

**Untersuchungen zum Stoffwechsel von Inositolphosphaten
in *Dictyostelium discoideum***

-

**Anreicherung und Charakterisierung von Phosphatasen
unterschiedlicher Spezifität**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades im Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften
der Bergischen Universität Wuppertal

vorgelegt von

Guido Dallmann

aus Wuppertal

August 2006

Tag der mündlichen Prüfung:

17.11.2006

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20060570

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3A468-20060570>]

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Günter Vogel für die Vergabe des interessanten Themas und sein Engagement bei der Betreuung der Arbeit.

Für die Übernahme des Koreferats danke ich Herrn Prof. Hans-Josef Altenbach.

Den Herren Dr. Michael Podeschwa und Dr. Oliver Plettenburg danke ich für die gute Kooperation zwischen Organischer Chemie und Biochemie, der Bereitstellung von synthetischen Verbindungen, sowie der ständigen Bereitschaft zur Diskussion chemischer Problemstellungen.

Meinen Kolleginnen und Kollegen Dr. Stephan Adelt, Anne-Brigitte Eyidi, Dr. Andreas Fischbach, Dr. Christine Trautwein und Alexander Müller danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft, die gute Teamarbeit und das hervorragende Arbeitsklima.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen eines DFG-Projektes.

Zusammenfassung

Der eukaryontische Modellorganismus *Dictyostelium discoideum* besitzt einen komplexen Phosphoinositid- und Inositolphosphatstoffwechsel ähnlich dem von Säugetieren. *Myo*-Inositol ist die zentrale Vorstufe bei der Biosynthese von Phosphoinositiden und Inositolphosphaten. Die Dephosphorylierung von *D*-*myo*-Ins(3)P zu *myo*-Inositol durch die *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase speist den zellulären Inositol-Pool. Die *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase aus *D. discoideum* wurde bis zur Homogenität gereinigt und umfassend charakterisiert. Bei den Eigenschaften zeigen sich weitgehende Übereinstimmungen zwischen der *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase aus *D. discoideum* und den verschiedenen *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatasen aus Säugetieren. Eine ungewöhnliche Eigenschaft ist die starke Inhibierbarkeit der *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase aus *D. discoideum* durch Mn^{2+} .

Am Inositolphosphatstoffwechsel mit seinen über 20 löslichen Inositolphosphaten ist eine Vielzahl von Kinasen und Phosphatasen beteiligt, welche die steady-state-Konzentrationen auch der Inositolphosphate mit Signalfunktion regulieren. Eine $InsP_5/InsP_4$ -Phosphatase katalysiert den Abbau einer Vielzahl von Inositolpentakisphosphat- und Inosoltetrakisphosphat-Isomeren zu Inositoltrisphosphaten. Eine auffällige Eigenschaft der $InsP_5/InsP_4$ -Phosphatase ist ihre hohe Regiospezifität bei einer geringen Stereospezifität, die zur Synthese eines enantiomerenreinen Amino-*myo*-Inositolphosphates genutzt wurde. Bei dem sehr instabilen Enzym konnten 3 Aufreinigungsschritte etabliert und so eine 179fache Anreicherung erzielt werden. Desweiteren wurden Versuche zur Anreicherung von Inositoltrisphosphat-Phosphatasen und einer membrangebundenen Phytase unternommen. Bei letzterer lag der Schwerpunkt auf der Entwicklung und Etablierung von affinitätschromatographischen Verfahren.

Phytasen sind in der Natur weitverbreitet und katalysieren die Hydrolyse von *myo*-Inositolhexakisphosphat zu anorganischem Phosphat und niedrigphosphorylierten Inositolphosphaten, in einigen Fällen bis zum freien *myo*-Inositol. In Kooperation mit organischen Chemikern wurde der Abbau verschiedener Stereoisomere von *myo*-Inositolhexakisphosphat durch Phytasen aus Hefen untersucht um Hinweise auf Strukturmerkmale zu bekommen, die bei der Substraterkennung eine Rolle spielen. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse über die Regio- und Stereospezifität wurden zur Entwicklung von enzymunterstützten Synthesen enantiomerenreiner *neo*- und *L-chiro*-Inositolphosphate genutzt.

Synopsis

The eukaryotic model organism *Dictyostelium discoideum* possesses a complex phosphoinositide and inositol phosphate metabolism similar to mammalian cells. *Myo*-inositol is the central precursor in biosynthesis of phosphoinositides and inositol phosphates. Dephosphorylation of D-*myo*-Ins(3)P to *myo*-inositol by *myo*-inositolmonophosphate phosphatase feeds the cellular inositol pool. The *myo*-inositolmonophosphate phosphatase from *D. discoideum* was purified to homogeneity and characterised in detail. The properties of the *myo*-inositolmonophosphate phosphatase from *D. discoideum* show a large conformity with various *myo*-inositolmonophosphate phosphatases from mammals. An unusual attribute of the *myo*-inositolmonophosphate phosphatase from *D. discoideum* is its strong inhibition by Mn^{2+} .

A huge number of kinases and phosphatases take part in inositol phosphate metabolism with its more than 20 soluble inositol phosphates regulating steady-state concentrations of inositol phosphates with signal functions. An InsP₅/InsP₄-phosphatase catalyses the degradation of a multitude of inositol pentakis- and inositol tetrakisphosphates to inositol trisphosphates. A salient feature of the InsP₅/InsP₄-Phosphatase is its high regiospecificity combined with only poor stereospecificity, which was used for the synthesis of enantiomeric pure amino-inositol phosphates. It was possible to establish three purification steps for the unstable enzyme and to obtain a 179-fold enrichment. Further attempts for the enrichment of inositoltrisphosphat phosphatases and a membrane bound phytase were made. In case of the phytase the main focus was the development and establishment of affinity chromatographically methods.

Phytases are widespread in nature and catalyse the hydrolysis of *myo*-inositol hexakisphosphate to inorganic phosphate and lower phosphorylated inositol phosphates, sometimes up to *myo*-inositol. The degradation of several stereoisomers of *myo*-inositol hexakisphosphate by phytases from yeasts was examined in cooperation with organic chemists getting a clue for patterns important for substrate recognition. The obtained findings about regiospecificity and stereospecificity were used to establish enzyme-assisted syntheses of enantiomeric pure *neo*- and *L-chiro*-inositol phosphates.

Eigene Publikationen

(Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits publiziert.)

Adelt S., Podeschwa M., Dallmann G., Altenbach H. J., 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(1)**, 44-67.

Adelt S., Plettenburg O., Dallmann G., Ritter F. P., Shears S. B., Altenbach H. J., Vogel G. (2001) Regiospecific phosphohydrolases from *Dictyostelium* as tools for the chemoenzymatic synthesis of the enantiomers *D-myo*-inositol 1,2,4-trisphosphate and *D-myo*-inositol 2,3,6-trisphosphate: non-physiological, potential analogues of biologically active *D-myo*-inositol 1,3,4-trisphosphate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11(20)**, 2705-8.

Adelt S., Podeschwa M., Dallmann G., Plettenburg O. (2001) Chemoenzymatic Synthesis of Biological Active Inositol Phosphate Analogues. *Biol. Chem.* **382** (special supplement), 87.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Inositole	1
1.1.1	Biosynthese und Katabolismus von <i>myo</i> -Inositol	2
1.2	Inositolphosphate	4
1.2.1	<i>myo</i> -Inositol-1,4,5-trisphosphat (Ins(1,4,5)P ₃) – ein sekundärer Botenstoff	4
1.2.2	Mögliche Funktionen von anderen Inositolphosphaten	5
1.3	Inositolphosphat Phosphatasen.....	8
1.3.1	<i>Myo</i> -Inositolmonophosphat Phosphatase	8
1.3.2	<i>Myo</i> -Inositolpolyphosphat 5-Phosphatasen.....	11
1.3.3	<i>Myo</i> -Inositolhexakisphosphat Phosphatasen (Phytasen).....	12
1.3.4	Weitere Inositolphosphat Phosphatasen.....	15
1.4	<i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellorganismus	16
1.5	Inositolphosphat-Stoffwechsel in <i>Dictyostelium discoideum</i>.....	18
1.6	Zielsetzung	22
2	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	24
2.1	Anreicherung und Charakterisierung einer <i>myo</i>-Inositolmonophosphat Phosphatase	24
2.1.1	Aktivitätsbestimmung	24
2.1.2	Anreicherung der <i>myo</i> -Inositolmonophosphat Phosphatase	28
2.1.2.1	Chromatographie an Q-Sepharose	28
2.1.2.2	Chromatographie an MonoQ.....	29
2.1.2.3	Chromatofokussierung an PBE 94	29
2.1.2.4	Gelfiltration an Superdex 200 HR.....	30
2.1.2.5	Stabilität und Aufbewahrung	31
2.1.2.6	Zusammenfassung der Anreicherung.....	31
2.1.3	Eigenschaften der <i>myo</i> -Inositolmonophosphat Phosphatase.....	32
2.1.3.1	Molekulargewicht.....	32
2.1.3.2	Isoelektrischer Punkt	33
2.1.3.3	Einfluß von Metallionen.....	34
2.1.3.4	pH-Abhängigkeit.....	35
2.1.3.5	Temperaturabhängigkeit.....	36
2.1.3.6	Substratspezifität	36
2.1.3.7	Kinetische Eigenschaften	37
2.1.3.8	Inhibierung der Inositolmonophosphat Phosphatase durch Lithium.....	39
2.1.3.9	Einfluß der Anionen Fluorid und Sulfat.....	40
2.1.3.10	Vergleich mit bekannten Enzymen	41
2.2	Versuche zur Identifizierung von Inositoltrisphosphat-Phosphatasen	44
2.3	Anreicherung und Charakterisierung einer Inositolpentakis-/Inosiltetrakisphosphat-Phosphatase.....	45

2.3.1	Aktivitätsbestimmung	45
2.3.2	Anreicherung der InsP ₅ /InsP ₄ -Phosphatase.....	46
2.3.2.1	Chromatographie an Heparin-Agarose.....	46
2.3.2.2	Chromatographie an Q-Sepharose ff.....	47
2.3.2.3	Untersuchungen zur Stabilität der InsP ₅ /InsP ₄ -Phosphatase.....	48
2.3.2.4	Anreicherungsversuche durch Hydrophobe Interaktionschromatographie, Chromatographie an Hydroxylapatit und Chromatofokussierung.....	49
2.3.2.5	Metallchelatchromatographie.....	51
2.3.2.6	Gelfiltration mit Superdex 200 HR.....	51
2.3.2.7	Zusammenfassung der Anreicherung der InsP ₅ /InsP ₄ -Phosphatase.....	52
2.3.3	Eigenschaften der Inositolpentakis-/Inosoltetrakisphosphat-Phosphatase.....	53
2.3.3.1	Molekulargewicht.....	53
2.3.3.2	pH-Abhängigkeit.....	53
2.3.3.3	Temperaturabhängigkeit.....	54
2.3.3.4	Substratspezifität	55
2.3.3.5	Einfluß von Metallionen.....	56
2.4	Eine membrangebundene Phytase aus <i>Dictyostelium discoideum</i>.....	57
2.4.1	Versuche zur Synthese von Affinitäts-Materialien	57
2.4.2	Verankerung der Phytase in der Zellmembran.....	60
2.5	Die Stereo- und Regiospezifität von Phytasen aus Hefen	62
2.5.1	Stereo- und Regiospezifität des Abbaus von <i>myo</i> -InsP ₆ durch die Phytasen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Pichia rhodanensis</i>	63
2.5.2	Abbau von <i>neo</i> -InsP ₆ und <i>L-chiro</i> -InsP ₆ durch die Phytasen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Pichia rhodanensis</i>	65
2.6	Chemoenzymatische Synthese von enantiomerenreinen Inositolphosphaten	71
2.6.1	Chemoenzymatische Synthese von D- <i>neo</i> -Ins(1,2,5,6)P ₄ , L- <i>chiro</i> -Ins(1,2,3,5,6)P ₅ und L- <i>chiro</i> -Ins(1,2,3,6)P ₄ mit Hilfe von Phytasen aus Hefen.....	71
2.6.2	Chemoenzymatische Synthese von D- <i>myo</i> -Ins(2,3,6)P ₃ mit Hilfe der Phytase aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	73
2.6.3	Chemoenzymatische Synthese von 3-Amino- <i>myo</i> -Ins(1,2,6)P ₃ mit Hilfe der InsP ₅ /InsP ₄ -Phosphatase aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	74
2.7	Fazit und Ausblick	76
3	MATERIAL UND METHODEN.....	79
3.1	Kultivierung von <i>Dictyostelium discoideum</i>	79
3.1.1	Axenisches Medium (HL-5 Medium)	80
3.1.2	Bestimmung der Zellzahl und der Zellvolumens	80
3.1.3	Gewinnung und Lagerung von <i>Dictyostelium discoideum</i> -Sporen.....	80
3.2	Kultivierung der Hefen <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Pichia rhodanensis</i>.....	81
3.2.1	YPD-Medium für Hefen.....	81
3.2.2	Bestimmung der Zellzahl	81
3.2.3	Lagerung von Hefen.....	81
3.3	Analytik von Inositolphosphaten	82
3.3.1	NMR-Analytik	82
3.3.2	Phosphatbestimmung	82

3.3.3	Analyse von Inositolphosphaten mittels HPLC-MDD.....	83
3.3.3.1	Detektionsprinzip und Aufbau der HPLC-MDD-Anlage	83
3.3.3.2	Elution mit einem pH- und Chlorid-Gradienten (saures Elutionssystem)	85
3.3.3.3	Elution mit einem gepufferten Chlorid-Gradienten (alkalisches Elutionssystem).....	86
3.3.4	Analyse von Inositolmono- und Inositolbisphosphaten mittels HPIC-CD	87
3.4	Analyse von Inositol-Isomeren mittels HPIC-IPAD	89
3.5	Proteinanalytik	91
3.5.1	Proteinbestimmung (Lowry <i>et al.</i> 1951)	91
3.5.2	SDS-Elektrophorese	92
3.6	Aufreinigung und Charakterisierung der <i>myo</i>-Inositolmonophosphat Phosphatase aus <i>Dictyostelium discoideum</i>.....	93
3.6.1	Aktivitätsbestimmung	93
3.6.2	Zellernte und Aufschluß.....	93
3.6.3	Chromatographie an Q-Sepharose ff.....	93
3.6.4	Chromatographie an MonoQ.....	94
3.6.5	Chromatofokussierung an PBE 94	94
3.6.6	Gelfiltration mit Superdex 200 HR	94
3.6.7	Temperaturabhängigkeit.....	95
3.7	Versuche zur Identifizierung von Inositoltrisphosphat-Phosphatasen	95
3.8	Aufreinigung und Charakterisierung einer $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$-Phosphatase aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	96
3.8.1	Aktivitätsbestimmung	96
3.8.2	Zellernte und Aufschluß.....	96
3.8.3	Chromatographie an Heparin-Agarose.....	96
3.8.4	Chromatographie an Q-Sepharose ff.....	97
3.8.5	InsP_6 -Affinitätselutionschromatographie an Heparin-Agarose.....	97
3.8.6	Hydrophobe Interaktionschromatographie.....	97
3.8.7	Chromatographie an Hydroxylapatit.....	98
3.8.8	Chromatofokussierung an PBE 94	98
3.8.9	Metallchelatchromatographie.....	98
3.8.10	Gelfiltration an Superdex 200 HR.....	99
3.8.11	Temperaturabhängigkeit.....	99
3.9	Eine membrangebundene Phytase aus <i>Dictyostelium discoideum</i>.....	99
3.9.1	Aktivitätsbestimmung	99
3.9.2	Zellaufschluß und Solubilisierung	100
3.9.3	Chromatographie an Q-Sepharose ff.....	100
3.9.4	Chromatographie an Source 15Q	100
3.9.5	Kopplung von $\text{Ins}(\text{SO}_4)_5\text{NH}_2$ an epoxy-aktivierte Sepharose 6B	101
3.9.6	Kopplung von InsP_6 an (Aminomethyl)polystyrol mit EDC als Crosslinker	101
3.9.7	Untersuchungen zur Verankerung der Phytase in der Membran von <i>Dictyostelium discoideum</i>	102
3.10	Stereo- und Regiospezifität von Phytasen aus Hefen.....	103
3.10.1	Fällung der sekretierten Phytase von <i>Pichia rhodanensis</i>	103
3.10.2	Gelfiltration der Phytase aus <i>Pichia rhodanensis</i> an Superdex 200 HR.....	104

3.10.3	Aktivitätstest für die Phytase aus <i>Pichia rhodanensis</i>	104
3.10.4	Abbau von <i>myo</i> -InsP ₆ , <i>neo</i> -InsP ₆ und <i>L-chiro</i> -InsP ₆ durch die Phytasen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Pichia rhodanensis</i>	104
3.10.5	Bestimmung der Enantiomerenreinheit von <i>myo</i> -Inositolpentakisphosphaten mit Hilfe einer Phytase aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	104
3.11	Enzymunterstützte Synthesen	105
3.11.1	Darstellung von <i>D-neo</i> -Ins(1,2,5,6)P ₄ mit Hilfe einer Phytase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	105
3.11.2	Darstellung von <i>L-chiro</i> -Ins(1,2,3,5,6)P ₅ und <i>L-chiro</i> -Ins(1,2,3,6)P ₄ mit Hilfe einer Phytase aus <i>Pichia rhodanensis</i>	106
3.11.3	Darstellung von <i>myo</i> -Ins(2,3,6)P ₃ mit Hilfe einer membrangebundenen Phytase aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	106
3.11.4	Darstellung von 3-NH ₂ - <i>myo</i> -Ins(1,2,6)P ₃ mit Hilfe einer InP ₅ /InsP ₄ -Phosphatase aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	107
4	LITERATUR	108

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
Bis-Tris	[<i>Bis</i> -(2-hydroxyethyl)-imino]- <i>tris</i> -(hydroxymethyl)-methan
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Leitfähigkeitsdetektion (<u>c</u> onductivity <u>d</u> etection)
d	Tage
Da	Dalton
DAG	1,2-Diacylglycerin
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Erdbeschleunigung (<u>g</u> ravitiy)
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunden
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (<u>h</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography)
Ins(3)P	D- <i>myo</i> -Inositol 3-phosphat
InsP _n	<i>myo</i> -Inositolphosphat mit n Phosphatgruppen
IMAC	Metallchelatchromatographie (<u>i</u> mmobilized <u>m</u> etal ion <u>a</u> ffinity <u>c</u> hromatography)
IMPase	<i>myo</i> -Inositolmonophosphat Phosphatase
IPAD	integrierte, gepulste Amperometrie (<u>i</u> ntegrated <u>p</u> ulsed <u>a</u> mperometric <u>d</u> etection)
MIPP	Multiple Inositolpolyphat Phosphatase
MIPS	<i>myo</i> -Inositol 1-Phosphat Synthase
min	Minuten
MDD	Metall-Indikator-Detektion (<u>m</u> etal <u>d</u> ye <u>d</u> etection)
N.N.	nicht nachweisbar
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAR	4-(2-Pyridylazo)-resorcinol
PBE	Säulenmaterial für die Chromatofokussierung (<u>p</u> oly <u>b</u> uffer <u>e</u> xchanger)
PEG	Polyethylenglykol
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdIns(4,5) ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
Upm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	<i>Tris</i> -(hydroxymethyl)-aminomethan
(v/v)	Volumen bezogen auf das Gesamtvolumen
(w/v)	Masse bezogen auf das Gesamtvolumen

1 Einleitung

1.1 Inositole

Im Jahr 1850 isolierte Scherer aus Muskeln ein Hexahydroxycyclohexan ($C_6H_6(OH)_6$), das er Inositol nannte (Scherer 1850). Aus diesem Grundkörper lassen sich je nach räumlicher Orientierung der Hydroxylgruppen neun Isomere ableiten (Abbildung 1). Sieben dieser Isomere besitzen eine Spiegelebene und sind somit optisch inaktive meso-Verbindungen (*scyllo*-, *myo*-, *neo*-, *epi*-, *cis*-, *muco*- und *allo*-Inositol), lediglich *chiro*-Inositol kommt in zwei enantiomeren Formen (*D-chiro*-(+)- und *L-chiro*-(-)-Inositol) vor.

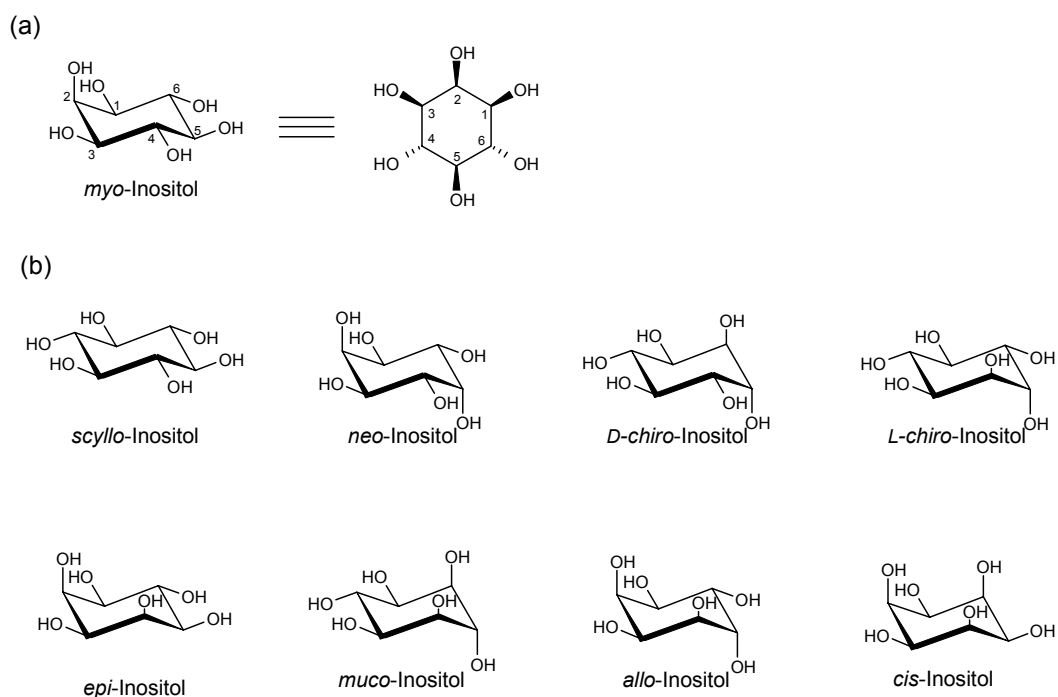


Abbildung 1: Strukturen und Nomenklatur der Inositole: Gezeigt ist (a) die stabile Sesselkonformation von *myo*-Inositol und die entsprechende Fischer-Projektion (b) Namen und Strukturen der restlichen acht Inositol-Isomere.

In der Natur wurden davon sechs Stereoisomere gefunden, lediglich *cis*-, *epi*-, und *allo*-Inositol sind bis jetzt noch nicht nachgewiesen worden (Mayr 1993). Das häufigste Isomer ist *myo*-Inositol, das in Tieren, Pflanzen und den meisten Mikroorganismen ubiquitär vorkommt. Nach *myo*-Inositol sind *D*- und *L-chiro*-Inositol die häufigsten Isomere, die frei oder als Methylether in Pflanzen vorkommen, danach folgen *scyllo*- und *neo*-Inositol. Letztere beiden Isomere konnten unter anderem im menschlichen Gehirn nachgewiesen werden, wobei *scyllo*-Inositol einen Anteil von 5 - 12 % am Cyclitol-Gehalt aufweist (Seaquist & Gruetter 1998) während *neo*-Inositol in weit geringeren Mengen gefunden wurde (Sherman *et al.* 1971). Die natürlich vorkommenden Inositol-Isomere entstehen durch Epimerisierungs-Reaktionen aus

myo-Inositol, eine entsprechende Epimerase konnte in den Gehirnen von Ratten und Kaninchen nachgewiesen werden (Hoffmann-Ostenhoff *et al.* 1982, Sherman *et al.* 1968a, b). Wird *myo*-Inositol in seiner bevorzugten Sesselkonformation betrachtet, so besitzt es eine axiale und fünf äquatoriale Hydroxylgruppen. Das Kohlenstoffatom, das die axiale Hydroxylgruppe trägt wird als C-2 bezeichnet, die anderen Kohlenstoffatome werden von C-1 bis C-6 im oder gegen den Uhrzeigersinn numeriert. Eine Numerierung gegen den Uhrzeigersinn führt zur D- und eine Numerierung im Uhrzeigersinn zur L-Konfiguration. Normalerweise erhält das Präfix, welches zu den niedrigeren Ziffern in der Numerierung führt den Vorzug. Diese Nomenklatur führte jedoch in der Praxis zu Unklarheiten, insbesondere bei der Verfolgung von Stoffwechselwegen konnte es zu einem Wechsel zwischen D- und L-Konfiguration kommen. So führt z. B. die Dephosphorylierung von D-Ins(1,3,4,5)P₄ an der 1-Position zu L-Ins(1,5,6)P₃, durch die Anwendung einer IUPAC-Empfehlung bei natürlich vorkommenden Inositolphosphaten konsequent die D-Numerierung zu verwenden wird dieses Problem umgangen (Abbildung 2).

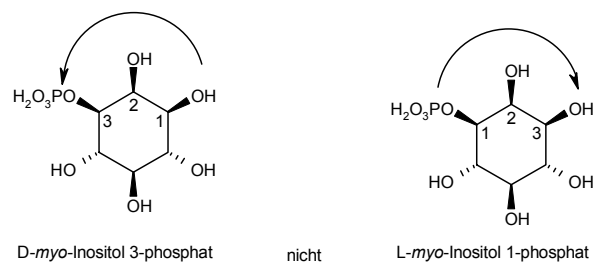


Abbildung 2: Nomenklatur der *myo*-Inositolphosphate.

1.1.1 Biosynthese und Katabolismus von *myo*-Inositol

Myo-Inositol wird *de novo* in zwei Stufen aus Glucose 6-phosphat synthetisiert. Die dafür verantwortlichen Enzyme sind eine *myo*-Inositol 3-phosphat Synthase (MIPS), früher als L-*myo*-Inositol 1-phosphat Synthase bezeichnet, und die *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase. Der erste Schritt der Biosynthese ist die Oxidation von Glucose 6-phosphat zu 5-Ketoglucose 6-phosphat, katalysiert durch die NAD⁺ abhängige Oxidoreduktase-Aktivität der Synthase. Über eine Aldolase-Aktivität erfolgt der Ringschluss zu L-*myo*-Inosose 2,1-phosphat. Abschließend wird durch das gebildete NADH die Ketogruppe reduziert (Abbildung 3). Das so gebildete *myo*-Inositol 3-phosphat wird dann durch die *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase zu *myo*-Inositol dephosphoryliert (Agam *et al.* 2002). Die menschliche Niere ist in der Lage bis zu 4 g *myo*-Inositol pro Tag zu synthetisieren, zusätzlich nimmt der Mensch täglich ca. 1 g *myo*-Inositol mit der Nahrung auf (Clements & Diethelm 1979; Holub 1986). *Myo*-Inositol ist im Serum vorhanden und kann von den Zellen

aufgenommen werden. Freies *myo*-Inositol ist, mit der Ausnahme eines spezifischen Aufnahme-Systems mit geringer Kapazität, allerdings nicht in der Lage die Bluthirnschranke zu überwinden. Für die Funktionen des Gehirns benötigtes *myo*-Inositol wird daher aus Glucose 6-phosphat synthetisiert.

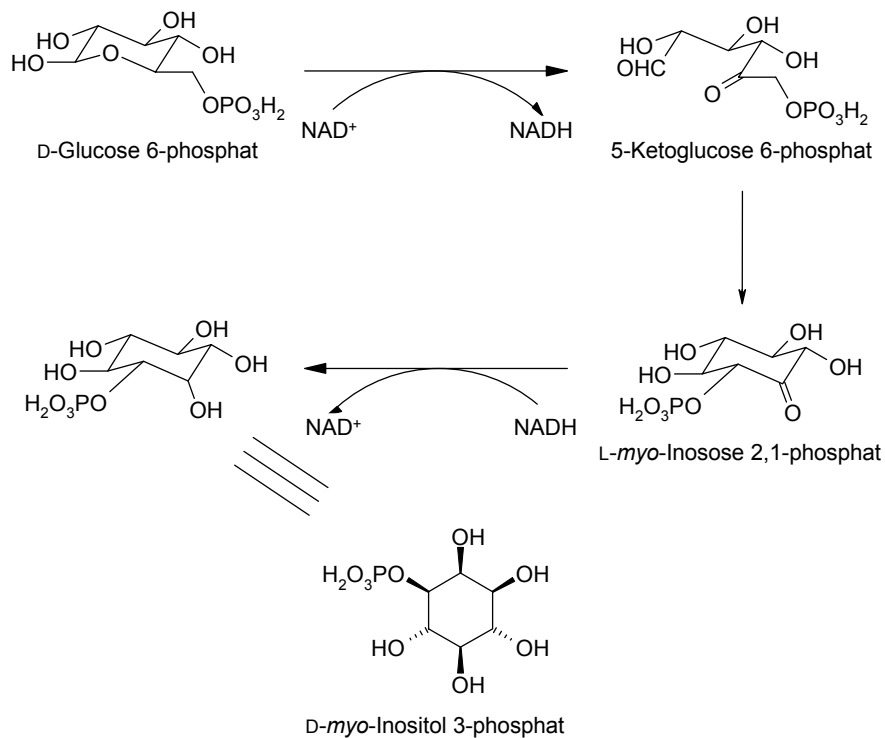


Abbildung 3: Biosynthese von *myo*-Inositol.

Der einzige bekannte Abbauweg für *myo*-Inositol ist seine Oxidation zu D-Glucuronsäure durch die *myo*-Inositol Oxygenase (Abbildung 4) und die anschließende schrittweise Metabolisierung zu D-Xylulose 5-phosphat, das dann in den Pentosephosphatzyklus eingeschleust wird (Reddy *et al.* 1981; Arner *et al.* 2001).

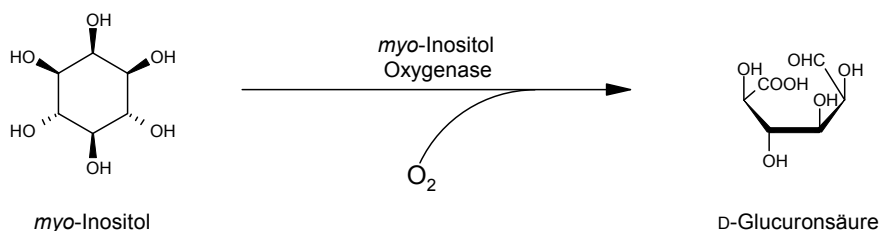


Abbildung 4: Katabolismus von *myo*-Inositol.

1.2 Inositolphosphate

Es wurden eine Reihe von *myo*-Inositolderivaten beschrieben, so z. B. Ketoderivate (Inososen) in Bakterien und tierischem Gewebe sowie Aminoderivate, doch die physiologisch wichtigsten sind die Phosphorsäureester, auch Inositolphosphate genannt. Je nach Grad der Phosphorylierung wird zwischen Mono-, Bis-, Tris-, Tetrakis-, Pentakis- und Hexakisphosphaten unterschieden. Aus der Kombination von Phosphorylierungsgrad und den jeweils möglichen Stellungsisomeren ergeben sich 63 theoretisch mögliche Inositolphosphate. Durch die Entdeckung von Diphosphoinositolphosphaten 1993 wurde das Spektrum der Inositolphosphate noch erweitert (Stephens *et al.* 1993). Für eine Intensivierung der Inositolphosphat-Forschung sorgte 1983 die Entdeckung, daß es sich bei $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ um einen Ca^{2+} -mobilisierenden sekundären Botenstoff handelt (Streb *et al.* 1983). Trotz erheblicher Anstrengungen gelang es aber bisher nur für wenige Inositolphosphate eine physiologische Funktion zu finden (Irvine & Schell 2001). Der Nachweis von Phosphorsäureestern anderer Inositol-Isomere in tierischem Gewebe gelang bis jetzt noch nicht. Allerdings wurden in *Entamoeba histolytica* neo-Inositolphosphate gefunden (Martin *et al.* 2000).

1.2.1 *myo*-Inositol-1,4,5-trisphosphat ($\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$) – ein sekundärer Botenstoff

$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ist ein kurzlebiger Botenstoff, der eine wichtige Rolle bei der transmembranen Signalübertragung spielt, und die rasche Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) bewirkt (Streb *et al.* 1983, Berridge 1987). Durch die Bindung eines extrazellulären Signalstoffes an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor wird das plasmamembranständige Enzym Phospholipase C (PLC) aktiviert. Die Phospholipase C spaltet das Plasmamembranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) in $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ und 1,2-Diacylglycerin (DAG). Das wasserlösliche $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ diffundiert durch das Cytosol und wird am ER durch einen spezifischen Rezeptor gebunden. Hierbei handelt es sich um ein Ca^{2+} -Ionenkanal, durch die Bindung des Liganden öffnet sich der Kanal und Ca^{2+} -Ionen gelangen aus dem ER in das Cytosol. Der erhöhte cytoplasmatische Ca^{2+} -Spiegel löst dann Prozesse wie die Kontraktion glatter Muskeln, den Glykogenabbau und die Exocytose aus. Innerhalb weniger Sekunden nach seiner Bildung wird der größte Teil von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ durch eine 5-Phosphatase zu $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ hydrolysiert, das die Ca^{2+} -Freisetzung nicht mehr beeinflusst. Das DAG verbleibt in der Plasmamembran und aktiviert die Proteinkinase C, welche Proteine phosphoryliert und damit deren Aktivität verändert. Die

nach der Bindung eines Signalstoffs an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor ausgelösten Vorgänge bis zur Freisetzung von Ca^{2+} sind in Abbildung 5 dargestellt.

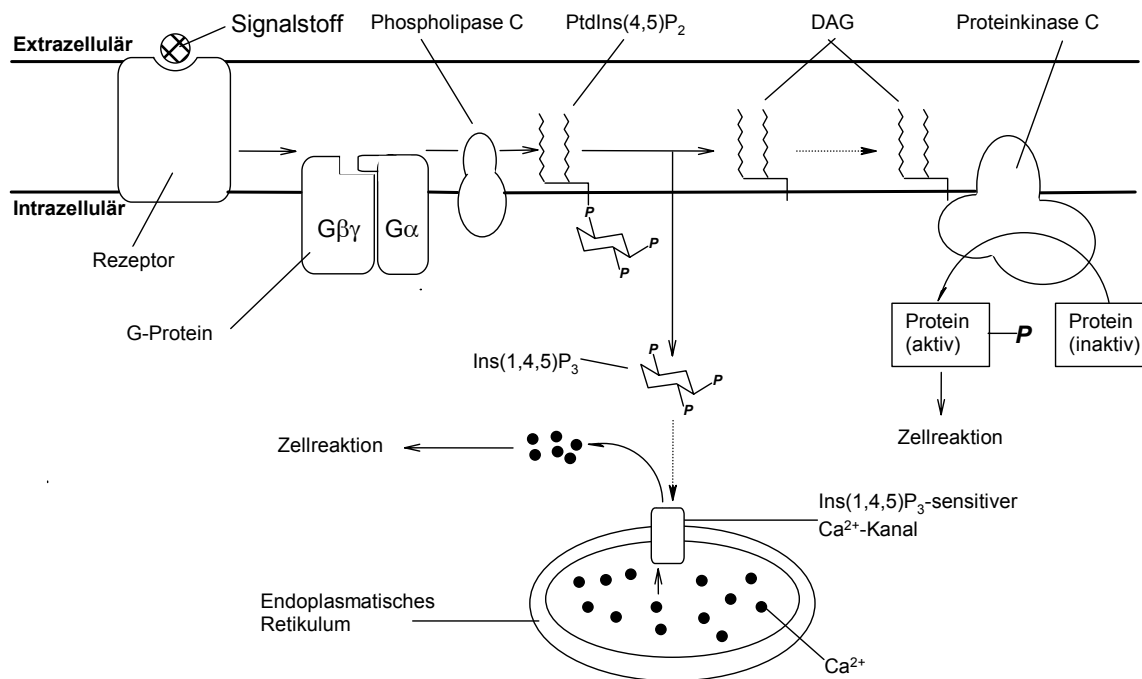


Abbildung 5: Der Inositol-Lipid-Signalweg.

1.2.2 Mögliche Funktionen von anderen Inositolphosphaten

Bei den Inositolmono- und Inositolbisphosphaten scheint es sich hauptsächlich um Zwischenstufen die beim Auf- und Abbau von physiologisch relevanten Inositolphosphaten entstehen zu handeln. Lediglich für $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ wird eine Beteiligung an der DNA-Replikation vermutet, da es die DNA-Polymerase α stimuliert (Sylvia *et al.* 1988). Bei den höherphosphorylierten Inositolphosphaten werden Funktionen für $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$, $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ und InsP_6 diskutiert. $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ wird aus $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ durch eine $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase gebildet. Diese $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-Kinase ist die aktivste Inositol-Kinase in Säugetieren und spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Konzentration. $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ wird durch die gleiche 5-Phosphatase hydrolysiert wie $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. Das Enzym besitzt allerdings eine 10fach höhere Affinität und einen 100fach niedrigen V_{max} für $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ als für $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. Auf diese Weise kann $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ gegen die Hydrolyse durch 5-Phosphatasen schützen und die Effektivität des Inositolphosphates erhöhen (Irvine 2001). In einigen Zelllinien kann $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ wie $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran aktivieren (Lückhoff & Clapham 1992). Ein weiteres biologisch relevantes Inositoltriphosphat ist $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$, in Epithelzellen ist es ein wichtiger Inhibitor der Ca^{2+} -regulierten Chlorid-Kanäle. Die

Synthese von $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ ist noch nicht vollständig geklärt. In Zellhomogenaten war es allerdings das Hauptabbauprodukt von $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$. Bei Patienten mit cystischer Fibrose ist der epithale cAMP-regulierte Chlorid-Kanal defekt, nur der durch Ca^{2+} und $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ regulierte Chloridkanal ist funktionsfähig. Beim Einsatz von Medikamenten, die zur Stimulierung dieses Weges eingesetzt werden, kommt es zur Bildung von $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$, welches den stimulierenden Effekt wieder aufhebt. Alternative Strategien sollen diesem inhibitorischen Effekt von $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ entgegen wirken. $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ wurde als Bestandteil von Vogelerythrozyten identifiziert, dieses Isomer ist auch das mengenmäßig dominanteste Inositolpentakisphosphat in Säugerzellen. Bei einigen Tierarten mit kernenthaltenden Erythrozyten wird durch $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins herabgesetzt während die Kooperativität für eine Sauerstoffbindung ansteigt, eine Funktion die sonst von ATP oder 2,3-Bisphosphoglycerat wahrgenommen wird (Isaaks & Harkness 1980). InsP_6 wurde ursprünglich in Pflanzen entdeckt und dient dort als Speicher für Phosphat und Kohlenhydrat in den Pflanzensamen. InsP_6 macht dabei $>1\%$ des Trockengewichtes der Pflanzensamen aus und ist für $\frac{2}{3}$ des Phosphatgehaltes verantwortlich (Raboy 2001). Durch seine Eigenschaft als starker Komplexbildner geriet InsP_6 ernährungswissenschaftlich in Mißkredit, da es als Bestandteil der Nahrung die Bioverfügbarkeit von physiologisch wichtigen Kationen, wie z. B. Eisen und Zink, beeinträchtigen soll (Greiner & Jany 2001, Davidsson *et al.* 1994, Saha *et al.* 1994). Es wurden deshalb Versuche unternommen den InsP_6 -Gehalt in Getreide zu verringern. Durch die gezielte Ausschaltung der zentralen an der Biosynthese von InsP_6 beteiligten Kinasen ist es in *Arabidopsis thaliana* gelungen den InsP_6 -Gehalt, ohne nennenswerte Beeinflussung der Samenanzahl und deren Keimfähigkeit, um 90 % zu reduzieren (Stevenson-Paulik *et al.* 2005). Eine entsprechende Übertragung der Experimente auf Nutzpflanzen steht noch aus. InsP_6 soll in Pflanzen auch an der Regulierung der Spaltöffnungen an der Blattunterseite, über die Aktivierung von Kaliumkanälen in den Schließzellen, beteiligt sein (Lemtiri-Chlieh *et al.* 2000). Nach und nach wurde festgestellt, daß InsP_6 auch ubiquitär in tierischen Zellen vorkommt und das häufigste Inositolphosphat auf der Welt ist. Die intrazellulären Konzentrationen liegen für Säugetierzellen zwischen 10 - 100 μM (Carpenter *et al.* 1989) und für niedere Eukaryonten zwischen 100 - 500 μM (Freund *et al.* 1992). Die Verfügbarkeit von InsP_6 in der Zelle ist allerdings durch die Bildung unlöslicher Komplexe mit Ca^{2+} und Mg^{2+} sowie der starken elektrostatischen Wechselwirkung mit Proteinen limitiert. Die Biosynthese von InsP_6 in Eukaryonten war Gegenstand vieler Untersuchungen (York *et al.* 1999, Verbsky *et al.* 2005a, Fujii & York 2005). Es handelt sich dabei um eine Phospholipase C-abhängige

InsP₆-Synthese, die von Ins(1,4,5)P₃ ausgeht und über verschiedene vom jeweiligen Organismus abhängigen Zwischenstufen zu Ins(1,3,4,5,6)P₅ führt, das abschließend durch eine 2-Kinase zu InsP₆ phosphoryliert wird (Abbildung 6).

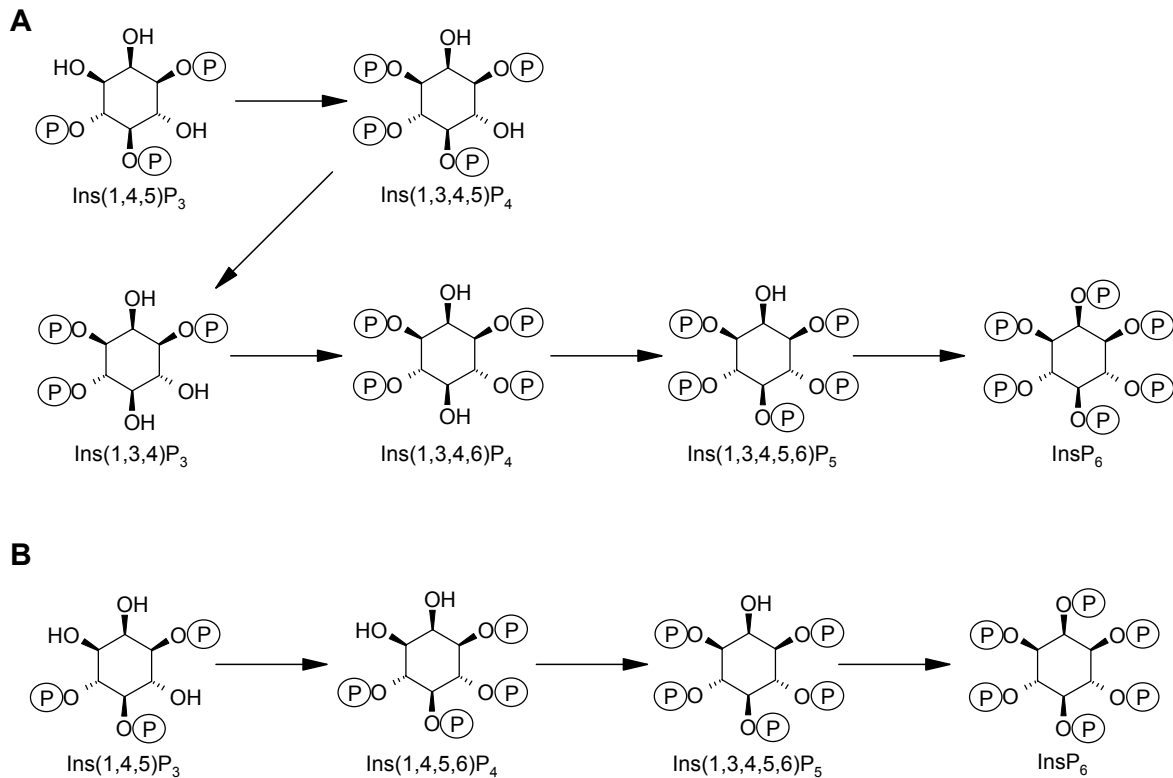


Abbildung 6: Biosynthese von InsP₆ in verschiedenen Organismen: (A) *Homo sapiens*, (B) *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* und *Arabidopsis thaliana* nach Verbsky *et al.* 2005a.

Außerhalb des Pflanzenreiches aktiviert InsP₆ die Proteinkinase C und inhibiert Proteinphosphatasen. Einige Entdeckungen zeigen, daß InsP₆ auch im Zellkern Funktionen wahrnimmt, so existiert im Zellkern ein separater von Ins(1,4,5)P₃ ausgehender Syntheseweg für InsP₆, welches für den mRNA-Export aus dem Zellkern benötigt wird. Bei diesen Untersuchungen an Hefen wurden vier Gene identifiziert, die am mRNA-Export aus dem Zellkern beteiligt sind. Drei dieser Gene kodieren für Enzyme die an der InsP₆-Synthese beteiligt sind (York *et al.* 1999). SopB ist eines der Proteine, die von *Salmonella*-Spezies bei Kontakt mit einer Wirtszelle in diese freigesetzt werden und für die Pathogenität mitverantwortlich ist. Es handelt um eine Inositolpolyphosphat Phosphatase, die eine große Zahl von Inositolphosphaten und Phospholipiden hydrolysiert. So wurde nach einer Infektion der Wirtszelle eine Abnahme des InsP₆-Gehaltes, einen Defekt beim mRNA-Export sowie eine Einstellung der Zellteilung beobachtet (Feng *et al.* 2001). Es existieren auch Hinweise darauf, daß InsP₆ DNA-Reparaturmechanismen durch Aktivierung einer DNA-abhängigen Proteinkinase in Gang setzen kann (Hanakahi *et al.* 2000). Diese Beobachtungen legen nahe,

daß eine intakte InsP₆-Biosynthese lebensnotwendig ist. Gestützt wird dies durch die Beobachtung, daß der Verlust der Kinase Aktivität, die den abschließende Schritt der Biosynthese von Ins(1,3,4,5,6)P₅ zu InsP₆ katalysiert, für Mäuse letal ist (Verbsky *et al.* 2005b; Frederick *et al.* 2005). InsP₆ hat eine sehr hohe Affinität zu Fe³⁺ und inhibiert so die Fe³⁺-katalysierte Hydroxylradikal-Bildung *in vitro* (Hawkins *et al.* 1993). Deswegen wurde vermutet, daß InsP₆ für den Transport von Eisen im Cytosol verantwortlich ist und so die Zelle vor der schädliche Bildung von Hydroxylradikalen schützt. Gestützt wurde diese Vermutung durch frühere Ergebnisse, daß InsP₆ eine sehr gutes Antioxidans *in vitro* ist (Graf *et al.* 1987). Die Vielzahl der Rollen die InsP₆ zugeschrieben werden sind allerdings mit Vorsicht zu genießen, so weist Shears (2001) auf die Problematik hin zwischen InsP₆-spezifischen und unspezifischen Reaktionen zu unterscheiden. Shears (2001) schlägt daher eine Reihe von Kriterien vor die eine Unterscheidung erleichtern sollen: Ein durch InsP₆ hervorgerufener Effekt sollte nicht durch andere Komplexbildner nachgeahmt werden können. Andere Inositolphosphate oder Diphosphoinositolphosphate sollten keine Reaktionen hervorrufen. Nützlich ist auch ob ein in Gegenwart von InsP₆ beobachteter Effekt durch Inositolhexakisulfat (InsS₆) imitiert wird. Da es sich bei letzterem um ein nichtphysiologisches Analog zu InsP₆ handelt mit einer, bei physiologischen pH-Werten, ähnlich hohen negativen Ladungsdichte. Auch der Einsatz von Isomeren von *myo*-InsP₆ (z. B. *scyllo*-InsP₆ und *neo*-InsP₆) kann bei der Bestimmung der Spezifität nützlich sein.

1.3 Inositolphosphat Phosphatasen

Am komplexen Phosphoinositid-/Inositolphosphatstoffwechsel mit seinen sechs Phospholipiden und über 20 löslichen Inositolphosphaten, wie sie in Säugetierzellen gefunden werden, sind eine Vielzahl von Kinasen und Phosphatasen beteiligt. Sie sorgen für eine steten Auf- und Abbau der Moleküle und regulieren die Konzentrationen der an zellulären Prozessen beteiligten Inositolphosphate. In den letzten 20 Jahren wurde eine Vielzahl von Inositolphosphat Phosphatasen entdeckt und charakterisiert. Im Folgenden soll daher auf einige ausgewählte Phosphatasen näher eingegangen werden.

1.3.1 *Myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase

Die *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase (EC 3.1.3.25) wurde von Eisenberg während Untersuchungen zur Biosynthese von *myo*-Inositol in Rattenhoden entdeckt (Eisenberg *et al.* 1965). Das Enzym kontrolliert den Stoffwechsel der Inositolmonophosphate, die sowohl durch Rezeptoraktivierung als auch durch *de novo* Synthese entstehen wie in Abbildung 7 dargestellt. Das gebildete *myo*-Inositol wird dann zur Synthese von Phosphatidylinositol

(PtdIns) und anderer phosphorylierter Phospholipide einschließlich Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) verwendet. Die Abkürzung IMPase hat sich für die *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase etabliert und wird dementsprechend in dieser Arbeit verwendet.

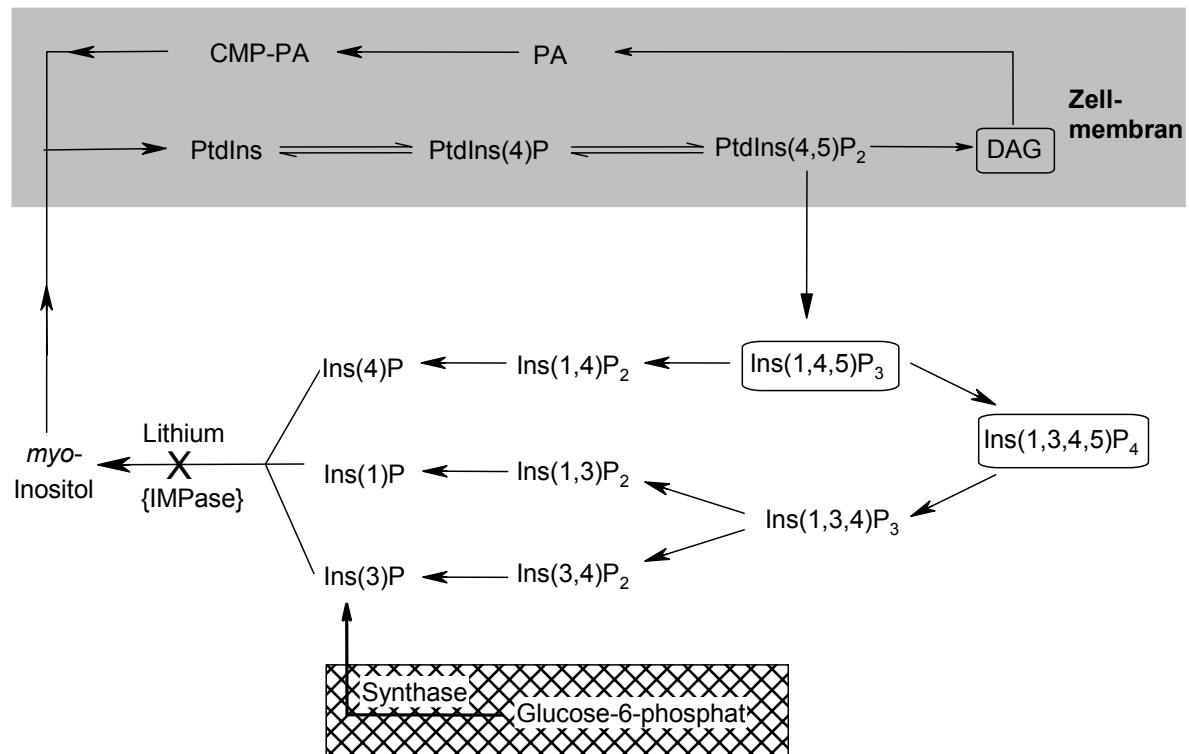


Abbildung 7: Kontrolle des Stoffwechsels der Inositolmonophosphate durch die IMPase.

