosäurereste in fünf konservierten Motiven, die an der Koordination der Metallzentren mitwirken [Li et al., 2002] Im Vergleich zu den anderen Phytasen zeichnen sie sich durch ihre Tartratresistenz aus [Kuang et al., 2009]. Bereits bekannte PAE aus der Gruppe der PAP besitzen ein

breites Substratspektrum und scheinen nicht ausschließlich auf Inositolphosphate beschränkt zu sein [Olczak et al., 2003].

Die dritte Gruppe bilden die β -Propeller Phytasen. Sie sind bisher nur aus Vertretern der Gattung *Bacillus* bekannt und zeigen keine Homologien zu anderen bekannten Phytasen. Ihr hervortretendes Merkmal ist die aus sechs Flügeln bestehende Propellerstruktur. Die Aktivität dieses Phytasetyps ist zusätzlich Ca^{2+} -abhängig [Ha et al., 2000; Rao et al., 2008]. Das Endprodukt der Hydrolyse ist InsP_3 . Es zeigte sich, dass der Abbau einem stereospezifischen Weg folgt und nur jedes zweite Phosphat abgespalten wird, so dass als Endprodukt $\text{Ins}(2,4,6)\text{P}_3$ entsteht [Greiner et al., 2007]. Obwohl in den letzten Jahren einige Phytat-abbauende Enzyme aus verschiedenen Organismen identifiziert und charakterisiert wurden [Rao et al., 2009], sind Abbauprodukte in ihrer Stereochemie nur bei wenigen isolierten Enzymen bestimmt werden. Dennoch zeigte es sich, dass alle bisher untersuchten β -Propeller-Phytasen InsP_6 über die gleichen Zwischenprodukte zum $\text{Ins}(2,4,6)\text{P}_3$ degradieren (siehe Abb. 1.4) [Greiner et al., 2007].

Die vierte Gruppe stellen die Cystein-Phosphatasen dar. Der einzige Vertreter dieser Phytasegruppe, der als Phytase eingeordnet wurde, stammt aus dem anaeroben Pansenbakterium *Selenomonas ruminantium* [Chu et al., 2004].

Über Wirkweise von Phytasen in biologischen Systemen ist bisher nur sehr wenig bekannt. Die meisten Erkenntnisse stammen, wie dargestellt von *in vitro*-Untersuchungen isolierter Phytat-abbauender Enzyme. Ob die untersuchten Enzyme, die *in vitro* InsP_6 abbauen, dies auch *in vivo* tun und ob InsP_6 das einzige Substrat darstellt, ist noch nicht geklärt. Zusammenfassend bleiben noch viele unbeantwortete Fragen, da insbesondere auch Expressionstudien fehlen. Diese könnten Aufschluss geben wie Phytase an Regulationsmechanismen mitwirken und wie und durch welche Einflüsse spezifische Signalmetabolite der Inositolphosphate bereitgestellt werden.

1.1.4 Biologische Funktionen der Inositolphosphate

Inositolphosphate sind ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen zu finden [Sasakawa et al., 1995]. Dort liegen sie am häufigsten als Phosphoinositide in der Zellmembran oder an Proteine gebunden vor [Torres et al., 2005; Veiga et al., 2006]. Es ist bekannt, dass die verschiedenen Isomere dabei unterschiedliche Funktionen in den Zellen übernehmen. Auf diese Weise können die Zellen auf eine fein regulierbare Signalmaschinerie zurückgreifen. Doch nicht nur an der Signaltransduktion sind Inositolphosphate beteiligt, auch in vielen weiteren Stoffwechselfvorgängen sind sie direkt oder indirekt involviert.

Einer der bekanntesten Vertreter der Inositolphosphate ist $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. In tierischen Zellen mobilisiert $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ Ca^{2+} -Ionen, indem es an spezifische, endomembranöse Ca^{2+} -Kanäle bindet [Berridge, 1993]. Wenngleich aus Pflanzen und Hefen keine Rezeptoren für $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ bekannt sind, so führt die Freisetzung in pflanzlichen Schließzellen doch zu einer Inhibierung der einwärtsgerichteten K^+ -Kanäle und zum Verschluss der Stomata [Lemtiri-Chlieh et al., 2003]. $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ist auch an Signalkaskaden infolge von gravitropen Reaktionen beteiligt [Perera et al., 2006]. Inositoltrisphosphate scheinen ebenfalls bei Abwehrreaktionen von Pflanzen auf Pathogenbefall eine Rolle zu spielen. So zeigten infizierte Zitronenkeimlinge einen Anstieg des InsP_3 -Gehalts infolge einer Infektion mit dem Schimmelpilz *Alternaria alternata* [Ortega et al., 2005]. Von anderen InsP_3 -Isomeren sind keine genauen Funktionen bekannt. Daher wird davon ausgegangen, dass sie wahrscheinlich im Rahmen des allgemeinen Metabolismus der Inositolphosphate gebildet werden [Brearley & Hanke, 2000].

Über die Funktionen verschiedener InsP_4 -Isomere ist noch relativ wenig bekannt. Ihre Wirkweise ist vor allem in tierischen Zellen genauer untersucht worden. So wird angenommen, dass $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran aktivieren kann [Irvine & Schell, 2001]. Für $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ konnte nachgewiesen, dass es ein wichtiger Inhibitor von Ca^{2+} -regulierten Cl^- -Kanälen darstellt [Kachitorn et al., 1993]. Auch eine Beteiligung an der Sekretion von Chlorid wird vermutet [Vajanaphanich et al., 1994].

Bei den InsP_5 -Isomeren tritt in erster Linie $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ auf. Es handelt sich dabei um das mengenmäßig häufigste InsP_5 -Isomer in Säugetieren [Stephens et al., 1991]. Aus Pflanzen ist $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ ebenfalls bekannt. Es entsteht als Vorstufe bei der InsP_6 -Synthese in *Spirodela polyrhiza* [Brearley & Hanke, 1996]. Im Schleimpilz

Dictyostelium discoideum [Stephens & Irvine, 1990] ist es auch als letztes Intermediat der InsP₆-Synthese nachgewiesen worden. Es wird daher angenommen, dass Ins(1,3,4,5,6)P₅ als metabolische Drehscheibe fungieren könnte [Irvine & Schell, 2001]. In tierischen Organismen, genauer bei deren Erythrozyten, ist noch eine weitere Funktion von Ins(1,3,4,5,6)P₅ bekannt. Es konnte nachgewiesen, dass Ins(1,3,4,5,6)P₅ die O₂-Affinität von Hämoglobin im Blut senkt [Irvine & Schell, 2001]. Das mengenmäßig wichtigste Inositolphosphat stellt jedoch InsP₆ dar. Es ist an einer Vielzahl von Vorgängen in der Zelle beteiligt. Aus Versuchen mit tierischen Zellkulturen ist bekannt, dass InsP₆ bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt ist [Hanakahi et al., 2000]. Zusätzlich wirkte InsP₆ inhibierend auf eine Proteinphosphatase [Larsson et al., 1997] und aktivierend auf eine Proteinkinase C [Efanov et al., 1997]. Dies verdeutlicht die exponierte Stellung von InsP₆ im Rahmen der zellulären Signaltransduktion. In *Saccharomyces cerevisiae* ist InsP₆ eine wichtige Komponente beim Export von mRNA aus dem Nukleus [York et al., 1999; Saiardi et al., 2000]. Auch wird eine Beteiligung bei Vorgängen von Endo- und Exocytose vermutet. [Efanov et al., 1997; Saiardi et al., 2002].

Es sind *in vitro* noch weitere Interaktionen zwischen InsP₆ und intrazellulären Proteinen bekannt. Da InsP₆ ein stark geladenes Molekül ist, interagiert es jedoch relativ leicht mit geladenen Proteinen und Kationen. Ob es sich bei den beobachteten Interaktionen jedoch auch *in vivo* stets um Reaktionspartner handelt, müssen weitere Untersuchungen klären.

Neben den bereits geschilderten Funktionen von InsP₆, die in erster Linie in *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen wurden, besitzt es vor allem in Pflanzen noch weitere wichtige Aufgaben. Die bekannteste Eigenschaft von InsP₆ ist die als Phosphat- und Mineralienspeicher in Samen. Auf diese Weise fungiert es als Energiequelle und Antioxidanz während der Keimung [Raboy, 2003]. Im Samen können über 1 % der Trockenmasse aus InsP₆ bzw. seinem Mineralsalz Phytin bestehen [Raboy & Dickinson, 1987]. InsP₆ bildet mit verschiedenen Kationen Salze aus, die auch auf diese Weise im Samen gebunden werden. Den mengenmäßig größten Anteil der gespeicherten Kationen machen Mg²⁺, Ca²⁺ und K⁺ aus [Bohn et al., 2007]. Chelatiert werden aber auch Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺ und Fe³⁺ [Vohra et al., 1965; Maddaiah et al., 1964]. InsP₆ lagert sich im Laufe der Samenreifung in diesen an und kann bis zu 90 % des gesamten Phosphors im Samen ausmachen [Lott et al.,

2000; 2001]. Die Speicherung von InsP_6 bzw. Phytin im Samen erfolgt in Globoiden. Sie befinden sich innerhalb von Proteinspeichervakuolen, die meist auf einen spezifischen Teil des Samens beschränkt sind [Bohn et al., 2008]. InsP_6 stellt auch ein wirksames Antioxidationsmittel dar. Aufgrund seiner Fähigkeit Fe^{2+} zu chelatieren, ist es ein potenter Inhibitor der Fe^{2+} -katalysierten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies [Graf et al., 1984], sowie der Lipidperoxidation *in vitro* [Graf et al., 1987; Graf & Eaton, 1990; Empson et al., 1991]. Der oxidative Stress für Pflanzen ist in fotosynthetisch aktivem Gewebe sowie in Samen in der letzten Phase der Reifung sehr ausgeprägt. Es wird daher vermutet, dass InsP_6 neben anderen Antioxidanzien wichtig zur Erhaltung der Keimfähigkeit des Samens ist. Bei Samen von *Zea mays* mit reduziertem InsP_6 -Gehalt zeigte sich bei längerer Lagerung eine verminderte Keimfähigkeit gegenüber den Kontrollen [Doria et al., 2009].

Neben den genannten Funktionen als Speicher für Inositol, Phosphat und Mineralien ist InsP_6 auch in vielfältiger Weise an der Signaltransduktion beteiligt.

InsP_6 ist ein wichtiger Faktor bei der Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern [Lemtiri-Chlieh et al., 2003], was zu einer Inaktivierung von einwärtsgerichteten K^+ -Kanälen in Schließzellen führt [Lemtiri-Chlieh et al., 2000]. InsP_6 ist auf diese Weise ein wichtiges Element der Regulation der Turgorbewegungen. InsP_6 ist ebenfalls an Wachstumsprozessen in der Pflanze beteiligt. Bei der Strukturaufklärung eines Rezeptors für das Phytohormon Auxin in *Arabidopsis thaliana* wurde InsP_6 als struktureller Cofaktor identifiziert [Tan et al., 2007]. InsP_6 ist somit auch an Auxin-induzierten pflanzlichen Wachstums- und Entwicklungsprozessen beteiligt.

Aus anderen Untersuchungen geht hervor, dass InsP_6 zusätzlich eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Grundresistenzen gegen Pathogene spielt. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen InsP_6 und der Ausbildung von basalen Resistenzen existiert. In Mutanten von *Arabidopsis thaliana*, die kein InsP_6 mehr synthetisieren konnten, zeigte sich, dass ein verminderter endogener Gehalt an InsP_6 zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber verschiedenen Pathogenen führte [Murphy et al., 2008].

1.1.5 Inositolphosphate in der Landwirtschaft

Der Gehalt an InsP_6 im Samen ist sehr hoch [Raboy & Dickinson, 1987]. Neben dem immobilisierten Phosphat sind noch große Mengen essentieller Kationen gebunden. Des Weiteren verfügen Samen über einen hohen Nährwert und sind sehr energiereich. Aufgrund dieser günstigen Eigenschaften werden sie gerne als Nutztierfutter eingesetzt, wo sie den Hauptteil der gesamten Futtermenge stellen [Reddy et al., 1982]. Die Nutzung von Sämereien als Futtermittel ist jedoch nicht in allen Fällen problemlos möglich. Monogastrische Nutztiere, in erster Linie Schweine und Geflügel, können das InsP_6 nur unzureichend aufschließen, da sie nur über eine sehr geringe Phytaseaktivität in ihrem Verdauungstrakt verfügen [Maenz & Claasen, 1998]. Daraus ergeben sich zwei Probleme, zum einen muss dem Futter Phosphat zugesetzt werden, da InsP_6 als Phosphatquelle nur ungenügend genutzt werden kann. Zum anderen wird durch den hohen Gehalt an InsP_6 ein Teil der Mineralien chelatiert und so dem Organismus vorenthalten. Ein Lösungsansatz stellt die Zugabe von Phytasen dar. Bei der Zugabe einer mikrobiellen Phytase ins Futter konnte die zusätzlich nötige Gabe von Zink bei heranwachsenden Schweinen um ein Drittel reduziert werden [Revy et al., 2006]. Die Problematik der Unterversorgung mit wichtigen Mineralien ist auch von Menschen bekannt, die eine Ernährung mit sehr InsP_6 -reichen Nahrungsmitteln präferieren. Bei ihnen stellt sich häufig eine Unterversorgung mit verschiedenen Mineralien ein. InsP_6 ist, als starker Chelator, in der Lage beispielsweise die Aufnahme von Eisen aus der Nahrung zu erschweren. Neben der Versorgung der Nutztiere liegt ein besonderes Augenmerk auf deren Ausscheidungen. Durch die mangelhafte Nutzung des Phytats im Verdauungstrakt der Monogastrier haben deren Exkreme noch einen sehr hohen Anteil an InsP_6 . Dies führt sowohl im Boden als auch nach der Auswaschung der Nährstoffe in Gewässern zu Eutrophierung [Bohn et al., 2008]. Um diese Anreicherung von Nährstoffen zu unterbinden, wurden bereits Versuche durchgeführt, bei denen konventionellem Samenfutter mikrobielle Phytasen zugesetzt wurden. Auf diese Weise konnte der Gehalt an InsP_6 im Futter verringert werden und den Nutztieren eine größere Menge an Phosphat zugänglich gemacht werden. Die Verfügbarkeit von Phosphat bei einer auf Getreide basierenden Ernährung von Schweinen konnte um annähernd 40 % gesteigert werden [Dungelhof et al., 1994]. Erste Testreihen mit Nutztieren zeigten dabei gute Ansätze bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit der Tiere und des Belastungsgrads der Exkreme. Sowohl bei Geflügel als auch

bei Schweinen konnte als positiver Effekt eine schnellere Gewichtszunahme attestiert werden [Bohn et al., 2008]. Der Phosphatgehalt der Ausscheidungen von Schweinen und Geflügel hat bei entsprechender Vorbehandlung des Futters um bis zu 60 % abgenommen [Bohn et al., 2008]. Eine weitere Möglichkeit sind pflanzliche Mutanten, die einen reduzierten Gehalt an InsP_6 aufweisen und stattdessen eine erhöhte Phosphatkonzentration besitzen. Solche Mutanten besitzen leider einige Nachteile bezüglich Keimungsrate und Ausbeute, so dass sie noch keine vollwertige Alternative darstellen.

1.2 *Cannabis sativa* L. – Hanf

1.2.1 Systematische Einordnung und Habitus

Hanf, *Cannabis sativa* L., gehört zur Familie der Cannabaceae, welche in die Ordnung Urticales gestellt wird. Neben *Cannabis sativa* wurden noch *C. indica* und *C. ruderalis* als Angehörige dieser Gattung beschrieben. Der Artstatus der beiden letztgenannten Spezies ist jedoch nicht abschließend geklärt. Es steht noch nicht fest, ob es sich um eigene Arten handelt oder eine bzw. beide als Unterarten von *C. sativa* anzusehen sind. Jede folgende Nennung von Hanf bezieht sich daher immer auf *C. sativa*. Die Familie enthält neben der Gattung *Cannabis* noch die Gattung *Humulus* mit den Vertretern *H. lupulus*, *H. japonicus* und *H. yunnanensis*.

Das ursprüngliche Habitat von *Cannabis sativa* liegt vermutlich in Zentralasien. Mittlerweile hat sich die Pflanze mit Ausnahme der tropischen und polaren Regionen, weltweit ausgebreitet. Hanf ist eine annuelle Pflanze, die lediglich einen Stängel ausbildet. Dieser kann je nach Sorte und Wachstumsbedingungen bis zu 5 m lang werden, Verzweigungen sind meist nur schwach ausgebildet. Es werden Pfahlwurzeln ausgebildet.

Cannabis sativa zählt zu den diözischen Pflanzen, d.h. es existieren männliche und weibliche Individuen. Die männlichen Exemplare (Femelhanf) sind dabei im Habitus meist weniger kräftig ausgebildet als die weiblichen Pflanzen (Hanfhennen).

Der Stängel verholzt mit zunehmendem Alter der Pflanze und besitzt dann eine ausgeprägt eckige Erscheinung. Im Phloem entstehen die primären Faserbündel, die eine größere Länge als die nachfolgenden sekundären Faserbündel aufweisen. Aufgrund dieser Eigenschaften sind die primären Fasern für die wirtschaftliche Nutzung besser geeignet als die sekundären Fasern. Die Blätter bestehen aus fünf bis neun Blattfingern und sind lang gestielt. Die Oberseite ist kräftig grün, die Unterseite hingegen deutlich blasser. Die Blütenstände befinden sich in den Blattachseln der oberen Laubblätter. Es handelt sich dabei um Trugdolden bzw. Rispen. Die männliche Blüte setzt sich aus fünf Staub- und fünf Hüllblättern zusammen. Die weibliche Blüte verfügt über ein reduziertes Perianth welches den oberständigen Fruchtknoten umschließt. Der Fruchtknoten selbst setzt sich aus zwei Fruchtblättern zusammen, die jeweils einen Griffel besitzen. Die Bestäubung erfolgt durch Anemogamie.

Die Früchte von *Cannabis sativa* sind Nüsse. Die rundlichen Schließfrüchte sind zwei bis sechs mm lang und besitzen einen Durchmesser von zwei bis vier mm. Die Größe kann jedoch in Abhängigkeit von Sorte und Wachstumsbedingungen variieren. Die Keimung der Samen verläuft tagneutral. Fast die gesamte Oberfläche der Hanfpflanze ist mit Drüsen besetzt. Frei von diesen Ausscheidungsorganen bleiben lediglich Samen und Wurzel. Die Drüsen sondern u.a. Harze und ätherische Öle ab [Herer, 1995], die für den charakteristischen Geruch von *Cannabis*-Arten verantwortlich sind.

1.2.2 Hanf als Nutzpflanze

Hanf ist eine der ältesten Nutzpflanzen der Menschheit. Bereits aus dem achten vorchristlichen Jahrtausend sind aus Hanffasern gefertigte Webstoffe nachgewiesen. Die Verwendung als Stofflieferant hat sich im Laufe der Zeit erhalten und weiterentwickelt. Neben der Herstellung von Segeltuch und anderen Schiffsutensilien sind besonders Seile aus Hanf ein wichtiger Zweig der Nutzung gewesen. In den vergangenen Jahrhunderten wurde auch ein Großteil der Bekleidung aus Hanffasern gefertigt. So waren in der Mitte des 19. Jahrhunderts etwa 80 % der in den USA fabrizierten Stoffe und Textilien aus Hanffasern.

Die Fasern wurden aber nicht nur zur Herstellung von Stoffen und Bekleidung genutzt. Sie wurden auch bei der Herstellung von Papier eingesetzt. Es existieren Nachweise über aus Hanffasern gefertigtes Papier in China, die auf das erste Jahrhundert nach Christus datiert werden.

In vielen Ländern wurden Auszüge von *Cannabis* zur Linderung unterschiedlichster Beschwerden eingesetzt. Dazu wurden Extrakte aus verschiedenen Pflanzenorganen wie Knospen, Blättern und Wurzeln hergestellt.

In der Gegenwart rückt auch die Bedeutung von Hanf als Nahrungsmittel wieder in den Vordergrund. In erster Linie werden dazu die Samen genutzt. Diese werden zu Hanföl gepresst oder als Hanfmehl zur Herstellung verschiedener anderer Verzehrgüter eingesetzt. Da in den Samen der heute verwendeten Samen praktisch kein Tetrahydrocannabinol (Δ -9 THC) enthalten ist, hat ihr Verzehr keine berauschende Wirkung. Die Samen sind darüber hinaus ernährungsphysiologisch sehr günstig, da sie neben einem relativ hohen Proteingehalt auch über einen hohen Anteil ungesättigter Fettsäuren verfügen. Sie sind deshalb nicht nur ein wichtiger Bestandteil in kommerziellem Vogelfutter, sondern auch für die Fütterung von landwirtschaftlichen Nutztieren gut geeignet.

Ein weiterer Bereich, in den Hanfprodukte vordringen, ist die Baustoffindustrie. In jüngster Zeit werden Hanffasern zu Dämmplatten gepresst und zur ökologischen Dämmung eingesetzt. Dies ist ein sinnvoller Anwendungsbereich, da solche Presselemente sehr günstige thermische und akustische Isoliereigenschaften besitzen [Herer, 1995].

1.3 Zielsetzung

Inositolphosphate stellen in vielen Organismen wichtige Verbindungen der zellulären Signaltransduktion dar [u.a. Berridge, 1993; Lemtiri-Chlieh et al., 2003]. Darüber hinaus sind sie als Reservestoffe und Antioxidanzien von großer Bedeutung für die pflanzliche Entwicklung [Raboy, 2003]. Der Metabolismus der Inositolphosphate in Pflanzen ist bis dato ein wenig untersuchter Forschungszweig. Insbesondere der Einfluss von exogenen Faktoren auf den intrazellulären Spiegel an Inositolphosphaten wurde kaum Beachtung geschenkt. Lediglich die Wirkung unterschiedlicher Phosphatkonzentrationen im Medium von Suspensionskulturen von *Catharanthus roseus* wurden bereits untersucht [Mitsubishi et al., 2005]. Die reizabhängige Modifikation der intrazellulären Gehalte an Inositolphosphaten wird durch verschiedene Phosphatasen und Kinasen reguliert. Bei Vorversuchen zeigten sich in *Cannabis sativa* ungewöhnliche Gehalte an Inositolpolyphosphaten. Um nun ein möglichst umfassendes Bild des Metabolismus der Inositolphosphate in Hanf zu erhalten wurde von zwei unterschiedlichen Seiten an das Thema herangegangen:

A. Untersuchung der intrazellulären Gehalte an Inositolpolyphosphaten in *Cannabis sativa* L.

An der Modellpflanze der Arbeitsgruppe, *Cannabis sativa* L., sollten die Gehalte an Inositolpolyphosphaten in Pflanzen und Suspensionskulturen untersucht werden. Ein besonderes Interesse bestand in der Bestimmung der dynamischen Verhältnisse der Inositolpolyphosphate im Laufe der Gewebsdifferenzierung bei sich entwickelnden Hanfpflanzen. Des Weiteren sollte der Einfluss ausgewählter exogener Faktoren auf die intrazellulären Gehalte an Inositolpolyphosphaten untersucht werden. Auch eine stereospezifische Determinierung der auftretenden Inositolpentakisphosphate war vorgesehen, um mehr Informationen zum Auf- und Abbau von InsP_6 in dieser Pflanze zu erhalten.

B. Identifizierung und Charakterisierung eines Phytat-abbauenden Enzyms aus Kotyledonen von *Cannabis sativa* L.

Hier sollte aus den Keimblättern von *Cannabis sativa* L. ein Phytat-abbauendes Enzym mittels biochemischer Aufreinigungsmethoden isoliert und charakterisiert werden. Neben dem Vergleich mit bereits bekannten Enzymen dieses Typs war auch eine Sequenzierung des Proteins vorgesehen.

2. Material und Methoden**2.1 Verzeichnis verwendeter Geräte und Verbrauchsmaterialien****2.1.1 Geräte**HPLC-MDD-Komponenten

Entgaser Uniflows Degasys DG1310	Uniflows, Tokio, Japan
Gradientenmischer LKB Low-Pressure-Mixer	Pharmacia, Freiburg
Kontroller LKB LC 2251	Pharmacia, Freiburg
Pumpe LKB HPLC-Pump 2248	Pharmacia, Freiburg
Pumpe LC-10AD	Shimadzu, Duisburg
Photometer LKB VWM 2141	Pharmacia, Freiburg
Autosampler Marathon	Pharmacia, Freiburg

Säulen

Hauptsäule Mono Q HR 10/10	Pharmacia, Freiburg
Vorsäule Resource Q HR 5/5	Pharmacia, Freiburg

Säulenmaterial für Biochromatographie

ConA-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Phenyl-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Q-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Sephadex G-75	Pharmacia, Freiburg
Source 15Q	Pharmacia, Freiburg

Photometer

Uvicord SII (Iodlampe)	Pharmacia LKB, Freiburg
Mikrotiterplatten-Photometer XR 680	Bio-Rad, Richmond, USA

sonstige verwendete Geräte

Gelelektrophorese-Set SE 250-10A-.75	Hoefler, San Francisco, USA
Lyophylle Alpha	Christ, Osterode am Harz
Magnetrührer FB15001	Fisher Scientific, Schwerte
Mikrotiterplattenschüttler Ika-Vibrax-VXR + Aufsatz VX8	Janke & Kunkel, Staufen
Netzgerät EA-3050	Elektro-Automatik, Viersen
Peristaltik-Pumpe P1	Pharmacia, Freiburg
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemian, USA
Waring Blendor	Bachhofer, Reutlingen
Wasserbad 2209 Multitemp	LKB, Bromma, Schweden

Alle hier nicht explizit aufgeführten Geräte gehören zur Grundausstattung biochemischer Labore.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Rotilabo®-Mikrotest-Platten, F-Profil	Roth, Karlsruhe
Teflon Solvent Filter	Pharmacia, Freiburg

Alle hier nicht separat aufgeführten Verbrauchsmaterialien wurden in Analyse-Qualität von den Firmen Roth, Millipore und Sigma-Aldrich bezogen.

2.2 Feinchemikalien

Acrylamid/ N,N-Methylenbisacrylamid (gebrauchsfertige Lösung)	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Aktivkohle	Roth, Karlsruhe
Ammoniummolybdat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Asparagin	Sigma, St. Louis, USA
Bis-Tris	Roth, Karlsruhe
Brilliant Blau R 250	Roth, Karlsruhe
Dithiotreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Glycin	Biorad, Richmond, USA
Malachitgrün-Hydrochlorid	Sigma, St. Louis, USA
Murashige & Skoog-Medium (MS-Salz)	Sigma, St. Louis, USA
Natriumfluorid	Sigma, St. Louis, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
p-Nitrophenylphosphat	Roth, Karlsruhe
Phytinsäure (InsP ₆)	Sigma, St. Louis, USA
Perchlorsäure	Roth, Karlsruhe
4-(2-Pyridylazo)resorcinol	Fluka, Buchs, Schweiz
Serin	Roth, Karlsruhe
Tergitol NP-10	Sigma, St. Louis, USA
<i>tri</i> -Natriumcitrat * 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, St. Louis, USA
Yttriumchlorid (YCl ₃)	Reacton, Cheshire, GB

Alle hier nicht separat aufgeführten Chemikalien wurden in Analyse-Qualität von den Firmen Fluka, Merck, Riedel-de Haën, Roth und Sigma-Aldrich bezogen.

2.3 Organismen

2.3.1 Pflanzenmaterial

Alle Versuche, bei denen *Cannabis sativa* L. verwendet wurde, erfolgten mit der Sorte Fedora 19. Alle weiteren untersuchten Pflanzenarten wurden als Saatgut ohne nähere Sortenbezeichnung im Fachhandel bezogen.

2.4 Anzucht des biologischen Materials

2.4.1 Medien

Cannabis sativa wurde in einem modifizierten Medium nach Linn & Staba (1961) kultiviert. *Nicotiana tabacum* wurde in modifiziertem MS-Medium [1 % (w/v) Saccharose, Nährsalze nach Murashige & Skoog, 1962] gehalten. Die Anzucht von *Pimpinella anisum* erfolgte in IB5-Medium [Gamborg, 1970]. Alle weiteren in dieser Arbeit untersuchten Zellkulturen wurden in LS-Medium angezogen [Linsmaier & Skoog, 1965]. Die Zusammensetzung der Medien war für Suspensionskulturen und Festmedien identisch. Die Festmedien enthielten zusätzlich noch 0,8 % (w/v) Agar-Agar.

2.4.2 Pflanzenanzucht

Die Anzucht erfolgte im Gewächshaus bei durchschnittlich 22 – 25°C. Die Belichtungsdauer lag bei 14 Stunden und 70 % Luftfeuchtigkeit. Als Substrat diente konventionelle Blumenerde oder Recyclingpapier.

2.4.3 Anlage von Gewebekalluskulturen

Aus vorher oberflächlich sterilisierten Blättern wurden mittels eines Korkbohrers Gewebestücke (Durchmesser ca. 1 cm) ausgestant. Diese wurden auf Petrischalen mit Festmedium (siehe 2.4.1) verbracht und unter konstanten Bedingungen (25 °C, 16 h Belichtung) bis zur Ausbildung von Kalli weiter kultiviert.

2.4.4 Suspensionskulturen

Die gebildeten Kalli (siehe 2.4.3) wurden zur Bildung einer Suspensionskultur in Flüssigmedium überführt. Bei 25 °C, 750 - 1000 Lux und 110 Upm erfolgte die

weitere Anzucht im Schüttelschrank. Einmal wöchentlich wurde das Medium erneuert.

2.4.5 Behandlung der Suspensionskulturen

Um die Wirkung von Inositol auf den Inositolphosphatstoffwechsel der Zellen zu untersuchen wurden die Suspensionskulturen in drei unterschiedlichen Medien angezogen. Als Kontrolle diente das beschriebene Medium nach Linn & Staba (1961). In den beiden übrigen Medien fehlte Inositol. Ein Medium, verblieb in diesem Zustand, als Inositol-Mangelmedium. Dem zweiten Medium wurde sofern nicht anders vermerkt 2 mM InsP₆ zugegeben. Die Zugabe des sterilfiltrierten InsP₆ erfolgte nach dem Autoklavieren des Mediums.

