

Untersuchungen zur Sphingolipid-Biosynthese in der Hefe
Pichia ciferrii

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

von
Daniel Börgel
aus Münster (Westf.)

Frankfurt 2007
(D 30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der

Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Rüdiger Wittig

Gutachter: Prof. Dr. Eckhard Boles

PD Dr. Torsten Stein

Datum der Disputation: 29.10.2007

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	- 1 -
1.1	Sphingolipide	- 1 -
1.1.1	Nomen est omen	- 1 -
1.1.2	Struktur der Sphingolipide	- 2 -
1.1.3	Sphingolipid-Biosynthese in <i>S. cerevisiae</i>	- 4 -
1.1.4	Besonderheiten und Abweichungen im Stoffwechselweg anderer Hefen	- 10 -
1.1.4.1	Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase	- 10 -
1.1.4.2	Sphingolipid- Δ^8 -Desaturase	- 11 -
1.1.4.3	Sphingolipid-C9-Methyltransferase	- 11 -
1.1.4.4	Ceramid-Glycosyltransferase	- 12 -
1.1.4.5	Ceramidase	- 13 -
1.1.5	Sphingolipide in <i>S. cerevisiae</i> und in Säugetieren	- 13 -
1.1.5.1	Biosynthese	- 13 -
1.1.5.2	Zelluläre Lokalisation	- 15 -
1.1.6	Funktionelle Rolle von Sphingolipiden in <i>S. cerevisiae</i>	- 17 -
1.1.6.1	Zell-Wachstum	- 17 -
1.1.6.2	Hitzestress-Antwort	- 17 -
1.1.6.3	Protein-Abbau	- 18 -
1.1.6.4	Endocytose	- 18 -
1.1.6.5	Protein-Transport	- 18 -
1.1.7	Sphingolipide in der menschlichen Haut	- 19 -
1.1.7.1	Struktur der Ceramide des <i>Stratum corneums</i>	- 20 -
1.1.7.2	Variationen der Ceramid-Konzentrationen im <i>Stratum corneum</i>	- 22 -
1.1.7.3	Einfluss von oberflächlich aufgetragenen Ceramiden auf die Schutzfunktion der Haut	- 22 -
1.1.7.4	Wirkung von Sphingoidbasen auf die Schutzfunktion der Haut ...	- 22 -
1.2	<i>Pichia ciferrii</i>	- 23 -
1.2.1	Taxonomie	- 23 -
1.2.2	Phylogenie und Biochemie	- 23 -
1.2.3	Ploidie	- 26 -
1.2.4	Sekretion von Sphingolipiden	- 26 -
1.2.5	Die Sphingolipid-Biosynthese in <i>P. ciferrii</i>	- 27 -
1.2.6	Metabolic engineering von <i>P. ciferrii</i>	- 29 -
1.3	Ziele der Arbeit	- 29 -
1.3.1	Entwicklung einer fermentativen Route zur Triacetyl-sphingosin-(TriASo-) Produktion	- 29 -
1.3.2	Charakterisierung der Sphingolipid-Biosynthese in <i>P. ciferrii</i>	- 30 -
2	MATERIAL UND METHODEN	- 31 -
2.1	Stämme und Medien	- 31 -
2.1.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	- 31 -
2.1.2	Medien und Anzucht von <i>E. coli</i>	- 31 -
2.1.3	Hefe-Stämme	- 31 -
2.1.4	Medien und Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C-Derivaten	- 32 -
2.1.5	Medien und Anzucht von <i>P. ciferrii</i>	- 32 -
2.2	Plasmide	- 34 -

Inhaltsverzeichnis

2.3	Oligonukleotide	- 37 -
2.4	Chemikalien	- 49 -
2.5	Geräte.....	- 53 -
2.6	Enzyme.....	- 54 -
2.7	Transformation.....	- 55 -
2.7.1	Transformation von <i>E. coli</i>	- 55 -
2.7.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	- 55 -
2.7.3	Transformation von <i>P. ciferrii</i>	- 55 -
2.8	Präparation von DNA.....	- 55 -
2.8.1	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	- 55 -
2.8.2	Isolation chromosomaler DNA aus <i>P. ciferrii</i>	- 55 -
2.9	Enzymatische Modifikation von DNA.....	- 56 -
2.9.1	DNA-Restriktion.....	- 56 -
2.9.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	- 56 -
2.9.3	Klenow-fill-in bei DNA-Fragmenten	- 56 -
2.9.4	Ligation.....	- 56 -
2.10	Amplifikation von DNA mittels PCR	- 57 -
2.11	DNA-Aufreinigung.....	- 57 -
2.12	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	- 57 -
2.13	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	- 57 -
2.14	Sequenzierung von DNA	- 58 -
2.15	Isolation von RNA aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>P. ciferrii</i>	- 58 -
2.16	cDNA-Synthese	- 58 -
2.17	Quantitative real time PCR (qRT-PCR) zur Quantifizierung von Transkriptmengen.....	- 59 -
2.18	Analytik zur Quantifizierung von Sphingoidbasen.....	- 59 -
2.18.1	HPLC-basierte Quantifizierung von Sphingoidbasen mit OPA- Derivatisierung und Fluoreszenz-Detektion.....	- 60 -
2.18.2	RP-HPLC mittels UV-Messung.....	- 61 -
2.18.3	ESI-MS/MS-basierte Quantifizierung von komplexen Sphingolipiden.....	- 61 -
3	ERGEBNISSE.....	- 62 -
3.1	Erstellung eines Inventars von Sphingolipid-Biosynthese-Genen in <i>P. ciferrii</i>	- 62 -
3.1.1	Vorgehensweise zur Isolation unbekannter Gene aus <i>P. ciferrii</i>	- 62 -
3.1.2	Lcb1p (Untereinheit 1 der Serin-Palmitoyltransferase).....	- 63 -
3.1.3	Tsc3p (akzessorisches Protein der Serin-Palmitoyltransferase)	- 64 -
3.1.4	Tsc10p (3-Ketosphinganin-Reduktase)	- 64 -
3.1.5	Lag1p & Laf1p (Ceramid-Synthasen)	- 66 -
3.1.6	Lip1p (Ceramid-Synthase-Untereinheit)	- 67 -
3.1.7	Yxc1p (Ceramidase).....	- 68 -
3.1.8	8Desp (Sphingolipid- Δ^8 -Desaturase).....	- 69 -
3.1.9	Gcs1p (Ceramid-Glycosyltransferase).....	- 71 -
3.2	Charakterisierung der Substratspezifitäten	- 74 -
3.2.1	Lag1p & Laf1p (Ceramid-Synthasen)	- 74 -
3.2.2	Des1p (Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase)	- 76 -
3.3	Sphingolipid-Zusammensetzung und Sphingolipid-Biosynthese in verschiedenen <i>P. ciferrii</i> -Stämmen	- 81 -
3.3.1	Zwei Gruppen von <i>P. ciferrii</i> Stämmen: TAPS- vs. TriAsa- Produzenten	- 82 -
3.3.2	Molekulare Charakterisierung von <i>P. ciferrii</i> TAPS-Produzenten	- 84 -

Inhaltsverzeichnis

3.3.3	Molekulare Charakterisierung von <i>P. ciferrii</i> TriASa-Produzenten...	- 85 -
3.4	Entwicklung von Selektionssystemen für <i>P. ciferrii</i>	- 86 -
3.4.1	Etablierung eines Uracil-basierten Selektionssystems	- 86 -
3.4.2	Etablierung eines Lysin-basierten Selektionssystems	- 90 -
3.5	Rationale Stammentwicklung der Hefe <i>P. ciferrii</i> zur fermentativen Herstellung von Sphingosin	- 92 -
3.5.1	Sphingosin: Chemische vs. fermentative Herstellung.....	- 92 -
3.5.2	Strategie zur Entwicklung eines Triacetylsphingosin-Produzenten	- 93 -
3.5.3	Disruption des <i>SYR2</i> -Gens zum Erhalt von SA-Produzenten	- 93 -
3.5.4	Überexpression verschiedener Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturasen in einem TriASa-Produktionsstamm	- 96 -
3.5.5	Überexpression von Ceramid-Synthasen und Ceramidasen verschiedener Spezies in Kombination mit der Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase aus <i>P. ciferrii</i>	- 96 -
3.5.6	Notwendigkeit zur Verwendung codon-optimierter Gene	- 99 -
3.5.7	Verwendung des Nourseothricin-Resistenz vermittelnden <i>nat1</i> -Gens in codon-optimierter Form als Selektionsmarker für <i>P. ciferrii</i>	- 102 -
3.5.8	Heterologe Expression des für die alkalischen Ceramidase aus der Maus kodierenden Gens in codon-optimierter Form in <i>P. ciferrii</i>	- 103 -
3.5.9	Erhöhung der Integrationshäufigkeit durch Erhöhen der Antibiotika-Konzentration.....	- 105 -
3.5.10	Screening von Ceramid-Synthasen auf ihre Eignung für die rationale Entwicklung eines TriASo-Produzenten.....	- 107 -
3.5.11	Eignung der <i>P. ciferrii</i> -eigenen alkalischen Ceramidase Yxc1p für die rationale Entwicklung eines TriASo-Produzenten.....	- 110 -
3.5.12	Übertragen der Stammentwicklung auf den Wildtyp von <i>P. ciferrii</i>	- 112 -
4	DISKUSSION	- 115 -
4.1	Die Sphingolipid-Biosynthese in <i>P. ciferrii</i>	- 115 -
4.1.1	Aufklärung durch die Isolation relevanter Gene aus <i>P. ciferrii</i>	- 115 -
4.1.2	Tsc3p.....	- 115 -
4.1.3	Lcb1p.....	- 116 -
4.1.4	Tsc10p.....	- 117 -
4.1.5	Lag1p, Laf1p & Lip1p	- 117 -
4.1.6	Des1p	- 118 -
4.1.7	Yxc1p	- 120 -
4.1.8	Cerebroside in <i>P. ciferrii</i>	- 122 -
4.1.9	Phosphoinositol enthaltende Sphingolipide: IPC, MIPC & M(IP) ₂ C.....	- 124 -
4.1.9.1	IPC-Synthase	- 125 -
4.1.9.2	Sphingolipid- α -Hydroxylase.....	- 126 -
4.1.9.3	Mannosyltransferase	- 126 -
4.1.9.4	Inositolphosphotransferase 1	- 128 -
4.1.10	Import, Export und Abbau von Sphingoidbasen und Sphingolipiden.....	- 128 -
4.1.10.1	Phosphorylierung von Sphingoidbasen durch LCB-Kinasen	- 128 -
4.1.10.2	Dephosphorylierung von Sphingoidbasen-Phosphaten durch LCBP-Phosphatasen.....	- 128 -

Inhaltsverzeichnis

4.1.10.3	Abbau durch die Sphinganinephosphat-Lyase.....	- 129 -
4.1.10.4	Export von Sphingoidbasen	- 129 -
4.1.11	Acetylierung der Sphingoidbasen in <i>P. ciferrii</i>	- 130 -
4.1.12	Zusammenfassung der Sphingolipid-Biosynthese von <i>P. ciferrii</i> ...	- 130 -
4.2	WT vs. TAPS- vs. TriASa-Produzent	- 132 -
4.2.1	Ursachen der gesteigerten TAPS-Synthese	- 132 -
4.2.2	Die Wirkung von Syringomycin-E auf <i>P. ciferrii</i>	- 133 -
4.3	Entwicklung Auxotrophie-basierter Selektionssysteme für <i>P. ciferrii</i> ..	- 134 -
4.3.1	<i>URA3</i> als Auxotrophie-Marker	- 134 -
4.3.2	<i>LYS2</i> als Auxotrophie-Marker	- 136 -
4.4	Entwicklung einer fermentativen Route zur TriASo-Produktion durch rationale Stammverbesserung von <i>P. ciferrii</i>	- 137 -
4.4.1	Inaktivierung der Sphinganine-Hydroxylase in <i>P. ciferrii</i>	- 137 -
4.4.2	Überexpressionen und Codon-Optimierung	- 138 -
4.4.2.1	Die eingeschränkte Codon-Verwendung in <i>P. ciferrii</i>	- 139 -
4.4.2.2	<i>nat1</i> als Selektionsmarker	- 140 -
4.4.2.3	Einfluss der heterologen Expression des die alkalische Ceramidase aus der Maus kodierenden Gens	- 140 -
4.4.2.4	Einfluss der heterologen Expression des eine virale Ceramid- Synthase kodierenden Gens	- 141 -
4.4.2.5	Welche Gene sind essentiell für die Erhöhung der TriASo- Konzentration auf 64 mg/L?	- 143 -
4.4.2.6	Einfluss der Expression des die alkalische Ceramidase aus <i>P. ciferrii</i> kodierenden Gens	- 143 -
4.4.2.7	Ursachen des Anstiegs der TriASo-Produktion durch Erhöhung der Antibiotika-Konzentration.....	- 144 -
4.4.2.8	Eignung des <i>P. ciferrii</i> -WT's als Ausgangsstamm für die Entwicklung eines TriASo-Produktionsstammes	- 145 -
5	AUSBLICK	- 147 -
6	ZUSAMMENFASSUNG	- 151 -
7	LITERATURVERZEICHNIS	- 153 -
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	- 176 -
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	- 179 -
10	TABELLENVERZEICHNIS	- 183 -
11	ANHANG	- 184 -
11.1	DNA- und Proteinsequenzen	- 184 -
11.2	Übersicht über die Ergebnisse der qRT-PCR's.....	- 202 -
11.3	Plasmide	- 212 -
	DANKSAGUNG	- 229 -
	LEBENS LAUF	- 231 -

1 EINLEITUNG

1.1 Sphingolipide

1.1.1 Nomen est omen

Sphingolipide sind eine strukturell sehr variable Klasse von Biomolekülen, deren Funktion den Wissenschaftlern lange Zeit Rätsel aufgab. Diese Rätselhaftigkeit war auch ausschlaggebend für ihre Benennung durch ihren Entdecker J. L. W. Thudichum (1884). Thudichum befasste sich viel mit der griechischen Mythologie und benannte die von ihm isolierten Verbindungen aufgrund ihrer rätselhaften Funktion nach dem griechischen Fabelwesen Sphinx.

Die Sphinx wird als ein mit Adlerflügeln versehener Löwe mit Frauenkopf dargestellt, der die Stadt Theben belagert (Abb. 1) und den vorbeikommenden Thebanern das berühmte „Rätsel der Sphinx“ aufgab: „Es ist am Morgen vierfüßig, am Mittag zweifüßig, am Abend dreifüßig. Von allen Geschöpfen wechselt es allein in der Zahl seiner Füße; aber eben, wenn es die meisten Füße bewegt, sind Kraft und Schnelligkeit bei ihm am geringsten.“ Alle, die das Rätsel nicht zu lösen vermochten, wurden von der Sphinx verschlungen. Ödipus fand seinerzeit die richtige Antwort: „Du meinst den Menschen, der am Morgen seines Lebens, solange er ein Kind ist, auf zwei Füßen und zwei Händen kriecht. Ist er stark geworden, geht er am Mittag seines Lebens auf zwei Füßen, am Lebensabend, als Greis, bedarf er der Stütze und nimmt den Stab als dritten Fuß zu Hilfe.“ Voller Scham und Verzweiflung stürzte sich die Sphinx daraufhin von dem Felsen und die Stadt Theben war von der Plage erlöst.



Abbildung 1: Ödipus und das Rätsel der Sphinx.

1.1.2 Struktur der Sphingolipide

Sphingolipide finden sich in allen eukaryontischen Zellen, sowie in einigen wenigen Prokaryonten, wie z.B. den gram-negativen Bakterien der Gattung *Sphingomonas*.

Wie alle Membranlipide, sind auch Sphingolipide amphipatische Moleküle mit hydrophoben und hydrophilen Eigenschaften. Bereits die Sphingoidbase (LCB: *long chain base*) - für gewöhnlich Sphingosin, Sphinganin oder Phytosphingosin - an die eine Fettsäure über eine Amid-Bindung am Kohlenstoff 2 gebunden ist, besitzt aufgrund der Amino- und Hydroxygruppen eine amphipatische Struktur (Abb. 2).

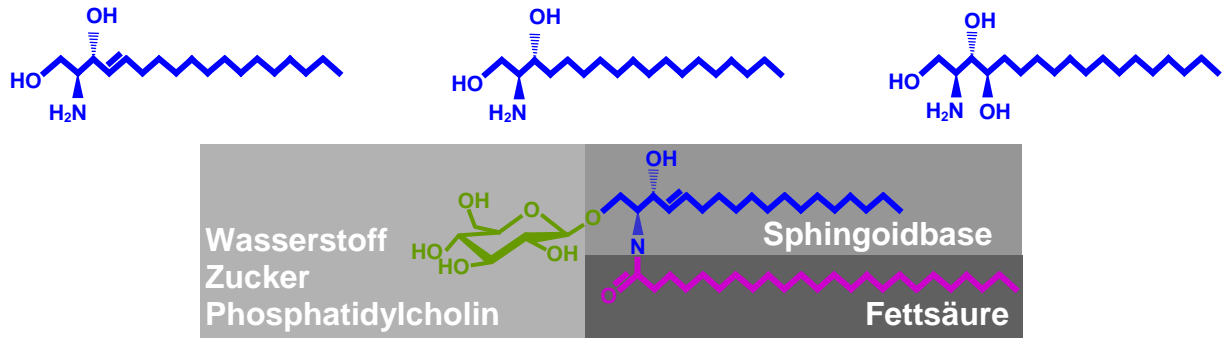


Abbildung 2: Der obere Teil der Abbildung zeigt die drei Sphingoidbasen Sphingosin, Sphinganin und Phytosphingosin (von links nach rechts). Der untere Teil der Abbildung stellt beispielhaft ein Sphingolipid dar, dass aus einer Sphingoidbase, einer Fettsäure und optional einem oder mehreren Zuckern oder Phosphatidylcholin besteht.

Das einfachste Sphingolipid, Ceramid, besitzt im Gegensatz zu komplexen Sphingolipiden, lediglich zwei OH-Gruppen als hydrophile Region (Abb. 3).

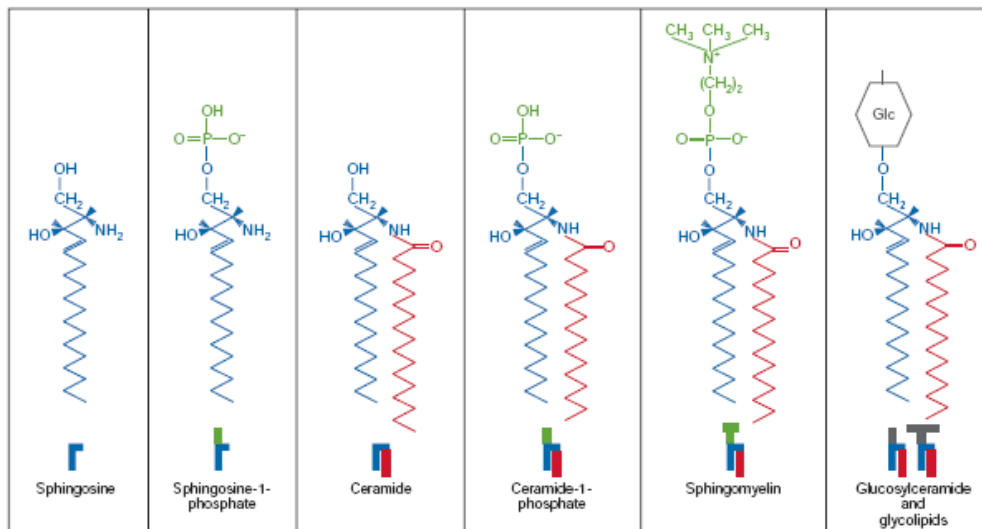


Abbildung 3: Die Komplexität der Sphingolipide. Zur Vereinfachung wird lediglich eine Sphingoidbase (Sphingosin, in blau) die mit nur einer Art von Fettsäure (Palmitat, in rot) N-acyliert ist, dargestellt. Ebenso wird nur ein Cerebrosid (Glucosylceramid, in schwarz) gezeigt. Das Ersetzen der Glukose durch andere Kohlenhydrat-Reste resultiert in mehr als 500 bekannten Glycosphingolipiden (aus Furtman und Hannun, 2004).

Komplexe Sphingolipide enthalten eine größere hydrophile Region, so wie z.B. Phosphat in Sphingosin-1-Phosphat und Ceramid-1-Phosphat, Phosphatidylcholin in Sphingomyelin, und Zuckerreste in Cerebrosiden.

In höheren Eukaryonten besteht die polare Kopfgruppe z.B. aus Glukose in Glucosylceramid, Galaktose in Galactosylceramid oder Phosphatidylcholin in Sphingomyelin. Die am häufigsten vorkommenden komplexen Sphingolipide bei Pilzen besitzen Inositolphosphat und Mannosereste am C-1 von Phytoceramid gebunden (Abb. 4).

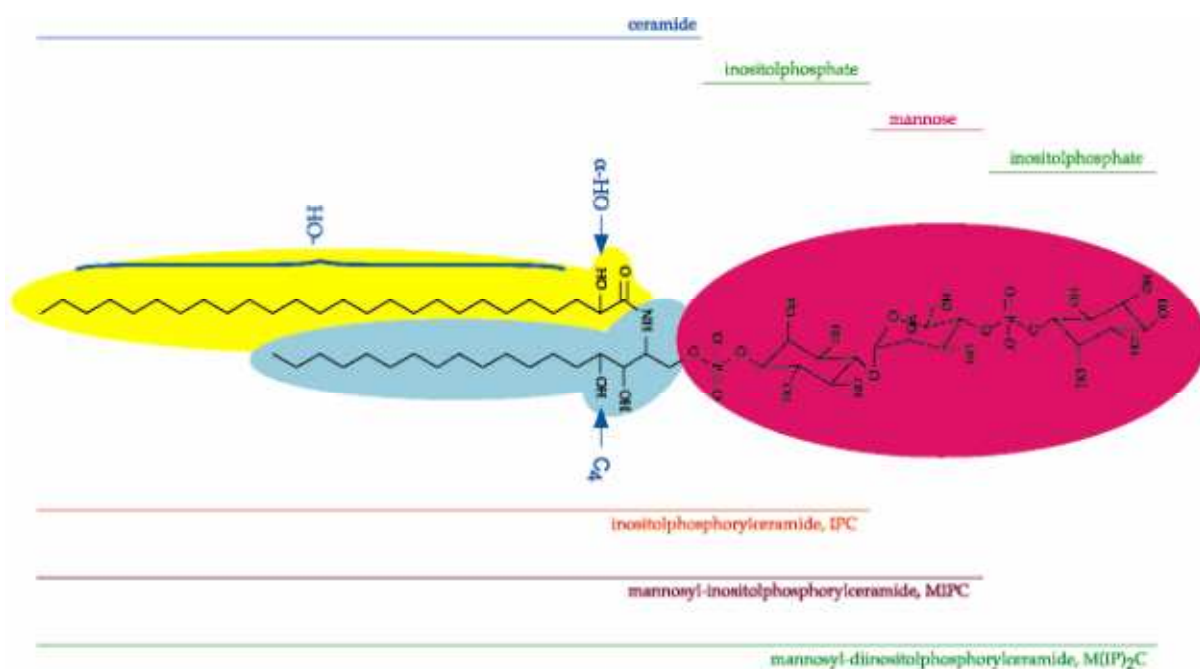


Abbildung 4: Struktur der drei Klassen von Sphingolipiden in Hefen: Inositol-Phosphorylceramid (IPC), Mannosyl-Inositol-Phosphorylceramid (MIPC) und Mannosyl-Di-Inositol-Phosphorylceramid M(IP)₂C. Die drei Teile des gezeigten Sphingolipids sind farblich markiert: die polare Kopfgruppe, rot; Sphingoidbase, blau; Fettsäure, gelb. Potentielle Hydroxylierungsstellen sind markiert (aus Schneiter, 1999).

1.1.3 Sphingolipid-Biosynthese in *S. cerevisiae*

Die Hefe *S. cerevisiae* ist bezüglich der Sphingolipid-Biosynthese einer der am besten untersuchten und verstandenen Organismen und dient daher an dieser Stelle modellhaft der Erklärung dieses Biosynthesewegs. Dennoch gibt es in anderen Hefen signifikante Abweichungen von dem beschriebenen Biosyntheseweg.

Die Synthese des Sphingoidbasen-Rückgrats ist der erste Schritt der Sphingolipid-Biosynthese in allen Organismen. Palmitoyl-CoA und Serin kondensieren zu 3-Ketosphingonin. Diese Reaktion wird katalysiert durch die Serin-Palmitoyltransferase, ein Pyridoxal-Phosphat enthaltendes Enzym, das in Hefe aus zwei Untereinheiten besteht, Lcb1p und Lcb2p (Buede *et al.*, 1991; Pinto *et al.*; 1992, Zhao *et al.*; 1994 und Nagiec *et al.*, 1994). Für eine optimale 3-Ketosphingonin-Synthese wird ein drittes Protein, Tsc3p, benötigt. Stämme mit einer Mutation in *TSC3* weisen eine deutlich verringerte Serin-Palmitoyltransferase-Aktivität auf, obwohl Tsc3p nicht fest an Lcb1p und Lcb2p bindet (Gable *et al.*, 2000; Monaghan *et al.*, 2002). Abbildung 5 gibt eine Übersicht über den vollständigen Sphingolipid-Biosyntheseweg in *S. cerevisiae*.

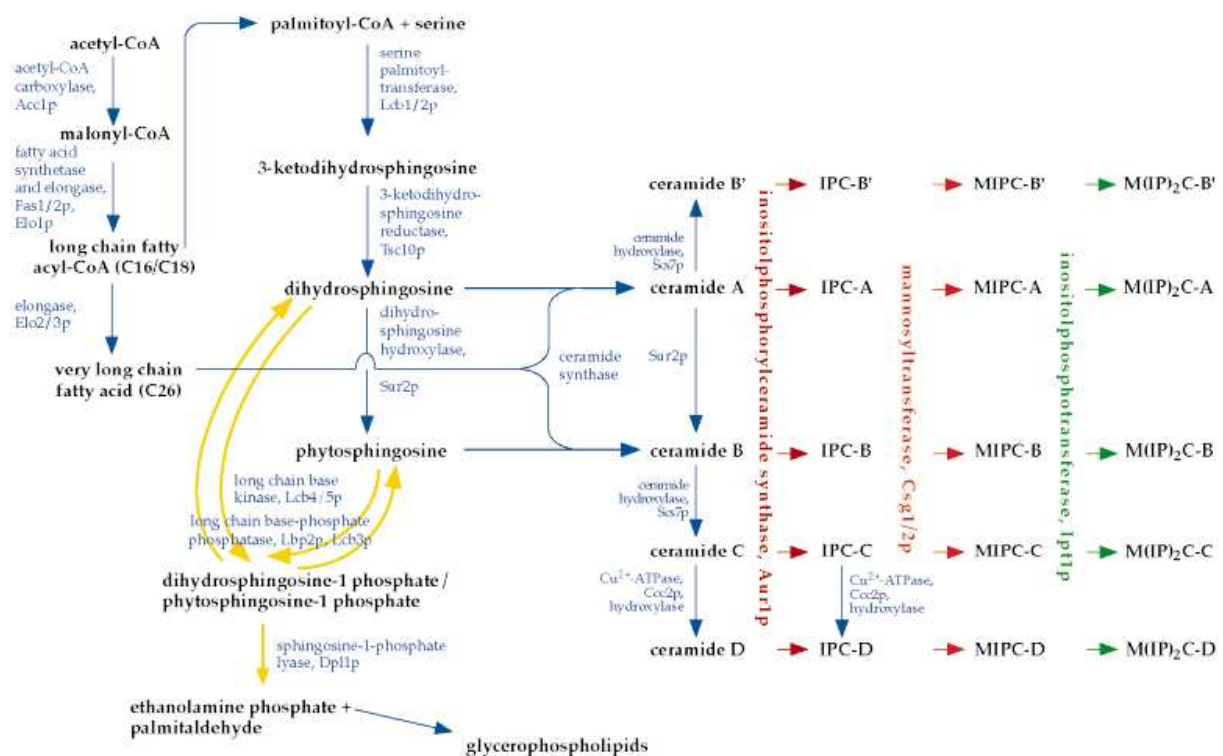


Abbildung 5: Sphingolipid-Biosynthese- und Abbau-Wege in *S. cerevisiae*. Reaktionsprodukte sind schwarz, Biosynthesewege und Enzyme blau markiert. Gelbe Pfeile stellen katabole Stoffwechselwege dar (3-ketodihydro-sphingosine = 3-Ketosphingonin; dihydro-sphingosine = Sphingonin) (aus Schneiter, 1999).