Die *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase wird unkompetitiv durch therapeutische Mengen von Lithium-Salzen (1 mM) inhibiert. Diese Salze werden zur Behandlung manisch-depressiver Patienten benutzt. Obwohl die Lithiumtherapie sehr effektiv ist zeigen sich merkliche Nebenwirkungen und der Bereich zwischen therapeutischen (0,6 - 1,2 mM) und toxischen (> 2mM) Lithiumkonzentrationen im Plasma ist sehr schmal. Eine Kontrolle dieser Konzentrationen bei den behandelten Patienten ist daher notwendig (Schou 1991). Der Effekt der Lithiumtherapie scheint auf einer Einschränkung der Signaltransduktion durch die Phosphoinositid-abhängige Signaltransduktion zu beruhen. Das durch Rezeptoraktivierung freigesetzte Ins(1,4,5)P₃ wird schrittweise zu Inositol hydrolysiert, einer Vorstufe bei der Phosphoinositid-Biosynthese. Die *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase katalysiert den letzten Schritt die Dephosphorylierung vom D-*myo*-Inositol-3-phosphat zum *myo*-Inositol. Durch die Li⁺-Inhibierung kommt es zu einer Reduzierung des für die Resynthese der Phosphoinositide benötigten *myo*-Inositols und damit zu einer Abnahme der durch Rezeptoraktivierung gebildeten Second-Messenger Ins(1,4,5)P₃ und DAG. *Myo*-Inositol ist

nicht in der Lage in der erforderlichen Menge die Blut-Hirnschranke zu passieren und so das erniedrigte Inositolniveau wieder zu erhöhen. Die Resynthese ist der einzige Weg den Phosphoinositid-Pool wieder aufzufüllen. Die IMPase aus Säugetieren besteht aus zwei identischen Untereinheiten (Homodimer) mit einem Molekulargewicht von je 30 kDa (Gee *et al.* 1988), sie wurde aus menschlichem Gehirn, Rinder- und Rattenhirn gereinigt und sequenziert. Dabei wurde festgestellt, daß es große Homologien in der Aminosäure-Sequenz bei verschiedenen Spezies gibt, so weisen die IMPasen aus menschlichem Gehirn, Rinder- und Rattenhirn eine 79%ige Identität auf (McAllister *et al.* 1992). Vergleiche mit der Aminosäuresequenz einer IMPase aus Fröschen zeigen eine hohe Übereinstimmung von 75 % (Wreggett 1992). Röntgenstrukturuntersuchungen zeigten, daß das aktive Zentrum der IMPase von Säugetieren überraschend groß und hydrophil ist, offenbar ist es viel größer als es zur Unterbringung von Inositolmonophosphaten benötigt wird (Bone *et al.* 1992). Das große aktive Zentrum könnte ein Erklärung dafür sein, warum neben äquatorial substituierten Inositolmonophosphaten von einigen IMPasen auch 2'-Nucleoside dephosphoryliert, werden. Die IMPase wird durch Mg^{2+} in millimolaren Konzentration aktiviert und anhand von Molecular Modelling, Mutagenese-Experimenten und kinetischen Studien konnte gezeigt werden, daß zwei Metallionen am Enzymmechanismus beteiligt sind (Pollack *et al.* 1994). Auch Röntgenstrukturanalysen weisen auf zwei Bindestellen für Metallionen hin. Mit Hilfe von kinetischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß es sowohl vor als auch nach der Anbindung des Substrates zu einer Bindung von Mg^{2+} -Ionen an die IMPase kommt. Aufgrund der Daten kann der wahrscheinliche Mechanismus für die Hydrolyse von Inositolmonophosphaten wie folgt zusammengefaßt werden (Abbildung 8): In Abwesenheit eines Substrates ist ein einzelnes Mg^{2+} -Ion an der ersten Metall-Bindestelle vorhanden (A). Das Substrat bindet nun an das Enzym, wobei der Hauptbeitrag für die Bindungsenergie aus der Wechselwirkung zwischen der Phosphatgruppe und Magnesium stammt (B). Nun bindet ein zweites Mg^{2+} -Ion an den Enzym-Substrat-Komplex und ermöglicht so den nucleophilen Angriff eines aktivierten Wassermoleküls auf den Phosphor der Phosphatgruppe (C). Das gebildete *myo*-Inositol löst sich und läßt das durch die zwei Mg^{2+} -Ionen komplexierte anorganische Phosphat zurück (D). Im Anschluß daran verläßt zuerst das zweite Magnesiumion seine Bindestelle (E), danach verläßt das anorganische Phosphat das Enzym und die IMPase ist bereit für den nächsten Reaktionszyklus (A). Die Inhibierung durch Li^+ läßt sich anhand dieses Mechanismus in folgender Weise erklären: In Gegenwart von Li^+ wird die Bindestelle des zweiten Magnesiumions unter Ausbildung eines stabilen Enzym-Magnesium-Phosphat-Lithium-Komplexes besetzt (F). Das Lithium verhindert die

Freisetzung des anorganischen Phosphats und inhibiert auf diese Weise das Enzym (Atack *et al.* 1995).

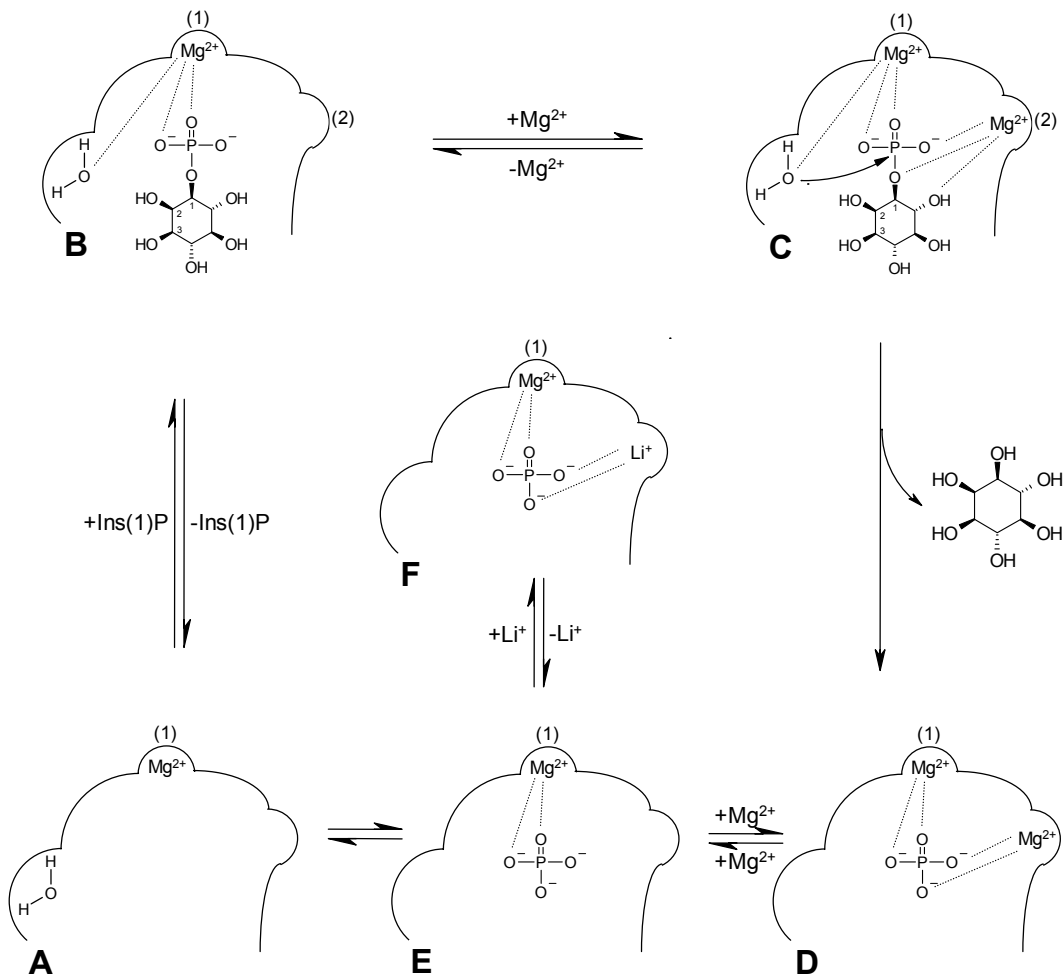


Abbildung 8: Stark vereinfachte Darstellung des Reaktionsmechanismus der IMPase.

1.3.2 Myo-Inositolpolyphosphat 5-Phosphatasen

Die Inositolpolyphosphat 5-Phosphatasen sind in der Phosphoinositidkaskade von besonderer Bedeutung, da ihnen eine signalterminierende Rolle zugeschrieben wird. Schon früh zeigte sich, daß es verschiedene 5-Phosphatasen gibt (Connolly *et al.* 1985; Hansen *et al.* 1987) und diese anscheinend ubiquitär vorkommen (Majerus 1996; Stolz *et al.* 1998). Die 5-Phosphatasen werden anhand ihrer Substratspezifität in Gruppen eingeteilt. Von den vier bekannten Substraten $Ins(1,4,5)P_3$, $Ins(1,3,4,5)P_4$, $PtdIns(4,5)P_2$ und $PtdIns(3,4,5)P_3$ katalysieren Typ I 5-Phosphatasen ausschließlich die Umsetzung von $Ins(1,4,5)P_3$ und $Ins(1,3,4,5)P_4$, die Typ II 5-Phosphatasen katalysieren neben der Umsetzung der löslichen Substrate auch die der Phosphoinositide $PtdIns(4,5)P_2$ und $PtdIns(3,4,5)P_3$, allerdings mit unterschiedlicher Effizienz. Untersuchungen haben gezeigt, daß Typ I 5-Phosphatasen eine zentrale Rolle bei der Regulierung der metabolischen Stoffwechselwege spielen, die den

intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel kontrollieren. Diese Enzyme sind Mg^{2+} -abhängige Phosphomonoesterasen, die über einen Prenyl-Rest an die Membran gebunden sind (Seet *et al.* 1998). Bei den Typ II 5-Phosphatasen handelt es sich um eine heterogenere Gruppe von Enzymen mit Unterschieden in der Substratspezifität, Regulation und Lokalisation. Ihre Substrate, die Phosphoinositide, besitzen unterschiedliche physiologische Funktionen. So konnte gezeigt werden, daß $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ und $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Aktinzytoskeletts spielen (Sakisaka *et al.* 1997; Ma *et al.* 1998; Vollenweider *et al.* 1999). Es ist auch bekannt, daß $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ und $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ die Funktionen verschiedener Proteine wie z. B. Proteinkinase C (Oh *et al.* 1998), Phospholipase D (Liscovitch *et al.* 1994; Pappan *et al.* 1997) und ATP-abhängige Natriumkanäle (Huang *et al.* 1998; Shyng & Nichols 1998; Baukowitz *et al.* 1998) beeinflussen. Wie wichtig die Regulation der Phosphoinositide ist, zeigt sich am Beispiel des Lowe-Syndroms, welches sich durch Trübungen der Hornhaut und der Augenlinse, intellektuelle Beeinträchtigungen, epileptische Anfälle, Verhaltensstörungen, muskuläre Hypotonie und Nierenerkrankungen äußert. Bei den betroffenen Patienten konnten Mutationen in einem für eine Typ II 5-Phosphatase kodierenden Gen (Attree *et al.* 1992; Lin *et al.* 1997) und eine deutlich reduzierte $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ 5-Phosphatase Aktivität in den Extrakten von Fibroblasten nachgewiesen werden. Dies deutet daraufhin, daß der $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -Gehalt normalerweise streng kontrolliert wird (Zhang *et al.* 1998; Toker 1998). Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden konnten in *D. discoideum* vier Typ II 5-Phosphatasen (Dd5P1 - Dd5P4) identifiziert werden. Alle 4 Proteine wurden inaktiviert, wobei der knock-out von Dd5P4 zu deutlichen Defekten im Wachstum auf Flüssigmedien und der Differenzierung führte. Eine geringe Wachstumsrate in axenischer Kultur und auf Bakterien läßt vermuten, daß Dd5P4 eine Rolle in der Endocytose spielt, hohe Transkriptionsraten im vegetativen und multizellulären Stadium stützen den Verdacht, daß das Enzym während des Wachstums und der Differenzierung von besonderer Bedeutung ist (Loovers *et al.* 2003).

1.3.3 Myo-Inositolhexakisphosphat Phosphatasen (Phytasen)

Phytasen sind in der Natur weitverbreitet und kommen in Mikroorganismen, Pflanzen und einigen tierischen Geweben vor (Dvořáková 1998). Sie katalysieren die Hydrolyse von *myo*-Inositolhexakisphosphat zu anorganischem Phosphat und niedrigphosphorylierten Inositolphosphaten, in einigen Fällen bis zum freien *myo*-Inositol. Die IUBMB (Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) unterscheidet zwei Klassen

von Phytasen: 3-Phytasen (EC 3.1.3.8) und 6-Phytasen (EC 3.1.3.26). Die Einteilung basiert auf der ersten Phosphatgruppe, die bevorzugt von dem Enzym abgespalten wird. Bei den 3-Phytasen, die typisch für Mikroorganismen und Pilze sind, wird der Phosphatester an der D-3 Position als erstes hydrolysiert, während es bei den 6-Phytasen, die hauptsächlich in Pflanzen vorkommen (Johnson & Tate 1969; Cosgrove 1969; Cosgrove 1970), der Phosphatester an der D-4 (bzw. L-6) Position ist (Abbildung 9).

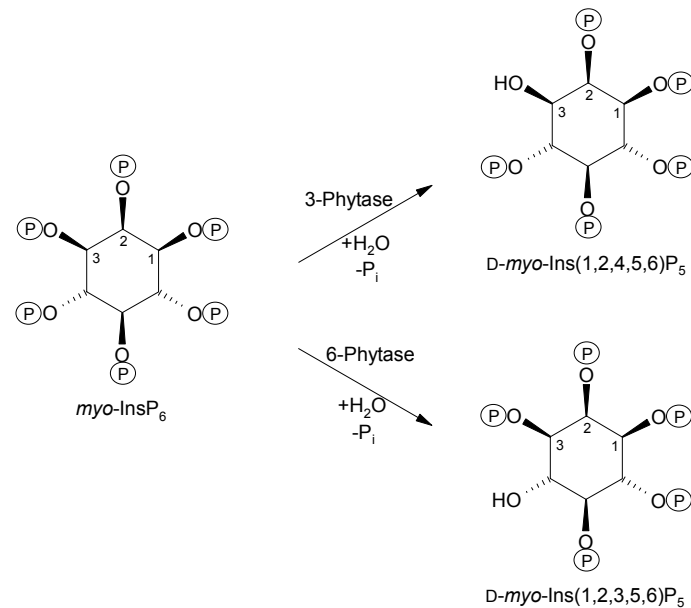


Abbildung 9: Einteilung der Phytasen anhand der Dephosphorylierung von *myo*-InsP₆.

Die Rolle der Phytasen in den verschiedenen Organismen scheint, in Abhängigkeit von der vom Substrat *myo*-InsP₆ wahrgenommenen Funktion, stark zu variieren. In Pflanzen sorgen die Phytasen dafür, daß der Pflanzensamen während der Keimung mit Phosphat und freiem *myo*-Inositol versorgt wird, einem wichtigen Wachstumsfaktor. Durch die Hydrolyse von Phytat werden auch gebundene Kationen wie K⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ und Ca²⁺ freigesetzt. Von den Mikroorganismen werden Phytasen hauptsächlich in Zeiten des Phosphatmangels expremiert und teilweise sekretiert, um Phosphat aus dem sie umgebenden InsP₆ oder aus bereits internalisiertem InsP₆ freizusetzen. Neben diesen beiden Fällen in denen Phytat als Speicher- oder Nährstoff dient, gibt es Hinweise darauf, daß zelluläres InsP₆ und seine Abbauprodukte auch Funktionen im Signalstoffwechsel wahrnehmen (Shears 2001). Ein phytaseähnliches Enzym, die Multiple Inositolpolyphosphat Phosphatase (MIPP) aus dem Gewebe von Säugetieren ist in der Lage die zellulären Konzentrationen von *myo*-InsP₆ und *myo*-Ins(1,3,4,5,6)P₅ zu regulieren (Craxton *et al.* 1997). Desweiteren sind die von der MIPP

gebildeten Abbauprodukte *myo*-Ins(1,3,4,5)P₄ und *myo*-Ins(1,4,5)P₃ aktiv an der Ca²⁺-Homöostase beteiligt (Van Dijken *et al.* 1995).

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Phytasen zeigt, daß sie ein konservatives RHGXRRP-Motiv mit einem Histidin im aktiven Zentrum aufweisen (Kerovuo *et al.* 2000). Bei der Betrachtung der biochemischen Eigenschaften fällt auf, daß Phytasen im allgemeinen thermisch stabil und über einen weiten pH-Bereich aktiv sind. Die Temperaturoptima variieren, liegen aber im Bereich zwischen 45 °C bis 77 °C. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang eine von Pasamontes *et al.* (1997) beschriebene extrem thermostabile Phytase aus *Aspergillus fumigatus*, die nach 20 Minuten bei 100 °C nur 10 % ihrer ursprünglichen Enzymaktivität verlor. Die meisten mikrobiellen Phytasen, vor allem die aus Pilzen, besitzen ein pH-Optimum zwischen 4,5 - 5,5, einige aus Bakterien eines zwischen 6,7 - 7,5. In Pflanzensamen wurden normalerweise Phytasen mit einem pH-Optimum zwischen 4,0 - 5,6 beschrieben (Dvořáková 1998). In Lilienpollen wurde allerdings eine alkalische Phytase mit einem pH-Optimum von 8,0 gefunden (Hara *et al.* 1985; Scott & Loewus 1986). Bei Untersuchungen zur Substratspezifität zeigte sich, daß nur wenige der beschriebenen Phytasen spezifisch für Phytinsäure sind, wie z. B. die Phytasen aus *Bacillus subtilis* (Powar & Jagannathan 1982; Shimizu 1992). In der Regel besitzen Phytasen ein breites Substratspektrum, so gehören z. B. ADP, ATP, *p*-Nitrophenylphosphat, Fructose 1,6-bisphosphat und 3-Phosphoglycerat, obwohl strukturell nicht mit *myo*-InsP₆ verwandt, zu den möglichen Substraten. Bei näherer Betrachtung des Abbaus von *myo*-InsP₆ durch Phytasen aus Pilzen wurde festgestellt, daß von den sechs möglichen Phosphatgruppen in den meisten Fällen nur fünf abgespalten wurden. Als häufigstes Endprodukt der Dephosphorylierungen konnte *myo*-Ins(2)P identifiziert werden. Dies ist ein Hinweis darauf, daß diese Phytasen bevorzugt Phosphatgruppen in äquatorialen Positionen angreifen, während sie anscheinend nicht in der Lage sind die axiale Phosphatgruppe abzuspalten (Wyss *et al.* 1999).

Neben dem rein wissenschaftlichen Interesse zeigte sich schon früh, daß Phytasen auch ein wirtschaftliches Potential besitzen. Dabei haben sich zwei Hauptanwendungen für Phytasen ergeben. Die erste ist die Elimination von Phytat in der Futtermittel- und Nahrungsmittelindustrie, die zweite die Synthese spezieller *myo*-Inositolphosphate als Hilfsmittel für biochemische Untersuchungen. Der Hauptgrund für die Entfernung von Phytat aus Futter- und Nahrungsmitteln ist dessen Unverdaulichkeit für Monogastrier einschließlich des Menschen (Simell *et al.* 1989). Das unverdaute InsP₆ wird ausgeschieden und verursacht Umweltprobleme. Hauptproblem ist die Eintragung von Phosphat in Gewässer und die damit einhergehende Eutrophierung. Dies kommt vor allem in Gegenden mit einer intensiven

Tierhaltung vor, insbesondere bei Hühner- und Schweinehaltung. Ein weiterer Grund für den Einsatz von Phytasen ist die Fähigkeit von InsP_6 zur Komplexbildung mit multivalenten Metallionen, welche die Aufnahme wichtiger Spurenelemente wie Fe, Zn und Ca durch Tiere und Menschen behindert und zu Defiziten in der Versorgung mit diesen Elementen führen kann. Phytat inhibiert auch Verdauungsenzyme (α -Amylase, Pepsin und Trypsin) und erhöht die Resistenz von Proteinen gegen den proteolytischen Verdau. Dies schränkt die Verwendung von Proteinpräparationen in der Nahrungsmittelindustrie ein. Alle diese Probleme können durch die Hydrolyse von Phytat mit Hilfe der Phytasen gelöst werden und seit geraumer Zeit bieten Alko Co. (Finnland), Alltech (USA) und BASF (USA) Phytasen, die im industriellen Maßstab hergestellt werden, unter den Bezeichnungen Finase, Allzyme Phytase und Natuphos als Zusatz für Futtermittel an. Phytasen haben allerdings auch ein Potential als enzymatische Werkzeuge in der Synthesechemie. So beschreibt Siren (1986) die Darstellung von *D*-*myo*- $\text{Ins}(1,2,6)\text{P}_3$, *D*-*myo*- $\text{Ins}(1,2,5)\text{P}_3$, *L*-*myo*- $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ und *myo*- $\text{Ins}(1,2,3)\text{P}_3$ durch die enzymatische Hydrolyse von Phytinsäure mit Hilfe einer Phytase aus *Saccharomyces cerevisiae*.

In unserem Arbeitskreis wurde in *D. discoideum* eine membrangebundene InsP_6 -Phosphatase identifiziert. Der enzymatische Abbau von *myo*- InsP_6 durch diese Phytase wurde untersucht und ist in Abbildung 10 dargestellt. Bei der Betrachtung des Abbauweges zeigt sich, daß bevorzugt die Positionen 3, 5 und 6 dephosphoryliert werden, die axiale 2-Position wird wie bei anderen Phytasen dagegen nicht angegriffen.

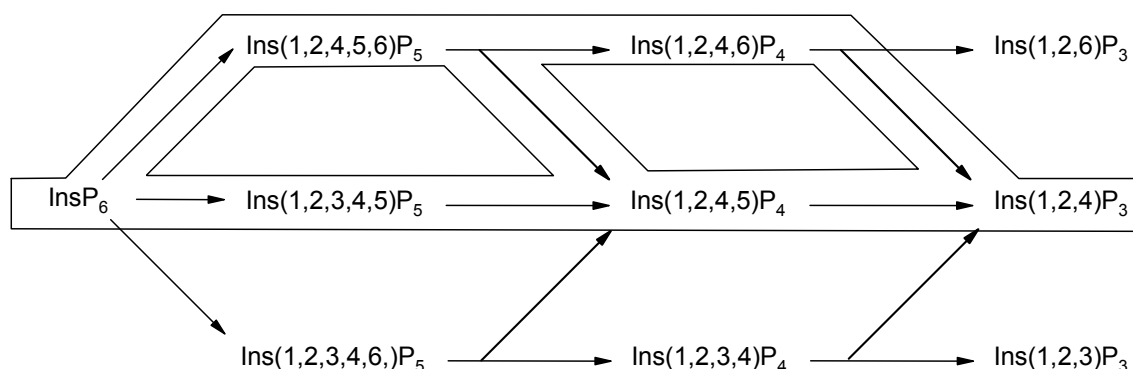


Abbildung 10: *myo*- InsP_6 -Abbau durch die Phytase aus *D. discoideum* (die eingetragenen Reaktionssequenzen zeigt die bevorzugten Abbauwege).

1.3.4 Weitere Inositolphosphat Phosphatasen

Neben den *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatasen, 5-Phosphatasen und Phytasen sind noch eine Reihe anderer Phosphatasen beschrieben worden (Majerus 1992; Majerus *et al.* 1999). So wird von einer aus Kalbshirn isolierten Mg^{2+} -abhängigen Inositolpolyphosphat 1-Phosphatase

Ins(1,3,4)P₃ zu Ins(3,4)P₂ und Ins(1,4)P₂ zu Ins(4)P dephosphoryliert. Andere an der 1-Position phosphorylierte Inositolphosphate sowie Phosphatidylinositolphosphate werden nicht umgesetzt (Inhorn *et al.* 1987). Neben den 1-Phosphatasen gibt es auch noch Inositolpolyphosphat 4-Phosphatasen und 3-Phosphatasen. Erstere hydrolysiert Ins(1,3,4)P₃ zu Ins(1,3)P₂ und Ins(3,4)P₂ zu Ins(3)P. Das Enzym benötigt keine Metallionen und es werden keine anderen Inositolphosphate umgesetzt die eine Phosphatgruppe an der 4-Position besitzen (Inhorn *et al.* 1987; Bansal *et al.* 1987; Howell *et al.* 1989). Die Inositolpolyphosphate 3-Phosphatase gehört wie die 5-Phosphatase zu den Enzymen, die sowohl lösliche als auch membranständige Substrate dephosphorylieren kann, so katalysiert sie die Umsetzungen von Ins(1,3)P₂ zu Ins(1)P und PtdIns(3)P zu PtdIns (Bansal *et al.* 1987; Caldwell *et al.* 1991).

1.4 *Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus

Der zelluläre Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*, erstmals 1935 von Raper beschrieben (Raper 1935), befindet sich an der evolutionären Grenze zwischen einzelligen und vielzelligen Organismen. Während der Wachstumsphase lebt *D. discoideum* als einzellige, etwa 10 µm große Amöbe in lockeren Bodenschichten, ernährt sich von Bakterien und vermehrt sich durch mitotische Zellteilung. Bei Nahrungsmangel endet diese Phase und eine Differenzierungsphase wird eingeleitet. Von den Zellen wird zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) als Botenstoff freigesetzt und benachbarte Zellen registrieren dieses Signal mit der Hilfe von G-Protein gekoppelten cAMP-Rezeptoren an der Zelloberfläche. Dies führt zu einer gerichteten Bewegung entlang des cAMP-Gradienten auf ein Aggregationszentrum. Etwa 10⁶ Zellen bilden ein Zellaggregat und formen eine fingerähnliche Struktur von 1 bis 2 mm Höhe (first finger). Dieses Gebilde kann zur Seite fallen und ist in der Lage sich als slug (Nacktschnecke) phototaktisch fortzubewegen. Diese Phase wird als Migrationsphase bezeichnet. In dieser Zeit differenzieren die Zellen zu zwei verschiedenen Zelltypen, den Prästiel- und den Präsporenzellen, dabei bilden etwa 20 % der Zellen Prästielzellen und die restlichen 80 % Präsporenzellen. Diese Phase endet nach etwa 24 Stunden mit der Ausbildung eines Fruchtkörpers. Der Fruchtkörper von *D. discoideum* besteht aus der Basalplatte, dem Stiel und dem Sporenkopf. Die Zellen des Stiels und der Basalplatte sind stark vakuolisiert und sterben im fertigen Sporenträger ab. Die Sporen sind gegen Hitze und Austrocknung resistent und in der Lage bei Keimung einen neuen Entwicklungszyklus einzuleiten. Beide Zelltypen sind im Gegensatz zu den Zellen der vorausgehenden Entwicklungsstadien von einer Zellulosewand umgeben. Die Ausbildung von

Fruchtkörpern ist für Dictyosteliden nicht die einzige Möglichkeit Hungerperioden zu überstehen. So sind einige Arten in der Lage Mikrozysten zu bilden. Dabei bildet jede Zelle eine Zellulosewand aus und es kommt zu einer Reihe von weiteren Veränderungen in der Zelle, die sie in die Lage versetzen die Hungerphase zu überleben. Die Bildung von Makrozysten ist eine weitere Möglichkeit. Bei dem 4 - 5 Tage dauernden Prozeß handelt es sich um eine sexuelle Fortpflanzung. Nach der Vereinigung von zwei Zellen und der anschließende Kernverschmelzung, wird von der Zygote cAMP freigesetzt und die so angelockten benachbarten *D. discoideum* Zellen werden gefressen. Nachdem auf diese Weise einige Hundert Zellen aufgenommen wurden umgibt sich die Zelle mit einer Zellulosewand und wartet auf günstige Lebensbedingungen um zu keimen. In diesem Fall teilt sich die Zygote in tausende kleiner Zellen, die die kombinierten Gene der beiden Elternzellen enthalten und anschließend den schützenden Zellulosemantel verlassen.

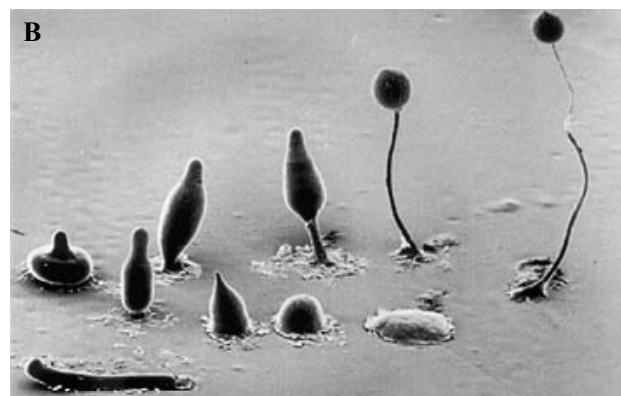
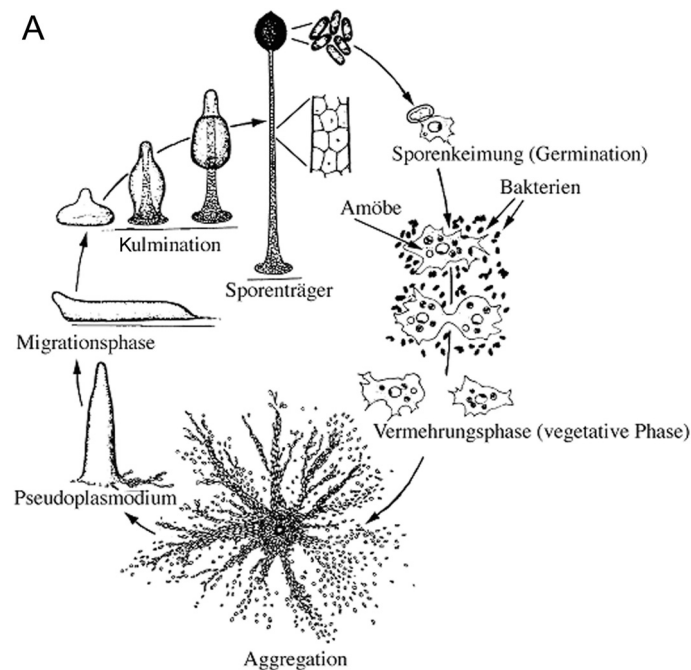


Abbildung 11: Schematische Darstellung und eine Photomontage von REM-Aufnahmen des Lebenszyklus von *D. discoideum* (A) nach Gerisch, 1965; (B) nach Grimson und Blanton.

D. discoideum wurde vom National Institutes of Health (USA) in die Liste der Modellorganismen aufgenommen (http://www.nih.gov/science/models/d_discoideum/) da eine Vielzahl von grundlegenden zellulären Prozessen große Ähnlichkeit mit denen höherer Organismen bis hin zum Menschen zeigen. Es ist ein besonders geeignetes System, wenn es um die Struktur, Regulation und Dynamik des Zytoskeletts geht, sowie um Signaltransduktion, Zell-Zelladhäsion und Entwicklung. So ermöglicht das komplexe Aktinzytoskelett von *D. discoideum* beteiligt an Prozessen wie Chemotaxis und Motilität ein Verhalten das dem von Leukozyten vergleichbar ist. Die Erforschung der molekularen Grundlagen dieser Prozesse ist für das Verständnis biologischer Prozesse wie etwa Wundheilung, Entzündung, Morphogenese und Tumormetastasierung von essentieller Bedeutung. *D. discoideum* hat eine Reihe von weiteren Vorzügen: Es hat einen kurzen Lebenszyklus, ist leicht zu züchten und kann in großen Mengen geerntet werden. Es wurden eine Reihe von biochemischen und molekular- sowie zellbiologischen Techniken etabliert. Sein haploides Genom kann leicht mit Hilfe von molekulargenetischen Techniken manipuliert werden, so ist eine Vielzahl von Methoden zur Inaktivierung, Stilllegung oder Überexpremierung von Genen vorhanden.

1.5 Inositolphosphat-Stoffwechsel in *Dictyostelium discoideum*

Der komplexe Inositolphosphat-Stoffwechsel in *D. discoideum* ist trotz einer Vielzahl von Untersuchungen noch nicht vollständig aufgeklärt. Es konnten mindestens 25 verschiedene Inositolphosphate nachgewiesen werden (Van Haastert & Van Dijken 1997). Die Aufklärung des Inositolphosphat-Stoffwechsels in *D. discoideum* könnte, wegen der Ähnlichkeit von Dictyosteliden mit Tier- und Pflanzenzellen, auch die Aufklärung des Stoffwechsels bei Tieren und Pflanzen erleichtern. *D. discoideum* ist in der Lage *myo*-Inositol *de novo* zu synthetisieren. Dies haben Versuche gezeigt, bei denen die Zellen auf definierten, synthetischen Medien ohne *myo*-Inositol wuchsen (Franke & Kessin 1977). Durch die *myo*-Inositol 3-phosphat Synthase wird dabei aus Glucose 6-phosphat *myo*-Ins(3)P gebildet, das dann durch eine Monophosphatase zu *myo*-Inositol dephosphoryliert. Diese zweistufige *de novo*-Synthese stellt den einzig bekannten Weg für die Bildung von *myo*-Inositol dar. Durch Umsetzung von *myo*-Inositol mit CDP-Diacylglycerin kann Phosphatidylinositol (PtdIns) gebildet werden. Dieses wird dann weiter zu PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ phosphoryliert (Van der Kay *et al.* 1990). Das für die MIPS kodierende Gen wurde in unserem Arbeitskreis deletiert und die daraus resultierenden Inositol-auxotrophen Mutanten charakterisiert (Fischbach 2005). Die unter Entzug von *myo*-Inositol beobachteten

phänotypischen Veränderungen, wie eine Einstellung des Wachstums und morphologische Veränderungen, können dabei zumindest teilweise mit der Konzentrationsabnahme von Phospholipiden, wie PtdIns(4,5)P₂, erklärt werden. In Zellextrakten von *D. discoideum* wurden auch die **Inositolmonophosphate** Ins(1)P und Ins(4)P nachgewiesen. Sie gelten als Abbauprodukte höherphosphorylierter Inositolphosphate. Physiologische Funktionen konnten bisher noch nicht nachgewiesen werden. Bei den **Inositolbisphosphaten** konnten bisher Ins(1,4)P₂ und Ins(3,6)P₂ identifiziert werden. Ins(3,6)P₂ wird aus Ins(3)P gebildet und ist ein Intermediat der InsP₆-Biosynthese. Die Inositolbisphosphate Ins(1,4)P₂ und Ins(4,5)P₂ entstehen beim Abbau von Ins(1,4,5)P₃ durch eine 1- bzw. 5-Phosphatase (Van Lookeren Campagne *et al.* 1988). In *D. discoideum* konnten neben Ins(1,4,5)P₃ auch die **Inositoltrisphosphate** Ins(3,4,6)P₃, Ins(1,2,6)P₃, Ins(1,2,3)P₃ und Ins(1,2,4)P₃ nachgewiesen werden. Ins(1,4,5)P₃ ist an der Signaltransduktion beteiligt. Die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern durch Ins(1,4,5)P₃ konnte auch in *D. discoideum* beobachtet werden (Europe-Finner & Newell 1986). Unabhängig von der Bildung durch die Hydrolyse von PtdIns(4,5)P₂ existiert in *D. discoideum* ein zweiter Weg zur Bildung von Ins(1,4,5)P₃. Es konnte gezeigt werden, daß die Ins(1,4,5)P₃-Konzentration bei Mutanten mit fehlender PLC-Aktivität nicht signifikant abnimmt (Drayer *et al.* 1994; Van Dijken *et al.* 1995; Van Dijken *et al.* 1997). Bei diesem zweiten Weg wird Ins(1,4,5)P₃ durch Dephosphorylierung von Ins(1,3,4,5,6)P₅ über Ins(1,4,5,6)P₄ gebildet (Van Haastert & Van Dijken 1997). Eine Erklärung für die zwei voneinander unabhängigen Syntheserouten für Ins(1,4,5)P₃ bei Säugerzellen und *D. discoideum* gibt es bislang nicht. Ins(3,4,6)P₃ ist ein Metabolit der InsP₆-Biosynthese. Die Inositoltrisphosphate Ins(1,2,3)P₃, Ins(1,2,4)P₃ und Ins(1,2,6)P₃ entstehen *in vitro* bei der Dephosphorylierung von InsP₆ durch eine membrangebundene InsP₆-Phosphatase (Knipp 1996). Ins(1,2,6)P₃ (auch als α -Trinositol bezeichnet) kann zusätzlich auch noch über die Reaktion einer InsP₅/InsP₄-Phosphatase gebildet werden. Ins(1,2,6)P₃ zeigt ein breites pharmakologisches Wirkungsspektrum. So konnten in Tierversuchen z. B. entzündungshemmende und schmerzstillende Wirkungen festgestellt werden (Sirén 1991; Malmberg *et al.* 1995). Über die molekulare Wirkungsweise von α -Trinositol ist allerdings nichts bekannt. Trotz der vielversprechenden Ergebnisse in Tierversuchen ließ sich Ins(1,2,6)P₃ therapeutisch nicht nutzen. Die entsprechenden Projekte wurden eingestellt. **Inosoltetrakisphosphate** konnten nur in geringen Konzentrationen in *D. discoideum* nachgewiesen werden. Sie sind zumeist Zwischenprodukte die beim Auf- bzw. Abbau anderer Inositolphosphate gebildet werden, wie z. B. Ins(1,4,5,6)P₄, Ins(1,3,4,5)P₄, Ins(1,2,4,6)P₄, Ins(1,2,4,5)P₄ und Ins(1,2,3,4)P₄. Die letzteren vier entstehen beim Abbau von

InsP₆ durch eine membrangebundene InsP₆-Phosphatase und Ins(1,3,4,5)P₄ entsteht aus Ins(1,4,5)P₃ katalysiert durch eine Ins(1,4,5)P₃ 3-Kinase. In Säugetieren soll Ins(1,3,4,5)P₄ die Effektivität von Ins(1,4,5)P₃ bei der Ca²⁺-Freisetzung erhöhen, da es Ins(1,4,5)P₃ vor dem Abbau durch 5-Phosphatasen schützt, ob es in *D. discoideum* diese Funktion erfüllt ist unklar. Bei den **Inositolpentakisphosphaten** wurden Ins(1,2,4,5,6)P₅, Ins(1,2,3,4,6)P₅, Ins(1,2,3,4,5)P₅ und Ins(1,3,4,5,6)P₅ nachgewiesen. Im Zusammenhang mit Untersuchungen zum InsP₆-Stoffwechsel wurden zwei sogenannte futile Zyklen gefunden, bei denen es zu einem ständigen bisher unverstandenen Auf- und Abbau zwischen InsP₆ und den beiden Inositolpentakisphosphat-Isomeren Ins(1,2,3,4,6)P₅ und Ins(1,2,4,5,6)P₅ kommt. **Inositolhexakisphosphat** entsteht durch schrittweise Phosphorylierung über Ins(3)P, Ins(3,6)P₂, Ins(3,4,6)P₃, Ins(1,3,4,6)P₄ und Ins(1,3,4,5,6)P₅ (Stephens & Irvine 1990). Im Zellkern wurde ein zweiter Weg gefunden. Dieser führt über die Phosphorylierung von Ins(1,4,5)P₃, Ins(1,3,4,5)P₄, Ins(1,3,4,5,6)P₅ zu InsP₆ (Van der Kaay *et al.* 1995). In *D. discoideum* liegen die gefundenen InsP₆-Konzentrationen im Bereich zwischen 300 - 700 µM. Bei logarithmisch wachsenden Zellen beträgt die Konzentration 350 µM, während sie bei Erreichen der stationären Phase auf 700 µM ansteigt. Damit ist InsP₆ das häufigste Inositolphosphat in *D. discoideum*. Seine biologische Funktion in diesem Organismus ist allerdings noch nicht geklärt. Bei den **Diphosphoinositolphosphaten** handelt es sich um eine neue Klasse von Inositolphosphaten mit Phosphorsäureanhydrid-Bindungen. 1989 gab es, bei Untersuchungen zur Chemotaxis von *D. discoideum*, erstmalig Hinweise auf die Existenz von Inositolphosphaten, die mindestens eine Phosphatgruppe mehr als InsP₆ tragen müssen (Europe-Finner *et al.* 1989). Ein direkter Nachweis von „InsP₇“ und „InsP₈“ in *D. discoideum* gelang Mayr *et al.* 1992 (Mayr *et al.* 1992). Eine endgültige Strukturaufklärung erfolgte 1999 in unserem Arbeitskreis (Laußmann 1999). Es konnte gezeigt werden, daß es sich bei den gefundenen Diphosphoinositolphosphaten um D-6-Diphospho-*myo*-inositolpentakisphosphat (6-PP-InsP₅) und D-5,6-Bisdiphospho-*myo*-inosoltetrakisphosphat (5,6-bis-PP-InsP₄) handelt (Laußmann 1999). Die Diphosphoinositolphosphate sind nach InsP₆ die häufigsten Inositolphosphate in *D. discoideum* und konnten in Abhängigkeit von der Wachstumsphase, den Wachstumsbedingungen und der Differenzierungsphase in Konzentrationen von 10 - 300 µM nachgewiesen werden (Laußmann 1999). Nach ihrer Entdeckung in *D. discoideum* wurden Diphosphoinositolphosphate auch in verschiedenen Zelltypen anderen Organismen beschrieben. So wurden diese Verbindungen in Säugerzellen (Albert *et al.* 1997), Hefen (Ali *et al.* 1995) und auch Pflanzenzellen (Brearley & Hanke 1996) nachgewiesen. Offenbar

handelt es sich um eine ubiquitär verbreitete Klasse von Inositolphosphaten. Ihre physiologische Bedeutung ist jedoch weitgehend unbekannt.

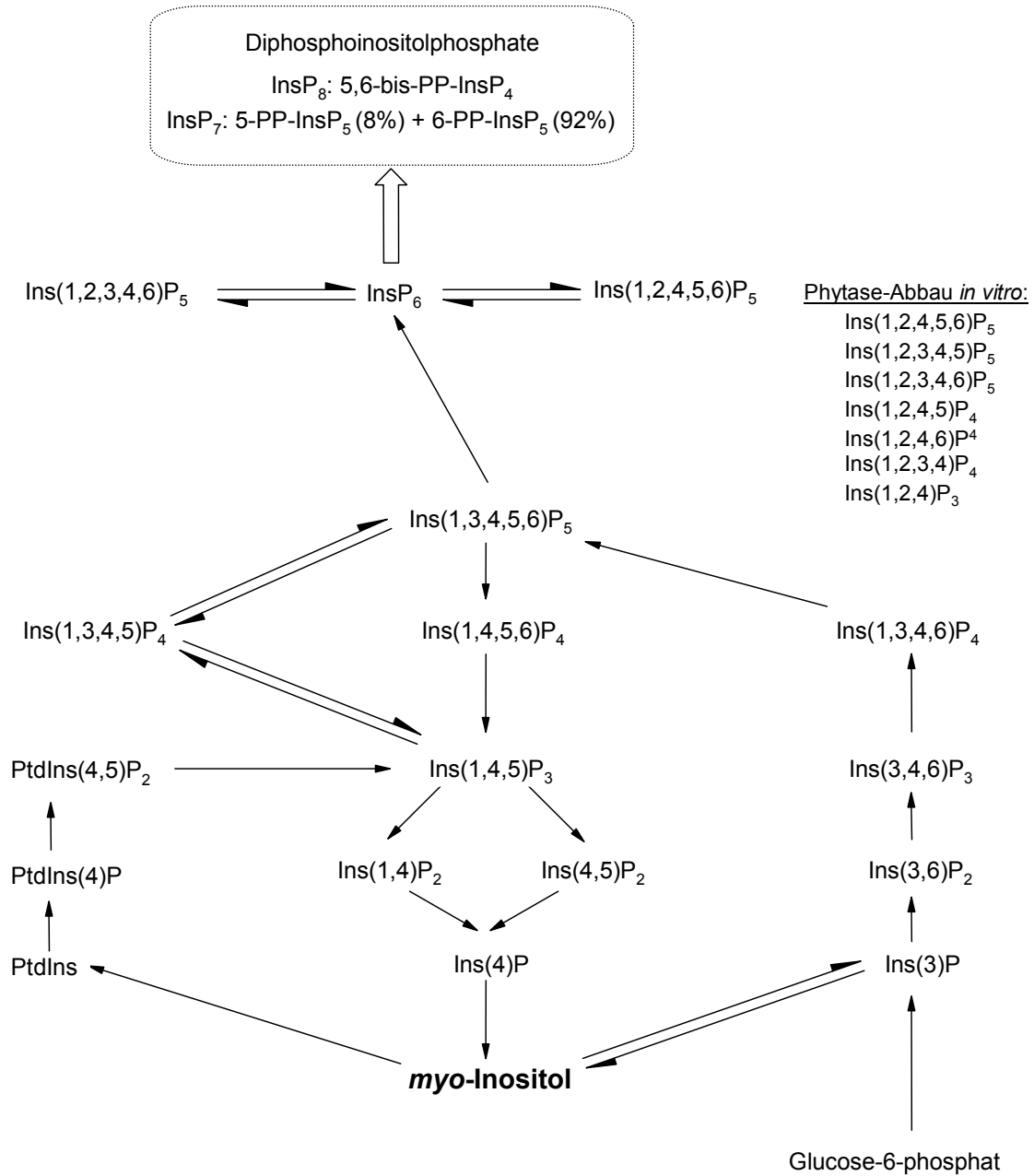


Abbildung 12: Modell des Inositolphosphat-Stoffwechsel in *D. discoideum*.

1.6 Zielsetzung

Trotz der Vielfalt an Inositolphosphaten, die Zellen eukaryontischen Ursprungs auftreten, gelingt eine Entschlüsselung der physiologischen Bedeutung einzelner Isomere nur zögerlich. Dabei wurden keine Anstrengungen gescheut, um Enzyme zu identifizieren, die Inositolphosphate metabolisieren. *D. discoideum* erscheint aufgrund vieler Kriterien ein geeignetes Untersuchungsobjekt zu sein. So existiert ein komplexer Inositolphosphat-Stoffwechsel, der dem höher entwickelter Eukaryonten ähnelt und die Zellen sind in relativ kurzer Zeit in großer Menge verfügbar.

Die Schwerpunktthemen in der vorliegenden Arbeit sind:

- Anreicherung und Charakterisierung einer *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase

Myo-Inositol ist die zentrale Vorstufe bei der Biosynthese von Phospholipiden und Inositolphosphaten. Die Dephosphorylierung von *D*-*myo*-Ins(3)P zu *myo*-Inositol durch die *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase stellt die einzig bekannte Quelle für *myo*-Inositol dar. In *D. discoideum* wurden mehrere Enzymaktivitäten beschrieben, die Inositolmonophosphate hydrolysieren (Van Dijken *et al.* 1996). Eine von ihnen weist Ähnlichkeiten mit einer IMPase auf. Durch deren Reinigung und Charakterisierung soll geklärt werden ob es sich bei einer dieser Enzymaktivität um eine *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase handelt und ob deren Charakteristika denen vergleichbarer Enzyme von Säugerzellen entsprechen.

- Identifizierung von Inositoltrisphosphat Phosphatasen

In *D. discoideum* konnten bisher keine Inositolpolyphosphat 1-Phosphatasen, 4-Phosphatasen oder 3-Phosphatasen nachgewiesen werden und es fehlen Informationen über andere Aktivitäten, die zum Abbau von auftretenden Inositoltrisphosphat-Isomeren wie z. B. Ins(1,2,6)P₃/Ins(2,3,4)P₃, Ins(1,2,3)P₃, Ins(3,4,6)P₃ (bzw. Ins(2,4,5)P₃) und Ins(1,2,4)P₃/Ins(2,3,6)P₃, dienen. Zur Vervollständigung des Bildes über den Inositolphosphatstoffwechsel in *D. discoideum* wurde daher das cytosolische Extrakt auf eventuell vorhandene Inositoltrisphosphat Phosphatase-Aktivitäten hin untersucht.

- Anreicherung und Charakterisierung einer Inositolpentakis-/Inosoltetrakisphosphat Phosphatase

Bei Untersuchungen zum Metabolismus von internalisiertem InsP₆ wurde eine Enzymaktivität gefunden, die eine Reihe von InsP₅- und InsP₄-Isomeren zu InsP₃-Isomeren dephosphoryliert (Adelt 1999). Das Enzym zeigt ein ungewöhnlich breites Substratspektrum und kann, mit Ausnahme von Position 2, alle Positionen am *myo*-Inositolring dephosphorylieren. Die Reinigung des Enzyms, sowie eine anschließende Sequenzierung und die Isolierung eines

cDNA-Klons wäre eine Möglichkeit zur Klärung der Funktionen der von dieser InsP₅-/InsP₄-Phosphatase umgesetzten Substrate und den entsprechenden Reaktionsprodukten. Versuche zur Anreicherung dieser InsP₅-/InsP₄-Phosphatase über den ersten Anreicherungsschritt hinaus waren in unserem Arbeitskreis bislang nicht erfolgreich. Durch Einsatz von Stabilisatoren und neuer Aufreinigungsverfahren sollte das Enzym aufgereinigt und charakterisiert werden.

- Eine membrangebundene Phytase aus *D. discoideum*

In *D. discoideum* ist Inositolhexakisphosphat das häufigste Inositolphosphat, doch dessen biologische Funktion ist noch nicht geklärt. Durch Aufreinigung und Charakterisierung der am InsP₆-Stoffwechsel beteiligten Enzyme könnten Informationen über mögliche Funktionen von InsP₆ gewonnen werden. In *D. discoideum* existiert eine membrangebundene InsP₆-Phosphatase, die bevorzugt Phosphatgruppen in den Positionen 3, 5 und 6 abspaltet. Mit konventionellen Anreicherungsverfahren war eine Aufreinigung über die ersten zwei Chromatographieschritte hinaus nicht möglich. Daher sollten neue Strategien zur Anreicherung erprobt werden. Der Schwerpunkt lag dabei auf affinitätschromatographischen Verfahren. Daneben sollte die Frage geklärt werden, wie das Enzym in der *D. discoideum* Membran verankert ist.

- Chemoenzymatische Synthese von enantiomerenreinen Inositolphosphaten

Das große Interesse am Inositolphosphat-Stoffwechsel macht die Synthese von isomeren- und enantiomerenreinen Inositolphosphaten nötig, z. B. als Referenzverbindungen. Die chemischen Synthesen von Inositolphosphaten beinhalten das Einführen und die Entfernung von Schutzgruppen und die Reaktionsbedingungen erfordern teilweise hohe Temperaturen oder Drücke. Die Kenntnisse über die Substrat- und Stereospezifität von Inositolphosphat-Phosphatasen kann zur enzymunterstützten Synthese von enantiomerenreinen Inositolphosphaten ausgenutzt werden. Die Vorteile liegen dabei in der hohen Spezifität der Enzyme und den milden Reaktionsbedingungen.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Anreicherung und Charakterisierung einer *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase

Die Dephosphorylierung von D-*myo*-Ins(3)P durch eine spezifische Phosphatase stellt die einzige bekannte interne Quelle für *myo*-Inositol dar, der zentralen Vorstufe bei der Biosynthese von Phospholipiden und Inositolphosphaten. Die *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase ist damit ein Schlüsselenzym im Phospholipid-/Inositolphosphat-Stoffwechsel, da ohne *myo*-Inositol dieser Stoffwechsel nicht aufrecht erhalten werden kann. In *D. discoideum* wurden mehrere Enzymaktivitäten gefunden, die in der Lage sind Inositolmonophosphate zu hydrolysieren. Eine dieser Aktivitäten wies Ähnlichkeiten mit der *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase aus Säugetieren auf (Van Dijken *et al.* 1996). Inwieweit es sich bei diesem Enzym wirklich um eine *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase handelt und ob deren Eigenschaften mit denen anderer Zelllinien vergleichbar sind, sollte durch die Anreicherung und Charakterisierung des Enzyms geklärt werden.