2.4.6 Kultur und Ernte von *Dictyostelium discoideum*

Es wurde der axenische Stamm AX-2 (ATCC:24397) verwendet. Die Anzucht erfolgte in Erlenmeyerkolben aus Sporen unter sterilen Bedingungen. Optimale Bedingungen für die Kultur waren bei ca. 23 °C auf einem Rundschüttler bei 120 Upm in axenischem Medium gegeben [Watts & Ashford, 1970].

Um die Zellen zu ernten, wurden diese sedimentiert [10 min; 4000 Upm; 4 °C] und anschließend mehrfach mit Puffer gewaschen. Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte bei -80 °C.

2.5 Proteinanalytik

2.5.1 Bestimmung des Proteingehalts

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte photometrisch nach Bradford (1976) unter Verwendung von Bradford-Reagenz [0,008 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R 250; 5 % (v/v) Ethanol; 13 % (v/v) Phosphorsäure]. Zur Bestimmung des Proteingehaltes diente der lineare Teil einer mit BSA erstellten Kalibriergerade.

2.5.2 Chloroform-Methanol-Fällung

Für die Aufkonzentrierung von Proteinen wurde die Proteinlösung mit vier Volumenteilen Methanol, einem Volumenteil Chloroform und drei Volumenteilen H₂O versetzt. Die Lösung wurde anschließend eine Minute mittels eines Vortexers durchmischt. Anschließend wurde der Ansatz 5 min bei 13000 Upm zentrifugiert und die obere Phase verworfen. Zur unteren Phase und der Interphase wurden drei Volumenteile Methanol zugesetzt und erneut durchmischt. Der Ansatz wurde wie im vorherigen Schritt zentrifugiert, das Pellet getrocknet und anschließend für die SDS-PAGE (siehe 2.5.3) resuspendiert.

2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen wurde die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden Apparaturen und ein diskontinuierliches Gel nach Ahn et al. (2001) verwendet. Die Trennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke. Zur Größenbestimmung wurde der SDS-PAGE Molecular Weight Standard (Low Range) von Bio-Rad verwendet. Nach der Auftrennung wurden die Proteine in der Regel mit Coomassie gefärbt (siehe 2.5.4).

2.5.4 Coomassiefärbung von Proteinen

Die Gele wurden 3 bis 4 h oder über Nacht in Coomassie-Lösung [0,04 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R 250; 40 % Methanol; 10 % Essigsäure] inkubiert. Um nicht an Proteinen haftenden Farbstoff zu entfernen, wurde mehrmals mit Entfärber-Lösung [40 % (v/v) Methanol] gespült. Anschließend konnten die Gele digitalisiert werden.

2.6 Enzymtests

2.6.1 Aktivitätsnachweis für saure Phosphatasen

Die Aktivitätsbestimmung der sauren Phosphatasen wurde nach einer Methode von Dimmond et al. (1981) durchgeführt. Als Substrat diente p-Nitrophenylphosphat. Die Bestimmung der Aktivität wurde bei pH 5,0 durchgeführt. Durch die bei 405 nm gemessene Extinktion von p-Nitrophenyl konnte mittels des Extinktionskoeffizienten ($18,5 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ in alkalischer Lösung) die Volumenaktivität berechnet werden.

2.6.2 Aktivitätsnachweis für Phosphohydrolasen

Die Detektion und Untersuchung der kinetischen Aktivität erfolgte auf Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen, Roth). Der Gesamtansatz bestand aus der Probe, welche mit Reaktionspuffer [125 mM NaAcetat-Puffer pH 5,0] auf 100 μl aufgefüllt wurde. Des Weiteren wurden 90 μl H_2O und 10 μl 2 mM InsP_6 -Lösung zugegeben. Als Starter fungierte dabei InsP_6 . Während der Inkubation wurden die Ansätze mit 80 Upm geschüttelt. Zu definierten Zeitpunkten wurden 10 μl -Aliquots aus dem Ansatz entnommen und mit 10 μl 2 M HCl versetzt, um die Reaktion zu stoppen. Die Quantifizierung des freigesetzten Phosphats erfolgte kolometrisch mit Hilfe des Malachitgrün-Reagenz. Für dieses wurden 735 Volumenteile Malachitgrün-Hydrochlorid-Lösung [0,045 % (w/v) Malachitgrün-Hydrochlorid in H_2O] mit 245 Volumenteilen Ammoniummolybdat-Lösung [4,2 % Ammoniummolybdat in 4 M HCl] vermischt. Die grüne Lösung wurde 24 h gerührt. Danach wurden 20 Volumenteile Tergitol-Lösung [2 % (v/v) Tergitol NP-10] hinzugeben. Abschließend wurde die Lösung filtriert und bei 4° C in einer Braunflasche verwahrt.

Bei der Bestimmung von Phosphat mit Malachitgrün sind bereits nanomolare Mengen nachweisbar [Lanzetta et al., 1979; Adelt, 1999]. Der obige angesäuerte Aliquot wurde mit 100 μl Malachitgrün-Reagenz versetzt. Nach ca. 1 min wurden 10 μl Färbelösung [34 % (w/v) *tri*-Natriumcitrat * 2 H_2O] zugegeben. Die vollständige Farbentwicklung war unter Schütteln (80 Upm) nach 20 min abgeschlossen. Die Extinktion wurde an einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 595 nm bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch eine KH_2PO_4 -Kalibriergerade.

2.7 Aufreinigung eines Phytat-abbauendes Enzyms

2.7.1 Aufschluss des Pflanzenmaterials

Für den Aufschluss wurden etwa 7 Tage alte Keimblätter von *Cannabis sativa* verwendet. Diese wurden mit Aufschlusspuffer [50 mM Bis-Tris; 1 mM EDTA; 20 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; pH 6,0] versetzt und mechanisch aufgeschlossen. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation [30 min, 10000 Upm, 4 °C] entfernt. Der Überstand wurde dann für weitere Aufreinigungsschritte eingesetzt.

2.7.2 (NH₄)₂SO₄-Fällung

Der erhaltene Rohextrakt (siehe 2.7.1) wurde im Eisbad gerührt. In Abhängigkeit vom Volumen des eingesetzten Rohextrakts wurde eine definierte Menge an (NH₄)₂SO₄ zugesetzt. Die zu erzielende Sättigung lag bei 35 % [Scopes, 1994]. Nachdem sich das Ammoniumsulfat vollständig gelöst hatte, wurden die präzipitierten Proteine mittels Zentrifugation entfernt [10 min, 4000 Upm, 4 °C]. Der Überstand wurde für weitere Aufreinigungsschritte verwendet (siehe 2.7.3).

2.7.3 Biochromatographie

Zur Anreicherung des gesuchten Proteins wurden Säulenchromatographien durchgeführt. Alle Chromatographien wurden sofern nicht anders beschrieben bei 4 °C durchgeführt. Für Aufgabe und Elution der Proben wurde eine peristaltische Pumpe verwendet. Die Flussrate lag, sofern nicht ausdrücklich erwähnt, bei 1 ml/min. Zum Nachweis von Proteinen wurde die Extinktion des Eluats bei 280 nm durch ein UV-Photometer mit Durchflussküvette bestimmt und direkt aufgezeichnet. Die Fraktionierung erfolgte manuell.

2.7.3.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die Fraktionen aus der (NH₄)₂SO₄-Fällung wurden direkt auf eine vorher mit Aufgabepuffer [0,1 M Natriumacetat; 1 M (NH₄)₂SO₄; pH 5,0] äquilibrierte Säule mit Phenyl-Sepharose gegeben. Nach Aufgabe der Probe wurde die Säule erneut mit obigem Puffer gespült. Nachdem kein ungebundenes Protein mehr von der Säule eluierte, wurden die gebundenen Proteine mit Elutionspuffer [0,1 M Natriumacetat; pH 5,0] von der Säule entfernt.

2.7.3.2 Lektinchromatographie

Das verwendete Säulenmaterial bestand aus ConA-Sepharose, die vor der Verwendung mit Aufgabepuffer [20 mM Tris; pH 7,0] äquilibriert wurde. Die Proteinfraction aus 2.7.3.1 wurde direkt auf die Säule gegeben. Nicht gebundenes Protein wurde anschließend durch Spülen mit Aufgabepuffer entfernt. Im letzten Schritt wurden die gebundenen Proteine durch Elutionspuffer [20 mM Tris; 1 M Glucose; pH 7,0] von der Säule eluiert und aufgefangen.

2.7.3.3 Affinitätschromatographie an Heparin-Agarose

Das Säulenmaterial wurde zunächst mit Aufgabepuffer [20 mM Natriumacetat; pH 5,0] äquilibriert. Die Fraktion aus 2.7.3.2 wurde direkt auf die Säule gegeben. Nicht gebundenes Protein wurde durch Spülen mit Aufgabepuffer entfernt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mittels eines linearen Gradienten. Die manuell fraktionierten Proben wurden anschließend auf Aktivität untersucht (siehe 2.6.2) und positive Proben gepoolt.

2.7.3.4 Größenausschlußchromatographie

Das Säulenmaterial, Sephadex G-75, wurde mit Puffer [20 mM Natriumacetat, pH 5,0] äquilibriert. Anschließend wurde die einkonzentrierte Probe (siehe 2.7.3.3) aufgegeben. Bei einer Flussrate von 0,5 ml/min wurde manuell ab dem ersten detektierten Protein fraktioniert.

2.8 HPLC-MDD-Analytik

2.8.1 Präparation des Pflanzenmaterials

Die Präparation von Proben für die HPLC-MDD-Analytik erfolgte für Zellmaterial aus Suspensionskulturen und für Pflanzenmaterial vom initialen Schritt abgesehen auf identische Weise. Die Zellen aus Suspensionskulturen wurden vor dem Aufschluss mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen, um anhaftendes Medium zu entfernen. Dieser vorgeschaltete Reinigungsschritt war bei Material von Versuchspflanzen nicht notwendig. Zur Gewinnung der Zellextrakte erfolgte als erster Schritt die Homogenisierung des Zellmaterials. Dazu wurde dieses mit 2 ml 2 M Perchlorsäure, 200 µl 100 mM EDTA und 20 µl 100 mM Natriumfluorid je Gramm Frischgewicht versetzt und aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation [5000 Upm, 5 min, 4 °C] entfernt. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mit 4 M KOH auf einen pH-Wert zwischen 5 und 6 eingestellt. Das bei diesem pH-Wert präzipitierende Kaliumperchlorat wurde durch Zentrifugation [5000 Upm, 5 min, 4 °C] aus der Lösung entfernt. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mit 400 µl Aktivkohlesuspension [20 % (w/v) Aktivkohle; 100 mM NaCl; 50 mM Natriumacetat; pH 4] je g Frischgewicht versetzt. Die Aktivkohle adsorbiert Nukleotide, die auf diese Weise aus der Lösung entfernt werden. Die Aktivkohle wurde sedimentiert [6000 Upm, 5 min, 4 °C] und das Pellet mit 1 ml Waschlösung [0,1 M NaCl; 5 mM NaF; 1 mM EDTA; pH 5] je g Frischgewicht resuspendiert. Die Probe wurde erneut zentrifugiert [6000 Upm, 5 min, 4 °C] und beide Überstände vereinigt. Die Trocknung der Proben erfolgt durch Lyophilisation. Bis zur HPLC-MDD-Analytik wurden die Proben des Pflanzenmaterials bei -80 °C gelagert.

2.8.2 Analytik der Inositolphosphate mittels HPLC-MDD

2.8.2.1 HPLC-MDD – Messprinzip und Aufbau

Inositolphosphate verfügen über keine chromophoren Gruppen, daher sind sie weder im UV-, noch im sichtbaren Wellenlängenbereich detektierbar. Diese Problematik wird durch ein Verfahren zur Nachsäulenderivatisierung behoben [Mayr et al., 1990]. Dabei erfolgt nach der chromatographischen Trennung der Inositolphosphate die Beimischung des Farbstoffs 4-(2-Pyriylazo)resorcinol (PAR) sowie von Yttrium(III)-

Ionen. Das Verfahren wird daher als HPLC-metal dye detection kurz HPLC-MDD bezeichnet. Der einzeln gelbe Farbstoff PAR chelatiert in alkalischem Milieu Yttrium(III)-Ionen zu einem rot gefärbten Komplex. Der daraus resultierende bathochrome Shift stellt sich bei 546 nm als Extinktionsminderung dar. Die in den Chromatogrammen gezeigten positiven Signale sind das Ergebnis einer Vorzeichenumkehr der detektierten Extinktionen.

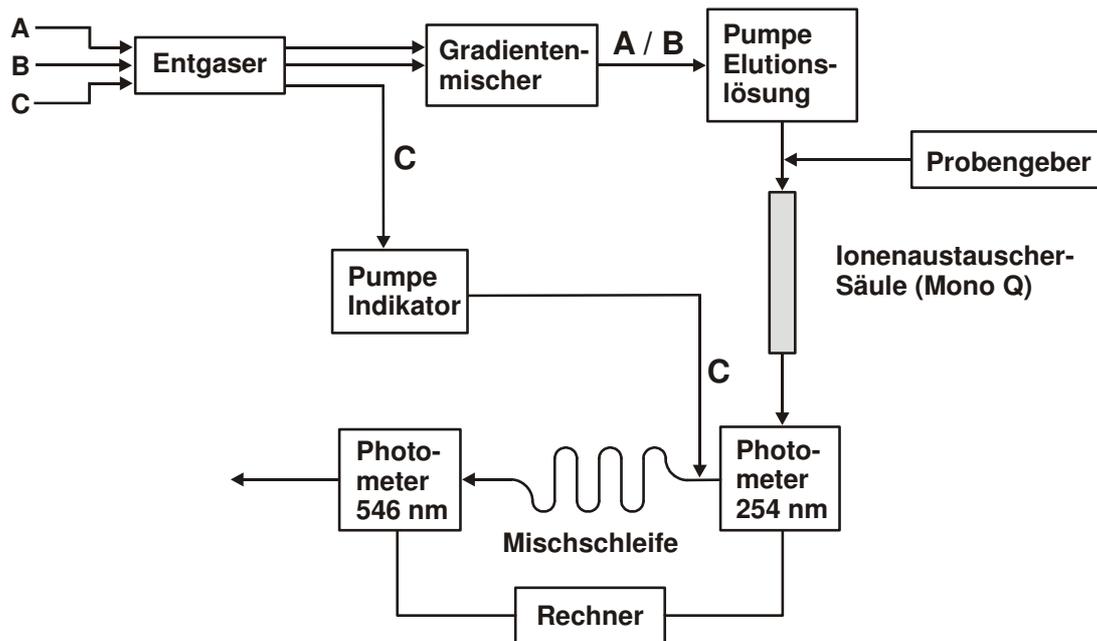


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau der HPLC-MDD-Anlage

Es werden zunächst die drei verwendeten Lösungen entgast. Der benötigte HCl-Gradient wird vor Erreichen der Säule mittels eines Gradientenmischer eingestellt und gelangt dann auf die Säule. Nach der UV-Detektion des Eluats wird dieses mit Lösung C, dem eigentlichen Färbereagens, vermischt. Anschließend wird das gefärbte Eluat im zweiten Photometer bei 546 nm auf Inositolphosphate untersucht.

Der schematische Aufbau der Anlage ist in Abbildung 2.1 wiedergegeben. Die präparierten Proben wurden in 2 ml H₂O gelöst und über einen Autosampler mit einer 1 ml Injektionsschleife aufgebracht. Bei einer Flussrate von 1,5 ml/min durchlief die Probe zuerst die Vorsäule und dann die Hauptsäule. Die am Anionentauscher gebundenen Inositolphosphate wurden mit einem optimierten Gradienten eluiert (siehe 2.8.2.2). Im ersten Photometer wurden zunächst bei 254 nm Nukleotide und andere UV-absorbierende Substanzen nachgewiesen. Dann wurde im Verhältnis zwei Teile Eluat mit einem Teil Nachsäulenderivatisierungsreagens mit PAR-Indikatorlösung [2 M Tris; 200 µM PAR; 30 µM YCl₃, 10 % (v/v) MeOH; pH 9,1] gemischt. Im zweiten Photometer wurde dann die Extinktion des Gemisches bei 546 nm gemessen. Beide Kanäle wurden an einem angeschlossenen Computer

dargestellt. Durch die synchrone Darstellung beider Chromatogramme war es möglich, zwischen phosphorylierten Substanzen, wie Inositolphosphaten und solchen mit UV-Aktivität, z.B. Nukleotiden zu unterscheiden.

Das Signal zum Start des Laufes und die Datenaufzeichnung wurden vom Autosampler an Controller und Computer übermittelt. Die Steuerung von Pumpen, Gradientenmischer und Photometern wurden zentral über den Controller gesteuert. Die Elution erfolgte ausschließlich mit einem linearen Gradienten (siehe 2.8.2.2). Die Auswertung der aufgezeichneten Chromatogramme erfolgte mit Hilfe des Programms EZChrom (V6.1, Scientific Software).

2.8.2.2 Elution mit einem pH- und Chlorid-Gradienten (HCl-System)

Für die Elution der Inositolphosphate wurde ein kombinierter pH- und Chlorid-Gradient verwendet. Der benutzte lineare Gradient (0 min, 0 % B; 70 min, 100 % B; 100 min, 100 % B; Flussrate 1,5 ml/min) bestand aus 0,2 mM HCl (Lösung A) und 0,5 M HCl (Lösung B). Die PAR-Indikatorlösung wurde mit einer Flussrate von 0,75 ml/min in das System gegeben (siehe Abb. 5).

2.8.2.3 Identifizierung der Inositolphosphatisomere und Herkunft der Referenzsubstanzen

Die Isomere der einzelnen Inositolphosphate wurden durch Kochromatographie identifiziert. Die dazu verwendeten Substanzen stammten aus dem Bestand der Arbeitsgruppe Altenbach der Organischen Chemie der Bergischen Universität Wuppertal.

2.8.2.4 Bestimmung der Stereochemie von Inositolphosphaten

Die Identifizierung der absoluten Konfiguration von Stereoisomeren erfolgte mittels eines Phytat-abbauenden Enzyms aus *Dictyostelium discoideum*, welches als enzymatisches Werkzeug verwendet wurde. Nach dem Aufschluss (siehe 2.4.6) wurden die Zellen mit Triton X-100 solubilisiert und anschließend mittels sequentieller Biochromatographie über Q-Sepharose und Source 15Q partiell aufgereinigt. Die beim Abbau entstehenden Inositolphosphate bildeten ein für das jeweilige Isomer typisches Muster. Anhand dieses Musters konnte die Konfiguration einzelner isolierter Inositolphosphate aus biologischen Proben bestimmt werden [Adelt et al., 2001; Adelt et al., 2003].

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zum Metabolismus von Inositolpolyphosphaten in Pflanzen

3.1.1 Quantifizierung von Inositolpentakis- und Inositolhexakisphosphat in ausgewählten Zellkulturen

Bisher ist wenig über die Gehalte an Inositolphosphaten in Zellkulturen bekannt daher, wurden zunächst einige Suspensionskulturen ausgewählter Pflanzen auf ihre Gehalte an InsP_5 und InsP_6 untersucht. Die verwendeten Kulturen waren vorher bezüglich ihrer Pflegeintervalle synchronisiert worden. Die Ergebnisse geben die Gesamtmengen der beiden untersuchten Isomere wieder, ohne zwischen einzelnen Stellungsisomeren zu diskriminieren (siehe Tab. 3.1). Die Bestimmung der Inositolphosphatgehalte erfolgte mittels HPLC-MDD (siehe 2.8.2).

Art	nmol InsP_5 pro g FG	nmol InsP_6 pro g FG
<i>Nicotiana tabacum</i>	n.n.	10,5
<i>Pimpinella anisum</i>	0,8	15,0
<i>Solanum lycopersicum</i>	n.n.	7,3
<i>Triticum aestivum</i>	n.n.	6,5
<i>Prunus dulcis</i>	n.n.	11,5
<i>Spinacea oleracea</i>	0,8	2,8
<i>Corydalis sempervivens</i>	0,3	4,2
<i>Glycine max</i>	2,4	4,4
<i>Cannabis sativa</i>	42,5	6,1

Tab. 3.1: Gehalte der Inositolpentakis- und Inositolhexakisphosphate in ausgewählten Suspensionskulturen

In der Tabelle sind die gemessenen Gehalte an InsP_5 und InsP_6 dargestellt. Bestimmt wurden die Gesamtmengen der beiden Inositolphosphate ohne zwischen verschiedenen Isomeren zu unterscheiden oder diese zu identifizieren. Konnten keine Inositolphosphate nachgewiesen werden, wurde dies kenntlich gemacht (n.n.; nicht nachweisbar).

In den untersuchten Kulturen von *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicum*, *Triticum aestivum* und *Prunus dulcis* konnte kein InsP₅ nachgewiesen werden (siehe Tab. 3.1). Die Gehalte an InsP₆ lagen für *Nicotiana tabacum* bei 10,5 nmol/g Fg und für *Solanum lycopersicum* bei 7,3 nmol/g Fg. In *Triticum aestivum* und *Prunus dulcis* konnten 6,5 bzw. 11,5 nmol InsP₆/g Fg detektiert werden. In den übrigen untersuchten Suspensionskulturen konnten sowohl InsP₅ als auch InsP₆ nachgewiesen werden. Dabei war der Gehalt an InsP₆ durchweg höher als die ermittelte Menge an InsP₅. Eine Ausnahme zeigte sich unter allen Bestimmungen lediglich für *Cannabis sativa*. Hier war die Menge an endogenem InsP₆ zwar mit den anderen untersuchten Arten vergleichbar, aber der Gehalt an detektierten InsP₅ lag um den Faktor sieben höher. Weder die große Menge an InsP₅ noch ein ähnliches Verhältnis der Gehalte an InsP₅ und InsP₆ war bei den anderen untersuchten Suspensionskulturen zu irgendeinem Zeitpunkt nachweisbar. Aufgrund dieser Auffälligkeit konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen an Suspensionskulturen zunächst auf *Cannabis sativa*.

3.1.2 Untersuchung des zeitabhängigen Metabolismus von Inositolphosphaten in Suspensionskulturen von *Cannabis sativa* L.

Nach den Ergebnissen aus 3.1.1 war es von Interesse zu erfahren, welchen Einfluss exogenes Inositol auf die Gehalte an ausgewählten Inositolpolyphosphaten in Zellen in Suspensionskultur hat. Die für diese Untersuchung verwendeten Zellen stammten jeweils aus einer Ausgangskultur. Um Kontaminationen, sowie erhöhten Stress für die Zellkulturen durch eine regelmäßige Probennahme zu verhindern wurden die Ansätze für die einzelnen Messzeitpunkte in separaten Gefäßen angezogen und jeweils komplett geerntet und aufgearbeitet (siehe 2.8.1). Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 3.1 und 3.2 dargestellt. Es zeigte sich, dass in inositolfreiem und inositolhaltigem Medium gezogene Suspensionskulturen jeweils nur ein InsP_5 -Isomer aufwiesen. Dabei handelte es sich um D-/L- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$. Bei der Zugabe von InsP_6 ins Medium zeigte sich noch ein weiterer InsP_5 -Peak (siehe Abb. 3.1), welcher durch Aufstockung als D-/L- $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ identifiziert werden konnte. Wie im Vergleich der Chromatogramme von Zellen aus InsP_6 -haltigem und inositolfreiem Medium zu erkennen ist, tritt der zweite InsP_5 -Peak exklusiv beim Zusatz von InsP_6 ins Medium auf (siehe Abb. 3.1). Für alle drei Ansätze konnte eine gemeinsame Tendenz über den Messzeitraum beobachtet werden. So stiegen die Werte von D-/L- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ im Versuchszeitraum zunächst an, um dann zum Ende der Untersuchung wieder leicht zu sinken. Diese Entwicklung war nicht bei allen Ansätzen gleich stark ausgeprägt, aber immer erkennbar (siehe Abb. 3.2).

Eine eingehende Betrachtung erbrachte noch weitere Auffälligkeiten (siehe Abb. 3.2). In inositolfreiem Medium fanden sich 20 bis 30 nmol InsP_5 /g Fg. Der höchste Wert stellte sich nach sieben Tagen im Medium ein. Der Gehalt an InsP_6 blieb weitgehend konstant um 3 nmol/g Fg. Beim detektierten InsP_5 handelte es sich ausschließlich um das bereits eingangs beschriebene D-/L- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$.

Im inositolhaltigem Medium liegen die Gehalte der untersuchten Inositolphosphate durchweg höher als im inositolfreiem Medium. In inositolhaltigem Medium lag der Gehalt für InsP_5 nach zwei Tagen bei 32 nmol/g Fg, stieg dann nach dem fünften Tag auf über 40 nmol/g Fg an. Die detektierte Menge an InsP_5 blieb bis zum zehnten Tag relativ konstant, ehe sie zum letzten Messtag um über 50 % abnahm. Der Gehalt an InsP_6 erreichte nach fünf Tagen mit etwa 6 nmol/g Fg sein intrazelluläres Maximum.

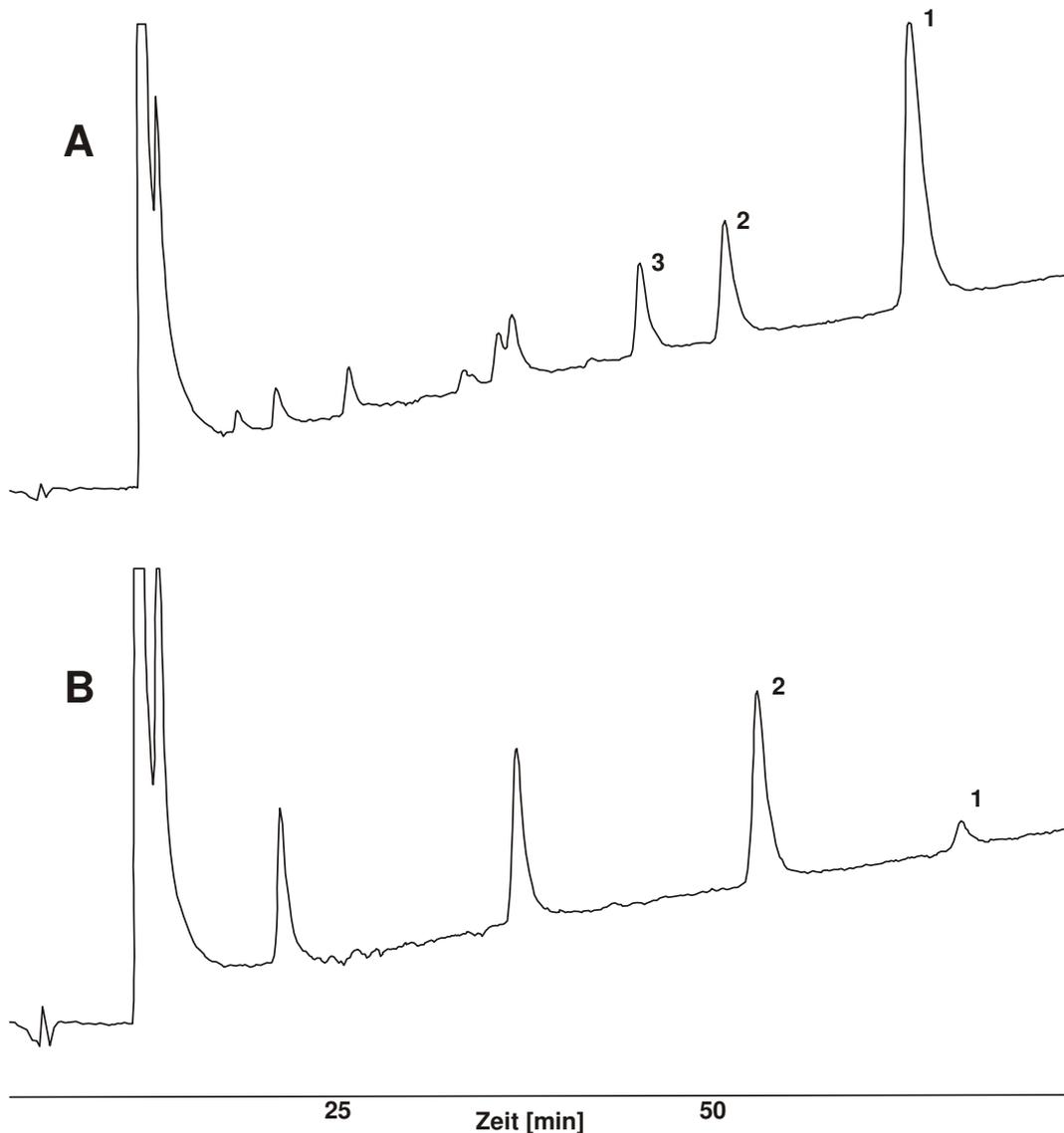


Abb. 3.1: Nachweis verschiedener Inositolphosphate in Zellen von *Cannabis sativa* aus Suspensionskultur

Dargestellt sind die Inositolphosphate in Suspensionskulturen aus *Cannabis sativa*, die in unterschiedlichen Medien gezogen wurden. **A** zeigt die Inositolphosphate aus Zellen mit InsP_6 -haltigem Medium (4 mM), während **B** die aus inositolfreiem Medium zeigen. Die Identifizierung der markierten Inositolphosphate erfolgte mittels Aufstockung durch Standardisomere. Die bezifferten Inositolphosphate sind InsP_6 (**1**), $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ (**2**) und D-/L- $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ (**3**).