Im zweiten Schritt der Sphingolipid-Biosynthese wird 3-Ketosphingonin in einer NADPH-abhängigen Reaktion zu Sphingonin reduziert. Die 3-Ketosphingonin-Reduk-

tase ist codiert durch *TSC10*, was durch die heterologe Expression in *E. coli* demonstriert wurde (Beeler *et al.*, 1998).

Sphinganin wird anschließend durch die Sphinganin-Hydroxylase am C-4 hydroxyliert, um Phytosphingosin zu bilden. Das zugehörige *SUR2*-Gen wurde im Zusammenhang mit dem Antibiotikum Syringomycin-E näher charakterisiert, wodurch ein erster Zusammenhang zwischen der antibiotischen Wirkung von Syringomycin-E und Sphingolipiden hergestellt werden konnte (Cliften *et al.*, 1996). Haak *et al.* zeigten 1997, dass Sur2p essentiell für die Hydroxylierung von Sphinganin ist.

Im nächsten Schritt wird eine Fettsäure - für gewöhnlich 26 (Lester *et al.*, 1993), manchmal aber auch 24 Kohlenstoffatome lang (Oh *et al.*, 1997) - über eine Amid-Bindung an Phytosphingosin bzw. Sphinganin gebunden, um Phytoceramid bzw. Dihydroceramid zu erhalten. Die Reaktion wird katalysiert durch die Ceramid-Synthase. Diese besteht aus drei Untereinheiten, Lac1p, Lag1p und Lip1p. Zunächst wurden *LAC1* und *LAG1* als die ersten, für die Acyl-CoA-abhängige Ceramid-Synthase-Reaktion benötigten Gene entdeckt (Schorling *et al.*, 2001). Vallée und Riezman zeigten dann 2005 anhand von SDS-Page-Analysen der gereinigten Ceramid-Synthase, dass diese eine weitere Untereinheit enthält, Lip1p. *In vivo* und *in vitro* wurde gezeigt, dass Lip1p für die Phyto- und Dihydroceramid-Synthase benötigt wird.

Phytoceramid bzw. Dihydroceramid werden anschließend zu IPC umgewandelt (Abb. 5), der ersten von drei so genannten komplexen Sphingolipid-Familien, die alle Inositolphosphat enthalten. Das Inositolphosphat wird von Phosphatidylinositol auf die C-1 OH-Gruppe von Phytoceramid bzw. Dihydroceramid übertragen (Lester *et al.*, 1993). Diese Reaktion wird durch die IPC-Synthase katalysiert (Becker und Lester, 1980), welche durch das *AUR1*-Gen codiert wird. Das Fungizid Aureobasidin A inhibiert spezifisch die Aktivität der IPC-Synthase (Nagiec *et al.*, 1997).

Es gibt mehrere IPC-Spezies ansteigender Hydrophilizität: IPC-A, IPC-B' (IPC-B), IPC-C und IPC-D. Diese IPC's besitzen entweder keine (IPC-A und IPC-B), eine (IPC-B' und IPC-C) oder zwei (IPC-D) Hydroxyl-Gruppen im aliphatischen Schwanz des Fettsäurerestes (Hechtberger *et al.*, 1994; Lester und Dickson, 1993). Dabei erfolgt die Hydroxylierung der C26-Fettsäure an der C2-Position von IPC-B', IPC-C und IPC-D durch die Sphingolipid- α -Hydroxylase, die durch *SCS7* codiert wird (Dunn *et al.*, 1997). Des Weiteren ist bekannt, dass Ccc2p für die Umwandlung von IPC-C in IPC-D benötigt wird, wobei offen ist, an welcher Stelle die zweite Hydroxylierung stattfindet. Unklar ist auch, ob Ccc2p diese Hydroxylierung selbst katalysiert (Beeler

et al., 1997). Unbekannt ist außerdem auf welcher Ebene der IPC-Biosynthese die Hydroxylierung stattfindet. So besteht die Möglichkeit der Hydroxylierung des Acyl-CoA-Esters vor der Phytoceramid-Bildung, des Phytoceramids vor der IPC-Synthese, oder des IPC's selbst.

IPC wird anschließend zu Mannosyl-Inositol-Phosphorylceramid (MIPC) mannosyliert (Abb. 5). Diese Reaktion setzt die Funktionalität dreier Gene, *SUR1* (Beeler *et al.*, 1997), *CSG2* (Zhao *et al.*, 1994) und *CSH1* (Uemura *et al.*, 2003) voraus. Deren Produkte bilden zwei Inositolphosphorylceramid-Mannosyltransferase-Komplexe - Sur1p-Csg2p und Csh1p-Csg2p - mit unterschiedlichen Substratspezifitäten (Uemura *et al.*, 2003).

Das abundanteste komplexe Sphingolipid, Mannosyl-Di-Inositol-Phosphorylceramid $M(IP)_2C$, wird schließlich durch den Transfer von Inositolphosphat von Phosphatidyl-inositol auf MIPC gebildet (Abb. 6). Katalysiert wird dieser Transfer durch die Inositolphosphotransferase 1, codiert durch *IPT1* (Dickson *et al.*, 1997). Die Deletion von *IPT1* führt zur Akkumulation von MIPC, wohingegen kein $M(IP)_2C$ mehr nachweisbar ist.

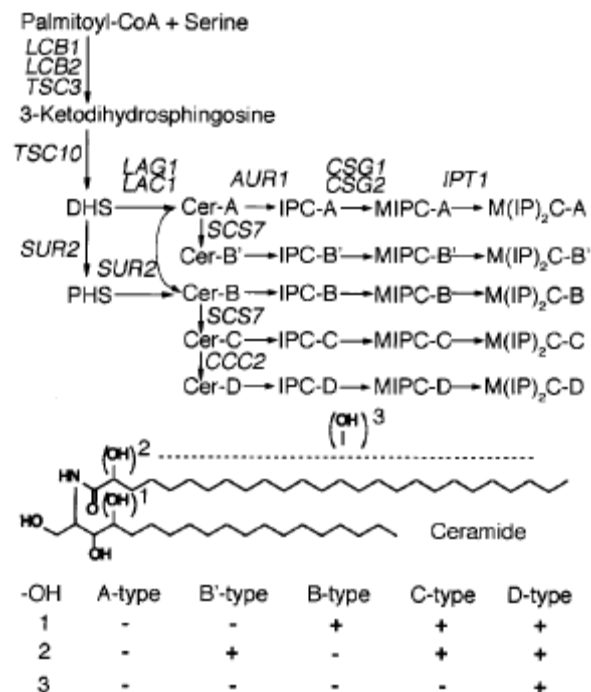


Abbildung 6: Die Bildung von Inositolphosphoceramiden in *S. cerevisiae*. Gezeigt sind die Biosynthesewege inklusive der beteiligten Gene. Aufgrund der unterschiedlichen Hydroxylierungsmuster der

Inositolphosphoceramide A, B', B, C und D gibt es jeweils fünf verschiedene Spezies von IPC, MIPC und M(IP)₂C. Die Inositolphosphoceramide A und B' enthalten Sphinganine (DHS) als Sphingoidbase, wohingegen B, C und D Phytosphingosin (PHS) enthalten (*3-Ketodihydrosphingosine* = 3-Ketosphinganine) (aus Uemura *et al.*, 2003).

Die komplexen Sphingolipide von *S. cerevisiae*, IPC, MIPC und M(IP)₂C sind ein Gemisch verschiedener Spezies, die sich nicht nur in der Sphingoidbase selbst unterscheiden. Hinzu kommen Unterschiede in der Kettenlänge und der Hydroxylierungs-Rate sowohl der Sphingoidbase, als auch der Fettsäure (Lester und Dickson, 1993).

Neben den endogen synthetisierten LCB's kann die Zelle auch extrazelluläres Sphinganine bzw. Phytosphingosin verwerten. Diese exogenen Formen werden über bis dato noch unbekannte Transporter aufgenommen und durch zwei Kinasen, Lcb4p und Lcb5p, am C-1-Atom zu LCB-1-Phosphaten (SA-1-P und PS-1-P) phosphoryliert (Nagiec *et al.*, 1998). Dies ist essentiell für den Transport von der Plasmamembran zur Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Die so genannten LCBP's müssen, nachdem sie zum ER gelangt sind, vor der Acylierung mit einer Fettsäure wiederum dephosphoryliert werden. Dies katalysieren die beiden LCB1P-Phosphatasen Lcb3p und Ysr3p (Qie *et al.*, 1997; Mao *et al.*, 1997; Mandala *et al.*, 1998).

Die LCB-Kinasen sind zudem in der Lage, während der endogenen Biosynthese gebildetes Sphinganine und Phytosphingosin zu phosphorylieren und so aus dem Biosyntheseweg der Sphingolipide zu entfernen. Diese phosphorylierten LCB's werden durch eine LCB-Phosphat-Lyase, codiert durch *DPL 1*, abgebaut (Saba *et al.*, 1997). Deren Reaktionsprodukte sind Phosphoethanolamin und Hexadecanal (SA-1-P) bzw. 2-Hydroxyhexadecanal (PS-1-P) (Abb. 7).

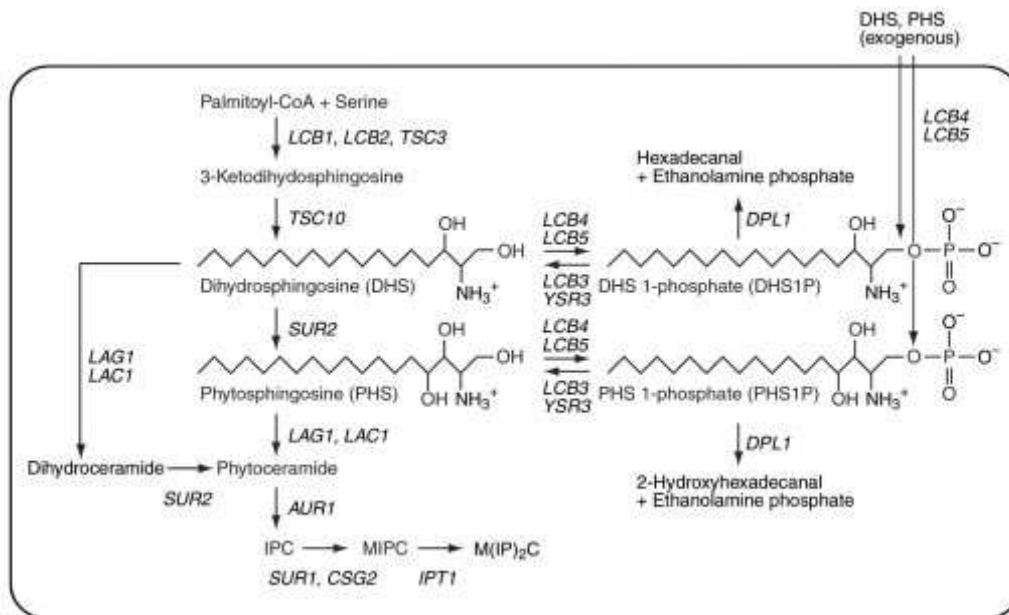


Abbildung 7: Import, Phosphorylierung, Dephosphorylierung und Abbau von Sphinganin (*Dihydrospingosine*, DHS) und Phytospingosin in *S. cerevisiae* (*3-Ketodihydrospingosine* = *3-Ketosphingonin*) (aus Kihara und Igarashi, 2002).

Eine weitere Möglichkeit zur Regulation der Sphingoidbasen-Konzentration in der Zelle besteht durch ihren Export. Hierzu dient ein Transporter oder eine Flippase, codiert durch *RSB1*. Das Translozieren der LCB's vom Zytoplasma in den extra-zytoplasmatischen Bereich ist ATP-abhängig. Allerdings werden nur LCB's und nicht LCBP's transportiert (Kihara und Igarashi, 2002).

Eine dritte Variante zur Regulation der LCB- bzw. Ceramid-Konzentration erfolgt durch so genannte Ceramidasen. *S. cerevisiae* besitzt zwei alkalische Ceramidasen Ypc1p und Ydc1p, die bevorzugt Phytoceramid bzw. Dihydroceramid in die jeweilige Sphingoidbase und Fettsäure hydrolysieren. Beide akzeptieren auch das jeweilige andere Substrat, wenn auch mit geringerer Affinität und besitzen eine reverse Aktivität zur CoA-unabhängigen Synthese von Phytoceramid (Ypc1p) bzw. Dihydroceramid (Ydc1p) aus Palmitat und der jeweiligen Sphingoidbase (Mao *et al.*, 2000a; Mao *et al.*, 2000b).

1.1.4 Besonderheiten und Abweichungen im Stoffwechselweg anderer Hefen

Die Hefe *S. cerevisiae* ist zwar der, bezüglich des Sphingolipid-Stoffwechselweges, am besten charakterisierte Pilz, weist jedoch einige Besonderheiten auf, die für Pilze eher untypisch sind.

So fehlt eine Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase, welche für die *de novo*-Synthese von Ceramid bzw. Sphingosin notwendig ist.

Ebenfalls nicht vorhanden sind die Enzymaktivitäten zur Synthese von Cerebrosiden mit Sphingadienin als LCB, wie die Sphingolipid- Δ^8 -Desaturase, die Sphingolipid-C9-Methyltransferase und die Ceramid-Glycosyltransferase. In anderen Organismen spielen Cerebroside jedoch eine wichtige strukturelle und funktionelle Rolle z.B. beim Zell-Wachstum und bei morphologischen Veränderungen (Warnecke und Heinz, 2003; Barreto-Bergter *et al.*, 2004).

Eine weitere Besonderheit in der Sphingolipid-Biosynthese von *S. cerevisiae* geht auf die frühe Genomverdopplung in einem Vorfahren von *S. cerevisiae* zurück (Dujon *et al.*, 2004) und schlägt sich in einem zweifachen Vorliegen einzelner Gene aus dem Sphingolipid-Biosyntheseweg nieder. So finden sich jeweils zwei Kopien der Ceramidase, der LCB-Kinase, der LCBP-Phosphatase, sowie der Mannosyltransferase. Die entsprechenden Unterschiede werden nachfolgend, sowie an anderer Stelle im Einzelnen erörtert.

1.1.4.1 Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase

Einer der wesentlichen Unterschiede zwischen der Sphingolipid-Biosynthese anderer Hefen und der von *S. cerevisiae* ist das Vorhandensein einer Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase, die Sphinganin auf der Ebene des Dihydroceramids zu Sphingosin desaturiert, wodurch Ceramid gebildet wird. Sphingosin bzw. Ceramid wird in *S. cerevisiae* nicht *de novo* gebildet, kann jedoch importiert werden (s.o.). Erstmalig charakterisiert wurde eine Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase in Eukaryonten durch Michel *et al.* (1997) anhand von Mikrosomen aus der Leber von Ratten. Durch einen bioinformatischer Ansatz kam es zur Identifikation einer Familie von Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturasen. Es fanden sich Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturasen in *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* und in *Candida albicans*, welche durch die Expression in *S. cerevisiae* charakterisiert wurden (Michel *et al.*, 1997). Neben der charakterisierten Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase aus *Candida albicans* wurden auch noch in zwei weiteren Hefen, *Neurospora crassa* und *Schizosaccharomyces pombe*, für Dihydro-

ceramid- Δ^4 -Desaturasen kodierende Gene entdeckt (Ternes *et al.*, 2002). Die Aktivität der korrespondierenden Enzyme als Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturasen wurde anschließend experimentell bestätigt (Garton *et al.*, 2003; Beckmann *et al.*, 2003).

1.1.4.2 Sphingolipid- Δ^8 -Desaturase

Ebenso wie Δ^4 - fehlen auch Δ^8 -desaturierte Sphingolipide in *S. cerevisiae* (Abb. 8). In anderen Pilzen finden sich jedoch in Form von Δ^4 - Δ^8 -Methyl-Sphingadienin, wie z.B. in der Hefe *Pichia pastoris* und den Pilzen *Rhynchosporium secalis* (Sakaki *et al.*, 2001) und *Mortierella alpina* (Batrakov *et al.*, 2002). Da Sphingolipid- Δ^8 -Desaturasen bereits in Pflanzen identifiziert und biochemisch charakterisiert worden waren, konnten die homologen Enzyme in Hefen leicht identifiziert werden. So wurden die Sphingolipid- Δ^8 -Desaturasen von *Saccharomyces kluyveri* und *Kluyveromyces lactis* experimentell charakterisiert (Takakuwa *et al.*, 2002). Eine mutmaßliche Sphingolipid- Δ^8 -Desaturase wurde zudem noch in *Candida albicans* identifiziert. Interessanterweise wurden in Hefen nur *trans*-Isomere von Δ^8 -desaturierten Sphingolipiden gefunden, wohingegen für Pflanzen eine Mischung von *cis*- und *trans*-Isomeren typisch ist (Warnecke und Heinz, 2003).

1.1.4.3 Sphingolipid-C9-Methyltransferase

Wie bereits erläutert, wurde in einigen Hefen und Pilzen die Existenz der Sphingoidbase Δ^4 - Δ^8 -Methyl-Sphingadienin nachgewiesen (Abb. 8). Die Identität der entsprechenden Methyltransferase war jedoch lange ungeklärt.

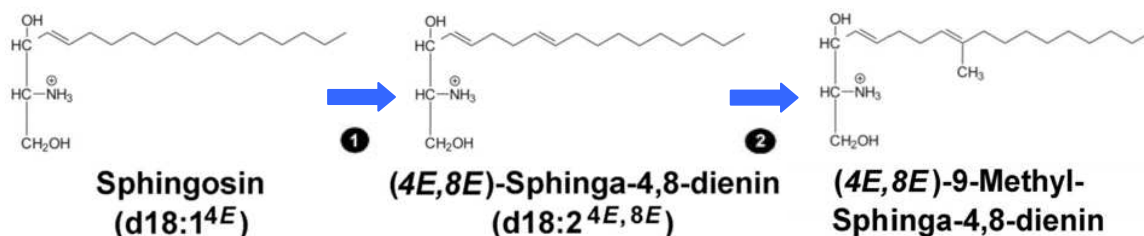


Abbildung 8: Modifikationen der Sphingoidbasen nach der Desaturierung von Sphinganin in Dihydroceramid zu Sphingosin in Ceramid.

❶ Sphingolipid- Δ^8 -Desaturase

❷ Sphingolipid-C9-Methyltransferase

Erst 2006 wurden Ternes *et al.* durch einen bioinformatischen Ansatz, der im Wesentlichen auf der Suche nach Methyltransferasen beruhte, deren Vorkommen sich auf jene Organismen beschränkte, die an C9 methylierte LCB's enthalten, fündig. Die Charakterisierung eines entsprechenden Kandidaten in der Hefe *Pichia pastoris* bestätigte dessen Aktivität als Sphingolipid-C9-Methyltransferase. Ternes *et al.* konnten zeigen, dass nur $\Delta^{4,8}$, nicht jedoch einfach desaturierte Ceramide als Substrate der Sphingolipid-C9-Methyltransferase akzeptiert werden. Die Sphingolipid-C9-Methyltransferase gehört zur Superfamilie der S-Adenosylmethionin-abhängigen Methyltransferasen, die eine große Bandbreite von Substraten an N-, O-, oder C-Atomen methylieren.

1.1.4.4 Ceramid-Glycosyltransferase

S. cerevisiae und *Schizosaccharomyces pombe* besitzen keine Ceramid-Glycosyltransferase. Dies geht einher mit der Erkenntnis, dass diese Hefen keine Cerebroside bilden. Im Gegensatz dazu wurden in *Candida albicans*, *Pichia pastoris* (Sakaki *et al.*, 2001), *Pichia anomala* (Dickson und Lester, 1999a) und in der Gattung *Cryptococcus* (Leverly *et al.*, 2000), sowie in *Yarrowia lipolytica* (Rupčić und Marić, 2004) Cerebroside nachgewiesen. Die Existenz von Ceramid-Glycosyltransferasen, die zuvor bereits in höheren Eukaryonten identifiziert und charakterisiert worden waren, konnte anschließend in *Magnaporthe grisea*, *Candida albicans* und *Pichia pastoris* (Leipelt *et al.*, 2001), sowie in *Saccharomyces kluyveri* und *Kluyveromyces lactis* (Takakuwa *et al.*, 2002) nachgewiesen werden.

Alle oben genannten Arten enthalten als einzigen Zucker Glukose, der β -glykosidisch an die C-1-Hydroxylgruppe von Ceramid gebunden ist. Dieser wird durch die Ceramid-Glycosyltransferase von Uridindiphosphosphat-Glukose (UDP-Glukose) auf Ceramid übertragen (Matsubara *et al.*, 1987; Leipelt *et al.*, 2000; Hillig *et al.*, 2003).

Ob die Glykosylierung der Ceramide durch die Ceramid-Glycosyltransferase vor oder nach dem Einfügen der Doppelbindungen bzw. der Methylgruppe stattfindet, ist nicht bekannt. Allerdings unterstützt die Tatsache, dass freie Ceramide vieler Pilze Δ^4 - Δ^8 -Methyl-Sphingadienin als Hauptbestandteil enthalten (Yaoita *et al.*, 2002) die Hypothese, dass die Modifikation der Sphingoidbasen der Cerebrosid-Bildung vorausgeht. Dies könnte alternativ aber auch durch einen Abbau von Cerebrosiden erklärt werden, wo die Modifikationen des Sphingoidbasen-Rückgrats nach dem Glykosylierungsschritt erfolgt.

1.1.4.5 Ceramidase

Neben den beiden aus *S. cerevisiae* isolierten alkalischen Ceramidasen Ydc1p und Ypc1p sind keine weiteren Ceramidasen aus Hefen charakterisiert worden. Diese besitzen Aktivitäten zur Hydrolyse von Dihydro- bzw. Phytoceramid, können aber Ceramid selbst nicht hydrolysieren (Mao *et al.*, 2000a und b).

Es sind jedoch zahlreiche Ceramidasen aus anderen eukaryontischen Organismen bekannt, die auch die Fähigkeit zur Hydrolyse von Ceramid aufweisen. So sind eine saure (Bernardo *et al.*, 1995), ebenso wie eine mitochondriale alkalische Ceramidase (El Bawab *et al.*, 2000) aus dem Menschen, sowie aus der Ratte eine Ceramidase mit breitem pH-Optimum (El Bawab *et al.*, 1999) und eine neutrale Ceramidase (Mitsutake *et al.*, 2001) charakterisiert worden. Zudem konnten Ceramid-hydrolysierende Ceramidasen aus dem Zebrafisch (Yoshimura *et al.*, 2004), sowie aus *Drosophila melanogaster* (Yoshimura *et al.*, 2002) isoliert werden. Ausnahmen bilden die neutrale und die alkalische Ceramidase aus der Maus. Erstere hydrolysiert im Gegensatz zu den oben genannten Ceramidasen fast ausschließlich sphingosin-basierte Ceramide. Die Affinität zu sphinganin-basierten Ceramiden ist deutlich niedriger und Phytoceramid wird gar nicht als Substrat akzeptiert (Tani *et al.*, 2000a und b). Die alkalische Ceramidase aus der Maus ist in ihrer Substratspezifität noch weiter eingeschränkt und akzeptiert ausschließlich sphingosin-basierte Ceramide als Substrat (Mao *et al.*, 2003).

1.1.5 Sphingolipide in *S. cerevisiae* und in Säugetieren

1.1.5.1 Biosynthese

Der Vergleich der Sphingolipid-Biosynthesewege von *S. cerevisiae* und Tieren in Abbildung 9 zeigt, dass IPC, MIPC und M(IP)₂C die einzigen in Hefe vorkommenden komplexen Sphingolipide sind (Lester und Dickson, 1993), wohingegen in Tieren Sphingomyelin und Cerebroside (Glukosylceramide und Galaktosylceramide) dominieren.

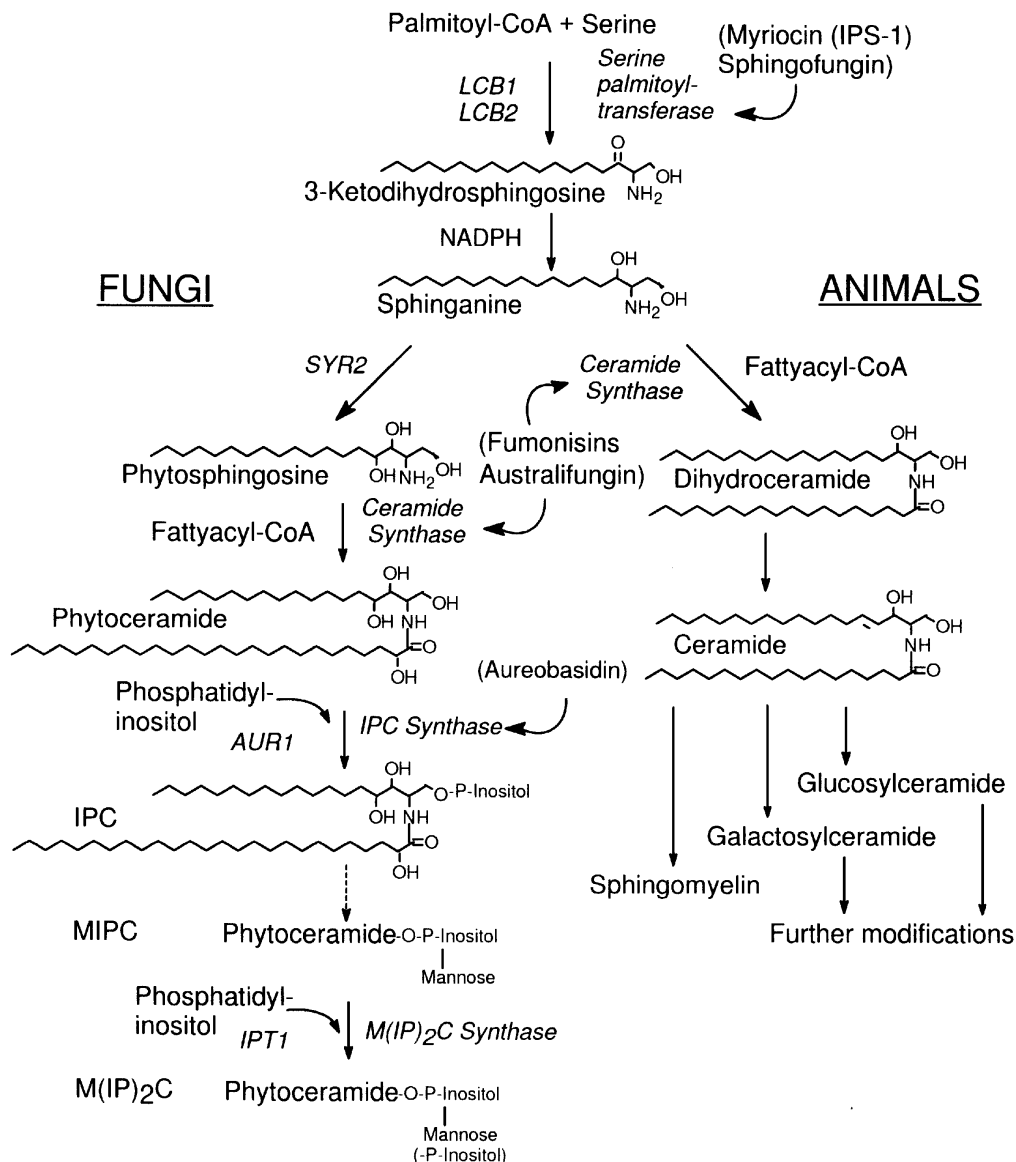


Abbildung 9: Vergleich der Sphingolipid-Biosynthesewege von *S. cerevisiae* und Tieren (3-Ketodihydrosphingosine = 3-Ketosphinganine) (aus Dickson, 1998).