2.1.1 Aktivitätsbestimmung

Die *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase katalysiert die Dephosphorylierung von Inositolmonophosphaten zu freiem *myo*-Inositol und anorganischen Phosphat. Sowohl das Edukt als auch die beiden Produkte lassen sich gut quantifizieren und wurden zum Nachweis der Enzymaktivität benutzt. Als Substrat wurde in den Aktivitätstests D-*myo*-Ins(3)P in einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt, ein Wert der sich aus Vorversuchen ergab. Dank der Kooperation mit der Organischen Chemie der Universität Wuppertal stand die Verbindung in ausreichender Menge zur Verfügung. Die Reinheit der zur Verfügung gestellten Substanz reichte allerdings für biochemische Zwecke nicht aus. Die Verunreinigungen lagen nach NMR-Messungen im Bereich zwischen 30 - 35 % und störten bei den Aktivitätstests. Mit der Hochleistungsionenchromatographie mit Leitfähigkeitsdetektion (HPIC-CD) stand eine Methode zur Verfügung, die sowohl für die Analytik von Inositolmonophosphaten als auch für ihre Aufreinigung geeignet war. Das *myo*-Ins(3)P wurde durch Chromatographie an einer IonPac[®] AG11-HC aufgereinigt. Das Ergebnis der Aufreinigung ist in Abbildung 13 dargestellt, als einzige nennenswerte Verunreinigung ist noch Chlorid zu erkennen, welches allerdings die Verwendung des *myo*-Ins(3)P in keiner Weise einschränkte.

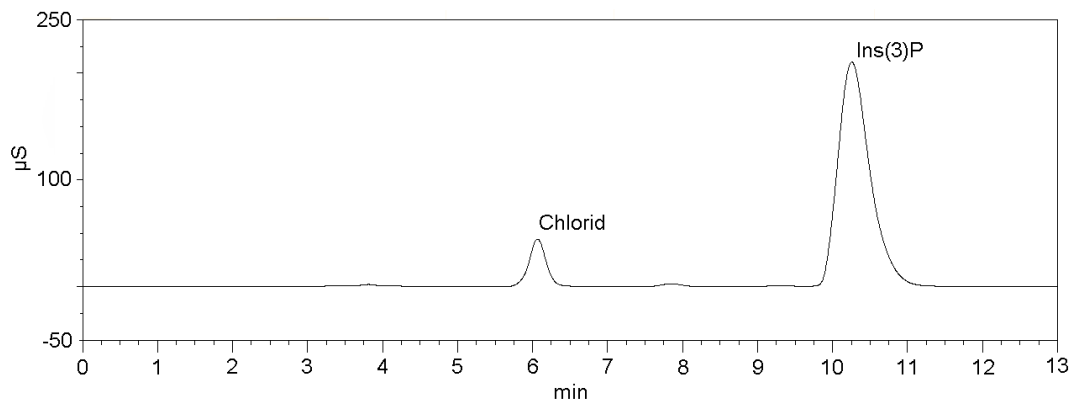


Abbildung 13: Reinheitskontrolle des für die Aktivitätstests eingesetzten *myo*-Ins(3)P nach erfolgter Aufreinigung über eine IonPac® AG11-HC.

Für die Bestimmung der Enzymaktivität standen die folgenden drei Methoden zur Verfügung: a) photometrische Bestimmung des durch die enzymatische Reaktion freigesetzten Phosphates, b) Quantifizierung der Änderung der Inositolmonophosphate (z. B. Ins(3)P) durch HPIC-CD und c) Quantifizierung der Änderung des Produktes, *myo*-Inositol, durch Hochleistungionenchromatographie mit integrierter amperometrischer Detektion (HPIC-IPAD).

Die einfachste Methode zur Bestimmung der Enzymaktivität ist die Quantifizierung der enzymatisch freigesetzten Phosphatmenge. Der Test ist auf einer Mikrotiterplatte durchführbar, im Bereich 0 - 4 nmol Phosphat linear und liefert schnell präzise Ergebnisse. Ist eine photometrische Bestimmung der Aktivität der *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase nicht möglich, z. B. aufgrund der hohen Konzentrationen an freiem Phosphat im Rohextrakt, wurde auf eine Aktivitätsbestimmung mit Hilfe der chromatographischen Verfahren (HPIC-CD und HPIC-IPAD) zurückgegriffen.

Zur Bestimmung von niedrigphosphorylierten Inositolphosphaten (InsP_x mit $x \leq 3$) eignet sich die HPIC mit Leitfähigkeitsdetektion. Für die Aktivitätstests wurde ein für die Trennung von Inositolmono- und Inositolbisphosphaten optimiertes Trennsystem verwendet. Die Nachweisgrenze für Inositolmonophosphate lag bei ca. 50 pmol. Ein Nachteil dieses Aktivitätstests ist, daß eine Konzentrationsabnahme bestimmt wird. Besonders bei geringen Umsätzen führt dies zu Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Enzymaktivitäten. Die im Rohextrakt vorkommenden hochphosphorylierten Inositolphosphate (InsP_x mit $x \geq 4$) können mit dem verwendeten System nicht eluiert werden und müssen daher vorher entfernt werden. Zusätzlich enthalten die Zellen eine große Anzahl von niedrig geladenen Verbindungen mit ähnlichen Retentionszeiten, die die Analytik erschweren. Eine Bestimmung der

IMPase-Aktivität im Rohextrakt ist daher nicht ohne weiteres möglich, sondern erfordert eine aufwendige Probenvorbereitung.

Für die Entwicklung eines Enzymtests der auf der Quantifizierung von *myo*-Inositol beruht mußte zuerst eine geeignete Analytik für *myo*-Inositol etabliert werden. Häufig wird zur Analytik von *myo*-Inositol die Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC-MS) eingesetzt. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die erforderliche Derivatisierung der nichtflüchtigen Cyclitole, verläuft dieser Schritt nicht quantitativ so ist die Analytik mit großen Fehlern behaftet. Eine andere Möglichkeit ist die Trennung von Cyclitolen durch Anionenaustauscherchromatographie gekoppelt mit amperometrischer Detektion. Die amperometrische Detektion wird im allgemeinen für die Analyse von Ionen mit pK-Werten größer sieben eingesetzt, die aufgrund ihrer geringen Dissoziation über die Leitfähigkeit nicht oder nur sehr unempfindlich detektiert werden können und ist damit ideal für die Bestimmung von Cyclitolen wie *myo*-Inositol. Ein Problem bei der Ionenchromatographie von *myo*-Inositol ist die geringe Affinität von *myo*-Inositol zu den normalerweise in der Zuckanalytik eingesetzten stationären Phasen. Es wird eine stationäre Phase benötigt, die über eine große Kapazität und eine ausreichende Hydrophobie verfügt. Der hydrophobe Charakter einer stationären Phase verstärkt die an sich geringen Wechselwirkungen zwischen *myo*-Inositol und der stationären Phase und trägt so zu einer stärkeren Retardierung bei. Mit der CarboPac[®] MA1 stand eine Säule zur Verfügung deren stationäre Phase diese Eigenschaften aufweist und eine Analytik des *myo*-Inositols erlaubt. Die HPIC-IPAD ist sehr empfindlich und besitzt einen großen dynamischen Bereich. Das Verfahren ist zwischen 50 und 1000 pmol *myo*-Inositol linear und die Nachweisgrenze für *myo*-Inositol liegt bei ca. 5 pmol. Die Proben werden durch eine einfache Behandlung mit einem Mischbettionenaustauscher für die Analyse vorbereitet und das Verfahren eignet sich sogar für eine Bestimmung der IMPase-Aktivität im Rohextrakt (Abbildung 14).

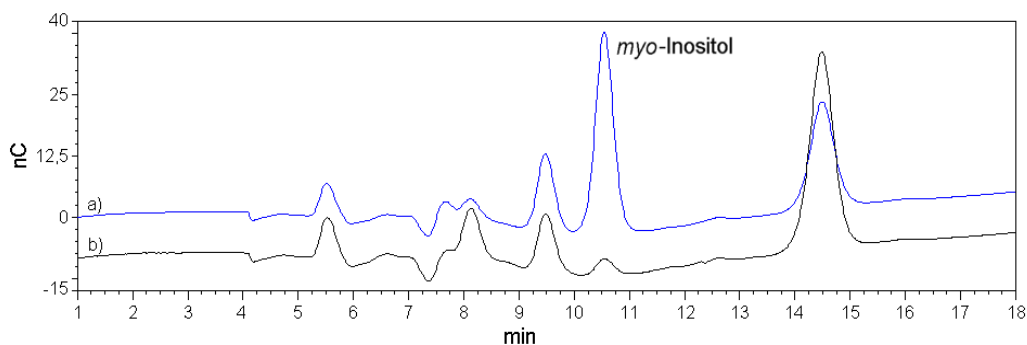


Abbildung 14: Beispielchromatogramme eines nach 3.6.1 bearbeiteten Enzymtests aufgenommen über HPIC-IPAD. Gezeigt ist a) das Elutionsprofil für 60 Minuten- und b) für 0 Minuten-Inkubationsdauer.

Deswegen und aufgrund seiner Empfindlichkeit, der einfachen Probenvorbereitung und der relativ schnellen Analysezeit wurde die HPIC-IPAD als Methode zur Aktivitätsbestimmung der Leitfähigkeitsdetektion vorgezogen. Da die IMPase durch Mg^{2+} in millimolaren Konzentrationen aktiviert wird, enthielt der Testansatz 5 mM $MgCl_2$. Die Enzymaktivitäten verhielten sich unter den gewählten Bedingungen im Anfangsbereich linear in Abhängigkeit von der Zeit und der Proteinkonzentration (Abbildung 15).

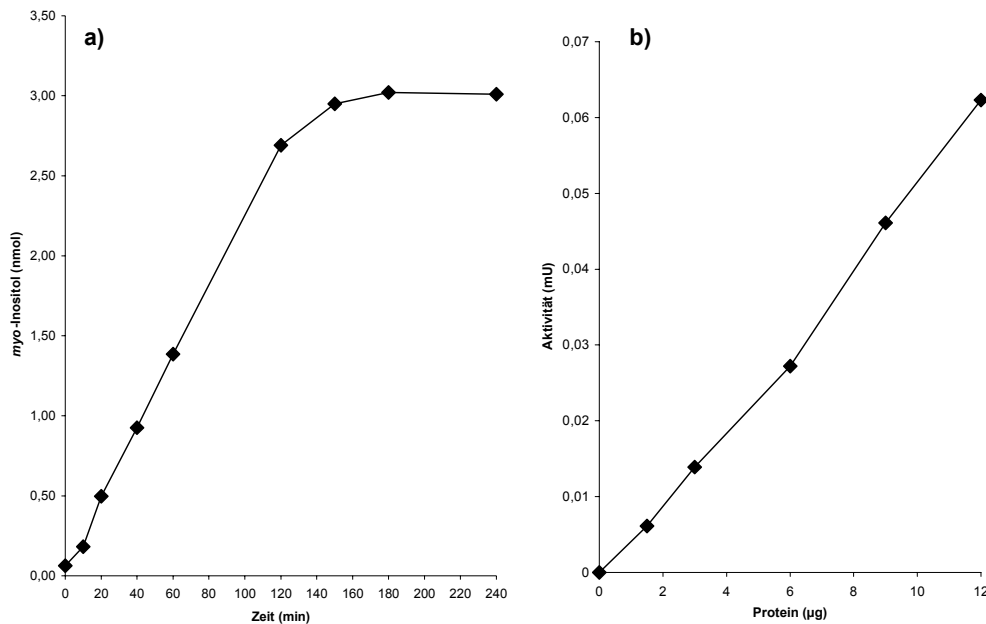


Abbildung 15: Abhängigkeit der IMPase-Aktivität von der Inkubationszeit (a) und der Proteinmenge (b) (Testbedingungen: 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM $MgCl_2$ bei RT. Die Proteinkonzentration in a) betrug 0,12 mg/mL und die Inkubationszeit bei b) 90 min.).

Durch die Kombination der Verfahren HPIC-CD und HPIC-IPAD kann eine Bilanz für die von der *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase katalysierten Dephosphorylierung von Ins(3)P aufgestellt werden. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Menge an gebildetem *myo*-Inositol der Menge an dephosphorylierten Ins(3)P entspricht, da während der Reaktion die Summe aus Ins(3)P und *myo*-Inositol nahezu konstant bleibt (Abbildung 16).

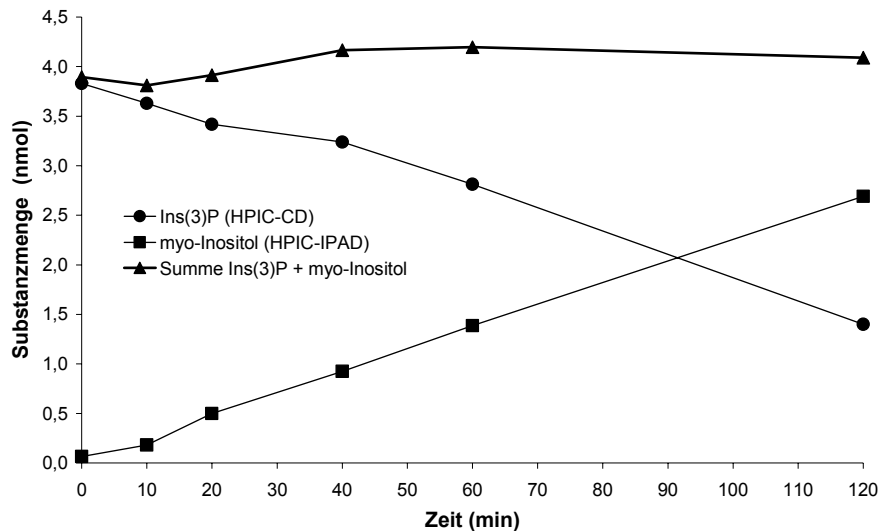


Abbildung 16: Bilanz der Dephosphorylierung von Ins(3)P durch die IMPase (Testbedingungen: 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂ bei RT. Die Proteinkonzentration betrug 0,1 mg/mL. Es wurden zu jedem Zeitpunkt zwei Proben entnommen, die dann jeweils per HPIC-CD und HPIC-IPAD analysiert wurden.).

2.1.2 Anreicherung der *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase

Die Zellen von *D. discoideum* wurden in axenischem Medium angezogen und bei einer Zelldichte von $7 \cdot 10^6$ bis $1,2 \cdot 10^7$ Zellen/mL geerntet. Es wurde ein einfacher Zellaufschluß verwendet, der die Zellen durch Zyklen von Einfrieren und Auftauen lysiert. Der Überstand nach der Ultrazentrifugation enthielt die gesuchte Enzymaktivität, in dem die Membranen und Organellen enthaltenen Sediment konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Damit handelt es sich bei der *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase um ein lösliches Enzym. In der Literatur ist beschrieben, daß die *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatasen zu Bildung von Enzymaggregaten neigen und das diese Aggregatbildung durch Zusatz von Dithiothreitol (DTT) unterbunden werden kann (Meek *et al.* 1988), deshalb enthalten alle zur Aufreinigung verwendeten Puffer 1 mM DTT, außer bei der Chromatofokussierung.

2.1.2.1 Chromatographie an Q-Sepharose

Für den ersten Reinigungsschritt wurde eine Q-Sepharose-(fast-flow) Säule eingesetzt. Dies erlaubt die Verwendung hoher Flußraten und damit großer Probenvolumina. Bei dem verwendeten pH-Wert von 7,7 bindet das Enzym an das Säulenmaterial, nichtbindende Enzyme wurden mit dem Startpuffer von der Säule gewaschen und die IMPase konnte mit 100 mM NaCl eluiert werden. Die Fraktion enthielt 50 % der Gesamtaktivität und es wurde ein 3,5fache Anreicherung erzielt. Die Enzymlösung konnte bei 0 °C für mehrere Tage ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

2.1.2.2 Chromatographie an MonoQ

Die aktive Fraktion von der Q-Sepharose wurde nach Verdünnung auf eine MonoQ Säule aufgetragen. Da die Kapazität der verwendeten Säule beschränkt war konnten nur Proben aufgetragen werden, deren Proteinmenge 25 mg nicht überschritt. Dadurch war es notwendig die aktive Fraktion der Q-Sepharose Säule aufzuteilen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Natriumchlorid-Gradienten (30 - 120 mM NaCl). Das Aktivitätsmaximum liegt zwischen 100 und 110 mM NaCl in einem Bereich mit nur geringer Proteinkonzentration (Abbildung 17). Bezogen auf den ersten Reinigungsschritt wird eine 6fache Anreicherung bei einer Ausbeute von 25 % erreicht. Bezogen auf den cytosolischen Extrakt bedeutet dies eine 20fache Anreicherung und eine Ausbeute von 12 %. Die erhaltene Enzympräparation kann über mehrere Tage bei 0 °C ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

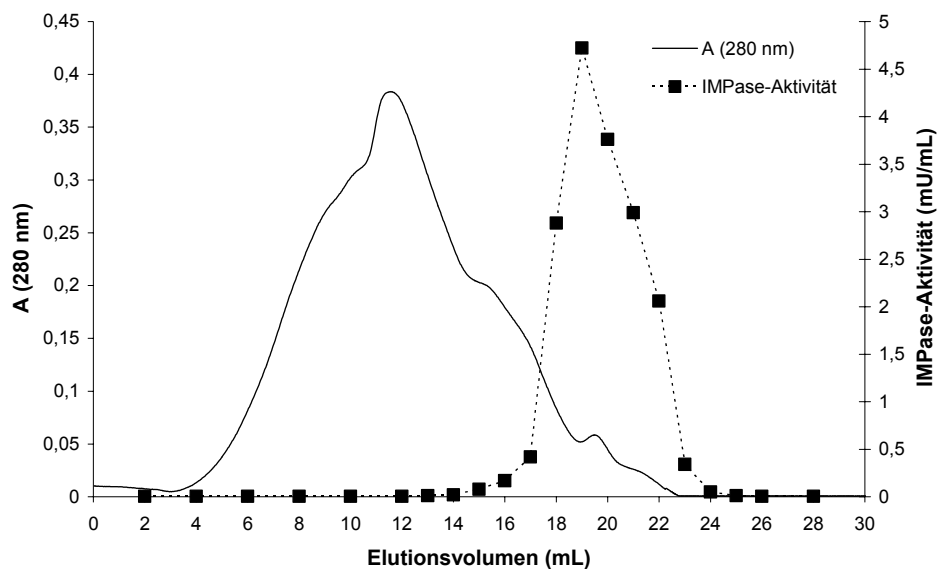


Abbildung 17: Elutionsprofil der Chromatographie an MonoQ (1 mL-Säule; 30 - 120 mM NaCl in 40 mM Tris/HCl (pH 7,7), 0,8 mM DTT, 30 mM NaCl; Flußrate: 2 mL/min).

2.1.2.3 Chromatofokussierung an PBE 94

Die Chromatofokussierung trennt Proteine nach ihren isoelektrischen Punkten. Bei dieser Technik wird ein pH-Gradient ausgenutzt, der entsteht, wenn eine in Startpuffer äquilibrierte Ionenaustauschersäule mit einem Elutionspuffer eluiert wird. Der pH-Wert des Elutionspuffers muß dabei kleiner sein als der des Startpuffers. Die Trennleistung dieser Methode ist sehr hoch. So werden Proteine getrennt, deren isoelektrische Punkte sich nur durch 0,05 pH-Einheiten unterscheiden.

Die vereinigten, aktiven Fraktionen der MonoQ Säule wurden umgepuffert und die Probe anschließend mit Stickstoff entgast. Nach dem Auftragen wurde mit Polybuffer® 74 eluiert und 3 mL-Fractionen aufgefangen (Abbildung 18). Von der aufgetragenen Aktivität konnten 95 % in dem Bereich von pH 5,1 bis pH 4,8 eluiert werden, dabei wurde eine 12fache Anreicherung erzielt.

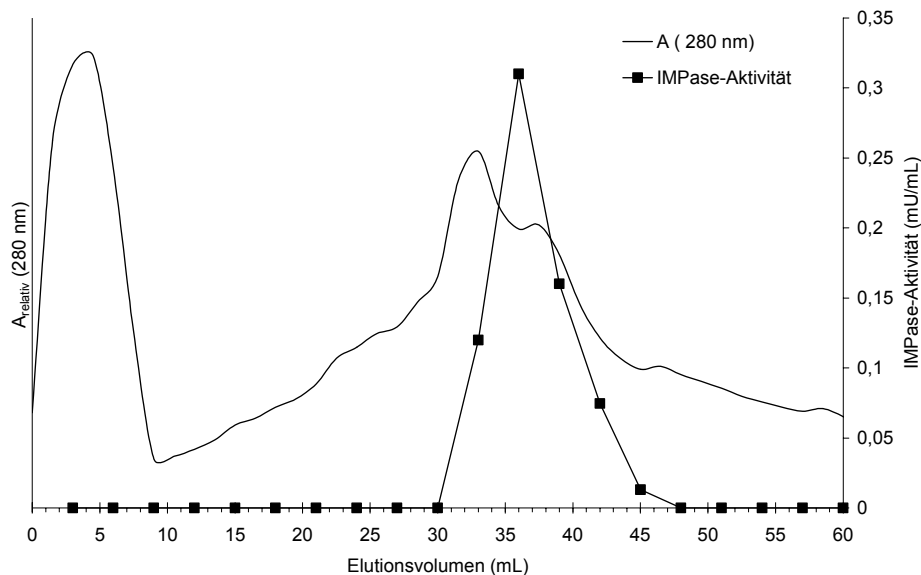


Abbildung 18: Elutionsprofil der Chromatofokussierung an PBE 94 (10 mL-Säule; pH 7,0 bis pH 4,0; Flußrate: 1 mL/min).

2.1.2.4 Gelfiltration an Superdex 200 HR

Die durch Chromatofokussierung erhaltene Enzympräparation wurde anschließend durch Gelfiltration weiter gereinigt. Die vereinigten, aktiven Fraktionen der Chromatofokussierung wurden aufkonzentriert und auf eine HPLC-Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) aufgetragen. Es wurden 15 % der aufgetragenen Aktivität bei einer 8fachen Anreicherung wiedergewonnen (Abbildung 19).

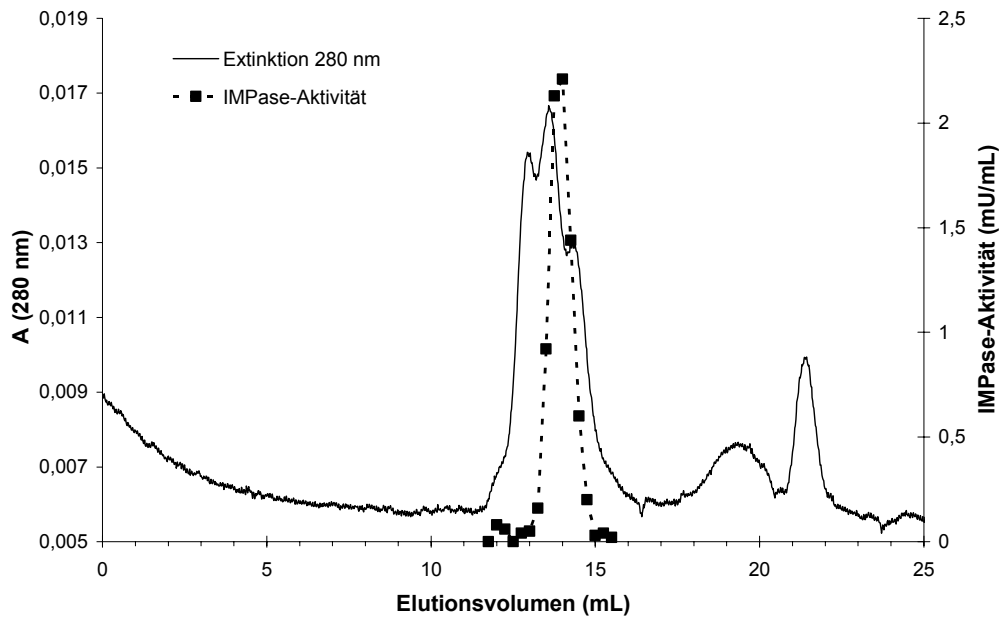


Abbildung 19: Elutionsprofil der Gelfiltration an Superdex 200 HR (24 mL-Säule; Elutionspuffer: 40 mM Bis-Tris (pH 7,0), 50 mM NaCl, 1 mM DTT; Flußrate: 0,5 mL/min).

2.1.2.5 Stabilität und Aufbewahrung

Die durch Gelfiltration gewonnenen Enzympräparationen sind 1 - 2 Tage auf Eis stabil, Einfrieren bei $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Gegenwart von 20 % Glycerin führt zu einem 40 - 50%igen Verlust der Aktivität.

2.1.2.6 Zusammenfassung der Anreicherung

Die einzelnen Schritte der Anreicherung sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Ergebnisse der SDS-PAGE der aktiven Fraktionen des jeweiligen Reinigungsschritts zeigt Abbildung 20. Die Proteinbanden wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Ein Vergleich mit Abbildung 22 zeigt, daß es sich bei der Proteinbande bei 36 kDa um die IMPase handelt. Die Anreicherung der *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase läßt sich auch in der Gelelektrophorese anhand der Bandenintensität bei 36 kDa gut nachvollziehen.

Reinigungsstufe	Gesamtprotein (mg)	spez. Aktivität (mU/mg)	Gesamt- aktivität (mU)	Anreicherung	Ausbeute (%)
Cytosol	360	1,2	448	1	100
Q-Sepharose	53,6	4,2	225	3,5	50
MonoQ	2,34	24	56	20	12
Chromatofokussierung	0,19	279	53	233	12
Gelfiltration	0,0035	2120	7	1767	2

Tabelle 1: Repräsentativ ist eine Zusammenfassung der Reinigungsschritte der IMPase gezeigt. Alle Werte beziehen sich auf $1,2 \cdot 10^{10}$ *D. discoideum* Zellen als Ausgangsmaterial.

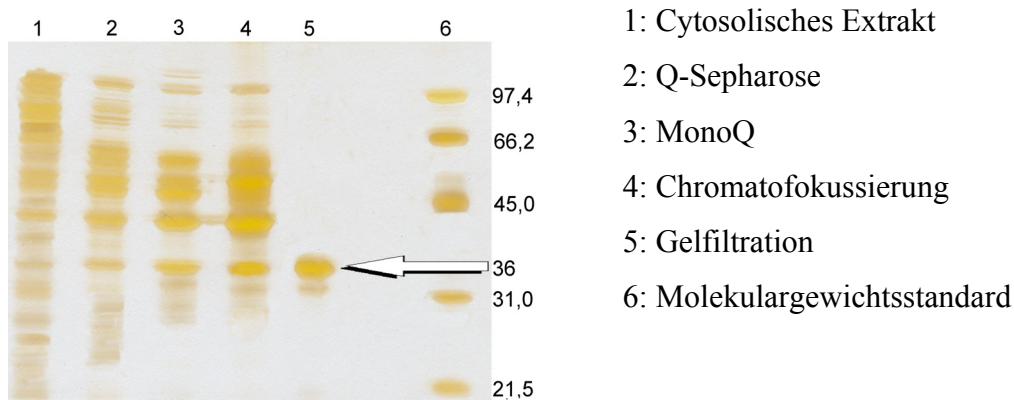


Abbildung 20: SDS-PAGE (Gradient mit 5 - 15 % Quervernetzung, Silberfärbung).

2.1.3 Eigenschaften der *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase

2.1.3.1 Molekulargewicht

Das Molekulargewicht der nativen *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase wurde im Rahmen der Aufreinigung durch Gelfiltration an Superdex 200 HR bestimmt und beträgt 70 kDa. Das Elutionsprofil der Gelfiltrationssäule ist in Abbildung 21 dargestellt.

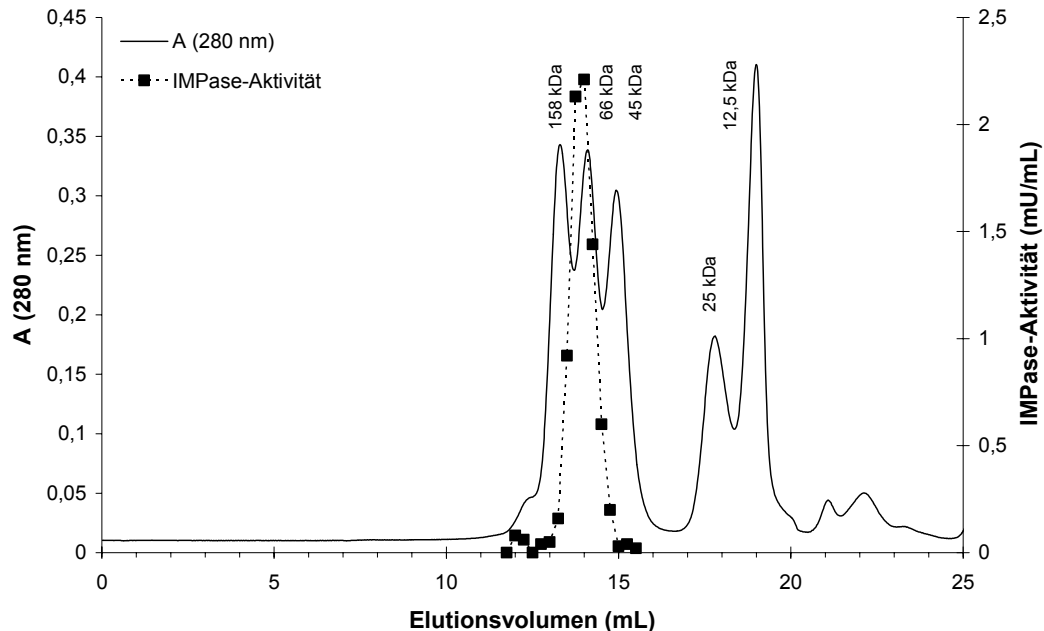


Abbildung 21: Ermittlung der Molmasse des nativen Enzyms durch Gelfiltration an Superdex 200 HR (Die Bestimmung erfolgte im Rahmen der Proteinanreicherung.).

Die Abbildung 22 zeigt das Ergebnis der SDS-PAGE der aktiven Fraktionen der Gelfiltration. Es ist nur eine Bande bei einem Molekulargewicht von 36 kDa zu erkennen. Der Vergleich

mit der Molmasse des nativen Enzyms zeigt, daß es sich bei der *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase um ein Homodimer handelt.

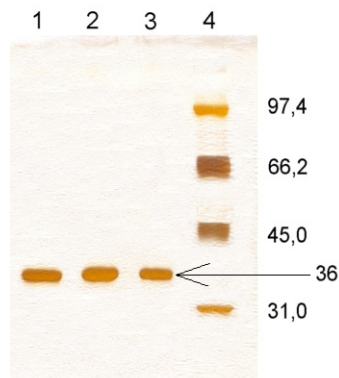


Abbildung 22: SDS-PAGE (Gradient mit 5 - 15 % Quervernetzung, Silberfärbung) zu Abbildung 21. 1 – 3 aktive Fraktionen der Gelfiltration, 4 Molekulargewichtsstandard.

2.1.3.2 Isoelektrischer Punkt

Der isoelektrische Punkt der *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase wurde durch Chromatofokussierung bestimmt und liegt bei $4,95 \pm 0,05$ (Abbildung 23). Da die meisten cytosolischen Proteine in *D. discoideum* einen leicht sauren isoelektrischen Punkt aufweisen, ist der gefundene Wert nicht ungewöhnlich.

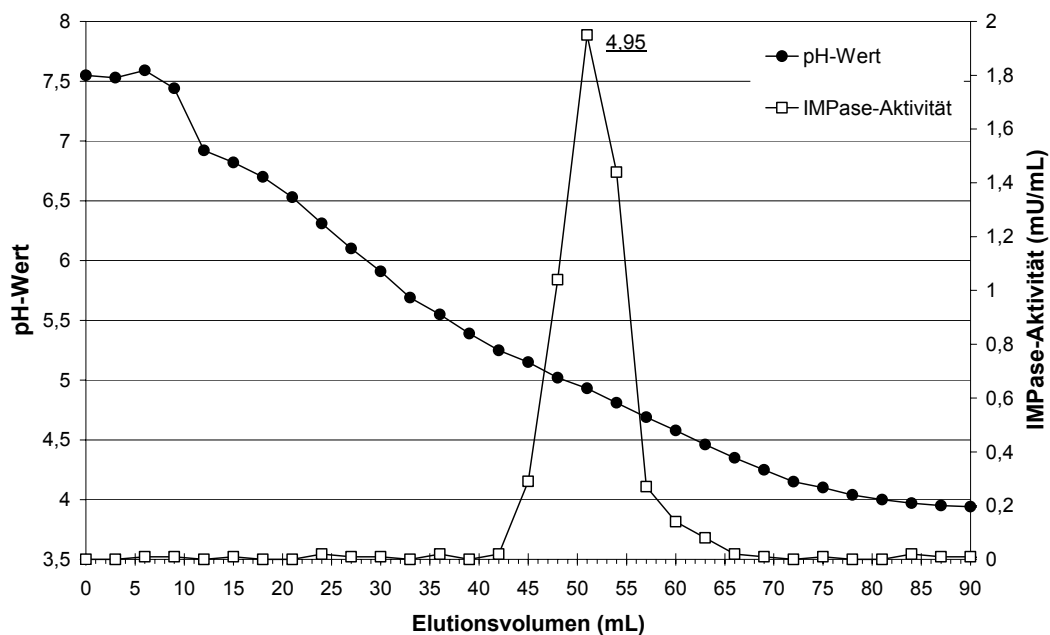


Abbildung 23: Bestimmung des isoelektrischen Punktes der IMPase durch Chromatofokussierung (Die Bestimmung erfolgte im Rahmen der Proteinanreicherung.).

2.1.3.3 Einfluß von Metallionen

Myo-Inositolmonophosphat Phosphatasen benötigen in der Regel Mg^{2+} für ihre enzymatische Aktivität. Zusätzlich wurden noch Mn^{2+} , Ca^{2+} und Co^{2+} getestet, zweiwertige Metallionen deren Einfluß auf die Aktivität von *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatasen in einigen Fällen beschrieben wurde. In Abwesenheit von Mg^{2+} ist keine enzymatische Aktivität nachweisbar, die maximale Aktivität wurde für 5 mM Mg^{2+} bestimmt, bei Konzentrationen über 5 mM treten inhibitorische Effekte auf (Abbildung 24). Die enzymatische Aktivität der IMPase aus *D. discoideum* ist demnach ebenfalls abhängig von Mg^{2+} .

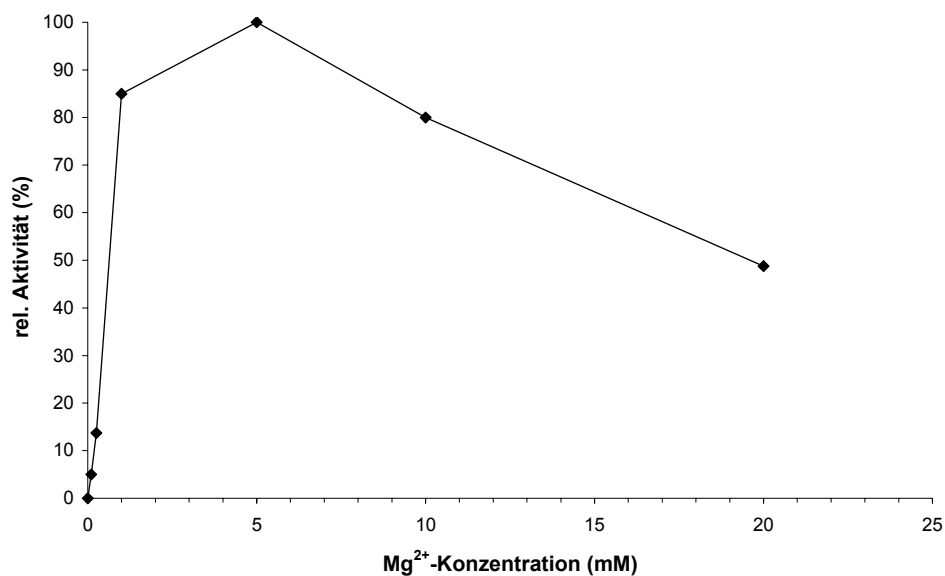


Abbildung 24: Abhängigkeit der IMPase-Aktivität von Mg^{2+} (Testbedingungen: 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,5) bei RT. Es wurde eine, durch Chromatographie an Mono Q, angereicherte Enzympräparation verwendet.).

Der Einfluß der anderen Kationen auf die enzymatische Aktivität wurde in Gegenwart von optimalen Mg^{2+} -Konzentrationen getestet. In allen Fällen wurden inhibitorische Wirkungen beobachtet. Zur Quantifizierung dieser Wirkung wurde für Calcium, Cobalt und Mangan die molare Inhibitorkonzentration $[I]_{50}$, welche die Reaktionsgeschwindigkeit V_0 der nicht inhibierten Reaktion unter gegebenen Reaktionsbedingungen halbiert, bestimmt (Kulhavý *et al.* 2002). In Tabelle 2 sind die $[I]_{50}$ -Werte der Metallionen zusammengefaßt. Der effektivste Inhibitor ist Mn^{2+} mit einem $[I]_{50}$ von 57 μ M. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu früheren Beobachtungen bei IMPasen (Kabasawa *et al.* 1974). Bei einigen IMPasen kann Mn^{2+} sogar die Aktivierung durch Mg^{2+} teilweise ersetzen und wirkt dann erst bei höheren Konzentrationen als Inhibitor (Eisenberg 1967; Naccarato *et al.* 1974; Kabasawa *et al.* 1974). Die starke inhibitorische Wirkung von Mn^{2+} läßt sich unter Umständen zur Beeinflussung des

Inositolphosphat-Stoffwechsels in *D. discoideum* ausnutzen. Durch Zugabe von Mn^{2+} in das Nährmedium ließe sich gezielt die Dephosphorylierung von Ins(3)P unterbinden und möglichen Auswirkungen auf den Inositol-Pool untersuchen. Voraussetzung ist neben der Aufnahme, daß die Mn^{2+} -Zugabe keine weiteren negativen Einflüsse auf die Zellen hat. Die Metallionen Co^{2+} und Ca^{2+} zeigen zwar ebenfalls eine inhibitorische Wirkung, sind aber weitaus schwächer.

Metallion	$[I]_{50}$
Mn^{2+}	57 μM
Co^{2+}	450 μM
Ca^{2+}	1,12 mM

Tabelle 2: $[I]_{50}$ -Werte für verschiedene Metallionen in Bezug auf die Mg^{2+} -aktivierte IMPase (Testbedingungen: 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM $MgCl_2$ bei RT. Es wurde eine, durch Chromatographie an Mono Q, angereicherte Enzympräparation verwendet.).

2.1.3.4 pH-Abhängigkeit

Für die Bestimmung der pH-Abhängigkeit wurde das Enzym in verschiedenen Pufferlösungen zwischen pH 4 und pH 9,5 aufgenommen und die Aktivität durch photometrische Bestimmung des freigesetzten Phosphates bestimmt. Die graphische Darstellung zeigt einen glockenförmigen Verlauf der Aktivität mit einem ausgeprägten Maximum bei pH 7,5 (Abbildung 25). Das leicht basische pH-Optimum deutet auf eine Beteiligung von basischen Aminosäuren im aktiven Zentrum hin.

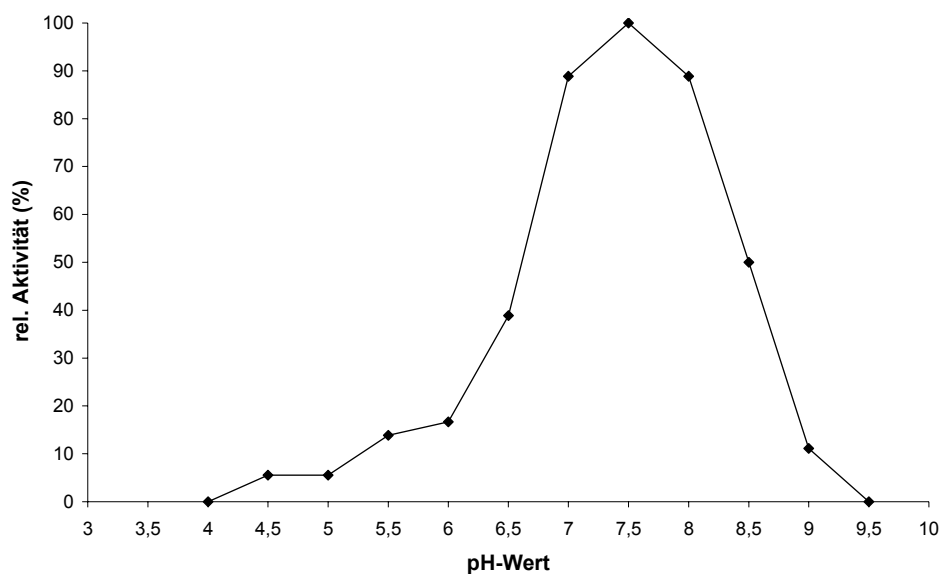


Abbildung 25: pH-Abhängigkeit der IMPase-Aktivität (Testbedingungen: 50 mM Puffer, 5 mM $MgCl_2$ bei RT. Es wurde eine, durch Chromatographie an Mono Q, angereicherte Enzympräparation verwendet. Verwendete Puffer: pH 4,0 – 5,5: 50 mM Natriumacetat; pH 5,5 – 7,5: 50 mM Bis-Tris; pH 7,5 – 9,5: 50 mM Tris).

2.1.3.5 Temperaturabhängigkeit

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurde die Aktivität des Enzyms im Bereich von 10 °C bis 80 °C bestimmt. Die Enzymaktivität nimmt kontinuierlich zu, bis sie bei 70 °C ein Maximum erreicht. Bei höheren Temperaturen nimmt die Enzymaktivität stark ab, was wahrscheinlich auf eine thermische Denaturierung des Enzyms zurückzuführen ist.

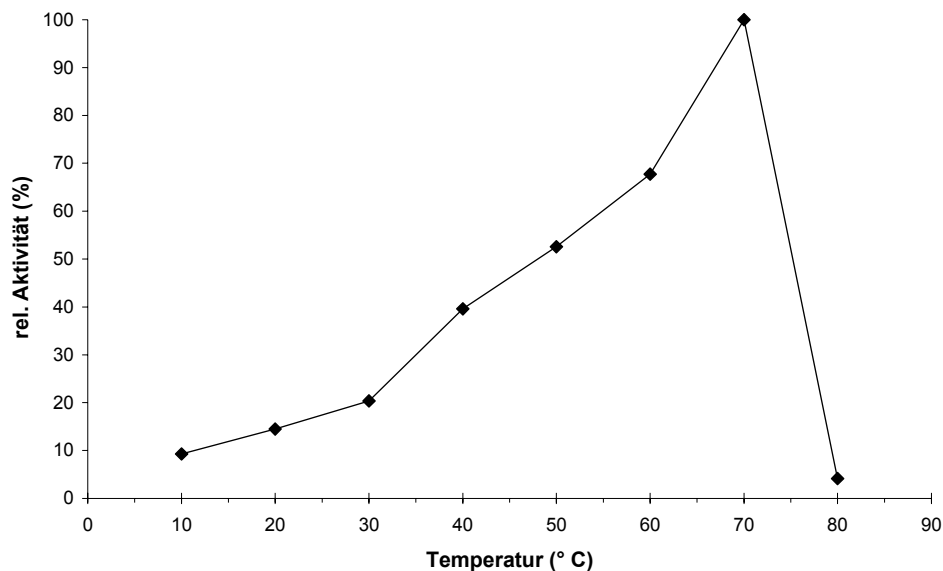


Abbildung 26: Temperaturabhängigkeit der IMPase-Aktivität (Testbedingungen: 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂. Es wurde eine, durch Chromatographie an Mono Q, angereicherte Enzympräparation verwendet.).

2.1.3.6 Substratspezifität

Zur Bestimmung der Substratspezifität wurden eine Reihe von Inositolmono- und Inositolbisphosphaten untersucht. Es wurden auch einige phosphorylierte Zucker getestet, da bei einigen IMPasen auch die Dephosphorylierung dieser Zucker beschrieben wurde. Von den untersuchten Substraten scheint *D-myo*-Ins(3)P das bevorzugte Substrat zu sein. Ein signifikanter Unterschied zwischen Ins(3)P und Ins(1)P konnte nicht festgestellt werden, das Enzym ist also nicht in der Lage zwischen den beiden enantiotopen Positionen zu differenzieren. Während Ins(5)P auch noch umgesetzt wird ist für Ins(2)P mit der axial stehenden Phosphatgruppe kein nennenswerter Umsatz mehr feststellbar. Dies läßt den Schluß zu, daß bei den Inositolmonophosphaten alle äquatorial stehenden Phosphatgruppen hydrolysiert werden, ein Umstand der schon bei anderen IMPasen beobachtet wurde. Die Inositolbisphosphate Ins(3,6)P₂, Ins(1,5)P₂ und Ins(2,4)P₂ wurden umgesetzt. Die IMPase aus *D. discoideum* ist demnach nicht spezifisch für Inositolmonophosphate, sondern kann die Hydrolyse von einigen Inositolbisphosphaten katalysieren, wenn auch in weit geringerem

Maße. Ungewöhnlich ist das $\text{Ins}(1,3)\text{P}_2$ von der IMPase nicht umgesetzt wird, obwohl hier die Positionen phosphoryliert sind, für die bei den Inositolmonophosphaten die höchsten Aktivitäten festgestellt wurden. Von den untersuchten phosphorylierten Zuckern konnte nur für Ribulose 5-phosphat eine abbauende Aktivität festgestellt werden.

Substrat	rel. Aktivität (%)
Ins(3)P	100
Ins(1)P	92
Ins(5)P	25
Ins(2)P	3
Ins(3,6)P ₂	20
Ins(1,5)P ₂	19
Ins(2,4)P ₂	6
Ins(1,2)P ₂	0
Ins(1,3)P ₂	0
p-NPP	2
Glucose 1-phosphat	4
Glucose 6-phosphat	3
Fructose 6-phosphat	0
Fructose 1,6-bisphosphat	0
Mannose 6-phosphat	0
Ribose 5-phosphat	0
Ribulose 5-phosphat	23

Tabelle 3: Substratspezifität der *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase (Testbedingungen: 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂ bei RT. Es wurde eine, durch Chromatographie an Mono Q, angereicherte Enzympräparation verwendet.).

2.1.3.7 Kinetische Eigenschaften

Durch die *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase wird die Spaltung einer Phosphorsäureester-Bindung katalysiert. Die kinetischen Messungen liefern wichtige Informationen über die Eigenschaften eines Enzyms.

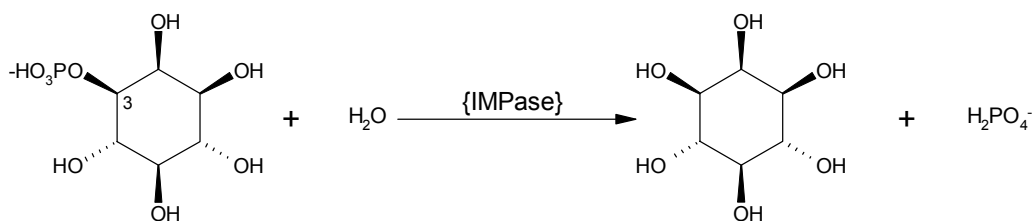


Abbildung 27: Durch die IMPase katalysierte Dephosphorylierung von Ins(3)P.

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit V von der Substratkonzentration S für enzymkatalysierte Reaktionen wird im einfachsten Fall durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Diese Gleichung enthält zwei Parameter, die Eigenschaften des Enzyms beschreiben: Die Michaelis-Konstante K_M entspricht, unter Michaelis-Menten Bedingungen, numerisch der Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes und ist damit ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat. Über die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} läßt sich die Wechselzahl des Enzyms (umgesetzte Substratmoleküle pro Enzymmolekül und Sekunde) berechnen. Untersucht wurde das Hauptsubstrat der IMPase Ins(3)P (Abbildung 28). Bei der Bestimmung der Maximalgeschwindigkeit muß berücksichtigt werden, daß nur eine angereicherte Enzym-Präparation verwendet wurde. Anhand der Gelelektrophorese aus der Anreicherung wurde der Anteil der IMPase am Proteingemisch auf ca. 5 % geschätzt.

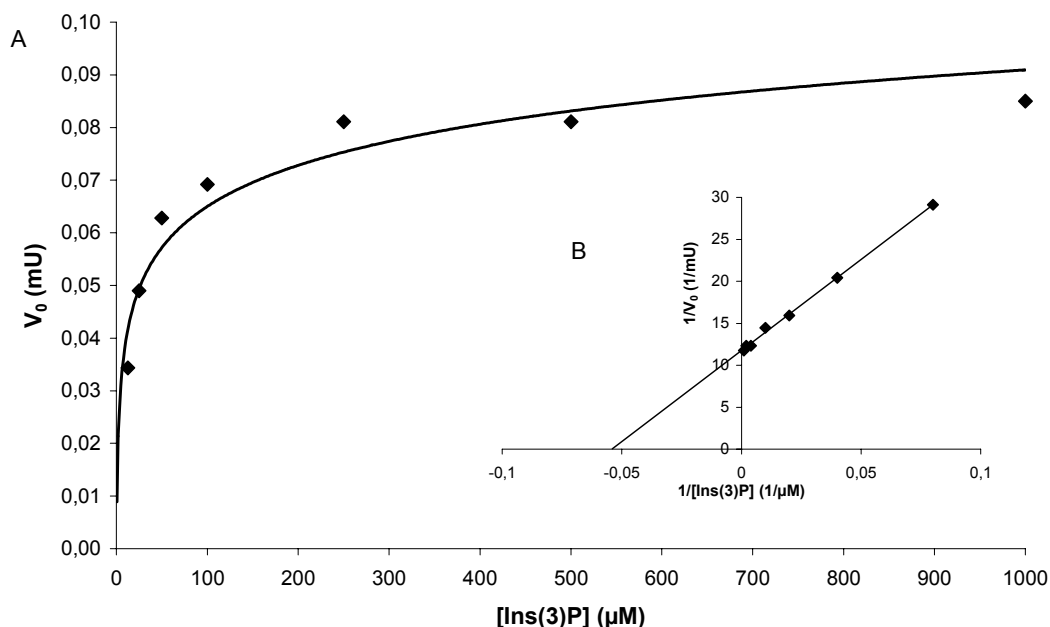


Abbildung 28: Michaelis-Menten-Kinetik für das Substrat Ins(3)P mit: **A** Anfangskonzentration V_0 als Funktion der Substratkonzentration und **B** Lineweaver-Burk-Auftragung zur Bestimmung von K_M und V_{\max} (Testbedingungen: 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM $MgCl_2$ bei RT, Proteinkonzentration 0,12 mg/mL).

Die K_M -Werte der meisten *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatasen für Inositolmonophosphate fallen in den μM -Bereich, indem diese Substanzen auch in den Zellen vorkommen (Sherman *et al.* 1985). Für die IMPase aus *D. discoideum* liegt der K_M -Wert für Ins(3)P mit 18 μM deutlich über der intrazellulären Ins(3)P-Konzentration von 1 μM (Dr.

Fischbach, Arbeitskreis Prof. Vogel, BU Wuppertal, persönl. Mitteilung). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die IMPase für höhere lokale Inositolmonophosphat-Konzentrationen optimiert ist, wie sie z. B. im Rahmen der Phosphoinositid-Kaskade auftreten, um so ein rasches Auffüllen des Phosphoinositid-Pools zu ermöglichen. Für die IMPase aus *D. discoideum* beträgt die Wechselzahl etwa 13 s^{-1} . Sie hat damit eine für IMPasen typische Größenordnung, so besitzt z. B. die IMPase aus *E. coli* eine Wechselzahl von $6,5 \text{ s}^{-1}$. Eine der aktivsten bisher bekannten IMPasen wurde aus *Thermotoga maritima* isoliert, die Wechselzahl beträgt 207 Ins(3)P-Moleküle pro Sekunde (Stec *et al.* 2000).