An den Messtagen 7, 10 und 14 schwankten die Werte von InsP_6 im inositolhaltigen Medium leicht, blieben in einem Bereich zwischen 3 und 5 nmol/g Fg aber relativ konstant. Ebenso wie im inositolfreien Medium konnte hier nur ein InsP_5 -Isomer detektiert werden, welches als D-/L- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ identifiziert wurde. Im Medium, dem InsP_6 zugesetzt wurde, zeigten sich insgesamt drei höher phosphorylierte Inositolphosphate.

Neben InsP_6 fanden sich hier beide oben beschriebene InsP_5 -Isomere (siehe Abb. 3.1). Im Vergleich zu den InsP_6 -freien Ansätzen lag der InsP_6 -Gehalt nach zwei Tagen mit etwa 28 nmol/g Fg deutlich höher als in den beiden anderen untersuchten Ansätzen. In den folgenden drei Tagen sank der Gehalt an InsP_6 geringfügig auf 24 nmol/g Fg. Am nächsten Messpunkt, nach sieben Tagen, ging die detektierte Menge jedoch deutlich zurück und stellte sich bis zum Ende der Messreihe auf einen Wert um 10 nmol/g Fg ein. Beim Vergleich der Gehalt von D-/L- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ in inositolhaltigem und InsP_6 -haltigem Medium waren nach zwei Tagen keine Unterschiede zu erkennen. Beide Werte lagen knapp über 30 nmol/g Fg. Im InsP_6 -haltigem Medium entwickelte sich das Niveau an D-/L- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ dann jedoch anders als im inositolhaltigen Medium. Es konnte ein deutlich stärkerer Anstieg des intrazellulären Niveaus an D-/L- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ festgestellt werden. Im InsP_6 -haltigen Medium wurden nach fünf Tagen Werte von 45 bis 50 nmol/g Fg erreicht. Dieser Gehalt nahm erst am letzten Messtag geringfügig ab. Das zweite detektierte InsP_5 , D-/L- $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$, wurde nach zwei Tagen mit knapp 10 nmol/g Fg quantifiziert. An den folgenden Messtagen nahm die nachweisbare Menge kontinuierlich ab. Nach 14 Tagen waren nur noch rund 2 nmol/g Fg zu detektieren.

Die Entdeckung eines zweiten InsP_5 , D-/L- $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$, in InsP_6 -haltigen Medien war auffällig, daher wurde der Versuch mit unterschiedlichen InsP_6 -Konzentrationen wiederholt. Dazu wurden im Vergleich zu den vorherigen Versuchen (siehe Abb. 3.2) größere Anzuchtgefäße verwendet, so dass sich die Ergebnisse leicht verändert darstellten und die detektierten intrazellulären Gehalte geringe Unterschiede aufwiesen (siehe Abb. 3.3). Bei einer Konzentration von 0,5 mM InsP_6 konnten nur geringe Unterschiede zum Medium mit Inositol festgestellt werden. Vier Tage nach dem Umsetzen in das 0,5 mM InsP_6 -haltige Medium verdoppelte sich der intrazelluläre Gehalt an InsP_6 . Bei dieser geringen Konzentration zeigte sich, verglichen mit den höheren Konzentrationen an InsP_6 im Medium, der höchste intrazelluläre Gehalt an InsP_6 erst nach vier Messtagen. Der InsP_6 -Gehalt sank dann im Laufe des Versuchs wieder ab, während sich für D-/L- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ nach 11 Tagen ein Maximum einstellte (siehe Abb. 3.3). Ab Tag 11 hat sich das Verhältnis zwischen D-/L- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ und InsP_6 so eingestellt, wie es aus den vorherigen Versuchen bekannt war, d.h. mit einem deutlich höheren Gehalt des InsP_5 -Isomers (siehe Abb. 3.2).

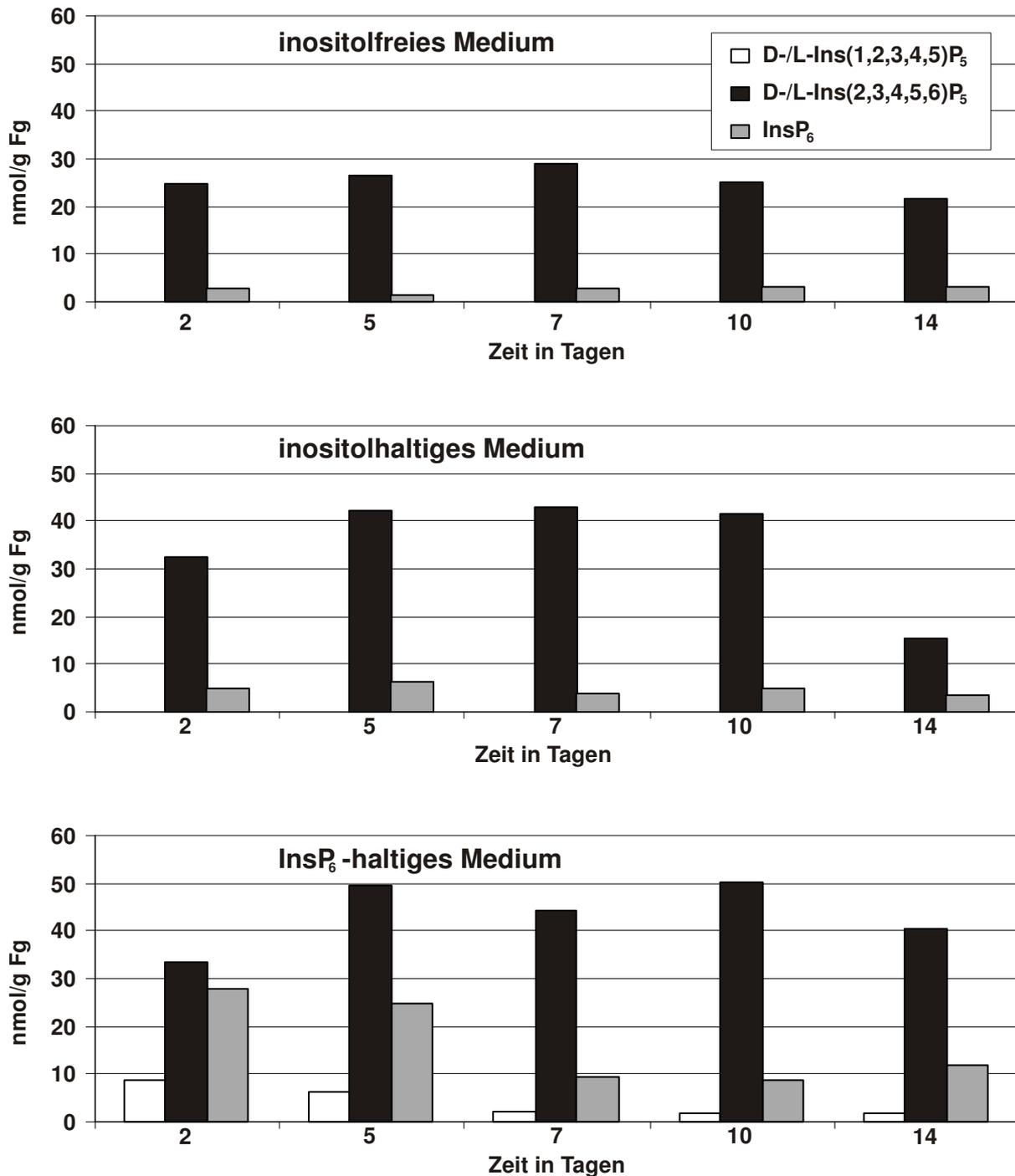


Abb. 3.2: Entwicklung der Gehalte an Inositolpolyphosphaten in Suspensionskulturen von *Cannabis sativa* in unterschiedlichen Medien

Suspensionskulturen von *Cannabis sativa* wurden in drei verschiedenen Medien (inositolfrei, inositolhaltig und mit InsP₆ als einzige Inositolquelle) angezogen. Die Ernte, Aufschluss und Analytik der Zellen erfolgte wie unter 2.8 beschrieben. Um Kontaminationen und Stress für die Kulturen zu vermeiden, wurden die jeweiligen Ansätze in separaten Kolben angezogen. Die Ernte erfolgte zu den festgelegten Zeitpunkten, dabei wurden mindestens zwei Kolben unabhängig voneinander aufgeschlüsselt. Um gleiche Ausgangsbedingungen zu gewährleisten, stammten die eingesetzten Zellen aus einem einzigen Ansatz. Die Anzucht dieser Ausgangszellen erfolgte in inositolhaltigem Standardmedium (siehe 2.4.1).

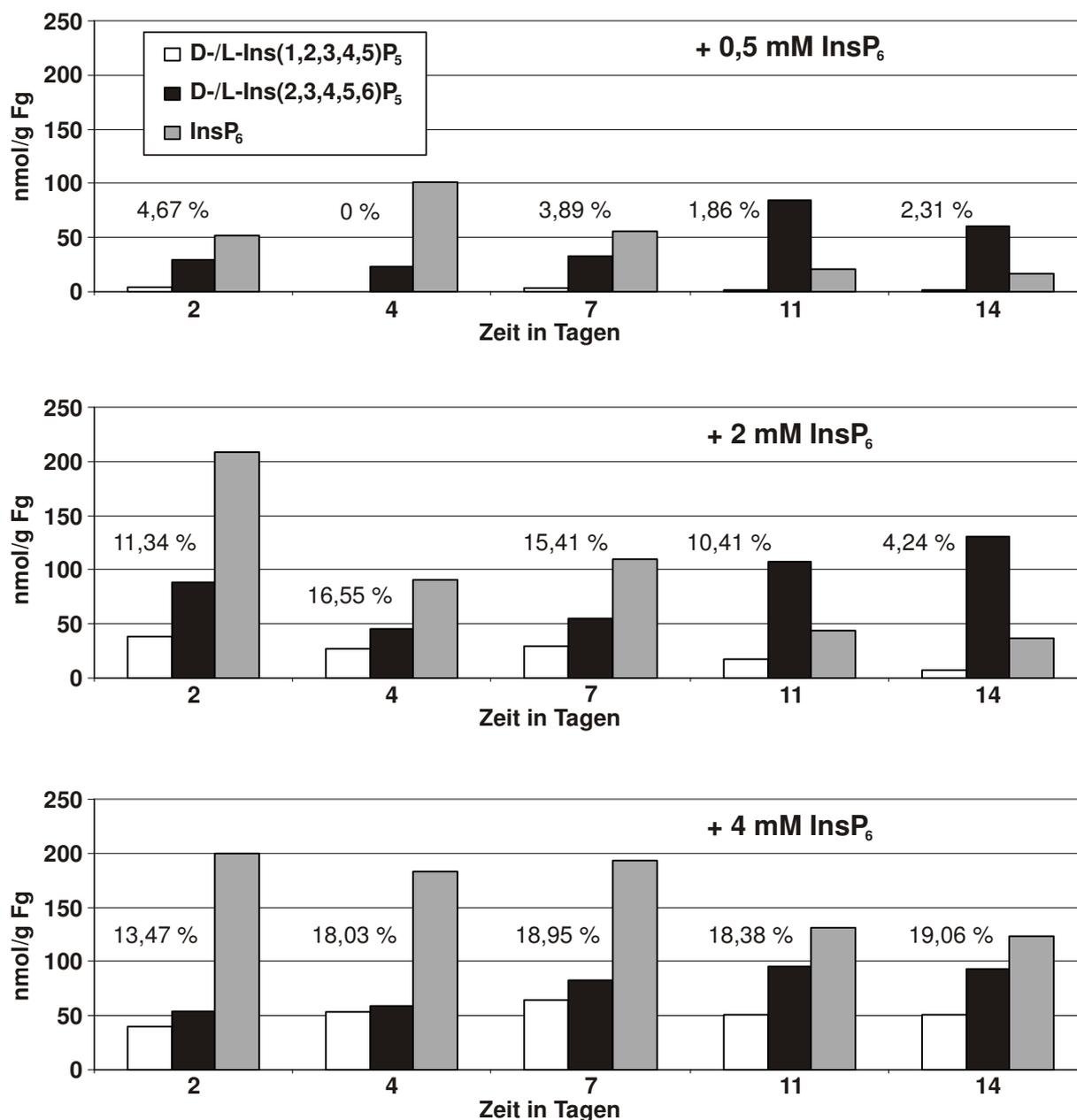


Abb. 3.3: Gehalte an Inositolpentakis- und Inositolhexakisphosphat in Zellen von *Cannabis sativa* in Medien mit unterschiedlichen Konzentrationen an Inositolhexakisphosphat

Gezeigt werden die Gehalte der beiden InsP₅-Isomere und von InsP₆. Den Medien wurden in unterschiedlichen Konzentrationen InsP₆ zugesetzt. Die Konzentrationen im Medium lagen bei 0,5 mM, 2 mM und 4 mM InsP₆. Die angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf den Anteil von D-/L-Ins(1,2,3,4,5)P₅ an der Gesamtmenge der Inositolpolyphosphate.

Bei einer InsP₆-Konzentration von 0,5 mM lag der Anteil von D-/L-Ins(1,2,3,4,5)P₅ nach zwei Tagen bei unter 5 % der Gesamtmenge an untersuchten Inositolpolyphosphaten. Der Anteil pendelte über den Versuchszeitraum in einem Bereich um 2 % der Gesamtmenge. Beim Vergleich der unterschiedlichen Konzentrationen an InsP₆ fällt auf, dass mit zunehmender Konzentration an InsP₆ im Medium auch der intrazelluläre Gehalt an InsP₆ deutlich ansteigt und bis auf 200

nmol/g Fg ansteigt. Bei 2 mM InsP₆ sinkt der intrazelluläre Gehalt im Zeitraum zwischen dem zweiten und vierten Messtag im Vergleich zum höher konzentrierten Ansatz relativ schnell unter 100 nmol/g Fg. Bei einer InsP₆-Konzentration von 4 mM InsP₆ im Medium blieb der intrazelluläre Gehalt an InsP₆ zunächst rund sieben Tage konstant hoch bei 200 nmol/g Fg. Erst nach 11 Tagen sank der Gehalt um rund 35 % und blieb bis zum Ende der Messung nach 14 Tagen auf diesem recht hohen Niveau. Neben *Cannabis sativa* wurde auch *Nicotiana tabacum* als Suspensionskultur angezogen und in Medium mit InsP₆ kultiviert. Die Zellen zeigten im Versuchsverlauf über 7 Tage eine kontinuierliche Zunahme an InsP₆. InsP₅ oder andere Isomere konnten hingegen nicht detektiert werden. Trotz eines Gehalts von 2 mM InsP₆ im Medium konnten maximal 3,3 nmol/g Fg in den Zellen des Tabaks nachgewiesen werden. Die Zellen reagierten im Vergleich zu denen von *Cannabis sativa* deutlich langsamer auf exogen angebotenes InsP₆. Außerdem erreichen die ermittelten Werte nicht annähernd die Gehalte, die in Hanf unter gleichen Bedingungen detektiert wurden.

3.1.3 Identifizierung des dominanten Inositolpentakisphosphats in ausgewählten Cannabaceen

Zur Familie Cannabaceae gehört neben der Gattung *Cannabis* noch die Gattung *Humulus*. Um herauszufinden, ob das in *Cannabis sativa* entdeckte dominante InsP_5 auch für Vertreter der Gattung *Humulus* kennzeichnend ist, wurden zusätzlich Analysen im Hopfen, *Humulus lupulus*, und der annualen Zierpflanze *Humulus japonicus* durchgeführt. Dabei wurden die Gehalte an InsP_5 und InsP_6 in Jungpflanzen untersucht. Auf diese Weise konnte auch überprüft werden, ob sich die Zusammensetzung der Inositolphosphate in Zellkulturen und normal entwickelten Pflanzen unterscheidet. Dazu wurden die gesamten oberirdischen Teile von vier Wochen alten Pflanzen für die Analyse der Inositolphosphate eingesetzt. Bei der Untersuchung zeigte sich in allen drei Arten, dass es ein dominantes InsP_5 gibt, welches zusammen mit InsP_6 den mengenmäßig größten Anteil der löslichen Inositolphosphate ausmacht (siehe Abb. 3.4).

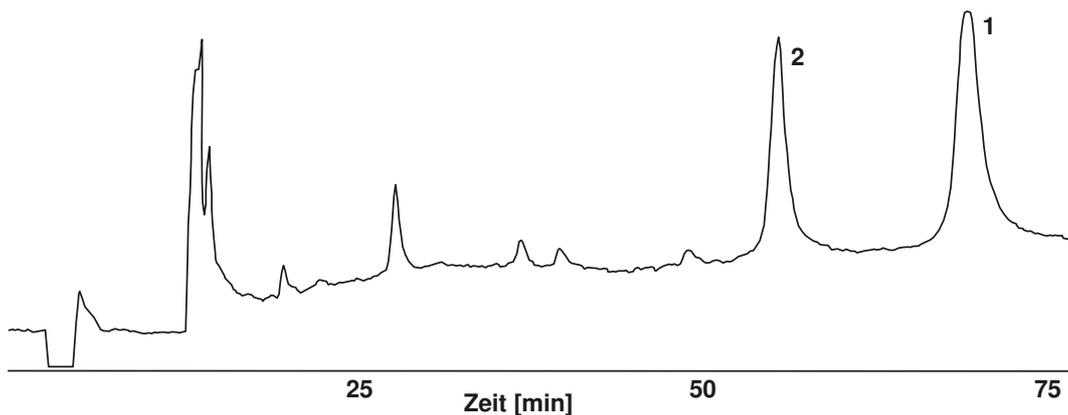


Abb. 3.4: Inositolphosphate in Jungpflanzen von *Humulus japonicus*

Dargestellt sind die in einem Pflanzenextrakt aus *H. japonicus* isolierten und mittels HPLC-MDD detektierten Inositolphosphate. Durch Aufstockung mit Standardsubstanzen wurden die mit 1 und 2 gekennzeichneten Peaks identifiziert. Es handelt sich dabei um InsP_6 (1) und D-/L- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ (2), die hier die dominanten Inositolphosphate sind.

Beide Isomere zusammen machten etwa 90 % der Gesamtmenge an detektierten Inositolphosphaten aus. Das dominante InsP_5 ließ sich durch Aufstockung in allen drei untersuchten Arten der Gattung als D-/L- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ identifizieren. Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Suspensionskulturen von *Cannabis sativa* (siehe 3.1.1). Daraus lässt sich ableiten, dass D-/L- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ auch in anderen Vertretern der Familie nachweisbar ist und dass die Zusammensetzung der Inositolphosphate in Suspensionskulturen nicht gravierend von den Verhältnissen in Pflanzen mit natürlichem Habitus abweicht.

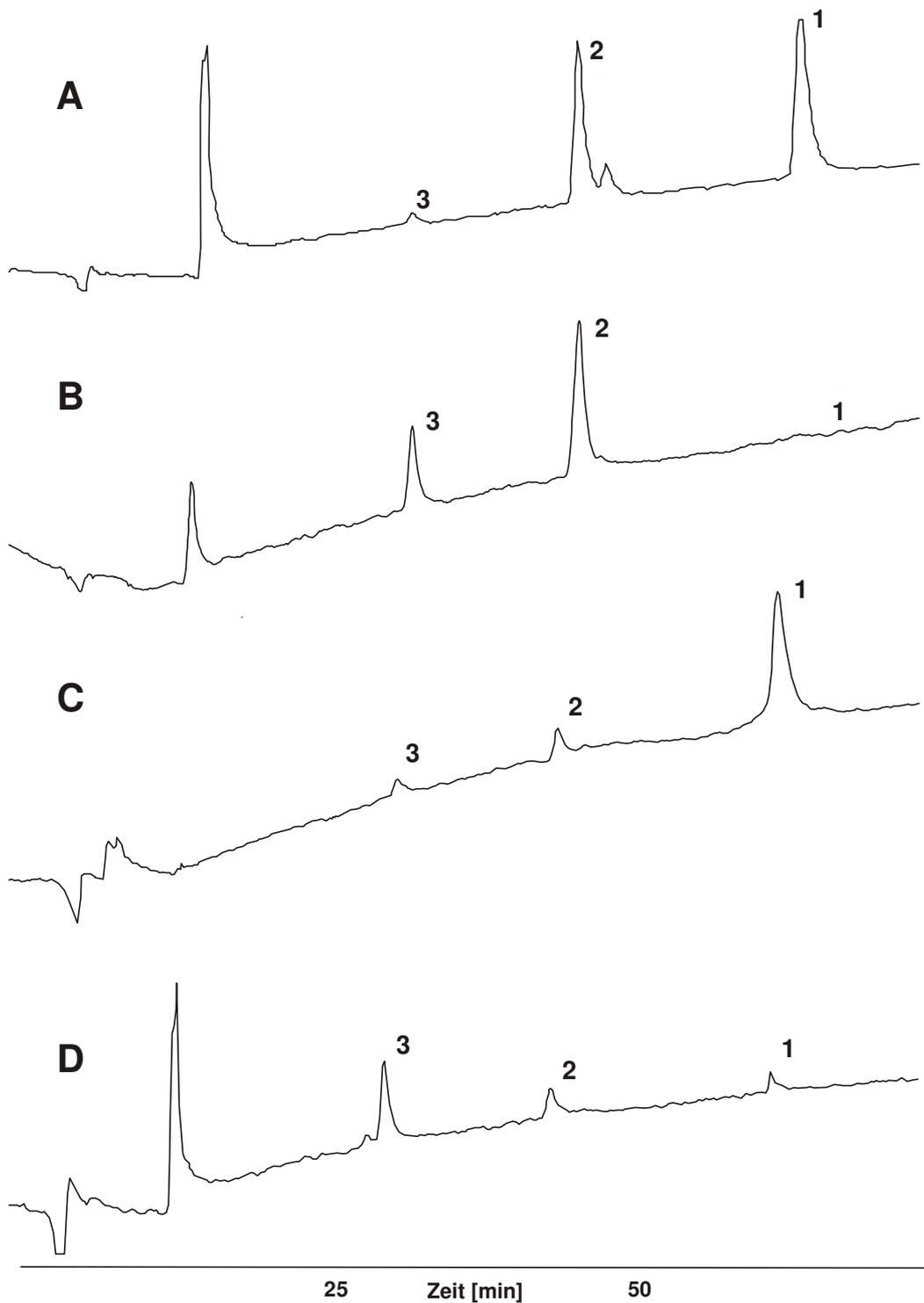


Abb. 3.5: Abbau von isolierten Inositolpentakisphosphaten verschiedener Pflanzen zur Bestimmung der absoluten Konfiguration

Die aus verschiedenen Pflanzen isolierten InsP_5 wurden mittels einer Phytase dephosphoryliert. Die beim Abbau entstehenden Isomere sind charakteristisch für die eingesetzte Ausgangssubstanz $\text{D-Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ (1). Im Rahmen des Abbaus entstehen $\text{D-Ins}(2,3,4,5)\text{P}_4$ (2) und $\text{D-Ins}(2,3,4)\text{P}_3$ (3). Untersucht wurden die auftretenden Abbaumuster der Standardsubstanz $\text{D-Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ (A) sowie von isolierten InsP_5 -Isomeren aus *Cannabis sativa* (B), *Humulus lupulus* (C) und *Humulus japonicus* (D).

Wie bereits aus 3.1.1 bekannt unterscheidet sich die detektierbare Menge an InsP_5 in *Cannabis sativa* gravierend von denen anderer untersuchter Zellkulturen. Daher war eine genaue Bestimmung des InsP_5 sinnvoll, um der Funktion dieser Anomalie im Metabolismus der Cannabaceae auf die Spur zu kommen. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration erfolgte mit Hilfe einer Phytase aus *Dictyostelium discoideum* deren Stereoselektivität beim Abbau bekannt ist und welche deshalb als enzymatisches Werkzeug verwendet werden konnte (siehe 2.8.2.4). Beim Abbau einzelner Isomere entstehen charakteristische Abbauprodukte, so dass das jeweilige Substrat anhand der entstehenden Abbauisomere eindeutig zugeordnet werden kann. Als Referenzsubstanz diente u.a. D- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$. Die während des Abbaus entstehenden typischen Produkte von D- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ sind D- $\text{Ins}(2,3,4,5)\text{P}_4$ und D- $\text{Ins}(2,3,4)\text{P}_3$ (siehe Abb. 3.5). Sowohl für *Cannabis sativa* als auch bei *Humulus lupulus* und *Humulus japonicus* wurde ein dominantes InsP_5 isoliert und durch die oben erwähnte Phytase enzymatisch abgebaut. Es zeigten sich bei allen drei untersuchten Isomeren die gleichen Abbauprodukte wie beim untersuchten Standard D- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ (siehe Abb. 3.5). Daraus kann gefolgert werden, dass das dominante InsP_5 in den untersuchten Cannabaceae D- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ ist.

3.1.4 Einfluss des abiotischen Faktors Licht auf den endogenen Gehalt von Inositolpolyphosphaten in Keimlingen von *Cannabis sativa* L.

In diesem Versuchsteil wurde der Einfluss des abiotischen Faktors Licht auf die Mobilisierung von Inositolphosphaten im Laufe der Keimung untersucht. Die Anzucht erfolgte wie unter 2.4.2 beschrieben auf Recyclingpapier. Die Samen wurden vor Versuchsbeginn zwei Stunden gewässert. Bei den Dunkelkeimern erfolgten alle Arbeitsschritte unter Lichtausschluss. Die Ernte der Keimlinge erfolgte an drei aufeinander folgenden Zeitpunkten, dazu wurden nur Keimlinge verwendet, die sich im gleichen Entwicklungsstadium befanden. Dabei wurden die gesamten Pflänzchen für die Messung aufgearbeitet. Die ersten Proben wurden nach zwei Tagen genommen (siehe Abkürzungsverzeichnis: Phase I). Die Keimlinge hatten zu diesem Zeitpunkt eine deutlich ausgebildete Primärwurzel, Spross und Kotyledonen lagen noch in der Samenschale. Nach fünf Tagen wurde die zweite Probennahme vorgenommen. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Keimlinge neben der Primärwurzel auch Spross und Keimblätter ausgebildet (Phase II). Die Keimblätter waren bereits voll entwickelt. Die dritte Probennahme erfolgte nach sieben bis neun Tagen. Zu diesem Zeitpunkt waren am Keimling bereits deutlich die Primärblätter zu erkennen (Phase III). Der Habitus der Keimlinge im Licht und im Dunkeln wies, abgesehen vom Etiolelement, keine nennenswerten Unterschiede auf.

	2 Tage	5 Tage	7 Tage	2 Tage	5 Tage	7 Tage
D-/L-Ins(1,2,3,4,5)P₅	63,17	23,79	n.n.	84,59	26,68	19,41
Ins(2,3,4,5,6)P₅	237,9	459,19	366,52	713,5	455,36	202,5
InsP₆	3255,01	2015,49	343,01	653,26	1728,51	1099,13
in nmol/g Fg	Licht			Dunkelheit		

Tab. 3.2: Lichtabhängige Mobilisierung der Inositolpolyphosphate in Keimlingen von *Cannabis sativa*

Die Tabelle zeigt die mittleren Inositolphosphatgehalte der höher phosphorylierten Inositolphosphate in Keimlingen von *Cannabis sativa* zu drei unterschiedlichen Messzeitpunkten. Die Analysen erfolgten sowohl von im Dunkeln gezogenen Pflanzen, als auch von normal im Licht gekeimten Jungpflanzen. Die Angabe der Gehalte erfolgte in nmol/ g Fg (n.n. = nicht nachweisbar).

Bei den im Licht gezogenen Keimlingen zeigt sich nach zwei Tagen der höchste Gehalt an InsP₆. Nach fünf Tagen war dieser um über 30 % gesunken (siehe Tab.

3.2). Nach sieben Tagen waren noch etwa 10 % des Ausgangsgehalts an InsP_6 nachweisbar. Nach sieben Tagen lag der Gehalt an $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ geringfügig höher als der von InsP_6 . Der maximale Gehalt an $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ wurde nach fünf Tagen erreicht. Außerdem nahm der Gehalt an $\text{D-/L-Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ im Laufe des Versuchs sukzessiv ab und war bei den Lichtkeimlingen nach sieben Tagen nicht mehr detektierbar.

Bei den im Dunkeln gezogenen Keimlingen zeigte sich das Maximum für InsP_6 nach fünf Tagen. Der Gehalt von 1728,51 nmol/g Fg war deutlich unter dem bereits nach zwei Tagen detektierten Maximum der Lichtpflanzen, sowie niedriger als der Gehalt in den Lichtpflanzen zum gleichen Zeitpunkt, also nach fünf Tagen. $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ erreichte sein Maximum bereits nach zwei Tagen. Des Weiteren ließ sich nach zwei Tagen eine größere Menge $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ nachweisen als dies für InsP_6 der Fall war. Auch bei den Dunkelpflanzen war das zweite InsP_5 , $\text{D-/L-Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ nachweisbar. Wie bei den Lichtpflanzen nahm es kontinuierlich ab, war jedoch am letzten Messtag noch in geringer Konzentration zu detektieren. Abgesehen von der Entwicklung des $\text{D-/L-Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$, die in beiden Ansätzen relativ identisch verläuft, zeigen die beiden anderen Inositolpolyphosphate im Licht und im Dunkeln unterschiedliche Entwicklungen ihrer intrazellulären Gehalte. Im Dunkeln fällt das nach fünf Tagen zu erkennende Maximum von InsP_6 auf, welches im Licht unmittelbar mit Beginn der Messung nachgewiesen wurde. Auch der Gehalt von $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ verhält sich in den beiden Ansätzen unterschiedlich. Im Dunkeln lässt sich nämlich zurzeit eine Abnahme des Gehalts über den Messzeitraum feststellen, während im Licht nach fünf Tagen ein Maximum erreicht wird.