Das vorherrschende Phytoceramid in *S. cerevisiae* enthält eine C₂₆-OH-Fettsäure. Im Gegensatz dazu nutzen Säugetiere kürzere Acyl-CoA-Thioester, C₁₆- bis C₂₄-CoA, zur Synthese von Dihydroceramid, welches anschließend zu Ceramid mit Sphingosin als Sphingoidbase umgewandelt wird (Merrill und Jones, 1990). In Hefe ist das Einfügen von einer oder zwei OH-Gruppen an die Fettsäure von Phytoceramid weit verbreitet, wohingegen eine Hydroxylierung der Fettsäure in Dihydroceramid bzw. Ceramid in Säugetieren eher selten vorkommt (Lester und Dickson, 1993). Von diesen Verallgemeinerungen gibt es allerdings auch Ausnahmen. So finden sich in der Epi-

dermis von Säugetieren neben Ceramid auch Phytoceramide. Zudem enthalten die Sphingolipide der Haut längere Fettsäuren von C₂₀ bis C₂₈ (Downing, 1992).

1.1.5.2 Zelluläre Lokalisation

Die drei komplexen Sphingolipide von *S. cerevisiae* sind hauptsächlich in der Plasmamembran zu finden, wo sie 7-8% der Gesamtmasse der Membran ausmachen (Patton und Lester, 1991; Hechtberger *et al.*, 1994). M(IP)₂C bildet 75% der Gesamtmasse der Sphingolipide; der Rest besteht aus IPC und MIPC (Smith und Lester, 1974). In Säugetieren liegen Sphingomyelin und Cerebroside hochkonzentriert auf der exoplasmatischen Seite der Plasmamembran vor. Geringere Konzentrationen sind in den Membranen einiger Zellkompartimente zu finden (van Echten und Sandhoff, 1993).

Generell bilden Sphingolipide zusammen mit Sterolen in der Plasmamembran so genannte "*lipid rafts*", die sich frei in der Membran bewegen können. Bei Säugetieren handelt es sich bei diesen Sterolen um Cholesterin, bei Hefen um Ergosterol (Abb. 10).

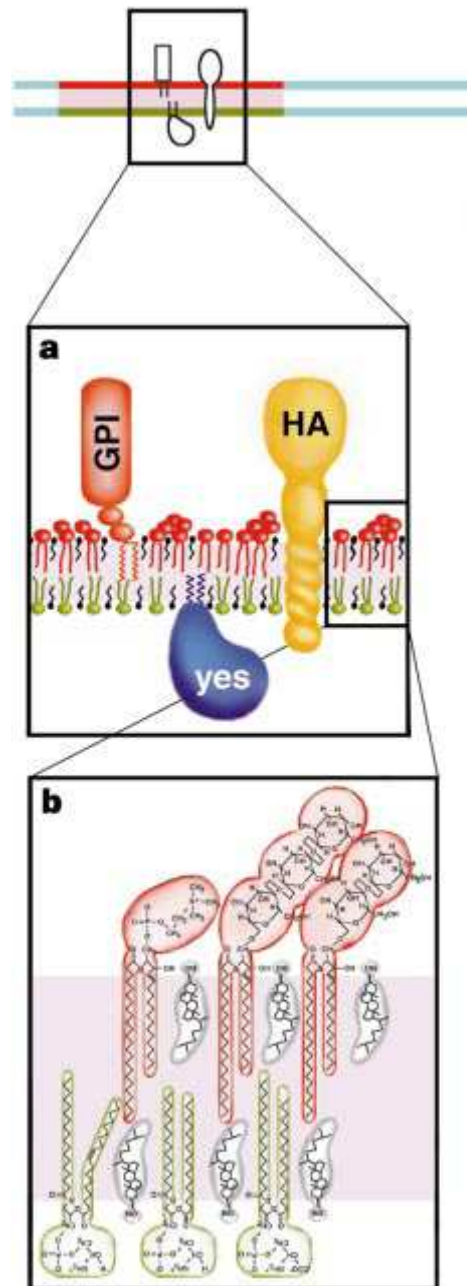


Abbildung 10: Modell der Organisation von "lipid rafts". Die "lipid rafts" (rot) unterscheiden sich von den anderen Regionen (blau), welche exoplasmatisch hauptsächlich Phosphatidylcholin enthalten. **a**, Neben den Sphingolipiden enthalten die "lipid rafts" Proteine, die exoplasmatisch über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker (rot), cytoplasmatisch über eine Fettsäure (blau), sowie Proteine, die über ihre Transmembran-Domäne mit der Membran assoziiert sind (gelb). **b**, Die Lipid-Doppelschicht ist in den "lipid rafts" asymmetrisch. Sphingomyelin (rot) und Cerebroside (rot) befinden sich auf der exoplasmatischen Seite der Membran, Glycerolipide (z.B. Phosphatidylserin und Phosphoethanolamin; grün) sind auf der cytoplasmatischen Seite zu finden sind. Cholesterin (grau) findet sich auf beiden Seiten der Membran (aus Simons und Ikonen, 1997).

Die Synthese der Sphingolipide beginnt sowohl in *S. cerevisiae*, als auch in Säugtieren im ER. In Hefe werden lediglich einige Phytoceramide vor dem Transport zum

Golgi-Apparat in IPC umgewandelt, wo dann die polare Kopfgruppe hinzugefügt wird (Puoti *et al.*, 1991). In Säugetieren wird das Ceramid vom ER durch sekretorische Vesikel zum Golgi-Apparat transportiert, wo es dann in komplexe Sphingolipide umgewandelt wird (Rosenwald und Pagano, 1993; Sandhoff und van Echten, 1993).

Neben dem massiven Vorkommen komplexer Sphingolipide in der Membran wurden Sphingolipide auch an anderen Orten gefunden. Geringere Konzentrationen, insbesondere von IPC in *S. cerevisiae*, finden sich sowohl im Golgi, als auch in der Vakuole. In den Mitochondrien hingegen konnten lediglich Spuren komplexer Sphingolipide detektiert werden (Hechtberger *et al.*, 1994). In Säugetieren wurde zudem in der Membran des Zellkerns Sphingomyelin gefunden (Allan und Raval, 1987).

1.1.6 Funktionelle Rolle von Sphingolipiden in *S. cerevisiae*

Neben der Rolle als essentieller Bestandteil der Zellmembran und der damit einhergehenden wichtigen strukturellen Funktion, übernehmen Sphingolipide weitere wichtige funktionelle Aufgaben.

1.1.6.1 Zell-Wachstum

Die Inaktivierung bestimmter Schritte des Sphingolipid-Biosyntheseweges ist letal. Dies zeigt, dass Sphingolipide essentiell für das Wachstum und das Überleben von *S. cerevisiae* sind (Dickson *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1995; Nagiec *et al.*, 1997).

Auf der anderen Seite wirken einige Stoffwechsel-Zwischenprodukte wie Phytoceramid und Dihydroceramid sowie Sphingoidbasen und deren Phosphate inhibitorisch auf das Wachstum. So zeigten Mao *et al.* (1997) und Saba *et al.* (1997), dass die externe Gabe von Sphingosin, sowie Phytosphingosin zu einem Wachstums-Stopp führen. Zudem führt die Erhöhung der Ceramid- bzw. Sphingoidbasen-Konzentration durch Überexpression der LCBP-Phosphatase zu einem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase, was auf eine Beteiligung der Sphingolipide bei der Zellzyklus-Kontrolle hinweist (Mao *et al.*, 1999).

1.1.6.2 Hitzestress-Antwort

Die schützende Rolle von Sphingolipiden bei Hitzestress wurde erstmalig bei *lcb1*- bzw. *lcb2*-Mutanten festgestellt, die eine weitere Mutation tragen, welche die LCB-Auxotrophie supprimiert. Diese Mutanten sind nicht in der Lage Sphingolipide zu bil-

den und bei erhöhten Temperaturen zu wachsen (Patton *et al.*, 1992; Lester *et al.*, 1993).

Die LCB-Konzentration steigt innerhalb von Minuten nach Einsetzen eines Hitzeschocks um das bis zu 100-fache an (Jenkins *et al.*, 1997; Dickson *et al.*, 1997). Dieser Konzentrations-Anstieg wird als Voraussetzung für eine erfolgreiche Hitzestress-Antwort angesehen und Sphingolipide dienen hier offenbar als Signalmoleküle oder so genannte "second messenger" (Liu *et al.*, 2005; Daquinag *et al.*, 2007). Allerdings sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch weitgehend ungeklärt.

1.1.6.3 Protein-Abbau

Sphingolipide spielen bei der Ubiquitylierung und dem anschließenden Abbau von Proteinen eine funktionelle Rolle. So inhibieren Sphingonin und Phytosphingosin das Wachstum von *S. cerevisiae* durch Blockierung des Imports von Tryptophan (Skrzypek *et al.*, 1998), Uracil, Leucin, Histidin und anderer Nährstoffe (Chung *et al.*, 2001). Dies geschieht durch das Stimulieren der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse der entsprechenden Permeasen (Chung *et al.*, 2000).

1.1.6.4 Endocytose

Für den Internalisierungs-Schritt der Endocytose werden Sphingoidbasen benötigt (Zanolari *et al.*, 2000). Zudem wirken Sphingoidbasen auch noch als Signal-Moleküle bei der Endocytose (Friant *et al.*, 2001). Somit haben Sphingoidbasen sowohl direkten als auch indirekten Einfluss auf den Transport über die Membran.

1.1.6.5 Protein-Transport

Die Sphingolipid-Biosynthese im ER wird für den effizienten Transport von GPI-verankerten Proteinen vom ER zum Golgi-Apparat benötigt. Dies zeigen Versuche, in denen einzelne Gene des Sphingolipid-Biosynthesewegs (*LCB1*, *LAC1*, *LAG1*) mutiert wurden, was zu einem Anstieg der Konzentration von Proteinen mit GPI-Anker im ER führt. Zurückzuführen ist dies auf den fehlenden Transport dieser Proteine vom ER zum Golgi-Apparat (Schorling *et al.*, 2001).

1.1.7 Sphingolipide in der menschlichen Haut

Die Hauptaufgabe der menschlichen Haut ist der Schutz vor Austrocknung. Dieser Schutz wird hauptsächlich durch die Epidermis der Haut ausgeübt, wobei der äußersten Schicht, dem *Stratum corneum* (Abb. 11), entscheidende Bedeutung zukommt (Harding *et al.*, 2000).

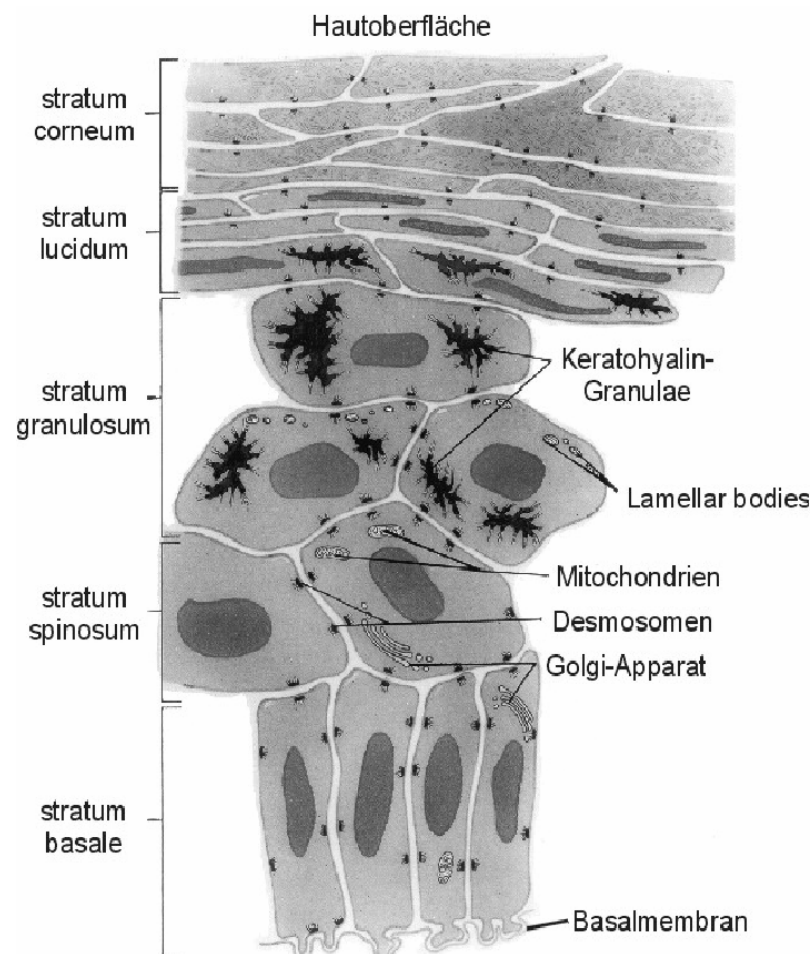


Abbildung 11: Querschnitt durch die menschliche Haut von der Basalmembran zur äußersten Hautschicht, dem *Stratum corneum*.

Das *Stratum corneum* besteht aus zwei Grundkomponenten: Corneocyten und Lipiden (Elias, 1983). Die Lipide machen ca. 20% des *Stratum corneum*-Volumens und 15% der Trockenmasse aus (Wertz und van den Bergh, 1998). 50% der Masse der *Stratum corneum*-Lipide machen die Ceramide aus (Elias, 1991) (Abb. 12).

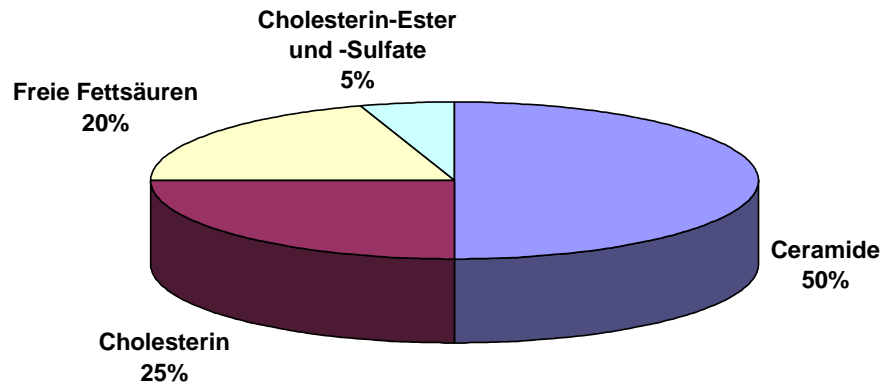


Abbildung 12: Zusammensetzung des *Stratum corneum*. Angegeben ist der jeweilige prozentuale Anteil an der Gesamtmasse.

In dem Bereich zwischen *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* werden die Phospholipide, Sphingolipide und Plasmamembran-Bestandteile vor dem Eintritt in das *Stratum corneum* enzymatisch zerlegt, um freie Fettsäuren und Ceramide zu generieren (Mao-Qiang *et al.*, 1995). Diese fusionieren anschließend und bilden die charakteristische lamellenförmige Doppelschicht des *Stratum corneums* aus.

1.1.7.1 Struktur der Ceramide des *Stratum corneums*

Neun Hauptklassen von freien, nicht Corneocyten-gebundenen, Ceramiden sind bekannt (Abb. 13). Zusätzlich gibt es noch vier Klassen, die kovalent gebunden sind (Robson *et al.*, 1994).

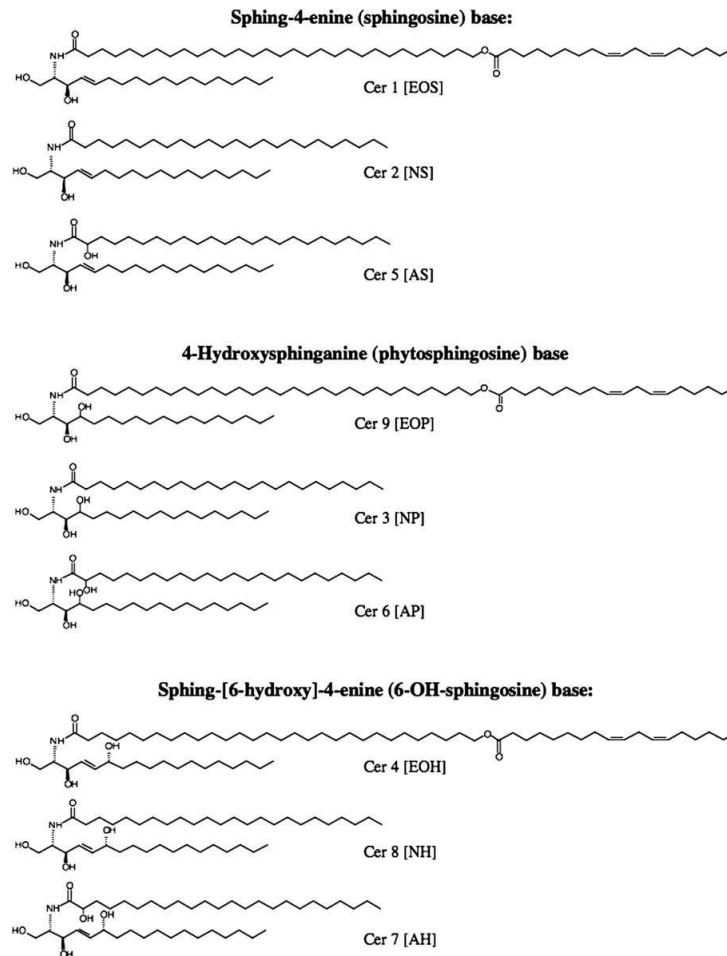


Abbildung 13: Struktur der häufigsten Ceramid-Spezies des *Stratum corneum*. Als Sphingoidbase fungieren Sphingosin (Ceramide 1, 2 und 5), Phytosphingosin (Ceramide 3, 6 und 9) und 6-Hydroxy-Sphingosin (Ceramide 4, 7 und 8) (aus Holleran *et al.*, 2006).

Unter den Ceramiden überwiegt der Anteil an Sphingosin-basierten Ceramiden mit ca. 47% am Gesamtpool freier Ceramide, gefolgt von den 6-Hydroxy-Sphingosin-basierten mit ca. 35% und den Phytosphingosin-basierten Ceramiden mit ca. 18%.

Die Ceramide 3, 6, 7 und 8 beinhalten meist eine C26- oder eine C28-Fettsäure. Die häufigste Fettsäure des Ceramids 5 ist eine C16-Fettsäure. Die übrigen Ceramide 1, 2, 4 und 9 beinhalten bevorzugt C30- und längere Fettsäuren (Farwanah *et al.*, 2005).

Neben der Funktion als Hauptbestandteil einer natürlichen Barriere zum Schutz vor Wasserverlust kommen den Ceramiden in der Epidermis noch weitere Aufgaben zu. So wurden im *Stratum corneum* Ceramidasen gefunden (Wertz und Downing, 1989), die zur Freisetzung freier Sphingoidbasen im *Stratum corneum* führen (Wertz und

Downing, 1990). Diesen wurde eine Beteiligung als Signalmolekül bei der Regulation der Keratinozyten-Proliferation zugewiesen (Gupta *et al.*, 1988).

Zudem zeigen Studien von Bibel *et al.* (1992), dass Sphingosin auch eine antimikrobielle Wirkung hat und somit eine erste Verteidigungslinie gegen eindringende Mikroorganismen im *Stratum corneum* bildet.

1.1.7.2 *Variationen der Ceramid-Konzentrationen im Stratum corneum*

Der Gesamtgehalt von Ceramiden im *Stratum corneum*, sowie die individuelle Konzentration einzelner Ceramid-Spezies wird beeinflusst durch z.B. Krankheiten, das Alter, externe Faktoren, die Jahreszeit usw. Diese Variationen können die Schutzfunktion und den Wassergehalt, sowie das allgemeine Erscheinungsbild der Haut negativ beeinflussen.

So finden sich z.B. bei Psoriasis (Menon and Ghadially, 1997), atopischer Dermatitis (Imokawa *et al.*, 1991), Akne (Downing *et al.*, 1986) und Kopfschuppen (Harding *et al.*, 2002) deutliche Veränderungen der Ceramid-Level.

Nieminen *et al.* konnten bereits 1967 zeigen, dass es im Winter generell zu einem Absinken der epidermalen Cerebrosid-Konzentrationen kommt, was auf die verringerte Luftfeuchtigkeit zurückzuführen ist.

1.1.7.3 *Einfluss von oberflächlich aufgetragenen Ceramiden auf die Schutzfunktion der Haut*

Durch das Auftragen von Ceramiden auf geschädigte, schuppige Haut werden eine Reduktion der Schuppenbildung und eine Verbesserung der Feuchtigkeit der Haut erzielt (Imokawa *et al.*, 1986). Diese Verbesserungen der Hautfeuchtigkeit und der Elastizität der Haut wurden insbesondere für das Phytoceramid 3 (NP) (Abb. 13) bestätigt (Yilmaz und Borchert, 2006).

1.1.7.4 *Wirkung von Sphingoidbasen auf die Schutzfunktion der Haut*

Eine Möglichkeit zur Verstärkung der Ceramid-Biosynthese besteht in der Gabe von Stoffwechsel-Zwischenprodukten. So zeigten Davies *et al.* (1996), dass das Auftragen der modifizierten Sphingoidbase Tetraacetylphytosphingosin (TAPS) zu einer Steigerung der Ceramid-Biosynthese und damit einhergehend zu einer verbesserten Widerstandsfähigkeit der Barriere gegenüber Tensiden führt.

Einen positiven Effekt auf die Behandlung chronischer Plaque-Psoriasis durch eine oberflächliche Behandlung mit Sphingosin konnten Arnold *et al.* (1993) zeigen, womit den Sphingoidbasen neben der kosmetischen, auch eine pharmazeutische Bedeutung zukommt.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Phytosphingosin und Sphingosin eine antimikrobielle sowie eine antifungizide Wirkung ausüben (Patentanmeldungen: WO 00/53568 und WO 98/49999).

Untersuchungen von de Jager *et al.* (2005) wiesen daraufhin, dass eine Mixtur aus Ceramiden die einzigartige Struktur des *Stratum corneums* nachahmen. Wurde in dieser Mixtur das Sphingosin-basierte Ceramid 1 vollständig durch das Phytosphingosin-basierte Ceramid 9 ersetzt, reduzierte sich die Bildung der lamellenförmigen Doppelschicht. Dies deutet daraufhin, dass den Sphingosin-basierten Ceramiden eine essentielle Rolle bei der Ausbildung der quasikristallinen Struktur des *Stratum corneums* und somit auch bei der Formulierung von entsprechenden Kosmetika zukommt.

1.2 *Pichia ciferrii*

1.2.1 Taxonomie

Die Hefe *P. ciferrii* aus der Familie der *Saccharomycetaceae* wird phylogenetisch der Ordnung der *Saccharomycetales* (sprossende Hefen) zugeordnet, welche zum Stamm der *Ascomycota* (Ascomyzeten) und zum Reich der *Fungi* (Pilze) gehört.

1.2.2 Phylogenie und Biochemie

Die Hefe *P. ciferrii* wurde 1932 durch Lodder entdeckt und als neue Spezies mit dem Namen *Hansenula ciferrii* beschrieben. 1952 reduzierten Lodder und Kreger-van Rij den Organismus zu einer Unterart von *Hansenula anomala*, was Wickerham 1953 aufgrund phänotypischer Merkmale widerrief.

1962 definierten Wickerham und Burton erstmalig systematisch die Gattung *Hansenula* als "Hefen, die Nitrat assimilieren, sich asexuell durch Sprossung oder durch Sprossung einhergehend mit der Bildung von Pseudohyphen oder echten Hyphen reproduzieren, und eine bis vier Ascosporen in Asci bilden, die nach der Sporenbildung aufbrechen". *H. ciferrii* (die Schreibweise variierte zu Beginn noch zwischen *ciferri* und *ciferrii*) wurde innerhalb dieser Gattung zur heterothallischen Spezies, die sich zu einem einzeln lebenden Organismus entwickelt, gezählt. Neben dem natürlichen Vorkommen diploider Stämme in der Natur wurden polyploide Stämme lediglich in älteren Labor-Kulturen entdeckt.

Als natürliches Habitat dient *H. ciferrii* der Erdboden, Wasser oder die Exudate von Pflanzen. Glukose, Galaktose, Maltose, Sukrose sowie Raffinose können als C-Quelle verwendet werden, wobei die Zugabe von Vitaminen zu einem synthetischen Medium nicht notwendig ist. Auf einem festen Nährmedium bildet *H. ciferrii* erhabene, weiße, matte, nicht glattrandige Kolonien aus, deren große Hydrophobizität diese krümelig erscheinen lassen.

1984 ordnete Kurtzman viele Arten der Gattung *Hansenula*, darunter auch *Hansenula ciferrii*, aufgrund von DNA-Verwandtschafts-Analysen der Gattung *Pichia* zu. *Hansenula ciferrii* wurde in *Pichia ciferrii* umbenannt.

Die Analyse partieller Sequenzen der für die 26S-RNA der großen ribosomalen Untereinheit kodierenden rDNA zur Klärung der Phylogenie der Ascomyzeten rückte *P. ciferrii* 1998 phylogenetisch in die Nähe der Gattung *Candida* (Abb. 14) (Kurtzman und Robnett).

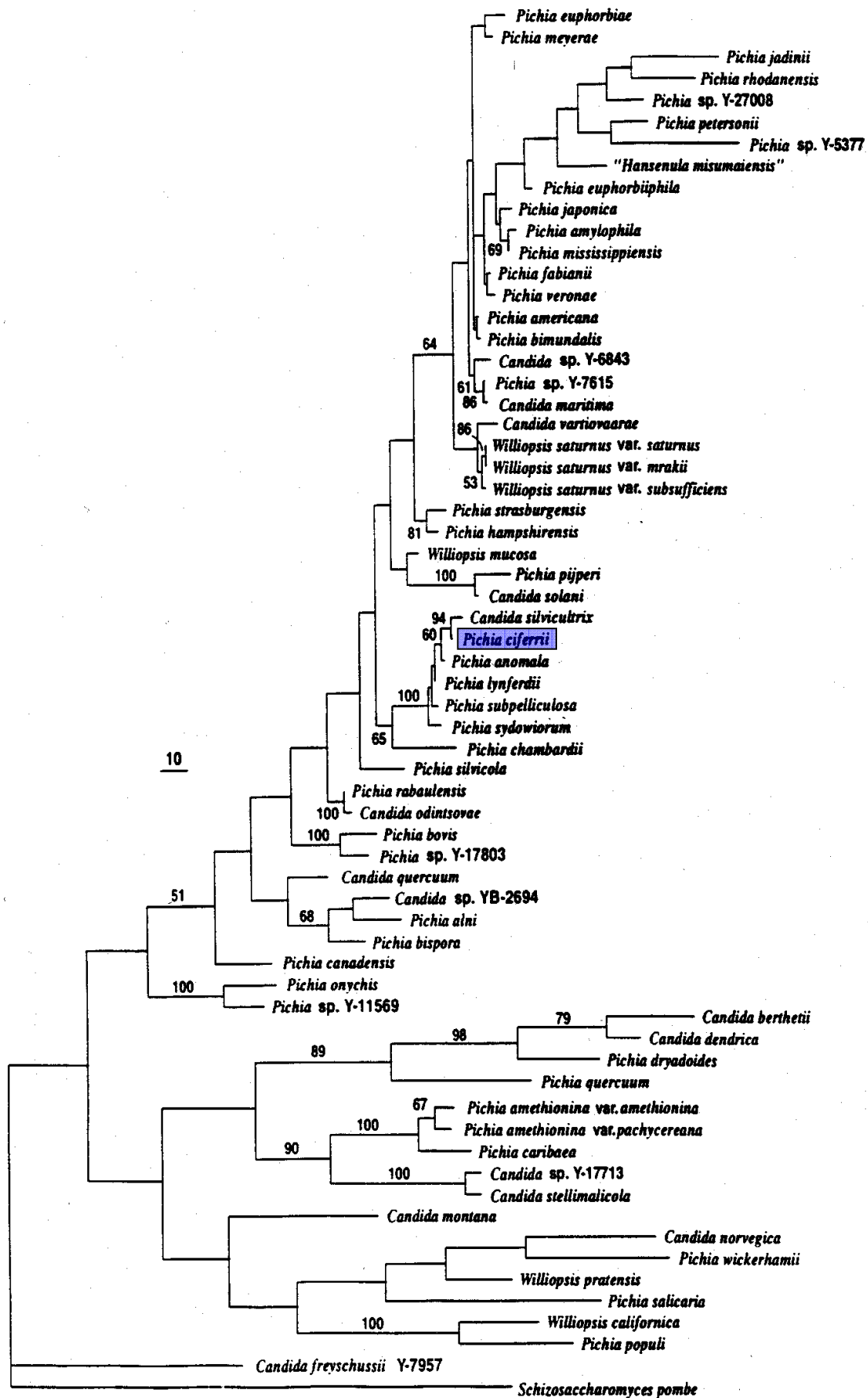


Abbildung 14: Phylogenetischer Baum des *Pichia anomala*-Zweiges (aus Kurtzman und Robnett, 1998).