2.1.3.8 Inhibierung der Inositolmonophosphat Phosphatase durch Lithium

Eine charakteristische Eigenschaft von Enzymen, die zur IMPase-Familie gehören, ist die unkompetitive Inhibierung durch das monovalente Kation Li^+ im millimolaren Bereich. Wie in Abbildung 29 gezeigt, wird die Aktivität der *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase durch Li^+ inhibiert. Der Wert für die molare InhibitorKonzentration $[\text{Li}^+]_{50}$ wurde graphisch bestimmt und liegt bei 1,95 mM. Dieser Wert liegt in dem erwarteten Bereich zwischen 0,1 und 2 mM.

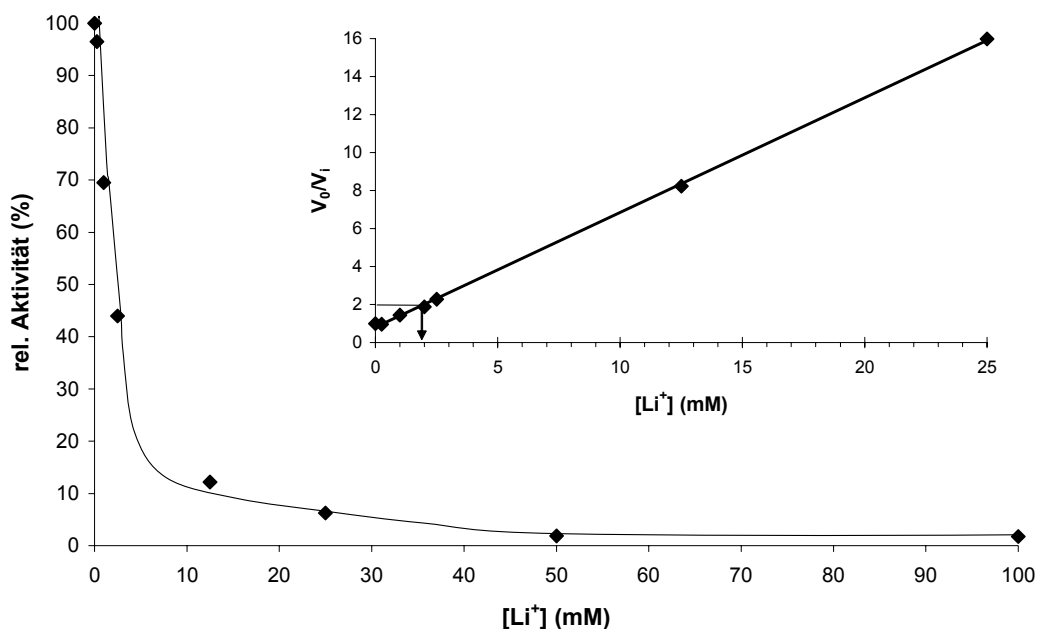


Abbildung 29: Inhibierung der *Dictyostelium* IMPase durch Li^+ -Ionen und Bestimmung der molaren InhibitorKonzentration $[\text{I}]_{50}$ (eingefügtes Diagramm) (Testbedingungen: 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl_2 bei RT. Es wurde eine, durch Chromatographie an Mono Q, angereicherte Enzympräparation verwendet.).

Die Art der Inhibierung wurde graphisch nach der Lineweaver-Burk-Methode bestimmt. Dazu wurde für 0 mM LiCl und 2 mM LiCl die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bestimmt und doppelt reziprok aufgetragen. Bei kompetitiven Inhibitoren schneiden sich die Geraden auf der Y-Achse, während bei nicht-kompetitiven Inhibitoren der Schnittpunkt auf der X-Achse liegt. Bei einem unkompetitiven Inhibitor sollten die Geraden parallel verlaufen.

Die Geraden für die IMPase zeigen einen Verlauf, der am ehesten mit einer unkompetitiven Inhibierung in Einklang zu bringen ist (Abbildung 30). In diesem Fall kann der Inhibitor Li^+ nur an den Komplex aus Enzym und Substrat binden und so die enzymatische Reaktion blockieren. Damit erfüllt die aus *D. discoideum* isolierte Phosphatase, das Kriterium einer unkompetitiven Inhibierung durch Lithium, das als wichtiges Merkmal für die *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatasen gilt.

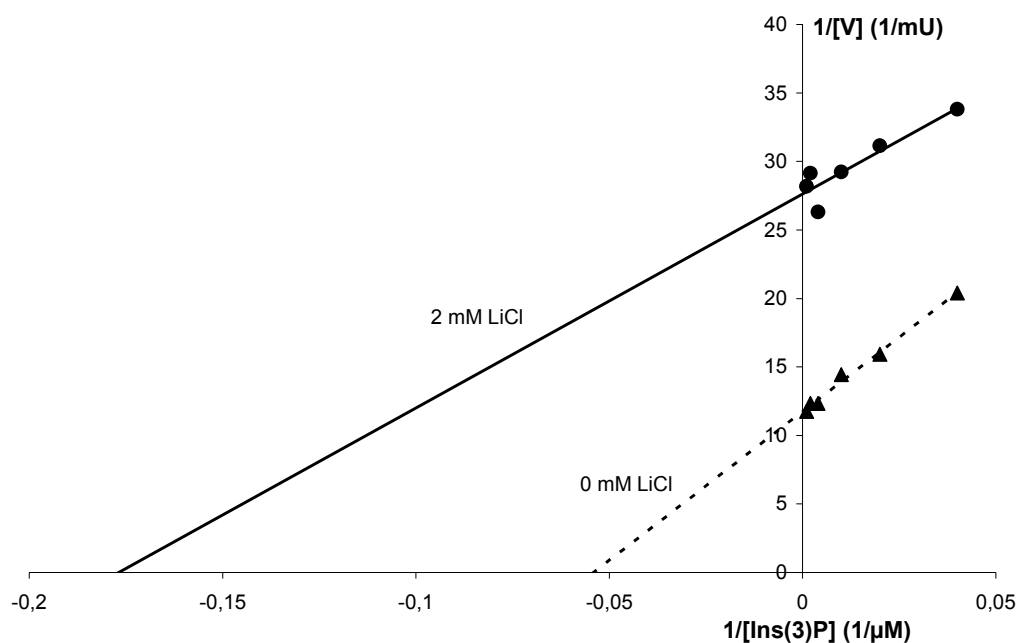


Abbildung 30: Bestimmung der Art der Inhibierung durch die Lineweaver-Burk-Methode.

2.1.3.9 Einfluß der Anionen Fluorid und Sulfat

Der Einfluß der Anionen Fluorid und Sulfat auf die Aktivität der IMPase wurde getestet. Fluorid inhibiert oftmals Phosphatasen, wie z. B. die Phytase oder die saure Phosphatase aus *D. discoideum*, und Sulfat wurde als Anion eingesetzt, das Phosphat ähnelt. Die Ergebnisse gibt die Tabelle 4 wieder.

Anion	Rel. Aktivität (%)
1 mM F ⁻	55
10 mM F ⁻	16
1 mM SO ₄ ²⁻	103
10 mM SO ₄ ²⁻	115

Tabelle 4: Einfluß von Fluorid und Sulfat auf die Aktivität der IMPase (Testbedingungen: 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂ bei RT. Es wurde eine, durch Chromatographie an Mono Q, angereicherte Enzympräparation verwendet.).

Fluorid inhibiert die *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase bei einer Konzentration von 10 mM fast vollständig (84 %), schon eine Konzentration von 1 mM reicht zu einer 50%igen Inhibierung. Der [I]₅₀ für Fluorid wurde auf 1,65 mM abgeschätzt. Sulfat hat keinen merklichen Einfluß auf die Aktivität der Inositolmonophosphat Phosphatase.

2.1.3.10 Vergleich mit bekannten Enzymen

Die wichtigsten Eigenschaften der IMPase aus *D. discoideum* werden in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Allgemeine Eigenschaften	
Molekulargewicht nativ	70 kDa
Molekulargewicht der Untereinheit	36 kDa
pH-Optimum	pH 7,5
Isoelektrischer Punkt	pH 4,95
Aktivator	
Mg ²⁺	[Mg ²⁺] ≤ 5 mM
Inhibitoren	
	[I] ₅₀
Li ⁺ (unkompetitiver Inhibitor)	1,95 mM
Mn ²⁺	57 µM
Co ²⁺	450 µM
Ca ²⁺	1,12 mM

Tabelle 5: Tabellarische Zusammenfassung der Eigenschaften der IMPase aus *D. discoideum*.

Bei den allgemeinen Eigenschaften zeigen sich große Übereinstimmungen zwischen der IMPase aus *D. discoideum* und den verschiedenen IMPasen aus Säugetieren. Es wurde eine Vielzahl von IMPasen aus Säugetieren isoliert und charakterisiert (Parthasarathy *et al.* 1994). Bei allen handelt es sich um Homodimere mit einem nativen Molekulargewicht zwischen 58 und 60 kDa und entsprechenden Untereinheiten von 29 - 30 kDa (Takimoto *et al.* 1985; Meek *et al.* 1988; Gee *et al.* 1988), gleiches gilt für Pflanzen (Gumber *et al.* 1984). Die IMPase aus *D. discoideum* weist mit 70 kDa (nativ) und 36 kDa für die Untereinheiten ein etwas höheres

Molekulargewicht auf als es erwartet wurde. Allerdings ist das Molekulargewicht von 70 kDa für eine IMPase nicht ungewöhnlich, es wurde im menschlichen Gehirn ein Enzym mit IMPase-Aktivität beschrieben, das auch ein Molekulargewicht von 70 kDa besitzt (Nakamura *et al.* 1979). Die pH-Optima für Säugerzellen liegen in dem Bereich zwischen pH 7,0 und pH 8,5. So wurde für die IMPase aus Rattenhoden ein pH-Optimum zwischen 7,0 und 8,0 ermittelt (Eisenberg 1967), bei Ratten- und Rinderhirnen liegt das pH-Optimum bei 7,4 bis 8,0 (Takimoto *et al.* 1985; Hallcher & Sherman 1980) und schließlich weist die IMPase aus menschlichem Hirn ein Optimum von pH 8,5 auf (Vogel & Thompson 1986). Beim pH-Optimum zeigt die IMPase aus *D. discoideum* keine Auffälligkeit und liegt mit pH 7,5 genau indem für Säugerzellen typischen Bereich. Ähnlich verhält es sich mit dem isoelektrischen Punkt. So wurde für die IMPase aus Rattenhirn einen pI-Wert von 4,6 (Takimoto *et al.* 1985) gefunden und im Rinderhirn liegen die pI-Werte zwischen 4,86 - 4,90 (Meek *et al.* 1988; Gee *et al.* 1988). Der pI-Wert von 4,95 für die IMPase aus *D. discoideum* zeigt, daß bei allen IMPasen der Anteil an geladenen Aminosäuren ähnlich ist. Dies deutet auf ein konservatives Enzym hin. Die gefundene Mg^{2+} -Abhängigkeit der IMPase aus *D. discoideum* deckt sich mit der Tatsache, daß es sich bei den aus Säugetieren isolierten IMPasen ausschließlich um Mg^{2+} -abhängige Enzyme handelt (Parthasarathy *et al.* 1994). Genau wie bei *D. discoideum* wurde gefunden, daß Konzentrationen < 5 mM Mg^{2+} aktivierend wirken (Hallcher & Sherman 1980; Jackson *et al.* 1989), während es bei höheren Konzentrationen (> 5 mM) ein Inhibitor ist (Ganzhorn & Chanal 1990; Leech *et al.* 1993). Die unkompetitive Inhibierung durch Lithium im millimolaren Bereich ist eine der typischen Eigenschaften, die alle in der Literatur beschriebenen Enzyme aufweisen und über die *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatasen definiert werden. Dementsprechend weisen alle beschriebenen Enzyme diese Eigenschaft auf. Die Beobachtung, daß Mangan ein guter Inhibitor der IMPase aus *D. discoideum* sind, steht im Widerspruch zu früheren Beobachtungen bei IMPasen (Kabasawa *et al.* 1974). Auch Eisenberg (1967) und Naccarato *et al.* (1974) beschreiben eine partielle Substitution von Mg^{2+} durch Mn^{2+} bei Erhalt der Aktivität. Die Autoren untersuchten Enzyme aus Ratten- bzw. Rindergewebe. Unterschiede zwischen den Spezies könnten daher für dieses Ergebnis verantwortlich sein. Bei Untersuchungen der IMPase aus Rinderhirn wurde von Hallcher & Sherman (1980) allerdings auch eine starke Inhibierung durch Mangan beobachtet. Die Autoren diskutierten in diesem Zusammenhang eine mögliche Funktion von Mn^{2+} als Regulator der IMPase. Abschließend läßt sich sagen, daß die Eigenschaften der IMPasen aus Säugetieren in weiten Teilen mit denen der IMPase aus *D. discoideum* isolierten übereinstimmen. Es gibt nur geringe Abweichungen und diese

bewegen sich innerhalb der Unterschiede, wie sie auch zwischen verschiedenen Säugetieren zu finden sind.

Neben den proteinchemischen Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung möglicher IMPasen in *D. discoideum* wurde auch ein molekularbiologischer Ansatz verfolgt. Das *D. discoideum* Genom wird seit 1998 sequenziert und analysiert (Kuspa *et al.* 2001) und die komplette Genomsequenz ist seit 2004 verfügbar. Die *D. discoideum* cDNA Datenbank (<http://dictycdb.biol.tsukuba.ac.jp/>), sowie die *D. discoideum* Genomische Datenbank (<http://dictybase.org/>), wurde nach möglichen IMPasen durchsucht und es konnte eine 0,9 kB große cDNA (FC-BP15) identifiziert werden. Ein Ähnlichkeitsvergleich der aus der cDNA abgeleiteten Proteinsequenz mit der abgeleiteter IMPase Proteinsequenzen aus verschiedenen Spezies zeigt einen hohen Grad an Homologie (Tabelle 6). Der Vergleich erfolgte mit der Clustal W-Methode. Das Gen für die IMPase ist auf Chromosom 3 (DDB0202100, Locus: JC3V2_0_01716, Position 4261304 to 4262400) lokalisiert. Es ist 1097 bp groß und enthält zwei Introns (149-304; 687-808). Die in unseren Arbeitskreis unternommenen Versuche mit Hilfe dieser cDNA Antisense-Mutanten der IMPase zu generieren waren bisher nicht erfolgreich.

	<i>D. discoideum</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>D. discoideum</i>	1	0,345	0,277	0,425	0,254	0,348	0,304
<i>Homo sapiens</i> CAA72195	0,345	1	0,319	0,372	0,315	0,862	0,367
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AAS56072	0,277	0,319	1	0,326	0,464	0,292	0,257
<i>Arabidopsis thaliana</i> AAF26973	0,425	0,372	0,326	1	0,285	0,365	0,342
<i>Neurospora crassa</i> EAA33146	0,254	0,315	0,464	0,285	1	0,305	0,247
<i>Mus musculus</i> AAK39515	0,348	0,862	0,292	0,365	0,305	1	0,355
<i>Drosophila melanogaster</i> AAF51693	0,304	0,367	0,257	0,342	0,247	0,355	1

Tabelle 6: Homologie der aus der cDNA abgeleiteten Sequenz mit abgeleiteten IMPase Proteinsequenzen aus verschiedenen Spezies (0 – 1 entspricht 0 – 100 % Übereinstimmung).

2.2 Versuche zur Identifizierung von Inositoltrisphosphat-Phosphatasen

In *D. discoideum* konnten bisher keine Inositolpolyphosphat 1-Phosphatasen, 4-Phosphatasen oder 3-Phosphatasen nachgewiesen werden und es fehlen Informationen über andere Aktivitäten, die zum Abbau von auftretenden Inositoltrisphosphat-Isomeren wie z. B. $\text{Ins}(1,2,6)\text{P}_3/\text{Ins}(2,3,4)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,2,3)\text{P}_3$, $\text{Ins}(3,4,6)\text{P}_3$ (bzw. $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$) und $\text{Ins}(1,2,4)\text{P}_3/\text{Ins}(2,3,6)\text{P}_3$, dienen. Daher wurde das cytosolische Extrakt auf eventuell vorhandene Inositoltrisphosphat Phosphatase-Aktivitäten untersucht. Zu den untersuchten Inositoltrisphosphaten gehören $\text{Ins}(1,2,4)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,2,6)\text{P}_3$ und $\text{Ins}(1,2,3)\text{P}_3$. Bei diesen Inositoltrisphosphaten handelt es sich um Abbauprodukte der InsP_6 -Hydrolyse durch die membrangebundene Phytase aus *D. discoideum* (Abbildung 10, S. 15). Das ebenfalls untersuchte $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ wird aus $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ durch Phosphorylierung und anschließender Hydrolyse gebildet (Abbildung 7, S. 9). Aufgrund einer Kooperation mit organischen Chemikern (Fachbereich Organische Chemie, Arbeitsgruppe Prof. Altenbach, BU Wuppertal) standen noch weitere Inositoltrisphosphate zu Verfügung ($\text{Ins}(2,3,4)\text{P}_3$, $\text{Ins}(2,3,6)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,5,6)\text{P}_3$, $\text{Ins}(3,4,5)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,4,6)\text{P}_3$ und $\text{Ins}(4,5,6)\text{P}_3$) die getestet wurden. Um die Zellen zu lysieren, wurden sie durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 5 μm gepreßt. Diese Aufschlußmethode ist besonders schonend, da die meisten Zellorganellen nicht zerstört werden (Das & Henderson 1983). Zur Stabilisierung der Enzymaktivität enthielt der verwendete Aufschlußpuffer Saccharose und EDTA. Die Proben wurden bei pH 6 inkubiert. Da einige Phosphatasen Mg^{2+} -abhängig sind wurden die Proben jeweils in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Mg^{2+} inkubiert. Die Proben wurden mit Hilfe der HPLC-MDD (alkalisches Elutionssystem) analysiert. Von einer enzymatischen Aktivität wurde ausgegangen wenn innerhalb von 40 Minuten mehr als 40 % des eingesetzten Inositolphosphates abgebaut wurden. Eine Dephosphorylierung wurde für $\text{Ins}(1,2,6)\text{P}_3$, $\text{Ins}(2,3,6)\text{P}_3$, $\text{Ins}(3,4,5)\text{P}_3$ und $\text{Ins}(1,4,6)\text{P}_3$ beobachtet. Eine strikte Mg^{2+} -Abhängigkeit konnte nicht festgestellt werden, allerdings zeigte sich bei der Dephosphorylierung von $\text{Ins}(1,2,6)\text{P}_3$ eine um 33 % erhöhte Aktivität in Gegenwart von Mg^{2+} (Tabelle 7). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß wenigstens zwei abbauenden Enzymaktivitäten vorhanden sind, von denen eine Mg^{2+} -unabhängig ist während bei der anderen Mg^{2+} als Aktivator wirkt. Ein weiterer Hinweis auf mehrere Enzymaktivitäten könnte auch das Fehlen eines gemeinsamen Strukturmotivs bei den getesteten Substraten sein.

Inositolphosphat	Abbau der InsP ₃ -Isomere (%)	
	ohne Mg ²⁺	mit Mg ²⁺
Ins(1,2,6)P ₃	45	60
Ins(2,3,6)P ₃	67	73
Ins(3,4,5)P ₃	55	53
Ins(1,4,6)P ₃	79	82

Tabelle 7: Abbau von InsP₃-Isomeren (Testbedingungen: 80 mM Bis-Tris (pH 6,0), 400 mM Saccharose, 5 mM EDTA, 250 µM Inositoltrisphosphat 40 min bei 25 °C. 1·10⁷ Zellen pro Reaktionsansatz).

Da zum Zeitpunkt der Versuche allerdings nur die HPLC-MDD Analytik zur Verfügung stand, war eine Identifizierung der gebildeten Reaktionsprodukte nicht möglich. Mit der HPIC-CD steht inzwischen eine empfindliche Analytik zur Verfügung, die die Identifizierung von Inositolmono- und Inositolbisphosphate ermöglicht (Abbildung 56, S. 89). Neben den Inositoltrisphosphaten Ins(1,2,6)P₃, Ins(2,3,6)P₃, Ins(3,4,5)P₃ und Ins(1,4,6)P₃ sollte auch die anderen Inositoltrisphosphate nochmals getestet werden. Durch die Identifizierung der Abbauprodukte läßt sich feststellen, ob es sich bei der beobachteten Konzentrationsabnahme der Inositoltrisphosphate um die spezifische Dephosphorylierung durch eine Phosphatase handelt.

2.3 Anreicherung und Charakterisierung einer Inositolpentakis- /Inosiltetrakisphosphat-Phosphatase

Bei Untersuchungen zum Metabolismus von InsP₆ wurde von S. Adelt (Adelt 1999) eine Enzymaktivität gefunden, die eine Reihe von InsP₅- und InsP₄-Isomeren dephosphoryliert. Im Rahmen einer Diplomarbeit (Hansen 1998) gelang ein erster Anreicherungsschritt und eine teilweise Charakterisierung des Enzyms. Versuche zur Etablierung weiterer Anreicherungsschritte waren nicht erfolgreich. Da diese InsP₅/InsP₄-Phosphatase neue Wege für den Abbau von Inositolpentakis- und Inosiltetrakisphosphaten aufzeigt, könnte sie im Inositolphosphat-Metabolismus von *D. discoideum* eine wichtige Rolle spielen.

2.3.1 Aktivitätsbestimmung

Standardmäßig wurde zur Bestimmung der Enzymaktivität die durch die Dephosphorylierung von Ins(1,2,5,6)P₄ freigesetzte Phosphatmenge photometrisch verfolgt. Wie in Abbildung 31 zu erkennen ist, ist die Enzymaktivität linear von der Zeit abhängig und proportional zur Enzymmenge. In Fällen, bei denen eine photometrische Aktivitätsbestimmung nicht möglich war (z. B. durch einen zu hohen Phosphathintergrund), wurde die Aktivität mittels HPLC-MDD durch die Bestimmung des umgesetzten Substrats ermittelt.

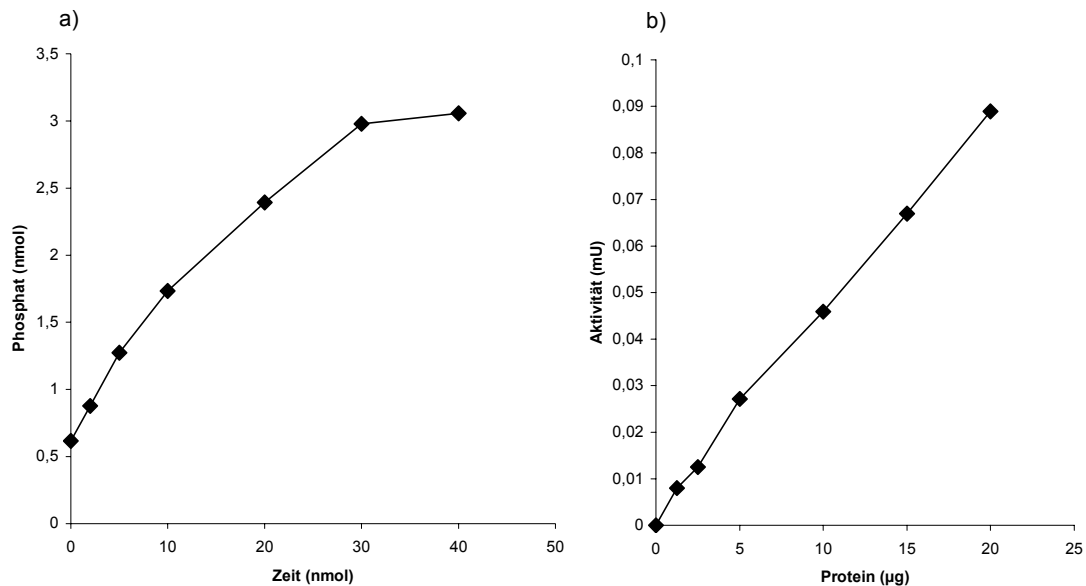


Abbildung 31: Abhängigkeit der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Aktivität von der Inkubationszeit (a) und der Proteinmenge (b) (Testbedingungen: 50 mM Mes/Na⁺ (pH 5,5), 1 mM MgCl₂, 0,1 % Triton X-100, Inkubation bei RT. Es wurde eine, durch Chromatographie an Heparin-Agarose, angereicherte Enzympräparation verwendet.).

2.3.2 Anreicherung der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase

Die *D. discoideum* Zellen wurden in axenischem Medium angezogen und durch Zyklen von Einfrieren und Auftauen lysiert. Der Überstand nach der Ultrazentrifugation enthielt die gesuchte Enzymaktivität, in dem die Membranen und Organellen enthaltenen Sediment konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.

2.3.2.1 Chromatographie an Heparin-Agarose

Standardmäßig wurde für den ersten Reinigungsschritt eine Heparin-Agarose Säule verwendet. Heparin ist ein sulfatiertes, negativ geladenes Glucosaminoglykan und hat sich zur Reinigung der 5-Phosphatase aus *D. discoideum* bereits bewährt (Adelt 1999). Ein Vorteil der Chromatographie an Heparin-Agarose ist, daß den Aktivitätstest störendes Phosphat bei diesem Reinigungsschritt entfernt wird. In Gegenwart von Magnesium und bei einem pH-Wert von 6,5 bindet die $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase an das Säulenmaterial. Die Elution erfolgte stufenweise mit steigender Ionenstärke. Die $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase wird unter diesen Bedingungen bei einer Ionenstärke von 500 mM NaCl eluiert, es wurde eine 13fache Anreicherung erreicht (Ausbeute 92 %).

	Protein (mg)	spez. Aktivität (mU/mg)	Gesamtaktivität (mU)	Anreicherung	Ausbeute (%)
Cytosol	360	1,24	446	1	100
Durchlauf	257	0	0	0	0
100 mM NaCl	24	0	0	0	0
200 mM NaCl	20	0	0	0	0
500 mM NaCl	26	15,76	410	12,7	92
1 M NaCl	2	0	0	0	0

Tabelle 8: Typische Anreicherung der InsP₅/InsP₄-Phosphatase durch Chromatographie an Heparin-Agarose für 1·10¹⁰ *D. discoideum* Zellen als Ausgangsmaterial.

Die InsP₅/InsP₄-Phosphatase wird stark durch InsP₆ inhibiert. Damit sollte eine Affinitätselution wie sie von Wilson und Majerus für die Aufreinigung einer Ins(1,3,4)P₃ 5/6-Kinase beschrieben wurde (Wilson & Majerus 1996) möglich sein. Durch die spezifische Elution mit InsP₆ wurde in diesem Fall eine höhere Anreicherung erzielt als durch die unspezifische Elution mit NaCl. Nach der Anbindung des Enzyms an das Säulenmaterial wurde mit aufsteigenden InsP₆-Konzentrationen von 0,5 mM, 1 mM und 10 mM eluiert. Die Elution mit InsP₆ gelang jedoch nicht. Erst durch die abschließende Elution mit einer hohen Ionenstärke (500 mM NaCl) konnte das Enzym von der Säule eluiert werden. Die Affinität der InsP₅/InsP₄-Phosphatase zu InsP₆ reichte offenbar nicht aus, um die Bindung an das Säulenmaterial zu lösen, daher mußte auf die InsP₆-Affinitätselution verzichtet werden.

2.3.2.2 Chromatographie an Q-Sepharose ff

Alternativ zur Chromatographie an Heparin-Agarose konnte als erster Schritt auch die Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose[®] ff angewendet werden. Ein Vorteil ist, daß gegenüber der Chromatographie an Heparin-Agarose mit höheren Flußraten gearbeitet werden kann und damit der erste Anreicherungsschritt wesentlich schneller durchführbar ist. Eluiert wurde mit Ionenstärken von 200 mM, 500 mM und 1 M NaCl. Die InsP₅/InsP₄-Phosphatase wird mit 200 mM NaCl eluiert und es wurde eine 6fache Anreicherung erreicht (Ausbeute 90 %).

	Protein [mg]	Spez. Aktivität [mU/mg]	Gesamtaktivität [mU]	Anreicherung	Ausbeute [%]
Cytosol	300	1,11	334	1	100
Durchlauf	195	0	0	0	0
200 mM NaCl	49	6,1	299	5,5	90
500 mM NaCl	33	0,15	5	0,14	2
1 M NaCl	17	0	0	0	0

Tabelle 9: Typische Anreicherung der InsP₅/InsP₄-Phosphatase durch Chromatographie an Q-Sepharose für 1·10¹⁰ *D. discoideum* Zellen als Ausgangsmaterial.

2.3.2.3 Untersuchungen zur Stabilität der InsP₅/InsP₄-Phosphatase

Versuche zur weiteren Aufreinigung der InsP₅/InsP₄-Phosphatase, durch Kombination der Chromatographie an Heparin-Agarose und anschließend Q-Sepharose oder umgekehrt, führten immer zum Verlust der Aktivität. Es gibt eine Reihe von Gründen für den Aktivitätsverlust bei der Aufreinigung von Enzymen, z. B. die irreversible Adsorption des Proteins an den Säulenmaterialien, proteolytischer Verdau, die Existenz von Cofaktoren, die für die Stabilität des Proteins wichtig sind und während der Reinigung verloren gehen oder Denaturierung. Die Adsorption des Proteins an das Säulenmaterial als Grund für den Aktivitätsverlust kann in diesem Fall ausgeschlossen werden, da beide Chromatographiemethoden für sich eine Aufreinigung ohne größeren Aktivitätsverlust erlauben. Ein proteolytischer Verdau kann auch ausgeschlossen werden, da parallel zur Aufreinigung auf Eis gelagerte Vergleichsproben keinen nennenswerten Aktivitätsverlust zeigten. Um einen Hinweis auf die Existenz von niedermolekularen Cofaktoren zu bekommen wurde in einem ersten Schritt alle nach der zweiten Säule erhaltenen Fraktionen vereinigt und die Aktivität bestimmt. Desweiteren wurden vom cytosolischen Extrakt durch Ultrafiltration (10kDa) niedermolekulare Substanzen abgetrennt und diese zu den Fraktionen gegeben. In beiden Fällen konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Da es auch möglich ist, mit Hilfe der Ultrafiltration ohne nennenswerten Aktivitätsverlust umzupuffern, ist die Existenz eines niedermolekularen Cofaktors nicht sehr wahrscheinlich. Daß die InsP₅/InsP₄-Phosphatase nicht sehr stabil ist, zeigt auch die Tatsache, daß über Nacht auf Eis gelagerte Enzympräparationen (Aufreinigung durch Chromatographie an Heparin-Agarose) nur noch 10 % der ursprünglichen Aktivität aufweisen. Es gibt eine Reihe von Verbindungen, die einen stabilisierenden Effekt auf die Struktur von Proteinen haben und deshalb nützlich zum Schutz des Proteins gegen Denaturierung sein können. Reduzierende Reagenzien wie DTT oder β -Mercaptoethanol verhindern die Oxidation von Thiolgruppen und erhalten so die native Struktur des Proteins. Die Zugabe von Proteinen wie Rinderserumalbumin (BSA) kann auch zur Stabilisierung eines Proteins beitragen. Der Einsatz von Polyolen oder Zuckern zur Stabilisierung von Enzymen ist seit langem bekannt, dabei werden hauptsächlich Glycerin oder Sucrose eingesetzt. Die getesteten Verbindungen und ihr Einfluß auf die Stabilität der InsP₅/InsP₄-Phosphatase sind in Tabelle 10 zusammengefaßt. Bei der Verwendung von Glycerin und Sucrose konnte eine Stabilisierung bei der Lagerung auf Eis beobachtet werden, jedoch führte der Zusatz in Puffern für die Biochromatographie nicht zu der gewünschten Stabilisierung bei den chromatographischen Trennungen. Die restlichen Substanzen hatten weder bei der Lagerung noch bei der Chromatographie einen Einfluß auf die Enzymstabilität.

Es ist nicht gelungen, die Trennbedingungen derart zu optimieren, daß die InsP₅/InsP₄-Phosphatase durch Kombination der Chromatographie an Heparin-Agarose und Q-Sepharose weiter aufgereinigt werden konnte. Aus diesem Grunde wurden andere chromatographische Trennverfahren auf ihre Tauglichkeit zur Aufreinigung der InsP₅/InsP₄-Phosphatase untersucht.

Pufferzusatz	Restaktivität (nach Lagerung über Nacht) (%)
ohne Zusatz	10
Glycerin (10 %)	67
Sucrose (10 %)	62
β-Mercaptoethanol (0,1 % (v/v))	13
DTT (1mM)	11
EDTA (1mM)	6
BSA (1 mg/mL)	9

Tabelle 10: Einfluß verschiedener Stabilisatoren auf die Aktivität der InsP₅/InsP₄-Phosphatase nach der Lagerung auf Eis (Lagerungspuffer: 50 mM Mes/Na⁺ (pH 6,5), 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, Aktivitätstest: 50 mM Mes/Na⁺ (pH 5,5), 1 mM MgCl₂, 0,1 % Triton X-100, Inkubation bei RT.).

2.3.2.4 Anreicherungsversuche durch Hydrophobe Interaktionschromatographie, Chromatographie an Hydroxylapatit und Chromatofokussierung

Viele lösliche Proteine besitzen auf ihrer Oberfläche hydrophobe Bereiche. In wäßriger Lösung assoziieren diese Bereiche mit hydrophoben Oberflächen. Diese hydrophoben Wechselwirkungen werden bei der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) ausgenutzt. Als Matrizes wurden Phenylsepharose und Octylsepharose getestet. Die Enzymprobe wird bei einer hohen Ionenstärke aufgetragen, da diese die hydrophoben Wechselwirkungen verstärken, und zur Elution werden abnehmende Salzkonzentrationen oder auch Detergentien verwendet, die die hydrophoben Bereiche der Proteine abdecken und sie dadurch von der Matrix ablösen. Die InsP₅/InsP₄-Phosphatase ist in Gegenwart hoher Ionenstärken aktiv und sollte daher die Bedingungen wie sie bei der HIC auftreten tolerieren. Für die Tests wurden durch Chromatographie an Heparin-Agarose angereicherte Enzympräparationen verwendet. Da die Enzympräparation, mit 500 mM NaCl, bereits eine sehr hohe Ionenstärke besitzt, wurde sie bei einem Teil der Tests direkt aufgetragen. Durch die Verwendung von Ammoniumsulfat lassen sich die hydrophoben Wechselwirkungen noch verstärken und es wird eine bessere Anbindung des Enzyms erreicht, daher wurde bei den anderen Tests vor der HIC eine Ammoniumsulfatfällung mit einer Sättigung von 60 % (= 2,72 M) durchgeführt und der Überstand aufgetragen. Eluiert wurde mit abnehmenden

Konzentrationen von NaCl bzw. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oder durch Zugabe von Triton-X-100. Die Untersuchungen zeigen, daß die HIC sich nicht zur Aufreinigung der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase eignet, da bei allen durchgeführten Tests weder im Durchlauf noch im Eluat Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte. Es ist bekannt, daß der Kontakt mit dem bei der HIC verwendeten Säulenmaterial zu einer irreversiblen Denaturierung des Proteins führen kann (Pingoud & Urbanke 1997), dies könnte einer der Gründe für den beobachteten Aktivitätsverlust sein.

Hydroxylapatit ist ein Calciumphosphatmineral, das Proteine über zwei Mechanismen bindet. Basische Proteine binden über ihre Aminogruppen an die negative Oberflächenladung des Materials, also über elektrostatische Wechselwirkungen, während saure Proteine über ihre Carboxylgruppen Komplexverbindungen mit dem Ca^{2+} des Materials bilden. Für die Tests wurde eine, durch Chromatographie an Heparin-Agarose angereicherte, Enzympräparation verwendet. Diese wurde vor dem Auftragen mit 10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8) verdünnt und anschließend direkt auf die Säule aufgetragen. Es wurde stufenweise mit aufsteigenden Phosphatkonzentrationen eluiert. Es konnte allerdings weder im Durchlauf noch im Eluat $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase-Aktivität nachgewiesen werden.

Wie bei der Ionenaustauscherchromatographie werden auch bei der Chromatofokussierung Proteine nach Ladungsunterschieden getrennt. Die Verwendbarkeit der Chromatofokussierung wird durch die Stabilität des Proteins in dem verwendeten Elutionspuffer (Polypuffer) eingeschränkt. Vor der Chromatographie wurde daher getestet, ob die $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase in Gegenwart des Polypuffers stabil ist. Es zeigte sich, daß der Puffer keinen Einfluß auf die Aktivität der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase hatte. Da die $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase bei pH 6,5 an den Anionentauscher Q-Sepharose bindet, muß der isoelektrische Punkt des Enzym bei einem niedrigeren pH-Wert liegen. Zur Elution wurde daher ein Puffersystem ausgewählt, daß den pH-Bereich 7 - 4 abdeckt und als Säulenmaterial wurde PBE 94 (Pharmacia) verwendet. Eine hohe Ionenstärke stört die Fokussierung. Vor der Auftragung wurde die durch Chromatographie an Heparin-Agarose angereicherte Enzympräparation durch Ultrafiltration entsalzt. Es konnte allerdings weder im Durchlauf noch im Eluat Enzymaktivität nachgewiesen werden. Die Chromatofokussierung eignet sich daher nicht für die Aufreinigung der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase. Da die Proteine an ihrem isoelektrischen Punkt von der Säule eluiert werden, besteht hier die Gefahr der Ausfällung und damit einhergehenden Denaturierung des Proteins, was eine Ursache für den Aktivitätsverlust sein könnte.

2.3.2.5 Metallchelatchromatographie

Die Metallchelatchromatographie (IMAC) nutzt die Tatsache aus, daß Proteine, die in geeigneter Anordnung mehrere Histidin- oder Cysteinreste enthalten, von Säulen gebunden werden, die an ihrer stationären Phase Metallchelate kovalent gebunden haben. Als Metallionen werden hauptsächlich Cu^{2+} , Zn^{2+} und Ni^{2+} verwendet. Cu^{2+} bindet Proteine sehr stark und in einigen Fällen gelingt die Bindung von Proteinen ausschließlich in Gegenwart von Cu^{2+} . Es gibt verschiedene Möglichkeiten Proteine bei der IMAC zu eluieren: Bei der Verwendung von EDTA werden die Metallionen und mit ihnen die gebundenen Proteine von der Säule eluiert. In dem meisten Fällen kann bei dieser Methode nicht zwischen verschiedenen Proteinen differenziert werden. Der pH-Wert bestimmt den Grad der Ionisierung der geladenen Gruppen an den Bindestellen. Durch eine Verringerung des pH-Wertes werden die gebundenen Proteine von der Säule abgelöst. Die meisten Proteine eluieren dabei zwischen pH 6,0 und 4,2. Reagenzien wie Imidazol konkurrieren mit den Proteinen um die Metallchelate, verdrängen diese und führen so häufig zu einer spezifischen Elution der Proteine. Getestet wurden die Metallchelate von Cu^{2+} , Zn^{2+} und Ni^{2+} . Für die Versuche wurde eine, durch Chromatographie an Heparin-Agarose angereicherte, Enzympräparation verwendet und eluiert wurde mit EDTA (50 mM), durch Verringerung des pH-Wertes auf pH 3,5 und mit Imidazol (500 mM). Um ionische Wechselwirkungen zu unterdrücken, die die IMAC stören können, enthielten alle Elutionspuffer 500 mM NaCl. Bei der Verwendung von Cu^{2+} konnte weder im Durchlauf noch in den Eluaten Enzymaktivität nachgewiesen werden. In Gegenwart von Zn^{2+} wurden im Durchlauf ca. 25 - 30 % der aufgetragenen Enzymaktivität wiedergefunden, ein Hinweis auf eine relativ schwache Anbindung der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase bei der Verwendung von Zn-Chelaten. In den Eluaten konnte jedoch keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Die einzigen Bedingungen unter denen eine Anbindung und anschließende Elution der aktiven $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase gelang, war bei einer Beladung der Säule mit Ni^{2+} und der anschließenden Elution mit 500 mM Imidazol. Von der aufgetragenen Aktivität konnten dabei 80 % eluiert werden, und es wurde eine 3fache Anreicherung erzielt. Die Verwendung eines Imidazolgradienten (0 bis 500 mM Imidazol) zur Elution der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase führt bei ähnlicher Anreicherung zu einer deutlichen Verringerung der Ausbeute.

2.3.2.6 Gelfiltration mit Superdex 200 HR

Die Präparation nach der Metallchelatchromatographie enthält mit 500 mM NaCl eine sehr hohe Ionenstärke und zusätzlich noch 500 mM Imidazol. Mit der Gelfiltration steht eine

Methode zur Verfügung die eine weitere Aufreinigung ohne vorheriges umpuffern erlaubt. Die vereinigten, aktiven Fraktionen der IMAC wurden aufkonzentriert und auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Es wurden 13 % der aufgetragenen Aktivität bei einer 4fachen Anreicherung eluiert.

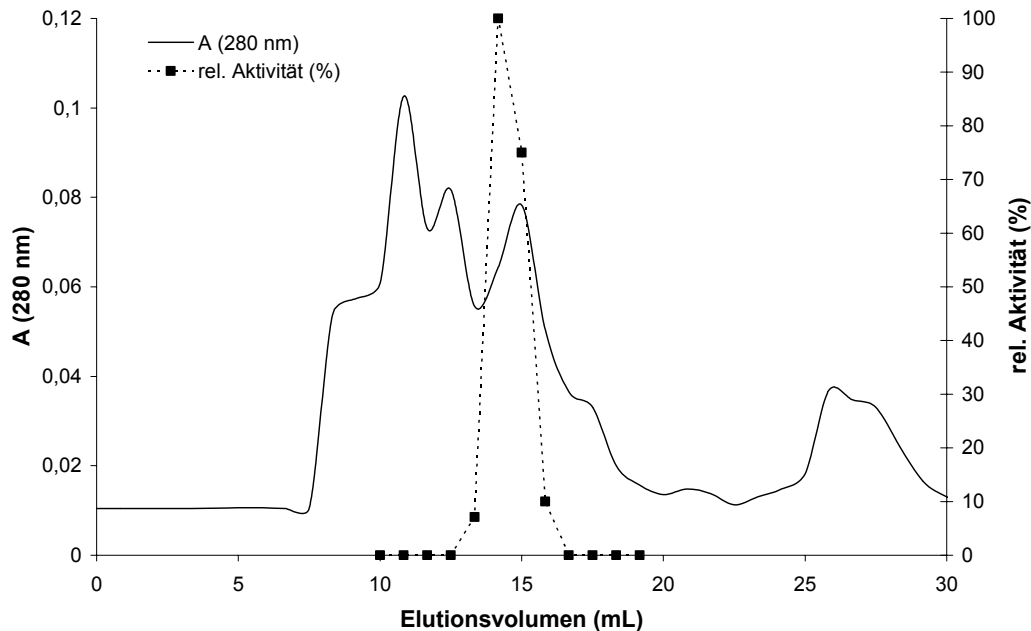


Abbildung 32: Elutionsprofil der Gelfiltration an Superdex 200 HR (24 mL-Säule; Elutionspuffer: 40 mM Tris/HCl (pH 7,7), 50 mM Imidazol, 400 mM NaCl; Flußrate: 0,25 mL/min).

2.3.2.7 Zusammenfassung der Anreicherung der InsP₅/InsP₄-Phosphatase

Eine typische Anreicherung der InsP₅/InsP₄-Phosphatase ist in Tabelle 11 zusammengefaßt. Durch die Etablierung von zwei neuen Reinigungsschritten konnte eine 179fache Anreicherung bei einer Ausbeute von 9 % erreicht werden.

Reinigungsstufe	Gesamtprotein (mg)	spez. Aktivität (mU/mg)	Gesamt- aktivität (mU)	Anreicherung	Ausbeute (%)
Cytosol. Extrakt	300	1,02	306	1	100
Heparin-Agarose	17,5	16,3	285	16	93
IMAC	5	45,6	228	45	75
Gelfiltration	0,16	183	29	179	9

Tabelle 11: Zusammenfassung einer exemplarischen Anreicherung der InsP₅/InsP₄-Phosphatase. Alle Werte beziehen sich auf 1·10¹⁰ Zellen als Ausgangsmaterial.

Höhere Anreicherungen lassen sich wahrscheinlich nur noch durch den Einsatz der Liganden-Affinitätschromatographie erreichen. Als Ligand würde sich z. B. InsP₆ eignen, ein Inhibitor der InsP₅/InsP₄-Phosphatase. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß 1mM InsP₆ zu einer

45%igen Inhibierung der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase führt. Es wurde versucht ein solches InsP_6 -Affinitätsmaterial darzustellen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Kapitel 2.4.1 zusammengefaßt.

2.3.3 Eigenschaften der Inositolpentakis-/Inosoltetrakisphosphat-Phosphatase

2.3.3.1 Molekulargewicht

Das Molekulargewicht der nativen $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase wurde durch Gelfiltration an Superdex 200 HR in Gegenwart von Imidazol (40 mM Tris/HCl, 50 mM Imidazol, 400 mM NaCl, pH 7,7) bestimmt und beträgt 120 kDa. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 33 dargestellt.

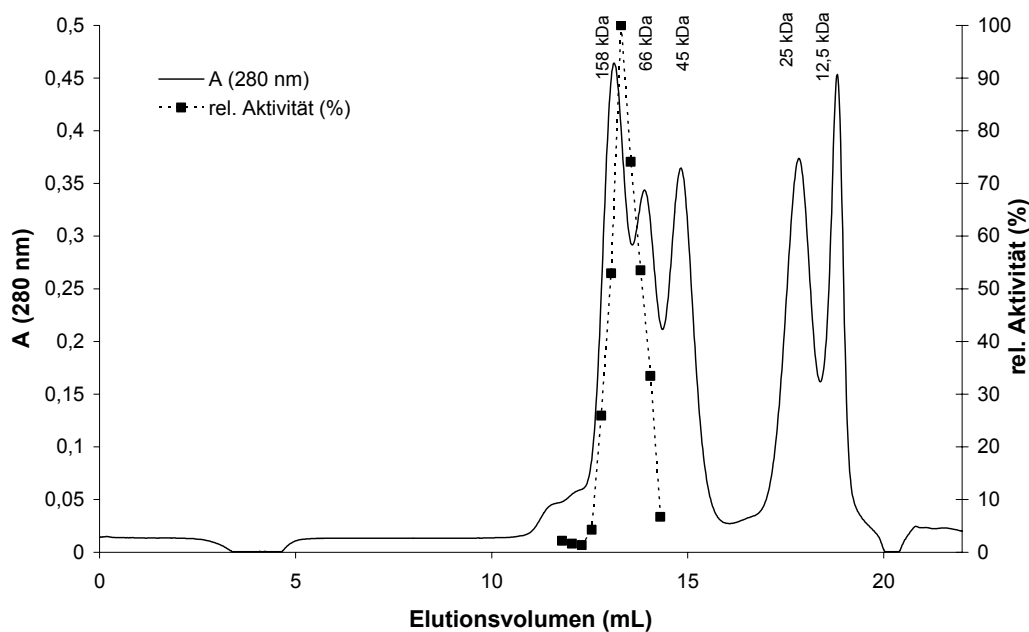


Abbildung 33: Ermittlung der Molmasse des nativen Enzyms durch Gelfiltration an Superdex 200 HR (24 mL-Säule; Elutionspuffer: 40 mM Tris/HCl (pH 7,7), 50 mM Imidazol, 400 mM NaCl; Flußrate: 0,25 mL/min).

2.3.3.2 pH-Abhängigkeit

Die Änderung der Enzymaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert wurde für den Bereich von pH 4,5 bis pH 9,5 bestimmt. Es ist zu erkennen, daß das Enzym über einen sehr breiten pH-Bereich aktiv ist. Die Aktivität steigt sehr schnell an, mit einem Maximum bei pH 5,5 fällt dann aber nur sehr langsam wieder ab (Abbildung 34). Das saure pH-Optimum deutet auf eine Beteiligung von sauren Aminosäuren im aktiven Zentrum hin.

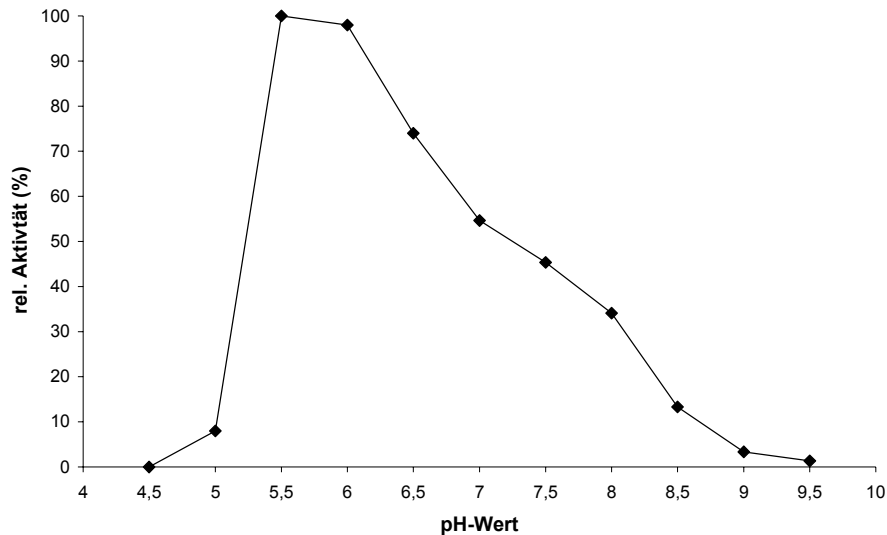


Abbildung 34: pH-Abhängigkeit der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase (Testbedingungen: 50 mM Puffer, 1 mM MgCl_2 , 0,1 % Triton X-100, Inkubation bei RT. Es wurde eine, durch Chromatographie an Heparin-Agarose, angereicherte Enzympräparation verwendet. Eingesetzte Puffer: pH 4,5 – 5,5: 50 mM Natriumacetat; pH 5,5 – 7,5: 50 mM Bis-Tris; pH 7,5 – 9,5: 50 mM Tris).

2.3.3.3 Temperaturabhängigkeit

Die Temperaturabhängigkeit der Aktivität der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase wurde in dem Bereich von 0 °C bis 60 °C bestimmt. Die Enzymaktivität nimmt kontinuierlich zu, bis sie bei 40 °C ein Maximum erreicht. Bei höheren Temperaturen nimmt die Enzymaktivität stark ab (Abbildung 35).

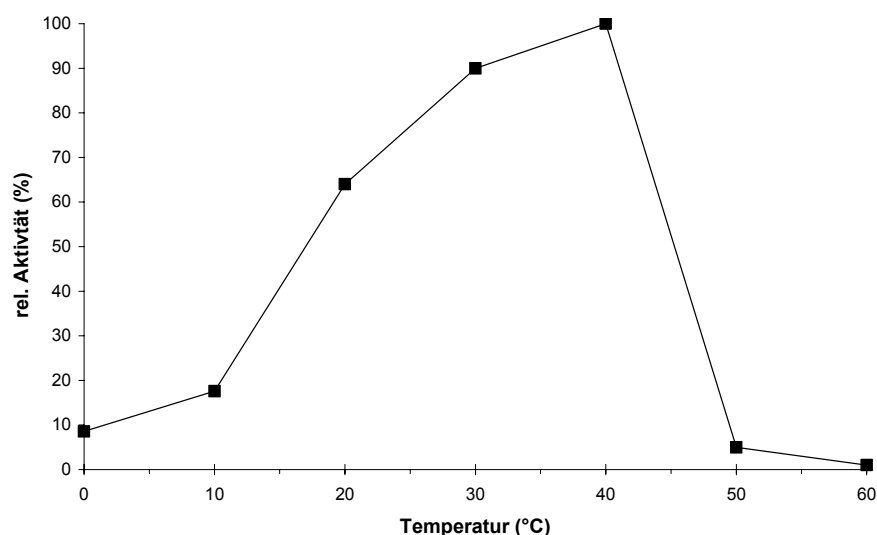


Abbildung 35: Temperaturabhängigkeit der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase (Testbedingungen: 50 mM Mes/ Na^+ (pH 5,5), 1 mM MgCl_2 , 0,1 % Triton X-100. Es wurde eine, durch Chromatographie an Heparin-Agarose, angereicherte Enzympräparation verwendet.).