3.1.5 Organspezifische Veränderungen der Gehalte von Inositolpolyphosphaten in ausgewählten Pflanzen

Die meisten bisher vorgestellten Ergebnisse wurden an Suspensionskulturen oder vollständigen Keimlingen erzielt. Wie sich die Konzentrationen der höher phosphorylierten Inositolphosphate, sowohl absolut als auch im Verhältnis zueinander, in pflanzlichen Organen im Rahmen von Wachstum und Entwicklung verhalten, ist nicht bekannt. Daher wurde im Verlauf dieser Arbeit eine umfangreiche Bestimmung der Gehalte von InsP_5 und InsP_6 in *Cannabis sativa* vorgenommen. Um auch die Gehalte einzelner Organe genauer bestimmen zu können, wurden diese separat geerntet und aufgearbeitet. Diese Untersuchungen wurden nicht nur für eine Entwicklungsphase durchgeführt, sondern für insgesamt neun verschiedene Phasen (Definition der Entwicklungsphasen siehe Abkürzungsverzeichnis), von der Keimung bis zur Blüte der Pflanze. Untersucht wurden dabei lediglich die oberirdischen Pflanzenteile. Die Sprosse wurden soweit möglich in einzelne oder in maximal aus zwei Internodien bestehende Segmente unterteilt und auf ihren Gehalt an Inositolphosphaten untersucht. Es wurden immer beide Blätter eines Nodiums für die Determination des Gehalts an Inositolphosphaten verwendet. Um eine ausreichende Menge an Pflanzenmaterial zur Quantifizierung zu erhalten, sowie eine ausreichende Varianz zu gewährleisten, wurden jeweils Pflanzenteile von mindestens sechs eigenständigen Pflanzen des gleichen Entwicklungsstadiums verwendet.

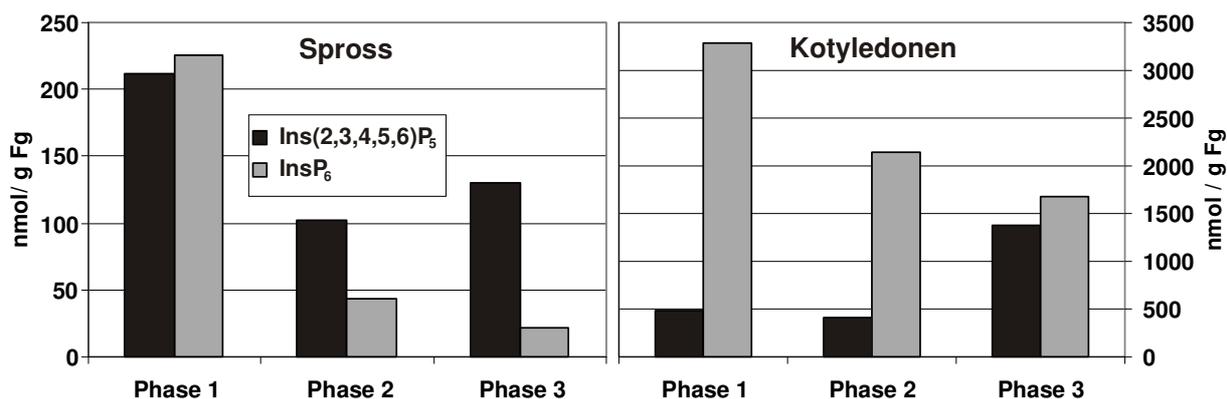


Abb. 3.6: Vergleichende Darstellung der Gehalte an Inositolphosphaten in oberirdischen Organen von *Cannabis sativa*

Die Abbildung zeigt die Gehalte der beiden vorherrschenden höher phosphorylierten Inositolphosphaten in verschiedenen Phasen der Keimung. Im linken Diagramm sind die Werte des Sprosses aufgetragen, rechts die in den Kotyledonen ermittelten Werte.

Die ersten Untersuchungen wurden in den Entwicklungsphasen eins bis drei durchgeführt. Dies sind die Phasen unmittelbar nach der Keimung, wenn die

Reservestoffe der Kotyledonen für das Wachstum des Keimlings mobilisiert werden. In Phase drei besitzt der Keimling vollständig entwickelte Kotyledonen und entspricht im Habitus einem typischen dikotyledonen Keimling. Grundsätzlich war der Gehalt an Inositolphosphaten im Spross deutlich niedriger als in den Keimblättern (siehe Abb. 3.6). In Phase eins lagen die Gehalte von InsP_6 und $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ im Spross auf dem gleichen Niveau. Im weiteren Verlauf der Entwicklung nehmen die Konzentrationen beider Inositolphosphate deutlich ab. Während in Phase drei die Menge an nachweisbarem InsP_6 um etwa 50 % abnimmt, im Laufe des Wachstums also eine sukzessive Abnahme an InsP_6 beobachtet wird, steigt der Gehalt an $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ bis zu diesem Messpunkt um rund 25 % an (siehe Abb. 3.6). In Phase eins zeigt sich in den Keimblättern zunächst ein extrem hoher Ausgangswert von InsP_6 . Der Gehalt an $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ liegt um den Faktor 6 niedriger, ist aber immer noch doppelt so hoch wie die im Spross detektierte Menge. Der Gehalt an InsP_6 sinkt auch in den Keimblättern im Messzeitraum kontinuierlich, während $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ in Phase zwei nur eine geringe Veränderung erfährt. In Phase drei ist jedoch ein deutlicher Anstieg des Gehalts an $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ auszumachen. Dies führt zu einem fast ausgeglichenen Verhältnis zwischen InsP_5 und InsP_6 auf einem sehr hohen Niveau von etwa 1500 nmol/g Fg (siehe Abb. 3.6). Der Gehalt an Inositolphosphaten sinkt bis zum folgenden Messzeitpunkt dramatisch ab (siehe Abb. 3.7). In den Phasen vier und fünf können jeweils weniger als 5 % der Gehalte der dritten Phase an InsP_6 und $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ in den Kotyledonen nachgewiesen werden. Ab der sechsten Wachstumsphase sind die Reservestoffe der Kotyledonen zunehmend aufgezehrt, so dass keine Inositolphosphate mehr detektiert werden konnten. Mit fortlaufender Entwicklung der Pflanzen sank der Gehalt an InsP_6 im Spross, während der Gehalt an $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ bis auf den zehnfachen Wert anstieg. Dabei zeigte sich bereits in den frühen Entwicklungsstadien der Pflanzen (siehe Abb. 3.7), dass ein Gefälle bezüglich des Gesamtgehalts an Inositolphosphaten von der Triebspitze zur Wurzel existiert.

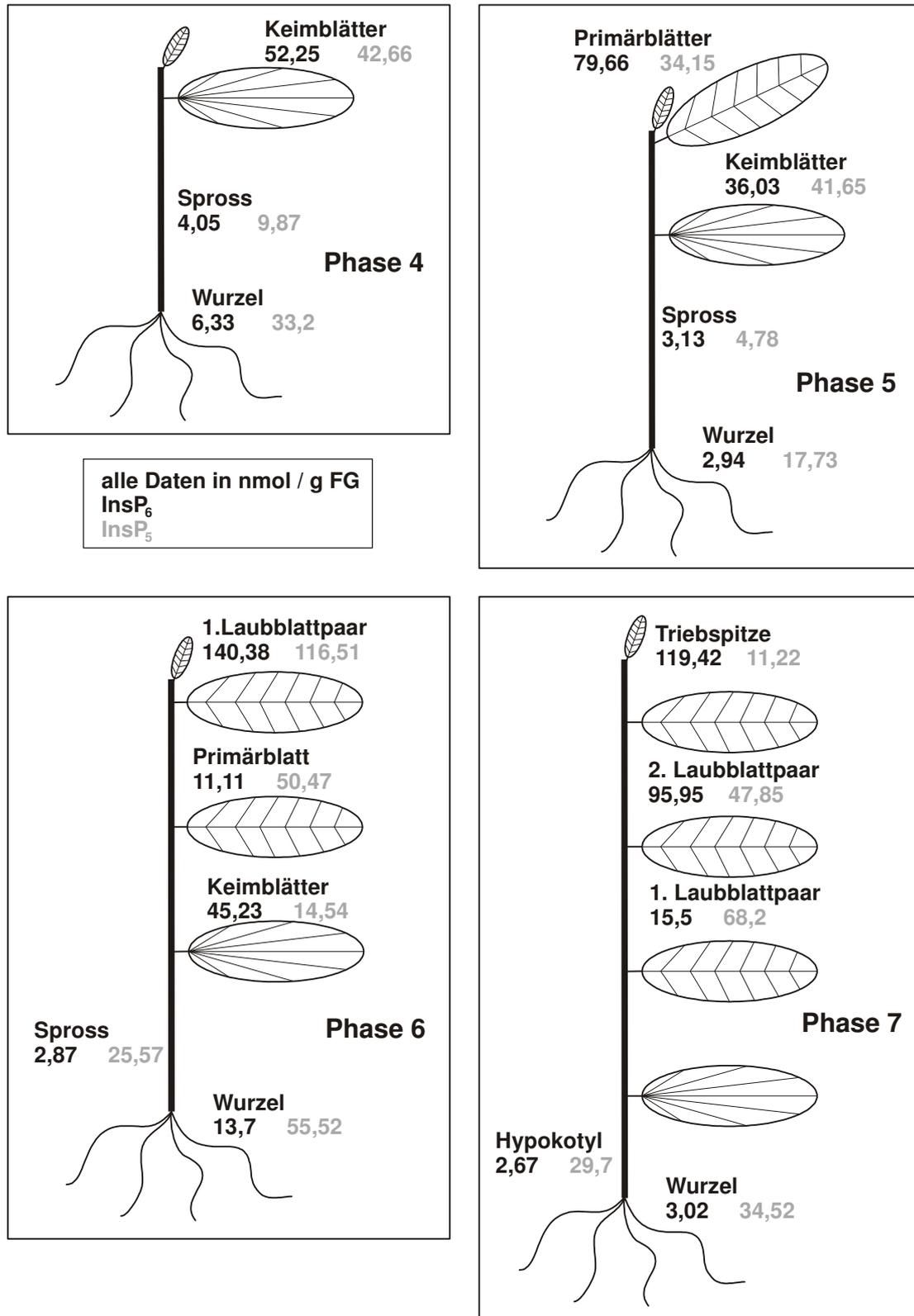


Abb. 3.7: Schematische Darstellung der Gehalte an Inositolpolyphosphaten in *Cannabis sativa* in verschiedenen Entwicklungsphasen

Die Abbildung zeigt vereinfacht die Entwicklungsstadien vier bis sieben. Beschriftet wurden die vermessenen Pflanzenorgane, sowie die gemessenen Konzentrationen an InsP₆ (schwarz) und Ins(2,3,4,5,6)P₅ (grau).

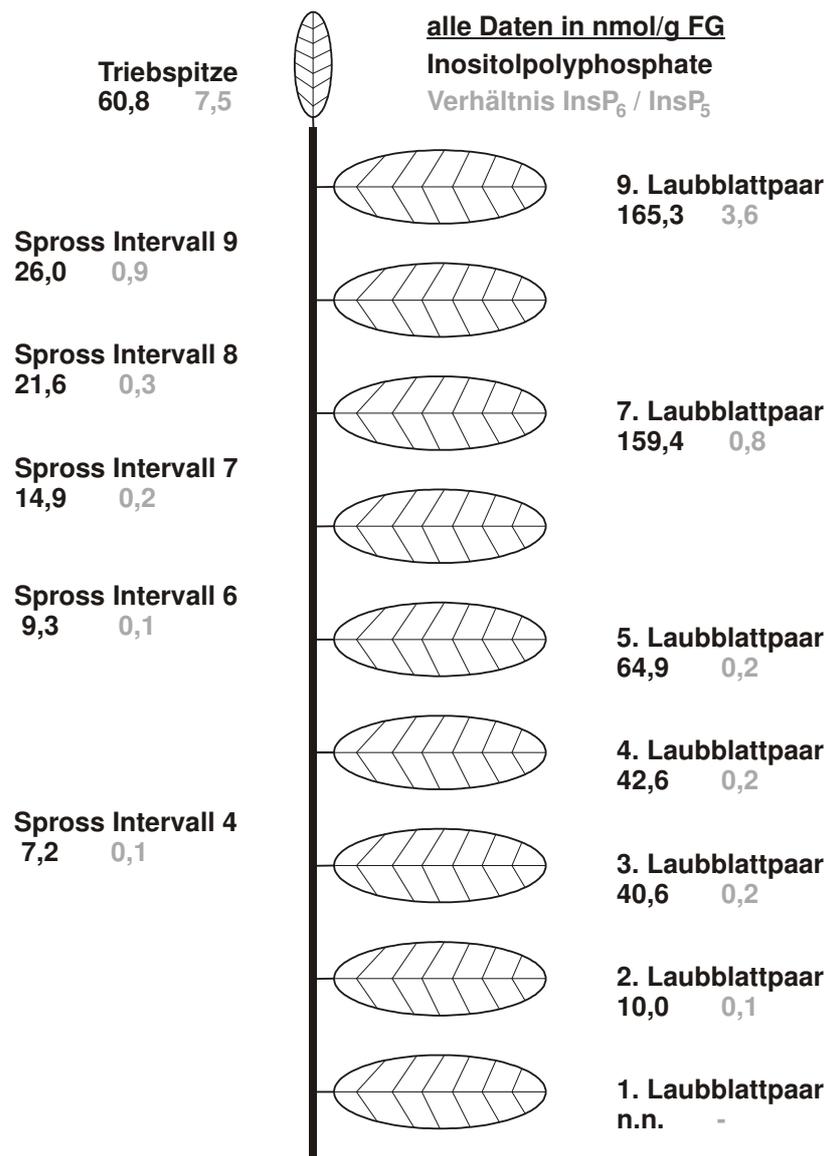


Abb. 3.8: Verteilung der Inositolpolyphosphate in subadulten Pflanzen von *Cannabis sativa*

Dargestellt sind die Gesamtgehalte der untersuchten Inositolpolyphosphate (schwarz) und deren Verhältnis in den einzelnen Organen. Auf der linken Seite des Schemas sind die Gehalte in den verschiedenen Internodien, also des Sprosses, abgebildet. Auf der rechten Seite die Werte korrelierenden Laubblätter.

Auch im weiteren Verlauf der Entwicklung zeigte sich ein ähnliches Bild wie es aus den vorherigen Phasen bereits bekannt war (siehe Abb. 3.7). Die im Spross detektierte Gesamtmenge an Inositolphosphaten war niedriger als in den ober- und unterhalb angrenzenden Blättern (siehe Abb. 3.8).

Dabei nahm der Gehalt an InsP_6 , als auch der Gesamtgehalt der Inositolpolyphosphate, vom Apikalmeristem zur Wurzel hin ab. Der Gehalt an $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ stieg, ausgehend vom Apikalmeristem zunächst bis zum siebten

Laubblattpaar bzw. zum achten Sprossabschnitt an. Nach Erreichen dieses Maximums sank der Gehalt fortwährend, blieb ab diesem Messpunkt jedoch durchweg deutlich über dem Niveau des endogenen InsP_6 (siehe Abb. 3.8).

Weitere Untersuchungen bezüglich des endogenen Gehalts an höher phosphorylierten Inositolphosphaten wurden an *Humulus japonicus*, einer annuellen Zierpflanze aus der Familie der Cannabaceae, durchgeführt. Da es sich bei dieser Art um eine Rankpflanze handelt, die eine recht hohe Wachstumsgeschwindigkeit zeigt, wurde die Pflanze nur in Stichproben untersucht. In den unteren Abschnitten des Sprosses waren unter den gegebenen Bedingungen keine Inositolphosphate nachweisbar. Erst im mittleren Teil des Sprosses konnten sie in geringen Konzentrationen detektiert werden (siehe Abb. 3.9).

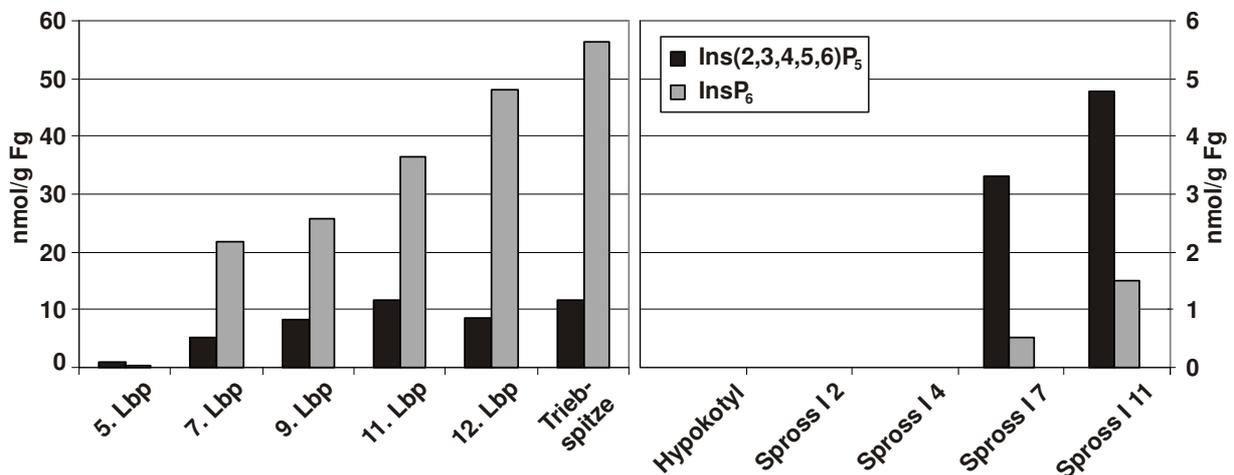


Abb. 3.9: Inositolpolyphosphate in ausgewählten Organen von *Humulus japonicus*

Die Diagramme zeigen die Gehalte an $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ und InsP_6 in ausgewählten Organen von *Humulus japonicus*. Die verwendeten Pflanzen hatten eine Größe von rund 1,5 m und wurden rund 3 Monate unter kontrollierten Bedingungen angezogen (siehe 2.4.2). Im linken Diagramm sind die Gehalte der Blätter dargestellt (Lbp = Laubblattpaar), während rechts die in den einzelnen Sprossinternodien nachgewiesenen Mengen zu sehen sind. Die Nummerierung bezieht sich jeweils auf das Internodium oberhalb des Laubblattpaares mit der entsprechenden Nummerierung. Die Nummerierung erfolgte ab dem dritten Nodium, da die vorherigen Blattpaare mit Keim- bzw. Primärblätter bezeichnet wurden.

Der Gehalt an $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ war in den untersuchten Sprossabschnitten höher als der von InsP_6 . Zur Triebspitze hin stiegen die Konzentrationen beider Inositolpolyphosphate im Spross an. Die Menge an $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ blieb jedoch mehrfach höher. Der Gehalt an InsP_6 in den Blättern lag etwa bis zur Sprossmitte, also dem siebten Laubblattpaar, deutlich höher als die detektierte Menge an $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$. Die Menge an InsP_6 nahm dabei jedoch von der Triebspitze ausgehend kontinuierlich ab, wobei die Abnahme sehr regelmäßig erfolgte. Der

Gehalt an Ins(2,3,4,5,6)P₅ pendelte bei den ersten drei Messpunkten um 10 nmol/ g Fg und sank dann ebenfalls. Ab dem fünften Laubblattpaar waren nur noch sehr geringe Mengen an Inositolphosphaten nachweisbar, Ins(2,3,4,5,6)P₅ stellte nun das mengenmäßig häufigere der beiden untersuchten Inositolpolyphosphate dar.

3.2. Aufreinigung eines Phytat-abbauenden Enzyms aus Kotyledonen von *Cannabis sativa* L.

3.2.1 Bestimmung des idealen Erntezeitpunkts zur Enzymgewinnung

Bei der Ernte der Keimlinge stellte sich zunächst die Frage, zu welchem Zeitpunkt die höchste Phytaseaktivität im den Kotyledonen vorlag. Daher wurde die Entwicklung der Keimlinge in verschiedene Phasen unterteilt, um die gemessenen Aktivitäten einem Entwicklungszustand und damit einem Erntezeitpunkt zuordnen zu können. Die Ernte der Pflanzen bezog sich dabei immer auf den Entwicklungsstand der Pflanze und spiegelt keine festgelegten Zeiträume wieder (Erläuterung siehe Abkürzungsverzeichnis). Keiner der Wachstumsphasen zugeordnet wurde der Samen. Dieser wurde sowohl trocken als auch nach einer Quellzeit von 2 h untersucht.

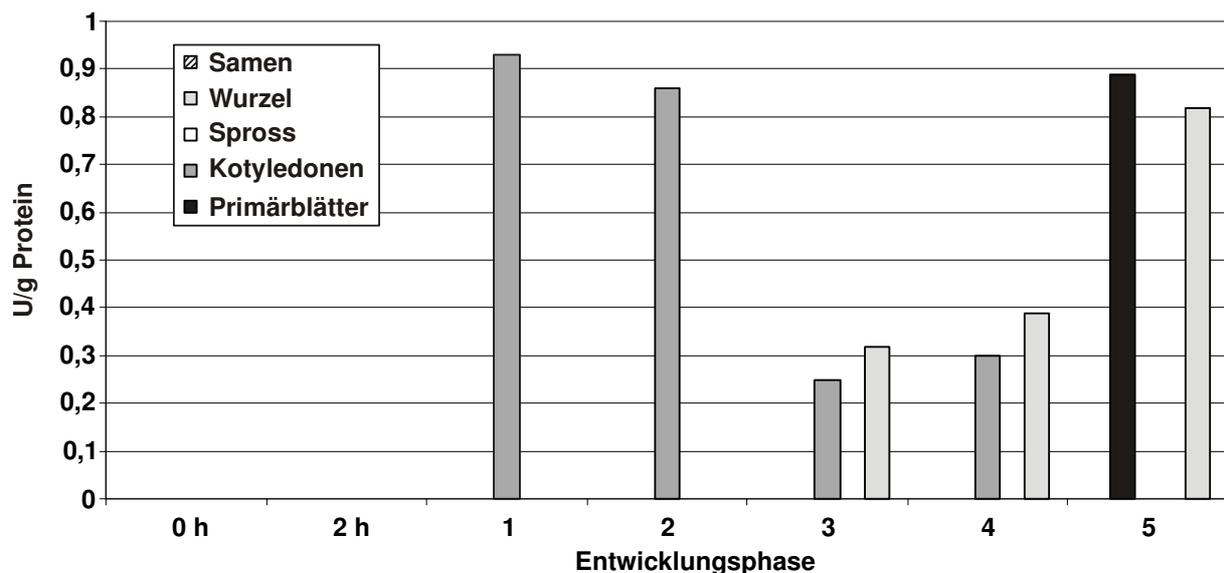


Abb. 3.10: Untersuchung der organspezifischen Phytaseaktivität in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand der Keimlinge von *Cannabis sativa*

Das Diagramm zeigt die jeweils detektierte Phytaseaktivität in den einzelnen Organen der Keimlinge in verschiedenen Alterstufen. Nach 0 und 2 h wurden jeweils die gesamten Samen ohne Samenschale für die Messung verwendet. Die Primärblätter wurden ab Phase 4 vermessen, alle übrigen Organe wurden ab Phase 1 jeweils separat auf ihre Phytaseaktivität überprüft.

In Samen ließ sich, unabhängig davon ob trocken oder vorgequollen, keine Phytaseaktivität nachweisen. Gleiches gilt für den im weiteren Versuchsverlauf untersuchten Spross der Hanfkeimlinge (siehe Abb. 3.10). Auch hier konnte in keinem der untersuchten Entwicklungsstadien Aktivität nachgewiesen werden. Die höchsten Phytaseaktivitäten fanden sich in Kotyledonen, Wurzeln und Primärblättern.

Die Aktivität in den Keimblättern zeigte ihren höchsten Wert bereits in der ersten definierten Wachstumsphase und nahm anschließend ab. In Wurzeln und Primärblättern konnten zwar auch etwa gleiche Mengen an Enzymaktivität wie in den Kotyledonen nachgewiesen werden, allerdings erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt der Entwicklung. Da die aufzureinigende Phytase aus den Kotyledonen stammende sollte, wurden für die Isolierung des Enzyms nur Keimblätter der ersten beiden Entwicklungsphasen genutzt, da hier die Aktivität der Enzyme am höchsten war (siehe Abb. 3.10) Die Organe wurden manuell geerntet und bis zu deren Aufschluss (siehe 3.2.2) bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Chromatographische Aufreinigung eines Phytat-abbauenden Enzyms

Die Kotyledonen, zu den unter 3.2.1 beschriebenen Bedingungen geerntet und gelagert, wurden als erstem Schritt der Aufreinigung zunächst in einen Waring-Blendor mechanisch aufgeschlossen (2.7.1). Auf diese Weise konnten durchschnittlich 27 mg Protein pro eingesetztem g Kotyledonen im Rohextrakt nachgewiesen werden. Die mittlere Enzymaktivität für Phytasen lag bei 0,057 U/mg Protein. Der Rohextrakt wurde anschließend komplett für eine Ammoniumsulfatfällung verwendet.

Die Fällung der Proteine mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurde wie unter 2.7.2 beschrieben durchgeführt. Wie aus Vorversuchen bekannt, fielen die Phytat-abbauenden Enzyme erst bei $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen von mehr als 35 % (w/v) aus. Um Proteine mit anderen Fällungseigenschaften abzutrennen, wurde daher zunächst eine entsprechende Fällung durchgeführt. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend mittels Zentrifugation vom Überstand separiert. Die löslichen Proteine des Überstands wurden anschließend in die hydrophobe Interaktionschromatographie eingesetzt (siehe 2.7.3.1). Da hier eine hohe Konzentration an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ erforderlich ist, wurde der Überstand im Anschluss an die Präzipitation mit 35 %-Sättigung keiner zweiten Fällung unterzogen, sondern direkt in die hydrophobe Interaktionschromatographie eingesetzt. Auf diese Weise mussten keine weiteren Modifikationen an der Proteinlösung vorgenommen werden. Nach der Ammoniumsulfatfällung konnten über 35 % der Proteine des Rohextrakts im Überstand wieder gefunden werden. Die Wiederfindungsrate der spezifischen Phytaseaktivität lag bei über 72 %. Der Reinigungsfaktor entsprach in diesem Fall 2,4 (siehe auch Tabelle 3.3). Das nach der Ammoniumsulfatfällung erhaltene Proteinextrakt wurde an Phenyl-Sepharose gebunden und zunächst mittels eines Stufengradienten mit abnehmenden Konzentrationen an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluiert. Bei dieser Elutionsmethode zeigte sich jedoch eine gleichmäßige Verteilung der Aktivität in allen Elutionfraktionen. Aus diesem Grund wurde auf eine schrittweise Elution verzichtet und die assoziierten Proteine in einer Fraktion eluiert. Dies führte zu einer Minimierung des zeitlichen Aufwands und verringerte das Volumen der Elutionsfraktion im Vergleich zum mehrstufigen Verfahren. Vom zu Beginn eingesetzten Protein konnten noch knapp 7 % im Eluat nachgewiesen werden. Bei

der Phytaseaktivität lag die Wiederfindungsrate bei etwa 19 %, der Reinigungsfaktor betrug 3,0.

Aufreinigungsschritt	Gesamtaktivität in U	Gesamtprotein in %	spez. Aktivität in U/mg	Rf	Wiederfindung in %
Rohextrakt	54,15	100	0,057	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung	38,92	34,68	0,135	2,4	71,88
Phenyl-Sepharose	10,19	7,14	0,166	2,92	20,39
ConA-Sepharose	3,3	0,55	0,625	10,97	6,1
Heparin-Agarose	1,79	0,07	1,823	22,5	3,3
Sephadex G-75	0,33	0,035	2,143	37,6	0,6

Tab. 3.3: Aufreinigung eines Phytat-abbauenden Enzyms aus Kotyledonen von *Cannabis sativa*

Die Tabelle zeigt die zur Aufreinigung des Phytat-abbauenden Enzyms durchgeführten Trennschritte. Angegeben sind die durchschnittlichen Werte der einzelnen Fraktionen der Aufreinigung für Gesamtaktivität, Gesamtproteingehalt, spezifischer Aktivität, Reinigungsfaktor (Rf) und die Wiederfindungsrate bezüglich der Ausgangsaktivität im Rohextrakt. Beschrieben sind die jeweiligen Säulen- bzw. Trennungsmaterialien. Phenyl-Sepharose wurde bei der hydrophoben Interaktionschromatographie verwendet, ConA-Sepharose für die Lektinchromatographie, Affinitätschromatographie erfolgte an Heparin-Agarose und die Gelfiltration wurde an Sephadex G-75 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens vier unabhängigen Aufreinigungen.

Die gewonnene Fraktion mit Phytaseaktivität wurde in einen weiteren Aufreinigungsschritt über ConA-Sepharose eingesetzt. Die Aufgabe der Proteinfraction erfolgte ohne Veränderungen der Zusammensetzung der Lösung. Die Elution erfolgte nicht stufenweise, sondern unmittelbar mit 1 M Glucose im Elutionspuffer (siehe 2.7.3.2), da auch hier bei einem mehrstufigen Elutionsverfahren Aktivität in allen Fraktionen nachgewiesen werden konnte. Dabei zeigte sich, dass fast die gesamte Phytase- und Phosphataseaktivität an das Lektin gebunden hatte. Im Durchlauf fanden sich nur minimale Mengen an Aktivität. In der Elutionsfraktion konnten noch 0,55 % der Proteinmenge des Rohextrakts nachgewiesen werden. Bezüglich der Phytaseaktivität wurden noch 6 % der Ausgangsaktivität nachgewiesen, der Reinigungsfaktor lag bei 11.

Als vierter Reinigungsschritt wurde die Affinitätschromatographie an Heparin-Agarose gewählt (siehe 2.7.3.3). Auch hier wurde die vorher erhaltene Proteinfraction

unverändert eingesetzt. Die Elution erfolgte mittels eines linearen Gradienten, die Fraktionierung wurde manuell durchgeführt. Fraktionen mit Phytaseaktivität wurden gepoolt und für den folgenden Schritt einkonzentriert. Die Daten für die zusammengefasste Fraktion lagen bei 3,3 % der Ausgangsaktivität für Phytasen und einem Reinigungsfaktor von 22,5. Als finaler Aufreinigungsschritt wurde eine Größenausschlusschromatographie an Sephadex G-75 durchgeführt (siehe 2.7.3.4). Fraktionen mit Aktivität wurden gepoolt und vermessen. Dabei zeigte sich, dass 0,6 % der initialen Phytaseaktivität noch nachweisbar waren. Die Abfolge und Ergebnisse der Aufreinigung des Enzyms sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Der Reinigungsfaktor lag bei 37,6. Nach diesem Aufreinigungsschritt war wie im SDS-Gel zu erkennen (siehe Abb. 3.11), nur noch eine Bande zu erkennen. Das Enzym wurde demnach bis zur Homogenität aufgereinigt (siehe Abb. 3.11 und Abb. 3.12). Anschließend wurden die Eigenschaften des isolierten Enzyms noch genauer charakterisiert (siehe 3.2.3).