1.2.3 Ploidie

Sowohl Wickerham und Burton (1962), als auch Bae *et al.* (2003) beschreiben *P. ciferrii* als polyploiden Organismus. Versuche zur Bestätigung dieser These sind jedoch in der weiteren Literatur nicht beschrieben, so dass über die Anzahl der Chromosomen-Sätze keine definitive Aussage getroffen werden kann.

1.2.4 Sekretion von Sphingolipiden

Bis dato einzigartig ist die Tatsache, dass *P. ciferrii* kristalline Sphingolipide - Tetraacetylphythosphingosin (TAPS) und Triacetylspingonanin (TriASa) - in das Medium sekretiert (Wickerham und Stodola, 1960; Stodola *et al.*, 1962) (Abb. 15).

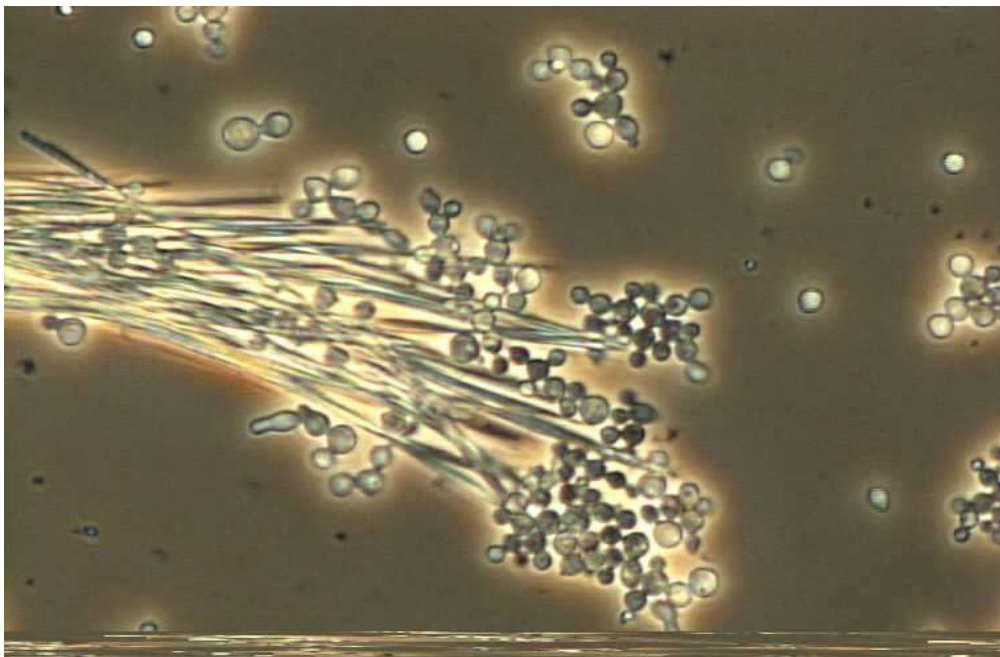


Abbildung 15: *P. ciferrii* produziert in flüssigem Nährmedium Tetraacetylphythosphingosin und Triacetylspingonanin, die sekretiert werden und kristalline Strukturen ausbilden.

Stodola und Wickerham (1960) sowie Stodola *et al.* (1962) konnten zeigen, dass die sekretierten Sphingoidbasen eine Länge von 18 Kohlenstoffatomen aufweisen. Allerdings liegen diese nicht immer vollständig acetyliert vor, sondern sind ebenfalls als Di- bzw. N-acetylierte Formen zu finden (Greene *et al.*, 1965).

In einem Spot-Test wurde die antibiotische Wirkung der freien Sphingoidbasen nachgewiesen. Hierbei wurde vermutlich ein Gemisch aus Phytosphingosin und Sphinganin verwendet (Karlsson, 1966). Neben den bereits identifizierten Sphingoidbasen mit einer Länge von 18 Kohlenstoffatomen konnten viele weitere entdeckt werden (Tab. 1). Der Anteil der Sphingoidbasen Phytosphingosin und Sphinganin mit jeweils 18 Kohlenstoffatomen überwiegt jedoch bei weitem.

Tabelle 1: Zusammensetzung der von *P. ciferrii* sekretierten Sphingoidbasen. Die Daten wurden von Karlsson (1966) übernommen.

Sphingoidbase	relative Menge
C18 PS	89,0
C18 SA	7,0
C20 PS	0,5
C20 SA	0,4
C19 PS	0,1
C19 SA	0,5
C17 PS	0,5
C17 SA	1,0
C16 SA	0,5

1.2.5 Die Sphingolipid-Biosynthese in *P. ciferrii*

P. ciferrii wurde sehr früh als ein Organismus identifiziert, der große Mengen Sphingoidbasen bildet und - bis dato einzigartig - diese sekretiert. Dies führte relativ früh zu einer intensiven Erforschung der Biosynthese der Sphingoidbasen in *P. ciferrii*.

Zunächst stellten Greene *et al.* (1965) fest, dass sich Phytosphingosin, Sphinganin und Sphingosin von Serin und Palmitoyl-CoA ableiten. Notwendig für die Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA ist das Vorhandensein von Pyridoxal-Phosphat als Co-Faktor (Braun und Snell, 1967). Das beteiligte Enzym wurde 3-Oxo-Sphinganine-Synthetase (heute: Serin-Palmitoyltransferase) genannt und ist in den Mikrosomen lokalisiert (Stoffel *et al.*, 1968). Als Produkt der Kondensation entsteht 3-Ketosphinganine (Braun und Snell, 1968). Eine Untereinheit der Serin-

Palmitoyltransferase wurde 2003 durch Bae *et al.* kloniert. Das Lcb2p von *P. ciferrii* weist eine 62%ige positionelle Aminosäureidentität zum Lcb2p von *S. cerevisiae* auf und enthält eine errechnete 25 Aminosäure (AS) lange Transmembran-Domäne am N-Terminus, sowie eine Pyridoxal-5-Phosphat Bindestelle (Bae *et al.* 2003).

Die ebenfalls in den Mikrosomen lokalisierte 3-Ketosphinganin-Reduktase katalysiert die anschließende NADPH-abhängige Reduktion von 3-Ketosphinganin zu Sphingamin (Stoffel *et al.*, 1968). Sphingamin liegt in *P. ciferrii*, ebenso wie Sphingosin, in der *erythro*-Konfiguration vor, was der im Menschen zu findenden Konfiguration entspricht (Braun und Snell, 1968).

Sphingamin wird dann durch die Aktivität einer Sphingamin-Hydroxylase, codiert durch SYR2, in Phytosphingosin umgewandelt. Das Syr2p von *P. ciferrii* enthält eine ER-Erkennungssequenz am C-Terminus (Bae *et al.*, 2004).

Die Acetylierung der Sphingoidbasen erfolgt über eine mikrosomale LCB-Acetyl-CoA-Acetyltransferase (Barenholz *et al.*, 1971), die die Acetyl-Gruppen von Acetyl-CoA auf die Sphingoidbasen überträgt (Barenholz und Gatt, 1969). Die LCB-Acetyl-CoA-Acetyltransferase katalysiert vermutlich sowohl die N- als auch die O-Acetylierung, da Versuche, die N- bzw. O-acetylierenden Aktivitäten zu separieren, fehlschlagen. Eine Reversibilität dieser Reaktion ist nicht gegeben. Sie kann Acetyl-Gruppen mit vergleichbarer Aktivität auf Sphingosin, Sphingamin und Phytosphingosin übertragen (Barenholz und Gatt, 1972). Extrazellulär sind nur acetylierte und keine freien Sphingoidbasen zu finden, was vermuten lässt, dass die Acetylierung Voraussetzung für die Exkretion ist (Barenholz *et al.*, 1971).

Neben der Synthese von Sphingoidbasen in freier und acetylierter Form bildet *P. ciferrii* langkettige Ceramide (Stoffel *et al.*, 1968). Diese können weiter zu Glucosylceramiden umgewandelt werden, die D-Glukose als einzigen Zucker enthalten. Die Fettsäureseitenkette des Glucocerebroside kann aus C_{16:0}, C_{16:1}, C_{18:0}, C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3} und C_{18:0-OH} bestehen. Als Sphingoidbase liegt dem Cerebroside Sphingosin zugrunde (Kaufman *et al.*, 1971).

Der Abbau der Sphingoidbasen erfolgt durch die ATP-abhängige Aktivität der Sphinganinphosphat-Lyase, die an die Membranen des ER gebunden ist (Stoffel *et al.*, 1969). Diese spaltet *in vitro* nicht nur Phytosphingosin in eine hydroxylierte Fettsäure und Phosphoethanolamin (Karlsson *et al.*, 1967), sondern auch Sphinganin und Sphingosin (Stoffel *et al.*, 1968).

1.2.6 **Metabolic engineering von *P. ciferrii***

2003 entwickelten Bae *et al.* ein Transformationssystem, um in die Sphingolipid-Biosynthese der Hefe *P. ciferrii* einzugreifen. Dieses basiert auf der Vermittlung einer Resistenz gegen Cycloheximid durch das multiple Einbringen einer mutierten Form des ribosomalen Proteins L41. Cycloheximid greift hierbei in die Proteinbiosynthese ein, wobei das ribosomale Protein L41 eines seiner Angriffspunkte darstellt. Der Austausch der AS Glutamin durch die AS Prolin an Position 56 dieses Proteins verhindert dieses Eingreifen und vermittelt somit eine Resistenz gegenüber Cycloheximid (Kawai *et al.*, 1992). Als Integrationsort dient der intergenische Bereich zwischen der 5S und der 26S rDNA. Durch die Wahl des Resistenz-Markers, der erst durch eine mehrfache Integration eine Cycloheximid-Resistenz hervorruft, und des Integrationsorts, der in ca. 100 Kopien in der Zelle vorliegt, wurden bis zu fünf bis sieben Integrationen pro Zelle erreicht.

Durch die Entwicklung dieses Transformationssystems konnte erstmalig gezielt in den Sphingolipid-Stoffwechsel von *P. ciferrii* eingegriffen werden. Die Überexpression des *LCB2*-Gens unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors führte zu einer 50fach höheren *LCB2* mRNA-Konzentration, was wiederum zu einer Verdopplung der TAPS-Konzentration führte (Bae *et al.*, 2003).

1.3 Ziele der Arbeit

1.3.1 Entwicklung einer fermentativen Route zur Triacetylsphingosin-(TriASo-) Produktion

Im Rahmen dieser Dissertation sollte ausgehend von einem Sphinganin-produzierenden *P. ciferrii*-Stamm, ein durch rationale Stammentwicklung hergestellter Stamm

für die fermentative Herstellung von TriASo entwickelt werden. Der fermentative Prozess zur Produktion von TriASo sollte genutzt werden, um die chemische Synthese des kosmetischen Wirkstoffs zu ersetzen, da die chemische Synthese zur Bildung eines Racemats führt. In der menschlichen Haut findet sich jedoch ausschließlich das *D*-Isomer. Bei der fermentativen Herstellung von TriASo durch die Hefe *P. ciferrii* wird ausschließlich dieses *D*-Sphingosin gebildet. Zudem ergibt sich durch die Mehrstufigkeit der chemischen Synthese und durch die vielen funktionellen Gruppen ein sehr hoher Produktionspreis, der den einer fermentativen Herstellung deutlich übersteigt.

Notwendig für die rationale Stammentwicklung ist zunächst einmal die Aufklärung des Sphingolipid-Biosynthesewegs in *P. ciferrii*. Die Kenntnisse aus dieser Aufklärung sollten angewendet werden, um den Fluss innerhalb der Sphingolipid-Biosynthese durch gezieltes Verstärken bzw. Inaktivieren einzelner Gene in Richtung der Sphingosin-Biosynthese zu lenken.

Um gentechnisch veränderte *P. ciferrii*-Stämme später auch kommerziell nutzen zu können, sollten zudem schutzfähige oder zumindest patentfreie Selektionssysteme etabliert werden.

1.3.2 Charakterisierung der Sphingolipid-Biosynthese in *P. ciferrii*

Zur näheren Charakterisierung der Sphingolipid-Biosynthese in *P. ciferrii* sollten die entsprechenden Gene isoliert und sequenziert werden, um im Anschluss mit geeigneten Methoden die zugehörigen Enzyme - insbesondere bezüglich ihrer Substratspezifität - zu analysieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Stämme und Medien

2.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

Tabelle 2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX</i> 74 <i>recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Fa. Invitrogen
DH5α	F ⁻ <i>endA1 hsdR17 supE44</i> ; λ ⁻ <i>thi-1 recA1 gyrA96 relA1</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15	Hanahan, 1985
NEB 5-alpha	<i>fhuA2</i> Δ(<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA glnV44</i> Φ80 Δ(<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Fa. New England Biolabs
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁻ <i>proAB lac</i> ^f ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Fa. Stratagene

2.1.2 Medien und Anzucht von *E. coli*

Flüssiges Vollmedium (LB): 2,5% (w/v) LB-Bouillon (MILLER)

Festes Vollmedium (LB): 3,75% (w/v) LB-Agar (MILLER)

Flüssiges Medium für Dauerkulturen: 3,75% (w/v) LB-Agar (MILLER), 40% (v/v) Glycerin

Für die Selektion auf eine plasmidkodierte Antibiotika-Resistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin zugesetzt.

Die Anzucht der *E. coli* Zellen erfolgte bei 37°C und 250 rpm im Falle der Kultivierung in Flüssigmedien.

2.1.3 Hefe-Stämme

Tabelle 3: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Hefe-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
CEN.PK2-1C	<i>S. cerevisiae</i> : MATa <i>leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8C SUC2</i>	Entian und Kötter

CEN.PK2-1C <i>sur2</i> Δ	<i>S. cerevisiae</i> : MATa <i>ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8C SUC2 sur2::KILEU2</i>	Schaffer, Degussa GmbH
F-60-10A NRRL 1031 (WT)	<i>P. ciferrii</i>	Fa. Cosmoferm
COS22A	<i>P. ciferrii</i>	Fa. Cosmoferm
COS23A	<i>P. ciferrii</i>	Fa. Cosmoferm
<i>syrE1</i>	<i>P. ciferrii</i>	Fa. Cosmoferm
<i>syrE10</i> Re-Isolat 11	<i>P. ciferrii</i>	Fa. Cosmoferm
<i>syr2 1-3</i> Re-Isolat 10	<i>P. ciferrii</i>	Fa. Cosmoferm
<i>syr2 1-3</i> Re-Isolat 23	<i>P. ciferrii</i>	Fa. Cosmoferm
SPS103	<i>P. ciferrii</i>	Fa. Cosmoferm

2.1.4 Medien und Anzucht von *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C-Derivaten

Vollmedium (YPD): 1% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) Pepton, 2% (w/v) Glukose

Minimalmedium (YNB): 0,67% (w/v) *Yeast Nitrogen Base* ohne AS, 2% (w/v) Glukose

Vollmedium für Dauerkulturen: YPD + 40% (v/v) Glycerin

Konzentration der Aminosäuren bzw. der Nukleinbasen im Minimalmedium:

Histidin [0,13 mM], Leucin [0,15 mM], Tryptophan [0,10 mM], Uracil [0,18 mM]

Die Selektion auf den Erwerb von Auxotrophiemarkern erfolgte durch das Auslassen der Zugabe der entsprechenden Aminosäure bzw. Nukleinbase.

Feste YPD-Nährböden enthielten zusätzlich 1,5% (w/v) und feste YNB-Nährböden zusätzlich 2,0% (w/v) Agar-Agar.

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte bei 30°C und 250 rpm im Falle der Kultivierung in Flüssigmedien.

2.1.5 Medien und Anzucht von *P. ciferrii*

Vollmedium (YPD): 1% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) Pepton, 2% (w/v) Glukose

Minimalmedium (YNB): 0,67% (w/v) *Yeast Nitrogen Base* ohne AS, 2% (w/v) Glukose

Vollmedium für Dauerkulturen: YPD + 40% (v/v) Glycerin

Anzucht-Medium für die Sphingoidbasen-Produktion und HPLC-Analytik (TAPS-Medium):

Komponente	Konzentration
Hefeextrakt	0,1000% (w/v)
Glucose Monohydrat	3,3000% (w/v)
Magnesiumsulfat * 7aq.	0,0880% (w/v)
Calciumchlorid * 2aq.	0,0200% (w/v)
Ammoniumchlorid	0,4830% (w/v)
Natriumchlorid	0,0060% (w/v)
Kaliumdihydrogenphosphat	0,1000% (w/v)
Kaliumhydrogenphthalat	2,0000% (w/v)
Myo-Inositol	0,0059% (w/v)
Spurenelementlösung	0,0300% (v/v)
Vitaminlösung	0,1000% (v/v)

Spurenelementlösung	Konzentration
$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$	0,00270% (w/v)
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,00050% (w/v)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,00075% (w/v)
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,00006% (w/v)
H_3BO_3	0,00006% (w/v)
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,00006% (w/v)
KI	0,00015% (w/v)

Vitaminlösung	Konzentration
Nikotinsäure	0,300% (w/v)
Calcium-D-Pantothenensäure	0,300% (w/v)
Thiamin (Vitamin B1)	0,300% (w/v)
PABA (p-Aminobenzoat)	0,200% (w/v)
Pyridoxin (Vitamin B6)	0,030% (w/v)
Biotin	0,001% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf 5,4 eingestellt.

Die Selektion auf die Integration eines Plasmids in das Genom erfolgte durch die Zugabe von 0,5 µg/ml Cycloheximid bzw. 50 µg/ml Nourseothricin.

Feste YPD-Nährböden enthielten zusätzlich 1,5% (w/v) Agar-Agar.

Die Anzucht von *P. ciferrii* erfolgte bei 30°C und 250 rpm im Falle der Kultivierung in Flüssigmedien.

2.2 Plasmide

Tabelle 4: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Quelle/Referenz	Beschreibung
p426HXT7-6His	Becker und Boles, 2003	2 μ Expressionplasmid zur Herstellung von Fusionsproteinen mit 6xHis-Epitop; <i>URA3</i> -Selektionsmarker, verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pAG25	Goldstein <i>et al.</i> , 1999	Der Vektor vermittelt eine Ampicillin-Resistenz in <i>E. coli</i> . Zur Selektion in Hefen enthält er das <i>nat1</i> -Gen aus <i>Streptomyces noursei</i> , welches für die Nourseothricin N-acetyl-Transferase codiert und eine Resistenz gegen das Antibiotikum Nourseothricin vermittelt
pNEB193	Fa. New England Biolabs	pNEB193 ist ein pUC19 -Derivat
pCR2.1-TOPO	Fa. Invitrogen	Vektor zur TOPO TA-Klonierung®
pCR4-TOPO	Fa. Invitrogen	Vektor zur TOPO TA-Klonierung®
pCR-Blunt II-TOPO	Fa. Invitrogen	Vektor zur Zero Blunt® TOPO® PCR-Klonierung
pYES2-CaDES	Fa. Degussa	Vektor beinhaltet <i>CaDES1</i> -Gen
pUC-kana-omCER	Fa. Geneart	Vektor beinhaltet codon-optimiertes <i>mCER</i> -Gen
pGA4-oCvDES1	Fa. Geneart	Vektor beinhaltet codon-optimiertes <i>CvDES1</i> -Gen
pGA4-oCvLAG1	Fa. Geneart	Vektor beinhaltet codon-optimiertes <i>CvLAG1</i> -Gen
pGA4-oAgDES1	Fa. Geneart	Vektor beinhaltet codon-optimiertes <i>AgDES1</i> -Gen
pUK-kana-omLASS1	Fa. Geneart	Vektor beinhaltet codon-optimiertes <i>mLASS1</i> -Gen
pUK-kana-omLASS2	Fa. Geneart	Vektor beinhaltet codon-optimiertes <i>mLASS2</i> -Gen
pGA4-omLASS4	Fa. Geneart	Vektor beinhaltet codon-optimiertes <i>mLASS4</i> -Gen
pUK-kana-omLASS5	Fa. Geneart	Vektor beinhaltet codon-optimiertes <i>mLASS5</i> -Gen
pGA4-omLASS6	Fa. Geneart	Vektor beinhaltet codon-optimiertes <i>mLASS6</i> -Gen
pUK-kana-oAgLAG1	Fa. Geneart	Vektor beinhaltet codon-optimiertes <i>AgLAG1</i> -Gen
pPCR-Script-	Fa. Geneart	Vektor beinhaltet codon-optimiertes <i>AgLAF1</i> -Gen

oAgLAF1

Tabelle 5: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pDB003	p426HXT7-6His-basierter Vektor; dient der Expression des <i>DES1</i> -Gens aus <i>P. ciferrii</i> in <i>S. cerevisiae</i> unter Kontrolle des <i>HXT7</i> -Promotors
pDB004.1	p426HXT7-6His-basierter Vektor; dient der Expression des <i>DES1</i> -Gens aus <i>Yarrowia lipolytica</i> in <i>S. cerevisiae</i> unter Kontrolle des <i>HXT7</i> -Promotors
pDB005	p426HXT7-6His-basierter Vektor; dient der Expression des <i>DES1</i> -Gens aus <i>Candida albicans</i> in <i>S. cerevisiae</i> unter Kontrolle des <i>HXT7</i> -Promotors
pDB006	integriert in den intergenischen Bereich zwischen der 5S und der 26SrDNA von <i>P. ciferrii</i> ; vermittelt eine Resistenz gegen Cycloheximid
pDB007	pDB006-basierter Vektor; dient der Überexpression des <i>DES1</i> -Gens aus <i>P. ciferrii</i> unter Kontrolle des <i>PcPDA1</i> -Promotors in <i>P. ciferrii</i>
pDB008	pDB006-basierter Vektor; enthält das <i>PcURA3</i> -Gen und dient der Komplementation einer <i>URA3</i> -basierten Uracil-Auxotrophie in <i>P. ciferrii</i>
pDB010	pDB006-basierter Vektor; enthält das <i>ScLYS2</i> -Gen und dient der Komplementation einer <i>LYS2</i> -basierten Lysin-Auxotrophie in <i>P. ciferrii</i>
pDB011	pDB006-basierter Vektor; enthält das <i>ScLYS5</i> -Gen und dient dem Versuch zur Komplementation einer Lysin-Auxotrophie in <i>P. ciferrii</i>
pDB012	pDB006-basierter Vektor; enthält das <i>PcLYS2</i> -Gen und dient der Komplementation einer <i>LYS2</i> -basierten Lysin-Auxotrophie in <i>P. ciferrii</i>
p-mCER-nat1	enthält eine Kasette zur Expression des <i>omCER</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors; vermittelt durch Tragen einer codon optimierten Form des <i>nat1</i> -Gens aus <i>Streptomyces noursei</i> unter Kontrolle des <i>PDA1</i> -Promotors aus <i>P. ciferrii</i> eine Resistenz gegen Nourseothricin; die Integration findet im intergenischen Bereich zwischen der 5S und der 26SrDNA statt
p-mCER-nat1-SYR2	p-mCER-nat1-basierter Vektor; trägt zusätzlich Teile des <i>PcSYR2</i> -Gens zur gezielten Disruption des <i>SYR2</i> -Gens in <i>P. ciferrii</i>
pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1	pDB007-basierter Vektor; dient der Expression des <i>AgLAF1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors und des <i>AgLAG1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcPDA1</i> -Promotors zur Expression in <i>P. ciferrii</i>

p-mCER-nat1-omLASS1	p-mCER-nat1-basierter Vektor; trägt zusätzlich das <i>omLASS1</i> -Gen unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors zur Expression in <i>P. ciferrii</i>
p-mCER-nat1-omLASS2	p-mCER-nat1-basierter Vektor; trägt zusätzlich das <i>omLASS2</i> -Gen unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors zur Expression in <i>P. ciferrii</i>
p-mCER-nat1-omLASS4	p-mCER-nat1-basierter Vektor; trägt zusätzlich das <i>omLASS4</i> -Gen unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors zur Expression in <i>P. ciferrii</i>
p-mCER-nat1-omLASS5	p-mCER-nat1-basierter Vektor; trägt zusätzlich das <i>omLASS5</i> -Gen unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors zur Expression in <i>P. ciferrii</i>
p-mCER-nat1-omLASS6	p-mCER-nat1-basierter Vektor; trägt zusätzlich das <i>omLASS6</i> -Gen unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors zur Expression in <i>P. ciferrii</i>
p-mCER-nat1-PcLAG1	p-mCER-nat1-basierter Vektor; trägt zusätzlich das <i>PcLAG1</i> -Gen unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors zur Expression in <i>P. ciferrii</i>
p-mCER-nat1-PcLAF1	p-mCER-nat1-basierter Vektor; trägt zusätzlich das <i>PcLAF1</i> -Gen unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors zur Expression in <i>P. ciferrii</i>
p-mCER-nat1-oAgLAG1	p-mCER-nat1-basierter Vektor; trägt zusätzlich das <i>oAgLAG1</i> -Gen unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors zur Expression in <i>P. ciferrii</i>
p-mCER-nat1-oAgLAF1	p-mCER-nat1-basierter Vektor; trägt zusätzlich das <i>oAgLAF1</i> -Gen unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors zur Expression in <i>P. ciferrii</i>
p-mCER-nat1-oCvLAG1	p-mCER-nat1-basierter Vektor; trägt zusätzlich das <i>oCvLAG1</i> -Gen unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors zur Expression in <i>P. ciferrii</i>
pPcYXC1-nat1-oCvLAG1	p-mCER-nat1-oCvLAG1-basierter Vektor; beinhaltet statt der Kasette zur Expression des <i>omCER</i> -Gens, eine Kasette zur Überexpression des <i>PcYXC1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors zur Expression in <i>P. ciferrii</i>
pDB006-PcDES1	pDB006-basierter Vektor; dient der Überexpression des <i>DES1</i> -Gens aus <i>P. ciferrii</i> unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors in <i>P. ciferrii</i>
p-nat1	p-mCER-nat1-basierter Vektor ohne die Kasette zur Expression des <i>omCER</i> -Gens zur Verwendung in <i>P. ciferrii</i>

2.3 Oligonukleotide

Tabelle 6: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide (synthetisiert durch MWG Biotech)

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
LCB1-fw2	TTY TAY GGT AAY CAA GAT GTY CA	Degenerierter Vorwärts-Primer zur Amplifikation des <i>PcLCB1</i> -Gens
LCB1-rev4	ACC YTT ACC DGT DGC ACC HAR RAC ACC	Degenerierter Revers-Primer zur Amplifikation des <i>PcLCB1</i> -Gens
LCB1-down-fw2	TGA ATC TTT ATC TTT AGG TGT CC	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcLCB1</i>
LCB1-down-rv3	TCC AAA TAA CTA ATT AAA TTT TCT TAA	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcLCB1</i>
LCB1-down-fw3	TTA GTG CTT CAT TAC CTG CTT A	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcLCB1</i>
LCB1-down-rv4	CAA TAA GCC ATT GAA CCA ATT C	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcLCB1</i>
DBö-LCB1-rev1	TAT ACA GTT TAA AGG TTG GG	Revers-Primer zur Sequenzierung des <i>PcLCB1</i> -Gens
PcLCB1-fw	CAT ATT AAA TTA GAA AAT GAT TTA GCA AAA TTT TTC G	Vorwärts-Primer zur Sequenzierung des <i>PcLCB1</i> -Gens
DBö-LCB1-fw2	CAA ACA AAT AAA TTC ATA TCA AAG AG	Vorwärts-Primer zur Sequenzierung des <i>PcLCB1</i> -Gens
DBö-LCB1-rev2	AAG CAC TAA AAC AAT AAG CC	Revers-Primer zur Sequenzierung des <i>PcLCB1</i> -Gens
DBö-LCB1-T7-1	TCC GGC ATC CAA TCA TC	Vorwärts-Primer zur Sequenzierung des <i>PcLCB1</i> -Gens
DBö-LCB1-T7-2	GAA TTT ACC GTT CCG TAG AC	Vorwärts-Primer zur Sequenzierung des <i>PcLCB1</i> -Gens
DBö-LCB1-rv2	CAA TAT CTC ACT ACA ACA GGC	Revers-Primer zur Sequenzierung des <i>PcLCB1</i> -Gens
TSC10-fw1	ATY WSW GGT GGT WSW CAA GGT YTD GGT	Degenerierter Vorwärts-Primer zur Amplifikation des <i>PcTSC10</i> -Gens
TSC10-rv1	CCA ACC RAC RAA ATC DGT DGT RAC	Degenerierter Revers-Primer zur Amplifikation des <i>PcTSC10</i> -Gens