2.3.3.4 Substratspezifität

Eine Vielzahl von Inositolphosphaten wurde auf ihre Eignung als mögliches Substrat der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase geprüft (Adelt 1999, Adelt *et al.* 1999). Dabei stellte sich heraus, daß die Substrate InsP_5 - und InsP_4 -Isomere sind, die mindestens eine *vicinal trans*-ständigen Hydroxylgruppe neben der zu dephosphorylierenden Position besitzen. Es können, mit Ausnahme von Position 2, alle Positionen am *myo*-Inositolring dephosphoryliert werden. Eine besondere Eigenschaft der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase ist, daß spiegelbildliche Positionen von Enantiomeren mit nahezu gleicher Geschwindigkeit umgesetzt werden. Das Enzym besitzt also eine hohe Regiospezifität kombiniert mit einer geringen Stereospezifität.

Die enantiomerenreine Synthese von Amino-*myo*-Inositolen wurde von Dr. Podeschwa (Organische Chemie, Arbeitskreis Prof. Altenbach, BU Wuppertal) etabliert (Podeschwa *et al.* 2003). Amino-Derivate von *myo*-Inositol zeigen interessante pharmakologische Wirkungen: So konnte bei Experimenten in Zellkulturen eine wirksame Inhibierung des Zellwachstums festgestellt werden, was diese Verbindungen als potentielle Antitumor-Therapeutika interessant macht (Powis *et al.* 1991). Bei einigen Amino-Derivaten wurde auch eine antibiotische Wirkung nachgewiesen (Legler 1990). Durch die Kooperation standen mehrere Amino-*myo*-Inositolpentakisphosphate ($3\text{-NH}_2\text{-Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$, $4\text{-NH}_2\text{-Ins}(1,2,3,5,6)\text{P}_5$, $6\text{-NH}_2\text{-Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$) zur Verfügung, die alle Eigenschaften eines potentiellen Substrat der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase aufweisen. Sie besitzen nur anstelle der benötigten *trans*-ständigen Hydroxylgruppe eine entsprechende Aminogruppe. Unter physiologischen Bedingungen sind die Amino-*myo*-Inositolphosphate in der NH_3^+ -Form. Da die NH_3^+ -Gruppe ungefähr dieselben sterischen Ansprüche hat wie eine OH-Gruppe kann der biologische Effekt eines positiv geladenen Substituenten beobachtet werden. Es ergibt sich die Frage, ob die Amino-*myo*-Inositolphosphate dennoch als Substrat erkannt werden und welchen Einfluß die Aminogruppe auf die Spezifität des Enzyms hat. Daher wurde die von der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase katalysierte Dephosphorylierung der Amino-Inositolphosphate untersucht. Dabei zeigte sich, daß alle untersuchten Amino-*myo*-Inositolpentakisphosphate von der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase hydrolysiert werden. Der Abbau verläuft dabei über definierte Zwischenstufen und es kommt zu einer Anreicherung eines Amino-*myo*-Inositoltrisphosphates, wie es auch beim Abbau der entsprechenden *myo*-Inositolpentakisphosphate beobachtet wird. Im Fall von $3\text{-NH}_2\text{-Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ wurde das Abbauprodukt isoliert und charakterisiert, es handelt sich um $3\text{-NH}_2\text{-Ins}(1,2,6)\text{P}_3$ (Abbildung 36). Bei früheren Untersuchungen zur Substratspezifität der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase wurde das Abbauprodukt von *myo*- $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ als *myo*- $\text{Ins}(1,2,6)\text{P}_3$ identifiziert (Adelt 1999). Dies zeigt, daß sich eine Aminogruppe bei der

Dephosphorylierung durch die $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase genauso verhält wie eine OH-Gruppe. Da die Aminogruppe unter physiologischen Bedingungen eine positive Ladung trägt ist für die Substraterkennung offenbar von geringer Bedeutung.

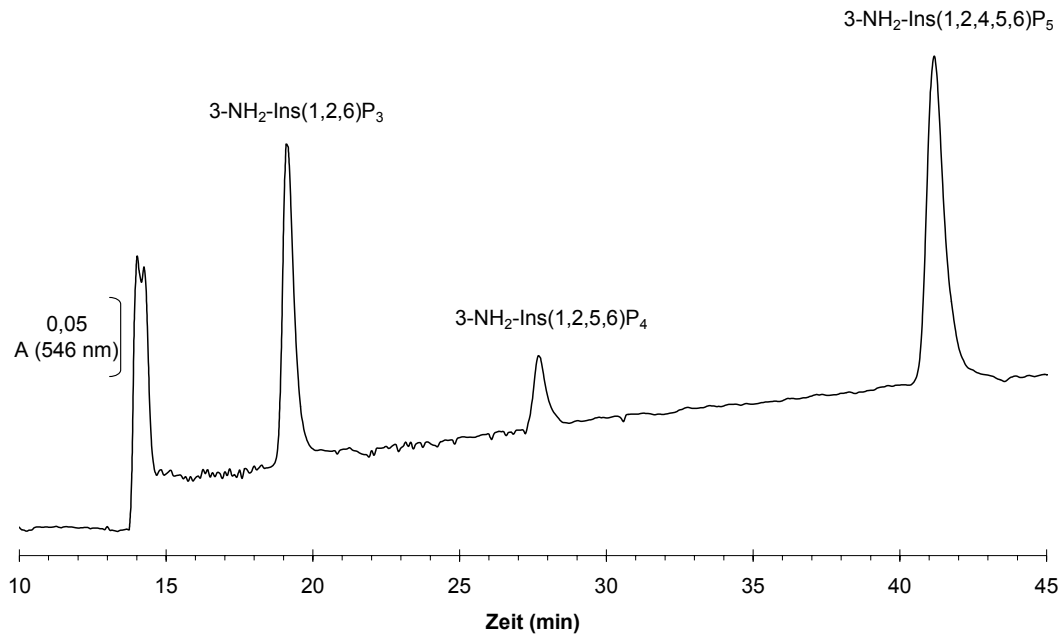


Abbildung 36: Abbau von $3\text{-NH}_2\text{-Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ durch die $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase.

2.3.3.5 Einfluß von Metallionen

Die $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase ist nicht Mg^{2+} -abhängig, allerdings führt Mg^{2+} zu einer leichten Erhöhung der Enzymaktivität. Das monovalente Lithium hat keinen erkennbaren Einfluß auf die Aktivität der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase, während Ca^{2+} inhibitorisch wirkt ($[\text{I}]_{50} = 14 \text{ mM}$).

Kation	rel. Aktivität (%)
1 mM Mg^{2+}	101
10 mM Mg^{2+}	117
1 mM Li^+	98
10 mM Li^+	102
1 mM Ca^{2+}	91
10 mM Ca^{2+}	59

Tabelle 12: Einfluß der Kationen Mg^{2+} , Li^+ und Ca^{2+} auf die Aktivität der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase (Testbedingungen: 50 mM Mes/ Na^+ (pH 5,5), 1 mM MgCl_2 , 0,1 % Triton X-100. Es wurde eine, durch Chromatographie an Heparin-Agarose, angereicherte Enzympräparation verwendet.).

2.4 Eine membrangebundene Phytase aus *Dictyostelium discoideum*

Die Phytase aus *D. discoideum* wurde standardmäßig mit Hilfe eines etablierten, dreistufigen Verfahrens angereichert, bestehend aus Solubilisierung mit Triton X-100 und anschließender Biochromatographie an Q-Sepharose und Resource Q. Mit diesen Verfahren wird eine 260fache Anreicherung erreicht, bei einer Ausbeute von 6 - 7 % (Knipp 1996). Mit konventionellen Aufreinigungsmethoden war eine weitere Anreicherung der Phytase nicht möglich. Daher konzentrierten sich die Arbeiten auf die Synthese von Säulenmaterialien die zur Aufreinigung der Phytase geeignet sein könnten. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde in der Regel die durch die Dephosphorylierung von InsP_6 freigesetzte Phosphatmenge photometrisch verfolgt. In Fällen, bei denen eine photometrische Aktivitätsbestimmung nicht möglich war, wurde die Aktivität mittels HPLC-MDD (saures Elutionssystem) durch die Messung der Abnahme von InsP_6 bestimmt.

2.4.1 Versuche zur Synthese von Affinitäts-Materialien

Die Liganden-Affinitätschromatographie ist das leistungsfähigste Chromatographieverfahren zur Aufreinigung von Proteinen. Bei diesem Verfahren sind Anreicherungen von 1000 und mehr möglich, bei Ausbeuten zwischen 10 % und 50 %. Die Voraussetzung ist, daß ein geeigneter Ligand gefunden wird, der an das Protein bindet und sich ohne Affinitätsverlust an eine Matrix koppeln läßt. Mit $\text{Ins}(\text{SO}_4)_6$ stand eine Verbindung zur Verfügung, die bereits bei geringen Konzentrationen zu einer Inhibierung der Phytase führte ($[\text{I}]_{50} = 0,1 \mu\text{M}$), allerdings fehlte noch eine funktionelle Gruppe, die die Kopplung an eine Matrix erlaubte. Mit der Synthese von $\text{Ins}(\text{SO}_4)_5\text{NH}_2$ gelang Dr. Plettenburg (Organische Chemie, Arbeitsgruppe Prof. Altenbach, BU Wuppertal) die Darstellung einer Verbindung, die als Inhibitor der Phytase wirkte und sich gleichzeitig durch eine primäre Aminogruppe als Ligand zur Immobilisierung eignen sollte. Als Matrix für die Kopplungsreaktionen wurde epoxyaktivierte Sepharose 6B (Pharmacia LKB) ausgewählt. Es handelt sich um ein vielseitiges Material, daß sich zur Kopplung von Liganden eignet, die Hydroxyl-, Amino- oder Thiolgruppen enthalten. Der relativ lange Spacer (13 Atome) ist besonders nützlich für die Immobilisierung von kleinen Liganden. Da $\text{Ins}(\text{SO}_4)_5\text{NH}_2$ nicht mit der HPLC-MDD detektiert werden konnte, wurde der Verlauf der Kopplungsreaktionen durch die Bestimmung der inhibitorischen Wirkung von nicht umgesetzten $\text{Ins}(\text{SO}_4)_5\text{NH}_2$ verfolgt. Auch bei nicht nachweisbarer Kopplungsreaktion ($\leq 5\%$) wurde zusätzlich noch geprüft, ob das Material in der Lage war die Phytase aus *D. dictyostelium* zu binden.

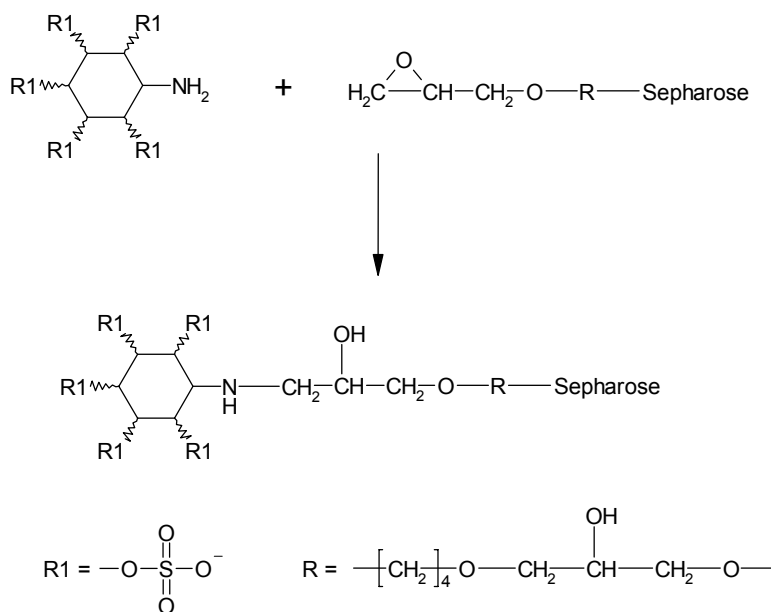


Abbildung 37: Kopplung von Ins(SO₄)₅NH₂ an Epoxy-aktivierte Sepharose.

Bei der Durchführung der Immobilisierung können eine Reihe von Parametern variiert werden: Verhältnis Ligand/Bindestellen, Temperatur, Reaktionsdauer und pH-Wert. Übliche Kopplungsbedingungen sind eine Reaktionsdauer von 16 h bei 20 - 45 °C und einem 10fachen Überschuß an Bindestellen gegenüber dem Liganden. Die verwendete epoxyaktivierte Sepharose 6B ist für Kopplungen im Bereich pH 9 - 13 geeignet. Der maximale pH-Wert ist limitiert durch die Stabilität des Liganden, der Kohlenhydrat-Seitenkette der Matrix und der Epoxygruppe. Besonders die Stabilität der Epoxygruppe ist dabei zu beachten. Bei pH 9,5 und 40 °C sind nach 10 h Inkubation ca. 35 % der Epoxide hydrolysiert, während bei pH 11 unter den gleichen Bedingungen schon 65 % der Epoxide hydrolysiert sind. In verschiedenen Versuchsreihen wurde versucht, die Reaktionsbedingungen für die Kopplung zu optimieren. Als wichtigste Faktoren für eine erfolgreiche Kopplungsreaktion wurden das Verhältnis Ligand/Bindestelle und der pH-Wert betrachtet. Daher wurden die Versuche sowohl mit einem 10fachen als auch einem 50fachen Überschuß an Ins(SO₄)₅NH₂ gegenüber den Bindestellen durchgeführt. Zur Ermittlung des optimalen pH-Wertes für die Kopplungsreaktion wurde der pH-Wert in Schritten von einer pH-Einheit bei pH 9 beginnend bis pH 13 erhöht. Unabhängig vom Verhältnis Ins(SO₄)₅NH₂/Epoxid konnte selbst bei pH 13, einer Temperatur von 22 °C und einer Reaktionsdauer von 24 h keine Kopplung nachgewiesen werden. Auch eine Erhöhung der Temperatur auf 37 °C brachte nicht den erhofften Erfolg. Ein möglicher Grund dafür, daß die Kopplung von Ins(SO₄)₅NH₂ an epoxyaktivierte Sepharose 6B nicht gelang, könnte in der Struktur von Ins(SO₄)₅NH₂ selbst liegen. Da Ins(SO₄)₅NH₂ mit den Sulfatgruppen sehr starke

Protonendonatoren und mit der Aminogruppe, aufgrund ihres pK-Wertes, einen Protonenakzeptor enthält, kann es zu einer intramolekularen Salzbildung zwischen diesen Gruppen kommen und damit steht die Aminogruppe nicht mehr für einen nucleophilen Angriff auf das Epoxid zur Verfügung. Unter Umständen reicht dann selbst ein pH-Wert von 13 nicht aus, um eine freie Aminofunktion für den nucleophilen Angriff auf das Epoxid zu erzeugen. Um die intramolekulare Salzbildung zu verhindern, sollte die Aminogruppe nicht direkt an den Inositolring gebunden werden sondern über einen Spacer, der die Sulfat- und Aminogruppe räumlich soweit voneinander trennt, daß eine Salzbildung unterbunden wird. Mit einem so modifizierten Liganden sollte dann eine Immobilisierung erfolgreich durchführbar sein.

Als zweites wurde versucht, ein InsP_6 -Affinitätsmaterial zu synthetisieren. Mit diesem Material sollte sowohl die Phytase als auch die $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase aufgereinigt werden, da letztere durch InsP_6 inhibiert wird. Da bei der Aufreinigung der Phytase aus *D. discoideum* das Säulenmaterial wahrscheinlich teilweise durch Dephosphorylierung zerstört würde, sollte das Material möglichst einfach, schnell und preiswert herzustellen sein. Da mit Phytinsäure ein Ligand verwendet wurde, der für die Kopplung nur Phosphatgruppen zur Verfügung hat mußte nach einer Möglichkeit gesucht werden, wie diese Phosphatgruppen, nach einer vorherigen Aktivierung, zur Synthese eines Affinitätsmaterials ausgenutzt werden können. In der Literatur werden Verfahren für die Kopplung von Proteinen oder die Synthese von Oligonukleotiden mit Hilfe von 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid (EDC) beschrieben (Grabarek & Gergely 1990; Kuznetsova *et al.* 1998). Dabei wird EDC als Reagenz für die Aktivierung von Carboxyl- oder Phosphatgruppen und anschließende Kopplung an Amine verwendet. Damit war es theoretisch das geeignete Reagenz, das die Kopplung von InsP_6 an eine aminoaktivierte Matrix erlauben sollte (Abbildung 38).

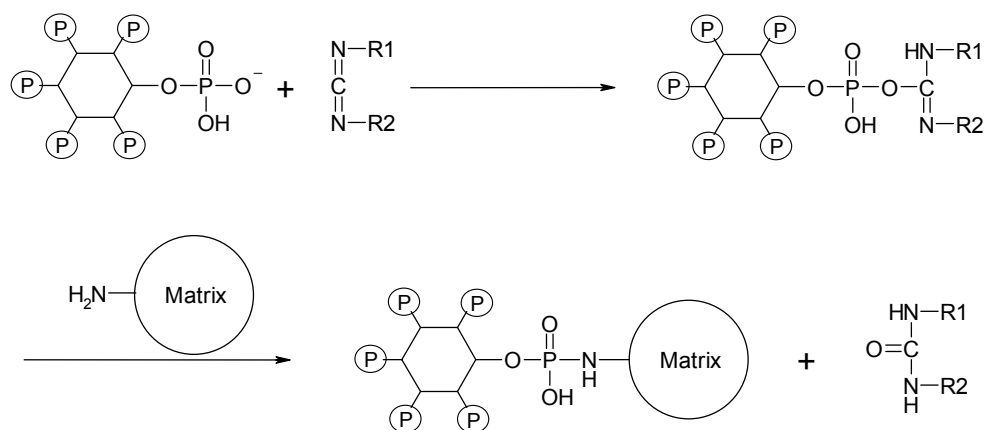


Abbildung 38: Immobilisierung von *myo-InsP*₆ mit EDC als Crosslinker.

Die Verwendung von EDC als Kopplungsreagenz hat dabei auch den Vorteil, daß überschüssiges Reagenz oder das bei der Kopplungsreaktion entstehende entsprechende Harnstoff-Derivat sich leicht durch Waschen mit Wasser oder verdünnten Säuren entfernen lassen. Die Kopplungsreaktionen wurden zwischen pH 4,5 und 7 durchgeführt. Zwischen pH 4,5 und 5 ist die Reaktion laut Literatur am schnellsten und in vielen Fällen schon nach wenigen Minuten beendet. Die Hydrolyse von EDC ist die Konkurrenzreaktion zu der Kopplung. Die Geschwindigkeit ist von der Temperatur, dem pH-Wert sowie dem verwendeten Puffer abhängig. Puffer die primäre Amine enthalten (z. B. Tris) oder Phosphatpuffer sind für die Kopplungsreaktionen ungeeignet, da es zu Reaktionen mit dem EDC kommt die dessen Effizienz als Kopplungsreagenz stark einschränken können. Für die Versuche wurde daher ein Mes-Puffer verwendet. Als Matrix für die Kopplung wurde (Aminomethyl)polystyrol verwendet, da es ein sehr preiswertes Material ist und in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Um den Verlauf der Kopplungsreaktionen zu verfolgen wurden aus dem Reaktionsansatz zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und mittels HPLC-MDD (saurer Elutionssystem) untersucht. Bei nichtnachweisbarer Kopplungsreaktion wurde nach Abschluß der Reaktion das (Aminomethyl)polystyrol-Harz mit Schwefelsäure hydrolysiert, um anschließend das aus dem gebundenen InsP_6 freigesetzte Phosphat photometrisch zu bestimmen. Diese Methode ist zwar aufwendig aber präziser als die HPLC-MDD Analytik, selbst geringste Mengen an gebundenem InsP_6 können so nachgewiesen werden. In den ersten Versuchsreihen wurde EDC und (Aminomethyl)polystyrol in einem 10- bzw. 50fachen Überschuß gegenüber InsP_6 eingesetzt. Da InsP_6 aber sechs Phosphatgruppen besitzt mit denen es reagieren kann, wurde bei anschließenden Versuchen dieser Überschuß noch versechsfacht. Die Reaktionsansätze wurden entweder bei 22 °C oder bei 37 °C auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Trotz zahlreicher Variation der Reaktionsbedingungen konnte keine Anbindung von InsP_6 an (Aminomethyl)polystyrol nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund könnte eine schnelle Hydrolyse der EDC-aktivierten Phosphatgruppen sein, so daß sie für eine Kopplungsreaktion dann nicht mehr zur Verfügung standen.

2.4.2 Verankerung der Phytase in der Zellmembran

Proteine können auf verschiedene Weise mit Membranen verbunden sein. Die integralen Membranproteine durchspannen mit Transmembran-Helices die Lipid-Doppelschicht, während die peripheren Membranproteine z. B. mit einem Lipidanker an die Membran gebunden sind. Als Membrananker dienen dabei Fettsäuren oder Isoprenoide. Auch eine

Kopplung von Proteinen an glykosyliertes Phosphatidylinositol (GPI) ist möglich, so handelt es sich z. B. bei der alkalischen Phosphatase und der Acetylcholin-Esterase aus Säugerzellen um GPI-verankerte Membranproteine. Frühere Untersuchungen zur Phytase aus *D. discoideum* führten zu der Vermutung, daß es sich um ein GPI-verankertes Enzym handeln könnte. Die bakterielle Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) spaltet die meisten GPI-verankerten Proteine in der Weise, daß das Protein in löslicher Form von der intakten Zelle oder einer Membranpräparation freigesetzt wird, dabei spalten sie Phosphatidylinositol zwischen dem Diacylglycerol-Rest und der Phosphatgruppe (Abbildung 39).

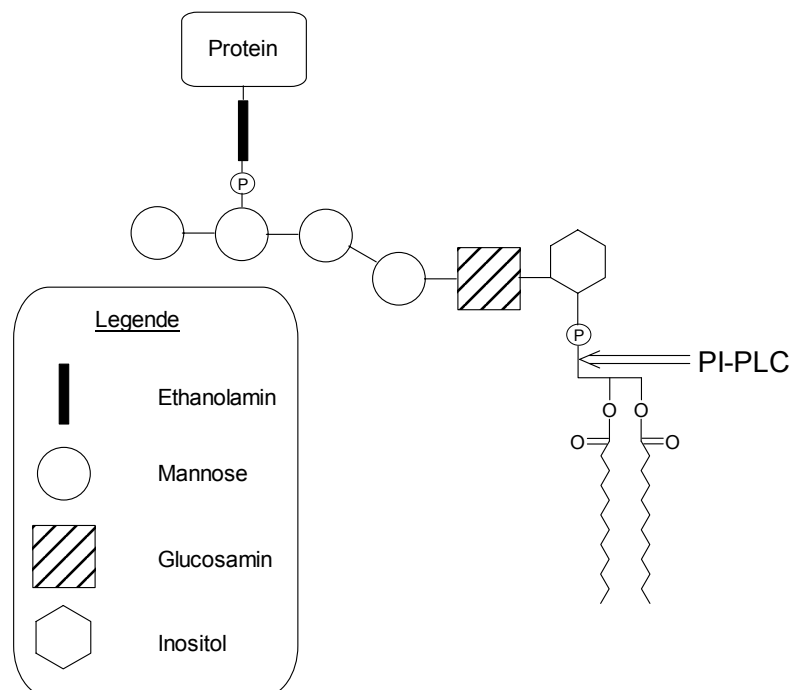


Abbildung 39: Spaltung eines GPI-Ankers durch eine bakterielle PI-PLC.

Diese Spaltung ist das bei der Identifizierung von GPI-verankerten Proteinen gebräuchlichste Merkmal (Ferguson 1988) und sollte auch bei der Phytase aus *D. discoideum* Klarheit die Frage klären, ob die Phytase GPI-verankert ist oder nicht. Für die Untersuchung wurden drei Membranpräparationen von *D. discoideum* parallel mit 500 mU PI-PLC, 100 mM Na₂CO₃ (alkalische Hydrolyse) und zur Kontrolle mit 1 % Triton X-100 (Solubilisierung der Membran) behandelt. Nach der Inkubation wurden die unlöslichen Bestandteile durch Ultrazentrifugation abgetrennt und der erhaltene Überstand mit Hilfe der HPLC-MDD auf Phytaseaktivität untersucht. Während bei den Proben nach der PI-PLC Behandlung keine Aktivität nachweisbar war, ließ sich die Phytase mit Hilfe der alkalischen Hydrolyse

extrahieren. Die gefundenen Aktivitäten lagen in demselben Bereich wie bei den mit Triton X-100 behandelten Kontrollproben.

Die Ergebnisse sprechen dafür, daß es sich bei der Phytase aus *D. discoideum* nicht um ein GPI-verankertes Enzym handelt. Andere periphere Membranproteine lassen sich mit Hilfe einer hohen Ionenstärke oder durch die Behandlung mit Basen extrahieren. Die gefundene Aktivität bei der alkalischen Hydrolyse ist damit ein deutlicher Hinweis auf ein peripheres Enzym. Gestützt wird dies durch die Tatsache, daß bei der Extraktion mit der alkalischen Hydrolyse und der Solubilisierung mit Triton X-100 fast dieselben Phytaseaktivitäten beobachtet werden.

2.5 Die Stereo- und Regiospezifität von Phytasen aus Hefen

Viel ist über die biologischen Funktionen von *myo*-Inositolphosphaten bekannt, allerdings gibt es nur wenige Informationen über die Bedeutung anderer Inositol-Isomere und ihrer Derivate. In einigen Publikationen wurde über das Auftreten geringer Konzentrationen von *scyllo*-, *chiro*- und *neo*-Inositol in tierischen Geweben berichtet (Sherman *et al.* 1968a, Shermann *et al.* 1971) und aus der Leber von Rindern wurde L-*chiro*-Inositol isoliert (Bruzik *et al.* 1994). Im Boden werden die Phosphorsäureester von *scyllo*-, *chiro*- und *neo*-Inositol gefunden (Turner *et al.* 2002), während sie in der belebten Natur jedoch selten sind. Es ergibt sich die Frage, ob Enzyme speziell für die genannten Isomere existieren oder ob die Existenz der Verbindungen aus einem Fehlen der Spezifität bei Umsetzungen von Enzymen aus dem *myo*-Inositolphosphat-Stoffwechsel resultiert. Um diese Frage zu klären wurde die von Phytasen katalysierte Dephosphorylierung von *myo*-InsP₆, *neo*-InsP₆ und L-*chiro*-InsP₆ durch ganze Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* und einer sekretierten Enzymaktivität von *Pichia rhodanensis* untersucht. Die *myo*-Inositolhexakisphosphat Stereoisomere *neo*-InsP₆ und L-*chiro*-InsP₆ wurden dafür ausgehend von enantiomerenreinen Konduritolderivaten chemisch von Dr. Podeschwa (Organische Chemie, Arbeitskreis Prof. Altenbach, BU Wuppertal) synthetisiert. Die beiden Hefen zeichnen sich durch einen besonders einfachen Zugang zu den zu untersuchenden Aktivitäten aus. Werden andere Substrate neben *myo*-InsP₆ umgesetzt, kann ein Vergleich der Abbauewege auf die strukturellen Motive schließen die zur Substraterkennung dienen.

2.5.1 Stereo- und Regiospezifität des Abbaus von *myo*-InsP₆ durch die Phytasen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia rhodanensis*

Die Ganzzellbiotransformation von *myo*-InsP₆ mit der Phytase aus Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) ist in der Literatur beschrieben worden (Sirén 1986; Blum *et al.* 1995). Dabei wird *myo*-InsP₆ über eine stereo- und regiospezifische Route dephosphoryliert (Greiner *et al.* 2001). Für die nachfolgenden Experimente wurde diese Phytase als ein Beispiel für ein hochspezifisches Enzym ausgewählt. Bei der Phytase aus *P. rhodanensis* ergaben Vorversuche Hinweise auf ein komplexeres Abbauverhalten. Die Phytase von *P. rhodanensis* wird in das Medium sekretiert und kann durch die Fällung mit Ethanol aus dem Überstand der Kultur schnell und mit einer Wiederfindung von 80 % der Gesamtaktivität angereichert werden. Die Verwendung einer angereicherten Enzympräparation anstatt ganzer Zellen bietet eine Reihe von Vorteilen: keine Kontamination durch eine mögliche Lyse der Zellen und bei der Arbeit mit ganzen Zellen hat man es oft mit Einschränkungen auf einen schmalen Temperatur- oder pH-Bereich zu tun.

Die Chromatogramme in Abbildung 40 zeigen die schrittweise Dephosphorylierung von *myo*-InsP₆ durch die Phytasen von *S. cerevisiae* (Chromatogramm a) und *P. rhodanensis* (Chromatogramm b), die verwendete achirale Methode erlaubt keine Differenzierung zwischen den Enantiomeren, allerdings wurde für die Phytase aus *S. cerevisiae* die absolute Konfiguration des angereicherten *myo*-InsP₃-Isomers bestimmt (Sirén 1986). Es handelt sich dabei ausschließlich um D-*myo*-Ins(1,2,6)P₃ (Alpha-Trinositol), eine Verbindung mit einem interessanten pharmakologischen Profil (Sirén 1991). Die Vorstufen wurden durch Cochromatographie mit Standards als D-*myo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅ und D-*myo*-Ins(1,2,5,6)P₄ identifiziert. Dieser Abbauweg stimmt mit dem überein, der von Greiner *et al.* (2001) für die reine Phytase aus *S. cerevisiae* beschrieben wurde. Es macht also offensichtlich keinen Unterschied, ob mit ganzen Zellen oder mit dem reinen Enzym gearbeitet wird. Für die Phytase aus *P. rhodanensis* wurden die folgenden Zwischenstufen beim Abbau von *myo*-InsP₆ beobachtet: Ins(1,2,4,5,6)P₅/Ins(2,3,4,5,6)P₅, Ins(1,2,3,4,5)P₅/Ins(1,2,3,5,6)P₅, Ins(1,2,5,6)P₄/Ins(2,3,4,5)P₄, Ins(1,2,4,5)P₄/Ins(2,3,5,6)P₄ und InsP₃-Isomere.

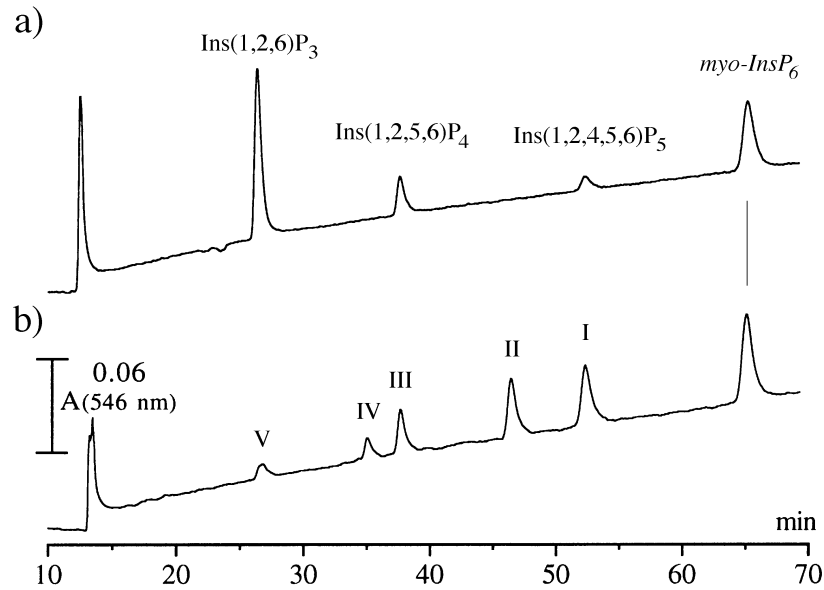


Abbildung 40: HPLC-MDD Chromatogramme die a) die *myo*- InsP_6 Dephosphorylierung durch die Phytase von *S. cerevisiae* und b) die entsprechende Reaktion der Phytase von *P. rhodanensis* zeigen (I: $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5/\text{Ins}(2,3,4,5,6)\text{P}_5$; II: $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5/\text{Ins}(1,2,3,5,6)\text{P}_5$; III: $\text{Ins}(1,2,5,6)\text{P}_4/\text{Ins}(2,3,4,5)\text{P}_4$; IV: $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4/\text{Ins}(2,3,5,6)\text{P}_4$; V: InsP_3 -Isomere).

Um Hinweise zu erhalten, ob die beobachteten Reaktionen durch ein einzelnes Enzym verursacht wurden, wurde mit der durch Ethanol-Fällung angereicherten Präparation eine Gelfiltration durchgeführt. Die Aktivität wurde als einzelner Peak mit einem ungefähren Molekulargewicht von 350 kDa und einer Wiederfindung von 70 % eluiert (Abbildung 41).

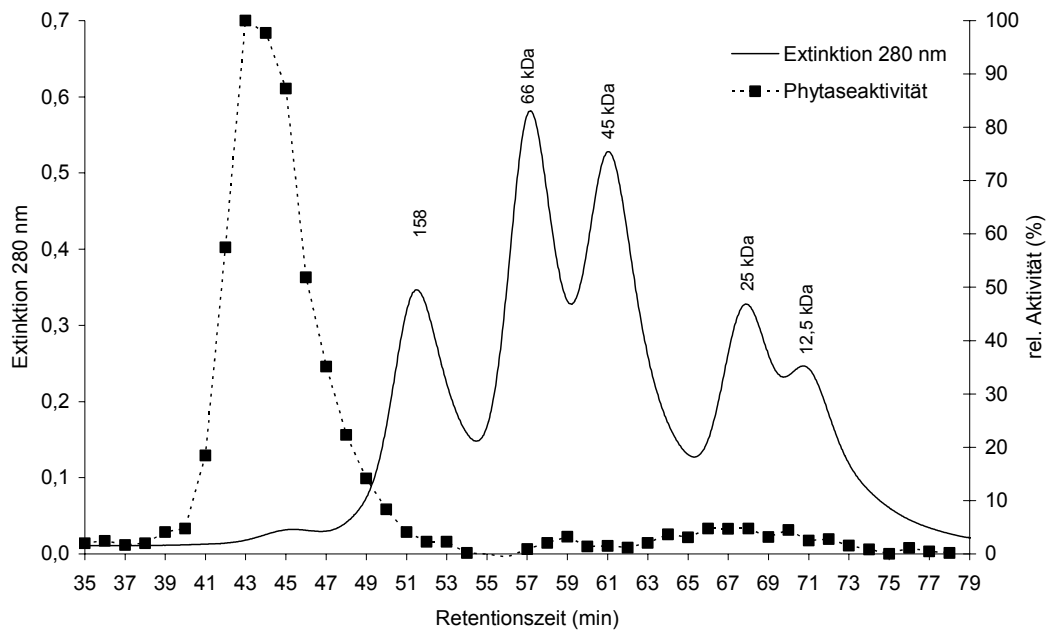


Abbildung 41: Abschätzung des Molekulargewichtes der Phytase aus *P. rhodanensis* durch Gelfiltration an Superdex 200 HR.

Ein Vergleich der Abbauege von *myo*-InsP₆ vor und nach der Gelfiltration zeigte keine Unterschiede, so daß es unwahrscheinlich ist, daß mehrere Enzymaktivitäten vorhanden sind und Beiträge zu dem gefundenen Abbaumuster leisten. Die Phytaseaktivität von *P. rhodanensis* wird fast vollständig ($\geq 90\%$) durch 100 μM des Pseudosubstrates *myo*-Inositolhexakissulfat inhibiert. Sollten an diesen Reaktionen verschiedene Aktivitäten beteiligt sein so teilen sie diese Eigenschaft.

Um die Substratspezifität der Phytasen mit *neo*-InsP₆ und *L-chiro*-InsP₆ zu untersuchen, ist es wichtig, daß der exakte Abbauweg für *myo*-InsP₆ einschließlich der absoluten Konfiguration der Zwischenstufen bekannt ist. Durch den Einsatz einer partiell angereicherten Phytase aus *D. discoideum* konnte ein einfaches Verfahren zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit von *myo*-Inositolpentakisphosphaten entwickelt werden (Adelt *et al.* 2003). Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten die absoluten Konfigurationen der bei der Dephosphorylierung von *myo*-InsP₆ durch die Phytase aus *P. rhodanensis* gebildeten *myo*-Inositolpentakisphosphate (*D-myo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅ und *D-myo*-Ins(1,2,3,4,5)P₅) ermittelt werden und der Abbauweg für *myo*-InsP₆ mit Hilfe der HPLC-MDD bis hinunter zu den Inositoltrisphosphaten aufgeklärt werden. In Abbildung 42 ist der komplexe Abbauweg dargestellt. Die eingerahmte Reaktionssequenz zeigt das vergleichsweise einfache aber spezifische Abbaumuster durch die Phytase aus *S. cerevisiae*.

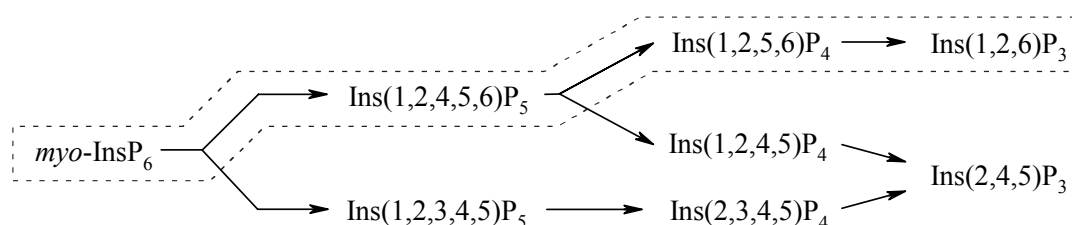


Abbildung 42: Hauptabbauege der Dephosphorylierung von *myo*-InsP₆ durch die Phytase von *P. rhodanensis* (die eingerahmte Reaktionssequenz ist charakteristisch für *S. cerevisiae*).

2.5.2 Abbau von *neo*-InsP₆ und *L-chiro*-InsP₆ durch die Phytasen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia rhodanensis*

Der offensichtliche Unterschied in der Struktur von *myo*-InsP₆ und *neo*-InsP₆ oder auch *L-chiro*-InsP₆ liegt in der Orientierung eines Substituenten (bestätigt durch NMR bei pH 5-7, Abbildung 43). Im Gegensatz zu *myo*-InsP₆, ist die Phosphatgruppe in Position 5 bei dem Epimer *neo*-InsP₆ axial orientiert, während bei *L-chiro*-InsP₆ eine axiale Phosphatgruppe in Position 3 (dies entspricht der Position 6 bei *L-chiro*-InsP₆) vorhanden ist.

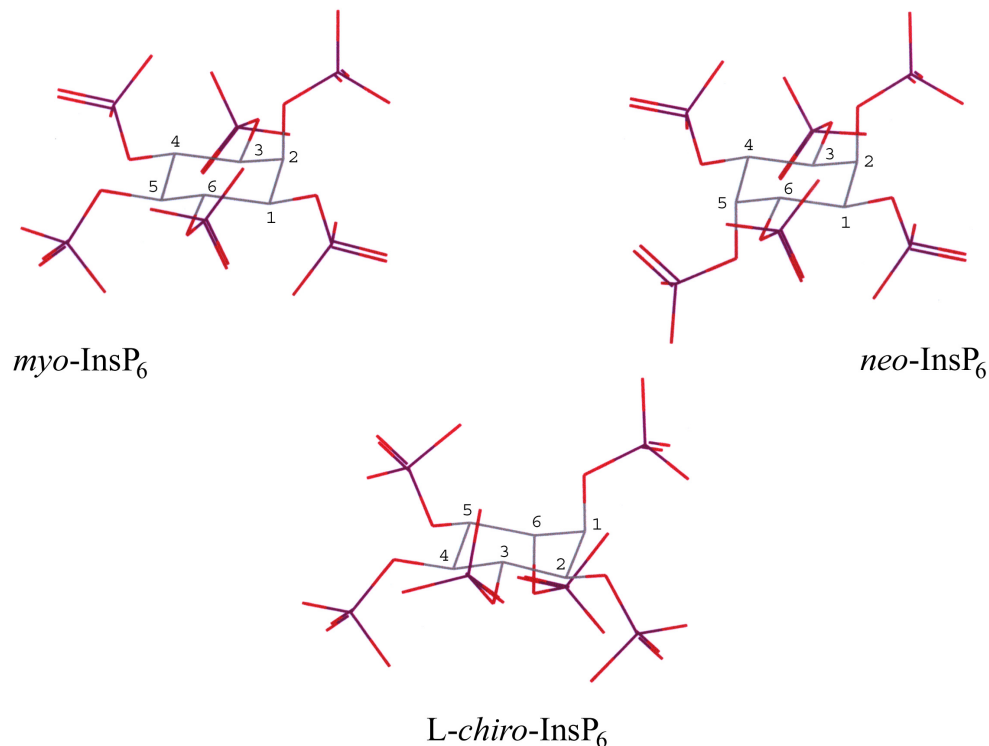


Abbildung 43: Molekulare Struktur und Numerierung der Kohlenstoffatome für die Inositolhexakisphosphat-Isomere.

Abbildung 43 gibt nur ein idealisiertes Bild der Strukturen in wässrigen Lösungen wieder, die räumliche Anordnung der Phosphatgruppen ist abhängig von der Protonierung und der Bildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen. Um zu untersuchen, ob die Phytasen aus *S. cerevisiae* und *P. rhodanensis* Abweichungen von der *myo*-Konfiguration tolerieren und auch die Dephosphorylierung von *neo*-InsP₆ und *L-chiro*-InsP₆ katalysieren, wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Umsetzungen verglichen. Für die kinetischen Messungen wurde das HPLC-MDD-System verwendet. Die Reaktionsbedingungen für die Umsetzung von *myo*-InsP₆ mit *S. cerevisiae* wurden der Literatur (Blum *et al.* 1995) entnommen. Bei vergleichenden Untersuchungen über Phytasen aus Hefen wurde ein Optimum der Aktivität im pH-Bereich 4 - 5 beobachtet (Nakamura *et al.* 2000). Der K_M -Wert für das partiell aufgereinigte Enzym aus *S. cerevisiae* beträgt 0,21 mM (Nayini & Markakis 1984) und für *P. rhodanensis* 0,25 mM (Nakamura *et al.* 2000). Um die Reaktionsgeschwindigkeiten miteinander vergleichen zu können, müssen sich die Enzyme in der Substratsättigung befinden. Bei einer Substratkonzentration von 1 mM *myo*-Inositolhexakisphosphat sollte dies sichergestellt sein. Um die Daten mit denen der angereicherten Phytase von *P. rhodanensis* vergleichen zu können, wurden für beide Fälle identische Reaktionsbedingungen gewählt: eine Temperatur von 45 °C, ein pH-Wert von 4,6 (Acetat-Puffer) und eine Substratkonzentration von 1 mM *myo*-InsP₆. *S. cerevisiae* ist unter

diesen Bedingungen für mehrere Stunden lebensfähig. Die Kinetiken wurden nur bis zu einem 30%igen Verbrauch des Substrats gemessen und die erhaltenen Kurven mittels linearer Regression ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefaßt. Für *S. cerevisiae* wurde die Aktivität im Verhältnis zum Feuchtgewicht der Zellen angegeben, während für *P. rhodanensis* die spezifische Aktivität angegeben ist. Die Ergebnisse sind überraschend, während *L-chiro*-InsP₆ von der Phytase aus *S. cerevisiae* nicht abgebaut wird, wird das natürliche Substrat *myo*-InsP₆ eindeutig langsamer abgebaut als *neo*-InsP₆. Für die Phytase aus *P. rhodanensis* ergibt sich ein anderes Bild: während *myo*-InsP₆ und *neo*-InsP₆ annähernd gleich schnell abgebaut werden, verläuft die Umsetzung von *L-chiro*-InsP₆ ungefähr doppelt so schnell. Alle verwendeten Inositolhexakisphosphate wurden vor der Verwendung mit Hilfe der HPLC aufgereinigt. Um die Möglichkeit auszuschließen, daß das verwendete *myo*-InsP₆ aus Weizen eventuell inhibitorisch wirkende Verunreinigungen enthält, wurden die Versuche mit aus Reis isoliertem *myo*-InsP₆ wiederholt. Die kinetischen Daten entsprachen dabei denen in Tabelle 13 und lagen innerhalb der Fehlergrenzen. Unter Berücksichtigung des Lebensraums von Hefen und der Tatsache, daß verschiedene Inositolhexakisphosphatisomere im Boden vorkommen (Turner *et al.* 2002) überrascht es nicht, daß die Enzyme in der Lage sind, neben *myo*-InsP₆ auch andere Isomere zu dephosphorylieren. Allerdings würde man erwarten, daß die Reaktion im Hinblick auf das natürliche Substrat *myo*-InsP₆ optimiert ist.

InsP ₆ -Stereoisomer	Phytase-Aktivität	
	<i>S. cerevisiae</i> (mU/mg Feuchtgewicht)	<i>P. rhodanensis</i> (mU/mg Protein)
<i>myo</i> -InsP ₆	0,13 ± 0,03	9,3 ± 1
<i>neo</i> -InsP ₆	0,55 ± 0,03	9,7 ± 1,1
<i>L-chiro</i> -InsP ₆	0	18,6 ± 0,5

Tabelle 13: Enzymaktivität der Phytasen aus *S. cerevisiae* und *P. rhodanensis* in Abhängigkeit von den verschiedenen InsP₆-Stereoisomeren.

Um zu klären, ob die Dephosphorylierung der Substratanaloga spezifisch oder unspezifisch abläuft, wurden HPLC-MDD Messungen durchgeführt, die Abbauprodukte isoliert und durch NMR-Spektroskopie charakterisiert. In Abbildung 44 sind die Chromatogramme für die Umsetzung der zwei synthetischen Inositolhexakisphosphate durch *S. cerevisiae* dargestellt. Während *L-chiro*-InsP₆ nicht dephosphoryliert wird (Chromatogramm b) kommt es bei der Umsetzung von *neo*-InsP₆ zu einer Anreicherung eines *neo*-Inositoltrakisphosphates (Chromatogramm a). Als mutmaßliche Vorstufe konnte nur ein *neo*-Inositolpentakisphosphat beobachtet werden, was auf eine spezifische enzymatische Umsetzung hindeutet. Selbst bei

einer kompletten Umsetzung des *neo*-InsP₆ zeigt sich für das *neo*-Inositoltrakisphosphat kein Anzeichen für einen weiteren Abbau. Um eine ausreichende Menge *neo*-InsP₄ für eine NMR-Analyse zu erhalten wurde der ursprünglich nur für kinetische Untersuchungen verwendete Reaktionsansatz entsprechend vergrößert. Die von der aufgereinigten Substanz erhaltenen Spektren weisen charakteristische chemische Verschiebungen und Kopplungsmuster für ein C₂-symmetrisches Molekül auf, bei dem die beiden axialen Positionen phosphoryliert sind. Die einzigen Strukturen die in Einklang mit den spektroskopischen Daten gebracht werden können sind die des Enantiomerenpaares *neo*-Ins(1,2,5,6)P₄/*neo*-Ins(2,3,4,5)P₄ (Abbildung 45). Es ist wahrscheinlich, daß die erste Dephosphorylierung an Position 3 stattfindet, wie es auch bei der stereospezifischen ersten Dephosphorylierung von *myo*-InsP₆ durch die Phytase aus *S. cerevisiae* beobachtet wird.

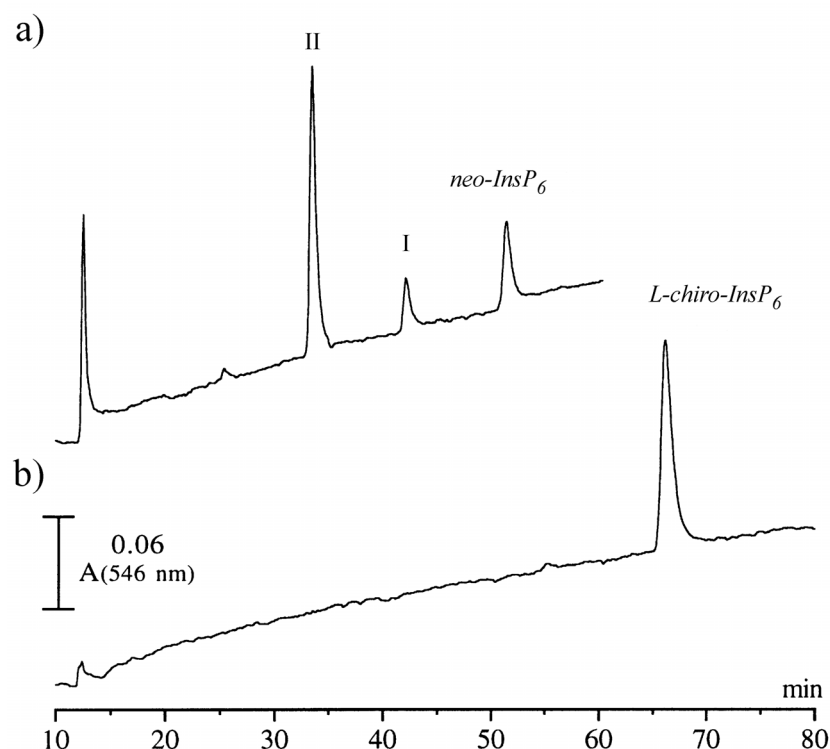


Abbildung 44: Chromatogramme der Dephosphorylierung von (a) *neo*-InsP₆ (I: *neo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅/*neo*-Ins(2,3,4,5,6)P₅, II: *neo*-Ins(1,2,5,6)P₄/*neo*-Ins(2,3,4,5)P₄) und (b) *L-chiro*-InsP₆ durch die Phytase aus *S. cerevisiae*.

In diesem Fall sollte es sich bei dem *neo*-Inositoltrakisphosphat um enantiomerenreines *neo*-Ins(1,2,5,6)P₄ handeln. Die Analyse der enzymatischen Dephosphorylierung von *neo*-Ins(2,3,4,5,6)P₅ (Vorstufe von *neo*-Ins(2,3,4,5)P₄) dem optischen Gegenstück zu *neo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅ (Vorstufe von *neo*-Ins(1,2,5,6)P₄), verlief relativ unspezifisch was am Auftreten von drei durch die HPLC trennbaren *neo*-Inositoltrakisphosphaten erkennbar war. Das bestätigt die Vermutung, daß es sich bei den beobachteten Zwischenprodukten beim

Abbau von *neo*-InsP₆ um *neo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅ und *neo*-Ins(1,2,5,6)P₄ handelt. Das die Reaktion nach zwei Dephosphorylierungen zum Erliegen kommt, könnte an einer Eigenschaft der Phytasen liegen, die schon häufiger beobachtet wurde: der geringen Tendenz zur Abspaltung axialer Phosphatgruppen (Dvořáková 1998; Kerovuo *et al.* 2000). Der Abbau von *neo*-InsP₆ beginnt an Position 3 anschließend wird die Phosphatgruppe in Position 4 abgespalten danach kommt die Reaktion allerdings zum Erliegen, da im Gegensatz zu *myo*-InsP₆ die Phosphatgruppe in Position 5 axial orientiert ist. Um die Suche nach strukturellen Motiven, die bei der Substraterkennung durch die Phytasen eine Rolle spielen zu erleichtern, kann *myo*-InsP₆ in zwei charakteristische Motive unterteilt werden: das all-*cis* 1,2,3-Motiv bei dem die Phosphatgruppen eine äquatorial-axial-äquatorial Konstellation aufweisen und das all-*trans* 4,5,6-Motiv bei dem die Phosphatgruppen ausschließlich äquatorial stehen. Das C₂-symmetrische *neo*-InsP₆ enthält zwei äquivalente Teile (1,2,3 und 4,5,6; Abbildung 43) die beide dem all-*cis* 1,2,3-Motiv von *myo*-InsP₆ entsprechen. Bei *L-chiro*-InsP₆ fehlen solche Konstellationen bei den Phosphatgruppen. Die Reaktionssequenz der Bäckerhefe-Phytase beginnt mit einem Angriff auf die Position 3 im all-*cis* 1,2,3-Motiv von *myo*-InsP₆, das Fehlen dieses Motivs wäre somit eine plausible Erklärung für die Resistenz von *L-chiro*-InsP₆.