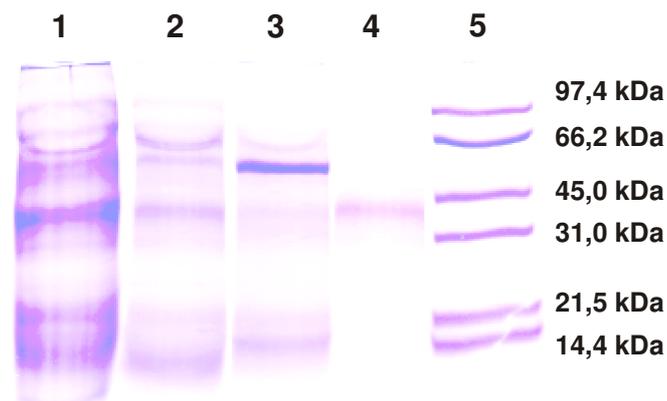


Abb. 3.11: Aufreinigung eines Phytat-abbauenden Enzyms aus Kotyledonen von *Cannabis sativa*

Auf dem SDS-Gel nach Ahn et al. (2001) wurden Proben unterschiedlicher Reinigungsschritte aufgetragen. Es wurden soweit möglich 30 µg Protein aufgetragen. Lediglich in Spur 4 konnten nur 3 µg Protein aufgetragen werden. Die Spuren wurden mit Proben der folgenden Aufreinigungsschritte belegt: 1) Ammoniumsulfatfällung, 2) Phenyl-Sepharose, 3) Heparin-Agarose, 4) Sephadex G-75 und 5) SDS-PAGE Molecular Weight Standard Low Range der Firma BioRad.

3.2.2 Charakterisierung des aufgereinigten Phytat-abbauenden Enzyms

Nach der Aufreinigung lag der Fokus auf der Charakterisierung des isolierten Enzyms. Dazu wurde zunächst die Molekülmasse des isolierten Proteins bestimmt. Dies erfolgte durch denaturierende SDS-Gelelektrophorese (siehe 2.5.3). Es zeigte sich, dass das isolierte Enzym ein Molekulargewicht von 45 kDa aufwies (siehe Abb. 3.12). Wie aus dieser Abbildung ersichtlich handelt es sich um ein monomeres Protein.

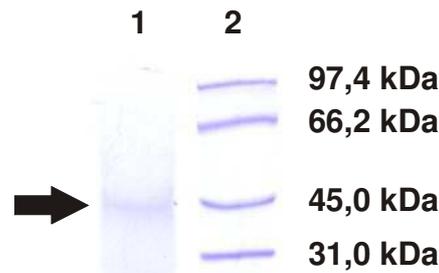


Abb. 3.12: Größendeterminierung des isolierten Phytat-abbauenden Enzyms aus *Cannabis sativa*

Die Größe des isolierten Enzyms wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung bestimmt. Wie aus der Abbildung ersichtlich lag die Größe des Enzyms bei etwa 45 kDa (Spur 1). Zur Größenbestimmung wurde der SDS-PAGE Molecular Weight Standard Low Range der Firma BioRad genutzt (Spur 2).

Im weiteren Verlauf der Charakterisierung wurde das pH- und das Temperaturoptimum ermittelt, sowie die Substratabhängigkeit bestimmt. Zusätzlich wurden noch Inhibitorstudien durchgeführt, die weitere Schlüsse über Typ und Aufbau des Enzyms ermöglichen.

Zu Beginn wurde das Temperaturoptimum des Enzyms bestimmt. Dazu wurden in einem Messbereich von 5 bis 70 °C die jeweiligen Aktivitäten aufgenommen. Ab einer Temperatur von 70 °C konnte keine Aktivität mehr nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.13). Die größte Aktivität zeigte das Enzym in einem Temperaturbereich zwischen 30 und 40 °C. Sowohl bei höheren als auch bei niedrigeren Temperaturen sank die Aktivität deutlich ab. Allerdings ist anzumerken, dass das Enzym auch im sehr niedrigen Temperaturbereich noch über 20 % der maximalen Aktivität zeigt.

Bei der Bestimmung des pH-Optimums zeigte sich, dass dieses bei pH 5,0 liegt. Bei pH 4,5 und 5,5 zeigten sich noch eine relativ hohe Aktivitäten, während unterhalb von pH 3,0 keine Aktivität mehr nachweisbar war (siehe Abb. 3.14).

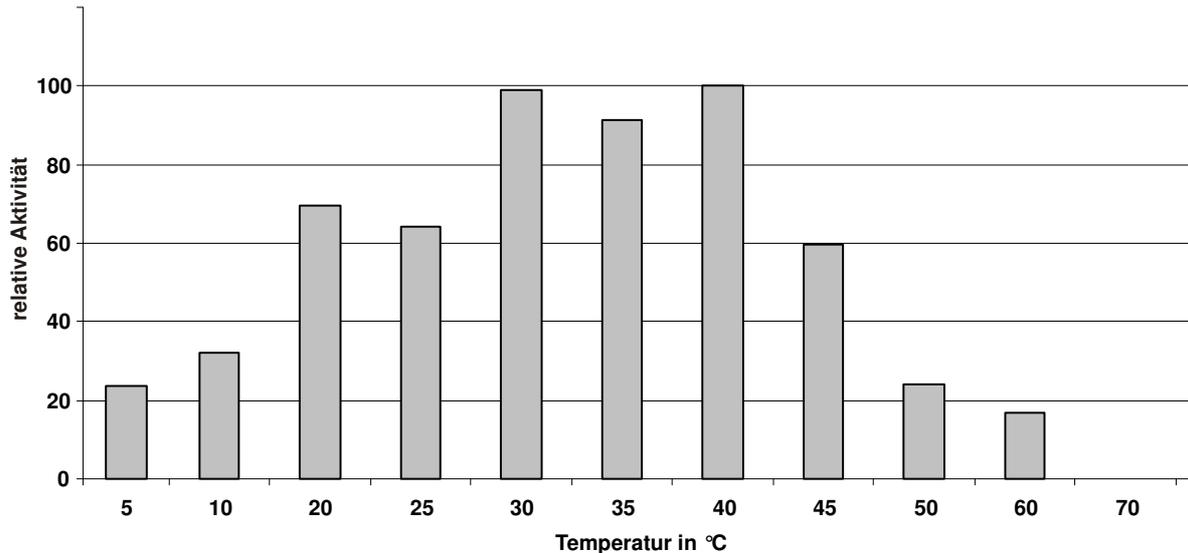


Abb. 3.13: Temperaturabhängigkeit des isolierten Enzyms aus *Cannabis sativa*

Hier wird die relative Aktivität des isolierten Phytat-abbauenden Enzyms in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte wie unter 2.6.2 beschrieben, jedoch wurde die Inkubationstemperatur entsprechende den Erfordernissen modifiziert. Vor Versuchsbeginn wurden die Enzyme jeweils 15 min bei den entsprechenden Temperaturen vorinkubiert. Für die Bestimmung wurde jeweils aufgereinigtes Protein verwendet. Es wurden mindestens drei unabhängige Messungen durchgeführt.

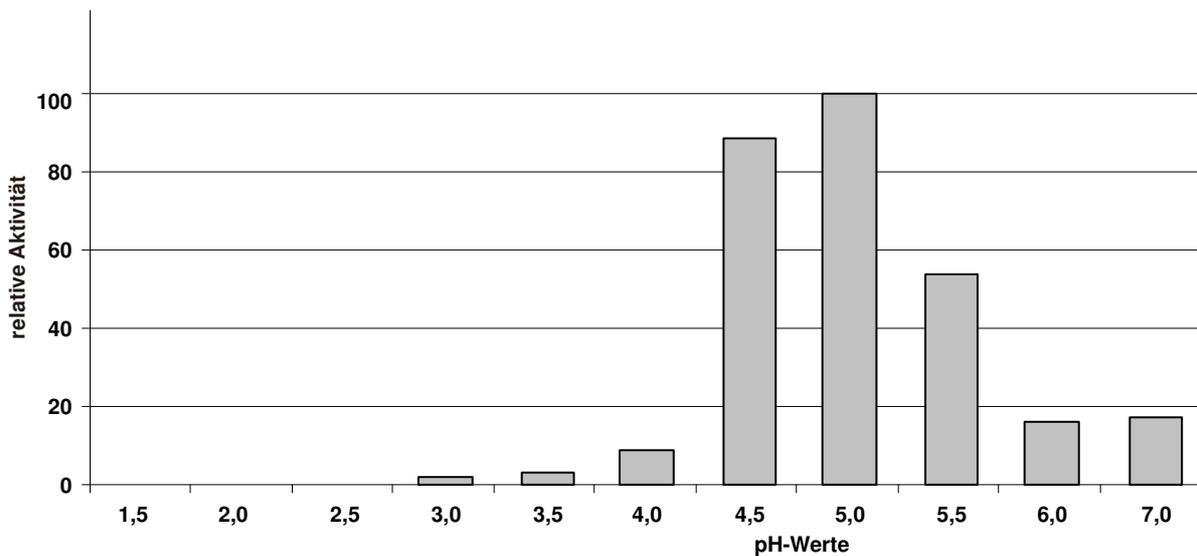


Abb. 3.14: pH-Abhängigkeit des isolierten Enzyms aus *Cannabis sativa*

Gezeigt wird die relative Aktivität des Phytat-abbauenden Enzyms in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte wie unter 2.6.2 beschrieben, jedoch wurde der pH-Wert der Inkubationslösung den Erfordernissen des Versuchs angepasst. Vor Versuchsbeginn wurden die Enzyme jeweils 15 min bei den entsprechenden pH-Werten vorinkubiert. Die Bestimmung erfolgte mit gereinigtem Protein und wurde in mindestens drei unabhängigen Messungen überprüft.

Im pH-Bereich zwischen 3,0 und 4,0 waren nur äußerst geringe Mengen an Aktivität zu detektieren. Nennenswerte Aktivität zeigte das Enzym jedoch im schwach sauren

bis neutralen pH-Bereich. Bei pH 6 bis 7 konnten noch über 15 % der maximalen Aktivität nachgewiesen werden.

Zur Festlegung der kinetischen Parameter wurde die Substratabhängigkeit des Enzyms bestimmt. K_m und V_{max} wurden aus dem Lineweaver-Burk-Plot errechnet (siehe Abb. 3.15). Anhand der Geradengleichung des Lineweaver-Burk-Plots wurde V_{max} mit 1,063 U/mg Protein bzw. 17,71 nkat/mg Protein bestimmt, während K_m mit 9,36 μM ermittelt wurde.

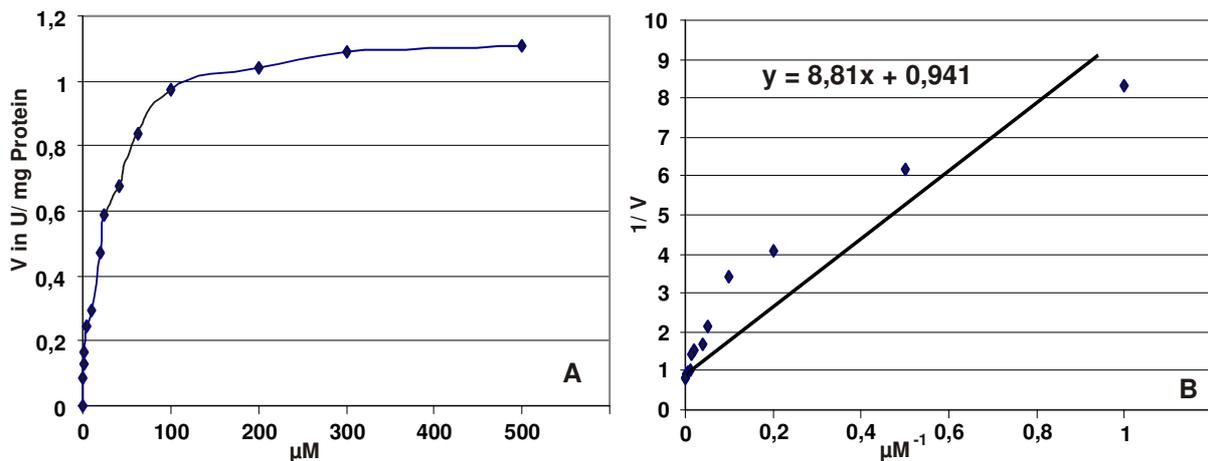


Abb. 3.15: Graphische Bestimmung der kinetischen Parameter des Phytat-abbauenden Enzyms aus *Cannabis sativa*

Die Abbildungen zeigen die Auftragung der Substratabhängigkeit nach Michaelis-Menten (A) und Lineweaver-Burk (B). Die Bestimmung von K_m und V_{max} erfolgte anhand der Geradengleichung des Lineweaver-Burk-Plots.

Bei anschließenden Untersuchungen von Inhibitoren zeigte sich, dass chelatierende Substanzen wie EDTA und Citrat keinen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität ausübten. Auch das Serin-spezifische Reagenz PMSF blieb ohne Effekt auf die Enzymaktivität. Zu den starken Inhibitoren zählten Fluorid und Phosphat. Fluoride verursachten bereits ab einer Konzentration von 0,1 μM eine komplette Inhibierung der Enzymaktivität.

Bei der Untersuchung der Substratspezifität zeigte sich, dass das isolierte Enzym über ein breites Substratspektrum verfügt. Alle angebotenen Substrate wurden umgesetzt, wenngleich nicht mit der Geschwindigkeit wie bei InsP_6 . Die relativ höchste Umsatzrate erreichte Fructose-1,6-bisphosphat mit 53 % des Umsatzes von InsP_6 . Die nächst höchsten Umsätze erzielten *p*-Nitrophenylphosphat mit 44 % und Fructose-6-phosphat mit 38 %. Es folgten Glycerin-3-phosphat mit 33 % und Glucose-6-phosphat mit 28 %. ATP und ADP erzielten 24 bzw. 23 % des Umsatzes von InsP_6 , während Glucose-1-phosphat lediglich 16 % erreichte.

4. Diskussion

4.1 Metabolismus der Inositolpolyphosphate in *Cannabis sativa* L.

Phosphatasen und Kinasen, als katabole bzw. anabole Enzyme des Inositolphosphatstoffwechsels stellen gleichzeitig wichtige Elemente der Signaltransduktion dar. Sie stellen die verschiedenen Isomere der Inositolphosphate bereit, die über unterschiedliche zelluläre Signalfunktionen verfügen. Inositolphosphate sind beispielsweise bei der Stomatabewegung involviert [Lemtiri-Chlieh, 2000; 2003], aber auch an pflanzlichen Abwehrreaktionen beteiligt [Ortega et al., 2005]. Daher stellen die an der Biosynthese beteiligten Enzyme auch wichtige Regulatoren für die wirksame Signaltransduktion durch die Bereitstellung spezieller Inositolphosphate dar. Über die intrazellulären Gehalte der Inositolphosphate in ihrer Funktion als Signal- und, im Fall von InsP_6 , auch Reservestoffe, ist wenig bekannt. Auf diesem Punkt lag der Fokus der Arbeit. Es ging um die Bestimmung der Gehalte der höher phosphorylierten Inositolphosphate InsP_5 und InsP_6 in Zellkulturen als auch in ausdifferenzierten Pflanzen. Den Inositolpolyphosphaten InsP_5 und InsP_6 konnten zwar einige intrazelluläre Funktionen zugeordnet werden, aber über ihre intrazellulären Konzentrationen bzw. Konzentrationsänderung in Reaktion auf das Einwirken von biotischen und abiotischen Faktoren ist bisher wenig bekannt. Dabei ist in erster Linie InsP_6 eine wichtige Komponente in der Zelle, die vielfältige Funktionen besitzt. InsP_6 ist an verschiedenen intrazellulären Vorgängen, u.a. bei der Signaltransduktion [Lemtiri-Chlieh et al., 2000; 2003], als Antioxidanz [Graf et al., 1984], Reservestoff [Raboy, 2003] und struktureller Cofaktor [Tan et al., 2007], beteiligt. Der Nachweis der höher phosphorylierten Inositolphosphate InsP_5 und InsP_6 ist durch die HPLC-MDD-Analytik relativ einfach möglich. Zur Untersuchung der intrazellulären Konzentrationen der höher phosphorylierten Inositolphosphate wurden zunächst Suspensionskulturen von verschiedenen Pflanzen untersucht. Bei diesen in Flüssigmedium gezogenen Zellen ist es problemlos möglich, die Medien regelmäßig zu wechseln und den Zellen so konstante Bedingungen zu bieten. Durch die gleichmäßige Bewegung der Zellen in der Lösung wird eine Ansammlung größerer Zellhaufen verhindert und der Kontakt zum Medium für alle Zellen gewährleistet. Die Zellen wurden jeweils auf dem für sie günstigsten Medium angezogen. Um Irritationen durch Auslaugung des Mediums bzw. zu hohe Zelldichten zu vermeiden, wurden die jeweiligen Zellkulturen bezüglich

Medienwechsel zeitlich synchronisiert und jeweils auf gleiche Zelldichten beim Inokulieren geachtet. Die Untersuchungen zeigten bei allen Suspensionskulturen einen Grundgehalt an InsP_6 . Dieser lag artspezifisch zwischen 2,8 und 15 nmol/g Fg. Inwiefern die gemessenen Werte im Laufe des Wachstums bzw. durch Auslaugung des Mediums schwanken, wurde hier nicht vermessen. In Suspensionskulturen von *Catharanthus roseus* wurde eine leichte Abnahme des Gehalts an InsP_6 über den Messzeitraum beobachtet. Die Gehalte der Zellen lagen mit etwa 10 nmol/g Fg im Konzentrationsbereich, der auch in den hier untersuchten Suspensionskulturen gemessen werden konnte [Mitsuhashi et al., 2005]. Bei den Versuchen mit *Nicotiana tabacum* konnte eine leichte Akkumulation von InsP_6 im Versuchszeitraum beobachtet werden. Damit zeigte sich eine gegenläufige Entwicklung zu der in *Catharanthus roseus* beobachteten. Die Zunahme in den Zellen von *Nicotiana tabacum* war jedoch nur minimal. Der InsP_6 -Gehalt in *Cannabis sativa* wies in der Messperiode zwar geringe Schwankungen auf, im Prinzip blieb der Gehalt jedoch konstant. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Gehalt an InsP_6 über einen Zeitraum von ein bis zwei Wochen in den Zellkulturen stabil blieb. Die in den übrigen Suspensionskulturen gemessenen Werte sind zwar nur Momentaufnahmen, aber die zeitliche Entwicklung des Gehalts an InsP_6 in *Cannabis sativa*, *Nicotiana tabacum* und *Catharanthus roseus* lässt vermuten, dass die Werte in den anderen Zellkulturen wohl ebenfalls nur geringen Variationen unterworfen sind. Die geringen Veränderungen des Gehaltes an InsP_6 zeigt die Bedeutung für die Pflanzen. Ein Grundgehalt an InsP_6 ist für die Pflanze sinnvoll, denn es erfüllt wie bereits erwähnt, nicht nur wichtige Funktionen unter anderem als Signalstoff [Lemtiri-Chlieh, 2003], sondern ist durch seine antioxidative Wirkung auch maßgeblich daran beteiligt, dass sich keine reaktiven Sauerstoffspezies bilden [Graf et al., 1984]. Eine definierte intrazelluläre Konzentration an InsP_6 ermöglicht der Pflanze des Weiteren schnell auf vielfältige Stimuli zu reagieren. Denkbar ist hier die Bildung von niederphosphorylierten Signalsubstanzen wie z. B. $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$.

Im Gegensatz zu InsP_6 verhielten sich die Gehalte an InsP_5 bei den untersuchten Spezies unterschiedlich. In einigen Arten, darunter die untersuchten Vertreter der Familie Solanaceae, *Solanum lycopersicum* und *Nicotiana tabacum*, war kein InsP_5 nachweisbar. Die übrigen vermessenen Arten zeigten zwar InsP_5 , jedoch in erheblich geringeren Mengen als jene, die für InsP_6 detektiert wurden. Lediglich *Cannabis sativa* bildete mit der massiv erhöhten Menge an InsP_5 eine Ausnahme. Die Messung

in *Catharanthus roseus* zeigte, dass bei 7,5 mM Phosphat im Medium InsP_6 das dominante Inositolphosphat war und bestätigen die Ausnahmestellung von *Cannabis sativa* [Mitsuhashi et al., 2005]. Dieser ungewöhnlich hohe Gehalt an InsP_5 zeigte sich nicht nur in Zellkulturen, sondern auch in ausdifferenzierten Organen der Pflanze. Dabei scheint allerdings der Entwicklungsstand des jeweiligen Organs einen Einfluss auf den Gesamtgehalt an Inositolpolyphosphaten als auch auf das Verhältnis zwischen InsP_5 und InsP_6 zu haben. Es wurde ein Gradient für den Gesamtgehalt an Inositolpolyphosphaten von der apikalen Triebspitze zum Hypokotyl nachgewiesen. Allerdings war der Gehalt in der Triebspitze mit dem Apikalmeristem geringer als in den nachfolgenden Laubblättern. Dies lag vermutlich an der Probennahme, denn es wurde neben dem Apikalmeristem auch das nachfolgende Internodium mitgeerntet. Dies hatte praktische Gründe, denn zur Detektion waren relativ große Mengen an Ausgangsmaterial nötig. In Anbetracht der geringeren Gehalte an Inositolphosphaten im Spross könnte diese gemeinsame Detektion den Wert für das Apikalmeristem erniedrigt haben. Bei zukünftigen Untersuchungen sollte hier eine genauere Untersuchung erfolgen. In jüngeren Blättern sowie in der Triebspitze lag der Gehalt an InsP_6 zum Teil zehnfach höher als der Gehalt an InsP_5 . In älteren Blättern veränderte sich dieses Verhältnis nachhaltig, zum einen sank, wie bereits erwähnt, der Gesamtgehalt der Inositolpolyphosphate, zum anderen war nun InsP_5 in einer bis zu zehnfach höheren Konzentration nachweisbar. Daraus lässt sich ableiten, dass das Verhältnis von InsP_5 zu InsP_6 in *Cannabis sativa* charakteristisch dafür ist, ob ein Organ sich noch entwickelt oder bereits ausdifferenziert ist. Die Untersuchungen deuten ebenfalls daraufhin, dass es sich dabei nicht um eine exklusive Eigenschaft von Hanf handelt, sondern dass dies in den Cannabaceae allgemein verbreitet ist. Die Ergebnisse in *Humulus japonicus* zeigen ebenfalls einen abnehmenden Gesamtgehalt an Inositolpolyphosphaten von der Triebspitze zur Wurzel. Hier scheint der Gehalt an InsP_5 jedoch konstant zu bleiben und nur das Niveau an InsP_6 abzunehmen. Im Spross waren die Gehalte an Inositolphosphaten sowohl in *Cannabis sativa* als auch in *Humulus japonicus* deutlich geringer. Im Spross zeigten bereits die obersten Internodien einen höheren Gehalt an InsP_5 . Die im Vergleich zu den Blättern deutlich niedrigeren Gehalte lassen sich wie folgt erklären. Für die Messungen wurde jeweils das Frischgewicht der Pflanzenteile bestimmt und vermessen. Da *Cannabis sativa* jedoch im Spross über einen hohen Anteil an Fasern, also sklerenchymatischen Zellen, verfügt und nur ein

kleiner Teil aus Parenchym besteht, ist der Anteil lebender Zellen am Gesamtgewicht erheblich niedriger als im Blatt. Es kann zwar keine Aussage zu den absoluten Mengen an Inositolphosphaten in den lebenden Zellen des Sprosses gemacht werden, auf die Verhältnisse zwischen InsP_5 und InsP_6 im Spross hat dies jedoch keinen Einfluss. Zieht man nun die Verhältnisse der Inositolpolyphosphate in ausdifferenzierten Blättern heran, deutet sich an, dass kein oder kaum noch Längenwachstum in den untersuchten Sprossabschnitten erfolgt. Diese Hypothese konnte durch Beobachtungen an parallel gezogenen Vergleichspflanzen bestätigt werden. InsP_6 scheint bei der Blattexpansion, aber evtl. auch bei anderen Wachstumsvorgängen, eine wichtige Rolle zu spielen. Welche Funktion InsP_6 beim Wachstum der Blätter genau übernimmt, ist noch nicht geklärt. Eine Funktion könnte die Bereitstellung von Inositol und Phosphat sein, die wichtige Komponenten des Pflanzenwachstums sind. Phosphor, als zentrales Element des Phosphats, stellt für die Pflanze einen essentiellen Wachstumsfaktor dar. Seine Wichtigkeit wird durch die Vielzahl an Aufnahmestrategien unterstrichen, um Phosphatmangel vorzubeugen [Yang & Finnegan, 2010]. Inositol ist eine wichtige Komponente bei der Zellteilung. Es zeigte sich bei Versuchen an Zellen von *Glycine max*, dass ein verringerter intrazellulärer Gehalt an Inositol die Zellteilung unterdrückt [Biffen & Hanke, 1990]. InsP_6 könnte demnach auch als Reservestoff für Inositol dienen. Im Laufe der Entwicklung wird es abgebaut und der Gesamtgehalt an Inositolpolyphosphaten im Blatt sinkt proportional zum Abschluss der Organdeterminierung. Ist das Blatt also ausdifferenziert, stellt sich das aus den Zellkulturen bekannte typische Verhältnis von InsP_5 zu InsP_6 ein. Hier ist jedoch zu berücksichtigen, dass bei der Nutzung des Inositols aus InsP_6 insgesamt sechs Phosphate anfallen. Wenn die freigesetzten Phosphatgruppen nicht anderweitig verwendet werden, kann dies zu einer Inhibierung der Phytasen beitragen, wie es auch von anderen PAE bekannt ist [Greiner et al., 2002]. Die *de novo*-Synthese von Inositol aus Glucose-6-phosphat erfolgt in zwei Schritten, während der Phytatabbau insgesamt sechs sukzessive Hydrolysen benötigt. Wenn also nicht parallel Bedarf an Phosphat in den Geweben vorliegt, scheint die Synthese ausgehend vom Glucosederivat vermutlich die metabolisch günstigere Variante zur Bereitstellung von Inositol. Die Wahrscheinlichkeit, dass Phosphat akkumuliert ist jedoch als gering anzusehen. Denn gerade in sich entwickelnden Keimlingen ist der Bedarf an Phosphat, z.B. für ATP, relativ hoch. Für die Pflanze kann es aus einem weiteren Grund von Vorteil sein

das InsP₆ vollständig abzubauen, da dass freigesetzte Inositol in Glucose überführt werden kann und so dem Organismus als wichtige Zuckerkomponente für das Wachstum zur Verfügung steht. Diese Möglichkeit ist besonders in der Phase der Keimung von Vorteil, wenn die Pflanze noch nicht selbst Glucose durch Fotosynthese bereitstellen kann. Aufgrund des hohen Phytatgehalts im Samen liegt also auch eine nicht unerhebliche Menge an Zucker in gespeicherter Form vor, die vom Keimling genutzt werden kann.

Die antioxidative Wirkung von InsP₆ kann ebenfalls ein relevanter Faktor sein. In den sich entwickelnden Pflanzenteilen müssen die sich bildenden Strukturen vor dem Angriff von reaktiven Sauerstoffspezies geschützt werden. InsP₆ kann die eisenkatalysierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies effektiv unterbinden [Graf et al., 1984] sowie die Lipidperoxidation verhindern [Graf et al., 1987; Graf & Eaton, 1990; Empson et al., 1991]. Die Pflanze verfügt über ein komplexes System von enzymatischen und nicht-enzymatischen Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress [Zeng et al., 2010]. Auf diese Weise werden die unreifen zellulären Strukturen wie der Fotosyntheseapparat von Anfang an vor oxidativen Prozessen bewahrt. Die Wirkung von InsP₆ wird dabei wohl nur eine untergeordnete Rolle spielen, wenngleich diese nicht unterschätzt werden darf. Denn trotz dieser komplexen Schutzvorrichtung zeigen Samen von *Zea mays*, die einen verminderten Gehalt an InsP₆ aufwiesen, bei längerer Lagerung einen deutlichen Verlust der Keimfähigkeit [Doria et al., 2009]. Aus den Untersuchungen ergibt sich, dass die Gehalte an InsP₆ in den vegetativen Bereichen der Pflanze erheblich geringer sind als im Samen. Daher wird InsP₆ in Spross und Blättern wohl mehr im Kollektiv mit anderen Schutzmechanismen wirken und keine so dominante Rolle wie im Samen einnehmen.