TSC10-up-fw1	GAA CAA ATT TCA AAA TTT AGA TTA GAG	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcLCB1</i>
TSC10-up-rv1	CAA CTT TTT TTA ATT TTG ATT CAG TTC	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcLCB1</i>
TSC10-down-fw1	GTG GAA ACT TGT GCA AAA ATT ATT A	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcTSC10</i>
TSC10-down-rv1	CCT TCA ATT TTT TTA GTA ATT TCA G	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcTSC10</i>
DBö-TSC10-for	AAA TTG AGG GAC AGC CTA G	Vorwärts-Primer zur Sequenzierung des <i>PcTSC10</i> -Gens
DBö-TSC10-rev	TAA TTT CTT TTA ATT CGA CC	Revers-Primer zur Sequenzierung des <i>PcTSC10</i> -Gens
LAC1-deg-fw	TTY GTY GGT TTY TAY GCW ATH TTY TTY ACW TTY TTR MGW GAA TT	Degenerierter Vorwärts-Primer zur Amplifikation des <i>PcLAG1</i> -Gens
LAC1-deg-rv	GGT TGW SWD ATC CAA CAT TTR TAT TGT TGW GT	Degenerierter Revers-Primer zur Amplifikation des <i>PcLAG1</i> -Gens
PcLAC1-us-fw	CCT TCT AAA ATC AAG AGA TTT ATG GAA CAA TC	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcLAG1</i>
PcLAC1-us-rv	CCA ACA ATT GGT GCA AGG GGA C	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcLAG1</i>
DBöPcLAC1-us-rv2	TTA GAC AGA AGC TCA ACA GG	Revers-Primer zur Sequenzierung des <i>PcLAG1</i> -Gens
DBö-PcLAC1intfw	TTC AGC TGG TTA TTT GTC TC	Vorwärts-Primer zur Sequenzierung des <i>PcLAG1</i> -Gens
DBö-PcLAC1intrv	TAA CCC AGA ATC AAG GTC	Revers-Primer zur Sequenzierung des <i>PcLAG1</i> -Gens
PcLAC1-ds-fw	GGG AGA TTT TAA ATT AAA TTT TGC AAC TCA AC	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcLAG1</i>
PcLAC1-ds-rv	CTG TTC TAA ATT CTG TTA AAA CTG ACC	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcLAG1</i>
DBö-PcLAC1dsfw2	AAA TCA GGT TTA ACA ATG GC	Vorwärts-Primer zur Sequenzierung des <i>PcLAG1</i> -Gens
DBö-PcLAC1dsfw3	AGT TGA TAA ATG ACG AAT GG	Vorwärts-Primer zur Sequenzierung des <i>PcLAG1</i> -Gens

		Gens
DBö- PcLAC1dsrv2	GAA CGT ACT CTT GTA TCA CCC	Revers-Primer zur Sequenzierung des <i>PcLAG1</i> -Gens
PcSSN8-deg- fw3	GAA GAA TGT CCW CAA CAT ATH MGW	Degenerierter Vorwärts-Primer zur Amplifikation des <i>PcSSN8</i> - Gens
PcSSN8-deg- rv2	YAA YAA CTG YAA ATC WGT DAT	Degenerierter Revers-Primer zur Amplifikation des <i>PcSSN8</i> -Gens
PcSSN8-ds-fw	GCT GGT CAA TTA TAA ATG ATA GTT ATG	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcSSN8</i>
PcSSN8-ds-rv	GTT ATT GCT ATT ATT ATT ATG ATT ATG ACC	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcSSN8</i>
PcLAG1-ds-fw	GTT GGA TCT TGG TTA TAT TAT CAT TCA TC	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcLAF1</i>
PcLAG1-ds-rv	TGT TCC ATA AAT CTT TGT TTA TCC TTT TGT G	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcLAF1</i>
DBö- PcLAG1dsfw2	TTA AAC CCA AAT AAA CCT GG	Vorwärts-Primer zur Sequenzierung des <i>PcLAF1</i> -Gens
LIP1-deg-fw	GCW GTT GAA TAY TTY AAR TAY	Degenerierter Vorwärts-Primer zur Amplifikation des <i>PcLIP1</i> - Gens
LIP1-deg-rv	YTT ATC ACA WSW WGG WCC WCC	Degenerierter Revers-Primer zur Amplifikation des <i>PcLIP1</i> -Gens
PcLIP1-us/ds- fw	TTA CAA CAT TCC CAA ATT CAA G	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des <i>PcLIP1</i> - Gens
PcLIP1-us/ds-rv	CTT GTG GTG TAC AAT GGA ACC	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des <i>PcLIP1</i> -Gens
ACER-deg-fw	ATY GAT TGG TGT GAA GAA AAY TAY GT	Degenerierter Vorwärts-Primer zur Amplifikation des <i>PcYXC1</i> - Gens
ACER-deg-rv- L2	ACC DGT YAA NAH ATG CCA CCA ACC ATG	Degenerierter Revers-Primer zur Amplifikation des <i>PcYXC1</i> -Gens
YPC1-IPCR-1- fw	GCT GGA TTT GCC ATG TTT TCT GC	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcYXC1</i>
YPC1-IPCR-1- rv	GCT TCT GCA ATA TAT GGA GTC ACA AC	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcYXC1</i>
PcYPC1-IP-3- fw	CAT GGT TGG TGG CAT DTN TTY ACH GG	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs

		von <i>PcYXC1</i>
PcYPC1-IP-3-rv	CCA GAA AGG AAA ATA CCA ATT CCT TTA ATC ATT G	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcYXC1</i>
PcYXC1-ds-fw	GGG GAA ACA AGA TGA TTA TGA ATT G	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcYXC1</i>
PcYXC1-ds-rv	CTA AAC CAG TTA AAA CAT GCC AC	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcYXC1</i>
PcYXC1-ds-fw2	GGA GAG TTC ACG TAG TTT AGG AG	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcYXC1</i>
PcYXC1-ds-rv2	GGA GTA TGA ATA CAT TGA TCC GAT AAT G	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcYXC1</i>
PcYXC1-us-fw	GGA TAA TCA GTT TAC CAT CAA AAG	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcYXC1</i>
PcYXC1-us-rv	TAT TGA TAA ACA ATT GAT ATT AGA TTA G	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcYXC1</i>
D8DES-fw	GAT GCW ACH GAT GAA ATG MAY GCW TAY C	Degenerierter Vorwärts-Primer zur Amplifikation des <i>Pc8DES</i> - Gens
D8DES-rv	TTG RAA TTG YAA ACC ACC RTG NAA RAA ATC YAA CC	Degenerierter Revers-Primer zur Amplifikation des <i>Pc8DES</i> -Gens
D8DES-IPCR- 1-fw	GGT GGG AAG TTC AGA ACT TTA GAA G	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>Pc8DES</i>
D8DES-IPCR- 1-rv	TTG AAT AGG CGG CAC AAA ATT GAT CC	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>Pc8DES</i>
PcD8DIPCR- US-fw	GGG TCC TGT TGA AAA AAG CTA GG	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>Pc8DES</i>
PcD8DIPCR- US-rv	CCA ACT GCT GGT TCA CCA AAA TAG	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>Pc8DES</i>
DBö-PcD8D- us-fw2	TTA AAT GGT ATT TCC TTA GTG C	Vorwärts-Primer zur Sequenzierung des <i>Pc8DES</i> - Gens
DBö-PcD8D- us-rv2	GAT TCA TCT TCC ATT ATC ATC TC	Revers-Primer zur Sequenzierung des <i>Pc8DES</i> -Gens
PcD8D-ds-fw	AAA TAA GAA CAA CAA TGG AAT GTT G	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer

		zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>Pc8DES</i>
PcD8D-ds-rv	CTT TCT GAA GTT CCT AAA TCT G	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>Pc8DES</i>
deg-GCS-fw	GGT CCW AAY CCW AAR GTY AAY AAY TT	Degenerierter Vorwärts-Primer zur Amplifikation des <i>PcGCS1</i> -Gens
deg-GCS-rv	GAT TCD GTD GTW GGT TCN AWY AAD GTW GC	Degenerierter Revers-Primer zur Amplifikation des <i>PcGCS1</i> -Gens
PcGCS-us-fw	GTC TTG GAC TCA AAT GTT TTC G	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcGCS1</i>
PcGCS-us-rv	AAA TTT TGC CAT TTT ATA ACC TTT TGC	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcGCS1</i>
DBö-PcGCS-us-fw2	AAG CTG ACT ACT AAA ATC GC	Vorwärts-Primer zur Sequenzierung des <i>PcGCS1</i> -Gens
PcGCS-ds-fw	GTA AAT ATA TGG TGT TAG CTG C	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcGCS1</i>
PcGCS-ds-rv	GTA CTC TTA ACC AAC GAA CTC	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcGCS1</i>
DBö-PcGCS-ds-fw2	TAC ATA TAG AAA TCA TAC CAT TCT G	Vorwärts-Primer zur Sequenzierung des <i>PcGCS1</i> -Gens
DBö-PcGCS-ds-rv2	ACT TTG TCT TTC ATA CGA TCT C	Revers-Primer zur Sequenzierung des <i>PcGCS1</i> -Gens
PcURA3-fw1	TTY GAA GAT MGW AAA TTY GCW	Degenerierter Vorwärts-Primer zur Amplifikation des <i>PcURA3</i> -Gens
PcURA3-rv1	AAY AAA CCW CKA CCR ACR ATR AT	Degenerierter Revers-Primer zur Amplifikation des <i>PcURA3</i> -Gens
PcURA3-up-fw1	AAT ATG CAG GTG GTG CTT TCA AAA TT	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcURA3</i>
PcURA3-up-rv1	GTG CTT TGA CTG TGT TCC CTA T	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcURA3</i>
PcURA3-down-fw1	GTT GTT TCA ACT GGT AGT GAT ATC AT	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcURA3</i>
PcURA3-down-	GGT ATC AAC GGA TCT ATA TTG TTG A	Inverser-PCR-Revers-Primer zur

rv1		Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcURA3</i>
PcURA3-up-fw2	CTT GTA CGG GAC ACG CTT CTA TG	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcURA3</i>
PcURA3-up-rv2	TCT ATG GGA CGC CTA GTG TCT C	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcURA3</i>
PcLYS2-fw	GTY ATY GAT CCW GCW TAY CCW CC	Degenerierter Vorwärts-Primer zur Amplifikation des <i>PcLYS2</i> -Gens
PcLYS2-rv	CCC AYT TWS WTT GAC CRT AAC C	Degenerierter Revers-Primer zur Amplifikation des <i>PcLYS2</i> -Gens
PcLYS2-intrv	CTG AAT TGA GAA TCA TCT TGG	Revers-Primer zur Sequenzierung des <i>PcLYS2</i> -Gens
PcLYS2-us-fw	CAT CAA AGA TGA ATT AGA TGT TGT TTC	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcLYS2</i>
PcLYS2-us-rv	CAA CAA GTT CAT CCA AGA CAC C	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcLYS2</i>
PcLYS2-us-rv2	CCT TCA ACT TTC GAT ATT ATA G	Revers-Primer zur Sequenzierung des <i>PcLYS2</i> -Gens
PcLYS2-ds-fw	TAA AGA TGG TAT TCC AGA ATC TGA TG	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcLYS2</i>
PcLYS2-ds-rv	AGA TAA TTC AAC GAA ATG TTG AGT ATC	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcLYS2</i>
PcLYS2-ds-fw2	ACC TTT GTA CAT ATG AAA TCT C	Vorwärts-Primer zur Sequenzierung des <i>PcLYS2</i> -Gens
PcACT1-deg-fw	GGW ATG GGW CAA AAR GAT WSW TAY G	Degenerierter Vorwärts-Primer zur Amplifikation des <i>PcACT1</i> -Gens
PcACT1-deg-rv	YAA WSW WGC YAA DAT WSW WCC WCC	Degenerierter Revers-Primer zur Amplifikation des <i>PcACT1</i> -Gens
Eno-1fw	MCW GGT AAY CCW ACH GTY GAA GTY G	Degenerierter Vorwärts-Primer zur Amplifikation des <i>PcENO1</i> -Gens
Eno-1rv	CCA ATC ATC TTC DGC RAA WGG ATC TTC RAT	Degenerierter Revers-Primer zur Amplifikation des <i>PcENO1</i> -Gens
ENO-down-fw	AAA AGC CGT TGC TAA CGT TAA TGA AA	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcENO1</i>

ENO-down-rv	CAA TTG ATC TGA AGA CAC CTT TGT CA	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcENO1</i>
ENO-up-fw	TTT AGT TAA AGA ATA CCC AAT TGT TTC A	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcENO1</i>
ENO-up-rv	GCA TAT AAA TCA GCT AAT TGT TCA CCA	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcENO1</i>
ENO-upstream-fw2	AAT TGG CAT CAC CTG GTG ATG	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcENO1</i>
ENO-upstream-rv	ATG AGG TTA TAA TGG TTG GAT TCC	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcENO1</i>
PDA1-deg-fw-3	TTY TAY GGT GGT AAY GGT ATY GTY GGT	Degenerierter Vorwärts-Primer zur Amplifikation des <i>PcPDA1</i> -Gens
PDA1-deg-rv-3	CAT WSW ATG ACC ACC RTA WCK RTA HGT	Degenerierter Revers-Primer zur Amplifikation des <i>PcPDA1</i> -Gens
PDA1-IP-US1	CAG CAA TAG CTT CTT GAC CAA CAG	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcPDA1</i>
PDA1-IP-US2	GGT GTT TCT TAT GGT AAA GGT GGT TC	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des us-Bereichs von <i>PcPDA1</i>
PDA1-IP-DS1	AGT TAA AGC TGA AGA TCT AGC AGC TG	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcPDA1</i>
PDA1-IP-DS2	GGG CAA TTT CTG GTA ATG GTC CAT TAG	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des ds-Bereichs von <i>PcPDA1</i>
PDA1-IPCR-2-fw	GGT CGT ATC TCT GAT GAT ACT TGG	Inverser-PCR-Vorwärts-Primer zur Amplifikation des <i>PcPDA1</i> -Gens
PDA1-IPCR-2-rv	CCT CTT AAA GTT GGA ACT TCA GAA C	Inverser-PCR-Revers-Primer zur Amplifikation des <i>PcPDA1</i> -Gens
pGAP-BglIII-for	TAT ATA <u>AGA TCT</u> GTG GTA CCT ACA TAC AAT TGA CCC	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>PcTDH1</i> -Promotors in den Vektor pAG25
pGAP-NcoI-rev	TAT ATA <u>CCA TGG</u> TTA ATT AAT TAT TTG TTT GTT <u>TG</u>	Revers-Primer zur Klonierung des <i>PcTDH1</i> -Promotors in den Vektor pAG25
pIS-NdeI-for	TAT ATA <u>CAT ATG</u> CTA ATC ACA ACA GAA CAT TCT CTA ACG	Vorwärts-Primer zur Klonierung des 5S-26SrDNA IS in den Vektor

		pTH-GAP-nat1
pIS-Ndel-rev	TAT ATA <u>CAT ATG</u> GCT AGA TTG ACA GAA GTC GAT CAG	Revers-Primer zur Klonierung des 5S-26SrDNA IS in den Vektor pTH-GAP-nat1
Pmel-rv	CCC ATC CAC TAA <u>GTT TAA ACA</u> CCC ATA CAA AAT CGA GCT TCA AAT C	Revers-Primer zum Einfügen einer <i>Pmel</i> -Schnittstelle in den IS des Vektors pTH-GAP-nat1-IS2
Pmel-fw	TGT <u>TTA AAC</u> TTA GTG GAT GGG AAA CCC TGT AGA ACT GGG ACA AAC	Vorwärts-Primer zum Einfügen einer <i>Pmel</i> -Schnittstelle in den IS des Vektors pTH-GAP-nat1-IS2
DES1-fw	TAG AAG TTC CAG AAA CTA CTT TCC AAA CTT CAA AAT CAA CTT TAT TAT CAA TGG CTA CAA TTA CAC ATA GAA AAA ACC CTT CAC AAC	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>PcDES1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcPDA1</i> -Promotors in den Vektor pTH-GAP-nat1-IS2-Pmel
DES1-rv	TAT <u>ACT GCA GGC</u> ATA TTG TCA ATT CTA TTG TAC TTG AGT ATT AAT GAT TA	Revers-Primer zur Klonierung des <i>PcDES1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcPDA1</i> -Promotors in den Vektor pTH-GAP-nat1-IS2-Pmel
PDA1-fw	TAT <u>ACT GCA GTG</u> TGC TCT AAA TTT GCC CGG TTC GCG ACG	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>PcDES1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcPDA1</i> -Promotors in den Vektor pTH-GAP-nat1-IS2-Pmel
PDA1-rv	TGA TAA TAA AGT TGA TTT TGA AGT TTG GAA AGT AGT TTC TGG AAC TTC TA	Revers-Primer zur Klonierung des <i>PcDES1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcPDA1</i> -Promotors in den Vektor pTH-GAP-nat1-IS2-Pmel
PcL41-Sall-fw	TAT <u>AGT CGA CGA</u> ATT CTC TTA AAT GAT GTT GG	Vorwärts-Primer zur Klonierung des mutierten <i>PcL41</i> -Gens in den Vektor pTH/DB-002a.1
PcL41-internal-rv	GTT TTA GCT TTT TTA TGG AAA ACT tGT TTG GTT TGA CCA CCG TAA CCG G	Revers-Primer zur Klonierung des mutierten <i>PcL41</i> -Gens in den Vektor pTH/DB-002a.1
PcL41-internal-fw	CCG GTT ACG GTG GTC AAA CCA AAC AAG TTT TCC ATA AAA AAG CTA AAA CTA CCA AAA AAG TTG TTT TAC G	Vorwärts-Primer zur Klonierung des mutierten <i>PcL41</i> -Gens in den Vektor pTH/DB-002a.1
PcL41-Sacl-rv	TAT <u>AGA GCT CAA</u> TTC CAA TGT TTT GAT CTG TC	Revers-Primer zur Klonierung des mutierten <i>PcL41</i> -Gens in den Vektor pTH/DB-002a.1
AgLAG1-fw	CAA ACA AAC AAA CAA ATA ATT AAT TAA CAA TGT CGG GCC AAG TCA GGC AG	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>AgLAG1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors in den Vektor pDB007
AgLAG1-rv	CAT TAC CGA TCA CCA GGT AGG	Revers-Primer zur Klonierung des <i>AgLAG1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors in den Vektor pDB007
PGAP-Sbfl	TAT ATA <u>CCT GCA GGT</u> TAC CCA GTG GTA	Vorwärts-Primer zur Klonierung

	CCT ACA TAC	des <i>AgLAG1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors in den Vektor pDB007
PGAP-rv	CAT TGT TAA TTA ATT ATT TGT TTG TTT GTT TG	Revers-Primer zur Klonierung des <i>AgLAG1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors in den Vektor pDB007
AgLAC1-fw	GAA ACT ACT TTC CAA ACT TCA AAA TCA ACT TTA TTA TCA ATG GCT GAA AAT TCG TTA TTG AAG CCA C	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>AgLAC1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcPDA1</i> -Promotors in den Vektor pPC-DES1-AgLAF1
AgLAC1-BsiWI-rv	TAT <u>ACG TAC GGT</u> GTA ATG GCG GTG GAA CAC	Revers-Primer zur Klonierung des <i>AgLAC1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcPDA1</i> -Promotors in den Vektor pPC-DES1-AgLAF1
PPDA-BsiWI-fw-new	TAT <u>ACG TAC GGA</u> CGC ACC GGC CAT TTT CAA AC	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>AgLAC1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcPDA1</i> -Promotors in den Vektor pPC-DES1-AgLAF1
PPDA-rv	CAT TGA TAA TAA AGT TGA TTT TGA AGT TTG GAA AGT AGT TTC	Revers-Primer zur Klonierung des <i>AgLAC1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcPDA1</i> -Promotors in den Vektor pPC-DES1-AgLAF1
mCER-fw	CAA ACA AAC AAA CAA ATA ATT AAT TAA CAA TGC ATG TAC CGG GCA CCA G	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>mCER</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors und des <i>PcENO1</i> -Terminators in den Vektor pDB007
mCER-rv	CGT TAT ATA GGA AAG CAC CGA AGC TAA ATT CAG CAG TTC TTG TCA TTC TC	Revers-Primer zur Klonierung des <i>mCER</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors und des <i>PcENO1</i> -Terminators in den Vektor pDB007
TENO-fw	ATT TAG CTT CGG TGC TTT CCT ATA TAA CG	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>mCER</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors und des <i>PcENO1</i> -Terminators in den Vektor pDB007
TENO-fw-Sbfl	TAT ATA <u>CCT GCA GGT</u> TAT AAC GGT TGG GCA ATG TTG AG	Revers-Primer zur Klonierung des <i>mCER</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcTDH1</i> -Promotors und des <i>PcENO1</i> -Terminators in den Vektor pDB007
opt-nat1-fw	CAA AAT CAA CTT TAT TAT CAA TGG GTA CTA CTT TAG ATG ATA C	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>onat1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcPDA1</i> -Promotors und des <i>TEF</i> -Terminators in den Vektor pPC-DES1-mCER
opt-nat1-rv	TCT TTT TAT TGT CAG TAC TGA TTA TTA TGG ACA TGG CAT TGA C	Revers-Primer zur Klonierung des <i>onat1</i> -Gens unter Kontrolle des

		<i>PcPDA1</i> -Promotors und des <i>TEF</i> -Terminators in den Vektor pPC-DES1-mCER
PPDA-Sall-fw	TAT <u>GTC GAC</u> TGT GCT CTA AAT TTG CCC GGT TC	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>onat1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcPDA1</i> -Promotors und des <i>TEF</i> -Terminators in den Vektor pPC-DES1-mCER
T-TEF-fw	TCA GTA CTG ACA ATA AAA AGA TTC TTG	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>onat1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcPDA1</i> -Promotors und des <i>TEF</i> -Terminators in den Vektor pPC-DES1-mCER
T-TEF-Sacl-rv	<u>TGA GCT CTC</u> GAC ACT GGA TGG CGG CGT TAG	Revers-Primer zur Klonierung des <i>onat1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PcPDA1</i> -Promotors und des <i>TEF</i> -Terminators in den Vektor pPC-DES1-mCER
opt-mCER-Pacl-fw	<u>GGT ACC</u> TTA ATT AAC AAT GCA TG	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>omCER</i> -Gens mit dem <i>PcENO1</i> -Terminator in den Vektor pPC-DES1-mCER-nat1
opt-mCER-rv	AGG AAA GCA CCG AAG CTA AAT TTA ACA ATT TTT ATC ATT TTC	Revers-Primer zur Klonierung des <i>omCER</i> -Gens mit dem <i>PcENO1</i> -Terminator in den Vektor pPC-DES1-mCER-nat1
T-ENO-BsiWI-rv	TAC <u>GTA CGT</u> TAT AAC GGT TGG GCA ATG TTG	Revers-Primer zur Klonierung des <i>omCER</i> -Gens mit dem <i>PcENO1</i> -Terminator in den Vektor pPC-DES1-mCER-nat1
GAPDH-Spel-fw	TAT ATA <u>ACT AGT</u> TTA CCC AGT GGT ACC TAC ATA C	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>PcTDH1</i> -Promotors und des <i>PcENO1</i> -Terminators in den Vektor p-mCER-nat1
GAPDH-CO-rv	CCC GGG ATT TAA ATG GCG CGC CGT TAA TTA ATT ATT TGT TTG TTT GTT TG	Revers-Primer zur Klonierung des <i>PcTDH1</i> -Promotors und des <i>PcENO1</i> -Terminators in den Vektor p-mCER-nat1
ENO-CO-fw	GGC GCG CCA TTT AAA TCC CGG GAT TTA GCT TCG GTG CTT TCC TA	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>PcTDH1</i> -Promotors und des <i>PcENO1</i> -Terminators in den Vektor p-mCER-nat1
ENO-Spel-rv	TAT ATA <u>CCG CGG</u> TTA TAA CGG TTG GGC AAT GTT G	Revers-Primer zur Klonierung des <i>PcTDH1</i> -Promotors und des <i>PcENO1</i> -Terminators in den Vektor p-mCER-nat1
PcLAF1-Hpal-fw	TAT ATA <u>GTT AAC</u> ATG ATT TCA ACT TCA ACA AAT TC	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>PcLAF1</i> -Gens in den Vektor p-mCER-nat1-X-B

PcLAF1-Xmal- rv	TAT ATA <u>CCC GGG</u> CTA ATC ATC ATC TTC ATC ATC	Revers-Primer zur Klonierung des <i>PcLAF1</i> -Gens in den Vektor p- mCER-nat1-X-B
PcLAG1- EcoRV-fw	TAT ATA <u>GAT ATC</u> ATG TCC ACT TCC AGA CCA CAG	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>PcLAG1</i> -Gens in den Vektor p-mCER-nat1-X-B
PcLAG1-Xmal- rv	TAT ATA <u>CCC GGG</u> TTA TTC ACT CTT TTT TTC TTG	Revers-Primer zur Klonierung des <i>PcLAG1</i> -Gens in den Vektor p- mCER-nat1-X-B
PcURA3-Sall- fw	TAT <u>GTC GAC</u> TTT GAT TGA TTT GAT ATA GAT TTG	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>PcURA3</i> -Gens in den Vektor pTH-GAP-nat1-IS2-Pmel
PcURA3-rv	TGC TGG AGG GGT TCT TAA GTA TAT AG	Revers-Primer zur Klonierung des <i>PcURA3</i> -Gens in den Vektor pTH- GAP-nat1-IS2-Pmel
PcL41-up	GCG TTC TAA CGA CAA TAT GTC C	Primer zum Nachweis der korrekten Integration im IS
26S rDNA- down	GTT TGT GTT TAT CAC AAC ACT TCT AAG	Primer zum Nachweis der korrekten Integration im IS
PcLYS2-compl- fw	AAT TAT TCT TAT CTT TAA CAT CAT TAC CAC TTA ACC	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>PcLYS2</i> -Gens in den Vektor pTH-GAP-nat1-IS2-Pmel
PcLYS2-compl- rv	AGA TTT CAT ATG TAC AAA GGT TAA TAC ACA TAT AAT ATA TTC	Revers-Primer zur Klonierung des <i>PcLYS2</i> -Gens in den Vektor pTH- GAP-nat1-IS2-Pmel
PcDES1-Stul- fw	TAT <u>AAG GCC</u> TAT GGC TAC AAT TAC ACA TAG AA	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>PcDES1</i> -Gens in den Vektor p426HXT7-6His
PcDES1-Spel- rv	TAT <u>AAC TAG</u> TTT ATT TCT TTG CAG TTT CTC TTT TAA C	Revers-Primer zur Klonierung des <i>PcDES1</i> -Gens in den Vektor p426HXT7-6His
YIDES1- BamHI-fw	TAT <u>AGG ATC</u> CAT GAG CAC CGA GAC ACA AAA CGA GGT G	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>YIDES1</i> -Gens in den Vektor p426HXT7-6His
YIDES1- BamHI-rv	ATA <u>TGG ATC</u> CCT AGG TTC GTG CTG CCA ACC GC	Revers-Primer zur Klonierung des <i>YIDES1</i> -Gens in den Vektor p426HXT7-6His
ScLYS5-Sall-fw	TAT <u>GTC GAC</u> TCC TTA TTC ACC TTA CAA CTT CTC TG	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>ScLYS5</i> -Gens in den Vektor pTH-GAP-nat1-IS2-Pmel
ScLYS5-SacI-rv	<u>GGA GCT</u> CAG TTC AAA CAG TAA TAA GAG TCT ATC	Revers-Primer zur Klonierung des <i>ScLYS5</i> -Gens in den Vektor pTH- GAP-nat1-IS2-Pmel
deltasyr2-fw	TAT ATA <u>GAC GTC</u> GAT CAA CCA AAC AAC TTT GGC G	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>PcSYR2</i> -Gens in den Vektor p-mCER-nat1