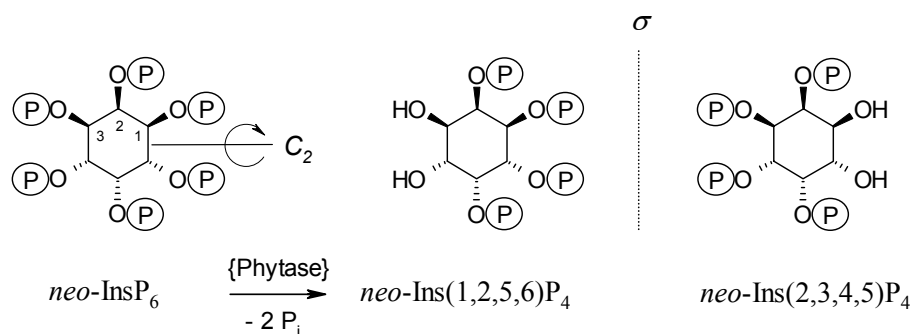


Abbildung 45: Dephosphorylierung von *neo*-InsP₆ durch die Phytase von *S. cerevisiae*.

Abschließend wurde die enzymatische Umsetzung von *neo*-InsP₆ und *L-chiro*-InsP₆ durch die Phytase aus *P. rhodanensis* untersucht. Beim Abbau von *neo*-InsP₆ treten dieselben Zwischenstufen auf, wie sie für *S. cerevisiae* beobachtet werden (Abbildung 46 Chromatogramm a). Dies korreliert mit den Ergebnissen die anhand des Abbaus von *myo*-InsP₆ erwartet wurden. Der prominente Zweig im Abbaumuster startet mit der Entfernung des Phosphats an Position 3 und ist identisch mit der spezifischen Dephosphorylierung, die durch die Phytase aus *S. cerevisiae* katalysiert wird. Das Fehlen eines all-*trans* 4,5,6-Motivs in der Struktur von *neo*-InsP₆ ist wahrscheinlich der Grund für

das definierte Abbaumuster, so daß kein Weg mit der Entfernung des Phosphats in Position 6 startet (siehe auch Abbildung 43). Für *L-chiro*-InsP₆ ist die Situation umgekehrt. Entsprechend IUPAC-IUB unterscheidet sich die Numerierung von *L-chiro*-InsP₆ und *myo*-InsP₆. Das all-*cis* 1,2,3-Motiv von *myo*-InsP₆ ist in der Struktur von *L-chiro*-InsP₆ gestört. In Abbildung 43 würde dies den Phosphatgruppen in den Positionen 2,1,6 entsprechen, und deswegen ist eine Dephosphorylierung beginnend an der axialen Position 6 sehr unwahrscheinlich. Die 5,4,3-Anordnung der Phosphatgruppen ähnelt dem all-*trans* Motiv von *myo*-InsP₆, und aus diesem Grund wurde ein Angriff auf die 3-Position von *L-chiro*-InsP₆ erwartet, als erster Schritt bei der Dephosphorylierung. Das Abbaumuster (Chromatogramm b in Abbildung 46) weist auf eine spezifische Reaktionsfolge hin und die NMR-Analyse des aufgereinigten *L-chiro*-Inositolpentakisphosphates bestätigt, daß es sich bei der ersten Zwischenstufe um *L-chiro*-Ins(1,2,4,5,6)P₅ handelt (Abbildung 47). Da es sich bei *L-chiro*-InsP₆ um eine C₂-symmetrische Verbindung handelt, ist es nicht möglich zwischen einer Dephosphorylierung an den Positionen 3 und 4 zu unterscheiden. Diese Positionen sind homotop und die entstehenden Produkte *L-chiro*-Ins(1,2,4,5,6)P₅ und *L-chiro*-Ins(1,2,3,5,6)P₅ sind identisch.

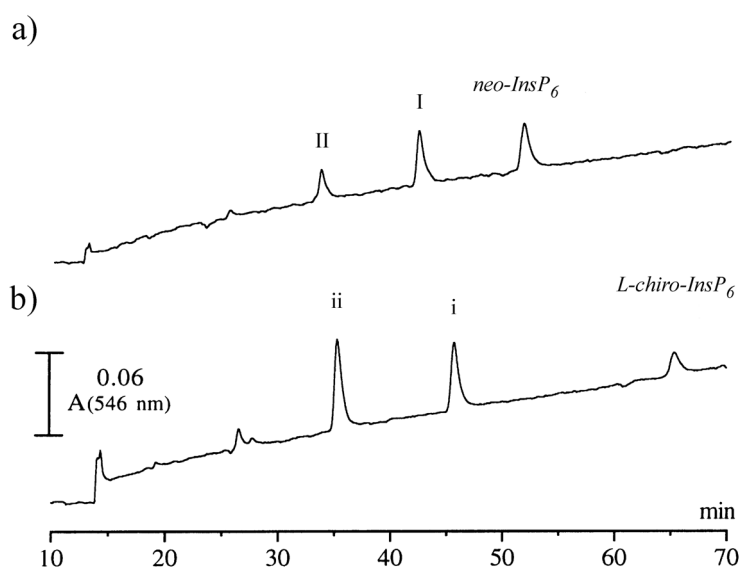


Abbildung 46: Chromatogramme der Dephosphorylierung von (a) *neo*-InsP₆ (I: *neo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅/*neo*-Ins(2,3,4,5,6)P₅, II: *neo*-Ins(1,2,5,6)P₄/*neo*-Ins(2,3,4,5)P₄) und (b) *L-chiro*-InsP₆ (i: *L-chiro*-Ins(1,2,3,5,6)P₅; ii: *L-chiro*-Ins(1,2,3,6)P₄) durch die Phytase aus *P. rhodanensis*.

In Übereinstimmung mit den IUPAC-IUB-Regeln wird die Numerierung mit den niedrigsten Ziffern bevorzugt und die korrekte Bezeichnung ist demnach *L-chiro*-Ins(1,2,3,5,6)P₅. Durch NMR-Analyse des aufgereinigten *L-chiro*-Inositoltetraisphosphates konnte nachgewiesen werden, daß die folgende Dephosphorylierung, wie im Fall von *myo*-Ins(1,2,3,4,5)P₅ (Abbildung 42), an der benachbarten Position zur freien Hydroxylgruppe entgegengesetzt

dem Uhrzeigersinn stattfindet. Das *L-chiro*-Inositoltrakisphosphat konnte als *L-chiro*-Ins(1,2,3,6)P₄ identifiziert werden.

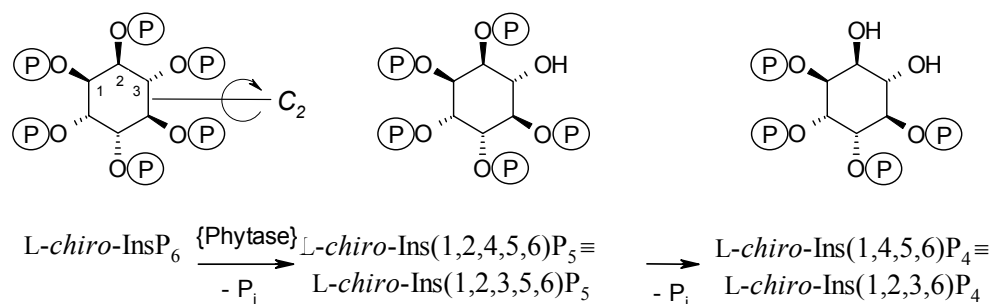


Abbildung 47: Umsetzung von *L-chiro*-InsP₆ durch die Phytase von *P. rhodanensis*.

2.6 Chemoenzymatische Synthese von enantiomerenreinen Inositolphosphaten

Das gestiegene Interesse an Inositolphosphaten und Phospholipiden, die eine wichtige Rolle bei der transmembranen Signaltransduktion und der Mobilisierung von Calcium aus intrazellulären Speichern spielen, macht die Darstellung verschiedener isomeren- und enantiomerenreiner Inositolphosphate nötig. Die chemischen Synthesen von Inositolphosphaten wurden 1993 von Billington zusammengefaßt (Billington 1993). Sie beinhalten häufig das Einführen und die Entfernung von Schutzgruppen und die Reaktionsbedingungen erfordern teilweise hohe Temperaturen oder Drücke. Daß bei Kenntnis der genauen Abbauwege für InsP₆ Phytasen nützliche Werkzeuge für die Synthese von Inositolphosphaten sind, wurde schon früh erkannt. So beschreibt Sirén (1986) die Darstellung von *D-myo*-Ins(1,2,6)P₃, *D-myo*-Ins(1,2,5)P₃, *L-myo*-Ins(1,3,4)P₃ und *myo*-Ins(1,2,3)P₃ durch enzymatische Hydrolyse von *myo*-InsP₆ mit einer Phytase aus *S. cerevisiae* und Greiner & Konietzny (1996) konnten Ins(1,2,3,4,5)P₅, Ins(2,3,4,5)P₄, Ins(2,4,5)P₃ und Ins(2,5)P₂ mit Hilfe einer immobilisierten Phytase aus *E. coli* darstellen. Die Vorteile der enzymatischen Hydrolyse liegen dabei in ihrer teils hohen Spezifität und den milden Reaktionsbedingungen, ferner steht mit *myo*-InsP₆ ein preiswertes Substrat zur Verfügung.

2.6.1 Chemoenzymatische Synthese von *D-neo*-Ins(1,2,5,6)P₄, *L-chiro*-Ins(1,2,3,5,6)P₅ und *L-chiro*-Ins(1,2,3,6)P₄ mit Hilfe von Phytasen aus Hefen

Die bei den Untersuchungen über die Stereo- und Regiospezifität von Phytasen aus Hefen gewonnenen Erkenntnisse über den Abbau von *neo*-InsP₆ und *L-chiro*-InsP₆ (siehe Kapitel

2.5.2) konnten direkt zur gezielten, enzymunterstützten, präparativen Synthese von *neo*- und *L-chiro*-Inositolphosphaten ausgenutzt werden.

So wurde nach Optimierung der Reaktionsbedingungen mit Hilfe der Phytase aus *S. cerevisiae* durch zweimalige Dephosphorylierung von *neo*-InsP₆, nach der Aufreinigung über die HPLC, *D-neo*-Ins(1,2,5,6)P₄ mit einer Gesamtausbeute von 75 – 85 % erhalten. *D-neo*-Ins(1,2,5,6)P₄ kann im weitesten Sinne als mit *myo*-Ins(1,2,6)P₃ verwandt bezeichnet werden, einer Verbindung der entzündungshemmende Wirkungen zugeschrieben werden (Sirén 1991; Malmberg *et al.* 1995). Es wäre daher interessant festzustellen, ob *D-neo*-Ins(1,2,5,6)P₄ einen ähnlichen Effekt erzielt.

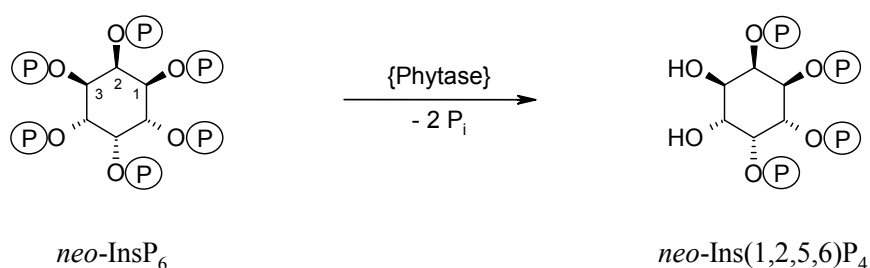


Abbildung 48: Chemoenzymatische Synthese von *D-neo*-Ins(1,2,5,6)P₄ mit Hilfe der Phytase aus *S. cerevisiae*.

Bei der Dephosphorylierung von *L-chiro*-InsP₆ mit Hilfe einer angereicherten Phytase aus *P. rhodanensis* waren die Verhältnisse schwieriger. Der Reaktionsverlauf mußte mit Hilfe der HPLC-MDD verfolgt werden. Die Reaktion wurde gestoppt, als die Gehalte an *L-chiro*-Ins(1,2,3,5,6)P₅ und *L-chiro*-Ins(1,2,3,6)P₄ ungefähr gleich waren. Die Produkte wurden mit Hilfe der HPLC aufgereinigt. Nach der Gefriertrocknung lag die Gesamtausbeute bei 30 - 40 % für beide Verbindungen. *L-chiro*-Ins(1,2,3,6)P₄ ist ein Epimer von *myo*-Ins(1,2,3,6)P₄. Dieser Verbindung wird z. B. eine Funktion als Eisen-Carrier zugeschrieben (Spiers *et al.* 1996). Mit Hilfe von *L-chiro*-Ins(1,2,3,6)P₄ könnte das Verständnis über die Struktur-Wirkungs-Beziehung verbessert werden.

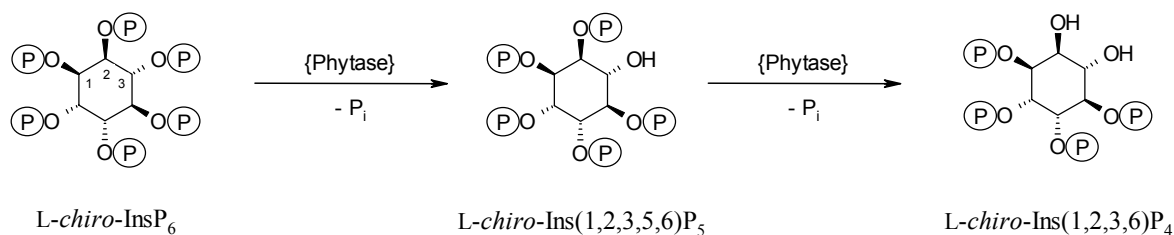


Abbildung 49: Chemoenzymatische Synthese von *L-chiro*-Ins(1,2,3,5,6)P₅ und *L-chiro*-Ins(1,2,3,6)P₄ mit Hilfe der Phytase aus *P. rhodanensis*.

Die erhaltenen Verbindungen sind Strukturanaloga von natürlich vorkommenden, biologisch aktiven myo-Inositolphosphaten. Mit ihrer Hilfe läßt sich der Einfluß der Strukturen auf die verschiedenen den myo-Inositolphosphaten zugeschriebenen Funktionen untersuchen und das Verständnis über die Wechselwirkung von Struktur und Wirkung verbessern. Das *chiro*- und *neo*-Inositol in tierischen Gewebe vorkommen ist schon länger bekannt (Sherman et al. 1968a, Shermann et al. 1971). Zur Aufklärung möglicher Funktionen werden daher zuverlässige und leicht zugängliche Standardverbindungen benötigt. Ein möglicher Zugang, durch die Kombination von organischer Synthese und regio- bzw. stereospezifischen enzymatischen Dephosphorylierungen zu diesen Verbindungen wurde hier aufgezeigt.

2.6.2 Chemoenzymatische Synthese von D-*myo*-Ins(2,3,6)P₃ mit Hilfe der Phytase aus *Dictyostelium discoideum*

Ins(3,4,5,6)P₄ ist ein Inhibitor der Calcium-aktivierten Chlorid-Kanäle in der Plasmamembran von Epithelzellen (Xie *et al.* 1996). Diese Ionenkanäle sind an der Kontrolle der Salz- und Flüssigkeitssekretion beteiligt und beeinflussen damit die Osmoregulation und pH-Balance. Es konnte gezeigt werden, daß Ins(1,3,4)P₃ ein Abbauprodukt von Ins(1,3,4,5)P₄ Einfluß auf die Regulation der Ins(3,4,5,6)P₄ Konzentration hat (Yang *et al.* 1999). Ins(1,3,4)P₃ ist ein konkurrierendes Substrat für die Ins(3, 4, 5, 6)P₄ 1-Kinase und wird durch dieses Enzym an den Positionen C-5 und C-6 phosphoryliert (Yang & Shears 2000). Bestimmte Krankheiten, wie die cystische Fibrose, können möglicherweise durch Manipulation der Calcium-aktivierten Chlorid-Kanäle behandelt werden (Schultz *et al.* 1997). Daher ist die Synthese effektiver Ins(3,4,5,6)P₄ Agonisten bzw. Antagonisten von großer pharmakologischer Bedeutung. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, daß eine racemische Mischung aus Ins(1,2,4)P₃/Ins(2,3,6)P₃ (beides nicht-physiologische Isomere) als Inhibitor der Phosphorylierung von Ins(3,4,5,6)P₄ durch die 1-Kinase wirkt. Dabei ist die inhibitorische Wirkung dieser Mischung nur um einen Faktor 4 geringer als die von Ins(1,3,4)P₃. Frühere Untersuchungen über die Substratspezifität der Phytase aus *D. discoideum* ließen erkennen, daß das Enzym nach organischer Synthese entsprechender Vorstufen für die Synthese von Ins(2,3,6)P₃ eingesetzt werden konnte. Ausgehend von *p*-Benzochinon wurde auf chemischem Wege von Dr. Plettenburg (Organische Chemie, Arbeitskreis Prof. Altenbach, BU Wuppertal) die Vorstufe *myo*-Ins(1,2,3,6)P₄ synthetisiert und durch einen abschließenden enzymatischen Schritt wurde das gewünschte Produkt erhalten. Die Dephosphorylierung des Substrates Ins(1,2,3,6)P₄ findet hauptsächlich an der C-1 Position, unter Bildung von Ins(2,3,6)P₃ statt (Abbildung 50). Allerdings wird eine weitere Hydrolyse von Ins(2,3,6)P₃

unter Bildung von nicht identifizierten InsP_2 -Isomeren beobachtet. Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen können gute Ausbeuten um die 45 % erreicht werden.

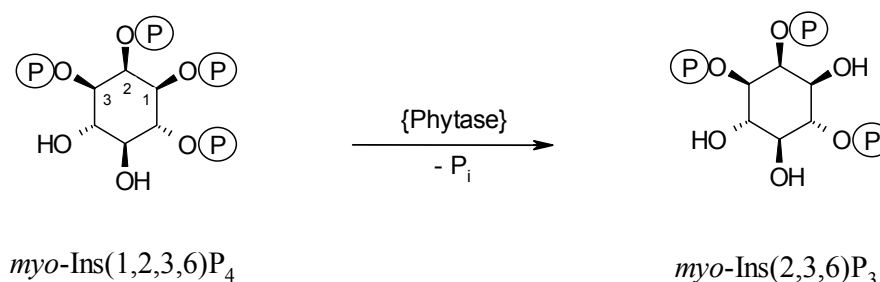


Abbildung 50: Chemoenzymatische Synthese von D-*myo*-Ins(2,3,6) P_3 mit Hilfe der Phytase aus *D. discoideum*.

Es wurde untersucht ob $\text{Ins}(2,3,6)\text{P}_3$ die Aktivität einer rekombinanten menschlichen $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ 1-Kinase beeinflussen konnte. Dabei zeigte sich, daß $\text{Ins}(2,3,6)\text{P}_3$ keinen Effekt auf die enzymatische Aktivität des Enzyms hat. In unserem Arbeitskreis gelang durch Kombination von chemischer Synthese und enzymatischer Umsetzung auch die Darstellung von $\text{Ins}(1,2,4)\text{P}_3$. Aktivitätstests mit der $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ 1-Kinase zeigten, daß es diese Komponente der racemischen Mischung war, die für den inhibitorischen Effekt verantwortlich ist (Adelt *et al.* 2001).

2.6.3 Chemoenzymatische Synthese von 3-Amino-*myo*-Ins(1,2,6) P_3 mit Hilfe der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase aus *Dictyostelium discoideum*

Die Dephosphorylierung durch die $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase erfolgt ausschließlich in Nachbarschaft zur *trans*-ständigen OH-Gruppe. Dies ermöglicht eine Vorhersage der entstehende Produkte beim Abbau eines Substrat und ist eine wichtige Voraussetzung für den gezielten Einsatz der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase bei enzymunterstützten Synthesen von enantiomerenreinen *myo*-Inositolphosphaten. Bei den Untersuchungen zur Substratspezifität der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase wurde festgestellt, daß sich die Aminogruppe eines Amino-*myo*-Inositolphosphats genauso verhält wie eine OH-Gruppe. Damit läßt sich der Einsatzbereich der $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase auf die gezielte Synthese enantiomerenreiner Amino-*myo*-Inositolphosphate erweitern. Die Vorstufe 3-NH₂-*myo*-Ins(1,2,4,5,6) P_5 wurde von Dr. Podeschwa (Organische Chemie, Arbeitskreis Prof. Altenbach, BU Wuppertal) ausgehend von *p*-Benzochinon über eine desymmetrisierende Route dargestellt. 3-NH₂-*myo*-Ins(1,2,4,5,6) P_5 wird selektiv an der 4-Position dephosphoryliert. Es entsteht nur ein einziges Inositoltrikisphosphat, welches sofort weiter zu 3-NH₂-*myo*-InsP(1,2,6) P_3 abgebaut wird und sich anreichert (Abbildung 51).

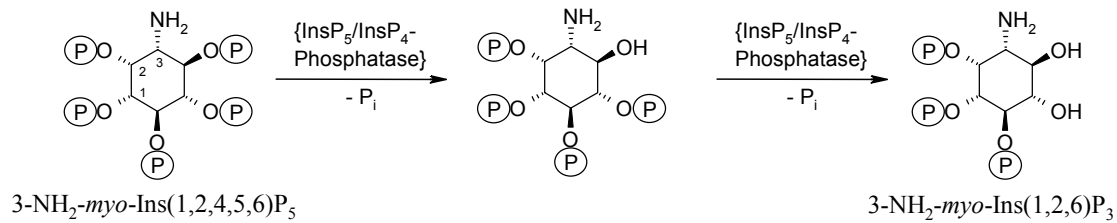


Abbildung 51: Chemoenzymatische Synthese von 3-Amino-*myo*-Ins(1,2,6)P₃ mit Hilfe der InsP₅/InsP₄-Phosphatase aus *D. discoideum*.

Mit 3-NH₂-*myo*-InsP(1,2,6)P₃ steht ein Amino-Derivat von *myo*-Ins(1,2,6)P₃ (α -Trinositol) zur Verfügung. α -Trinositol zeigt ein breites pharmakologisches Wirkungsspektrum. So konnten in Tierversuchen z. B. entzündungshemmende und schmerzstillende Wirkungen festgestellt werden (Sirén 1991; Malmberg *et al.* 1995). Über die molekulare Wirkungsweise von α -Trinositol ist allerdings nichts bekannt. Ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der Wirkungsweise wäre die Identifizierung potentieller *myo*-Ins(1,2,6)P₃-Bindestellen. 3-NH₂-*myo*-InsP(1,2,6)P₃ ist ein Ligand der über eine primäre Aminogruppe verfügt, die zur Kopplung mit einem heterofunktionellen Vernetzer mit Arylazidgruppe (z. B. NHS-ASA) genutzt werden kann. Mit dem so synthetisierten Photoaffinitätsliganden können nun Bindungsproteine selektiv und kovalent markiert werden, ohne diese vorher aufzureinigen. Zur Aufreinigung der Proteine könnte dann eine Affinitätschromatographie verwendet werden, bei der zuvor 3-NH₂-*myo*-InsP(1,2,6)P₃ an eine aktivierte Matrix (z. B. epoxyaktivierte Sepharose) gekoppelt wurde.

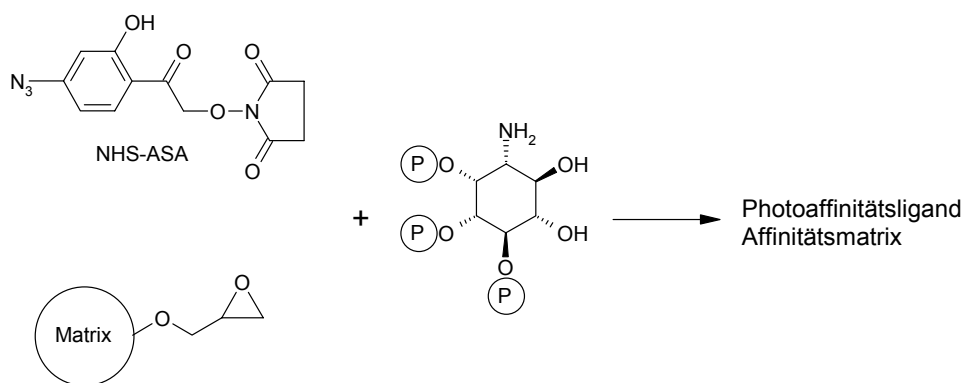


Abbildung 52: Mögliche Anwendungen von 3-NH₂-*myo*-InsP(1,2,6)P₃.

2.7 Fazit und Ausblick

Die IMPase aus *D. discoideum* wurde bis zur Homogenität gereinigt und charakterisiert. Bei den Eigenschaften zeigen sich weitgehende Übereinstimmungen zwischen der IMPase aus *D. discoideum* und den verschiedenen IMPasen aus Säugetieren. Eine ungewöhnliche Eigenschaft ist die starke Inhibierbarkeit der IMPase aus *D. discoideum* durch Mn^{2+} . Diese starke inhibitorische Wirkung läßt sich unter Umständen zur Beeinflussung des Inositolphosphat-Stoffwechsels in *D. discoideum* ausnutzen. Die Biosynthese von *myo*-Inositol ließe sich gezielt unterbinden und die physiologischen Auswirkungen untersuchen. Dabei wäre auch interessant zu wissen, inwieweit die Auswirkungen mit denen in Gegenwart von Lithium beschriebenen phänotypischen Veränderungen von *D. discoideum* übereinstimmen. So werden in Gegenwart von 7 mM Li^+ nur kleine Fruchtkörper ausgebildet. Dabei ist die Basalplatte vergrößert, während ein stark verkleinerter Sporenkopf beobachtet wird. Bei einer Konzentration von 10 mM wird kein Fruchtkörper mehr ausgebildet (Maeda 1970; Harwood *et al.* 1995; Williams *et al.* 1999). Da durch Li^+ nicht nur die Aktivität der IMPase beeinflusst wird, könnten durch einen Vergleich mit den, in Gegenwart von Mn^{2+} , beobachteten Veränderungen die Effekte identifiziert werden, die auf eine Veränderung des Inositol-Pools zurückzuführen sind. Im Phosphoinositid-Signalstoffwechsel ist *myo*-Inositol die zentrale Vorstufe bei der Biosynthese der Phosphatidylinositolphosphate und ohne *myo*-Inositol ist eine Aufrechterhaltung dieses Signalstoffwechsels nicht möglich. Die durch die *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase katalysierte Dephosphorylierung von D-*myo*-Ins(3)P stellt die einzig bekannte biosynthetische Quelle für *myo*-Inositol dar, dementsprechend ist die IMPase ein Schlüsselenzym im Phospholipid-Signalstoffwechsel. Das Enzym ist daher ein ideales Ziel für genetische Manipulationen in Untersuchungen zum Stoffwechsel und der Funktion von Phosphoinositiden. Die *D. discoideum* cDNA Datenbank, sowie die *D. discoideum* Genomische Datenbank, wurde nach möglichen IMPasen durchsucht und es konnte eine cDNA identifiziert werden. Die Generierung von Mutanten durch Gendeletion und Antisense-Technik könnte Informationen über mögliche Funktionen von Phosphatidylinositolphosphaten liefern. Veränderungen im Wachstum und der Differenzierung wären zu erwarten, da es Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen dem Phosphoinositid-Stoffwechsel und der multizellularen Entwicklung gibt (Zhou *et al.* 1995; Varela *et al.* 1987). Beeinflusst werden wahrscheinlich auch Prozesse wie die Phago- und Pinocytose. Bei Mutanten der *myo*-Inositol 3-phosphat Synthase wurden entsprechende Veränderungen beobachtet (Fischbach 2005). Die *myo*-Inositol 3-phosphat Synthase ist, wie die IMPase, von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung des zellulären Inositol-Pools.

Sie liefert mit *myo*-Ins(3)P aber auch die Vorstufe für die Biosynthese hochphosphorylierter Inositolphosphate. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß einige der bei der *myo*-Inositol 3-phosphat Synthase Mutante beobachteten Veränderungen auf Änderungen der zellulären Konzentrationen dieser Inositolphosphate beruhen. Die von *myo*-Ins(3)P ausgehende Synthese von hochphosphorylierten Inositolphosphaten wäre, bei einer Manipulation der IMPase, weitgehend unbeeinflusst, während die von *myo*-Inositol ausgehende Synthese der Phosphatidylinositolphosphate nicht mehr möglich wäre. Phänotypische Veränderungen bei den erzeugten Mutanten könnten so eindeutig den Phosphatidylinositolphosphaten zugeordnet werden. Im Rahmen der Aufreinigung der IMPase wurde ein auf der HPIC-IPAD basierender Aktivitätstest entwickelt. Die HPIC-IPAD wurde zum Nachweis des gebildeten *myo*-Inositol verwendet, sie erlaubt aber auch die Bestimmung von anderen Stereoisomeren des *myo*-Inositols (Abbildung 58, S. 91). Normalerweise wird zur Bestimmung von Cyclitolen, wie *myo*-Inositol, die GC-MS-Analytik mit einer vorhergehenden Derivatisierung der Analyten benutzt. Bei der einfachen Probenvorbereitung der HPIC-IPAD entfällt die Derivatisierung und damit auch eine mögliche Fehlerquelle. Das Analyseverfahren zeichnet sich durch hohe Empfindlichkeit und einen breiten dynamischen Bereich aus. Eine weitere Erhöhung der Empfindlichkeit könnte noch durch den Einsatz von Nanobore-Technik erreicht werden. Neuere Ergebnisse zeigen, daß einige Epimere des *myo*-Inositols von pharmakologischem Interesse sind. So wurde z. B. bei Patienten mit chronischem Alkoholismus eine Anreicherung von *scyllo*-Inositol im Gehirn und ein Zusammenhang mit der Entwicklung der alkoholbedingten Enzephalopathie festgestellt (Viola *et al.* 2004). Und bei Patienten mit Morbus Alzheimer wurde der therapeutische Einsatz von *epi*- und *scyllo*-Inositol vorgeschlagen. Beide Isomere sind in der Lage die, für diese Erkrankung typische, Bildung von Amyloid-Ablagerungen zu verringern (McLaurin *et al.* 2000). Ein System, wie die HPIC-IPAD, daß die einfache und zuverlässige Bestimmung von Inositol-Stereoisomeren ermöglicht, könnte einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Rolle dieser Inositol-Isomere leisten.

Am Inositolphosphatstoffwechsel mit seinen über 20 löslichen Inositolphosphaten ist eine Vielzahl von Kinasen und Phosphatasen beteiligt, welche die Konzentrationen der an zellulären Prozessen beteiligten Inositolphosphate regulieren. Eine, den Abbau einer Vielzahl von Inositolpentakisphosphat- und Inosoltetrakisphosphat-Isomeren katalysierende, InsP₅/InsP₄-Phosphatase aus *D. discoideum* wurde 179fach angereichert und charakterisiert. Es wurde auch der Abbau verschiedener Stereoisomere von *myo*-Inositolhexakisphosphat durch Phytasen aus Hefen untersucht, um zu klären, ob diese Enzyme strukturelle

Abweichungen von ihrem natürlichen Substrat *myo*-Inositolhexakisphosphat zulassen. Die gewonnenen Kenntnisse über die Substrat- und Stereospezifität der untersuchten Inositolphosphat-Phosphatasen, ermöglichten die enzymunterstützten Synthese einiger enantiomerenreiner Inositolphosphate. Daß neben den natürlichen Substraten auch Phosphorsäureester von Isomeren des *myo*-Inositols, sowie Amino-Derivate von *myo*-Inositolphosphaten umgesetzt werden, ist ungewöhnlich. Die synthetischen Einsatzmöglichkeiten der untersuchten Phosphatasen werden dadurch allerdings erheblich erweitert. Wie am Beispiel der Phytasen aus *S. cerevisiae* und *P. rhodanensis* gezeigt, erlaubt der Einsatz von Strukturisomeren des *myo*-Inositolhexakisphosphats Aussagen darüber welche relativen Positionen die Substituenten zueinander haben müssen, damit eine Verbindung als Substrat dienen kann. Durch den Austausch einer Hydroxylgruppe gegen andere funktionelle Gruppen könnte der Einfluß verschiedener weiterer Faktoren auf die Struktur-Reaktivitätsbeziehungen untersucht werden. So ließe sich durch die Verwendung von CF₃, F, Cl, Br, MeO schrittweise die Größe eines Substituenten erhöhen und durch die Verwendung von NH₂, unter physiologischen Bedingungen, eine positive Ladung in das Molekül einführen. Durch die Kombination aus Variation der Substituenten und Einsatz von Strukturisomeren des *myo*-Inositols steht ein großes Repertoire an Verbindungen zur Verfügung mit deren Hilfe gezielt verschiedene Einflüsse auf Struktur-Reaktivitätsbeziehungen untersucht werden können.

3 Material und Methoden

Chemikalien, Medienbestandteile	Bezugsquelle
Agar	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Amberlite MB3	Merck Bioscience Schwalbach-Ts.
(Aminomethyl)polystyrol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Centriprep-50	Millipore GmbH, Schwalbach
Dihydrostreptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Fleisch-Pepton	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid GmbH, Wesel
HEPES	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
HiTrap [®] Affinitäts-Säulen	Amersham Bioscience, Europe GmbH, Freiburg
Hydroxylapatit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
InsP ₆	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Malachitgrün-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
MES	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Mono-Q	Amersham Bioscience, Europe GmbH, Freiburg
MOPS	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
myo-Inositol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Octyl/Phenyl Sepharose [®] 6	Amersham Bioscience, Europe GmbH, Freiburg
PAR	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Q-Sepharose ff	Amersham Bioscience, Europe GmbH, Freiburg
Resource-Q	Amersham Bioscience, Europe GmbH, Freiburg
Sepharose 6B	Amersham Bioscience, Europe GmbH, Freiburg
(NHS-aktiviert)	
Tergitol NP-10	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tris	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
YCl ₃	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

3.1 Kultivierung von *Dictyostelium discoideum*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Stamm *D. discoideum* AX-2 (ATCC: 24397) verwendet. Dieser Stamm läßt sich in einem bakterienfreien Medium (axenisches Medium, Tabelle 14) kultivieren. Auf Grund der einfachen Handhabung dieser Flüssigkultur eignet sich der Stamm *D. discoideum* AX-2 besonders zur Aufzucht großer Zellmengen z. B. für Enzympräparationen. Die Anzucht erfolgte unter sterilen Bedingungen aus Sporen, die bei -20 °C im 17 mM Phosphatpuffer (Sörensen-Puffer), 20 % (v/v) Glycerin, pH 6,5 gelagert worden waren. Die Germination erfolgte in Gewebekulturflaschen (50 mL) innerhalb von 2 - 3 Tagen. Die Anzucht und Inkubation erfolgte auf einem Rundschtüttler (120 Upm) bei 22,5 °C. Als Kulturgefäße wurden Erlenmeyerkolben (100-1000 mL) oder Fernbachkolben (1200 bzw. 3000 mL) verwendet. Um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff zu gewährleisten, wurden die Erlenmeyerkolben mit maximal 10 % und die Fernbachkolben mit maximal 30 % des Nennvolumens befüllt. Die Zellen wurden bei Zelldichten zwischen $2 \cdot 10^5$ und $1,2 \cdot 10^7$ Zellen/mL gehalten. Die Verdopplungszeiten lagen bei ca. 10 - 12 h.

3.1.1 Axenisches Medium (HL-5 Medium)

Komponente	Konzentration (g/L)
KH ₂ PO ₄	0,48
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,64
D(+)-Glucose Monohydrat	15,4
Hefeextrakt	7,15
Fleischpepton	14,3
Dihydrostreptomycin Sulfat	0,25

Tabelle 14: Zusammensetzung axenisches Medium (Watts & Ashworth 1970).

Die Komponenten wurden in der oben angegebenen Reihenfolge eingewogen, mit bidestilliertem Wasser das entsprechende Volumen aufgefüllt und das Medium anschließend 16 min bei 121 °C autoklaviert.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvolumens

Unter sterilen Bedingungen wurde aus der Zellsuspension eine Probe entnommen. Die Proben wurden vor der Messung 5 min auf Eis inkubiert, damit die Zellen eine abgerundete Form annahmen. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und für die Messung verdünnt. Zur Bestimmung der Zellzahl und des durchschnittlichen Zellvolumens wurde ein Partikelzählgerät (Coulter[®] Counter Modell Z2) der Firma Coulter Electronics GmbH (Krefeld) verwendet, die Daten wurden anschließend elektronisch ausgewertet (Coulter[®] Z2 AccuComp[®] Vers. 3.01a).

3.1.3 Gewinnung und Lagerung von *Dictyostelium discoideum*-Sporen

Zur Gewinnung der Sporen wurden Zellen von *D. discoideum* in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet (1000 g, 5 min, 4 °C), zweimal mit Sörensen-Puffer gewaschen und auf eine Zelldichte von $3 \cdot 10^8$ Zellen/mL resuspendiert. 1 mL der Zellsuspension wurde auf Wasseragarplatten (8 cm Durchmesser) ausgestrichen und bei 22,5 °C inkubiert. Nach der Differenzierung wurden die Sporen durch Abschlagen geerntet und in 1 mL sterilfiltriertem, 30 % Glycerin enthaltenem, Sörensen-Puffer resuspendiert. Die Aliquote wurden bei -20 °C eingefroren und waren unter diesen Bedingungen mehrere Jahre haltbar.

Komponente	Konzentration (g/L)
KH ₂ PO ₄	1,997
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,504
Agar	10

Tabelle 15: Zusammensetzung des Wasseragars. Der Agar wurde für 30 min bei 120 °C autoklaviert. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50 °C wurde der Agar in Petrischalen gegossen.

3.2 Kultivierung der Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia rhodanensis*

S. cerevisiae wurde in einem lokalen Supermarkt erworben (Hersteller: Deutsche Hefewerke, Nürnberg, Deutschland) und *P. rhodanensis* (CBS 5518) stammt vom Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Niederlande). Die Kulturen in YPD-Medium (Tabelle 16) wurden mit einer Impföse Hefen pro Liter Medium angeimpft und in Schikanekolben auf einem Rundschüttler (150 Upm) inkubiert. Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte dabei bei 30 °C, während es bei *P. rhodanensis* 25 °C waren.

3.2.1 YPD-Medium für Hefen

Komponente	Konzentration (g/L)
Hefeextrakt	10
Fleischpepton	20
Glucose	20

Tabelle 16: Zusammensetzung des YPD-Mediums (Yeast-Peptide-Dextrose Medium).

Hefeextrakt und Fleischpepton wurden eingewogen, mit bidestilliertem Wasser das entsprechende Volumen aufgefüllt und die Lösung vor Zugabe der Glucose anschließend 16 min bei 121 °C autoklaviert. Eine 20%ige Glucose-Stocklösung wurde separat autoklaviert und nachträglich zugegeben.

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Verfolgung des Hefe-Wachstums wurde die Optische Dichte (OD) des Mediums bei 600 nm gemessen ($OD\ 1 \approx 2,4 \cdot 10^8$ Zellen/mL). Die Kalibrierung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

3.2.3 Lagerung von Hefen

In einer 15%igen Glycerin-Lösung können Hefe-Zellen bei niedrigen Temperaturen langfristig gelagert werden. Dazu wurden nach 24stündigem Wachstum 812 µL Zellsuspension aus einer Hefe-Kultur steril entnommen und in ein Kryo-Gefäß (2 mL) überführt. Anschließend wurden 188 µL einer sterilen 80%igen Glycerin-Lösung zugegeben und mit der

Zellsuspension vermischt. Die Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, da Temperaturen über $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ zum Absterben der Hefen führen.

3.3 Analytik von Inositolphosphaten

3.3.1 NMR-Analytik

Alle NMR-Spektren wurden mit einem Bruker ARX 400 Spektrometer aufgenommen. Neben ^1H (400 MHz), ^{13}C (101 MHz) und ^{31}P (162 MHz) wurden auch 2D COSY- (^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C und ^1H - ^{31}P) und DEPT-Spektren verwendet. Die chemische Verschiebung wird in ppm relativ zum verwendeten Lösungsmittel angegeben. Für die Multiplizitäten wurden die folgenden Symbole verwendet: s (Singulet), d (Dublet), t (Triplet), q (Quartet), m (Mulitplet), Ψ t (Pseudotriplett für nicht aufgelöste dd) und br (allgemein). Die Kopplungskonstante J wird in Hz angegeben.

3.3.2 Phosphatbestimmung

Zur Quantifizierung von Phosphat im nanomolaren Bereich wurde ein kolorimetrisches Verfahren eingesetzt. Die Reduzierung auf den Mikrotiterplatten-Maßstab erlaubt die simultane Bestimmung einer großen Anzahl von Proben. Mit dieser Methode konnte sowohl die enzymatische Reaktion von Phosphatasen verfolgt als auch Inositolphosphate quantifiziert werden. Bei Kenntnis von Phosphorylierungsgrad und Reinheit eines Inositolphosphats eignet sich die Phosphatbestimmung nach Lanzetta (Lanzetta *et al.* 1979) zur Quantifizierung des Inositolphosphats. Hierzu müssen die Orthophosphorsäureester durch Behandlung mit heißer Schwefelsäure komplett hydrolysiert werden. Am Beispiel einer Lösung die 2 - 5 mM organisch gebundenes Phosphat enthält wird die Methode vorgestellt. 10 μL -Aliquote der Lösung wurden mit je 50 μL 10 M H_2SO_4 (p.a., Merck) gemischt und für 5 h auf $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Für diesen Schritt werden Borosilikat-Reaktionsgefäße der Hydrolyseklasse I (Macherey Nagel) benötigt. Für eine exakte, quantitative Phosphatbestimmung wird der entstandenen Kohlenstoff mit 20 - 40 μL einer 30%igen Wasserstoffperoxid-Lösung (p.a., Merck) oxidiert. Anschließend wurde zur Zersetzung des überschüssigen Wasserstoffperoxids erneut auf $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt (ca. 3 - 5 h). Dies ist notwendig, da es sonst zur Bildung von störenden gelben Peroxokomplexen mit dem Molybdat des Farbreagenzes kommt. Das Volumen des abgekühlten klaren Rückstandes wurde bestimmt und 100fach mit 1 M H_2SO_4 verdünnt. 50 μL Portionen dieser Lösungen wurden dann auf freigesetztes Phosphat untersucht.

Für die eigentliche Phosphatbestimmung wurde die saure Probenlösung mit 100 μL Phosphat-Reagenz versetzt und durchmischt. Nach 1 min wurden 10 μL einer 35%igen (w/v) *tri*-Natriumcitrat- $2\text{H}_2\text{O}$ -Lösung zugegeben. Zur vollständigen Farbentwicklung wurden die Proben 20 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Abschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Microplatten-Reader Modell 450, Bio-Rad) gemessen. Die Bestimmung erwies sich im Bereich von 0 - 3 nmol Phosphat (absolut) als linear.

Für das Phosphat-Reagenz wurden 735 Volumenteile einer wäßrigen 0,045%igen (w/v) Malachitgrün-Hydrochlorid-Lösung mit 245 Volumenteilen einer salzsauren (4 M HCl) 4,2%igen (w/v) Ammoniumheptamolybdat-Lösung gemischt. Die Lösung wurde nach 24-stündigem Rühren im Dunkeln mit 20 Volumenteilen einer 2%igen (w/v) Tergitol NP-10-Lösung versetzt und anschließend filtriert. Das erhaltene Phosphat-Reagenz ist bei kühler Lagerung in Braunglasflaschen über mehrere Monate stabil.

3.3.3 Analyse von Inositolphosphaten mittels HPLC-MDD

3.3.3.1 Detektionsprinzip und Aufbau der HPLC-MDD-Anlage

Inositolphosphate besitzen keine chromophore Gruppen und sind daher nicht direkt photometrisch nachweisbar. Zur Detektion der Inositolphosphate wurde daher ein von G. W. Mayr entwickeltes, als HPLC-MDD (HPLC-metal-dye-detection) bezeichnetes Verfahren zur Nachsäulenderivatisierung eingesetzt (Mayr 1988; Mayr 1990). Der gelb gefärbte Indikator Pyridazolazoresorcin (PAR) bildet im alkalischen pH mit Y^{3+} -Ionen einen intensiv orangerot gefärbten Komplex. Die stark komplexierenden Inositolphosphate verdrängen den Indikator aus dem Komplex und bilden mit den Y^{3+} -Ionen einen farblosen Komplex. Dies führt zu einer Farbverschiebung von orangerot nach gelb, die als Extinktionsabnahme bei 546 nm verfolgt werden kann. Durch Invertierung der Signale am Integrator werden im Chromatogramm positive Peaks erhalten. Abbildung 53 gibt schematisch den Aufbau der HPLC-Anlage wieder.

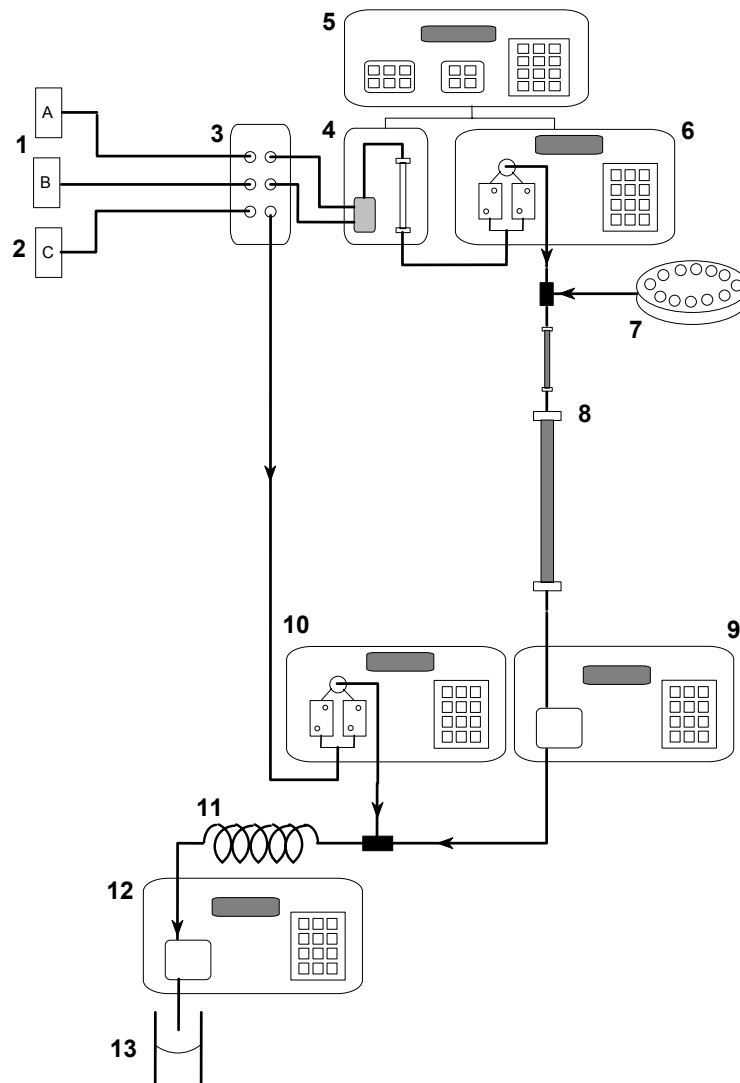


Abbildung 53: Schematischer Aufbau der HPLC-MDD Anlage mit 1: Elutenten A und B, 2: Reagenz, 3: Entgaser, 4: Gradientenmischer, 5: Controller, 6: Eluentenpumpe, 7: Autosampler, 8: Säulen, 9: Photometer I, 10: Reagenzienpumpe, 11: Mischschleife, 12: Photometer II, 13 : Abfall.

Komponente	Hersteller/Modell
Entgaser	Uniflows Degasys DG1310
Gradientenmischer	Pharmacia LKB Low-Pressure-Mixer
Controller	Pharmacia LKB LC 2252
Eluentenpumpe	Pharmacia LKB HPLC Pump 2248 Flußrate: 1,50 mL/min
Autosampler	Marathon
Säulen	Vorsäule : Pharmacia Resource Q HR 5/5 Trennsäule: Pharmacia Mono Q HR 10/10
Photometer I	Pharmacia LKB VWM 2141, $\lambda = 254 \text{ nm}$
Reagenzienpumpe	Pharmacia LKB HPLC Pump 2248 Flußrate: 0,75 mL/min
Photometer II	Pharmacia LKB VWM 2141, $\lambda = 546 \text{ nm}$

Tabelle 17: Komponenten der HPLC-MDD Anlage.

Von einer vorbereiteten Probe wurde 1 mL mit einem Autosampler auf die Anionentauschersäulen (Mono Q HR 10/10 mit Vorsäule Resource Q HR 5/5) aufgetragen. Die an die Säulen gebundenen Inositolphosphate wurden mit einem für das Trennproblem optimierten pH- und/oder Ionenstärkegradienten eluiert. Die Gradienten wurden über einen Niederdruck-Gradientenmischer zusammengesetzt. Zum Nachweis von Nukleotiden und anderen UV-absorbierenden Substanzen passierte das Eluat zunächst ein Photometer ($\lambda = 254 \text{ nm}$), bevor in einer Mischschleife das PAR-Reagenz zugeführt wurde. Die Extinktion dieses Gemisches wurde dann bei 546 nm mit einem zweiten Photometer gemessen. Durch Vergleich der bei 254 nm und 546 nm aufgezeichneten Chromatogramme können Nukleotide, die ebenfalls einen positiven Nachweis mit dem PAR-Reagenz ergeben, von Inositolphosphaten unterschieden werden. Die HPLC-Säulen wurden bei Nachlassen der Trennleistung spätestens aber nach 10 Messungen regeneriert, dazu wurde je viermal 1 mL 2 M NaOH, 1 mL 2 M NaCl und 1 mL 1 M HCl über den Autosampler injiziert, während zur Elution bidestilliertes Wasser verwendet wurde. Zur Datenaufnahme und der anschließenden Auswertung wurde die Software EZChrom™ Chromatography Data System Version 6.1 von Scientific Software Inc. verwendet.

3.3.3.2 Elution mit einem pH- und Chlorid-Gradienten (saures Elutionssystem)

Beim sauren Elutionssystem handelt es sich um einen kombinierten pH- und Chlorid-Gradienten (Tabelle 18 und Tabelle 19). Dieser ermöglicht die Analyse von Inositolphosphaten mit Phosphorylierungsgraden von drei bis sechs.

Lösungen	Zusammensetzung
Lösung A	200 μM HCl in bidest. Wasser
Lösung B	0,5 M HCl in bidest. Wasser
Lösung C (PAR-Reagenz)	2 M Tris/HCl (pH 9,1) 200 μM PAR 30 μM YCl_3 10 % (v/v) Methanol p.A. in bidest. Wasser

Tabelle 18: Zusammensetzung der Elutions-Lösungen für das saure Elutionssystem.

Zeit	Zusammensetzung Eluent
0 min	0 % B
60 min	100 % B
80 min	100 % B

Tabelle 19: Gradient zur Trennung und Identifizierung von InsP_4 -/ InsP_5 -Isomeren.

Im Bereich der InsP_4 - und InsP_5 -Isomere besitzt diese Methode ein gutes Auflösungsvermögen, wohingegen es bei den InsP_3 -Isomeren zu Koelutionen kommt (Abbildung 54).

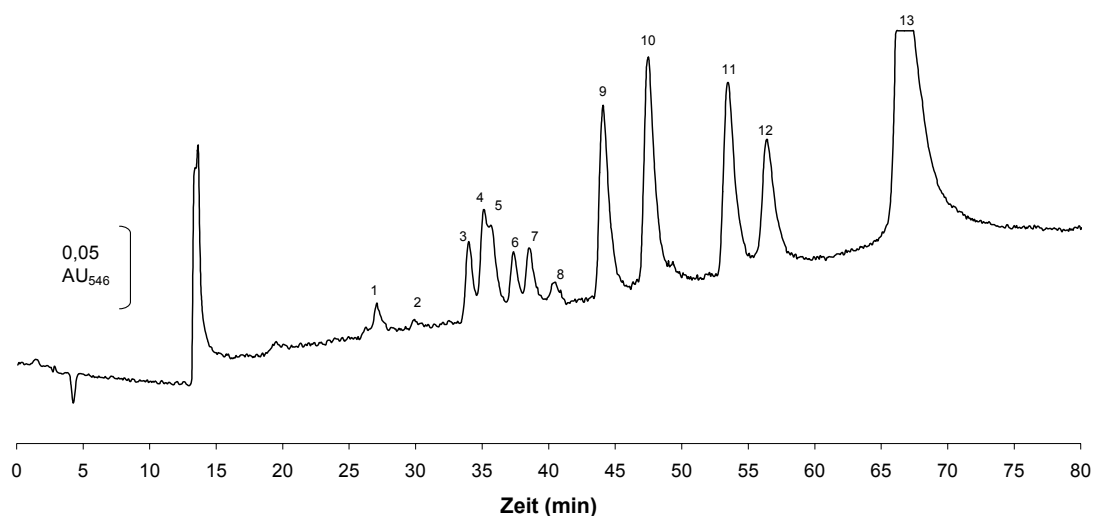


Abbildung 54: InsP_6 -Hydrolysat (säure-katalytisch), Zuordnung der Verbindungen: 1: $\text{Ins}(1,2,3)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,2,6)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$; 2: ($\text{Ins}(1,5,6)\text{P}_3$); 3: $\text{Ins}(1,2,4,6)\text{P}_4$; 4: $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$, $\text{Ins}(1,2,3,4)\text{P}_4$; 5: $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$; 6: $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$; 7: $\text{Ins}(1,2,5,6)\text{P}_4$; 8: $\text{Ins}(2,4,5,6)\text{P}_4$; 9: $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$, $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$; 10: $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$; 11: $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$; 13: InsP_6 .