Inositolphosphate besitzen auch eine Schnittstelle mit dem Auxinsignalweg. Auxine, hier die natürlich vorkommende Indoleessigsäure (IAA), sind als Phytohormone wichtige Regulatoren von Wachstum und Entwicklung der Pflanzen. Hinweise auf die Beteiligung von InsP₆ lassen sich anhand der Funktion als struktureller Cofaktor eines TIR1-ASK1-Komplexes aus *Arabidopsis thaliana* ableiten. Dieser Rezeptor nimmt Einfluss auf die Genaktivität, sobald Auxine binden [Tan et al., 2007]. Die Syntheseorte von IAA sind junge Blätter und Blüten [Petrášek & Friml, 2009]. In diesen wachsenden Teilen der Pflanze dürfte auch der Gehalt an Rezeptoren hoch sein, da insbesondere in diesen Geweben Wachstum und Entwicklung koordiniert

werden müssen. Ein hoher Gehalt an Rezeptoren hätte auch einen erhöhten Gehalt an InsP_6 zur Folge, da jedes Rezeptormolekül über ein Molekül InsP_6 verfügt. Bei der Aufreinigung des Rezeptors bleibt das InsP_6 im Komplex gebunden, so dass eine feste Bindung an den Komplex vermutet wird [Tan et al., 2007]. Aufgrund des aggressiven Aufschlusses mit Perchlorsäure wurde wohl trotz der festen Bindung von InsP_6 an den Rezeptor ein Großteil aus dem Komplex entfernt. Dennoch dürfte das auf diese Weise freigesetzte InsP_6 keinen signifikanten Einfluss auf den Gesamtgehalt gehabt haben. Somit lässt sich der sehr hohe InsP_6 -Gehalt in jungen Pflanzenteilen auf diesem Weg nicht klären.

Die aufgeführten Funktionen von InsP_6 in wachsenden Pflanzenorganen geben noch keine abschließende Erklärung für den signifikant erhöhten Gehalt an. Es ist anzunehmen, dass InsP_6 die oben angeführten Funktionen auch oder gerade in jungen Blättern erfüllt. Zu bezweifeln ist aber, ob dies bereits die massiv erhöhten Gehalte an InsP_6 erklärt. Wahrscheinlicher ist eine direkte oder indirekte Beteiligung von InsP_6 an den Wachstumsprozessen, die über die bereits genannten Funktionen noch hinausgehen. In welcher Form InsP_6 auf das Wachstum einwirkt, ob als Reservestoff oder Signalmolekül, bleibt vorerst unklar. Erkenntnisse hätten Untersuchungen an Mutanten mit reduziertem Gehalt an InsP_6 liefern können, doch hier wurde in der Regel der Phosphatgehalt untersucht und auch nicht zwischen einzelnen Organen unterschieden. InsP_5 scheint in *Cannabis sativa*, als auch in *Humulus japonicus*, sowie in Jungpflanzen von *Humulus lupulus*, als Reservoir für andere Inositolphosphate zu dienen. Aus InsP_5 können schnell andere relevante Inositolphosphate synthetisiert werden. Die Vermutung, dass ein InsP_5 als metabolische Drehscheibe fungieren könnte, bestehen bereits länger [Irvine & Schell, 2001]. In den Cannabaceae scheint es also so zu sein, dass in den ausdifferenzierten Geweben ein Grundlevel an InsP_6 erhalten bleibt, welches vermutlich die bekannten intrazellulären Funktionen erfüllt. Daneben existiert ein Pool aus InsP_5 , der bei Bedarf schnell die benötigten Inositolphosphate bereitstellt. Inwiefern dieses Reservoir-Modell auch in anderen Pflanzenfamilien oder Organismen bestätigt werden kann, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Doch nicht nur der Gehalt an InsP_5 im Gewebe war in Cannabaceae ungewöhnlich hoch, sondern es konnte mit D- $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ ein bisher in anderen Organismen noch nicht nachgewiesenes InsP_5 identifiziert werden. Das dominante Inositolpolyphosphat in Zellkulturen und ausdifferenzierten Geweben von *Cannabis*

sativa war eben das im Ergebnisteil beschriebene $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$. Allerdings fand sich $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ auch als dominantes höher phosphoryliertes Inositolphosphat in *Humulus lupulus* und *Humulus japonicus*. Zusammen mit dem außergewöhnlich hohen Gehalt an InsP_5 , sowie mit einem bis dato unbekanntem InsP_5 -Isomer besitzen die Cannabaceae gleich zwei Auffälligkeiten im Metabolismus der Inositolphosphate. Über die intrazellulären Gehalte an Inositolphosphaten ist nur wenig bekannt. Auch die *in vivo* vorkommenden Isomere sind kaum untersucht. In Zellen einer Suspensionskultur von *Catharanthus roseus* fanden sich drei verschiedene Isomere von InsP_5 . Es handelte sich dabei um D-/L- $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$, $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ und D-/L- $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ [Mitsuhashi et al., 2005]. Man geht davon aus, dass die axiale Phosphatgruppe an Position 2 des Inositolrings eine wichtige Funktion bei der intrazellulären Differenzierung zwischen anabolem und katabolem Metabolismus übernimmt. Isomere, die an der 2-Position phosphoryliert sind, werden abgebaut, während solche, die an dieser Position nicht phosphoryliert sind, zur Synthese von InsP_6 genutzt werden [Greiner, 2007]. Für diese These sprechen mehrere Indizien. Die meisten bekannten PAE entlassen als letztes Intermediat $\text{Ins}(2)\text{P}_1$. Solche Enzyme sind aus verschiedenen Organismen bekannt, so auch aus dem gramnegativen, anaeroben Bakterium *Megasphaera elsdenii* [Puhl et al., 2009], dem chemoorganotrophen Enterobakterium *Klebsiella terrigena* [Greiner & Carlsson, 2006], den Höheren Pflanzen *Glycine max* und *Lupinus albus* [Greiner et al., 2002] und der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* [Greiner et al., 2001]. Bei der Synthese von InsP_6 bildet in der Regel $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ die letzte Vorstufe. Diese ist ebenfalls auch in verschiedenen Organismengruppen nachgewiesen worden, u.a. aus Zellen von Ratten [Fujii & York, 2005], aus der monokotyledonen Pflanze *Spirodela polyrhiza* [Brearley & Hanke, 1996a], aus *Vicia radiata* [Biswas et al., 1978a], dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* [Stephens & Irvine, 1990] sowie der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* [Ongushaha et al., 1998]. Auch sind mehrere InsP_5 -2-Kinasen bekannt, die die finale Umsetzung zum InsP_6 katalysieren [Biswas et al., 1978b]. All diese Fakten stützen die These, dass die Phosphatgruppe an Position 2 wichtig für die Einordnung in Synthese oder Abbau des Inositolphosphats ist. Legt man nun die eben angeführte Hypothese für die Beobachtungen in der Suspensionskultur von *Cannabis sativa* zugrunde, so zeigt sich, dass das dominante $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ vermutlich ein Abbauprodukt des InsP_6 ist. Auch die in *Catharanthus roseus* nachgewiesenen Isomere müssen folglich dem katabolen Stoffwechsel

zugeordnet werden [Mitsuhashi et al., 2005] In den Zellen, die in inositolfreiem sowie bei den Zellen, die in inositolhaltigem Medium kultiviert wurden, zeigte sich ein Anstieg der InsP_6 -Konzentration. Dieser kann nicht durch die Aufnahme aus extrazellulären Quellen erfolgt sein, da diese unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht vorhanden waren. Daher kann dieser Zuwachs nur neu synthetisiert worden sein. Offen bleibt jedoch, ob InsP_6 aus dem InsP_5 -Pool synthetisiert wird oder ob die Synthese komplett am $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ -Reservoir vorbei über $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ erfolgt. Außer den beiden bereits beschriebenen InsP_5 -Isomeren konnten allerdings in keinem Fall weitere InsP_5 -Isomere detektiert werden. Damit ist allerdings nicht nachgewiesen, dass in *Cannabaceae* kein $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ vorhanden sein kann. Wenn $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ schnell umgesetzt wird kommt es unter Umständen nur in sehr geringen Mengen vor und war durch die Messmethode nicht nachweisbar. Aus menschlichen Zellkulturen ist bekannt, dass der limitierende Schritt bei der Synthese von InsP_6 die Umsetzung durch die 5-/6-Kinase ist. Die Reaktion der 2-Kinase verläuft hingegen sehr schnell ab [Verbsky et al., 2005]. Dies deutet an, dass anfallendes $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ wohl schnell umgesetzt werden würde. Eine abschließende Erklärung lässt sich aber erst finden, wenn entweder das Intermediat $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ nachgewiesen wird oder eine spezifische Kinase für $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ oder $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ gefunden würde. Auch ist ein paralleles Vorkommen beider Synthesewege denkbar. Bis zur Klärung des Sachverhalts bleibt offen, wie in *Cannabis sativa* und vermutlich allen *Cannabaceae* InsP_6 synthetisiert wird.

Die Versuche mit Suspensionskulturen von *Cannabis sativa* haben gezeigt, dass InsP_6 von den Zellen aufgenommen werden kann. Eine Aufnahme war bisher lediglich für Tumorzellen von Menschen und Mäusen bekannt [Vucenik & Shamsuddin, 1994]. Der rasante Anstieg gegenüber den Zellen aus Medien ohne InsP_6 lässt hier keine anderen Schlüsse zu. Der Gehalt stieg innerhalb von zwei Tagen um die sechsfache Menge an, während die verfügbare Menge im Medium proportional abnahm. Die Zellen scheinen insbesondere bei Konzentrationen ab zwei mM InsP_6 zunächst große Mengen von InsP_6 aufzunehmen. Ob diese, wie aus *Catharanthus roseus* bekannt, zunächst überwiegend in der Vakuole gelagert werden, wurde nicht untersucht [Mitsuhashi et al., 2005]. In den folgenden Tagen kam es dann zu einem sukzessiven Abbau von InsP_6 mit einem damit verbundenen Anstieg der Konzentrationen an InsP_5 . Zu diesem Zeitpunkt tritt dann auch das zweite InsP_5 , nämlich D-/L- $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ auf. Der Anstieg dieser beiden Isomere

zeigt eindeutig, dass sie Komponenten des katabolen Stoffwechsels sind. Das bevorzugt gebildete InsP_5 scheint aber das dominante $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ zu sein. Das zweite Abbauprodukt, D-/L- $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$, entsteht nur bei hohen intrazellulären Konzentrationen an InsP_6 . Bei den beteiligten Enzymen handelt es sich also um Phytasen, die zunächst an der 1-Position hydrolysieren. Ein Enzym von diesem Typ ist bisher nicht bekannt. Die bereits isolierten Enzyme beginnen den Abbau an der Position 3, 4, 5 oder 6 [Rao et al., 2009]. In *Cannabis sativa* und den untersuchten *Humulus*-Arten scheint also ein bisher nicht bekannter Enzymtyp zu existieren. Genauere Untersuchungen müssen für die Zukunft klären, ob es ein vollkommen neuer Phytase-Typ ist oder ob es sich um eine der bekannten Phytasen mit einer neuen Abbaustrategie handelt. Das Auftreten des zweiten Isomers liegt vermutlich in dem großen Überschuss von InsP_6 begründet. Zum einen ist es möglich, dass unspezifische Phosphatasen mit geringer Substratspezifität den Abbau katalysieren. Die zweite Möglichkeit besteht darin, dass das oder die Enzyme neben dem Hauptabbauweg über $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ noch über einen zweiten Weg verfügen, der aber nur einen geringen Substratdurchsatz ausmacht. PAE mit solcher Fähigkeit sind bereits aus verschiedenen Organismen isoliert worden. Neben einem Enzym aus *Triticum aestivum* [Nakano et al., 1999], ist auch ein PAE aus *Megasphaera elsdenii* [Puhl et al., 2009] beschrieben, welches über zwei separate Abbauewege mit unterschiedlichem Substratdurchsatz verfügt. Allerdings trennen sich die Wege immer erst beim Abbau von InsP_5 . Lediglich aus *Triticum aestivum* ist ein Enzym bekannt, das bereits bei der ersten Hydrolyse zwei Abbauprodukte erzeugt und sowohl an der 3- als auch an der 6-Position mit der Dephosphorylierung beginnen kann [Bohn et al., 2007]. Auch die Beteiligung von mehr als einem Isoenzym bei *Cannabis sativa* ist denkbar. Letztlich kann nur eine genaue Bestimmung des Abbaueweges von PAE aus *Cannabis sativa* klären, wie der InsP_6 -Abbau in der Pflanze erfolgt. Hier kann das isolierte und größtenteils charakterisierte Enzym aus den Kotyledonen von *Cannabis sativa* schnell erste Ergebnisse liefern. Bei der Untersuchung des Enzyms auf die bei der Hydrolyse entstehenden Isomere können evtl. bereits einige Unklarheiten beseitigt werden. Falls das Enzym beim Abbau von InsP_6 zwei InsP_5 -Isomere bildet, wäre ein erster Hinweis darauf gegeben, dass der Abbau von einem Enzym bzw. Isoenzym katalysiert werden kann. Ein solcher Nachweis ist mit einer ausreichenden Menge isoliertem Enzym relativ leicht durchzuführen.

Trotz der im Laufe dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bleiben der Metabolismus der Inositolphosphate und die Regulation der Signalstoffe weiterhin überwiegend unaufgeklärt. Es sind viele Funktionen von InsP_6 bekannt, aber in welcher Form es am Wachstum der pflanzlichen Gewebe partizipiert muss noch eingehend untersucht werden. Auch der Entstehungsweg und die Funktion des neu entdeckten $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ in Vertretern der Cannabaceae ist noch vollkommen unklar. Während sich die Synthese durch markierte potentielle Vorstufen belegen ließe, müssten zur Funktionsbestimmung vermutlich spezielle Mutanten eingesetzt werden. Die Herstellung solcher Mutanten ist allerdings relativ schwierig und mit großem Arbeitsaufwand verbunden. Schnelle Ergebnisse sind hier nicht zu erwarten.

Ebenfalls unklar ist, wie, wann und wo Phytasen synthetisiert werden. Insbesondere in Hanf ist dazu zunächst eine Sequenzierung des Genoms nötig, um alle potentiellen Phytasen anhand von Homologien zu identifizieren. Erst danach können Expressionsstudien durchgeführt und falls nötig gezielt einzelne Enzyme geklont oder ausgeschaltet werden. Auch dieser Weg zum Verständnis der Regulation der Genexpression von Phytasen ist zeit- und arbeitsintensiv. Es werden daher nur kleine Schritte möglich sein, um mehr über den Stoffwechsel der Inositolphosphate und die Regulation der beteiligten Enzyme zu erfahren.

4.2 Lichtabhängige Mobilisierung von Inositolphosphaten in Keimlingen von *Cannabis sativa* L.

Der Abbau von Phytin, dem Mineralsalz von InsP_6 , ermöglicht der Pflanze Zugang zu einigen für die Entwicklung essentiellen Substanzen, wie Inositol, Phosphat und verschiedenen Mineralien. Während der Keimung ist Licht als initialer Faktor für die Ausbildung unterschiedlicher Charakteristika der Pflanze verantwortlich, so auch für die Synthese von Chlorophyll. Liegt Lichtmangel vor, kann die Pflanze diese normale Entwicklung nicht durchlaufen. Im Gegensatz zur im Licht ablaufenden Fotomorphogenese läuft bei Dunkelheit der Prozess der Skotomorphogenese ab. Als Ergebnis dieser Entwicklung unterscheiden sich im Dunkeln gezogene Pflanzen deutlich von im Licht angezogenen Individuen derselben Art. Da angenommen wird, dass insbesondere die untersuchten Inositolpolyphosphate an Wachstums- und Entwicklungsprozessen beteiligt sind sollten die Gehalte in etiolierten und normalen Keimlingen bestimmt und miteinander verglichen werden.

Für die Untersuchung wurden Keimlinge von *Cannabis sativa* eingesetzt. Zwischen den Licht- und Dunkelpflanzen konnten nur geringe morphologische Unterschiede registriert werden. Neben dem Fehlen von Chlorophyll in den Dunkelkeimlingen waren lediglich die Internodien geringfügig länger als bei den Kontrollpflanzen. Dieses Merkmal ist ein typischer Unterschied zwischen den beiden Entwicklungsprozessen. Die Beobachtung zeigt, dass Hanf offensichtlich nur wenig zum Vergeilen neigt. Da in Hanf jedoch relativ große Mengen an Inositolpolyphosphaten nachweisbar sind, wurden die Untersuchungen trotzdem an ihnen durchgeführt. Um einen Vergleich mit anderen Spezies ziehen zu können bietet es sich jedoch an die Versuche mit einer anderen Art zu wiederholen. Dabei sollte es sich möglichst um eine Art handeln, die zu eine stark divergierenden Entwicklung bei Licht und Lichtmangel neigt. Dazu eignen sich insbesondere solche Spezies, die möglichst viele der typischen Skotomorphosen ausbilden, wie dies z.B. von *Pisum sativum* bekannt ist.

In den beiden Entwicklungsformen konnten alle drei bereits aus den Untersuchungen an Zellkulturen von *Cannabis sativa* bekannten Inositolpolyphosphate detektiert werden. So fand sich neben InsP_6 und $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ auch das zweite Inositolpentakisphosphat D-/L- $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$. Letzteres konnte jedoch nur in geringen Mengen nachgewiesen werden und nahm an den aufeinander folgenden Messtagen kontinuierlich ab. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass es

aufgrund der großen Mengen an InsP_6 lediglich als Nebenprodukt entsteht, aber keine dominante Funktion erfüllt.

Die normale Mobilisierung der Reserven an Inositolphosphaten erfolgt unter Lichteinfluss. Man kann also davon ausgehen, dass die Lichtkeimlinge die typische Entwicklung der Pflanze darstellen. Bei ihnen erfolgt demnach der normale Abbau der Inositolphosphate. Wie sich an den Gehalten der Inositolpolyphosphate ablesen lässt (siehe Tab. 3.2) verläuft die Entwicklung bei Dunkelkeimern unterschiedlich ab. Zwei Tage nach der Keimung ist der Gehalt an InsP_6 verglichen mit der Kontrolle erheblich niedriger. Es können nicht nur insgesamt weniger Inositolpolyphosphate nachgewiesen werden, sondern auch das Verhältnis zwischen InsP_6 und $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ ist unterschiedlich. Während InsP_6 in den Kontrollpflanzen um den Faktor 12 höher liegt als InsP_5 , zeigt sich bei den etiolierten Exemplaren ein fast ausgeglichenes Verhältnis zwischen diesen beiden Isomeren. Für dieses auffällige Ergebnis sind unterschiedliche Erklärungen denkbar. Es könnte sich zum einen um einen Messfehler handeln. Die Wahrscheinlichkeit ist jedoch sehr gering, da mehrere Messungen durchgeführt wurden und für jede einzelne mindestens fünf Keimlinge zusammen untersucht wurden. Des Weiteren ist denkbar, dass in den Keimlingen Speicher für InsP_6 existieren, die aufgrund fehlender Schlüsselreize in den etiolierten Keimlingen noch nicht genutzt wurden. Auch diese Variante erscheint eher unwahrscheinlich, da davon ausgegangen werden kann, dass auch das in den Globuli der Speichervakuolen enthaltenen InsP_6 durch die verwendete Aufschlussmethode in Lösung gebracht werden konnte. Sinnvoll erscheint nur ein durch den fehlenden Lichtreiz bedingtes alternatives Entwicklungsprogramm zu sein. Möglicherweise mobilisiert die Pflanze sehr schnell ihre vorhandenen Reserven, um durch verstärktes Wachstum an eine Lichtquelle zu gelangen. Zu dieser Mobilisierung würde wohl auch ein verstärkter Umsatz von InsP_6 gehören, um der Pflanze neben Phosphat auch Inositol bzw. die aus diesem zu bildende Glucose bereitzustellen. Einen Hinweis auf diese These wurde eine erhöhte Phytaseaktivität in den etiolierten Keimlingen geben oder eine vergleichende Messung der Inositol- bzw. Phosphatgehalte in Licht- und Dunkelkeimlingen.

Bei fünf Tage alten Keimlingen zeigt sich eine interessante Entwicklung, so konnte nun bei den dunkel adaptierten Pflanzen ein starker Anstieg des InsP_6 -Gehalts beobachtet werden. Die Jungpflanzen zeigen sowohl bei den normal gezogenen als auch bei den im Dunkeln gezogenen Exemplaren fast gleich Mengen an InsP_6 und

den beiden InsP_5 . Während sich diese Beobachtung in den Kontrollen durch Abbau von InsP_6 erklären lässt, scheint es in den etiolierten Keimlingen zu einer Synthese von InsP_6 gekommen zu sein. Dieser deutliche Anstieg könnte durch die Freisetzung von InsP_6 aus bisher nicht detektierten Speichern verursacht worden sein. Wie bereits erwähnt ist diese Möglichkeit eher unwahrscheinlich und wird daher vernachlässigt. Die zweite Option ist eine Neusynthese von InsP_6 aus freien oder gebundenen Vorstufen. Vermutlich liegt die Ursache dieser Entwicklung im fortwährend fehlenden Lichtreiz. Da die Pflanze trotz verstärkter Mobilisierung ihrer Reserven noch nicht an das Licht gelangt ist ändert sie ihre Strategie. Sie erhöht den Gehalt an InsP_6 auf ein Verhältnis wie es aus den noch nicht differenzierten Bereichen der Pflanzen bekannt ist (siehe 3.1.5). Es ist denkbar, dass die Pflanze auf diese Weise versucht das Streckungswachstum des Sprosses aufrecht zu erhalten. Die Umstellung der Strategie von einem energieaufwendigen schnellen Wachstum zu einer langsameren Lebensweise macht für die Pflanze Sinn. Noch ist zwar unklar wie weit die Beteiligung der Inositolphosphate an Wachstumsprozessen wirklich gehen, doch scheinen sie wie bereits erwähnt (siehe 4.1) einen Hinweis auf den Differenzierungsgrad des Gewebes zu geben bzw. mit einer Erniedrigung von InsP_6 eine Differenzierung einherzugehen. Für die im Dunkeln gezogene Pflanze ist es wichtig keine Ressourcen zu verschwenden. Für sie ist Stützgewebe im Spross in der aktuellen Situation nicht notwendig. Möglicherweise erhöhen sie den Gehalt an InsP_6 derart massiv um einer weiteren Differenzierung des Gewebes entgegen zu wirken und nur Reserven in das Längenwachstum fließen zu lassen.

Im weiteren Lauf der Entwicklung zeigt sich in den Kontrollpflanzen ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen InsP_6 und $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$. In den Dunkelpflanzen liegt der Gehalt des InsP_5 etwa 60 % niedriger als in den Kontrollpflanzen. InsP_6 hingegen ist bei den etiolierten Individuen im Vergleich mit dem endogenen Gehalt an InsP_5 weiterhin deutlich erhöht. Diese Beobachtung bestätigt noch einmal die eben vorgestellte Hypothese, dass InsP_6 relativ zu $\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$ Einfluss auf die Differenzierung von Geweben ausübt. Diese Überlegung erscheint logisch. In dieser Situation wurde bereits ein Großteil der Reserven für das Längenwachstum der Pflanze verwendet ohne an eine Lichtquelle zu gelangen. Die einzige Möglichkeit zu überleben ist das Erreichen des Sonnenlichts, welches der Keimling nur durch fortgesetztes Längenwachstum erreichen kann. Da das Gewebe aufgrund des hohen Gehalts an InsP_6 nicht weiter

ausdifferenziert, können die letzten Reserven für die Zellteilungen und das Längenwachstum mobilisiert werden.

Interessant wäre an dieser Stelle eine länger andauernde Beobachtung, um zu klären, wie lange die Pflanze dieses Verhältnis an Inositolpolyphosphaten aufrechterhalten kann und parallel noch Längenwachstum zu erkennen ist. Weitere Untersuchungen müssten sich auch der Beziehung zwischen Inositolphosphaten und Längenwachstum des Sprosses bzw. dessen Differenzierungsgrad widmen. Hier wäre wichtig zu klären, ob InsP_6 , falls es in gewissen Konzentrationen vorliegt Einfluss auf die Gewebsdifferenzierung, z.B. auf die Ausbildung von Stützgewebe und dergleichen hat. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben zwar Hinweise, aber abschließende Belege zu dieser Hypothese konnten noch nicht erbracht werden.

4.3 **Aufreinigung eines Phytat-abbauenden Enzyms aus Kotyledonen von *Cannabis sativa* L.**

Im Metabolismus der Inositolphosphate nehmen Phytasen eine entscheidende Rolle ein. Diese Enzyme stellen ein bedeutendes Element während der Keimung dar, weil sie die Mobilisierung und damit die Verfügbarkeit von Phosphat, Inositol und Mineralien in der Pflanze gewährleisten. Sie stellen in dieser frühen Phase der pflanzlichen Entwicklung, in der die junge Pflanze aufgrund des noch nicht ausgebildeten Fotosyntheseapparats nicht autotroph ist, eine unverzichtbare Komponente für das normale Wachstum der Pflanze bereit. Ziel dieser Forschungsarbeit war die Isolierung eines Enzyms aus *Cannabis sativa* durch biochemische Reinigungsmethoden. Diese Vorgehensweise wurde bereits erfolgreich für einige Enzyme aus Pflanzen und Bakterien angewendet [Greiner et al., 1993; Greiner, 2002]. Die Aufgabe bestand in der Isolierung eines Phytat-abbauenden Enzyms (PAE, Abkürzung steht sowohl für die Singular- als auch die Pluralform) aus den Kotyledonen von *Cannabis sativa*. Ein vergleichbares Enzym wurde bereits aus den Keimblättern von *Glycine max* isoliert [Gibson & Ullah, 1988]. Der Großteil der aktuell bekannten PAE wurde, im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit verfolgten Ansatz, durch Sequenzvergleiche identifiziert. Die entsprechenden Gene wurden mittels PCR amplifiziert und in einem Expressionssystem zur weiteren Charakterisierung überexprimiert [Übersicht in Rao et al., 2009]. Auf diese Weise konnte bereits eine Vielzahl an potentiellen Phytasen isoliert werden. Die Suche nach passenden Proteinen erfolgte in erster Linie bei Organismen, deren Genom bereits entschlüsselt wurde und in denen deshalb anhand bekannter Sequenzmuster nach PAE gesucht werden konnte. Das Genom von *Cannabis sativa* wurde noch nicht sequenziert. Bedingt durch das Fehlen dieser Sequenzinformationen war einem biochemischen Vorgehen gegenüber einem rein molekularbiologischen Ansatz der Vorzug zu geben.

Die Isolierung von Enzymen direkt aus Pflanzengewebe benötigt große Mengen an Ausgangsmaterial. Um den größtmöglichen Gehalt an Enzym im Gewebe zu erhalten musste zunächst der optimale Erntezeitpunkt der Kotyledonen bestimmt werden. Dies bedeutet den Entwicklungsstand mit der höchsten Phytaseaktivität zu bestimmen. Um dies zu ermöglichen, muss man sich erst die Funktion der Keimblätter im Keimungsverlauf verdeutlichen. Für die ersten Tage der Keimung befinden sich Reservestoffe in den Kotyledonen. Sie ermöglichen dem Keimling die

für eine photoautotrophe Lebensweise nötigen Strukturen auszubilden. Nachdem die Speichersubstanzen aufgebraucht wurden, sind die Keimblätter für die Pflanze nutzlos geworden und sterben ab. Dies begrenzt den Erntezeitraum auf die ersten sieben bis zehn Tage nach der Keimung. In *Cannabis sativa* stieg die Phytaseaktivität in der ersten Phase der Keimung zunächst rapide an und stabilisierte sich dann im weiteren Verlauf der Entwicklung. Von anderen Keimlingen sind ähnliche Aktivitätsverläufe bekannt. So zeigte sich in Samen von *Zea mays* eine Verdoppelung der Aktivität während der Keimung und in unterschiedlichen Sorten von *Pisum sativum* wurden sogar Steigerungen der Aktivität um 800 bis 3000 % innerhalb von fünf Tagen nach der Keimung beobachtet [Gibson & Ullah, 1988]. Die genaue Steigerung der Aktivität kann in *Cannabis sativa* nicht beziffert werden, da im Samen keine Phytaseaktivität nachweisbar war. Jedoch passen die in Hanf beobachteten Zeiträume gut mit der Aktivitätssteigerung überein, die in Erbsen ermittelt wurde. In Hanf war das Aktivitätsmaximum, zumindest in den Keimblättern, drei bis fünf Tagen nach der Keimung erreicht. Der Anstieg der Phytaseaktivität verläuft also in unterschiedlichen Pflanzenarten in einem ähnlichen zeitlichen Rahmen. Es wird angenommen, dass in Samen grundsätzlich aktive Phytasen vorhanden sind [Greiner, 2007]. Der Umstand, dass dies in *Cannabis sativa* nicht nachgewiesen werden konnte, kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte die Konzentration der im Samen vorhandenen konstitutiv exprimierten PAE zu gering gewesen sein, um sie durch den verwendeten Enzymtest nachzuweisen. Die Enzyme könnten auch als inaktive Form vorgelegen haben. Eine Aktivierung mit Hilfe eines Schlüsselreizes wäre unter den gegebenen Testbedingungen dann allerdings nicht erfolgt. Eine weitere Option wäre das Fehlen von essentiellen Cofaktoren, wie z.B. Ca^{2+} -Ionen. Versuche zeigten jedoch, dass der Zusatz von Ca^{2+} -Ionen zu keinem Nachweis von Aktivität führte. Dies wäre ein interessanter Fund gewesen, denn die einzigen bekannten Phytasen, die Ca^{2+} als Cofaktor benötigen, sind die β -Propeller-Phytasen. Dieser Phytasetyp ist bisher aber nur aus Bakterien der Gattung *Bacillus* bekannt [Fu et al., 2008]. Man geht davon aus, dass es sich um eine besondere evolutive Anpassung dieser Bakteriengruppe handelt. Die Entdeckung eines solchen Enzyms in einer Pflanze hätte diese These widerlegt. Ebenfalls denkbar ist, dass die Enzyme aufgrund der verwendeten Aufschlussmethode nicht in Lösung gehen konnten. Dies wäre bei membranassoziierten Proteinen denkbar, die nur durch Verwendung eines entsprechenden Detergenz von der Membran zu lösen

wären. In verschiedenen Versuchsansätzen zeigte sich jedoch, dass beim Einsatz von Triton X-100, in einer Standardkonzentration von 0,1 % (v/v), keine signifikante Erhöhung der messbaren Phytaseaktivität nachweisbar war. Damit ist nicht bewiesen, dass keine Phytasen im Samen von *Cannabis sativa* enthalten sind, allerdings waren sie unter den verwendeten Aufschluss- und Testbedingungen unter den löslichen Zellbestandteil nicht nachweisbar. Hier könnten weitere Untersuchungen ansetzen, um unter modifizierten Aufschluss- und Testbedingungen im Samen aktive Phytasen zu isolieren.