PcSYR2-down- rv	GAT ATA ATT TTC CAT TTC GAT AAA AGC TCA AG	Revers-Primer zur Klonierung des <i>PcSYR2</i> -Gens in den Vektor p- mCER-nat1
Pgap-PcYXC1- fw	CAA ACA AAC AAA CAA ATA ATT AAT TAA CAA TGT CAT ATC ATT TAC CAT TTG CTA AAC C	Vorwärts-Primer zur Klonierung des <i>PcYXC1</i> -Gens in den Vektor p-mCER-nat1-oCvLAG1
P-Gap- PcYXC1-rv	TAT ATA <u>CAG CTG</u> TCG TTA AGA TCT AAA GAG ACA AAA GAT C	Revers-Primer zur Klonierung des <i>PcYXC1</i> -Gens in den Vektor p- mCER-nat1-oCvLAG1
PcACT1-deg-fw	GGW ATG GGW CAA AAR GAT WSW TAY G	Vorwärts-RT-Primer zur Amplifikation des <i>PcACT1</i> -Gens
PcACT1-deg-rv	YAA WSW WGC YAA DAT WSW WCC WCC	Revers-RT-Primer zur Amplifikation des <i>PcACT1</i> -Gens
PcGAPDH-RT- fw	GATCCATTCATTGCACCAGAATATG	Vorwärts-RT-Primer zur Amplifikation des <i>PcTDH1</i> -Gens
PcGAPDH-RT- rv	CAT CAA TAA CAA TGT TTT CAC CTT CAT G	Revers-RT-Primer zur Amplifikation des <i>PcTDH1</i> -Gens
PcDES1-RT-rv	CAT TTT GAT TTG CAG TAG CAC CAA TTA TAT AAC TTA AC	Revers-RT-Primer zur Amplifikation des <i>PcDES1</i> -Gens
PcLCB1-RT-fw	TTT TTC GAA GTT GGT GGT GCT G	Vorwärts-RT-Primer zur Amplifikation des <i>PcLCB1</i> -Gens
LCB1-RT-rv	GCA ACA TTT GAT GAA GCA TCA GC	Revers-RT-Primer zur Amplifikation des <i>PcLCB1</i> -Gens
LCB2-RT-fw	GGG TAC AAT GGC AAA TTT ACC TG	Vorwärts-RT-Primer zur Amplifikation des <i>PcLCB2</i> -Gens
LCB2-RT-rv	CAA ACA CCA CGA CCT GAT GG	Revers-RT-Primer zur Amplifikation des <i>PcLCB2</i> -Gens
TSC10-RT-fw2	GCA AAA TTA GAT CAA TCA CCT GAT ATT G	Vorwärts-RT-Primer zur Amplifikation des <i>PcTSC10</i> -Gens
TSC10-RT-rv2	CTT GGA TCT GTT GAT TTT TCT AGT GAC	Revers-RT-Primer zur Amplifikation des <i>PcTSC10</i> -Gens
SUR2-RT-fw	CTT AGG TAC CGG TAT TGC TGC	Vorwärts-RT-Primer zur Amplifikation des <i>PcSYR2</i> -Gens
SUR2-RT-rv	TTG GGA ACA AAA TTT GGA AAG GAT C	Revers-RT-Primer zur Amplifikation des <i>PcSYR2</i> -Gens
PcURA3-RT-fw	GGT CCA TAT ATC TGT CTT GTC AAA AC	Vorwärts-RT-Primer zur Amplifikation des <i>PcURA3</i> -Gens
PcURA3-RT-rv	CCC TAT ATC AGC AAA TTT ACG ATC TTC	Revers-RT-Primer zur Amplifikation des <i>PcURA3</i> -Gens
PcLYS2-RT-fw	ACT TGG AAG GTG AAG ATG TCT TAG	Vorwärts-RT-Primer zur Amplifikation des <i>PcLYS2</i> -Gens

PcLYS2-RT-rv	CTA AAG AGA AAT GTC TAC CCA AGA C	Revers-RT-Primer zur Amplifikation des <i>PcLYS2</i> -Gens
--------------	-----------------------------------	---

2.4 Chemikalien

Tabelle 7: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Deoxy-D-Galaktose	Fa. Sigma
2-Mercaptoethanol 98% (v/v)	Fa. Sigma
2-Propanol	Fa. Sigma
5-Fluorooritinsäure (5FOA)	Fa. Serva
Aceton	Fa. Sigma
Acetonitril für HPLC	Fa. Sigma
Agar-Agar, hochrein	Fa. Merck
Agarose	Fa. Sigma
Ammoniumacetat	Fa. Merck
Ammoniumchlorid	Fa. Merck
Ammoniumperoxydisulfat	Fa. Merck
Ammoniumsulfat	Fa. Merck
Ampicillin Natriumsalz	Fa. Sigma
Bromphenolblau	Fa. Sigma
Calciumchlorid-Dihydrat	Fa. Merck
Calcium-D(+)-Pantothenat	Fa. Roth
Calciumsuccinat-Monohydrat	Fa. Merck
Casein Hydrolysat	Fa. ICN
Casiton	Fa. Merck
CHAPS	Fa. Sigma
Chloroform	Fa. Sigma
CTAB	Fa. Sigma
Cycloheximid	Fa. Serva
D(+)-Biotin	Fa. Roth

DEPC-behandeltes Wasser	Fa. Sigma
D-Galaktose	Fa. Sigma
D-Glukose-Monohydrat	Fa. Sigma
Dihyronicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH)	Fa. Sigma
Dihydrosphingosin	Fa. Avanti Polar Lipids, Fa. Matreya
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Fa. Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Fa. Merck
Dithiothreitol (DTT)	Fa. Promega
DL-2-Aminoadipat	Fa. Merck
DL-Methionin	Fa. Merck
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fa. Roth
D-Sorbitol	Fa. Sigma
Eisensulfat-Heptahydrat	Fa. Merck
Essigsäure (Eisessig) 100% (v/v)	Fa. Sigma
Essigsäureanhydrid	Fa. Sigma
Ethanol 96% (v/v)	Fa. Sigma
Ethanol vergällt	Fa. Sigma
Ethidiumbromid Adsorber	Fa. Sigma
Ethidiumbromidlösung 1% (v/v)	Fa. Sigma
Geneticin G418	Fa. Acros Organics
Glycerin 99% (v/v)	Fa. Sigma
Glycerin etwa 87% (v/v)	Fa. Sigma
Glycin	Fa. Sigma
Hefeextrakt	Fa. Merck
HEPES	Fa. Roth
Hygromycin B	Fa. Sigma
Immersionsöl für Mikroskopie	Fa. Sigma
Kaliumacetat	Fa. Merck
Kaliumchlorid	Fa. Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Fa. Merck

Kaliumhydrogenphthalat	Fa. Merck
Kaliumhydroxid-Plätzchen	Fa. Merck
Kanamycindisulfat	Fa. Merck
Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat	Fa. Merck
Kupfersulfat-Pentahydrat	Fa. Merck
LB-Agar nach Miller	Fa. Merck
LB-Bouillon nach Miller	Fa. Merck
L-Histidin	Fa. Merck
Lithiumacetat 99,99%	Fa. Merck
Lithiumchlorid, wasserfrei	Fa. Sigma
L-Leucin	Fa. Merck
L-Lysin	Fa. Merck
L-Prolin	Fa. Merck
L-Tryptophan	Fa. Merck
Lysozym	Fa. Fluka
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Fa. Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Fa. Merck
Malzextract	Fa. Applichem
Methanol für HPLC	Fa. Sigma
<i>myo</i> -Inosit	Fa. Merck
Natriumacetat-Trihydrat	Fa. Merck
Natriumchlorid	Fa. Merck
Natriumcitrat-Dihydrat	Fa. Merck
Natriumdihydrogphosphat-Dihydrat	Fa. Merck
Natriumhydroxid-Plätzchen	Fa. Merck
Natriummolybdat-Dihydrat	Fa. Merck
Natriumnitrat	Fa. Merck
Natriumsulfid-Hydrat	Fa. Merck
Natronlauge 1N	Fa. Sigma
N-Dodecane	Fa. Sigma
Nicotinamide 98+%	Fa. Sigma

Nourseothricin (clonNAT)	Fa. WERNER BioAgents
<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd Reagenz (unvollständig)	Fa. Sigma
Pepton aus Fleisch	Fa. Merck
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Fa. Sigma
Phytosphingosin	Fa. Avanti Polar Lipids, Fa. Matreya
Polyethylenglycol (PEG) 3350	Fa. Sigma
Polyethylenglycol (PEG) 4000	Fa. Sigma
Raffinose-Pentahydrat	Fa. Sigma
Restriktionsendonukleasen	Fa. New England Biolabs, Fa. Fermentas
Salzsäure 1N	Fa. Sigma
Schwefelsäure 95-97% (w/v)	Fa. Sigma
SDS	Fa. Serva
SDS 10% (w/v)	Fa. Sigma
Streptomycinsulfat	Fa. Merck
Sucrose	Fa. Sigma
TAE 50x	Fa. Promega
Tergitol	Fa. Sigma
Tetrabutylammonium-Phosphat	Fa. Merck
Tetracyclin 98%	Fa. Sigma
Titriplex III (EDTA)	Fa. Merck
Trifluoroessigsäure	Fa. Sigma
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Fa. Merck
TRIS HCl	Fa. Merck
TRIS LAB	Fa. Merck
Triton X-100	Fa. Sigma
Trypton aus Casein	Fa. Difco
TWEEN 20	Fa. Merck
TWEEN 80	Fa. Merck
Uracil	Fa. Sigma
Ureidobornsteinsäure	Fa. Sigma

Vitamin B12	Fa. Roth
X-Gal	Fa. Roth
Yeast Nitrogen Base ohne AS	Fa. Difco
Yeast Nitrogen Base ohne AS und ohne $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	Fa. Difco
Zinksulfat Heptahydrat	Fa. Merck
Zitronensäure	Fa. Sigma

2.5 Geräte

Tabelle 8: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschränke kelvitron t	Fa. Heraeus
Darkroom–CN-3000	Fa. Vilber Lourmat
DNA Engine Opticon System	Fa. MJ Research
Fuge/Vortex Combi-Spin FVL-2400	Fa. peqlab
Gene Pulser Xcell Electroporation System	Fa. Bio-Rad
HPLC (LC-Net II/ADC, FP-2020 Plus Intelligent Fluorescence Detector, MD-2010 Plus Multiwavelength Detector, PU-2080 Plus Intelligent HPLC Pump, LG-2080-02 Ternary Gradient Unit, DG-2080-53 3-Line-Degaser, AS-2055 Plus Intelligent Sampler, Column Thermostat Jetstream Plus)	Fa. Jasco
HPLC-PC	Fa. benq
Hybridisierungsöfen HB-1000	Fa. peqlab
Kühl-/Gefrierkombination	Fa. Liebherr
Laborschüttler Certomat R, Inkubator Certomat HT	Fa. B. Braun Biotech International
Laborwaage TE 1502S	Fa. Sartorius
Magnetrührer MR 3001	Fa. Heidolph
Mikrowelle R-33SSTD	Fa. Sharp
Mini-PROTEAN 3 Cell	Fa. Bio-Rad
MINI-Schüttler MS2	Fa. IKA Werke
Orbital multi-3D Shaker	Fa. peqlab

PCR-/ Workstation-PC	Fa. Hewlett Packard
PerfectBlue Horizontal Mini Electrophoresis System	Fa. peqlab
pH-Meter SevenEasy	Fa. Mettler Toledo
Photodokumentationssystem und Peripherie (S/W-CCTV-Monitor, Thermodrucker P93)	Fa. peqlab (Fa. Santec, Fa. Mitsubishi)
Pipetten	Fa. Eppendorf
PowerPac Basic Power Supply	Fa. Bio-Rad
Precellys 24	Fa. peqlab
Primus 96 advanced Gradient PCR-Cycler	Fa. peqlab
SmartSpec Plus Spectrophotometer	Fa. Bio-Rad
Sterilbank HLB 2472 GS	Fa. Heraeus
Thermo-Inkubationsmischer	Fa. peqlab
Vakuumkonzentrator (Kühlfalle CT-02-50, Zentrifuge RVC 2-25, Pumpe)	Fa. Christ
Vortex Genie 2	Fa. Scientific Industries
Wasserbad HAAKE P21 mit Thermostat HAAKE DC10	Fa. Thermo Electron
Workstation-PC	Fa. Fujitsu Siemens
Zentrifuge 5415 D	Fa. Eppendorf
Zentrifuge 5415 R	Fa. Eppendorf
Zentrifuge Sigma 4K15	Fa. Sigma

2.6 Enzyme

Die Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs und Fermentas bezogen.

2.7 Transformation

2.7.1 Transformation von *E. coli*

Der Stamm TOP10 wurde gemäß des "One Shot[®] TOP10 Competent Cells"-Protokolls der Fa. Invitrogen zur Transformation chemisch kompetenter Zellen transformiert.

Der Stamm XL1Blue wurde gemäß des "XL1-Blue Competent Cells"-Protokolls der Fa. Stratagene transformiert.

Der Stamm DH5 α wurde gemäß Hanahan (1985) transformiert.

Der Stamm NEB5-alpha wurde gemäß des "High Efficiency Transformation Protocols for NEB 5-alpha competent *E. coli*" der Fa. New England Biolabs transformiert.

2.7.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach Gietz und Woods (2002).

2.7.3 Transformation von *P. ciferrii*

Die verschiedenen *P. ciferrii*-Stämme wurden mittels der durch Bae *et al.* 2003 entwickelten Methode transformiert.

2.8 Präparation von DNA

2.8.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte über das "QIAprep Spin Miniprep Kit" bzw. über das "HiSpeed Plasmid Midi Kit" der Fa. Qiagen.

2.8.2 Isolation chromosomaler DNA aus *P. ciferrii*

Die DNA wurde durch eine abgewandelte Cethyltrimethylammoniumbromid- (CTAB) Methode (Murray und Thompson, 1980) isoliert. Hierzu wurden 1 g gefrorener Zellen mit flüssigem Stickstoff und Mörser und Pistill zu einem feinen Puder zerrieben. 8 ml heißen (65°C) CTAB-Puffers (2% (w/v) CTAB, 100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl) wurden zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe eines Volumens Chloroform und anschließendem Homogenisieren für 10 s wurde der Ansatz für 5 min bei 16.000 g zentrifugiert. Der DNA-haltige Über-

stand wurde entfernt und die DNA mit einem Volumen Isopropanol gefällt. Nach der folgenden Zentrifugation für 10 min bei 16.000 g und 4°C wurde das Sediment in 1 ml TE-Puffer aufgenommen und mit 2 µl RNase [2 mg/ml] der Fa. Invitrogen für 1 h bei 37°C inkubiert. Die anschließende Extraktion erfolgte mit einem Volumen Chloroform. Der Ansatz wurde 10 s homogenisiert und für 3 min bei 16.000 g zentrifugiert. Die DNA-haltige Oberphase wurde abgenommen und die DNA dann mit einem Volumen Isopropanol gefällt. Das Sediment wurde nach 3 min Zentrifugation bei 16.000 g und 4°C mit 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl EB-Puffer resuspendiert.

2.9 Enzymatische Modifikation von DNA

2.9.1 DNA-Restriktion

Die Sequenz-spezifische Spaltung der DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers der Restriktionsendonukleasen. Die Kontrolle der Restriktion erfolgte in allen Fällen mittels einer Agarose-Gelelektrophorese.

2.9.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Verwendung der Antarktischen Phosphatase bzw. der Alkalischen Phosphatase (CIP) der Fa. New England Biolabs, oder der Alkalischen Phosphatase (SAP) der Fa. Roche nach der entsprechenden Herstellerangabe.

2.9.3 Klenow-*fill-in* bei DNA-Fragmenten

Das Erzeugen stumpfer Enden nach der Restriktion von DNA wurde mit Hilfe der "DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment" der Fa. New England Biolabs nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.9.4 Ligation

Das Verknüpfen zweier DNA-Fragmente erfolgte durch die T4 DNA Ligase der Fa. New England Biolabs nach den Angaben des Herstellers.

2.10 Amplifikation von DNA mittels PCR

Zur Amplifikation von DNA mittels PCR wurden die Herkulase der Fa. Stratagene, die *Taq*-Polymerase und die ProofStart DNA-Polymerase der Fa. Qiagen, das Expand™ High Fidelity PCR System der Fa. Roche, sowie die Phusion DNA-Polymerase der Fa. Finnzymes verwendet. Das Erstellen der Ansätze erfolgte jeweils nach den entsprechenden Hersteller-Angaben.

2.11 DNA-Aufreinigung

Die DNA wurde mit dem "MinElute PCR Purification Kit" (< 4 kbp), dem "QIAquick PCR Purification Kit" (4-10 kbp) bzw. dem "QIAEX II Gel Extraction Kit" (> 10 kbp) der Fa. Qiagen nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.12 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden in 1,5%-igen (w/v) Agarosegelen aufgetrennt. Als Gel- und Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) (Maniatis *et al.*, 1982). Als Größenstandards dienten der 1 kbp-Marker der Fa. New England Biolabs, der 500 bp-Marker der Fa. Roche, sowie der 100 bp-Marker der Firma Invitrogen. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit $\frac{1}{10}$ Volumen Ladepuffer (0,2% (w/v) Bromphenolblau, 25% (v/v) Glycerin) versetzt. Die Nukleinsäuren wurden nach Anfärben in einem Ethidiumbromid-Färbegrad durch Fluoreszenz unter UV-Licht sichtbar gemacht und die Auftrennung dokumentiert.

2.13 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels des "MinElute Gel Extraction Kit" (< 4 kbp), des "QIAquick Gel Extraction Kit" (4-10 kbp) bzw. des "QIAEX II Gel Extraction Kit" (> 10 kbp) der Fa. Qiagen nach den Herstellerangaben aufgereinigt.

2.14 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA, sowie von amplifizierten DNA-Fragmenten erfolgte durch die Fa. Sequiserve.

2.15 Isolation von RNA aus *S. cerevisiae* und *P. ciferrii*

Zur Isolation von RNA aus *S. cerevisiae* und *P. ciferrii* wurde das RNeasy Mini Kit der Fa. Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte anhand des modifizierten Protokolls III "Mechanical Disruption Protocol" aus dem dazugehörigen Handbuch.

Für die RNA-Isolation wurden $2 \cdot 10^7$ Zellen aus einer exponentiell wachsenden Kultur eingesetzt. Der Zellaufschluss (Schritt 4 im Handbuch) erfolgte im Precellys 24 bei 5.000 rpm für 2 x 60 s mit 15 s Pause.

Nach Schritt 7 wurde das "RNase-Free DNase Set" der Fa. Qiagen für ein erstes zusätzliches Entfernen von DNA angewandt.

Nach der Elution in 30 µl H₂O wurde die DNA-Konzentration in der RNA-Präparation mit Hilfe der Desoxyribonuklease I der Fa. Sigma ein zweites Mal gesenkt. Die Anwendung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben.

Diese zweifache DNase-Behandlung diente der weitestgehenden Entfernung von DNA aus den RNA-Präparationen, um sicherzugehen, dass in der später folgenden qRT-PCR von RNA ausgehende cDNA und nicht genomische DNA als Template zur Amplifikation des gewünschten Bereichs diente.

2.16 cDNA-Synthese

Das Umschreiben der RNA in cDNA für die anschließende qRT-PCR wurde durch Anwendung des "SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR" bzw. des "SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix" der Fa. Invitrogen durchgeführt. Eingesetzt wurden jeweils 300 ng der DNase-behandelten RNA-Präparation. Die weitere Anwendung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

Als Kontrolle wurde pro Probe zusätzlich ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase angesetzt. Diese -RT-Kontrolle diente der Absicherung, dass die während der qRT-PCR amplifizierten Fragmente von cDNA und nicht von genomischer oder Plasmid-DNA abstammen.

2.17 Quantitative *real time* PCR (qRT-PCR) zur Quantifizierung von Transkriptmengen

Zur Quantifizierung von Transkriptmengen mittels qRT-PCR wurde das "QuantiTect SYBR Green PCR-Kit" der Fa. Qiagen verwendet.

Das Protokoll: "Using ABI Sequence Detection Systems and Other Real-Time Thermal Cyclers" diente als Grundlage für die Durchführung der Experimente am "DNA Engine Opticon System" der Fa. MJ Research.

Es wurden jeweils 2 µl der cDNA-Ansätze als Template verwendet. Zusätzlich diente ein Ansatz mit Wasser anstatt Template als "*Non-Template Control*" (NTC).

Zur Sicherstellung, dass es sich bei den amplifizierten Fragmenten um einheitliche Amplifikate und nicht um Oligonukleotid-Dimere handelte, wurde an das Ende der qRT-PCR eine Schmelzpunktbestimmung im Bereich von 65°C - 95°C angehängt.

Als Haushalts-Gene wurden jeweils Teile des *ACT1*- (kodierend für Actin) und des *TDH1*-Gens (kodierend für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) amplifiziert und in die Berechnung mittels des $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode (Livak und Schmittgen, 2001) einbezogen.

2.18 Analytik zur Quantifizierung von Sphingoidbasen

Insgesamt dienten drei Methoden zur Quantifizierung der Sphingolipid-Konzentration. Zwei Methoden basierten auf einer Auftrennung mittels RP-HPLC. Die hierbei sensitivere Methode umfasste eine Vorsäulenderivatsierung mit *ortho*-Phthaldialdehyd, welches an primäre Amine bindet und stark fluoreszierende Isoindole bildet (Chen *et al.*, 1979). Die unterschiedliche Hydrophobizität der Sphingoidbasen-Derivate ermöglichte deren Auftrennung durch eine Basen-deaktivierte Kieselgelsäule (Jones und Gilligan, 1983). Mittels dieser Methode wurden freie, sowie in Dihydroceramid, Phytoceramid und Ceramid gebundene Sphingoidbasen quantifiziert. Unterscheiden ließ sich zwischen diesen jedoch nicht, da die Probenaufbereitung zur Freisetzung der gebundenen Sphingoidbasen führte. Im Zuge dieser Arbeit stellte sich jedoch heraus, dass diese Methode, bedingt durch die Probenaufbereitung, zu einem erheblichen Konzentrations-Verlust freier Sphingoidbasen führte. Daher wurde eine zweite, wesentlich weniger sensitive, RP-HPLC-basierte Methode entwickelt, die auf einer UV-

Messung bei 200 nm basiert und eine "schonende" Probenvorbereitung beinhaltet. Hierdurch wurden die Konzentrationen der acetylierten Sphingoidbasen bestimmt.

Bei der dritten Methode erfolgte die Messung mittels der "*electrospray ionization tandem mass-spectrometry*" (ESI-MS/MS). Diese diente der Analyse der komplexen Sphingolipide, insbesondere bezüglich der Länge der Fettsäureseitenkette, der Art der Sphingoidbase und der Glykosylierung.

In allen Fällen wurde die Analytik von einer vier Tage alten, in TAPS-Medium gewachsenen, stationären Kultur durchgeführt, welche zuvor von einer drei Tage in Vollmedium (YPD) gewachsenen Vorkultur 1:100 angeimpft wurde.

2.18.1 HPLC-basierte Quantifizierung von Sphingoidbasen mit OPA-Derivatisierung und Fluoreszenz-Detektion

Zur Probenaufbereitung wurden zunächst 5 ml der vier Tage gewachsenen Kultur sedimentiert. Das Sediment wurde in 250 µl MeOH:H₂O (82:18) resuspendiert und die Suspension in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1,2 ml HCl [1 M] wurde der Ansatz homogenisiert und über Nacht bei 80°C im Wasserbad inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden 500 µl der homogenisierten Suspension in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und mit 1 ml Chloroform : MeOH (2:1) versetzt. Die Extraktion erfolgte in einer Kugelmühle für 30 min. Zur Phasentrennung wurde der Ansatz anschließend für 5 min bei 16.000 g zentrifugiert und 500 µl der unteren Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Flüssigkeit wurde bei 60°C mittels eines Vakuum-Konzentrators verdampft und das Sediment in 250 µl Isopropanol aufgenommen. Das Resuspendieren erfolgte für 10 min bei 40°C in einem Ultraschall-Bad. Nach Zugabe von 250 µl H₂O war die Probe bereit für die Quantifizierung.

Die Ansätze wurden mittels einer HPLC der Fa. Jasco inklusive eines Multiwellenlängen-Detektors und einer Kromasil 100 C18 (250 x 4.6 mm, Partikelgröße 5 µm)-Säule analysiert. Die mobile Phase bestand aus MeOH : H₂O (92:8) (w/v) bei einem Durchfluss von 2 ml/min. Gemessen wurde bei einer Säulentemperatur von 40°C. Es wurden jeweils 10 µl der Probe mit 10 µl des OPA-Reagenz für 2 min gemischt und anschließend auf die Säule aufgegeben. Die Analyte wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm angeregt und bei einer Wellenlänge von 455 nm detektiert.

Die finalen Konzentrationsangaben der einzelnen Sphingoidbasen in mg/L beziehen sich bei dieser Messmethode aufgrund der Probenvorbereitung jeweils nur auf die abgetrennte Zellmasse.

2.18.2 RP-HPLC mittels UV-Messung

(Patentanmeldung: WO 2006/048458)

Die Aufbereitung, sowie die Quantifizierung mittels RP-HPLC bei 200 nm erfolgte gemäß dem Beispiel #6 des genannten Patents.

Die finalen Konzentrationsangaben der einzelnen acetylierten Sphingoidbasen in mg/L beziehen sich bei dieser Messmethode aufgrund der Probenvorbereitung jeweils auf die gesamte Kulturbrühe.

2.18.3 ESI-MS/MS-basierte Quantifizierung von komplexen Sphingolipiden

(Patentanmeldung: WO 2006/048458)

Die Analytik mittels ESI-MS/MS erfolgte wie in den Beispielen #13 und #14 der angegebenen Patentanmeldung beschrieben.

3 ERGEBNISSE

3.1 Erstellung eines Inventars von Sphingolipid-Biosynthese-Genen in *P. ciferrii*

3.1.1 Vorgehensweise zur Isolation unbekannter Gene aus *P. ciferrii*

Zur Isolation der für Sphingolipid-Biosynthese-Enzyme kodierenden Gene aus *P. ciferrii* wurden Sequenzvergleiche von homologen Proteinen aus nahe verwandten Hefen auf Aminosäureebene durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die Aminosäure-Abfolge der entsprechenden Proteine aus Hefen mittels einer TBLASTN-Suche mit einer bereits beschriebenen Sequenz des gesuchten Proteins als Matrize aus NCBI's Datenbank für vollständige und unvollständige eukaryontische Genome (www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi) extrahiert. Im Idealfall war das als Matrize verwendete Protein zuvor biochemisch charakterisiert worden. Die extrahierten Sequenzen wurden durch Verwendung des ClustalW-Programms (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) in einem "Multiple sequence alignment" (MSA) abgeglichen und auf das Vorliegen konservierter Bereiche untersucht.

Bereiche, die über die Art- bzw. Gattungsgrenzen hinaus die gleiche Aminosäure-Abfolge aufwiesen, wurden verwendet, um zunächst einen internen Bereich des entsprechenden Gens aus *P. ciferrii* zu isolieren. Hierzu wurden passende degenerierte Oligonukleotide durch Zurück-Übersetzen der AS-Abfolge in eine DNA-Sequenz unter Berücksichtigung der stark eingeschränkten Codon-Verwendung von *P. ciferrii* abgeleitet. Die DNA-Sequenz des aufgereinigten Amplifikats wurde durch die Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977) bestimmt. Die Sequenzierung des Amplifikats wurde durch die Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Deutschland) durchgeführt. Durch Übersetzen der erhaltenen DNA- in eine Protein-Sequenz mittels der Clone Manager 7-Software (Scientific & Educational Software) und anschließendem Abgleich der erhaltenen AS-Abfolge über NCBI's nicht redundante Protein-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) wurde sichergestellt, dass es sich um das gewünschte Amplifikat hielt.

Zur Vergrößerung bzw. Vervollständigung der Gensequenz inklusive Promotor und 3'-nicht-translatierter Region wurden nach außen gerichtete Primer abgeleitet und in einer inversen PCR (Compton, 1990) eingesetzt. Als Template wurde chromosomale DNA aus dem WT von *P. ciferrii* verwendet, die zuvor mit einer Restriktionsendo-

nuklease geschnitten und mittels einer DNA-Ligase religiert wurde. Erhaltene Amplifikate wurden, wie zuvor beschrieben, sequenziert und wiederum in eine Protein-Sequenz übersetzt und mittels der nicht-redundanten Protein-Datenbank von NCBI abgeglichen, um sicherzustellen, dass es sich um das gewünschte Amplifikat handelt. Anschließend wurde die neu erhaltene Sequenz-Information mit der durch degenerative Primer erhaltenen Information zu einem erweiterten bekannten Bereich verknüpft.