3.3.3.3 Elution mit einem gepufferten Chlorid-Gradienten (alkalisches Elutionssystem)

Bei dem alkalischen Elutionssystem handelt es sich um einen reinen Chlorid-Gradienten. Der komplexe Gradient wurden zur Trennung von InsP_3 -Isomeren entwickelt (Tabelle 20 und Tabelle 21).

Lösungen	Zusammensetzung
Lösung A	50 mM Tris/HCl (pH 8,5) in bidest. Wasser
Lösung B	50 mM Tris/HCl (pH 8,5) 0,4 M KCl in bidest. Wasser
Lösung C (Farbstofflösung)	2 mM Ammoniumacetat p.A. 200 μM PAR 30 μM YCl_3 10 % (v/v) Methanol p.A. in bidest. Wasser (pH 5,0)

Tabelle 20: Zusammensetzung der Lösungen für das alkalische Elutionssystem.

Zeit (min)	Zusammensetzung Eluent (% B)
0	30
2	40
16	42
20	50
38	60
48	75
50	100
60	100

Tabelle 21: Gradient zur Trennung und Identifizierung von InsP₃-Isomeren.

3.3.4 Analyse von Inositolmono- und Inositolbisphosphaten mittels HPIC-CD

Der Response bei dem von Mayr entwickelten Verfahren ist abhängig von der Stellung und Anzahl der Phosphatgruppen am Cyclohexanring, je geringer die Anzahl der Phosphatgruppe um so kleiner ist die Neigung zur Komplexbildung mit Y^{3+} und dementsprechend geringer fällt die Entfärbung aus. So sind Inositolmonophosphate praktisch kaum detektierbar. Durch den Einsatz der Leitfähigkeitsdetektion sind aber auch die niedrigphosphorylierten Inositolphosphate mit ausreichender Empfindlichkeit nachweisbar. Das verwendete System ist allerdings nicht zur Analytik von hochphosphorylierten Inositolphosphaten InsP_x ($x \geq 4$) geeignet, da die zur Elution der hochgeladenen Verbindungen erforderlichen Ionenstärken, die Kapazität des Suppressors überschreiten würden. Daher ist es z. B. bei der Analytik von Zellextrakten notwendig, die hochphosphorylierten Inositolphosphate im Rahmen der Probenvorbereitung abzutrennen. Die Elution erfolgte mit einem Wasser/Methanol-Gemisch, dem über einen Eluentgenerator elektrolytisch erzeugtes KOH (0-90 mM) zugefügt wurde. Dadurch wurde eine Kontamination des Laufmittels durch Carbonat vermieden. Die Eluentlösungen wurden vor ihrer Verwendung mit Helium entgast. Vor dem Eintritt in die Leitfähigkeits-Meßzelle wird das Eluat durch einen kontinuierlich regenerierten Suppressor geleitet, mit dem die hohe Grundleitfähigkeit des Eluenten auf chemischen Wege verringert und die zu analysierende Probe in eine stärker leitende Form überführt wird. Anfangs wurde eine elektrochemische Suppression verwendet, auf Dauer war dies aber wegen des organischen Anteils im Eluenten nicht praktikabel, daher wurde später eine externe chemische Suppression mit einem AMM III-Suppressorsystem verwendet. Zur Regeneration wurde 25 mM Schwefelsäure verwendet, welche mit einem konstanten Druck von 5 psi dem Suppressorsystem zugeführt wurde. Nach der Leitfähigkeits-Meßzelle passiert das Eluat zum Nachweis von UV-absorbierenden Substanzen noch ein Photometer ($\lambda = 254$ nm). In Abbildung 55 ist der schematische Aufbau der verwendeten HPIC-CD-Anlage dargestellt. Zur

Steuerung des HPIC-Systems und zur Datenauswertung wurde die Software Chromeleon™ Version 6.2 der Firma Dionex verwendet.

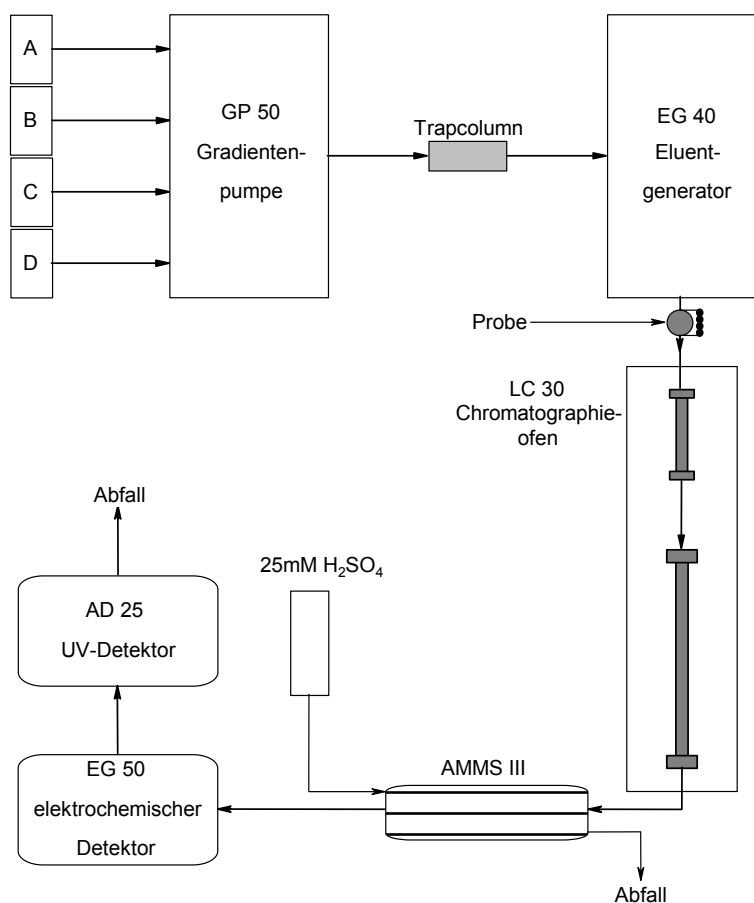


Abbildung 55: Schematischer Aufbau der HPIC-CD-Anlage mit chemischer Suppression.

Komponente	Modell
HPIC-Anlage	AS 40 Auto-Sampler AD 25 UV-Detektor ($\lambda = 254 \text{ nm}$) LC 30 Chromatographie Ofen ($30 \text{ }^\circ\text{C}$) EG 40 Eluent-Generator ED 50 Electrochemischer Detektor (Zellkonstante 160 cm^{-1}) GP 50 Gradienten Pumpe
Säulen	Vorsäule: IonPac® AS11-HC Trennsäule: IonPac® AG11-HC (4 x 250)

Tabelle 22: Komponenten der HPIC-CD-Anlage (alle Komponenten von der Dionex GmbH, Idstein).

Im Rahmen von Enzymtests während der Aufreinigung der IMPase wurde die HPIC-CD hauptsächlich zur Bestimmung von *myo*-Ins(3)P verwendet. Desweiteren ermöglichte das System eine präparative Aufreinigung von *myo*-Ins(3)P aus chemischen Reaktionsansätzen, ohne weitere Modifikation. Der verwendete KOH-Gradient (Tabelle 23) erlaubte auch die

Quantifizierung und Identifizierung von Inositolmono- und Inositolbisphosphaten wie Abbildung 56 zeigt.

Zeit (min)	KOH (mM)	Steigung	Kurve
0	15	linear	5
10	15	linear	5
26,2	60	konvex	3
36,2	60	linear	5
40,9	90	linear	5
44,9	90	linear	5
48,7	15	linear	5
51,4	15	linear	5

Tabelle 23: KOH-Gradient zur Trennung von Inositolmonophosphaten bis Inositoltrisphosphaten (Laufmittel: 25 % Methanol, Flußrate: 0,85 mL/min).

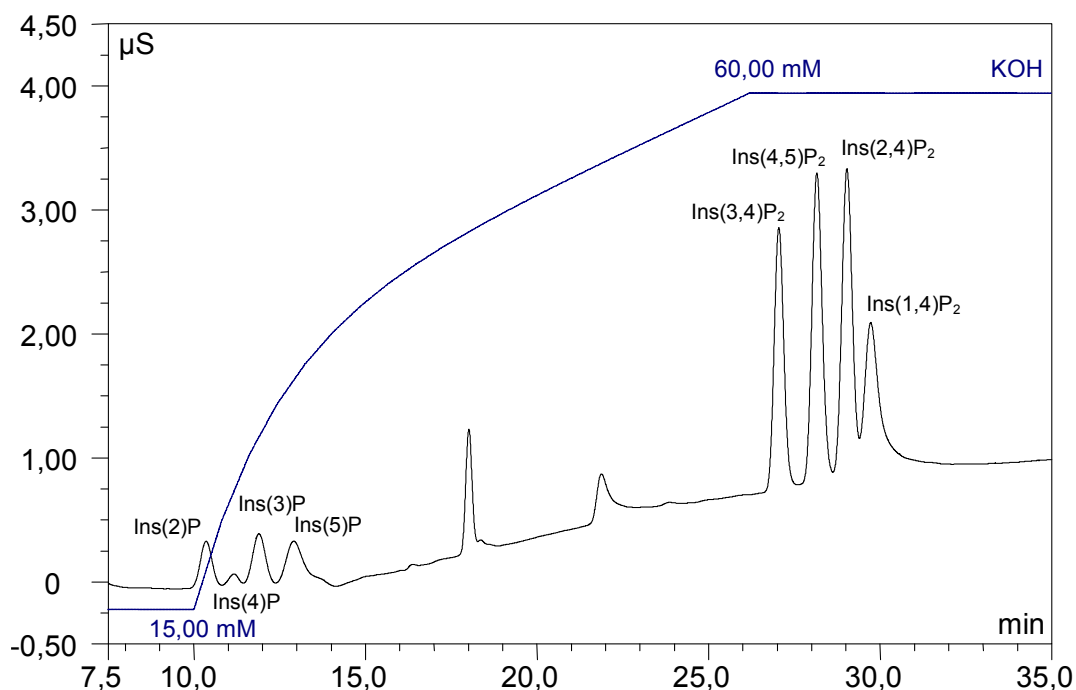


Abbildung 56: Beispielchromatogramm für die HPIC-CD Analytik von *myo*-Inositolmono- und *myo*-Inositolbisphosphat-Isomeren.

3.4 Analyse von Inositol-Isomeren mittels HPIC-IPAD

Die HPIC-IPAD wurde, im Rahmen von Enzymtests, während der Aufreinigung der IMPase hauptsächlich zur Bestimmung von *myo*-Inositol verwendet. Eine schematische Darstellung der HPIC-IPAD Anlage zeigt Abbildung 57. Die verwendeten Komponenten sind mit denen für die HPIC-CD identisch (Tabelle 22), auf einen UV-Detektor wurde allerdings verzichtet. Die Trennung des *myo*-Inositols erfolgte an einer CarboPac[®] MA1 (4 x 250) mit Vorsäule CarboPac[®] MA1 Guard. Für die Detektion wurde ein elektrochemischer Detektor (ED 50,

Dionex) mit PAD-Zelle (Au-Arbeitselektrode, Referenzelektrode Ag/AgCl) benutzt. Tabelle 24 zeigt die verwendete Potentialsequenz. Der verwendete NaOH-Gradient (Tabelle 25) erlaubt neben der Quantifizierung von *myo*-Inositol auch die Bestimmung anderer Inositol-Stereoisomere (Abbildung 58).

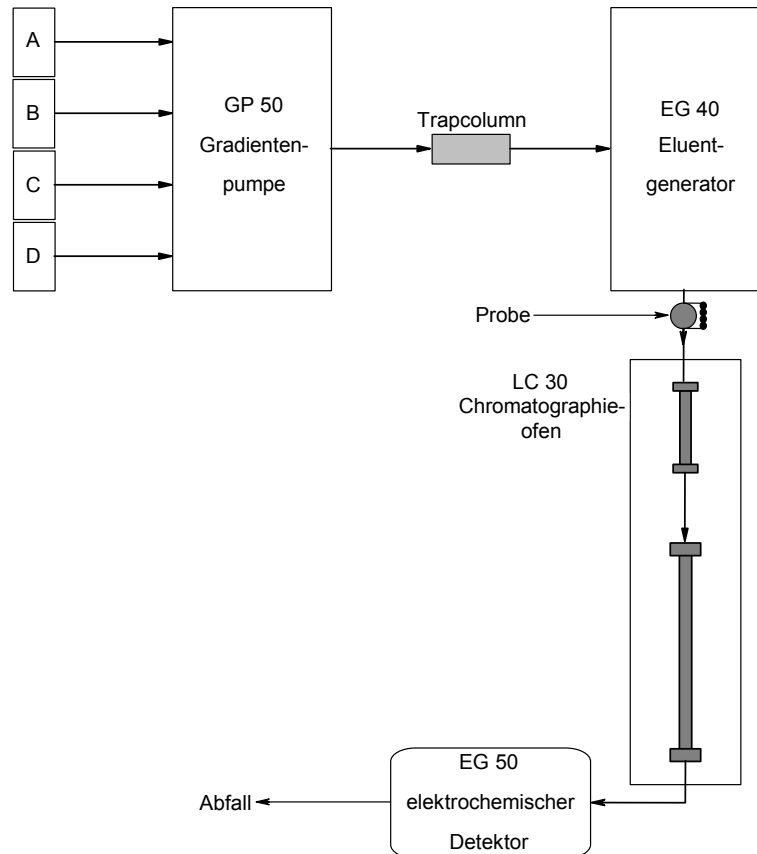


Abbildung 57: Schematischer Aufbau der HPIC-IPAD-Anlage.

Zeit (s)	Potential (V)	Integration (Start/Ende)
0,00	+0,05	
0,20	+0,05	Start
0,40	+0,05	Ende
0,41	+0,75	
0,60	+0,75	
0,61	-0,15	
1,00	-0,15	

Tabelle 24: Potentialsequenz an der Au-Arbeitselektrode.

Zeit (min)	Wasser (%)	1 M NaOH (%)	Steigung	Kurve
0	100	0	linear	5
30	40	60	linear	5
50	40	60	linear	5
50,1	100	0	linear	5

Tabelle 25: NaOH-Gradient zur Trennung von Inositol-Isomeren (Flußrate: 0,40 mL/min).

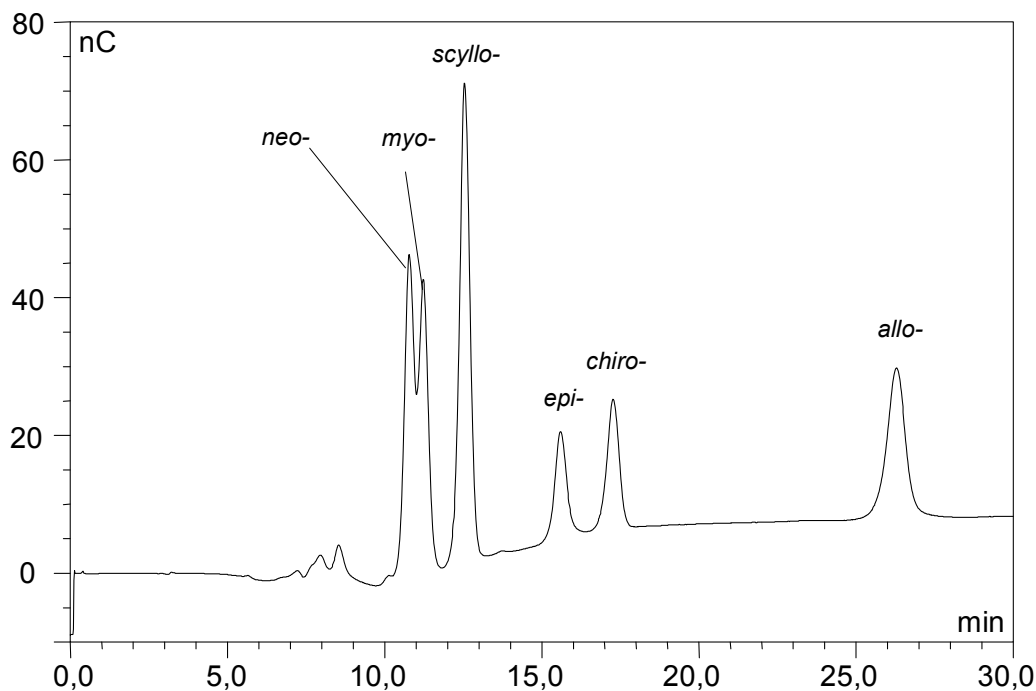


Abbildung 58: Beispielchromatogramm für die HPIC-IPAD Analytik von Inositol-Stereoisomeren.

3.5 Proteinanalytik

3.5.1 Proteinbestimmung (Lowry *et al.* 1951)

Proteinbestimmungen von Proben im Bereich von 0,15 - 1,5 mg/mL wurde mit einem, auf der Methode nach Lowry *et al.* (1951) basierenden, kommerziellen Test der Firma BioRad (DC Protein Assay, Katalog-Nr.: 500-0116) durchgeführt.

In einigen Fällen war eine Proteinbestimmung nach Lowry nicht möglich, dann wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976; Krüger 1994) durchgeführt. Zu einer Mischung von 20 μ L Proteinlösung und 50 μ L 1 M NaOH wurde 1 mL Reagenzlösung (0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 10 % (v/v) Phosphorsäure (85%ig), 5 % (v/v) Ethanol (95%ig)) gegeben und die Absorption nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur bei 595 nm gemessen.

Für Proteinbestimmungen im Bereich 2 - 40 µg/mL wurde das auf der BCA-Methode (Smith *et al.* 1985; Wiechelman *et al.* 1988) basierenden Micro BCA Protein Assay Reagent Kit der Firma Pierce benutzt. Zur Kalibrierung wurde in allen Fällen Rinderserumalbumin verwendet.

3.5.2 SDS-Elektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde das diskontinuierliche Laemmli-System mit Tris-Glycin-Puffern verwendet (Laemmli 1970). Als Apparatur diente eine Mini-Protean II[®] (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Es wurden grundsätzlich Trenngele mit Acrylamiddichte-Gradienten von 7,5 - 15 % verwendet. Die Proben wurden mit 5fachem SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. In der Regel wurden 5 µg Protein in jede Probentasche gegeben. Proteinlösungen, die zu verdünnt waren, um direkt auf das Gel aufgetragen zu werden, wurden mit StrataClean™ Resin (Stratagene[®], CAT# 400714-61), nach Anleitung des Herstellers, aufkonzentriert. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde die relative Beweglichkeit der Protein-Banden mit der von Marker-Proteinen definierter Größe verglichen (SDS-PAGE Standards, broad-range, Bio-Rad).

Für die Färbung der Gele wurde die Silberfärbung verwendet. Der Vorteil der Methode liegt in ihrer hohen Empfindlichkeit, so können noch ca. 50 bis 100 pg Protein pro Bande nachgewiesen werden (Merril *et al.* 1981; Heukeshoven & Dernick 1988).

Arbeitsschritt	Lösungen	Dauer
Fixieren: Lös. 1	50 % Ethanol 10 % Essigsäure	30 min
Fixieren: Lös. 2	5 % Ethanol 1 % Essigsäure	15 min
Waschen	Wasser	3 x 5 min
Reduktion	Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O (0,2 g/L)	
Färben	AgNO ₃ (0,2 g/L) Formaldehyd (75 µL 37%ig/100 mL)	
Waschen	Wasser	2 x 1 min
Entwickeln	Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O 0,4 mg/100 mL Formaldehyd 75 µL 37%ig/100 mL Na ₂ CO ₃ 6g/100 mL	ca. 3 – 5 min
Abstoppen	6%ige Essigsäure	30 min
Aufbewahren	Wasser	

Tabelle 26: Silberfärbungsprotokoll für SDS-PAGE.

3.6 Aufreinigung und Charakterisierung der *myo*-Inositolmonophosphat Phosphatase aus *Dictyostelium discoideum*

3.6.1 Aktivitätsbestimmung

Der Reaktionsansatz enthielt je 10 μL Puffer (200 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,5), 20 mM MgCl_2), Wasser, Enzymlösung und Substrat (400 μM *myo*-Ins(3)P). Das Wasser wurde bei Inhibierungsversuchen durch entsprechende Lösungen des Inhibitors ersetzt. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler (90 Upm) inkubiert und die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von 10 μL 2 N HCl gestoppt. Das freigesetzte Phosphat wurde photometrisch bestimmt. Bei einem zu hohen Phosphathintergrund war eine Aktivitätsbestimmung auf diese Weise nicht möglich. Statt dessen wurde die Zunahme des gebildeten *myo*-Inositol durch gepulste Amperometrie bestimmt. Die Reaktionsansätze wurde mit 250 μL H_2O versetzt und anschließend wurde ein Mischbettionenaustauscher (Amberlite MB-3) zugegeben. Das Gemisch wurde zentrifugiert und 200 μL des Überstandes wurden entnommen. Nach Verdünnen auf 500 μL wurde die Probe analysiert.

3.6.2 Zellernte und Aufschluß

D. discoideum Zellen wurden bei einer Zelldichte von $7 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^7$ Zellen/mL geerntet (1500 g, 15 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen dreimal mit gekühltem Mes-Puffer (20 mM Mes/ Na^+ (pH 6,5)) gewaschen und das Zellpellet bei -80 °C eingefroren. Zum Zellaufschluß wurde das tiefgefrorene Zellpellet in 50 mM Tris/HCl (pH 7,7), 1 mM DTT zu einer Zelldichte von $2 \cdot 10^8$ Zellen/mL aufgenommen und aufgetaut. Der Aufschluß wurde mikroskopisch kontrolliert. Das Zelllysate wurde ultrazentrifugiert (150000 g, 45 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und für die nachfolgende Biochromatographie durch Glaswolle filtriert.

3.6.3 Chromatographie an Q-Sepharose ff

Das filtrierte cytosolische Extrakt wurde 1:1 mit Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,7), 1 mM DTT) verdünnt und mit einer Flußrate von 2 mL/min auf eine mit Aufschlußpuffer äquilibrierte Q-Sepharose ff Säule (Säulenvolumen ca. 55 mL) aufgetragen. Die Proteindetektion erfolgte durch ein UV-Photometer mit Durchflußküvette (Uvicord SII, Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg) bei 280 nm. Die Elution erfolgte stufenweise mit 100 mM NaCl, 500 mM NaCl und 1 M NaCl in 50 mM Tris/HCl (pH 7,7), 1 mM DTT. Die Fraktion mit der höchsten Aktivität wurde direkt für die weitere Aufreinigung eingesetzt.

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C. Die Regeneration der Säule erfolgte durch jeweils 200 mL 1 M NaOH, 2 M NaCl und 1 M HCl. Längere Lagerung erfolgte unter 20 % Ethanol.

3.6.4 Chromatographie an MonoQ

Die nach der Chromatographie an Q-Sepharose gewonnene aktivste Fraktion wurde in 25 mg-Aliquote aufgeteilt. Die Lösung wurde sterilfiltriert und so verdünnt, daß die Ionenstärke dem für die Chromatographie verwendeten Auftragungspuffer entsprach (40 mM Tris/HCl (pH 7,7), 0,8 mM DTT, 30 mM NaCl). Die verdünnte Lösung wurde mit einer HPLC-Anlage (siehe 3.3.3.1, ohne Nachsäulenderivatisierung) mit 2 mL/min auf eine mit Auftragungspuffer äquilibrierte MonoQ Säule aufgetragen und anschließend mit einem Gradienten (30 mM NaCl auf 120 mM NaCl in 40 mM Tris/HCl (pH 7,7), 0,8 mM DTT, 30 mM NaCl; 20 min; 1 mL/min) eluiert. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 20 °C. Zur Regeneration wurde 1 M NaOH, 2 M NaCl und 1 M HCl verwendet. Längere Lagerung erfolgte unter 20 % Ethanol.

3.6.5 Chromatofokussierung an PBE 94

Für die Chromatofokussierung wurde ein pH-Gradient von pH 7 bis pH 4 und eine 10 mL-Säule mit PBE 94 verwendet. Als Startpuffer wurde 25 mM Imidazol/HCl (pH 7,4) und als Eluent Polybuffer[®] 74 benutzt. Der Polybuffer[®] 74 (Sigma-Aldrich) wurde 1:8 mit Wasser verdünnt und mit HCl auf pH 4 eingestellt. Da HCO₃⁻ den pH-Gradienten stört, dürfen der Start- und Elutionspuffer kein Kohlendioxid enthalten. Die Puffer wurden daher mit Stickstoff entgast. Die vereinigten aktiven Fraktionen der MonoQ Säule wurden mit einem Centricon[®]-10 (Amicon) umgepuffert und auf ein Volumen von ca. 6 mL aufkonzentriert. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumina Startpuffer äquilibriert und vor dem Auftragen der Probe wurde mit 3 mL Eluent gespült. Die Probe wurde mit einer Flußrate von 1 mL/min aufgetragen. Anschließend wurde mit Polybuffer[®] 74 eluiert und Fraktionen von 3 mL aufgefangen. Die Proteindetektion erfolgte durch ein UV-Photometer mit Durchflußküvette bei 280 nm. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C.

3.6.6 Gelfiltration mit Superdex 200 HR

Für die Gelfiltration wurde Superdex 200 HR (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) verwendet. Die Säule (Volumen ca. 24 mL) wurde mit der HPLC-Anlage betrieben (siehe 3.3.3.1, ohne Nachsäulenderivatisierung). Die Probe wurde auf ca. 0,5 mL aufkonzentriert (Centriprep-10, Millipore GmbH Schwalbach) und dann auf die Säule aufgetragen. Als Laufpuffer diente 40 mM Bis-Tris (pH 7,0), 50 mM NaCl, 1 mM DTT bei einer Flußrate von 0,5 mL/min und einem Gegendruck von 9 bar. Alle Arbeitsschritte

erfolgten bei 20 °C. Für die Bestimmung des Molekulargewichtes der IMPase wurde das Elutionsverhalten des Enzyms mit dem von Standardproteinen verglichen. Nachfolgend sind die zur Kalibrierung benutzten Proteine und die jeweils aufgetragene Menge aufgeführt: 450 µg Aldolase (158 kDa), 600 µg BSA (68 kDa), 600 µg Ovalbumin (45 kDa), 240 µg Chymotrypsinogen (25 kDa), 150 µg Cytochrom C (12,5 kDa) (alle Proteine von Sigma). Die Superdex 200 HR Säule wurde unter 20 % Ethanol gelagert. Falls erforderlich wurde die Säule durch Behandlung mit einer Lösung von 1 mg/mL Pepsin (Sigma) in 100 mM Essigsäure mit 500 mM NaCl über Nacht gereinigt.

3.6.7 Temperaturabhängigkeit

Der Reaktionsansatz enthielt je 30 µL Wasser, Puffer (200 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,5), 20 mM MgCl₂), Enzymlösung, Substrat (400 µM *myo*-Ins(3)P). Die Reaktionsansätze wurden bei verschiedenen Temperaturen (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C) inkubiert, zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 40 µL-Aliquote entnommen und die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 10 µL 2 N HCl gestoppt. Das enzymatisch freigesetzte Phosphat wurde photometrisch bestimmt.

3.7 Versuche zur Identifizierung von Inositoltrisphosphat-Phosphatasen

Für die Untersuchungen wurden *D. discoideum* Zellen bei einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen/mL geerntet (1500g, 15 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen dreimal mit gekühltem Mes-Puffer (20 mM Mes/Na⁺; pH 6,5) gewaschen und das Zellpellet zu einer Zelldichte von $5 \cdot 10^8$ Zellen/mL in 50 mM Bis-Tris (pH 6,0) aufgenommen. Zum Zellaufschluß wurde die Suspension durch eine Filter mit 5 µm Porengröße (Nucleopore PC-Membran 5 µm) gepreßt. Der Aufschluß wurde mikroskopisch kontrolliert. Das Zelllysate wurde ultrazentrifugiert (150000g, 45 min, 4 °C) und der Überstand wurde direkt für die Untersuchungen verwendet. Der Testansatz mit einem Gesamtvolumen von 200 µL enthielt 20 µL Zelllysate (entspricht $1 \cdot 10^7$ Zellen), 100 µL Testpuffer (160 mM Bis-Tris (pH 6,0), 800 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 20 mM MgCl₂), 20 µL Inositolphosphatlösung (50 nmol) und 60 µL Wasser. Die Proben wurden 40 Minuten bei 25 °C auf einem Rundschtüttler inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µL 2 N HCl gestoppt. Es wurden 500 µL Wasser zum Reaktionsansatz gegeben und der pH-Wert der Probe auf 5 - 7 eingestellt. Eventuell ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert (13000g, 10 min, RT). Der Überstand wurde mit Wasser auf 2 mL aufgefüllt und ein Aliquot das 5 nmol nicht umgesetzten Inositoltrisphosphat entspricht für Analyse mit der HPLC-MDD (alkalisches Elutionssystem, siehe 3.3.3.3) entnommen. Getestet wurden die folgenden Inositoltrisphosphate:

Ins(1,2,6)P₃/Ins(2,3,4)P₃, Ins(1,2,3)P₃, Ins(1,2,4)P₃/Ins(2,3,6)P₃, Ins(1,5,6)P₃/Ins(3,4,5)P₃, Ins(1,3,4)P₃, Ins(1,4,6)P₃ und Ins(4,5,6)P₃.

3.8 Aufreinigung und Charakterisierung einer InsP₅/InsP₄-Phosphatase aus *Dictyostelium discoideum*

3.8.1 Aktivitätsbestimmung

Der Reaktionsansatz enthielt je 10 µL Puffer (200 mM Mes/Na⁺ (pH 5,5), 4 mM MgCl₂, 0,4 % Triton X-100), Wasser, Enzymlösung und Substrat (400 µM Ins(1,2,5,6)P₄). Das Wasser wurde bei Inhibierungsversuchen durch entsprechende Lösungen des Inhibitors ersetzt. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler (90 Upm) inkubiert und die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von 10 µL 5 N HCl gestoppt. Das freigesetzte Phosphat wurde photometrisch bestimmt. Bei einem zu hohen Phosphathintergrund war eine Aktivitätsbestimmung auf diese Weise nicht möglich. Stattdessen wurde die Abnahme von Ins(1,2,5,6)P₄ durch HPLC-MDD bestimmt. Dazu wurde nach Abstoppen der Reaktion mit 5 N HCl 500 µL Wasser zum Reaktionsansatz gegeben und der pH-Wert der Probe auf 5 - 7 eingestellt. Eventuell ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert (13000 g, 10 min, RT). Der Überstand wurde mit Wasser auf 2 mL aufgefüllt und mit der HPLC-MDD (saurer Elutionssystem, siehe 3.3.3.2) analysiert.

3.8.2 Zellernte und Aufschluß

D. discoideum Zellen wurden bei einer Zelldichte von 7·10⁶ bis 1·10⁷ Zellen/mL geerntet (1500 g, 15 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen dreimal mit gekühltem Mes-Puffer (20 mM Mes/Na⁺; pH 6,5) gewaschen und das Zellpellet bei -80 °C eingefroren. Zum Zellaufschluß wurde das tiefgefrorene Zellpellet in 50 mM Mes/Na⁺ (pH 6,5), 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF zu einer Zelldichte von 2·10⁸ Zellen/mL aufgenommen und aufgetaut. Der Aufschluß wurde mikroskopisch kontrolliert. Das Zelllysate wurde ultrazentrifugiert (150000 g, 45 min, 4 °C). Zellorganellen und -membranen wurden verworfen und der Überstand für die weitere Aufreinigung verwendet.

3.8.3 Chromatographie an Heparin-Agarose

Das cytosolische Extrakt wurde 1:1 mit Aufschlußpuffer (50 mM Mes/Na⁺ (pH 6,5), 5 mM MgCl₂, 1mM PMSF) verdünnt und mit einer Flußrate von 1 mL/min auf eine mit Aufschlußpuffer äquilibrierte Heparin-Agarose Säule (Säulenvolumen ca. 10 mL) aufgetragen. Die Proteindetektion erfolgte durch ein UV-Photometer mit Durchflußküvette

(Uvicord SII, Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg) bei 280 nm. Anschließend erfolgte die Elution in vier Stufen mit Ionenstärken von 100 mM, 200 mM, 500 mM und 1 M NaCl in 50 mM Mes/Na⁺ (pH 6,5), 5 mM MgCl₂. Die Fraktion mit der höchsten Aktivität wurde direkt für die weitere Aufreinigung eingesetzt. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C. Die Regeneration der Säule erfolgte durch jeweils 100 mL Wasser, 100 mM Tris/HCl (pH 8,5), 500 mM NaCl, abermals Wasser und 100 mM Na-Acetatpuffer (pH 4,5), 500 mM NaCl. Längere Lagerung erfolgte unter 20 % Ethanol.

3.8.4 Chromatographie an Q-Sepharose ff

Das cytosolische Extrakt wurde 1:1 mit Aufschlußpuffer (50 mM Mes/Na⁺ (pH 6,5), 5 mM MgCl₂, 1mM PMSF) verdünnt und mit einer Flußrate von 2 mL/min auf eine mit Aufschlußpuffer äquilibrierte Q-Sepharose ff Säule (Säulenvolumen ca. 55 mL) aufgetragen. Die Proteindetektion erfolgte durch ein UV-Photometer mit Durchflußküvette bei 280 nm. Die Elution erfolgte in drei Stufen mit Ionenstärken von 200 mM, 500 mM und 1 M NaCl in 50 mM Mes/Na⁺ (pH 6,5), 5 mM MgCl₂. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C. Zur Regeneration wurde 1 M NaOH, 2 M NaCl und 1 M HCl verwendet. Längere Lagerung erfolgte unter 20 % Ethanol.

3.8.5 InsP₆-Affinitätselutionschromatographie an Heparin-Agarose

Für die InsP₆-Affinitätselutionschromatographie nach Wilson & Majerus (1996) wurde das cytosolische Extrakt 1:1 mit Aufschlußpuffer (50 mM Mes/Na⁺ (pH 6,5), 5 mM MgCl₂, 1mM PMSF) verdünnt und mit einer Flußrate von 1 mL/min auf eine mit Aufschlußpuffer äquilibrierte Heparin-Agarose Säule (Säulenvolumen ca. 10 mL) aufgetragen. Die Proteindetektion erfolgte durch ein UV-Photometer mit Durchflußküvette bei 280 nm. Die Elution erfolgte in vier Stufen mit 0,5 mM, 1 mM, 10 mM InsP₆ und 500 mM NaCl in 50 mM Mes/Na⁺ (pH 6,5). Die einzelnen Fraktionen der Elution wurden durch Ultrafiltration (Centriprep-50, Millipore) auf 50 mM Mes/Na⁺ (pH 6,5) umgepuffert, da InsP₆ auf die InsP₅/InsP₄-Phosphatase inhibierend wirkt. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C. Die Aktivität wurde mittels HPLC-MDD (saures Elutionssystem, siehe 3.3.3.2) bestimmt. Die Säule wurde wie unter 3.8.3 beschrieben regeneriert und gelagert.

3.8.6 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Für die Tests wurden fertige 1 mL-Säulen mit Phenyl Sepharose[®] 6 Fast Flow bzw. Octyl Sepharose[®] von Amersham Bioscience (Freiburg) und 15 mg-Aliquote der 500 mM NaCl-Fraktion aus 3.8.3 verwendet. Es wurden drei Elutionssysteme getestet: a) Das

15 mg-Aliquot wurde mit einer Flußrate von 1 mL/min auf die mit 50 mM Mes/Na⁺ (pH 6,5), 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte in drei Stufen mit 200 mM NaCl, 100 mM NaCl und 0 mM NaCl in 50 mM Mes/Na⁺ (pH 6,5), 5 mM MgCl₂. b) Durch die Verwendung von Ammoniumsulfat lassen sich hydrophobe Wechselwirkungen verstärken, daher wurde vor der Chromatographie eine Ammoniumsulfatfällung mit einer Sättigung von 60 % (NH₄)₂SO₄ (= 2,72 M) durchgeführt und ausgefallenes Protein abzentrifugiert (13000 g, 10 min 4 °C). Der die Aktivität enthaltene Überstand wurde mit einer Flußrate von 1 mL/min auf die mit 50 mM Mes/Na⁺ (pH 6,5), 2,72 M (NH₄)₂SO₄ äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte in drei Stufen mit 1,36 M (NH₄)₂SO₄, 0,68 M (NH₄)₂SO₄ und 0 M (NH₄)₂SO₄ in 50 mM Mes/Na⁺ (pH 6,5). c) Das 15 mg-Aliquot wurde mit einer Flußrate von 1 mL/min auf die mit 50 mM Mes/Na⁺ (pH 6,5), 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 10 % Triton X-100 in 50 mM Mes/Na⁺ (pH 6,5), 5 mM MgCl₂. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C. Die Aktivität wurde mittels HPLC-MDD (saures Elutionssystem, siehe 3.3.3.2) bestimmt. Zur Regeneration der Säulen wurden diese mit 4 Säulenvolumen 1 M NaOH, gefolgt von 4 Säulenvolumen Wasser gespült. Bei starker Verschmutzung wurden 6 - 10 Säulenvolumen 70 % Ethanol verwendet. Längere Lagerung erfolgte unter 20 % Ethanol.

3.8.7 Chromatographie an Hydroxylapatit

Die 500 mM NaCl-Fraktion aus 3.8.3 wurde mit 10 mM KH₂PO₄ (pH 6,8) auf das zehnfache Volumen verdünnt. Mit einer HPLC-Anlage (siehe 3.3.3.1, ohne Nachsäulenderivatisierung) wurde die Probe auf eine Hydroxylapatitsäule (Bio-Rad Macro-Prep Ceramic Hydroxylapatit, Volumen ca. 1 ml) mit einer Flußrate von 1,5 mL/min aufgetragen. Die Elution erfolgte in vier Stufen mit 100 mM, 200 mM, 300 mM und 400 mM KH₂PO₄ (pH 6,8). Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 20 °C. Die Aktivität wurde mittels HPLC-MDD (saures Elutionssystem, siehe 3.3.3.2) bestimmt. Das Hydroxylapatit wurde nach Benutzung mit dem fünffachen Säulenvolumen an 400 mM KH₂PO₄ (pH 6,8) gewaschen und anschließend mit Wasser neutral gewaschen. Längere Lagerung erfolgte unter Wasser.

3.8.8 Chromatofokussierung an PBE 94

Die Vorgehensweise entspricht der unter 3.6.5 geschilderten.

3.8.9 Metallchelatchromatographie

Die 5 mL HiTrap[®] Säule (Pharmacia) wurde durch Spülen mit dem 10fachen Säulenvolumen einer 0,1-molaren Salzlösung mit dem entsprechenden Kation (Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺) beladen.

Anschließend wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen Wasser gespült und mit Startpuffer (50 mM Tris (pH 7,7), 500 mM NaCl) äquilibriert. 25 mg-Aliquote der 500 mM NaCl-Fraktion aus 3.8.3 wurden mit einer Flußrate von 1 mL/min auf die äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Proteindetektion erfolgte durch ein UV-Photometer mit Durchflußküvette bei 280 nm. Die Elution erfolgte entweder mit a) 50 mM Tris (pH 7,7), 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, b) 50 mM Na-Acetat (pH 3,5), 500 mM NaCl oder c) 50 mM Tris (pH 7,7), 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C. Der Durchlauf und alle Fraktionen wurden auf $\text{InsP}_5/\text{InsP}_4$ -Phosphatase-Aktivität kontrolliert. Nach jeder Benutzung wurde die Säule mit dem 2fachen Säulenvolumen 50 mM EDTA, 1 M NaCl und zur Entfernung von stark hydrophoben Proteinen mit 70 % Ethanol gewaschen. Längere Lagerung erfolgte unter 20 % Ethanol.

3.8.10 Gelfiltration an Superdex 200 HR

Die Vorgehensweise entspricht der unter 3.6.6 geschilderten. Als Elutionspuffer wurde 40 mM Tris/HCl (pH 7,7), 50 mM Imidazol, 400 mM NaCl verwendet.

3.8.11 Temperaturabhängigkeit

Für die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit wurde der Reaktionsansatz leicht verändert: 30 μL Wasser, 30 μL Puffer (200 mM Mes/ Na^+ (pH 5,5), 4 mM MgCl_2 , 0,4 % Triton X-100), 30 μL Enzymlösung, 30 μL Substrat (400 μM $\text{Ins}(1,2,5,6)\text{P}_4$). Der Reaktionsansätze wurden bei verschiedenen Temperaturen (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 °C) inkubiert, zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 40 μL -Aliquote entnommen und die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 10 μL 2 N HCl gestoppt. Das enzymatisch freigesetzte Phosphat wurde photometrisch bestimmt.

3.9 Eine membrangebundene Phytase aus *Dictyostelium discoideum*

3.9.1 Aktivitätsbestimmung

Der Aktivitätstest erfolgte in einem Gesamtvolumen von 100 μL . Zu 20 μL Puffer (125 mM Na-Acetat (pH 4,5)) wurden 20 μL Enzymlösung und 20 μL Wasser (bei Inhibierungsversuchen wurde das Wasser durch entsprechende Lösungen des Inhibitors ausgetauscht) gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40 μL Substratlösung (5 mM InsP_6 in 125 mM Na-Acetat (pH 4,5)) gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 10 μL -Proben entnommen und zu 10 μL 2 N HCl, die vorlegt wurden, gegeben. Das freigesetzte Phosphat wurde photometrisch bestimmt.

3.9.2 Zellaufschluß und Solubilisierung

D. discoideum Zellen wurden in der stationären Phase bei einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ bis $2 \cdot 10^7$ Zellen/mL geerntet (1500 g, 15 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen dreimal mit gekühltem Tris-Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,7)) gewaschen und das Zellpellet bei -80 °C eingefroren. Zum Zellaufschluß wurde das tiefgefrorene Zellpellet in Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,7), 2,5 mM EDTA, 4 mM Benzamidin, 1mM PMSF) zu einer Zelldichte von $2 \cdot 10^8$ Zellen/mL aufgenommen und aufgetaut. Der Aufschluß wurde mikroskopisch kontrolliert. Das Zelllysate wurde ultrazentrifugiert (150000 g, 45 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen. Der Niederschlag wurde in Aufschlußpuffer zu einer Zelldichte von $4 \cdot 10^8$ Zellen/mL aufgenommen und zügig viermal in einem Potter-Homogenisator bei 500 Upm homogenisiert. Dann wurden 10 % (w/v) Saccharose und 1 % (w/v) Triton^H X-100 zugegeben. Die Suspension wurde 30 min unter langsamem Rühren auf Eis inkubiert. Danach wurde unter Rühren tropfenweise eine wäßrige 50%ige PEG₆₀₀₀-Lösung zugegeben bis die Suspension eine Endkonzentration von 11 % (w/v) PEG₆₀₀₀ erreichte. Nach einer weiteren 30minütigen Inkubation auf Eis wurde die Suspension (40000 g, 30 min, 4 °C) zentrifugiert und der erhaltene Niederschlag verworfen.

3.9.3 Chromatographie an Q-Sepharose ff

Der die solubilisierter Phytase enthaltende Überstand aus 3.9.2 wurde mit einer Flußrate von 3 mL/min auf die mit 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 0,1 % (w/v) Triton^H X-100, 10 % (w/v) Glycerin äquilibrierte Q-Sepharose ff Säule (Volumen ca. 55 mL) aufgetragen. Die Proteindetektion erfolgte durch ein UV-Photometer mit Durchflußküvette bei 280 nm. Die Elution erfolgte Stufenweise mit 200 mM NaCl, 400 mM NaCl und 1 M NaCl in mM Tris/HCl (pH 7,5), 0,1 % (w/v) Triton^H X-100, 10 % (w/v) Glycerin. Die Phytase wurde bei einer Ionenstärke von 400 mM NaCl eluiert. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C. Die Regeneration der Säule erfolgte durch jeweils 200 mL 1 M NaOH, 2 M NaCl und 1 M HCl. Längere Lagerung erfolgte unter 20 % Ethanol.

3.9.4 Chromatographie an Source 15Q

Die 400 mM NaCl-Fraktion aus 3.9.3 wurde 1:1 mit 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 0,1 % (w/v) Triton^H X-100, 10 % (w/v) Glycerin verdünnt und über eine HPLC-Anlage (siehe 3.3.3.1, ohne Nachsäulenderivatisierung) mit einer Flußrate von 3 mL/min auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Source 15Q Säule (Volumen ca. 10 mL) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 200 mM NaCl auf 350 mM NaCl (60 mL Volumen) und

anschließend mit 30 mL 350 mM NaCl und 30 mL 1 M NaCl. Es wurden 2 mL-Fractionen aufgefangen. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C. Die Regeneration der Säule erfolgte durch jeweils 20 mL 1 M NaOH, 2 M NaCl und 1 M HCl. Längere Lagerung erfolgte unter 20 % Ethanol.

3.9.5 Kopplung von $\text{Ins}(\text{SO}_4)_5\text{NH}_2$ an epoxy-aktivierte Sepharose 6B

Die epoxy-aktivierte Sepharose 6B mußte vor den Kopplungsversuchen vorbereitet werden. Dazu wurde die benötigte Menge des gefriergetrockneten Materials (ca. 90 μmol Epoxygruppen pro g Material) in destilliertem Wasser aufgenommen und 1 h auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Das aufgequollene Material wurde anschließend über eine Glasfritte (G 3) mit destilliertem Wasser gewaschen (ca. 200 mL H_2O pro g Material) und im Kopplungspuffer aufgenommen. Für die Kopplungsversuche im Bereich pH 9 - 11 wurden 200 mM Carbonate/Bicarbonate-Puffer und für pH 12 - 13 NaOH-Lösungen verwendet, alle Kopplungspuffer enthielten 500 mM NaCl. Für die Kopplungsversuche wurden 5 μmol von $\text{Ins}(\text{SO}_4)_5\text{NH}_2$ pro Ansatz und 0,56 g (entspricht einem 10fachen Überschuß an $\text{Ins}(\text{SO}_4)_5\text{NH}_2$ gegenüber den Bindestellen) bzw. 2,8 g (entspricht einem 50fachen Überschuß) gefriergetrocknete Sepharose 6B verwendet. Die Reaktionsansätze wurden bei 22 °C bzw. 37 °C für 24 h auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben aus dem Überstand des Reaktionsansatzes entnommen und auf ihre inhibitorische Wirkung getestet (siehe 3.9.1). Für die Aktivitätsbestimmungen wurde eine mit Triton X-100 solubilisierte und partiell über Q-Sepharose ff und Source 15Q aufgereinigte Phytase aus *D. discoideum* (siehe 3.9.2 bis 3.9.4) verwendet. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Material mit je 50 mL Wasser, 100 mM NaHCO_3 (pH 8,0), 100 mM Na-Acetat (pH 4,0) gewaschen. Zum Blocken nichtumgesetzter Epoxygruppen wurde das Material für 24 h in 1 M Ethanolamin bei 37 °C inkubiert und danach mit Wasser gewaschen. Das Säulenmaterial wurde dann mit 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 0,1 % (w/v) Triton^H X-100, 10 % (w/v) Glycerin äquilibriert und mit einer geringen Menge der partial aufgereinigte Phytase versetzt und durchmischt. Der Reaktionsansatz wurde zentrifugiert (500 g, 20 sec, RT) und der Überstand auf Phytaseaktivität untersucht.

3.9.6 Kopplung von InsP_6 an (Aminomethyl)polystyrol mit EDC als Crosslinker

Die Kopplungsreaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 500 μL mit 5 μmol InsP_6 durchgeführt. Für die Reaktion mit 10fachen Überschuß an Amin und EDC wurden 55 mg (Aminomethyl)polystyrol (1,1 mmol Amin/g Harz) in 400 μL Reaktionspuffer (100 mM Mes/ Na^+ (pH 6,0), 250 mM NaCl) resuspendiert und mit 50 μL InsP_6 -Lösung (100 mM InsP_6

in Reaktionspuffer) versetzt. Anschließend wurden 50 μL EDC (1 M EDC in Reaktionspuffer) zugegeben und der Reaktionsansatz auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Die Kopplungsreaktionen wurden bei 22 °C und 37 °C durchgeführt. Für die Reaktionen bei pH 5,0 wurde 100 mM Mes/ Na^+ (pH 5,0), 250 mM NaCl als Reaktionspuffer verwendet. Der Überschuß an Amin und EDC wurde in den Versuchreihen variiert, dazu wurden die Mengen an (Aminomethyl)polystyrol und EDC entsprechend geändert und das verwendete Reaktionspuffer-Volumen angepaßt. Die Reaktionsdauer lag zwischen einer Stunde und einer Woche. Konnte in den ersten Stunden keine Anbindung nachgewiesen werden, wurde der Reaktionsansatz weiterinkubiert. Zur Kontrolle der Anbindung wurde die InsP_6 -Konzentration im Reaktionsansatz verfolgt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde der Reaktionsansatz zentrifugiert (500 g, 20 sec, RT) und aus dem Überstand eine 2 μL -Probe entnommen. Diese wurde mit 98 μL Wasser verdünnt und für eine spätere Analyse bei -85 °C eingefroren. Vor der eigentlichen Analyse wurden die Probe durch Kieselgur (300 μL) zentrifugiert, anschließend wurde mit 100 μL Wasser nachgespült. Das erhaltene Zentrifugat wurde ausgelitert und ein Volumen das 3 nmol nicht umgesetzten InsP_6 entsprach mittels HPLC-MDD (saurer Elutionssystem, siehe 3.3.3.2) analysiert. Nach jeder Kopplungsreaktion wurde das (Aminomethyl)polystyrol-Harz mit Schwefelsäure hydrolysiert, um anschließend das aus dem eventuell gebundenen InsP_6 freigesetzte Phosphat photometrisch zu bestimmen. Die Vorgehensweise entsprach dabei der unter 3.3.2 geschilderten.

3.9.7 Untersuchungen zur Verankerung der Phytase in der Membran von *Dictyostelium discoideum*

Dazu wurden *D. discoideum* Zellen bei einer Zelldichte $1 \cdot 10^7$ Zellen/mL geerntet (1500 g, 15 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen dreimal mit gekühltem Mes-Puffer (20 mM Mes/ Na^+ (pH 6,5)) gewaschen und das Zellpellet bei -80 °C eingefroren. Zum Zellaufschluß wurde das tiefgefrorene Zellpellet in 5 mM Glycin, 0,5 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 , pH 8,5 zu einer Zelldichte von $2 \cdot 10^8$ Zellen/mL aufgenommen und aufgetaut. Das Zelllysat wurde ultrazentrifugiert (150000 g, 45 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag wurde in Mes-Puffer (20 mM Mes/ Na^+ (pH 6,5)) zu einer Zelldichte von $2 \cdot 10^8$ Zellen/mL aufgenommen. Ein 1 mL-Aliquot ($2 \cdot 10^8$ Zellen) wurde zentrifugiert (140000 g, 40 min, 4 °C) und der Niederschlag für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet:

Na_2CO_3 -Behandlung nach Van Dijken et al. (1997): Der Niederschlag wurde in 400 μL 100 mM Na_2CO_3 resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde ultrazentrifugiert (140000 g, 40 min, 4 °C). Zum Überstand wurde 1 mL Puffer (50 mM

Tris/HCl (pH 7,4), 0,1 % Triton X-100) gegeben und mit 160 μ L 0,5 M HCl neutralisiert. Der neutralisierte Überstand wurde auf Phytaseaktivität untersucht.