Im Vergleich von Rohextrakten aus verschiedenen biochemischen Aufreinigungen zeigte sich in bakteriellen Proteinlösungen eine deutlich höhere spezifische Aktivität als in pflanzlichen Extrakten [Übersicht: Rao et al., 2009]. Die im Hanf ermittelte spezifische Aktivität von 0,057 U/mg Protein liegt in einem Bereich der auch in Rohextrakten anderer Pflanzen nachgewiesen werden konnte. So zeigte sich im Samen von *Lupinus albus* eine spezifische Aktivität von 0,038 U/mg Protein [Greiner, 2002], im Rohextrakt der Kotyledonen von *Glycine max* wurden Werte von 0,11 U/mg erreicht [Gibson & Ullah, 1988]. In den untersuchten Bakterien konnten spezifische Aktivitäten von 0,5 U/mg Protein im Rohextrakt nachgewiesen werden [Greiner et al., 1993; Greiner et al., 1997]. Diese höhere Aktivität in den Mikroorganismen ist vermutlich durch die Anzuchtbedingungen stimuliert worden. In *Klebsiella terrigena* löste beispielsweise nur Kohlenstoffmangel die Synthese der anschließend isolierten Phytase aus [Greiner et al., 1997]. Unter diesen speziellen Konditionen bildeten die Mikroorganismen vermutlich große Mengen an PAE, um den Mangelbedingungen zu entgehen. Dieser relativ hohe Anteil der PAE am Proteom der Mikroorganismen verursacht die beobachtete höhere spezifische Aktivität. Die Keimlinge der Pflanzen sind durch ihre Reservestoffe gut versorgt. Es besteht bei ihnen also keine Veranlassung zu einer erhöhten Expression von PAE. In den Pflanzensamen läuft ein normales Wachstumsprogramm ab, die Bakterien befinden sich dagegen durch die herrschenden Mangelbedingungen in einer Ausnahmesituation und reagieren entsprechend ihrer Veranlagung mit einer vermehrten Bildung von Phytasen.

Bei allen bekannten Phytaseaufreinigungen, die ausschließlich auf biochemische Methoden zurückgegriffen haben, stellt der erste Reinigungsschritt eine Fällung der Proteine durch Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dar. Die in *Cannabis sativa* durchgeführte Fällung orientierte sich dabei an der Aufreinigung von drei PAE aus *Lupinus albus* [Greiner, 2002]. Hier wurden die präzipitierten Proteine im Bereich 30 bis 80 %

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung für die weitere Aufreinigung verwendet. Für *Cannabis* wurde dieser Schritt leicht modifiziert, indem zunächst eine Sättigung von 35 % eingestellt und die präzipitierten Proteine entfernt wurden. Eine weitere Aufsalzung erfolgte nicht. Wurde nämlich eine sekundäre Fällung bei 80 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung durchgeführt, ging ein erheblicher Teil der Aktivität verloren. Die in der Lösung eingestellte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration war zusätzlich für den folgenden Aufreinigungsschritt über Phenyl-Sepharose ideal. Die Ausbeuten an aktiven Phytasen, die bei verschiedenen Isolierungen publiziert wurden, lagen etwas höher als jene in *Cannabis sativa* erzielten Werte von knapp 72 %. In *Lupinus albus* konnten 89 % Ausbeute erzielt werden [Greiner, 2002], in den untersuchten Bakterien *Klebsiella terrigena* und *Escherichia coli* betrug diese jeweils 95 % [Greiner et al., 1997; Greiner et al., 1993]. Bei *Zea mays* zeigte sich ein starker Verlust von Aktivität, hier konnten lediglich 21,3 % der Ausgangsaktivität renaturiert werden [Hübel & Beck, 1996]. Der Umstand, dass das Enzym aus *Zea mays* ein Homodimer ist, könnte die geringe Ausbeute erklären. Es bildet offensichtlich nach der Fällung nur in wenigen Fällen die vorherige räumliche Struktur wieder aus, d.h. die beiden Untereinheiten lagern sich nicht wieder korrekt zusammen. Durch die fehlende Dimerisierung geht vermutlich ein Großteil der Aktivität verloren. Für die monomeren Enzyme ist die Ausbildung solcher Strukturen nicht nötig, so dass hier die Renaturierung mit einer deutlich höheren Ausbeute erfolgt. Interessant sind die Ergebnisse in *Glycine max*, hier konnten im Anschluss an die Fällung 40 % mehr an Aktivität detektiert werden als im Rohextrakt [Gibson & Ullah, 1988]. Diese Beobachtung konnte in *Cannabis sativa* in ähnlicher Form auch gemacht werden. Im Vergleich mit der Ausgangsaktivität wurden in mehreren Aufreinigungen erhöhte Werte für die Aktivität der unspezifischen Phosphatasen beobachtet. Wahrscheinlich hat das Ammoniumsulfat eine stabilisierende Wirkung auf die Proteine. Zum einen wird so der Abbau der Proteine, u.a. durch Proteasen, verhindert oder wenigstens verlangsamt, zum anderen bewirkt die stabilere Konformation des Proteins eine Zunahme der Aktivität. Dieses Verhalten wurde bereits an einer Lactat-Dehydrogenase aus Schweinemuskeln beobachtet. Hier wirkte Ammoniumsulfat als effektiver Stabilisator und verhinderte so die Oxidation des Enzyms [Anderson et al., 2000]. Dies wäre eine nachvollziehbare Erklärung für die erhöhte Aktivität. Allerdings ist auch denkbar, dass durch die Fällung hemmende Elemente aus der Lösung entfernt wurden. Zu diesen Inhibitoren könnten sowohl Proteasen gehören, aber

auch spezifische Hemmstoffe von Phytasen wie z.B. Phosphat und Fluorid [Greiner, 2002].

Die nachfolgenden Aufreinigungsschritte unterscheiden sich deutlich von anderen biochemischen Phytasereinigungen aus bekannten Publikationen. Während andere Proteine nun mittels verschiedener Ionenaustauschermaterialien gereinigt wurden [Greiner et al., 1997; Greiner, 2002], erfolgte für *Cannabis sativa* eine hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Sepharose. Diese alternative Reinigungsstrategie war notwendig geworden, da die Verwendung unterschiedlicher Ionenaustauscher, in erster Linie von Q-Sepharose, DEAE-Sepharose und CM-Sepharose, für *Cannabis sativa* keine zufrieden stellenden Ergebnisse erbrachte. Dies galt sowohl für die separate Anwendung, als auch für unterschiedliche Kombinationen der Ionenaustauschermaterialien. Daher wurde als erster chromatographischer Reinigungsschritt Phenyl-Sepharose eingesetzt. Dieses Säulenmaterial ist bereits aus anderen Aufreinigungen bekannt, wurde bisher jedoch ausschließlich im Anschluss an eine Ionenaustauschchromatographie eingesetzt [Greiner et al., 1993; Choi et al., 2001]. Die dabei für *Cannabis sativa* erzielten Ausbeuten wurden mit über 20 % der Ausgangsaktivität ermittelt und lagen damit im selben Größenbereich wie die bei der Aufreinigung einer Phytase aus *Bacillus sp.* beschrieben wurde [Choi et al., 2001]. Ein entscheidender Vorteil der Phenyl-Sepharose ist, dass sie im Aufgabepuffer hohe Konzentrationen an Ammoniumsulfat verträgt bzw. benötigt. Die hydrophoben Bereiche der Proteine neigen unter diesen Bedingungen zu stärkeren Interaktionen mit dem hydrophoben Säulenmaterial. Deshalb war es nicht notwendig, die Fällungsfractionen mit relativ hohen Konzentrationen an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ einer weiteren Behandlung zu unterziehen, sondern sie konnten direkt eingesetzt werden. Das während dieser Arbeit praktizierte modifizierte Verfahren vereinfachte die Aufreinigung deutlich und verringerte den Zeitaufwand.

Als dritter Reinigungsschritt hat sich eine Lektinchromatographie an ConA-Sepharose, einem Säulenmaterial mit einem Glykoproteinrest, als günstig erwiesen. Die Untersuchungen zeigten, dass fast alle Phosphatasen an ConA-Sepharose gebunden haben. An Weizenkeimagglutinin (WGA) erfolgte keine Bindung der Proteine. WGA bindet bevorzugt N-Acetylglucosamin und besitzt auch eine Affinität für Sialinsäurereste [Bakry et al., 1991]. Es kann also abgeleitet werden, dass diese Art der Glykosylierung in den noch vorhandenen Proteinen wohl nicht zu finden ist.

Die Bindung der Phosphatasen an ConA deutet auf eine Glykosilierung mit Anteilen von α -Mannose hin [Becker et al., 1975]. Die Glykosilierung von Proteinen scheint zumindest bei Phytasen einen positiven Effekt auf Aktivität und Thermostabilität zu haben. Eine in *Saccharomyces cerevisiae* exprimierte, aus *Aspergillus niger* stammende, Phytase zeigte einen massiv erhöhten Grad an Glykosilierung, der die Molekülmasse von 80 auf 120 kDa erhöht hat. Die Entfernung der Zuckerreste verursachte einen Verlust an Aktivität und eine erhebliche Einbuße an Thermostabilität [Han et al., 1999]. Es wird deutlich, dass die Glykosilierung, wenn auch durch die Expression in fremden Organismen bedingt, einen positiven Effekt insbesondere auf die in der Wirtschaft gewünschten Eigenschaften der Enzyme haben kann. Dazu zählen die für die wirtschaftliche Nutzung gewünschte hohe Aktivitäten bei relativ hohen Temperaturen.

Als nachfolgender Aufreinigungsschritt wurde eine Affinitätschromatographie durchgeführt. Unter den getesteten Materialien zeigte Heparin-Agarose die besten Eigenschaften für die Bindung eines Phytat-abbauenden Enzyms. Hier erfolgte eine selektive Bindung des PAE an die Matrix. Auf welche Weise die Enzyme genau mit der Heparin-Agarose interagieren ist noch nicht geklärt. Die Ergebnisse dieses Aufreinigungsschritts zeigen jedoch einen positiven Effekt bei der Abtrennung unspezifischer Phosphatasen. Neben einer deutlichen Steigerung des Reinigungsfaktors, zeigt sich dies auch in einem deutlichen Anstieg der spezifischen Aktivität. Die Anzahl der eluierten Proteine war nach der Affinitätschromatographie auf eine kleine Zahl reduziert worden. Aufgrund der relativ unterschiedlichen Molekülmassen bot sich als finaler Schritt eine Größenausschlusschromatographie an. Auf diese Weise konnte ein Enzym mit einer Größe von 45 kDa isoliert werden. Die Wiederfindungsrate lag mit 0,6 % relativ niedrig. Aus Bakterien konnten 18 bzw. 28 % der Aktivität in der letzten Fraktion detektiert werden [Greiner et al., 1993; Greiner et al., 1997]. In den Kotyledonen von *Glycine max* waren 7 % und in *Lupinus albus* rund 10% der Aktivität in der letzten Fraktion erhalten geblieben [Gibson & Ullah, 1988; Greiner, 2002]. Lediglich die Phytase aus der Wurzel von *Zea mays* wies mit 0,3 % eine geringere Wiederfindungsrate auf [Hübel & Beck, 1996]. Der Reinigungsfaktor für die isolierte Phytase aus *Cannabis sativa* lag bei 37,6 und damit zwischen den Werten von *Glycine max* mit 21,9 [Gibson & Ullah, 1988] und *Zea mays* mit 64,4 [Hübel & Beck, 1996]. Die Aufreinigung der drei Phytasen aus *Lupinus albus* erzielt Werte für den Reinigungsfaktor zwischen 13.000 und 16.000 [Greiner,

2002]. Der Reinigungsfaktor der hier durchgeführten Aufreinigung ist mittelmäßig, dennoch wurde ein Phytat-abbauendes Enzym bis zur Homogenität aufgereinigt. Das isolierte Enzym wurde einer weitergehenden Charakterisierung unterzogen, um zu klären, ob es sich tatsächlich um eine Phytase handelt und falls ja um welchen Enzymtyp es sich dabei handelt.

Der erste Schritt bestand in der Auflösung der Quartärstruktur und der Größenbestimmung. Mittels Gelelektrophorese konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dem isolierten Enzym um ein Monomer handelt, wie es auf die meisten isolierten PAE zutrifft. So wurden in verschiedenen Bakterien und Hefen ausschließlich monomere Enzyme entdeckt [Rao et al., 2009]. Im Pflanzenreich sind monomere PAE aus *Glycine max* [Gibson & Ullah, 1988; Hegeman & Grabau, 2001], *Lupinus alba* [Greiner, 2002] und *Vicia faba* [Greiner et al., 2001] beschrieben worden. Die Enzyme wurden dabei entweder aus den Kotyledonen [Gibson & Ullah, 1988; Hegeman & Grabau, 2001] oder den Samen [Greiner, 2002] oder ganzen Keimlingen [Greiner et al., 2001] isoliert. Bei den anderen aus Pflanzen aufgereinigten Enzymen handelt es sich dagegen um Homodimere. Sie stammen aus *Zea mays* [Hübel & Beck, 1996; Laboure et al., 1993] und *Solanum lycopersicum* [Li et al., 1997]. Aus *Zea mays* sind dimere Isoenzyme aus der Wurzel und dem Spross bekannt. In *Solanum lycopersicum* wurde es aus der Wurzel isoliert. Bis jetzt sind noch zu wenige PAE isoliert und charakterisiert, um eine abschließende Bewertung vornehmen zu können. Zwar scheint in *Zea mays* der dimere Proteintyp vorzuherrschen, damit ist aber noch nicht erwiesen, dass in Mais bzw. Tomate nicht auch andere Enzymtypen vorkommen. Genauso ist unklar, ob bei den eingangs erwähnten Pflanzen nicht auch Isoenzyme vorkommen, die in ihrer Quartärstruktur von den bereits bekannten Phytasen abweichen.

Neben der Tatsache, dass es sich bei dem aus *Cannabis sativa* isolierten Enzym um ein Monomer handelt, konnte anhand der SDS-Gelelektrophorese auch die Größe des Enzyms mit 45 kDa bestimmt werden. Das Molekulargewicht liegt in einem für PAE typischen Bereich. Vereinzelt wurden zwar deutlich größere Proteine beschrieben, so aus *Aspergillus fumigatus* mit 88 kDa [Wang et al., 2007], aus der marinen Hefe *Kodamaea ohmeri* mit 98,2 kDa [Li et al., 2008] sowie aus *Solanum lycopersicum* und *Glycine max* mit 82 bzw. 72 kDa [Li et al., 1997; Hegeman & Grabau, 2001], aber die meisten PAE passen in den Größenbereich zwischen 40 und 60 kDa. Obwohl die Enzyme aus verschiedenen Organismengruppen stammen,

weisen sie dennoch relativ ähnliche Molekülgrößen auf. Eine Phytase aus *Glycine max* besaß eine Molekülmasse von 50 kDa [Gibson & Ullah, 1988], eine Untereinheit des homodimeren Enzyms aus *Zea mays* war 38 kDa groß [Hübel & Beck, 1996]. Einige Enzyme bakteriellen Ursprungs liegen von ihrer Größe sogar noch näher am aus Hanf isolierten PAE. In *Escherichia coli* war ein Enzym von 42 kDa nachweisbar [Greiner et al., 1993] und in *Bacillus subtilis* eines von 43 kDa [Kerovuo et al., 1998]. Des Weiteren ist ein 43 kDa großes Protein aus *Dickeya paradisiaca* beschrieben worden [Gu et al., 2009] und im phytopathogenen Bakterium *Pectobacterium wasabiae* konnte ein Enzym mit 45 kDa charakterisiert werden [Shao et al., 2008]. Neben Pflanzen und Bakterien zeigen auch die meisten pilzlichen Enzyme eine Größe zwischen 40 und 60 kDa. Eine aus *Saccharomyces cerevisiae* bekannte Phytase hatte eine Größe von 49 kDa [Kim et al., 2006], aus der Hefe *Axula adenivorans* ist ein 52,4 kDa großes Protein bekannt [Kaur et al., 2007]. Im thermophilen Pilz *Thermomyces lanuginosus* wurde eine hitzestabile Phytase mit 54 kDa kloniert [Gulati et al., 2007].

Aus diesen Beobachtungen können noch keine allgemeingültigen Aussagen über die Größe von Phytasen gemacht werden. Dafür sind zu viele unterschiedliche Klassen dieses Enzyms bekannt. Aufgrund der weiten Verbreitung in unterschiedlichen Organismen scheint eine Enzymgröße zwischen 40 und 60 kDa für die katalytische Aufgabe des Proteins im evolutiven Prozess als besonders günstig erwiesen zu haben. Das isolierte monomere Enzym aus *Cannabis sativa* besitzt mit 45 kDa eine passende Größe, um eine Phytase zu sein.

Zwei wichtige Parameter für die Enzymaktivität und die Charakterisierung des Proteins stellen pH- und Temperaturoptimum dar. Das pH-Optimum des isolierten Enzyms aus *Cannabis sativa* lag bei 5,0. Bei pH 4,5 und 5,5 zeigte das Enzym noch gute Phytaseaktivität, zum sauren Bereich hin zeigte sich eine starke Abnahme der Aktivität. Auch zum neutralen Bereich hin nahm die Aktivität stark ab. Die pH-Optima der meisten isolierten PAE liegen im sauren pH-Bereich [Rao et al., 2009]. Von den pflanzlichen PAE zeigt jenes aus der Wurzel von *Solanum lycopersicum* ein pH-Optimum von 4,3 [Li et al., 1997]. Aus *Glycine max*, den Wurzeln von *Zea mays*, *Allium fistulosum* sowie *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare* sind Enzyme bekannt, deren pH-Optima zwischen 4,5 und 5,5 liegen [Hegeman & Grabau, 2001; Hübel & Beck, 1996; Phillippy, 1998; Dionisio et al., 2007]. Dabei zeigte sich, dass die Aktivität vieler PAE nur in einem kleinen pH-Bereich um das Optimum auf hohem

Niveau stabil ist, während sie zu beiden Seiten der pH-Skala rapide absinkt. Dieser zum sauren und alkalischen pH-Bereich zu beobachtende starke Aktivitätsverlust scheint ein typisches Merkmal für PAE pflanzlichen Ursprungs darzustellen [Rao et al., 2009]. Dies ist ein weiteres Indiz, dass das isolierte Enzym aus *Cannabis sativa* wirklich eine Phytase ist. Aufgrund des sauren pH-Optimums kann das Enzym unabhängig von seiner weiteren Klassifizierung als Saure Phosphatase eingestuft werden.

Das pH-Optimum dieses Typs von PAE gibt auch erste Hinweise auf die Lokalisierung der Enzyme innerhalb der Zelle. Der vorherrschende pH-Wert im Cytoplasma ist etwa 7,0. Die meisten PAE zeigen in diesem Bereich jedoch nur noch eine geringe Aktivität. Daher ist davon auszugehen, dass der Einsatzort dieser Enzyme nicht das Cytoplasma ist. Wahrscheinlicher scheint, sofern eine intrazelluläre Lokalisation gegeben ist, dass die Enzyme in der Vakuole angesiedelt sind. Dort herrscht ein pH-Wert von 5,5, zum Teil noch darunter, so dass die meisten Enzyme bei einem pH-Wert nah an ihrem Optimum arbeiten könnten. Abschließend können dies aber nur weitere Untersuchungen belegen.

Das für das Hanfenzym bestimmte Temperaturoptimum liegt zwischen 30 und 40 °C. Es zeigt sowohl zu höheren als auch zu niedrigeren Temperaturen eine kontinuierliche Abnahme der Aktivität. Allerdings nahm die Aktivität bei höheren Temperaturen deutlich schneller ab und oberhalb einer Temperatur von 70 °C war keine Aktivität mehr nachweisbar. Bei niedrigeren Temperaturen war das Enzym deutlich stabiler und zeigte bei 5 °C noch über 20 % der maximalen Aktivität. Während das Temperaturoptimum einer PAE aus *Zea mays* mit 40 °C noch im Bereich des Enzyms aus *Cannabis sativa* lag, hatten die meisten anderen PAE deutlich höhere Temperaturoptima [Hübel & Beck, 1996]. In *Solanum lycopersicum* fand sich ein PAE mit einem Temperaturoptimum von 45 °C [Li et al., 1997]. Die meisten pflanzlichen PAE hatten sogar noch höhere Temperaturoptima. Enzyme aus *Glycine max* zeigten ihre maximale Aktivität bei 55 bzw. 58 °C [Gibson & Ullah, 1988; Hegeman & Grabau, 2001]. PAE aus *Vicia faba* und *Lupinus albus* besaßen ihr katalytisches Maximum bei 50 °C [Greiner et al., 2001; Greiner, 2002]. In *Hordeum vulgare* konnte ein Enzym mit einem Optimum bei 65 °C nachgewiesen werden [Dionisio et al., 2007]. Die pflanzlichen Enzyme zeigen also ein recht inhomogenes Bild bezüglich ihrer Temperaturmaxima. Diese lagen in einem relativ weiten Bereich nämlich zwischen 35 und 65 °C. Anders sieht es bei den bakteriellen PAE aus. Hier

besitzen die meisten Enzyme ein Optimum im Bereich zwischen 50 und 60 °C. Dies gilt für das Heubakterium *Bacillus subtilis* mit einem Temperaturoptimum von 55 °C [Kerovuo et al., 1998], ebenso wie für das Enterobakterium *Pantoea agglomerans* mit 60 °C [Greiner, 2004] und das phytopathogene Bakterium *Pectobacterium wasabiae* mit 50 °C [Shao et al., 2008]. In den bereits untersuchten pilzlichen Enzymen waren die Temperaturoptima ebenfalls höher als im PAE aus *Cannabis sativa*. Das Temperaturoptimum für ein PAE aus *Aspergillus fumigatus* fand sich bei 55 °C [Wang et al., 2007], ebenso wie bei *Yersinia intermedia* [Huang et al., 2006]. Enzyme mit einer erhöhten thermischen Stabilität wurden aus *Kodamaea ohmeri* und dem thermophilen Pilz *Thermomyces lanuginosus* isoliert. Ihre Maxima lagen bei 65 °C bzw. 70 °C [Li et al., 2008; Gulati et al., 2007]. Im Mittel zeigen Enzyme aus Bakterien und Pilzen höhere Temperaturoptima als entsprechende Enzyme aus Pflanzen. Das Enzym aus *Cannabis sativa* besitzt im Vergleich aller bekannter PAE eines der niedrigsten Temperaturmaxima. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass aufgrund der großen Anzahl unterschiedlicher Kultursorten von *Cannabis sativa* auch Isoenzyme existieren können, die ein abweichendes Temperaturoptimum besitzen. Das Aktivitätsmaximum bei geringen Temperaturen hat für die Pflanze auch Vorteile, so kann bereits bei niedrigen Temperaturen eine bessere Versorgung des Keimlings mit Phosphat und Inositol als bei weniger gut adaptierte Sorten gewährleistet werden. Auf diese Weise haben Pflanzen, die sich durch Enzyme mit einem geringeren Temperaturoptimum auszeichnen, einen Vorteil gegenüber Pflanzen mit Enzymen, die ein höheres Temperaturoptimum aufweisen. Insbesondere in den gemäßigten Breiten erhöht sich für die Pflanze so die Chance bei geringen Temperaturen einen Entwicklungsvorteil gegenüber Konkurrenten zu sichern. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass noch weitere abiotische und biotische Faktoren auf die Keimlinge einwirken. Daher handelt es sich bei diesen Überlegungen um ein theoretisches Konstrukt, welches seinen Fokus auf die Keimtemperaturen legt und weitere Faktoren unberücksichtigt lässt. Liegt aber nun ein bei niedrigeren Temperaturen aktives Enzym in einer Sorte vor, trägt dies zu einer verbesserten Nährstoffmobilisierung durch eine erhöhte Enzymaktivität bei. Für den Einsatz in der Futtermittelindustrie sind diese Eigenschaften aber nicht von Interesse. Tierfutter aus Samen wird in der Regel in Pelletform produziert. Diese Pellets werden je nach Herstellungsverfahren über einen längeren Zeitraum Temperaturen von 70 °C und höher ausgesetzt. Für den Einsatz als Futteradditiv zum Aufschluss von InsP_6

ist die PAE aus *Cannabis sativa* daher nicht zu verwenden. Die zur Produktion nötigen Temperaturen liegen in Bereichen, in denen das Enzym keine Aktivität mehr aufweist. Eine biotechnische Nutzung als Zusatz zum Tierfutter zum Abbau von InsP_6 kann deshalb ausgeschlossen werden.

Die weitere Charakterisierung erfolgte durch Untersuchungen von potentiellen Inhibitoren und Cofaktoren. Hemmung durch spezielle Substanzen bzw. der Bedarf an Cofaktoren ermöglichen Rückschlüsse auf den hier vorliegenden Phytasetyp. Aus den Versuchen war ersichtlich, dass chelatierende Substanzen, wie z.B. EDTA oder Citrat, keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hatten. Die fehlende Inhibierung von EDTA zeigt, dass keine metallischen Cofaktoren für die Katalyse benötigt werden. Da β -Propeller-Phytasen jedoch auf Ca^{2+} -Ionen angewiesen sind [Rao et al., 2009], kann ausgeschlossen werden, dass das Hanfenzym zu dieser Phytasegruppe gehört. Aufgrund der fehlenden Hemmung der Enzymaktivität handelt es sich ebenfalls nicht um ein Metalloprotein. Damit kann das Enzym nicht zur Gruppe der PAP gehören [Greiner et al., 2002; Greiner, 2007]. Eine Inhibierung durch Fluorid und Phosphat sind ganz typische Eigenschaften, die ebenfalls bei verschiedenen anderen Enzymen entdeckt wurden [Greiner et al., 1997] und darauf hindeuten, dass das isolierte Enzym zu den Histidin-Sauren Phosphatasen zählt. Im Aktiven Zentrum sind keine Sulfhydrylgruppen oder Serinreste lokalisiert, denn weder Mercaptoethanol noch PMSF führten zu einer Inhibierung der Aktivität. Im Bezug auf die Substratspezifität unterscheidet sich das Hanfenzym nicht von anderen PAE mit breitem Substratspektrum. Wie typisch für HAP wird eine ganze Reihe verschiedener phosphathaltiger Substrate umgesetzt. Dazu zählten ATP und ADP genauso wie verschiedene Fructose- und Glucosephosphate und das bekannte Phosphatasesubstrat *p*-Nitrophenylphosphat (NPP). Dieses Spektrum an umgesetzten Phosphatderivaten konnte auch in verschiedenen anderen HAP nachgewiesen werden [Greiner et al., 1997; Greiner et al., 2001; Gu et al., 2009]. Die relative Aktivität des PAE aus *Cannabis* zeigte deutlich, dass das präferierte Substrat InsP_6 ist. Lediglich Fructose-1,6-bisphosphat, NPP und Fructose-6-phosphat erreichten höhere Werte bezüglich des relativen Umsatzes von 53, 44 bzw. 38 %. Alle übrigen Substrate blieben zum Teil deutlich unter 30 %. Relativ hohe Umsatzraten für Fructose-1,6-bisphosphat sind auch von anderen pflanzlichen Enzymen bekannt [Greiner et al., 2001]. Hier scheint die Anwesenheit von zwei Phosphatgruppen für die Katalyseaktivität des Enzyms vorteilhaft zu sein.

Die kinetischen Werte belegen, dass es sich bei dem PAE aus *Cannabis sativa* um eine Phytase handelt. Das Enzym zeigte für InsP_6 einen K_m -Wert von $9,36 \mu\text{M}$. Dieser Wert zeigt die hohe Affinität des Enzyms zum Substrat InsP_6 . Die in anderen Organismen entdeckten PAE haben zum Teil deutlich höhere K_m -Werte. Bei den Enzymen aus *Lupinus albus* lagen die K_m -Werte zwischen 80 und $300 \mu\text{M}$ [Greiner, 2002] und in *Vicia faba* bei $148 \mu\text{M}$ [Greiner, 2001]. Im Enterobakterium *Dickeya paradisiaca* wurde eine PAE isoliert, die einen K_m -Wert von $399 \mu\text{M}$ aufwies [Gu et al., 2009], während im Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* ein Enzym mit einem K_m -Wert von $114 \mu\text{M}$ identifiziert werden konnte [Wang et al., 2007]. Die Werte verdeutlichen, dass das Enzym aus *Cannabis sativa* im Vergleich mit anderen PAE eine sehr hohe Affinität zu InsP_6 als Substrat besitzt. Aufgrund der hier diskutierten Fakten handelt es sich beim isolierten Enzym eindeutig um eine Phytase. Ob es sich bei dieser Phytase tatsächlich um ein Enzym aus der Gruppe der HAP handelt, kann nur eine Sequenzierung mit abschließender Sicherheit klären.