Dies wurde wiederholt bis der vollständige offene Leserahmen des gewünschten Gens inklusive jeweils ca. 1 kbp stromauf- und stromabwärts vorlagen.

3.1.2 Lcb1p (Untereinheit 1 der Serin-Palmitoyltransferase)

Zur Identifizierung konservierter Bereiche unter Verwendung des ClustalW-Programms wurden zunächst die Lcb1p-Sequenzen folgender Organismen verwendet: *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Gibberella zeae*, *Magnaporthe grisea*, *Saccharomyces castellii* sowie *S. cerevisiae*.

Durch die oben beschriebene Vorgehensweise konnten insgesamt 4235 bp Sequenzinformation erhalten werden. Diese beinhaltet 1713 bp des *LCB1*-ORFs von *P. ciferrii*. Das daraus resultierende Lcb1-Protein mit einem errechneten *pI* von 7,58 besitzt eine Länge von 570 AS (Abb. 42 im Anhang) und weist eine 46%-ige (64%-ige) und 42%-ige (59%-ige) positionelle Aminosäure-Identität (Ähnlichkeit) zu Lcb1p von *Debaromyces hansenii* (Genbank-Eintrag # XP_459426) bzw. zu Lcb1p von *S. cerevisiae* (Genbank-Eintrag # NP_014025) auf. *LCB1* von *S. cerevisiae* wurde kloniert und charakterisiert als notwendig für die Biosynthese von Sphingolipiden (Buede *et al.*, 1991). Zudem wurde ein Anstieg der Serin-Palmitoyltransferase-Aktivität durch Überexpression von *LCB1* in *S. cerevisiae* gezeigt (Pinto *et al.*, 1992). Zusätzlich stellten Gable *et al.* (2002) heraus, dass es sich bei der Serin-Palmitoyltransferase von *S. cerevisiae* um ein Heterodimer aus Lcb1p und Lcb2p handelt. Dies deutet daraufhin, dass es sich bei dem aus *P. ciferrii* isolierten Gen tatsächlich um *LCB1* handelt.

3.1.3 Tsc3p (akzessorisches Protein der Serin-Palmitoyltransferase)

Die Extraktion potentieller Tsc3p durch eine TBLASTN-Suche mittels des beschriebenen *Tsc3p* aus *S. cerevisiae*, führte lediglich zur Extraktion zweier homologer Proteine aus *Kluyveromyces lactis* und *Ashbya gossypii*.

Die anschließenden Versuche zur Isolation von *TSC3* aus *P. ciferrii* über die Amplifikation eines internen Fragments mittels degenerierter Primer führten ausschließlich zur Vervielfältigung nicht-homologer Abschnitte.

In *Candida albicans* und *Candida tropicalis* findet sich eine konservierte Anordnung potentieller *TSC3*-Gene, deren Genprodukte allerdings nur eine äußerst geringe Ähnlichkeit zum beschriebenen Tsc3p von *S. cerevisiae* aufweisen. Hier liegt jeweils stromabwärts des potentiellen *TSC3*-Gens das *RDH54*-Gen. Jedoch zeigte sich nach Amplifikation eines internen Fragments von *RDH54* aus *P. ciferrii* und anschließender inverser PCR des stromaufwärts liegenden Bereichs, dass an dieser Stelle im Genom von *P. ciferrii* das potentielle *HSP26*- und nicht das *TSC3*-Gen liegt.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass ein *TSC3*-Gen in *P. ciferrii* nicht vorhanden ist. Da auch in den Genomen einer Vielzahl anderer Hefen kein *TSC3*-Gen nachweisbar war, erscheint dies durchaus möglich.

3.1.4 Tsc10p (3-Ketosphinganin-Reduktase)

Zur Isolation von *TSC10* aus *P. ciferrii* wurden die Proteinsequenzen von Tsc10p aus *Ashbya gossypii*, *Candida albicans*, *Kluyveromyces lactis*, *S. cerevisiae* und *Yarrowia lipolytica* verglichen.

Die oben beschriebene Vorgehensweise führte zur Isolation von insgesamt 3539 bp, wovon 915 bp für das potentielle Tsc10p aus *P. ciferrii* codieren. Das somit 304 AS lange Protein (Abb. 43 im Anhang) mit einem berechneten *pI* von 8,29 weist eine 49%-ige (65%-ige) bzw. 51%-ige (69%-ige) positionelle Übereinstimmung (Ähnlichkeit) zum mutmaßlichen Tsc10p von *Debaromyces hansenii* (Genbank-Eintrag # XP_459519) bzw. zum Tsc10p von *Candida albicans* (Genbank-Eintrag # EAK93149) auf. Fornarotto *et al.* (2006) isolierten *TSC10* aus *Candida albicans* und zeigten, dass Mutationen im *TSC10*-Gen einen Defekt in der Sphingolipid-Biosynthese hervorrufen. Darüber hinaus wurde für das Tsc10p aus *Candida albicans* das Vorliegen einer 3-Ketosphinganin-Reduktase-Aktivität bestätigt. Das Tsc10p aus *S. cerevisiae* (Genbank-Eintrag # NP_009824) weist eine 39%-ige (54%-ige) positionelle Aminosäure-Identität (-Ähnlichkeit) zum mutmaßlichen Tsc10p aus

P. ciferrii auf. Das Tsc10p aus *S. cerevisiae* ist ein Mitglied der "Kurz-kettigen Dehydrogenase/Reduktase-Protein-Familie" (Beeler *et al.*, 1998). Für diese Familie sind zwei hoch konservierte Sequenzabfolgen charakteristisch:

- ein SX(12)YXXXK-Motif im katalytischen Zentrum (Jörnvall *et al.*, 1995)
- das Vorliegen einer Rossmann-Falte, die eine konservierte Sequenz, welche nahe der NADPH-Bindedomäne eine Biegung zwischen einem β -Strang und einer α -Helix einfügt (Consensus-Sequenz: GXXXGXG) (Ghosh *et al.*, 1994 und Duax *et al.*, 1996), darstellt.

Beide Motive finden sich auch im Tsc10p von *P. ciferrii* wieder (Abb. 16).

```

CLUSTAL W (1.83) Multiple sequence alignment von Tsc10p

                GXXXGXG
S.cer  -----MKFTLEDQVVLI TGGSQGLGK EFAKKYNEAENTKIIIVSRSEARLLDTCNEIRI 55
P.cif  MWFTKGHFDVKHKLAIISGGSQGVGA EFAKQLVEKGS D--VIIVSRTE SKLKKVVEQI-- 56
      : * ::::: : * : * * * * : * : * : * : * * * * * : * : * : * : * : * : * : *

S.cer  EAHLRRET TDEGQVQH KLAAPLDLEQ RLFYPCDLSCY ESVECLFNAL RDLDLLPTQTLC 115
P.cif  -SKFR-----L EKFQIVSYIVADISNYEEAEKVF---AKLDQSPDIVVC 96
      :::*          * : * : * . : * * * . : * : * * * * : * : * : * : *

                S
S.cer  CAGGAVPKLFRGLSGHELN LGMDINYKTTLNVAH---QIALAEQTKEHHLIIFSSATAL 171
P.cif  CAGSSVPKLFLDLSPNELNNGIT TNYNTAVNFAHAAMKMSLEKSTDPHLLIFFSSVVAF 156
      *** : * * * * * * * : * * * * : * * : * * * * * : * * : * * : * * * * * :

                YXXXK
S.cer  YPFVGY SQYAPAWAAIKSLVAILRQELT--NFRISCVYPGNFESEGF TVEQLTKPEITKL 229
P.cif  FPFIGYQYAPLKA AAVRALADVLRQEAI PYNIRVSSVFPGNFDESEGFLEENKTKPEITKK 216
      : * * : * * * * * * * : * * * * * : * * : * * * * * * * * : * * * * * * *

S.cer  IEGPSDAIPCKQACDIIAKSLARGDEDVFTDFVGMIMGMDLGLTAKKSRFVPLQWIFGV 289
P.cif  IEGPSYPI SVETCAKIIIDSLDRGYETIT TDFIGWVLT S ISLGLSPRS--WGVLQAIIGF 274
      * * * * * . * : . . * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

S.cer  LSNILVVPFYMVGCSWYIRKWFRENDGKKAN 320
P.cif  VI-ALIAPIISW SFNRDIRNHFKNEQNTIRN 304
      : * : * : * . . * * * : * : * : * . . *

```

Abbildung 16: MSA der Tsc10p aus *S. cerevisiae* und *P. ciferrii*. Grau unterlegt sind die beiden charakteristischen Sequenzabfolgen. Darüber stehend findet sich die entsprechende Consensus-Sequenz.

Die bioinformatische Analyse des Tsc10p aus *Pichia ciferrii* deutet klar daraufhin, dass es sich bei dem aus *P. ciferrii* isolierten Gen um *TSC10* handelt, welches für die 3-Ketosphingarin-Reduktase codiert.

3.1.5 Lag1p & Laf1p (Ceramid-Synthasen)

In *S. cerevisiae* codieren zwei Gene, *LAG1* (Genbank-Eintrag # NP_011860) und das Paralog *LAC1* (Genbank-Eintrag # NP_012917), für sehr ähnliche, ER-ständige Ceramid-Synthase-Untereinheiten (Barz und Walter, 1999).

Die Isolation einer der beiden Ceramid-Synthasen erfolgte für *P. ciferrii* über den Sequenzvergleich verschiedener Lag1p diverser *Saccharomycotina*-Spezies. Durch die oben beschriebene Vorgehensweise wurden insgesamt 4952 bp isoliert, wovon 1290 bp für eine der zwei potentiellen Ceramid-Synthasen von *P. ciferrii* codieren. Das somit 429 AS lange Protein (Abb. 44 im Anhang) mit einem errechneten *pI* von 6,68 weist mit 64% (80%) positioneller Aminosäure-Identität (-Ähnlichkeit) die größte Ähnlichkeit zu einer potentiellen Ceramid-Synthase von *Kluyveromyces lactis* (Genbank-Eintrag # XP_452132) auf. Mit 65% (75%) bzw. 62% (75%) besteht auch noch eine sehr große Identität (Ähnlichkeit) zu den beiden Ceramid-Synthasen Lac1p bzw. Lag1p aus *S. cerevisiae*. Die Inaktivierung beider Untereinheiten führte zum vollständigen Verlust der Ceramid-Synthase-Aktivität (Schorling *et al.*, 2001 und Guillas *et al.*, 2001). Zudem enthält die abgeleitete Proteinsequenz von AS 159-375 eine TLC-Domäne (*TRAM-LAG1-CLN8*-Domäne) (Abb. 44 im Anhang), die u.a. charakteristisch für Ceramid-Synthasen ist (Winter und Ponting, 2002). Dies untermauert, dass das isolierte Gen aus *P. ciferrii* tatsächlich für eine Ceramid-Synthase-Untereinheit codiert. Aufgrund der Syntenie des Gens mit *S. cerevisiae* *LAG1* wurde es ebenfalls als *LAG1* bezeichnet.

Zur Isolation der zweiten Ceramid-Synthase wurden zunächst Lac1p-Sequenzen verschiedener *Saccharomycotina* in einem MSA abgeglichen. Die Isolation eines internen Fragments über degenerierte Primer führte jedoch nicht zum Erfolg, sondern zur Amplifikation nicht-homologer Bereiche. Da sich aber in *Ashbya gossypii*, *Candida albicans* und *Debaromyces hansenii* eine konservierte Lage einer der beiden Ceramid-Synthasen stromabwärts des Cyclin C-Gens (*SSN8*) zeigte, wurden diese drei Gene genutzt, um ausgehend von einem MSA der korrespondierenden Genprodukte degenerierte Primer abzuleiten und über eine inverse PCR den stromabwärts liegenden Bereich in *P. ciferrii* zu isolieren. Über diesen Weg wurden 4195 bp sequenziert, worin 1158 bp eines ORF's enthalten sind, der für eine potentielle Ceramid-Synthase kodiert. Das somit 385 AS lange Protein (Abb. 45 im Anhang) mit einem errechneten *pI* von 6,60 weist mit 51% (68%) positioneller Aminosäure-Identität (-Ähnlichkeit) die größte Ähnlichkeit zu einer potentiellen Ceramid-Synthase von *Kluyveromyces lactis*

auf. Der Vergleich mit den Ceramid-Synthasen aus *S. cerevisiae* zeigte eine deutlich geringere Ähnlichkeit: 33% (52%) bzw. 29% (50%) positionelle Übereinstimmung (Ähnlichkeit) zu Lac1p bzw. Lag1p. Dennoch dürfte das isolierte Gen für eine Ceramid-Synthase codieren, da das abgeleitete Protein von AS 156-370 ebenfalls eine TLC-Domäne enthält (Abb. 45 im Anhang). Aufgrund der geringen Ähnlichkeit des Genproduktes zu *S. cerevisiae* Lac1p und des vollständigen Fehlens von Syntenie zwischen dem *P. ciferrii*-Gen und den homologen Genen aus *Ashbya gossypii*, *Candida albicans* und *Debaromyces hansenii* auf der einen Seite und *S. cerevisiae* LAC1 auf der anderen Seite, wurde das Gen in Anlehnung an die beiden Ceramid-Synthase-Gene aus *S. cerevisiae* LAG1 und LAC1 als LAF1 bezeichnet.

3.1.6 Lip1p (Ceramid-Synthase-Untereinheit)

Die Isolation von LIP1 aus *P. ciferrii* erfolgte wie oben beschrieben. Verglichen wurden zu diesem Zweck die Lip1p-Sequenzen aus *S. cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis* und *Ashbya gossypii*. Es wurden 1945 bp isoliert, wovon 369 bp für das potentielle 122 AS lange *P. ciferrii* Lip1p mit einem theoretischen pl von 6,55 codieren (Abb. 46 im Anhang). Dies weist eine 55%-ige (80%-ige) bzw. 51%-ige (70%-ige) positionelle Aminosäure-Identität (-Ähnlichkeit) zum potentiellen Lip1p von *Candida glabrata* (Genbank-Eintrag # XP_449938) bzw. zum biochemisch charakterisierten Lip1p von *S. cerevisiae* (Genbank-Eintrag # NP_014027) auf. Dieses wurde von Vallée und Riezman (2005) als essentielle Untereinheit der Ceramid-Synthase charakterisiert, welche *in vitro* und *in vivo* für die Ceramid-Synthase-Aktivität benötigt wird. Zudem wurde für das Lip1p von *P. ciferrii*, ebenso wie für das Lip1p von *S. cerevisiae* eine einzelne Transmembrandomäne in der Nähe des N-Terminus vorhergesagt (Abb. 17).

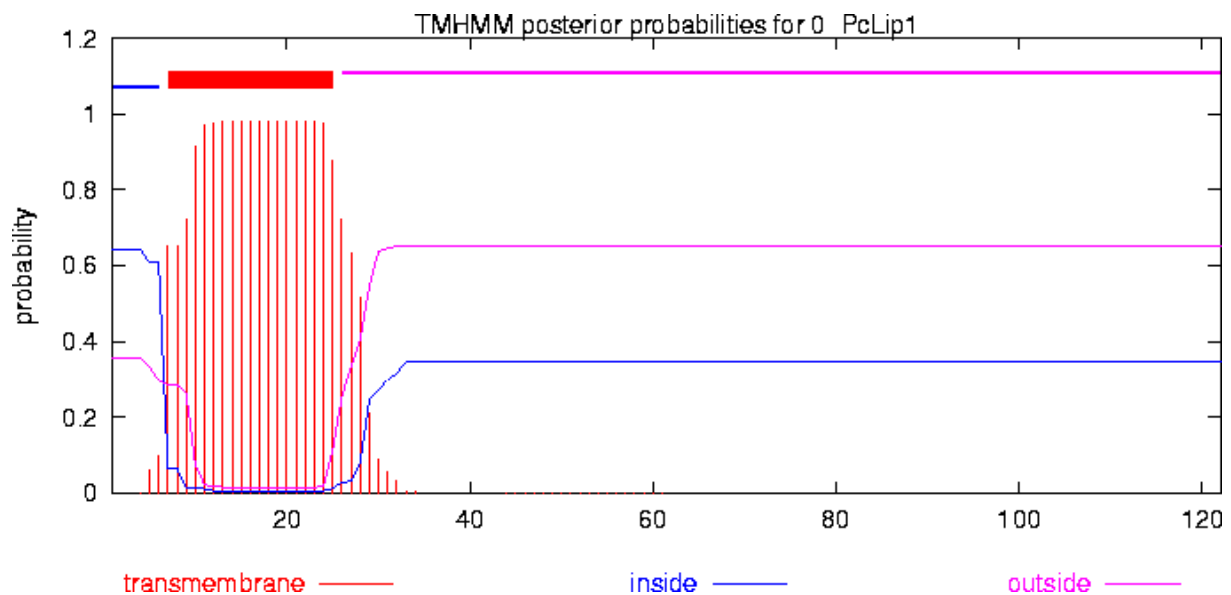


Abbildung 17: Vorhersage der Lokalisation von Transmembran-Helices des Lip1p von *P. ciferrii* durch die TMHMM 2.0-Software (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

Die Ähnlichkeit der aus der isolierten Gen-Sequenz abgeleiteten Protein-Sequenz mit einem charakterisierten Lip1p und das jeweilige Vorhandensein einer einzelnen Transmembrandomäne, legt nahe, dass es sich bei dem aus *P. ciferrii* isolierten Gen um *LIP1* handelt.

3.1.7 Yxc1p (Ceramidase)

Zur Identifikation hoch konservierter Bereiche innerhalb der Ceramidase Proteinsequenzen wurden die Ydc1p-Sequenzen von *S. cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Ashbya gossypii*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaromyces hansenii* und *Candida albicans* verglichen. Durch diesen Abgleich wurden nach der oben beschriebenen Methode 3402 bp isoliert und sequenziert. Hierin enthalten sind 855 bp, die für die potentielle alkalische Ceramidase aus *P. ciferrii* codieren. Das somit 284 AS lange potentielle Yxc1p (Abb. 49 im Anhang) mit einem theoretischen *pI* von 7,15 weist 61% (75%), sowie 46% (66%) positionelle Aminosäure-Identität (-Ähnlichkeit) zu einer potentiellen alkalischen Ceramidase von *Debaromyces hansenii* (Genbank-Eintrag # XP_457637) bzw. zu einer charakterisierten alkalischen Ceramidase (Ydc1p) aus *S. cerevisiae* (Genbank-Eintrag # NP_015238), die bevorzugt Dihydroceramide hydrolysiert, auf. Die zweite in *S. cerevisiae* charakterisierte alkalische Ceramidase, welche bevorzugt Phytoceramid (Ypc1p) als Substrat verwendet (Genbank-Eintrag

NP_009742), zeigt mit 46% (64%) positioneller Aminosäure-Identität (-Ähnlichkeit) allerdings nur eine geringfügig niedrigere Ähnlichkeit zum potentiellen Yxc1p aus *P. ciferrii*. Beide Genprodukte wurden als membran-gebundene, alkalische Ceramidasen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten charakterisiert (Mao *et al.*, 2000a und b). Das Yxc1p von *P. ciferrii* enthält sieben vorhergesagte Transmembrandomänen (Abb. 18), was vermuten lässt, dass es sich ebenfalls um ein integrales Membranprotein handelt. Zudem enthält das Protein, ebenso wie die beiden Ceramidasen aus *S. cerevisiae*, eine ER-Rückführungssequenz - KKXX - am C-Terminus (Mao *et al.*, 2000a und b) (Abb. 35 im Anhang), die eine Lokalisierung im ER vermuten lässt.

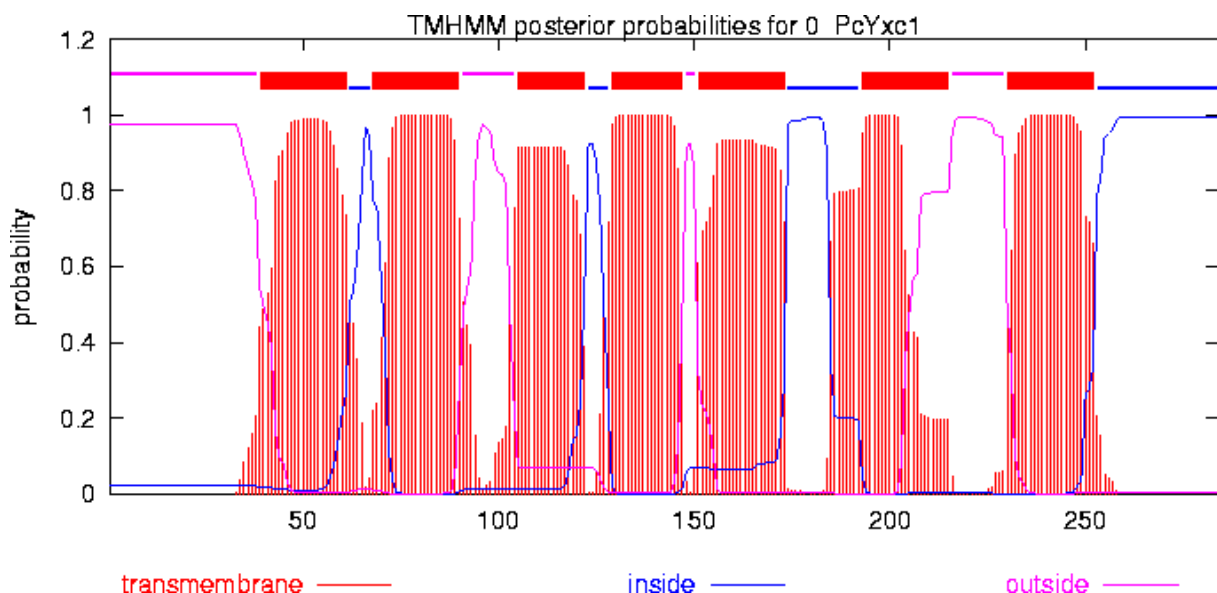


Abbildung 18: Vorhersage der Lokalisation von Transmembran-Helices des Yxc1p von *P. ciferrii* durch die TMHMM 2.0-Software (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

Basierend auf den Ähnlichkeiten der Proteinsequenzen und dem Hydropathie-Profil kann davon ausgegangen werden, dass das isolierte *YXC1*-Gen aus *P. ciferrii* für eine alkalische Ceramidase codiert.

3.1.8 8Desp (Sphingolipid- Δ^8 -Desaturase)

Die Isolation des *8DES*-Gens aus *P. ciferrii* erfolgte wie in den zuvor beschriebenen Fällen. Zur Ableitung degenerierter Primer wurden die 8Desp-Sequenzen von *Deba-*

romyces hansenii, *Candida albicans*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces kluyveri*, und *Ashbya gossypii* verglichen. Durch diese Herangehensweise wurden 5106 bp isoliert und sequenziert. Hiervon codierten 1794 bp für das potentielle 8Desp von *P. ciferrii*. Das 597 AS lange Protein (Abb. 50 im Anhang) mit einem theoretischen *pI* von 6,48 weist mit 62% (74%) positioneller Aminosäure-Identität (-Ähnlichkeit) die größte Ähnlichkeit zu einer bereits charakterisierten Sphingolipid- Δ^8 -Desaturase aus *Kluyveromyces lactis* (Genbank-Eintrag # XP_454832) auf. Die heterologe Expression dieses Enzyms in *S. cerevisiae* führte zur Umwandlung von 4-Hydroxysphingalin (=Phytosphingosin) zu 4-Hydroxy-*trans*-8-sphingalin (Takakuwa *et al.*, 2002). Neben den Sequenz-Ähnlichkeiten sprechen auch noch einige strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten Proteinsequenz für das Vorliegen einer Sphingolipid- Δ^8 -Desaturase. So findet sich in der Sequenz von AS 4-79 eine Cytochrom *b*₅-Domäne (Abb. 19). Das Vorkommen von Fusionen zwischen Lipid-Desaturasen und ihrem Reaktionspartner Cytochrom *b*₅ ist bereits mehrfach beschrieben worden (Napier *et al.*, 2003). Zudem enthält das Protein, drei für Acyl-Lipid-Desaturasen charakteristische und hoch konservierte Histidin-Boxen (Sperling *et al.*, 1998). Diese Boxen weisen die allgemeine Sequenz HX₂₍₃₎[XH]H auf, wobei die Distanz zwischen der ersten und zweiten Box 31 oder 32 AS betragen kann. Die zweite Box ist von der dritten durch 132-173 AS getrennt (Sperling *et al.*, 1995) (Abb. 19).

```

1      M S S S K V L S R G E I E H R I A L G D A I V I F E N S V L R M N K W L K F H P
41     G G D K A V F H L V G R D A T D E M I A Y H C D E T Q A T F K R W K I G E I N Y
81     K W I N F V P P I Q G G K F R T L E E Q E L D E I K E E Q L S R S P A S P A S N
121    S S S S E D L K L S S S T D P S D V E D S I D T K A E S S S N Y A K Q Q Q Q K Q
161    Q Q P K L N T T A G Q C S E V T K P K I P Q G L I P S L S T K E A Y E R K V V K
201    D P S D V I D N Y D N G Q V E Q D L K S L P S L D Y E T Q E H L S K E Y N K L H
241    D I I I E N G W Y Q C P Y W E Y A K E A T R I A T L F S I S F T L L Y F K W Y F
281    L S A I F L G L A W Q Q L V F I A H D A G H I S I T H Q Y E T D N I I G M I V A
321    S F I G G L S L G W W K R N H N V H H L I T N D P V H D P D I Q H L P F F A V S
361    T R L F G N V Y S T Y Y E K F L W F D A F A K K L I P I Q Q F M Y Y P I L S F G
401    R F N L Y R L S W E H V L F G Q G P R H G K A A W F R Y F E L V G L T F F N W W
441    F F Y L I V Y K S I E S N S S R F M F V M V S H I T T M I V H V Q I T L S H F A
481    M S T S D L G T S E S F V S R Q I R T T M D V D C P G W F D F F H G G L Q F Q A
521    I H H L F P R V P R H N F R K I Q P L V I G F C D K V G L K Y S I Y G F V D G N
561    E V V I N K L S D I A K Q A K I M R D C H K T M K K E A I E E G K Y F E F *

```

Abbildung 19: Aminosäuresequenz des 8Desp aus *P. ciferrii*. Die Cytochrom b_5 -Domäne (unterstrichen) wurde mittels des PROSITE-Programms (<http://www.expasy.ch/prosite/>) ermittelt. Die drei konservierten Histidin-Boxen sind grau unterlegt. Der in der ersten AS der dritten Histidin-Box vermutlich durch eine Punktmutation aufgetretene Austausch von Histidin durch Glutamin ist bereits beschrieben (Sperling *et al.*, 1995), seine funktionellen Konsequenzen jedoch noch nicht geklärt.

Zusammengenommen legen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung nahe, dass das aus *P. ciferrii* isolierte 8DES-Gen für eine Sphingolipid- Δ^8 -Desaturase codiert.