PI-PLC-Behandlung: Der Niederschlag wurde in 1 mL 50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 0,1 % Triton X-100, resuspendiert anschließend wurden 500 mU PI-PLC zugefügt und der Reaktionsansatz auf einem Rundschtüttler bei 37 °C inkubiert. Es wurden Proben nach 2 h, 4 h und 24 h entnommen und auf Phytaseaktivität untersucht.

Solubilisierung mit Triton X-100: Der Niederschlag wurde in 1 mL 50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 % Triton X-100 resuspendiert, dazu wurde es viermal bei 500 Upm in einem Potter-Homogenisator homogenisiert. Die erhaltene Suspension wurde 30 min gerührt und die festen Bestandteile abzentrifugiert (140000 g, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde auf Phytaseaktivität untersucht.

Zur Bestimmung der Phytaseaktivität wurden zu 40 μ L Probe, 20 μ L Puffer (125 mM Na-Acetat (pH 4,5)) und 40 μ L Substrat (1,25 mM *myo*-InsP₆ in 125 mM Na-Acetat (pH 4,5)) gegeben, zu verschiedene Zeitpunkten wurden 30 μ L-Aliquote entnommen und mit 20 μ L 5 N HCl versetzt. Die Lösung wurde mit Wasser auf ca. 500 μ L aufgefüllt und neutralisiert. Ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert (13000 g, 10 min, RT), der Überstand auf 2 mL mit Wasser aufgefüllt und mit der HPLC-MDD (saurer Elutionssystem, siehe 3.3.3.2) analysiert.

3.10 Stereo- und Regiospezifität von Phytasen aus Hefen

3.10.1 Fällung der sekretierten Phytase von *Pichia rhodanensis*

Die Zellen wurden bei einer OD₆₀₀ von 20 - 25 durch Zentrifugation (4000 g, 15 min, 4 °C) geerntet. Die Phytase wurde aus dem Überstand mit 66 % vorgekühltem Ethanol (-20 °C) gefällt. Die Fällung wurde auf einem Eis/Kochsalzbad unter Rühren und kontinuierlicher Ethanol-Zugabe durchgeführt. Um Aktivitätsverluste zu vermeiden, mußte darauf geachtet werden, daß die Lösung nicht gefriert. Nach erfolgter Zugabe wurde die Lösung noch für weitere 15 min gerührt. Das gefällte Protein wurde abzentrifugiert (6000 g, 15 min, 4 °C) in 50 mM Tris/HCl (pH 7,7) resuspendiert, aliquotiert und bei -20 °C tiefgefroren. Das auf diese Weise präparierte Enzym behält seine Aktivität für mehrere Monate. Aus einer 50 mL Kultur *P. rhodanensis* wurden 150 - 200 mU Phytase-Aktivität erhalten (Wiederfindung 80 %).

3.10.2 Gelfiltration der Phytase aus *Pichia rhodanensis* an Superdex 200 HR

Die Abschätzung des Molekulargewichts der Phytase aus *P. rhodanensis* erfolgte durch Gelfiltration an Superdex 200 HR. Die Vorgehensweise entspricht der unter 3.6.6 geschilderten.

3.10.3 Aktivitätstest für die Phytase aus *Pichia rhodanensis*

Der Reaktionsansatz enthielt 100 μ L Puffer (125 mM Na-Acetat (pH 4,6), 1,25 mM InsP_6) und 25 μ L Enzymlösung. Die Mischung wurde bei 56 °C inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten 10 μ L-Aliquote entnommen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ L 2N HCl gestoppt und das enzymatisch freigesetzte Phosphat photometrisch bestimmt.

3.10.4 Abbau von *myo-InsP₆*, *neo-InsP₆* und *L-chiro-InsP₆* durch die Phytasen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia rhodanensis*

Die Zellen von *S. cerevisiae* wurden durch Zentrifugation geerntet und zweimal mit 75 mM Na-Acetat (pH 4,6) gewaschen (3000 g, 10 min, 4 °C). Die Zellen (Feuchtgewicht 20 - 60 mg) wurden in 700 μ L 75 mM Na-Acetat (pH 4,6) resuspendiert, der 1 mM des zu untersuchenden Substrates enthielt. Im Falle von *P. rhodanensis* wurde die durch Ethanolpräzipitation angereicherte Phytase (siehe 3.10.1, 20 mU/mL, Bestimmung durch P_i -Freisetzung von 1 mM *myo-InsP₆*) anstelle von ganzen Zellen verwendet. Für die Inhibierungsstudien enthielt der Reaktionsansatz noch 100 μ M Inositolhexakisulfat. Die Proben wurden in einer 24-Kavitäten-Zellkulturplatte bei 45 °C in einem Wasserbad-Schüttler inkubiert. Damit sich die richtige Temperatur einstellen konnte wurden die Platten 2 Minuten vorinkubiert bevor mit der Analyse begonnen wurde. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 50 μ L-Aliquote entnommen, die Zellen abzentrifugiert (15000 g, 1 min, 4 °C) und der Überstand mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei den Experimenten mit der Phytase aus *P. rhodanensis* wurden die Aliquote ohne weitere Behandlung direkt eingefroren. Die Aliquote wurden zu einem späteren Zeitpunkt mit der HPLC-MDD (saures Elutionssystem, siehe 3.3.3.2) analysiert.

3.10.5 Bestimmung der Enantiomerenreinheit von *myo-Inositolpentakisphosphaten* mit Hilfe einer Phytase aus *Dictyostelium discoideum*

Für die Bestimmung der Enantiomerenreinheit von *myo-Inositolpentakisphosphaten* wurde eine mit Triton X-100 solubilisierete und partiell über Q-Sepharose ff und Source 15Q aufgereinigte Phytase aus *D. discoideum* (siehe 3.9.2 bis 3.9.4) verwendet. Um die benötigten kinetischen Daten zu erhalten wurde ein Mikrotiterplattentest etabliert. Der Reaktionsansatz

in einer Kavität enthielt 10 μL Testpuffer (200 mM Mes/Na⁺ (pH 5,15), 0,2 % (w/v) Triton^H X-100), 10 μL Wasser, 10 μL Phytase (45 mU/mL, Bestimmung durch Pi-Freisetzung von 1 mM *myo*-InsP₆) aus *D. discoideum* und 10 μL einer 400 μM *myo*-Inositolphosphat-Lösung. Die Proben wurden bei Raumtemperatur auf einen Schüttler (80 Upm) inkubiert und die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von 10 μL 2 N HCl gestoppt. Das freigesetzte anorganische Phosphat wurde anschließend photometrisch bestimmt. Für die eigentliche Bestimmung wurde der Reaktionsansatz auf 120 μL vergrößert. Die Reaktion wurde, als 24 % des organisch gebundenen Phosphats freigesetzt waren, durch die Zugabe von 30 μL 2 N HCl gestoppt. Die Proben wurden neutralisiert und anschließend mit der HPLC-MDD (saurer Elutionssystem, siehe 3.3.3.2) analysiert.

3.11 Enzymunterstützte Synthesen

3.11.1 Darstellung von D-*neo*-Ins(1,2,5,6)P₄ mit Hilfe einer Phytase aus

Saccharomyces cerevisiae

Nach einem 25stündigen Wachstum wurden Zellen von *S. cerevisiae* bei einer OD₆₀₀ von 15 durch Zentrifugation (3000 g, 10 min, 4 °C) geerntet. Die Zellen wurden zweimal mit 75 mM Na-Acetat (pH 4,6) gewaschen (3000 g, 10 min, 4 °C) und das Feuchtgewicht der Zellen bestimmt (25 mL Zellkultur ergeben ca. 500 mg). Die Zellen wurden in 75 mM Na-Acetat (pH 4,6) der 1 mM *neo*-InsP₆ enthielt auf eine Endkonzentration von 30 mg Zellen/mL resuspendiert. Die Reaktion wurde bei 45 °C auf einem Wasserbad-Schüttler durchgeführt. Der Reaktionsverlauf wurde mit HPLC-MDD (saurer Elutionssystem, siehe 3.3.3.2) verfolgt. Nach 80 - 90 Minuten wurde die Reaktion durch Entfernen der Zellen (6000 g, 10 min, 4 °C) gestoppt. Das Sediment wurde zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen, die Überstände vereinigt und sterilfiltriert. Das Produkt wurde mit Hilfe der HPLC (saurer Elutionssystem ohne Nachsäulenderivatisierung, siehe 3.3.3.2) aufgereinigt. Nach der Gefriertrocknung lag die, durch Bestimmung des anorganischen Phosphats, ermittelte Gesamtausbeute bei 75 - 85 % für D-*neo*-Ins(1,2,5,6)P₄.

$[\alpha]_D^{20} = -12,8^\circ$ (c= 0,22 H₂O); ¹H-NMR (D₂O, pH 6 mit ND₄OD eingestellt): δ 3,86 (s, 2 H, H-3, H-4), 4,37 (d, $J = 6,6$ Hz, 2 H, H-1, H-6), 4,74 (d, $J = 9,2$ Hz, 2 H, H-2, H-5); ¹³C-NMR (D₂O, pH 6 mit ND₄OD eingestellt): δ 71,89 (C-3 und C-4), 74,74 (C-1 und C-6), 77,50 (C-2 und C-5); ³¹P-NMR {¹H} (D₂O, pH 6 eingestellt mit ND₄OD): δ 1,78 (P-1 und P-6), 3,08 (p-2 und P-5).

3.11.2 Darstellung von *L-chiro*-Ins(1,2,3,5,6)P₅ und *L-chiro*-Ins(1,2,3,6)P₄ mit Hilfe einer Phytase aus *Pichia rhodanensis*

Für die Dephosphorylierung von *L-chiro*-InsP₆ wurde die durch Ethanolpräzipitation angereicherte Phytase aus *P. rhodanensis* (siehe 3.10.1) verwendet. Die Reaktion wurde in 75 mM Na-Acetat (pH 4,6) mit einer Substratkonzentration von 1 mM und einer Enzymaktivität von 8,5 mU/mL bei 45 °C auf einem Wasserbadschüttler durchgeführt. Der Reaktionsverlauf wurde mit Hilfe der HPLC-MDD (saures Elutionssystem, siehe 3.3.3.2) verfolgt und die Reaktionen als die Konzentrationen an *L-chiro*-Ins(1,2,3,5,6)P₅ und *L-chiro*-Ins(1,2,3,6)P₄ ungefähr gleich waren nach 80 - 90 Minuten gestoppt. Die Produkte wurden mit Hilfe der HPLC (saures Elutionssystem ohne Nachsäulenderivatisierung, siehe 3.3.3.2) aufgereinigt. Nach der Gefriertrocknung lag die, durch Bestimmung des anorganischen Phosphats, ermittelte Gesamtausbeute bei 30 - 40 % für beide Verbindungen.

L-chiro-Ins(1,2,3,5,6)P₅: $[\alpha]_D^{20} = -26^\circ$ (c= 0,5, H₂O); ¹H-NMR (D₂O, pH 6 mit ND₄OD eingestellt): δ 3,86 (Ψ t, $J = 9,2$ Hz, 1 H, H-4), 4,24 (Ψ q, $J = 9,2$ Hz, 1 H, H-3), 4,33 (d Ψ t, $J = 9,7$ Hz, $J = 3,1$ Hz, 1 H, H-5), 4,39 (d Ψ t, $J = 9,7$ Hz, $J = 2,5$ Hz, 1 H, H-2), 4,65 (unter D₂O, 2 H, H-1; H-6); ¹³C-NMR (D₂O, pH 6 mit ND₄OD eingestellt): δ 73,72 (dd, $J = 6,1$ Hz, $J = 2,0$ Hz, CH), 74,52 (d, $J = 4,1$ Hz, CH), 75,20 (m, CH), 75,43 (d, $J = 4,1$ Hz, CH), 76,04 (Ψ t, $J = 5,1$ Hz, CH), 79,21 (Ψ t, $J = 5,6$ Hz, CH); ³¹P-NMR{¹H} (D₂O, pH 6 mit ND₄OD eingestellt): δ 1,17 (P-1), 1,48 (P-5 und P-6), 2,09 (P-2), 2,48 (P-3).

L-chiro-Ins(1,2,3,6)P₄: $[\alpha]_D^{20} = -19,8^\circ$ (c= 0,63, H₂O); ¹H-NMR (D₂O, pH 6 mit ND₄OD eingestellt): δ 3,82 (Ψ t, $J = 9,9$ Hz, 1 H, H-4), 3,91 (dd, $J = 9,4$ Hz, $J = 2,3$ Hz, 1 H, H-5), 4,23 (Ψ q, $J = 9,0$ Hz, 1 H, H-3), 4,39 (d Ψ t, $J = 9,4$ Hz, $J = 2,5$ Hz, 1 H, H-2), 4,59 (dd, $J = 9,2$ Hz, $J = 3,6$ Hz, 1 H, H-6), 4,65 (unter D₂O, 1 H, H-1); ¹³C-NMR (D₂O, pH 6 mit ND₄OD eingestellt): δ 70,29 (m, CH), 73,16 (s, CH), 73,53 (m, CH), 73,57 (m, CH), 74,05 (d, $J = 4,1$ Hz, CH), 77,70 (m, CH); ³¹P-NMR{¹H} (D₂O, pH 6 mit ND₄OD eingestellt): δ 1,68 (P-1), 2,36 (P-2), 2,57 (P-&), 3,07 (P-3).

3.11.3 Darstellung von *myo*-Ins(2,3,6)P₃ mit Hilfe einer membrangebundenen Phytase aus *Dictyostelium discoideum*

Es wurde eine mit Triton X-100 solubilisierte und partiell über Q-Sepharose ff und Source 15Q aufgereinigte Phytase aus *D. discoideum* (siehe 3.9.2 bis 3.9.4) verwendet. Die Dephosphorylierung von *myo*-Ins(1,2,3,6)P₄ wurde in einem Volumen von 13 mL (50 mM Mes/Na⁺, pH 5,2), einer Anfangskonzentration des Substrates von 308 μ M und einer Volumenaktivität von 1,4 mU/mL bei Raumtemperatur durchgeführt. Dreimal wurde frisches

Substrat von einer 20 mM Stocklösung zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 7 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 mL 2,5 N HCl gestoppt. Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 7 eingestellt und das denaturierte Protein durch Zentrifugation (6000 g, 15 min, RT) abgetrennt. Die Ausbeute nach Aufreinigung über HPLC (saures Elutionssystem ohne Nachsäulenderivatisierung, siehe 3.3.3.2) lag bei 7,2 μmol *myo*-Ins(2,3,6)P₃ (45 %).

3.11.4 Darstellung von 3-NH₂-*myo*-Ins(1,2,6)P₃ mit Hilfe einer InP₅/InsP₄-Phosphatase aus *Dictyostelium discoideum*

Es wurde eine partiell über Heparin-Agarose aufgereinigte InsP₅/InsP₄-Phosphatase aus *D. discoideum* (siehe 3.8.3) verwendet. Die Dephosphorylierung von 3-NH₂-*myo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅ wurde in einem Volumen von 13 mL (50 mM Mes/Na⁺, 1 mM MgCl₂, 0,1% Triton^H X-100, pH 5,5), einer Anfangskonzentration des Substrates von 15 μM und einer Volumenaktivität von 3 - 3,5 mU/mL bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Reaktionsverlauf wurde mit Hilfe der HPLC-MDD (saures Elutionssystem, siehe 3.3.3.2) verfolgt. Nach einer Inkubationsdauer von ca. 1,5 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 N HCl gestoppt. Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 6 eingestellt und das denaturierte Protein durch Zentrifugation (6000 g, 15 min, RT) abgetrennt. Das Produkt wurde ionenchromatographisch mittels HPLC (saures Elutionssystem ohne Nachsäulenderivatisierung, siehe 3.3.3.2) aufgereinigt.

3-NH₂-*myo*-Ins(1,2,6)P₃: $[\alpha]_D^{20} = -11,5^\circ$ (c= 1,8, H₂O); ¹H-NMR (D₂O, pH 1): δ 3,43 (dd, 1 H, J= 2,0 Hz, J=11,2 Hz, H-3), 3,56 (Ψ t, 1 H, J=9,2 Hz, H-5), 3,88 (Ψ t, 1 H, J=10,2 Hz, H-4), 4,27 (d Ψ t, 1 H, J=2,8 Hz, J=9,4 Hz, H-1), 4,35 (Ψ q, 1 H, J=9,2 Hz, H-6), 4,86 (d Ψ t, 1 H, J=9,2 Hz, J=2,0 Hz, H-2); ¹³C-NMR (D₂O, pH 1): δ 55,13 (m, C-3), 70,97 (s, C-4), 74,59 (C-2), 75,94 (d, J=3,1 Hz), 76,13 (C-1 und C-5), 79,36 (d, J=6,0 Hz); ³¹P-NMR {¹H} (D₂O, pH 1): δ 0,94 (PC-2), 1,28 (PC-6), 1,36 (PC-1).

4 Literatur

- Adelt S. (1999) Untersuchungen zum Stoffwechsel von *myo*-Inositolphosphaten in *Dictyostelium discoideum*. Dissertation, Shaker-Verlag, ISBN 3-8265-6760-9
- Adelt S., Plettenburg O., Dallmann G., Ritter F. P., Shears S. B., Altenbach H.-J., Vogel G. (2001) Regiospecific Phosphatases from *Dictyostelium* as Tools for Chemoenzymatic Synthesis of the Enantiomers D-*myo*-Inositol 1,2,4-Trisphosphate and D-*myo*-Inositol 2,3,6-Trisphosphate: Non-physiological, Potential Analogues of Biologically Active D-*myo*-Inositol 1,3,4-Trisphosphate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 2705-2708.
- Adelt S., Plettenburg O., Stricker R., Reiser G., Altenbach H.-J., Vogel G. (1999) Enzyme-Assisted Total Synthesis of the Optical Antipodes D-*myo*-Inositol 3,4,5-Trisphosphate and D-*myo*-Inositol 1,5,6-Trisphosphate: Aspects of Their Structure-Activity Relationship to Biologically Active Inositol Phosphates. *J. Med. Chem.* **42**, 1262-1273.
- Adelt S., Podeschwa M., Dallmann G., Altenbach H.-J., 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.
- Agam G., Shamir A., Shaltiel G., Greenberg M. L. (2002) *Myo*-inositol-1-phosphate (MIP) synthase: a possible new target for antibipolar drugs. *Bipolar Disord.* **4**(1), 15-20.
- Ali N., Duden R., Bembeneck M. E., Shears S. B. (1995) The interaction of coatamer with inositol polyphosphates is conserved in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **310**, 279-285.
- Albert C., Safrany S. T., Bembeneck M. E., Reddy K. M., Reddy K. K., Falck J. R., Bröker M., Shears S. B., Mayr G. W. (1997) Biological variability in the structures of diphosphoinositol polyphosphates in *Dictyostelium discoideum* and mammalian cells. *Biochem J.* **327**, 553-560.
- Arner R. J., Prabhu K. S., Thompson J. T., Hildenbrandt G. R., Liken A. D., Reddy C. C. (2001) *myo*-Inositol oxygenase: molecular cloning and expression of a unique enzyme that oxidizes *myo*-inositol and D-*chiro*-inositol. *Biochem. J.* **360**(2), 313-20.
- Atack J. R., Broughton H. B., Pollack S. J. (1995) Structure and mechanism of inositol monophosphatase. *FEBS Letters* **361**, 1-7.
- Attree O., Olivos I. M., Okabe I., Bailey L. C., Nelson D. L., Lewis R. A., McInnes R. R., Nussbaum R. L. (1992) The Lowe's oculocerebrorenal syndrome gene encodes a protein highly homologous to inositol polyphosphate-5-phosphatase. *Nature* **358**, 239-242.
- Bansal V. S., Inhorn R. C., Majerus P. W. (1987) The metabolism of inositol 1,3,4-trisphosphate to inositol 1,3-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **262**, 9444-9447.
- Baukrowitz T., Schulte U., Oliver D., Herlitze S., Krauter T., Tucker S. J., Ruppertsberg J. P., Fakler B. (1998) PIP2 and PIP as determinants for ATP inhibition of KATP channels. *Science* **282**, 1141-1144.
- Berridge M. J. (1987) Inositol Trisphosphate and Diacylglycerol: Two Interacting Second Messengers. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 159-193
- Billington D. C. (1993) The Inositol Phosphates. Chemical Synthesis and Biological Significance. Verlag Chemie, Weinheim.
-

-
- Blum C., Karlsson S., Schlewer G., Spieß B., Rehnberg N. (1995) Synthesis of Optically Active (+)-D-3,4,5-*tri* O-Phenylcarbamoyl *Myo*-Inositol from Phytic Acid. *Tetrahedron Lett.* **36**, 7239-7242.
- Bradford M. H. (1976) A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **205**, 22-26.
- Brearley C. A., Hanke D. E. (1996) Inositol phosphates in barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone tissue are stereochemically similar to the products of breakdown of InsP₆ in vitro by wheat-phytase. *Biochem. J.* **318**, 279-286.
- Bruzik K. S., Hakeem A. A., Tsai M.-D. (1994) Are D- and L-*chiro*-phosphoinositides substrates of phosphatidylinositol-specific phospholipase C? *Biochemistry* **33**, 8367-8374.
- Cade J. F. J. (1949) *Med. J. (Australia)* **36**, 349-352.
- Caldwell K. K., Lips D. L., Bansal V. S., Majerus P. W. (1991) Isolation and characterization of two 3-phosphatases that hydrolyze both phosphatidylinositol 3-phosphate and inositol 1,3-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **266**, 18378-18386.
- Carpenter D., Hanley M. P., Hawkins P. T., Jackson T. R., Shears L. R., Vallejo M. (1989) The Metabolism and Function of Inositol Pentakisphosphate and Inositol Hexakisphosphate. *Biochemical Society Transaction* **17**, 1473-1480.
- Clements R. S. Jr., Diethelm A. G. (1979) The metabolism of *myo*-Inositol by the human kidney. *J. Laboratory Clin. Med.* **93**, 210-219.
- Connolly T. M., Bross T. E., Majerus P. W. (1985) Isolation of a Phosphomonoesterase from Human Platelets That Specifically Hydrolyzes the 5-Phosphate of Inositol 1,4,5-Trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **260**, 7868-7874.
- Cosgrove D. J. (1969) Ion-exchange chromatography of inositol polyphosphates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **165**, 677-686.
- Cosgrove D. J. (1970) Inositol phosphates of microbial origin. Inositol phosphates intermediates in the dephosphorylation of the hexaphosphates of *myo*-inositol, *scyllo*-inositol and D-*chiro*-inositol by a bacterial (*Pseudomonas sp.*) phytase. *Austral. J. Biol. Sci.* **23**, 1207-1220.
- Craxton A., Caffrey J. J., Burkhart W., Safrany S. T., Shears S. B. (1997) Molecular cloning and expression of a rat multiple inositol polyphosphate phosphatase. *Biochem. J.* **328**, 75-81.
- Das O. P., Henderson E. J. (1983) A novel technique for gentle lysis of eukaryotic cells. Isolation of plasma membrane from *Dictyostelium discoideum*. *Biochim. Biophys. Acta* **736**, 45-56.
- Davidsson L., Galan P., Kastenmayer P., Cherourvier F., Juillerat M.-A., Hercberg S., Hurrell R. F. (1994) Iron Bioavailability Studied in Infants: The Influence of Phytic Acid and Ascorbic Acid in Infant Formulas Based on Soy Isolate. *Pediatric Research* **36**, 816-822.
- Drayer A. L., Van der Kaay J., Mayr G. W., Van Haastert P. J. M. (1994) Role of Phospholipase C in *Dictyostelium*: Formation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate and Normal Development in Cells Lacking Phospholipase C Activity. *EMBO J.* **13**, 1601-1609.
-

-
- Dvořáková J. (1998) Phytase: Sources, Preparation and Exploitation. *Folia Microbiol.* **43**, 323-338.
- Eisenberg F. Jr., Bolden A. H. (1965) D-*myo*-inositol-1-phosphate, an intermediate in the biosynthesis of inositol in the mammal. *Biochem Biophys Res Commun.* **21(2)**, 100-105.
- Eisenberg F. Jr. (1967) D-*myo*-inositol 1-phosphate as product of cyclization of glucose 6-phosphate and substrate for a specific phosphatase in rat testis. *J. Biol. Chem.* **242(7)**, 1375-1382.
- Europe-Finner G. N., Newell P. C. (1986) Inositol 1,4,5-trisphosphate induces calcium release from a non-mitochondrial pool in amoebae of *Dictyostelium*. *Biochim. Biophys. Acta* **887**, 335-340.
- Europe-Finner G. N., Gammon B., Wood C. A., Newell P. C. (1989) Inositol tris- and polyphosphate forming during chemotaxis of *Dictyostelium*. *J. Cell Science* **93**, 585-592.
- Feng Y., Wente S. R., Majerus P. W. (2001) Overexpression of the inositol phosphatase SopB in human 293 cells stimulates cellular chloride influx and inhibits nuclear mRNA export. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98(3)**, 875-879.
- Ferguson M. A. J. (1988) Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 285-320.
- Fischbach A. (2005) D-*myo*-Inositol 3-phosphat in *D. discoideum*. Isolierung und Charakterisierung inositol-auxotropher Mutanten. Dissertation im Fachbereich Chemie der Bergischen Universität Wuppertal.
- Franke J. Kessin R. (1977) A defined minimal Medium for axenic strains of *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 2157-2161.
- Frederick J. P., Matisse D., Wofford J. A., Megosh L. C., Drake L. Y., Chiou S.-T., Hogan B. L. M., York J. D. (2005) An essential role for an inositol polyphosphate multikinase, *lpk2*, in mouse embryogenesis and second messenger function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102(24)**, 8454-8459.
- Freund W.-D., Mayr G. W., Tietz C., Schultz J. E. (1992) Metabolism of Inositol Phosphates in the Protozoan *Paramecium*. Characterization of a Novel Inositol-Hexakisphosphate-Dephosphorylating Enzyme. *European Journal of Biochemistry* **207**, 359-367.
- Fujii M., York J. W. (2005) A role for rat inositol polyphosphate kinases rIPK2 and rIPK1 in inositol pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate production in rat-1 cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 1156-1164.
- Ganzhorn A. J., Chanal M.C. (1990) Kinetic studies with *myo*-inositol monophosphatase from bovine brain. *Biochemistry* **29**, 6065-6071.
- Gee N. S., Ragan C. I., Watling K. J., Aspley S., Jackson R. G., Reid G. G., Gani D., Shute J. K. (1988) The Purification and Properties of *myo*-Inositol Monophosphatase from Bovine Brain. *Biochem. J.* **249**, 883-889.
- Grabarek Z., Gergely J. (1990) Zero-length Crosslinking Procedure with the Use of Active Esters. *Anal. Biochem.* **185**, 131-135.
- Graf E., Empson K. L., Eaton J. W. (1987) Phytic Acid. A Natural Antioxidant. *J. Biol. Chem.* **262**, 11647-11650.
- Greiner R., Jany KL-D. (2001) Ist Phytat ein unerwünschter Inhaltsstoff in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft? *Lebensmittelchemie* **55**, 109-110.
-

-
- Greiner R., Konietzny U. (1996) Construction of a bioreactor to produce special breakdown products of phytate. *J. Biotechnol.* **48**, 153-159.
- Greiner R., Larsson Alminger M., Carlsson N.-G. (2001) Stereospecificity of *myo*-Inositol Hexakisphosphate Dephosphorylation by a Phytate-Degrading Enzyme of Baker's Yeast. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2228-2233.
- Gumber S. C., Loewus M. W., Loewus F. A. (1984) Further Studies on *myo*-Inositol-1-phosphatase from the Pollen of *Lilium longiflorum* Thunb. *Plant Physiol.* **76**, 40-44.
- Hallcher L. M., Sherman W. R. (1980) The Effects of Lithium Ion and Other Agents on the Activity of *myo*-Inositol-1-phosphatase from Bovine Brain. *J. Biol. Chem.* **255**, 10896-10901.
- Hanakahi L. A., Bartlet-Jones M., Chappell C., Pappin D., West S. C. (2000) Binding of inositol phosphate to DNA-PK and stimulation of double-stran break repair. *Cell* **102**, 721-729.
- Hansen C. A., Johanson R. A., Williamson M. T., Williamson J. R. (1987) Purification and Characterization of Two Types of Soluble Inositol Phosphate 5-Phosphomonoesterases from Rat Brain. *J. Biol. Chem.* **262**, 17319-17326.
- Hansen A. (1998) Untersuchungen zum enzymatischen Abbau von Inositolphosphaten in *Dictyostelium discoideum*: Reinigung und Charakterisierung einer Inositolpentakisphosphat-Inosoltetrakisphosphat-Phosphohydrolase. Diplomarbeit im Fachbereich 9-Chemie der Bergischen Universität Wuppertal.
- Hara A., Ebina S., Kondo A., Funaguma T. (1985) A new type of phytase from pollen of *Typha latifolia* L. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 3539-3544.
- Harwood A. J., Plyte S. E., Woodgett J., Strutt H., Kay R. R. (1995) Glycogen synthase kinase 3 regulates cell fate in *Dictyostelium*. *Cell* **80**, 139-148.
- Hawkins P. T., Poyner D. R., Jackson T. R., Letcher A. J., Lander D. A., Irvine R. F. (1993) Inhibition of Iron-Catalyzed Hydroxyl Radical Formation by Inositol Polyphosphates : A Possible Physiological Function for *myo*-Inositol Hexakisphosphate. *Biochem. J.* **294**, 929-934.
- Heukeshoven J., Dernick R. (1988) Improved silver stain procedure for fast staining in Phastsystem development unit; staining of sodium dedecylsulfate gels. *Electrophoresis* **9**, 28-32.
- Hoffmann-Ostenhof O., Pittner F. (1982) The biosynthesis of *myo*-inositol and its isomers. *Can. J. Chem.* **60**, 1863-1871.
- Holub B. J. (1986) Metabolism and function of *myo*-Inositol and inositol phospholipids. *Annu. Rev. Nutr.* **6**, 563-597.
- Howell S., Barnaby R. J., Rowe T., Ragan C. I., Gee N. S. (1989) Evidence for at least four different inositol bisphosphatases in bovine brain. *Eur. J. Biochem.* **183**, 169-172.
- Huang C. L., Feng S., Hilgemann D. W. (1998) Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gbetagamma. *Nature* **391**, 803-806.
- Ingham K. C. (1990) Precipitation of Protein with Polyethylene Glycol. *Meth. Enzymol.* **182**, 301-306.
- Inhorn R. C., Bansal V. S., Majerus P. W. (1987) Pathway for inositol 1,3,4-trisphosphate and 1,4-bisphosphate metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2170-2174.
-

-
- Irvine R. F. (1990) in R. F. Irvine (Ed.) *Methods in Inositide Research*, Raven Press, New York, 9-30.
- Irvine R. F. (2001) Does IP₄ run a protection racket? *Curr. Biol.* **11**, R173-R175
- Irvine R. F., Schell M. J. (2001) Back in the water: the return of the inositol phosphates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 327-338.
- Isaaks R. E., Harkness D. R. (1980) Erythrocyte organic phosphates and haemoglobine function in birds, reptils and fishes. *Am. Zool.* **20**, 115-129.
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). (1992) Numbering of atoms in *myo*-inositol, in *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, 2nd edn, 156-157. Portland Press, Londond
- Jackson R. G., Gee N. S., Ragan C. I. (1989) Modification of *myo*-inositol monophosphatase by the arginine-specific reagent phenylglyoxal. *Biochem. J.* **264**, 419-422.
- Johnson L. F., Tate M. E. (1969) The structure of *myo*-inositol pentaphosphates. *Ann. A. N. Acad. Sci.* **165**, 526-532.
- Kabasawa I., Lou M. F., Merola L. O., Kinoshita J. H. (1974) *Ophthalmic Res.* **6**, 155-165.
- Kerovuo J., Rouvinen J., Hatzack F. (2000) Analysis of *myo*-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus phytase*: indication of a novel reaction mechanism. *Biochem. J.* **352**, 623-628.
- Knipp M. (1996) Untersuchungen zum enzymatischen Abbau von Inositolpolyphosphaten in *Dictyostelium discoideum*. Eine *myo*-Inositolhexakisphosphat hydrolysierendes Enzym und seine Produkte: Isolierung und Charakterisierung. Diplomarbeit im Fachbereich 9-Chemie der Bergischen Universität Wuppertal.
- Krüger N. J. (1994) The Bradford Method for Protein Quantitation. *Meth. Mol. Biol.* **32**, 9-15.
- Kulhavý D., Čegan A., Komers K., Mindl J. (2002) Inhibition of Enzymatic Reactions. A Rapid Method to Determine the Index pI₅₀. *Z. Naturforsch.* **57c**, 496-499
- Kuspa A., Sucgang R., Shaulsky G. (2001) The promise of a protist: the *Dictyostelium* genome project. *Funct. Integr. Genomics.* **1**, 279-293.
- Kuznetsova S. A., Kanevsky I. E., Shabarova Z. A. (1998) Design and synthesis of double-stranded oligonucleotides containing reactive acylphosphates internucleotide groups. *FEBS Letters* **431**, 453-456.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- 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.
- Laußmann T. (1999) Diphosphoinositolphosphate in *Dictyosteliden*: Strukturen und Stoffwechsel. Dissertation, Shaker Verlag, ISBN 3-8265-4972-4.
- Leech A. P., Baker G. R., Shute J. K., Cohen M. A., Gani D. (1993) Chemical and kinetic mechanism of the inositol monophosphatase reaction and its inhibition by Li⁺. *Eur. J. Biochem.* **212**, 693-704.
- 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.
-

-
- Lin T., Orrison B. M., Leahey A. M., Suchy S. F., Bernard D. J., Lewis R. A., Nussbaum R. L. (1997) Spectrum of mutations in the OCRL1 gene in the Lowe oculocerebrorenal syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **60**(6), 1384-1388.
- Liscovitch M., Chalifa V., Pertile P., Chen C. S., Cantley L. C. (1994) Novel function of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **269**, 21403-21406.
- Loovers H. M., Veenstra K., Snippe H., Pesesse X., Erneux C., van Haastert P. J. (2003) A diverse family of inositol 5-phosphatases playing a role in growth and development in *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **278**(8), 5652-5658.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. & Randall R. J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lückhoff A., Clapham D. E. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca(2+)-permeable channel. *Nature* **355**, 356-358.
- Ma A. D., Metjian A., Bagrodia S., Taylor S., Abrams C. S. (1998) Cytoskeletal reorganization by G protein-coupled receptors is dependent on phosphoinositide 3-kinase gamma, a Rac guanosine exchange factor, and Rac. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4744-4751.
- Maeda Y. (1970) Influence of ionic conditions on cell differentiation and morphogenesis of the cellular slime molds. *Dev. Growth Differ.* **12**, 217-227.
- Majerus P. W. (1992) Inositol Phosphate Biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 225-250.
- Majerus P. W. (1996) Inositol do it all. *Genes Dev.* **10**, 1051-1053.
- Majerus P. W., Kisseleva M. V., Norris F. A. (1999) The Role of Phosphatases in Inositol Signaling Reactions. *J. Biol. Chem.* **274**, 210669-10672.
- Malmberg A. B., Fallgren B., Hedner T. (1995) Antinociceptive effect of alpha-trinositol, a novel D-*myo*-inositol derivative, in the formalin test in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **294**, 609-615.
- Martin J. B., Laussmann T., Bakker-Grunwald T., Vogel G., Klein G. (2000) *neo*-Inositolphosphates in the amoeba *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* **275**, 10134-10140.
- Mayr G. W. (1988) A novel metal-dye detection system permits picomolar-range h.p.l.c. analysis of inositol polyphosphates from non-radioactively labelled cells or tissue specimens. *Biochem. J.* **254**, 585-591.
- Mayr G. W. (1990) Mass Determination of Inositol Phosphates by High-Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Complexometry (Metal-Dye Detection). *Methods in Inositide Research* (Irvine R. F. Ed.) Raven Press N.Y., 83-108.
- Mayr G. W. (1993) Inositol Phosphates: Structural Components, Regulators and Signal Transducers of the Cell – a Review. *Topics in Biochemistry*, Boehringer Mannheim.
- Mayr G. W., Radenberg T., Thiel U., Vogel G., Stephens L. R. (1992) Phosphoinositol diphosphates: nonenzymic formation *in vitro* and occurrence *in vivo* in the cellular slime mold *Dictyostelium*. *Carbohydrate Research* **234**, 247-262.
- McAllister G., Whiting P., Hammond E. A., Knowles M. R., Atack J. R., Bailey F. J., Maigetter R., Ragan C. I. (1992) cDNA cloning of human and rat brain *myo*-inositol monophosphatase. Expression and characterization of the human recombinant enzyme. *Biochem. J.* **284**, 749-754.
-

- McLaurin J., Golomb Rivka, Jurewicz A., Antel J. P., Fraser P. E. (2000) Inositol Stereoisomers Stabilize an Oligomeric Aggregate of Alzheimer Amyloid β Peptide and Inhibit A β -induced Toxicity. *J. Biol. Chem.* **275**(24), 18495-18502.
- Meek J. L., Rice T. J., Anton E. (1988) Rapid purification of inositol monophosphate phosphatase from beef brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 143-148.
- Merril C. R., Goldman D., Sedman S. A., Ebert M. H. (1981) Ultrasensitive Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels Shows Regional Variation in Cerebrospinal Fluid Proteins. *Science* **211**, 1437-1438.
- Naccarato W. F., Ray R. E., Wells W. W. (1974) Biosynthesis of *myo*-inositol in rat mammary gland. Isolation and properties of the enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **164**, 194-201.
- Nakamura S., Yamao S., Ito J., Kameyama M. (1979) Purification and properties of 2'-nucleotidase from mammalian brain. *Biochim. Biophys. Acta* **568**, 30-38.
- Nakamura Y., Fukuhara H., Sano K. (2000) Secreted Phytase Activities of Yeasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**(4), 841-844.
- Nayini N.R., Markakis P. (1984) The Phytase of Yeast. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* **17**, 24-26.
- Oh E. S., Woods A., Lim S. T., Theibert A. W., Couchman J. R. (1998) Syndecan-4 proteoglycan cytoplasmic domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate coordinately regulate protein kinase C activity. *J. Biol. Chem.* **273**, 10624-10629.
- Pappan K., Qin W., Dyer J. H., Zheng L., Wang X. (1997) Molecular cloning and functional analysis of polyphosphoinositide-dependent phospholipase D, PLDbeta, from Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **272**, 7055-7061.
- Parthasarathy L., Vadnal R. E., Parthasarathy R., Devi, C. S. S. (1994) Biochemical and Molecular Properties of Lithium-Sensitive *myo*-inositol monophosphatase. *Life Science* **54**, 1127-1142.
- Pasamontes L., Haiker M., Wyss M., Tessier, Van Loon A.P. (1997) Gene cloning, purification and characterization of a heatstable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1696-1700.
- Pingoud A., Urbanke C. (1997) Arbeitsmethoden der Biochemie. Walter de Gruyter, ISBN 3-11-014696-7.
- Podeschwa M., Plettenburg O., Altenbach H.J. (2003) Stereoselektive Synthesis of Several Azido- and Diazido/-diamino-Inositols and their Phosphates from *p*-Benzochinon. *Org. Biomol. Chem.* **1**, 1919-1929.
- Podeschwa M., Plettenburg O., vom Brocke J., Block O., Adelt S., Altenbach H.-J. (2003) Stereoselective Synthesis of *myo*-, *neo*-, *L-chiro*-, *D-chiro*-, *allo*-, *scyllo*- and *epi*-Inositol-Systems via Conduritol Prepared from *p*-Benzochinone. *Eur. J. Org. Chem.* 1958-1972.
- Pollack S. J., Atack J. R., Knowles M. R., McAllister G., Ragan C. I., Baker R., Fletcher S. R., Iversen L. L., Broughton H. B. (1994) Mechanism of inositol monophosphatase, the putative target of lithium therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5766-5770.
- Powar V. K., Jagannathan V. (1982) Purification and properties of phytate-specific phosphatases from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **151**, 1102-1108.
- Raboy V. (2001) Seeds for a better future: 'low phytate' grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. *Trends Plant Sci.* **6**(10), 458-62.
-

-
- Raper K. B. (1935) *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agr. Res.* **50**, 135-147.
- Reddy C. C., Swan J.S., Hamilton G. A. (1981) *myo*-Inositol Oxygenase from Hog Kidney. *J. Biol. Chem.* **256(16)**, 8510-8518.
- Saha P. R., Weaver C. M., Mason A. C. (1994) Mineral Bioavailability in Rats from Intrinsically Labeled Whole Wheat Flour of Various Phytate Levels. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2331-2335.
- Sakisaka T., Itoh T., Miura K. Takenawa T. (1997) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphatase regulates the rearrangement of actin filaments. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3841-3849.
- Scherer J. (1850) Über eine neue, aus dem Muskelfleische gewonnene Zuckerart. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **73**, 322.
- Schou M. (1991) in: Lithium and the Cell (Birch, N. J. ed) pp.1-6, Academic Press, London.
- Schultz C., Roemer S., Stadler C., Rudolf M. T., Wolfson E., Traynor-Kaplan A. E. (1997) *Gastroenterology* **112**, A401.
- Scott J. J., Loewus F. A. (1986) A calcium activated phytase from pollen of *Lilium longiflorum*. *Plant Physiol.* **82**, 333-335.
- Seaquist E. R., Gruetter R. (1998) Identification of a high concentration of *scyllo*-inositol in the brain of a healthy human subject using ¹H- und ¹³C-NMR. *Magn. Reson. Med.* **39**, 313-316.
- Seet L-F., Cho S., Hessel A., Dumont D. J. (1998) Molecular cloning of multiple isoforms of synaptojanin 2 and assignment of the gene to mouse chromosome 17A2-3.1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 116-122.
- Shears S.B. (2001) Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate. *Cell. Signal.* **13**, 151-158.
- Sherman W .R., Stewart M. A., Kurien M. M., Goodswain S. L. (1968a) The measurement of *myo*-inositol, *myo*-inosose-2 and *scyllo*-inositol in mammalian tissues. *Biochem. Biophys. Acta* **158**, 197-205.
- Sherman W. R., Stewart M. A., Simpson P. C., Goodswain S. L. (1968b) The identification of *myo*-inosose-2 and *scyllo*-inositol in mammalian tissues. *Biochemistry* **7**, 819-824.
- Sherman W. R., Goodswain S. L., Gunnell K. D. (1971) *neo*-Inositol in mammalian tissues. Identification, measurement, and enzymatic synthesis from mannose 6-phosphate. *Biochemistry* **10**, 3491-3499.
- Sherman W. R., Munsell L. Y., Gish L. Y., Honchar M. P. (1985) Effects of systemically administered lithium on phosphoinositide metabolism in rat brain, kidney, and testis. *J. Neurochem.* **44**, 798-807.
- Shimizu M. (1992) Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1266-1269.
- Shyng S. L., Nichols C. G. (1998) Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of KATP channels. *Science* **282**, 1138-1141.
- Simell M., Turunen M., Piironen J., Vaara T. (1989) Feed and food applications of phytase. Lecture at 3rd Meet. *Industrial Applications of Enzymes*, Barcelona (Spain).
-

- Sirén M., (1986a) Stabilized pharmaceutical and biological material composition. *Pat. SE* 003 165.
- Sirén M., (1986b) New *myo*-inositol triphosphoric acid isomer. *Pat. SW* 052 950.
- Sirén H. (1991) Pharmacological Effects of D-*myo*-Inositol-1,2,6-Trisphosphate. In *Inositolphosphates and Derivatives, Synthesis, Biochemistry and Therapeutic Potential*; Reitz, A., Ed.; ACS Symposium Series Vol. 463, ACS Washington DC.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Garther F. K., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Spiers I. D., Barker C. J., Chung S.-K. Chang Y.-T., Freeman S., Gardiner J.-M., Hirst P. H., Lambert P. A., Michell R. H., Poyner D. A., Schwalbe C. H., Smith A. W., Solomons K. R. H. (1996) *Carbohydr. Res.* **282**, 81-99.
- Stec B., Yang H., Johnson K. A., Chen L., Roberts M. F. (2000) MJ0109 is an enzyme that is both an inositol monophosphatase and the 'missing' archaeal fructose-1,6-bisphosphatase. *Nat Struct Biol.* **7(11)**, 1046-1050.
- Stephens L. R., Irvine R. F. (1990) Stepwise phosphorylation of *myo*-inositol leading to *myo*-inositolhexakisphosphate in *Dictyostelium*. *Nature* **346**, 580-583.
- Stephens L., Radenberg T., Thiel U., Vogel G., Khoo K.-H., Dell A., Jackson T. R., Hawkins P. T., Mayr G.W. (1993) The detection, purification, structural characterization, and metabolism of diphosphoinositol pentakisphosphate(s) and bisdiphosphoinositol tetrakisphosphate(s). *J. Biol. Chem.* **268**, 4009
- Stevenson-Paulik J., Bastidas R. J., Chiou S-T., Frye R. A., York J. D. (2005) Generation of phytate-free seeds in *Arabidopsis* through disruption of inositol polyphosphate kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102(35)**, 12612-12617.
- Stolz L. E., Huynh C. V., Thorner J., York Y. D. (1998) Identification and Characterization of an Essential Family of Inositol Polyphosphate 5-Phosphatases (INP51, INP52 and INP53 Gene Products) in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **148**, 1715-1729.
- Streb H., Irvine R. F., Berridge M. J., Schulz I. (1983) Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* **306**, 67-69.
- Sylvia V., Curtin G., Norman J., Stec J., Busbee D. (1988) Activation of a low specific activity form of DNA polymerase alpha by inositol-1,4-bisphosphate. *Cell* **54**, 651-658.
- Takimoto K., Okada M., Matsuda Y. Nakagawa H. (1985) Purification and properties of *myo*-inositol-1-phosphatase from rat brain. *J. Biochem. (Tokyo)* **98**, 363-370.
- Toker A. (1998) The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **10**, 254-261.
- Turner B. L., Papházy M. J., Haygarth P. M., McKelvie I. D. (2002) Inositol phosphates in the environment. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* **357**, 449-469
- Van der Kaay J., Draijer R., Van Haaster P. J. M. (1990) Increased Conversion of Phosphatidylinositol to Phosphatidylinositol Phosphate in *Dictyostelium* Cells Expressing a Mutated ras Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9197-9201.
- Van der Kaay J., Wesseling J., Van Haastert P. J. M. (1995) Nucleus-associated phosphorylation of Ins(1,4,5)P₃ to InsP₆ in *Dictyostelium*. *Biochem. J.* **312**, 911-917.

-
- Van Dijken P., De Haas J. R., Craxton A., Erneux C., Shears S. B., Van Haastert P. J. M. (1995) A Novel Phospholipase C-independent Pathway of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Formation in *Dictyostelium* and Rat Liver. *J. Biol. Chem.* **270**, 29724-29731.
- Van Dijken P., Bergsma J. C. T., Van Haastert P. J. M. (1997) Phospholipase-C-Independent Inositol 1,4,5-Trisphosphate Formation in *Dictyostelium* Cells. *Eur. J. Biochem.* **244**, 113-119.
- Van Dijken P., Bergsma J. C. T., Hiemstra H. S., De Vries B., Van der Kaay J., Van Haastert P. J. M. (1996) *Dictyostelium discoideum* contains three inositol monophosphatase activities with different substrate specificities and sensitivities to lithium. *Biochem. J.* **314**, 491-495.
- Van Haastert P. J. M., Van Dijken P. (1997) Biochemistry and Genetics of Inositol Phosphate Metabolism in *Dictyostelium*. *FEBS Letters* **410**, 39-43.
- Van Lookeren Campagne M. M., Erneux C., Van Eijk R., Van Haastert P. J. M. (1988) Two dephosphorylation pathways of inositol 1,4,5-trisphosphate in homogenates of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. J.* **254**, 343-350.
- Varela I., Van Lookeren Campagne M. M., Alvarez J. F., Mato J. M. (1987) The developmental regulation of phosphatidylinositol kinase in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Letters* **211**, 64-68.
- Verbsky J., Chang S. C., Wilson M. P., Mochizuki Y., Majerus P. W. (2005a) The pathway for the production of inositol hexakisphosphate in human cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 1911-1920.
- Verbsky J., Lavine K., Majerus P. W. (2005b) Disruption of the mouse inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase gene, associated lethality, and tissue disruption of 2-kinase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102(24)**, 8448-8453.
- Viola A., Nicoli F., Denis B., Confort-Gouny S., Le Fur Y., Ranjeva J. P., Viout P., Cozzone P. J. (2004) High cerebral scyllo-inositol: a new marker of brain metabolism disturbances induced by chronic alcoholism. *MAGMA* **17(1)**, 47-61.
- Vogel U., Thompson R. J. (1986) *Biochem. Soc. Trans.* **14**, 349-350.
- Vollenweider P., Clodi M., Martin S. S., Imamura T., Kavanaugh W. M., Olefsky J. M. (1999) An SH2 domain-containing 5' inositolphosphatase inhibits insulin-induced GLUT4 translocation and growth factor-induced actin filament rearrangement. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1081-1091.
- Watts D. J., Ashworth J. M. (1970) Growth of Myxamoebae of the Cellular Slime Mould *Dictyostelium discoideum* in Axenic Culture. *Biochem. J.* **119**, 171-174.
- Wiechelmann K. J., Braun R. D., Fitzpatrick J. D. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* **175**, 231-237.
- Williams R. S., Eames M., Ryves W. J., Viggars J., Harwood A. J. (1999) Loss of a prolyl oligopeptidase confers resistance to lithium by elevation of inositol (1,4,5) trisphosphate. *EMBO J.* **18**, 2734-2745.
- Wilson M. O., Majerus P. W. (1996) Isolation of Inositol 1,3,4-Trisphosphate 5/6-Kinase, cDNA Cloning and Expression of the Recombinant Enzyme. *J. Biol. Chem.* **271(20)**, 11904-11910.
-

-
- Wreggett K. A. (1992) Inositol monophosphatase is a highly conserved enzyme having localized structural similarity to both glycerol 3-phosphate dehydrogenase and haemoglobin. *Biochem. J.* **286**, 147-152.
- Wyss M., Brugger R., Kronenberger A., Rémy R., Fimbel R., Oesterhelt G., Lehmann M., Van Loon A. P. G. M. (1999) Biochemical Characterization of Fungal Phytases (*myo*-Inositol Hexakisphosphate Phosphatases): Catalytic Properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 367-373.
- Xie W., Kaetzel M. A., Bruzik K. S., Dedman J. R., Shears S. B., Nelson D. J. (1996) Inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate inhibits the calmodulin-dependent protein kinase II-activated chloride conductance in T84 colonic epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **271**(24), 14092-14097.
- Yang X., Rudolf M., Carew M. A., Yoshida M., Nerreter V., Riley A. M., Chung S. K., Bruzik K. S., Potter B. V. L., Schultz C., Shears S. B. (1999) Inositol 1,3,4-trisphosphate acts *in vivo* as a specific regulator of cellular signaling by inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate. *J. Biol. Chem.* **274**(27), 18973-18980.
- Yang X., Shears S. B. (2000) Multitasking in signal transduction by a promiscuous human Ins(3,4,5,6)P(4) 1-kinase/Ins(1,3,4)P(3) 5/6-kinase. *Biochem. J.* **351**, 551-555.
- York J. D., Odom A. R., Murphy R., Ives E. B., Wentz S. R. (1999) A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science* **285**, 96-100.
- Zhang X., Hartz P. A., Philip E., Racusen L. C., Majerus P. W. (1998) Cell lines from kidney proximal tubules of a patient with Lowe syndrome lack OCRL inositol polyphosphate 5-phosphatase and accumulate phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **273**, 1574-1582.
- Zhou K., Takegawa K., Emr S. D., Firtel R. A. (1995) A phosphatidylinositol (PI) kinase gene family in *Dictyostelium discoideum*: biological roles of putative mammalian p110 and yeast Vps34p PI 3-kinase homologs during growth and development. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5645-5656
-