6. Literaturverzeichnis

- Adelt, S. (1999)
Untersuchungen zum Stoffwechsel von myo-Inositolpolyphosphaten in *Dictyostelium discoideum*.
Dissertation; Shaker Verlag, Aachen
- Adelt, S.; Plettenberg, O.; Dallmann, G.; Ritter, F.P.; Shears, S.B.; Altenbach, H. & Vogel, G. (2001)
Regiospecific phosphohydrolases from *Dictyostelium* as tools for the chemoenzymatic synthesis of the enantiomers D-myoinositol 1,2,4-trisphosphate and D-myoinositol 2,3,6-trisphosphate: Non-physiological, potential analogues of biologically active D-myoinositol 1,3,4-trisphosphate.
Bioorg. Med. Chem. Lett. **11**, 2705-2708
- Adelt, S.; Podeschwa, M.; Dallmann, G.; Altenbach, H. & Vogel, G. (2003)
Stereo- and regiospecificity of yeast phytases-chemical synthesis and enzymatic conversion of the substrate analogues neo and L-chiro-inositol hexakisphosphate.
Bioorg. Chem. **31**, 44-67
- Ahn, T.; Yim, S.; Choi, H. & Yun, C. (2001)
Polyacrylamid gel electrophoresis without a stacking gel: Use of amino acids as electrolytes.
Anal. Biochem. **291**, 300-303
- Anderson, M.M.; Breccia, J.D. & Hatti-Kaul, R. (2000)
Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase.
Biotechnol. Appl. Biochem. **32**, 145-153
- Bakry, N.; Kamata, Y. & Simpson, L.L. (1991)
Tetanus toxin and neuronal membranes: the relationship between binding and toxicity.
J. Pharmacol. Exp. Ther. **258**, 830-836
- Barrientos, L.; Scott, J.J. & Murthy, P.P. (1994)
Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen.
Plant Physiol. **106**, 1489-1495
- Becker, J.W.; Reeke, G.N.; Wang, J.L.; Cunningham, B.A. & Edelman, G.M. (1975)
The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interaction with metals and saccharides.
J. Biol. Chem. **250**, 1513-1524
- Berridge, M.J. & Irvine R.F. (1989)
Inositol phosphates and cell signaling.
Nature **341**, 388-389

- Berridge, M.J. (1993)
Inositol trisphosphate and calcium signaling.
Nature **361**, 315-325
- Biffen, M. & Hanke, D.E. (1990)
Reduction in the level of intracellular *myo*-inositol in cultured soybean (*Glycine max*) cells inhibited cell division.
Biochem. J. **265**, 809-814
- Billington, D.C. (1993)
The inositol phosphates – chemical synthesis and biological significance.
VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, 1. Auflage
- Biswas, B.B.; Biswas, S.; Chakrabati, S. & De, B.P. (1978a)
A novel metabolic cycle involving *myo*-inositol phosphates during formation and germination in seeds.
in: Cyclitols and phosphoinositides, Academic press New York
- Biswas, S.; Maity, I.B.; Chakrabati S. And Biswas B.B. (1978b)
Purification and characterization of *myo*-inositol hexaphosphate-adenosine diphosphate phosphotransferase from *Phaseolus aureus*.
Arch. Biochem. Biophys. **185**, 557-566
- Bohn, L.; Josefsen, L.; Meyer, A.S. & Rasmussen, S.K. (2007)
Quantitative analysis of phytate globoids isolated from wheat bran and characterization of their sequential dephosphorylation by wheat phytase.
J. Agric. Food Chem. **55**, 7547-7552
- Bohn, L.; Meyer, A.S. & Rasmussen, S.K. (2008)
Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding.
J. Zhejiang Univ. Sci. B **9**, 165-191
- Bradford, M.M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. **72**, 248-254
- Brearley, C.A. & Hanke, D.E. (1996a)
Metabolic evidence for the order of addition of individual phosphate esters to the *myo*-inositol moiety of inositol hexakisphosphate in the duckweed *Spirodela polyrhiza* L.
Biochem. J. **314**, 227-233
- Brearley, C.A. & Hanke, D.E. (2000)
Metabolic relations of inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate revealed by cell permeabilization. Identification of Ins 3,4,5,6-tetrakisphosphate 1-kinase and inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate phosphatase activities in mesophyll cells.
Plant Physiol. **122**, 1209-1216

- Choi, Y.M.; Suh, H.J. & Kim, J.M. (2001)
Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus sp.* KHU-10
J. Protein Chem. **20**, 287-292
- Chu H.M.; Guo, T.W.; Lin, C.C.; Chou, H.L.; Shr, H.L.; Lai, T.Y.; Tang, K.J. & Cheng, B.L. (2004)
Structures of *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate: DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate.
Structure **12**, 2015-2024
- Cosgrove, D.J. (1970)
Inositol phosphatases of microbiological origin. Inositol phosphate intermediates in the dephosphorylation of the hexaphosphates of *myo*-inositol, *scyllo*-inositol and *D-chiro*-inositol by a bacterial (*Pseudomonas sp.*) phytase.
Aust. J. Bio. Sci. **23**, 1207-1220
- Cosgrove, D.J. (1980)
Inositol phosphates, their chemistry, biochemistry and physiology.
Elsevier Oxford
- Dimond, R.L.; Burns, R.A. & Jordan, K.B. (1981)
Secretion of lysosomal enzymes in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*.
J. Biol. Chem. **256**, 6565-6572
- Dionisio, G.; Holm, P.B. & Brinch-Penderson, H. (2007)
Wheat (*Triticum aestivum*) and barley (*Hordeum vulgare*) multiple inositol phosphate phosphatases (MINPPs) are phytases expressed during grain filling and germination.
Plant Biotechnol. J. **5**, 328-338
- Doria, E.; Galleschi, L.; Calucci, L.; Pinzino, C.; Pilu, R.; Cassani, E. & Nielsen, E. (2009)
Phytic acid prevents oxidative stress in seeds: evidence from a maize (*Zea mays* L.) *low phytic acid* mutant
J. Exp. Bot. **60**, 967-976
- Dungelhof, M.; Rodehutsord, M.; Spiekers, H. & Pfeffer, E. (1994)
Effects of supplemental microbial phytase on availability of phosphorus contained in maize, wheat and triticale to pigs.
Anim. Feed Sci. Technol. **49**, 1-10
- Efanov, A.M.; Zaitsev, S.V. & Berggren, P.O. (1997)
Inositol hexakisphosphate stimulates non-Ca²⁺-mediated and primes Ca²⁺-mediated exocytosis of insulin by activation of protein kinase C
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 4435-4439
- Ehrlich, K.C.; Montalbano, B.G.; Mullaney, E.J.; Dischinger, H.C. & Ullah, A.H. (1993)
Identification and cloning of a second phytase gene (*phyB*) from *Aspergillus niger* (*ficuum*).
Biochem. Biophys. Res. Commun. **195**, 53-57

- Empson, K.L.; Labuza, T.P. & Graf, E. (1991)
Phytic acid as a food antioxidant.
J. Food Sci. **56**, 560-563
- Fu, S.; Sun, J.; Qian, L. & Li, Z. (2008)
Bacillus phytases: present scenario and future perspectives.
Appl. Biochem. Biotechnol. **151**, 1-8
- Fujii, M. & York, J.D. (2005)
A role for rat inositol polyphosphate kinases, rlpk2 and rlpk1, in inositol pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate production in Rat-1 cells.
J. Biol. Chem. **280**, 1156-1164
- Gamborg, O.L. (1970)
The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture.
Plant Physiol. **45**, 372-375
- Gibson, D.M. & Ullah, A.H. (1988)
Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds.
Arch. Biochem. Biophys. **260**, 503-513
- Graf, E.; Mahoney, J.R.; Bryant, R.G. & Eaton, J.W. (1984)
Iron-catalysed hydroxyl radical formation.
J. Biol. Chem. **259**, 3620-3624
- Graf, E.; Empson, K.L. & Eaton, J.W. (1987)
Phytic acid. A natural antioxidant.
J. Biol. Chem. **262**, 11647-11650
- Graf, E. & Eaton, J.W. (1990)
Antioxidant functions of phytic acid.
J. Free Radic. Biol. Med. **8**, 61-69
- Greiner, R.; Konietzny, U. & Jany, K. (1993)
Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*.
Arch. Biochem. Biophys. **303**, 107-113
- Greiner, R.; Haller, E.; Konietzny, U. & Jany, K. (1997)
Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*.
Arch. Biochem. Biophys. **341**, 201-206
- Greiner R., Carlsson N. & Larsson-Alminger M. (2000a)
Stereospecificity of *myo*-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*.
J. Biotechnol. **84**, 53-62

- Greiner R., Larsson-Alminger M. & Carlsson N. (2001)
Stereospecificity of *myo*-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of baker's yeast.
J. Agric. Food Chem. **49**, 2228-2233
- Greiner, R.; Muzquiz, M.; Burbano, C.; Cuadrado, C.; Pedrosa, M.M. & Goyoaga, C. (2001)
Purification and characterization of a phytate-degrading enzyme from germinated faba beans (*Vicia faba* var. Alameda).
J. Agric. Food Chem. **49**, 2234-2240
- Greiner R. & Larsson-Alminger M. (2001)
Stereospecificity of *myo*-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by phytate-degrading enzymes of cereals.
J. Food Biochem. **25**, 229-248
- Greiner, R. (2002)
Purification and characterization of three phytases from germinated lupine seeds (*Lupinus albus* var. Amiga).
J. Agric. Food Chem. **50**, 6858-6864
- Greiner, R.; Larsson-Alminger, M.; Carlsson, N.G.; Muzquiz, M.; Burbano, C.; Cuadrado, C.; Pedrosa, M.M. & Goyoaga, C. (2002)
Pathway of dephosphorylation of *myo*-inositol hexakisphosphate by phytases of legume seeds.
J. Agric. Food Chem. **50**, 6865-6870
- Greiner, R. (2004)
Purification and characterization of a phytate-degrading enzyme from *Pantoea agglomerans*.
Protein J. **23**, 567-578
- Greiner, R. & Carlsson, N.G. (2006)
Myo-inositol phosphate isomers generated by the action of a phytate-degrading enzyme from *Klebsiella terrigena* on phytate.
Can. J. Microbiol. **52**, 759-768
- Greiner, R.; Lim, B.L.; Cheng, C. & Carlsson, N.G. (2007)
Pathway of phytate dephosphorylation by beta-propellerphytases of different origins.
Can. J. Microbiol. **53**, 488-495
- Greiner, R. (2007)
Phytate-degrading enzymes: Regulation of synthesis in microorganisms and plants.
In Inositol phosphates: Linking Agriculture and the environment; Turner, E.A.; Richardson, E.A. & Mullaney, E.J. (Eds.), CAB International

- Gu, W.; Huang, H.; Meng, K.; Yang, P.; Fu, D.; Luo, H.; Wang, Y.; Yao, B. & Zhan, Z. (2009)
Gene cloning, expression and characterization of a novel phytase from *Dickeya paradisiaca*.
Appl. Biochem. Biotechnol. **157**, 113-123
- Gulati, H.K.; Chadha, B.S. & Saini, H.S. (2007)
Production, purification and characterization of thermostable phytase from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* TL-7.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. **54**, 121-138
- Ha, N.C.; Oh, B.C.; Shin, S.; Kim, H.J.; Oh, T.K.; Kim, Y.O.; Choi, K.Y. & Oh, B.H. (2000)
Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states.
Nat. Struct. Biol. **7**, 147-153
- Han, Y.; Wilson, D.B. & Lei, X.G. (1999)
Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (*phyA*) in *Saccharomyces cerevisiae*.
Appl. Environ. Microbiol. **65**, 1915-1918
- Hanakahi, L.A.; Bartlett-Jones, M.; Chappell, C.; Pappin, D. & West, S.C. (2000)
Binding of inositol phosphate to DNA-PK and stimulation of double-strand break repair.
Cell **102**, 721-729
- Hegeman, C.E. & Grabau, E.A. (2001)
A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledones of germinating soybean seedlings.
Plant Physiol. **126**, 1598-1608
- Herer, J. (1995)
Die Wiederentdeckung der Nutzpflanze Hanf.
Verlag Zweitausendeins, Frankfurt 5.Auflage
- Huang, H.; Luo, H.; Yang, P.; Meng, K.; Wang, Y.; Yuan, T.; Bai, Y. & Yao, B. (2006)
A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **350**, 884-889
- Hübel, F. & Beck, E. (1996)
Maize root phytase
Plant. Physiol. **112**, 1429-1436
- Irvine, R.F. & Schell, M.J. (2001)
Back in the water: The return of the inositol phosphates.
Net. Rev. Mol. Cell Biol. **2**, 327-338

- Kachintorn, U.; Vajanaphanich, M.; Barrett, K.E. & Trayner-Kaplan, A.E. (1993)
Elevation of inositol trisphosphate parallels inhibition of Ca^{2+} -dependent Cl^- -secretion in T84-cells.
Am. J. Physiol. **264**, 671-676
- Kaida, R.; Hayashi, T. & Kaneko, T.S. (2008)
Purple acid phosphatase in cell walls of tobacco cells.
Phytochemistry **14**, 2546-2551
- Kaur, P.; Lingner, A.; Singh, B.; Böer, E.; Polajeva, J.; Steinborn, G.; Bode, R.; Gellissen, G.; Satyanarayana, T. & Kunze, G. (2007)
APHO1 from the yeast *Arxula adenivorans* encodes an acid phosphatase of broad substrate specificity.
Antonie van Leeuwenhoek **91**, 45-55
- Kerovuo, J.; Lauraeus, M.; Nurminen, P.; Kalkkinen, N. & Apajalahti, J. (1998)
Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*.
Appl. Environ. Microbiol. **64**, 2079-2085
- Konietzny, U. & Greiner, R. (2002)
Molecular and catalytic properties of phytase-degrading enzymes (phytases).
In *International journal of food science and technology* **37**, 791-812
- Kuang, R.; Chan, K.H.; Yeung, E. & Lim, B.L. (2009)
Molecular and biochemical characterization of AtPAP15, a purple acid phosphatase with phytase activity, in *Arabidopsis*.
Plant Physiol. **151**, 199-209
- Laboure, A.M.; Gagnon, J. & Lescure, A.M. (1993)
Purification and characterization of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination.
Biochem. J. **295**, 413-419
- Lanzetta, P.A.; Alvarez, L.J.; Reinach, P.S. & Candia, O.A. (1979)
An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate.
Anal. Biochem. **100**, 95-97
- Larsson, O.; Barker, C.J.; Sjöholm, A.; Carlqvist, H.; Michell, R.H.; Bertorello, A.; Nilsson, T.; Honkanen, R.E.; Mayer, G.W.; Zwiller, J. & Berggren, P.O. (1997)
Inhibition of phosphatases and increased Ca^{2+} channel activity by inositol hexakisphosphate.
Science **278**, 471-474
- Lemtiri-Chlieh, F.; MacRobbie, E.A. & Brearley C.A. (2000)
Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulating the K^+ -inward rectifying conductance in guard cells.
Proc. Natl. Acad. Sci USA **97**, 8687-8692

- Lemtiri-Chlieh, F.; MacRobbie, E.A.; Webb, A.A.; Manison, N.F.; Brownlee, C.; Skeeper, J.N.; Chen, J.; Prestwich, G.D. & Brearley, C.A. (2003)
Inositol hecakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells.
Proc. Natl. Acad. Sci USA **100**, 10091-10095
- Li, M.; Osaki, M.; Honma, M. & Tadano, T. (1997)
Purification and characterization of phytase induced in tomato roots under phosphorus-deficient conditions.
Soil Sci. Plant Nutr. **43**, 179,190
- Li, D.; Zhu, H.; Liu, K.; Liu, X.; Leggewie, G.; Udvardi, M. & Wang, D. (2002)
Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*: comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation.
J. Biol. Chem. **277**, 27772-27781
- Li, X.; Chi, Z.; Liu, Z.; Wang, X. & Hirimuthugoda, N.Y. (2008)
Purification and characterization of extracellular phytase from a marine yeast *Kodamaea ohmeri* BG3.
Mar. Biotechnol. (NY)
- Lin, M. & Staba, J. (1961)
Peppermint and spearmint tissue cultures. Callus formation and submerged culture.
Lloydia **24**, 139-145
- Linsmaier, E.M. & Skoog, F. (1965)
Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant. **18**, 100-127
- Loewus, F.A. (1990b)
Inositol metabolism: Precursor role and breakdown.
in: Inositol metabolism in plants, Wiley-Liss new York
- Loewus F.A. & Murthy, P.P.N. (1990)
myo-inositol metabolism in plants
Plant Sci. **150**, 1-19
- Loewus, M.W.; Sasaki, K.; Leavitt, A.L.; Munsell, L.; Sherman, W.R. & Loewus, F.A. (1982)
The enantiomeric form of *myo*-inositol-1-phosphate produced by *myo*-inositol 1-phosphate synthase and *myo*-inositol kinase in higher plants.
Plant. Physiol. **70**, 1661-1663
- Lott, J.N.; Ockenden, I.; Raboy, V. & Batten, G.D. (2000)
Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: A global estimate.
Seed Sci. Res. **10**, 11-33
- Lott, J.N.; Ockenden, I.; Raboy, V. & Batten, G.D. (2001)
Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: A global estimate.
Seed Sci. Res. **11**, 181

- Lung, S.C.; Leung, A.; Kuang, R.; Wang, Y.; Leung, P. & Lim, B.L. (2008)
Phytase activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) root exudates is exhibited by a purple acid phosphatase.
Phytochemistry **69**, 365-373
- Maddaiah, V.T.; Kurnick, A.A. & Reid, B.L. (1964)
Phytic acid studies.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **115**, 391-393
- Majumder, A.L.; Johnson, M.D. & Henry, S.A. (1997)
1L-*myo*-inositol-1-phosphate synthase.
Biochim. Biophys. Acta **1348**, 245-256
- Maugenest, S.; Martinez, I. & Lescure, A.M. (1997)
Cloning and characterization of a cDNA encoding a maize seedling phytase.
Biochem. J. **322**, 511-517
- Mayr, G.W. (1987)
Inositol phosphates: Structural components, regulators and signal transducers of the cell – a review.
Topics in Biochemistry, Boehringer Mannheim
- Miller, A.L.; Suntharalingam, M.; Johnson, S.L.; Audhya, A.; Emr, S.D. & Went, S.R. (2004)
Cytoplasmic inositol hexakisphosphate production is sufficient for mediating the Gle1-mRNA export pathway.
J. Biol. Chem. **279**, 51022-51032
- Morton, R.K. & Raison J.K. (1963)
A complete intracellular unit for incorporation of amino acid into storage protein utilizing adenosine triphosphate generated by phytate.
Nature **200**, 429-433
- Mitsuhashi, N.; Ohnishi, M.; Sekiguchi, Y.; Kwon, Y.U.; Chang, Y.T.; Chung, S.K.; Inoue, Y.; Reid, R.J.; Yagisawa, H. & Mimura, T. (2005)
Phytic acid synthesis and vacuolar accumulation in suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* induced by high concentration of inorganic phosphate and cations.
Plant Physiol. **138**, 1607-1614
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962)
A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues.
Plant Physiol. **15**, 473-497
- Nakano, T.; Joh, T.; Tokumoto, E. & Hayakawa, T. (1999)
Purification and characterization of phytase from bran of *Triticum aestivum* L. cv. Nourin #61
Food Sci. Technol. Res. **5**, 18-23

- NC-IUB (1989)
Numbering of atoms in *myo*-inositol (Recommandation 1988).
Biochem. J. **258**, 1-2
- Olczak, M.; Morawiecka, B. & Watorek, W. (2003)
Plant purple acid phosphatases – genes, structure and biological function.
Acta Biochim. Pol. **50**, 1245-1256
- Ongusaha, P.P.; Hughes, P.J.; Davey, J. & Michell R.H. (1998)
Inositol hexakisphosphate in *Schizosaccharomyces pombe*: synthesis from
Ins(1,4,5)P₃ and osmotic regulation
Biochem. J. **335**, 671-679
- Ortega, X.; Velasquez, J.C. & Perez, L.M. (2005)
IP₃ production in the hypersensitive response of lemon seedlings against
Alternaria alternata involves active protein tyrosine kinases but not a G-protein.
Biol. Res. **38**, 89-99
- Parthasarathy, L.; Vadnal, R.E.; Parthasarathy, R.; Shyamala & Devi, C.S. (1994)
Biochemical and molecular properties of lithium-sensitive *myo*-inositol
monophosphatase.
Life Sci. **54**, 1127-1142
- Perera, I.Y.; Hung, C.; Brady, S.; Muday, G.K. & Boss, W.F. (2006)
A universal role for inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling in plant
gravitropism.
Plant Physiol. **140**, 746-760
- Petrášek, J. & Friml, J. (2009)
Auxin transport routes in plant development.
Development **136**, 2675-2688
- Phillippy, B.Q.; Ullah, A.H.J. & Ehrlich, K.C. (1994)
Purification and some properties of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-
kinase from immature soybean seeds.
J. Biol. Chem. **269**, 28393-28399
- Phillippy, B.Q. (1998)
Purification and catalytic properties of a phytase from scallion (*Allium
fistulosum* L.) leaves.
J. Agric. Food Chem. **46**, 3491-3496
- Piddington, C.S.; Houston, C.S.; Paloheimo, M.; Cantrell, M.; Miettinen-Oinonen, A.;
Nevalainen, H. & Rambosek, J. (1993)
The cloning and sequencing of the genes encoding phytase (*phy*) and pH 2.5-
optimum acid phosphatase (*aph*) from *Aspergillus niger* var. *awamori*
Gene. **133**, 55-62

- Puhl, A.A.; Greiner, R & Selinger L.B. (2009)
Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by a protein tyrosine phosphatase-like inositol polyphosphatase from *Megasphaera elsdenii*.
Appl. Microbiol. Biotechnol. **82**, 95-103
- Raboy, V. & Dickinson, D.B. (1987)
The timing and rate of phytic acid accumulation in developing soybean seeds.
Plant Physiol. **85**, 841-844
- Raboy, V. (2003)
Myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate
Phytochemistry **64**, 1033-1043
- Rao, D.E.; Rao, K.V. & Reddy V.D. (2008)
Cloning and expression of *Bacillus* phytase gene (*phy*) in Escherichia coli and recovery of active enzyme from the inclusion bodies.
J. Appl. Microbiol. **105**, 1128-1137
- Rao, D.E.; Rao, K.V.; Reddy, T.P. & Reddy, V.D. (2009)
Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: An overview.
Crit. Rev. Biotechnol. **29**, 182-198
- Reddy, N.R.; Sathe, S.K. & Salunkhe, D.K. (1982)
Phytases in legumes and cereals.
Adv. Food Res. **28**, 1-92
- Revy, P.S.; Jondreville, C.; Dourmad, J.Y. & Nys, Y. (2006)
Assessment of dietary zinc requirement of weaned piglets fed diets with or without microbial phytase.
J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. **90**, 50-59
- Safrany, S.T.; Caffrey, J.J.; Yang, X. & Shears, S.B. (1999)
Diphosphoinositol polyphosphates: The final frontier for inositide research?
Biol. Chem. **380**, 945-951
- Saiardi, A.; Caffrey, J.J.; Snyder, S. & Shears, S.B. (2000)
Inositol polyphosphate multikinase (ArgR/III) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*.
FEBS Lett. **468**, 28-32
- Saiardi, A.; Sciambi, C.; McCaffery, J.M.; Wendland, B. & Snyder, S.H. (2002)
Inositol pyrophosphates regulate endocytic trafficking.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**, 14206-14211
- Sajidan, A.; Farouk, A.; Greiner, R.; Jungblut, P.; Müller, E. & Borriss, R. (2004)
Molecular and physiological characterization of a 3-phytase from soil bacterium *Klebsiella sp.* ASR1
Appl. Microbiol. Biotechnol. **65**, 110-118

- Sasakawa, N.; Sharif, M. & Hanley M.R. (1995)
Metabolism and biological activities of inositol pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate.
Biochem. Pharmacol. **50**, 137-146
- Singh, B. & Satyanarayana, T. (2009)
Characterization of a HAP-phytase from a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*.
Bioresour. Technol. **100**, 2046-2051
- Scopes, R.K. (1994)
Protein purification – principles and practice
Springer-Verlag, New York, 3.Auflage
- Seeds, A.M.; Sandquist, J.C.; Spana, E.P. and York J.D. (2004)
A molecular basis for inositol polyphosphate synthesis in *Drosophila melanogaster*.
J. Biol. Chem. **279**, 47222-47232
- Shao, N.; Huang, H.; Meng, K.; Luo, H.; Wang, Y.; Yang, P. & Yao, B. (2008)
Cloning, expression and characterization of a new phytase from the phytopathogenic bacterium *Pectobacterium wasabiae* DSMZ 18074
J. Microbiol. Biotechnol. **18**, 1221-1226
- Stephens, L.R. & Irvine R.F. (1990)
Stepwise phosphorylation of *myo*-inositol leading to *myo*-inositol hexakisphosphate in *Dictyostelium*.
Nature **346**, 580-583
- Stephens, L.R.; Hawkins, P.T.; Stanley, A.F.; Moore, T.; Poyner, D.R.; Morris, P.J.; Hanley, M.R.; Kay, R.R. & Irvine, R.F. (1991)
myo-inositol pentakisphosphate
Biochem. J. **275**, 485-499
- Stevenson-Paulik, J.; Odom, A.R. and York, J.D. (2002)
Molecular and biochemical characterization of two plant inositol polyphosphate 6-/3-/5-kinase.
J. Biol. Chem. **272**, 42711-42718
- Sun, Y.; Thompson, M.; Lin, G.; Butler, H.; Gao, Z.; Thornburgh, S.; Yau, K.; Smith, D.A. & Shukla, V.K. (2007)
Inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase from maize: Molecular and biochemical characterization
Plant Physiol. **144**, 1278-1291
- Tan, X.; Calderon-Villalobos, L.I.; Sharon, M. ; Zheng, C. ; Robinson, C.V. ; Estelle, M. & Zheng, M. (2007)
Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase
Nature **446**, 640-645

- Torres, J.; Dominguez, S.; Cerda, M.F.; Obal, G.; Mederos, A.; Irvine, R.F.; Diaz, A. & Kremer, J. (2005)
Solution behaviour of *myo*-inositol hexakisphosphate in the presence of multivalent cations. Prediction of a neutral pentamagnesium species under cytosolic/nuclear conditions.
J. Inorg. Biochem. **99**, 828-840
- Van der Kaay, J. & Van Haastert, P.J. (1995)
Stereospecificity of inositol hexakisphosphate dephosphorylation by *Paramecium* phytase.
Biochem. J. **312**, 907-910
- Vajanaphanich, M.; Schultz, C.; Rudolf, M.T.; Wassermann, M.; Enyedi, P.; Craxton, A.; Shears, S.B.; Tsien, R.Y.; Barrett, K.E. & Traynor-Kaplan, A.E. (1994)
Long-term uncoupling of chloride secretion from intracellular calcium levels by Ins(3,4,5,6)P₄.
Nature **371**, 711-714
- Veiga, N.; Torres, J.; Dominguez, S.; Mederos, A.; Irvine, R.F.; Diaz, A. & Kremer, C. (2006)
The behaviour of *myo*-inositol hexakisphosphate in the presence of magnesium(II) and calcium (II): Protein-free soluble InsP(6) is limited to 49 μM under cytosolic/nuclear conditions.
J. Inorg. Biochem. **100**, 1800-1810
- Verbsky, J.W.; Chang, S.C.; Wilson, M.P.; Mochizuki, Y. & Majerus, P.W. (2005)
The pathway for the production of inositol hexakisphosphate in human cells.
J. Biol. Chem. **280**, 1911-1920
- Vincent, J.B. & Averill, B.A. (1990b)
An enzyme with double identity: purple acid phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase.
FASEB J. **4**, 3009-3014
- Vincent, J.B.; Crowder, M.W. & Averill, B.A. (1992)
Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions.
Trends Biochem. Sci. **17**, 105-110
- Vogel, A.; Borchert, T.; Marcus, T.; Meyer, H.E.; Krebs, B. & Spener, F. (2002)
Heterologous expression and characterization of recombinant purple acid phosphatase from red kidney bean.
Arch. Biochem. Biophys. **401**, 164-172
- Vohra, P.; Gray, G.A. & Kratzer, F.H. (1964)
Phytic acid-metal complexes.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **120**, 447-449
- Vucenik, I. & Shamsuddin, A.M. (1994)
 [³H]Inositol hexaphosphate (phytic acid) is rapidly absorbed and metabolized by murine and human malignant cells *in vitro*.
J. Nutr. **124**, 861-868

- Vucenik, I. & Shamsuddin, A.M. (2003)
Cancer inhibition by inositol hexakisphosphate (IP6) and inositol: From laboratory to clinic.
J. Nutr. **133**, 3778-3784
- Wang, Y.; Gao, X.; Su, Q.; Wu, W. & An, L. (2007)
Cloning, expression and enzyme characterization of an acid heat-stable phytase from *Aspergillus fumigatus* WY-2
Curr. Microbiol. **55**, 65-70
- Watts, D.J. & Ashford, J.M. (1970)
Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture.
Biochem. J. **119**, 171-174
- Yang, X.J. & Finnegan, P.M. (2010)
Regulation of phosphate starvation responses in higher plants.
Ann. Bot. **105**, 513-526
- York, J.D.; Odom, A.R.; Murphy, R.; Ives, E.B. and Went, S.R. (1999)
A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export.
Science **285**, 96-100
- Zeng, X.Q.; Chow, W.S.; Su, L.J.; Peng, X.X. & Peng, C.L. (2010)
Protective effect of supplemental anthocyanins on *Arabidopsis* leaves under high light.
Physiol. Plant. **138**, 215-225

Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Altenbach für die Vergabe des interessanten Themas und für die Möglichkeit zur Promotion.

Mein besonderer Dank gilt Frau A.D. Dr. Mölleken für ihre stete Bereitschaft Probleme im Verlauf der praktischen Arbeit, aber auch während der Erstellung der Dissertation zu diskutieren.

Beiden danke ich auch ausdrücklich für die Anfertigung der Gutachten.

Meinem Kollegen Jörg Nitschke danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die vielen fachlichen Unterredungen.

Herrn Dr. Stephan Adelt danke ich für die Einführung in den Umgang mit der HPLC-MDD-Anlage und für seine Hilfe beim Umgang mit *Dictyostelium discoideum*.

Meinen Eltern und Großeltern danke ich für ihre in vielfältiger Form gewährte Unterstützung während meiner Promotion.

Ich möchte auch meinen Kindern, Sophie und Lena, danken. In schwierigen Zeiten hilft ein Kinderlachen doch über den meisten Ärger hinweg.

Ganz besonders möchte ich meiner Frau für den Rückhalt und ihr Verständnis danken. Es war nicht immer leicht, aber jetzt ist es geschafft.