

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Seit den Untersuchungen von Mertz und Schwarz in den späten fünfziger Jahren wird Chrom in seiner dreiwertigen Form als ein essentielles Spurenelement für Menschen und Tiere mit Bedeutung für die Insulinwirkung angesehen. Die metabolisch aktive Form von Chrom wird, wie ursprünglich von Mertz und Schwarz vorgeschlagen, für eine besondere Form von organisch komplexiertem dreiwertigem Chrom gehalten, dem aufgrund seines vorgeschlagenen Effekts auf den Glukosemetabolismus der Name „Glukosetoleranzfaktor“ gegeben wurde. *In vitro*- Assays legten nahe, daß die wirksamsten Quellen für biologisch aktive Chromverbindungen einige Nahrungsmittel, insbesondere Extrakte von Niere, Leber, Schwarzem Pfeffer und Bierhefe sind. Bis heute sind zahlreiche Versuche, die biologisch aktiven Chromkomplexe vor allem aus Bierhefe zu isolieren, nicht erfolgreich gewesen.

Wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmals natürlich in der Hefe vorkommende Komplexe des dreiwertigen Chroms unter schonenden Bedingungen zu isolieren. Unter Berücksichtigung der möglichen Instabilität der in der Hefe vorliegenden Chrom(III)- Komplexe gegenüber alkalischen oder sauren Bedingungen wurden zur Extraktion der Bierhefe, Aufarbeitung der Extrakte und zur Chromatographie hohe Salzkonzentrationen, stark komplexierende Puffersubstanzen und extreme pH- Werte vermieden. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten, bei denen herkömmliche Methoden der Ionenchromatographie Verwendung fanden, wurde die Ionenpaarchromatographie auf Umkehrphasen (RPIP-HPLC) als wesentliche Trennmethode für die Fraktionierung von Chromverbindungen aus Bierhefe eingesetzt.

Zur Gewinnung der intrazellulär vorliegenden Chrom(III)- Komplexe wurde Bierhefe aerob in Gegenwart von 1 mg/L  $^{51}\text{CrCl}_3$  kultiviert. Nach der Ernte wurden die Zellen mit einer Rührwerkskugelmühle in kalter 0,2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  aufgeschlossen. Lediglich etwa 0,6 bis 4% des Chroms aus dem Nährmedium konnten nach Ende der Kultur mit Hefe assoziiert vorgefunden werden, 10 bis 50% davon befanden sich in löslicher Form in der zytosolischen Fraktion der Hefe. Dieser zytosolische Anteil des Chroms ließ sich durch Gelchromatographie auf Toyopearl<sup>®</sup> TSK HW 40s bzw. Toyopearl<sup>®</sup> TSK HW 55s (Eluent 0,2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) in eine hochmolekulare (ca. 40 kDa) und bis zu

drei niedermolekulare chrombindende Fraktionen (600, 800 und 1100 Da) auftrennen. Das niedermolekular gebundene Chrom eluierte nach Ionenpaarchromatographie (Merck Lichrospher<sup>®</sup> mit einem wäßrigen Methanol/0,05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>- Gradienten unter Verwendung von 5 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat als amphiphiles Ionenpaarreagenz) in Form zweier deutlich getrennter anionischer Peaks. Verschiedene massenspektrometrische Methoden (Plasmadesorptions- Massenspektrometrie (PD-MS), Elektrospray- Massenspektrometrie (ESI-MS) und Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations- Massenspektrometrie (MALDI-MS) konnten keine weiteren Hinweise auf die Art der Substanzen im Zytosol der Hefe geben.

Im verbrauchten Nährmedium wurde das Auftreten einiger weiterer Chrom-bindender Fraktionen (300-800 Da) beobachtet, die sich von den Fraktionen aus der Hefe und auch von anorganischem Chrom(III) klar unterschieden. Wie anhand der Elutionsprofile der Gelchromatographie und der Ionenpaarchromatographie festgestellt werden konnte, erwies sich keine dieser Fraktionen als stabil genug, um durch Gefriertrocknung des verbrauchten Nährmediums aufkonzentriert werden zu können.

Die Ergebnisse stehen in deutlichem Widerspruch zu den Ergebnissen vorheriger Arbeiten, die z.T. über eine Anreicherung von Chrom in Bierhefe berichteten und einen wesentlichen Anteil des an Hefe gebundenen Chroms in Form kationischer Komplexe auffanden. Verschiedene Befunde in Hinblick auf Anzahl und Eigenschaften von aus Bierhefe isolierten chromhaltigen Fraktionen müssen ihre Ursache entweder in der Verwendung unterschiedlicher Heferasen, unterschiedlichen Kulturbedingungen oder in unterschiedlichen Prozeduren zur Isolation, Aufarbeitung und Analyse haben. Es erscheint daher möglich, daß die meisten der chrombindenden Fraktionen, die von anderen Autoren beschrieben wurden, Artefakte darstellen, die sich während rauher Isolationsprozeduren gebildet haben und die zumindest teilweise von an die Zellwand adsorbiertem und anschließend wieder freigesetzten Chrom abstammen.

Gestützt durch die Erkenntnisse anderer Autoren, die einerseits das Vorkommen größerer Mengen von Polyphosphat in Hefe nachgewiesen und andererseits die Beteiligung von Polyphosphat an der zytosolischen Bindung von Metallkationen gezeigt haben, könnte die offensichtlich nur geringe UV- Absorption der durch Ionenpaarchromatographie getrennten Substanzen in Verbindung mit dem Fehlen charakteristischer Peaks in den massenspektroskopischen Experimenten auf das Vorliegen von einfachen Chrom(III)- Polyphosphat- Komplexen im Zytosol der Hefe hindeuten.