3.1.9 Gcs1p (Ceramid-Glycosyltransferase)

Durch den Vergleich der Gcs1p-Sequenzen aus *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces kluyveri*, *Ashbya gossypii*, *Debaromyces hansenii*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris* und *Yarrowia lipolytica* wurden degenerierte Primer zur Amplifikation eines hoch konservierten Bereichs abgeleitet. Die anschließende Klonierung des GCS1-Locus aus *P. ciferrii* führte zur Isolation von insgesamt 4949 bp. Der potentielle GCS1-ORF weist eine Größe von 1650 bp auf, woraus sich eine Länge von 549 AS (Abb. 51 im Anhang) und ein theoretischer pI von 6,19 für das korrespondierende Genprodukt ergab. Das Protein weist mit 45% (59%) positioneller Aminosäure-Identität (-Ähnlichkeit) die größte Ähnlichkeit zu der bereits beschriebenen Ceramid-Glycosyltransferase Hsx11p aus *Candida albicans* (Genbank-Eintrag # EAL03927)

auf. Leipelt *et al.* (2000) klonierten und charakterisierten die Ceramid-Glycosyltransferase von *Candida albicans* durch heterologe Expression in *S. cerevisiae* und durch Generierung einer *Candida albicans* Deletionsmutante. In beiden Fällen zeigten sich starke Veränderungen in den zellulären Konzentrationen von Cerebrosiden, welche die Reaktionsprodukte der Ceramid-Glycosyltransferaseaktivität sind. Die Glycosyltransferase von *Candida albicans* gehört zur Glycosyltransferase-Familie 21. Diese ist charakterisiert durch das Vorliegen hoch konservierter Nukleotid-Erkennungsdomänen (NRD2L und NRD2S; Kapitonov und Yu, 1999) und zahlreicher AS, welche essentiell für die Enzymaktivität sind (RXXRW-Motif, D₁, D₂, D₃; Wu *et al.*, 1999 und Marks *et al.*, 2001). Der Vergleich der Ceramid-Glycosyltransferasen aus *Candida albicans* und *P. ciferrii* ist in Abb. 20 zu finden.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

C.alb      -----MVQEELSLFRITTTGYFF 17
P.cif      MFSSAESIILSFCTRFGYSASIEGSSIPNTGNTMVNGSPIVIESFQLSNLQYALSVIG 60
           : . : ** : : : . :

C.alb      LLWYIIILVAAYSGFFEILFNFRN--RPILHTKQQANHQNDESDDEEIIYEGVTIIRPI 74
P.cif      FIWWAVMMFIIYYGFTEIYFKFNGPKYKPLEVQVQSNDDGVDKIIDLDDILEGVTILRPI 120
           : **: : : . * * * * * : * . : : * * : * * * * * : **

           D1
C.alb      KGIDPELTSCLLESSFCQNYPRSKLQILFCVDDPNPSIPIIQKLIKAKYPTVDAQILTSES 134
P.cif      KGIDPELEICLESSILQKYPSEKIQIIFCVENSQDPAIPIIEKLIKRYNHLDELLIDES 180
           * * * * * * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

           D2
C.alb      YNSQTKTSDDHYPNPKVNNLAKGFVHAKYDILWVMSNVWASSNILKNSVILNGLNLM 194
P.cif      Y-----EDNHFGPNPKINNLAQGYKMAKFDIIWVLDNSVFNPNPTLLRSIINLQKSIDN 234
           * . * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

C.alb      SR-----KMGQSRPVKLVHHPVLAALSINNTTRSDDFIGGQDLEITAMTPVPSSESLNSQL 249
P.cif      GRETFNFDTKGNKIKIMHHPVLAVSINNS----- 264
           . * . * : . : * * * * * : * * * * * : : : : : : : : :

           H C
C.alb      VKRKSSPKSNNSLNVHPGFYTSKFKKLGAELEDFLHTSHSKFYVSLNNAVAPCVNGK 309
P.cif      -----NTLG-----NLGARLDEMFLFTSHAKFYVFFNKASIAPCVNGK 302
           : * : . : : : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

           D3
C.alb      SNIYRRSDLDQSVRLIPHKDSPPFFKDPKVKQDAGYYTSLGVGHAIKFFARYIGEDNMIGI 369
P.cif      SNIYRKSDDLSSVMEISKGGIPLINNRESIAKAASTFVKTPGEGIRFFSRYIGEDNMIGI 362
           * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

           RXXRW
C.alb      ALWEN--TQGR TGLTGDDVVVQPYSGSENN-----AVKDYIQRRVRWLRVRKYMVLLA 419
P.cif      ALWNDPNNGGR TGMTGDVVIQPIGGSTNNGLPFHYNKIMDYVNRVRWLRVRKYMVLLA 422
           * * * * : . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

C.alb      TLIPTTESIICGIYGYAISTVFFGTWFKYWFVMHMLIWMLTDYVQYHTLINHTLD-- 477
P.cif      TLVEPTTESLLIGVFQTYGLSNLFFQGGYKKTIMFLHELIWCITDYTQFKILLKQVQDK 482
           * * * * * * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :

C.alb      -VKNITYLPNWLNESIPPQRNCLQWGYIWLRELLALPIWIAMIHGEIDWRGRPFRIK 536
P.cif      LHDNQTISPYFINDHIEEKYK-LINWLPIWILREILALPIWIMAMCGTEIDWRNRPFKIR 541
           . * * * * : * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

C.alb      KDLTAEEM 544
P.cif      TDLCAEEL 549
           . ** * * * :

```

Abbildung 20: Vergleich der AS-Sequenzen der beiden Ceramid-Glycosyltransferasen aus *Candida albicans* und *P. ciferrii*. Die hoch konservierten Motive sind grau unterlegt (erste graue Box: NRD2L, zweite graue Box: NRD2S, dritte graue Box: RXXRW-Motiv). Aminosäuren deren essentieller Charakter für die Glycosyltransferase-Aktivität gezeigt wurde, sind über den entsprechenden AS noch einmal vermerkt. Der Vergleich wurde mittels des Clustal W-Programms (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) erstellt.

Die Ergebnisse der bioinformatischen Analysen legen den Schluss nahe, dass es sich bei dem aus *P. ciferrii* isolierten Gen um *GCS1* handelt, welches für eine Ceramid-Glycosyltransferase codiert.

3.2 Charakterisierung der Substratspezifitäten

3.2.1 Lag1p & Laf1p (Ceramid-Synthasen)

Um Informationen über die Substratspezifität der *P. ciferrii* Ceramid-Synthasen Lag1p und Laf1p bzgl. der akzeptierten Länge der Acyl-CoA-Thioester zu erhalten, wurden ESI-MS/MS-Analysen der Ceramidfraktionen verschiedener *P. ciferrii*-Stämme durchgeführt. Verglichen wurden der WT mit zwei TAPS-Produktionsstämmen (COS23A und syrE1) und verschiedenen TriASa-Produktionsstämmen (syrE10 Re-Isolat 11, syr2 1-3 Re-Isolate 10 und 23), in denen vermutlich die Sphinganin-C4-Hydroxylase inaktiv ist. Der WT und die beiden TAPS-Produktionsstämme enthalten fast ausschließlich Phytoceramide mit einer Fettsäure-Kettenlänge von 24 bzw. 26 Kohlenstoff-Atomen. Diese liegen fast ausschließlich gesättigt und hydroxyliert vor ($C_{24:0-OH}$ und $C_{26:0-OH}$), wobei $C_{26:0-OH}$ deutlich überwiegt. Wie zu erwarten sind in den TriASa-Produktionsstämmen kaum Phytoceramide nachzuweisen (Abb. 21).

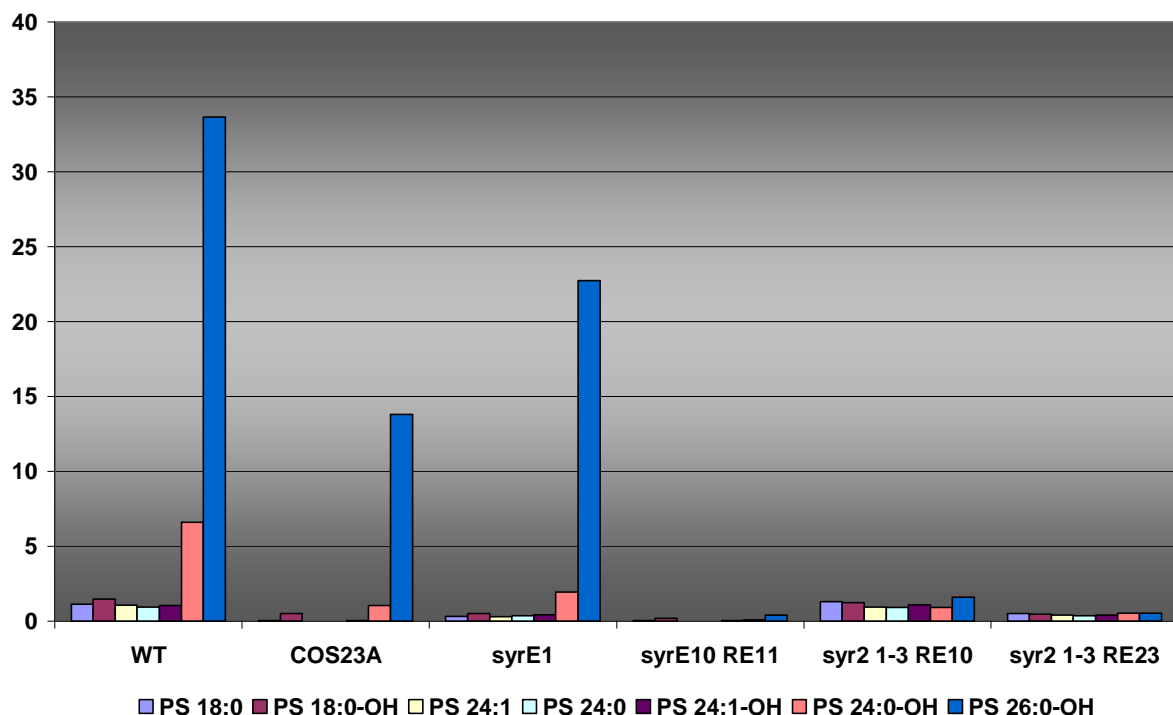


Abbildung 21: Charakterisierung der Phytoceramid-Fraktion in verschiedenen *P. ciferrii*-Stämmen. Angegeben sind die Konzentrationen der Phytoceramide (PS: Phytosphingosin) mit unterschiedlichen Fettsäureseitenketten in nmol/mg Protein (z.B. 24:1-OH: C24 mit einer Doppelbindung und einer Hydroxylgruppe).

Die Sphinganin-Produzenten, die vermutlich aufgrund einer Inaktivierung der Sphinganin-Hydroxylase kein TAPS, sondern TriASa bilden, akkumulieren vorwiegend Dihydroceramide. Trotz der offensichtlich stammabhängig unterschiedlichen Verteilung der Fettsäure-Kettenlänge der Dihydroceramide, lässt sich ein allgemeiner Trend zur Akkumulation von Dihydroceramiden mit einer Fettsäure-Kettenlänge von 26 bzw. in geringerem Maße mit zwei Kohlenstoff-Atomen ($C_{26:0-OH}$ und $C_{2:0}$) feststellen (Abb. 22). Zusätzlich zur stammabhängigen Variabilität der Ergebnisse erschwert die im Vergleich mit den Phytoceramiden um eine Größenordnung geringere relative Konzentration der Dihydroceramide die Interpretation der Ergebnisse.

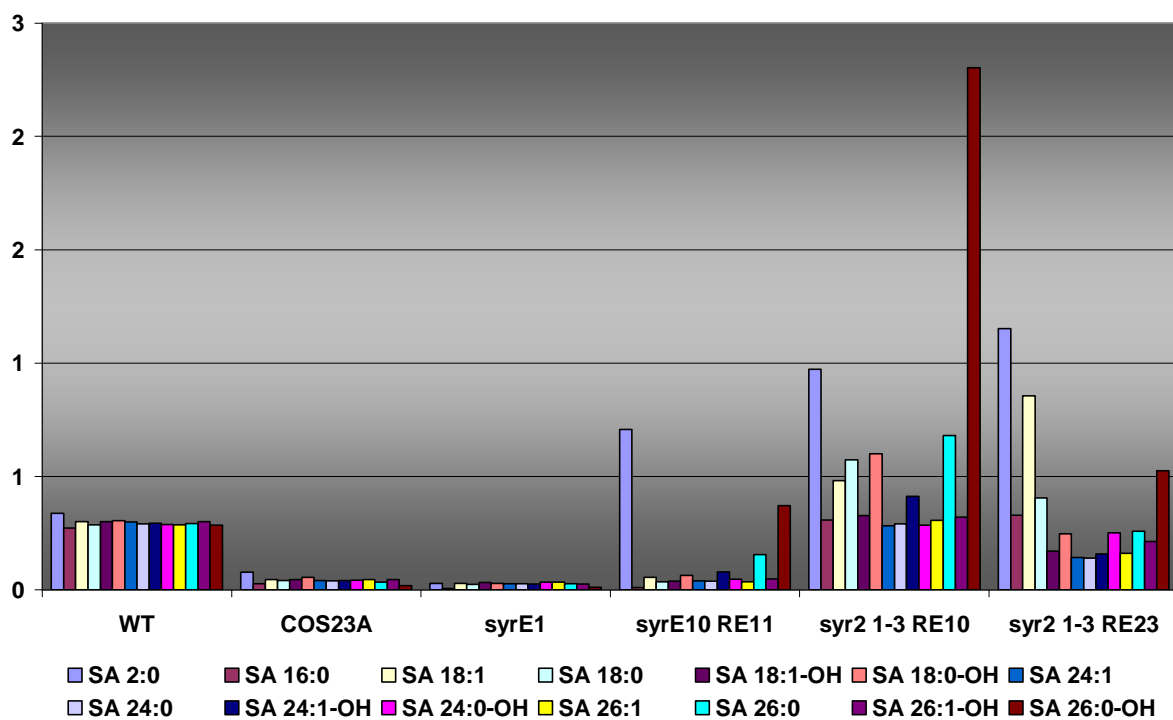


Abbildung 22: Charakterisierung der Dihydroceramid-Fraktion in verschiedenen *P. ciferrii*-Stämmen. Angegeben sind die Konzentrationen der Dihydroceramide (SA: Sphinganin) mit unterschiedlichen Fettsäureseitenketten in nmol/mg Protein (z.B. 24:1-OH: C24 mit einer Doppelbindung und einer Hydroxylgruppe).

Die Ceramid-Synthasen aus *P. ciferrii* nutzen somit bevorzugt Phytosphingosin bzw. mit geringerer Affinität Sphinganin und Acyl-CoA-Thioester mit einer Kettenlänge von 26 Kohlenstoffatomen, um daraus SA(PS)-C_{26:0-OH} zu bilden. Bei SA(PS)-C_{2:0} handelt es sich vermutlich eher um ein Produkt der Acetyltransferase, die die Acetylgruppen auf die Sphingoidbasen überträgt. Inwiefern die Acyl-CoA-Thioester bereits eine Hydroxylierung der Fettsäure enthalten, ist ungeklärt, da die Frage auf welcher Ebene die Hydroxylierung stattfindet noch offen ist.

3.2.2 Des1p (Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase)

Das 2006 beschriebene Des1p aus *P. ciferrii* wurde anhand seiner Homologie zu anderen Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturasen als solches annotiert (Patentanmeldung: WO 2006/048458). Zur Bestätigung des Vorliegens einer Aktivität zur Umwandlung von Dihydroceramid in Ceramid wurde das entsprechende Gen heterolog exprimiert. Analog zu den durch Beckmann *et al.* (2003) durchgeführten Versuchen mit der Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase von *Candida albicans*, wurde das *DES1*-Gen aus *P. ciferrii* in einem *syr2 Δ* -Stamm von *S. cerevisiae* exprimiert, um anschließend die Veränderungen der Sphingolipid-Konzentrationen zu detektieren. *S. cerevisiae* besitzt keine eigene Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase und kann somit Ceramid nur bei heterologer Expression einer Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase bilden (Ternes *et al.*, 2002). Zunächst war es notwendig eine Deletion des *SYR2*-Gens in dem *S. cerevisiae*-Stamm CEN.PK2-1C einzufügen, um eine Akkumulation von Sphinganin bzw. Dihydroceramid als Vorläufermolekül für die Ceramid-Bildung zu erzielen (Haak *et al.*, 1997 und Grilley *et al.*, 1998). Der entsprechende *S. cerevisiae*-Stamm CEN.PK2-1C *syr2::KILEU2* wurde durch Steffen Schaffer (Schaffer, unveröffentlicht) erzeugt und für die folgenden Arbeiten zur Verfügung gestellt. Er wurde zunächst mittels RP-HPLC auf die Akkumulation von Sphinganin und die Abnahme der Phytosphingosin-Konzentration untersucht (Abb. 23).

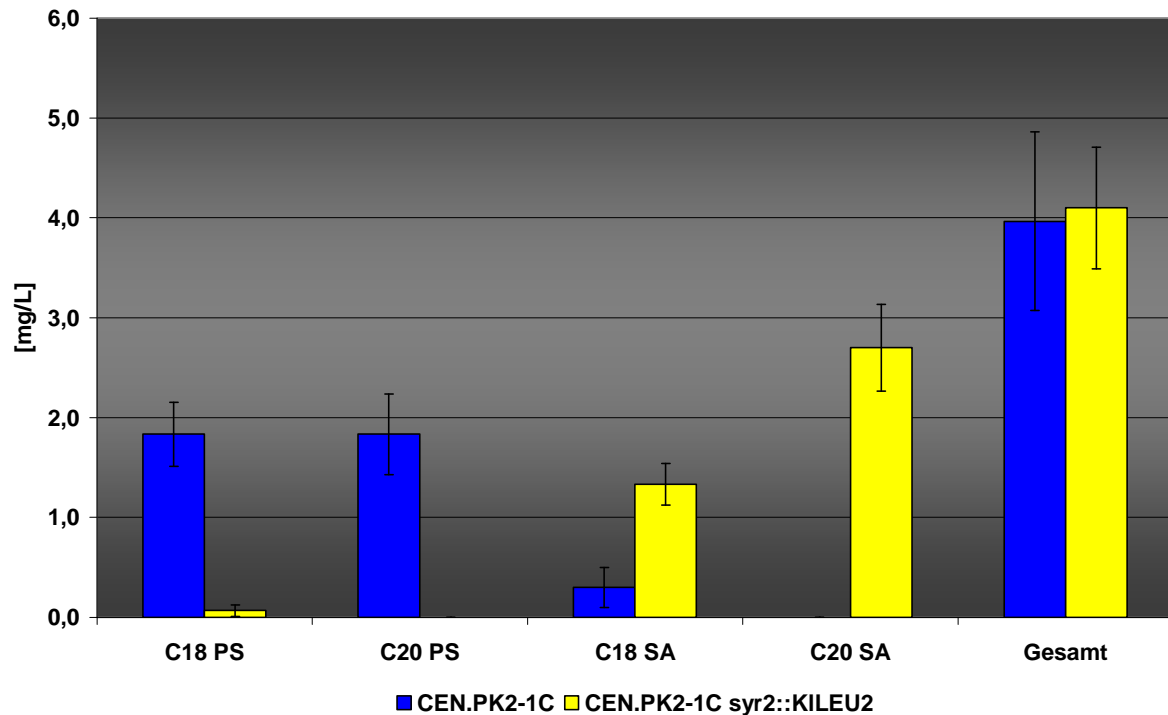


Abbildung 23: Konzentration der Sphingoidbasen Phytosphingosin (PS) und Sphinganin (SA) mit einer Kettenlänge von 18 (C18) bzw. 20 (C20) Kohlenstoffatomen im *S. cerevisiae* WT und im *syr2Δ*-Stamm. OD_{600nm}:

Wie erwartet, produzierte der Stamm CEN.PK2-1C fast ausschließlich C18- und C20-Phytosphingosin (ca. 1:1), während im Stamm CEN.PK2-1C *syr2::KILEU2* nahezu kein Phytosphingosin mehr gebildet, aber C18- und C20-Sphinganin im Verhältnis 1:2 akkumuliert wurde (Haak *et al.*, 1997 und Grilley *et al.*, 1998). Allerdings differenziert die angewandte Analytik nicht zwischen freien und ceramidgebundenen Sphingoidbasen.

Im zweiten Schritt wurde der *syr2Δ*-Stamm mit verschiedenen Derivaten des Vektors p426HXT7-6His transformiert, die verschiedene Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturasen unter Kontrolle des konstitutiv starken *HXT7*-Promotors enthält und zur Selektion das *URA3*-Gen trägt. Als Positivkontrolle wurde das *DES1*-Gen aus *Candida albicans* hinter den *HXT7*-Promotor kloniert (pDB005, Abb. 66 im Anhang), da von diesem bereits bekannt ist es das es eine Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase-Aktivität codiert (Beckmann *et al.*, 2003). Zur heterologen Überexpression des *DES1*-Gens aus *Pichia ciferrii* in CEN.PK2-1C *syr2::KILEU2* diente der Vektor pDB003 (Abb. 67 im Anhang). Zusätzlich wurde noch das potentielle *DES1*-Gen aus *Yarrowia lipolytica* ge-

testet (pDB004.1, Abb. 68 im Anhang). Die Analyse der erhaltenen Transformanten in Hinsicht auf das Sphingoidbasen-Spektrum erfolgte mittels RP-HPLC (Abb. 24).

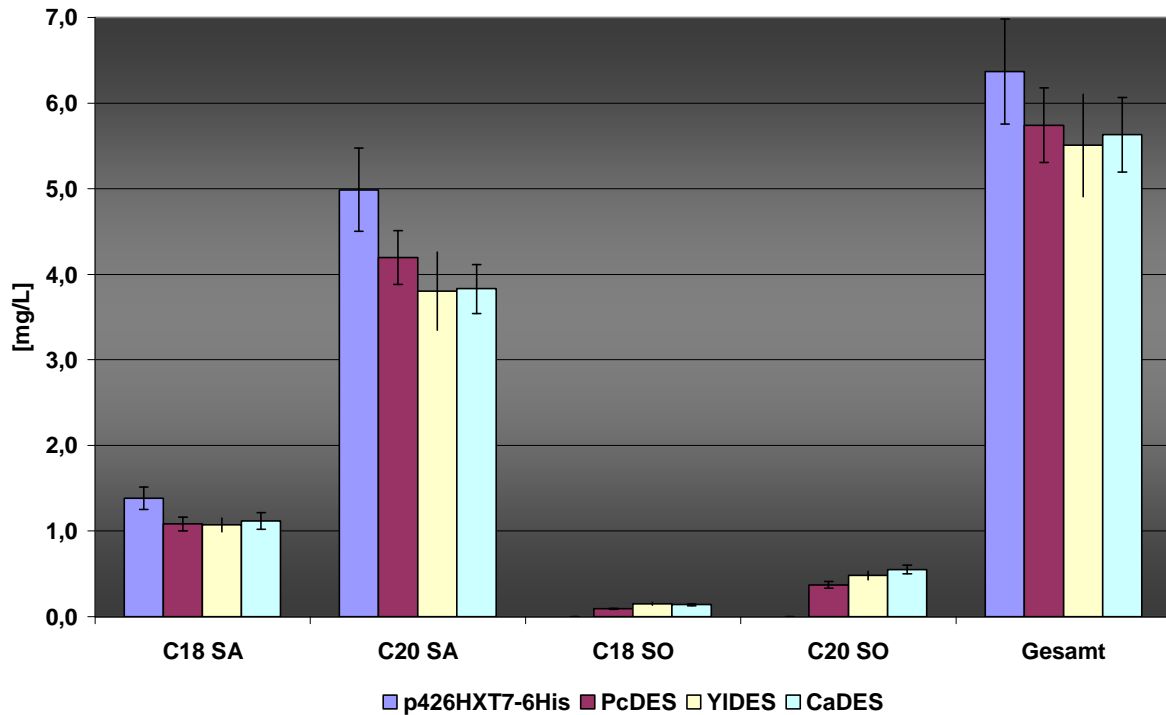


Abbildung 24: Vergleich der Umsetzung von Dihydroceramid in Ceramid durch Überexpression verschiedener Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturasen in dem Stamm CEN.PK2-1C *syz2::KILEU2*. Quantifiziert wurden hier die Sphingoidbasen nach Abspaltung der Fettsäure (Dihydroceramid \Rightarrow Sphinganin/ Ceramid \Rightarrow Sphingosin). Eine Differenzierung zwischen freien und ceramidgebundenen Sphingoidbasen ist somit nicht möglich. (OD_{600nm} [Mittelwerte]: p426HXT7-6His \Rightarrow 8,5 / PcDES \Rightarrow 8,6 / YIDES \Rightarrow 8,4 / CaDES \Rightarrow 8,1)

Es zeigt sich, dass nicht nur die Überexpression des *DES1*-Gens aus *Candida albicans* zur Umsetzung von Dihydroceramid zu Ceramid führt, sondern auch die potentiellen Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturasen aus *P. ciferrii* und *Yarrowia lipolytica* diese Umsetzung katalysieren. Der Vergleich mit der Leervektor-Kontrolle bestätigt das Fehlen einer Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase-Aktivität in *S. cerevisiae*, da hier kein Ceramid gebildet wird. Es konnte somit bestätigt werden, dass die potentiellen Des1p aus *P. ciferrii* und *Yarrowia lipolytica* eine Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase-Aktivität aufweisen.

Zur näheren Charakterisierung der Substratspezifität der Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase aus *P. ciferrii* hinsichtlich der Fettsäureseitenkette des Dihydroceramids wurden Versuche zur Überexpression des *DES1*-Gens in *P. ciferrii* durchgeführt, um anschließend die Konzentration der verschiedenen Dihydroceramid-Spezies zu bestimmen. Zur Überexpression wurde der Promotor des *PDA1*-Gens, welches für die α -Untereinheit E1 der Pyruvat-Dehydrogenase codiert, verwendet. Es wurde angenommen, dass das *PDA1*-Gen beim aeroben Wachstum von *P. ciferrii* relativ stark exprimiert wird und sich der zugehörige Promotor daher gut zur Überexpression von Genen in *P. ciferrii* eignen würde. Zudem wurde durch Sickmann *et al.* (2003) in einer Proteom-Analyse der Mitochondrien von *S. cerevisiae* gezeigt, dass das *PDA1*-Gen tatsächlich zu den relativ stark exprimierten Genen gehört. Daher wurde das *PDA1*-Gen inklusive Promotor mittels degenerierter Primer und inverser PCR aus *P. ciferrii* isoliert (Abb. 47 im Anhang).

Das *DES1*-Gen wurde anschließend unter Kontrolle des *PDA1*-Promotors gebracht und der entsprechende Vektor pDB007 (Abb. 69 im Anhang) in den TriASa-Produktionsstamm *P. ciferrii* syrE10 RE11 transformiert. Hier sei noch einmal darauf hingewiesen, dass alle im Folgenden in *P. ciferrii* eingebrachten Vektoren keine replikativen Plasmide darstellen, sondern zielgerichtet in das Genom von *P. ciferrii* integrieren. Alle im Folgenden verwendeten Plasmide erhalten einen intergenischen Bereich eines rDNA-Operons aus *P. ciferrii*. rDNA-Operons kommen in Hefen in hoher Kopiezahl vor (Seligy und James, 1977), so dass die Linearisierung der Vektoren innerhalb des intergenischen Bereichs zu deren bevorzugter Integration in rDNA-Operons über homologe Rekombination führen sollte. Als Vergleich dient ein Kontrollstamm mit leerem Vektor (pDB006, Abb. 70 im Anhang). Um zu prüfen, ob die mRNA-Spiegel des *DES1*-Gens in *P. ciferrii* syrE10 RE11 pDB007 im Vergleich zum Kontrollstamm tatsächlich erhöht waren, wurden die mRNA-Populationen beider Stämme mittels einer quantitativen *real-time* PCR (qRT-PCR) verglichen. Als Referenz dienten so genannte Haushaltsgene, von denen angenommen wird, dass ihre korrespondierende mRNA unter verschiedensten Bedingungen annähernd gleich bleiben, da die entsprechenden Genprodukte unter allen Wachstumsbedingungen benötigt werden. Dies waren das für Actin codierende *ACT1*-Gen, welches zuvor mittels degenerierter Primer und inverser PCR aus *P. ciferrii* isoliert wurde (Abb. 48 im Anhang), und das für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase codierende *TDH1*-Gen. Die qRT-PCR bestätigte die vermehrte Transkription des *DES1*-Gens

und somit die Funktionalität des *PDA1*-Promotors. Der pDB007-tragende Stamm zeigte eine, um den Faktor 4 (*ACT1* als interne Referenz) bzw. 5 (*TDH1* als interne Referenz) erhöhten mRNA-Spiegel (gemessen werden Veränderungen von Transkriptionsrate und mRNA-Stabilität) des *DES1*-Gens im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle (Tab. 14 im Anhang). Der Vergleich der Dihydroceramid-Fractionen in beiden Stämmen zeigt im Stamm *syrE10 RE11 pDB007* eine Abnahme fast aller Dihydroceramid-Spezies unter die Nachweisgrenze (Abb. 25). Dies deutete darauf hin, dass *P. ciferrii* *Des1p* Dihydroceramide mit sehr verschiedenen Fettsäureseitenketten von C16 bis zu C26, ungesättigt und einfach gesättigt, zum entsprechenden Ceramid umsetzen kann.

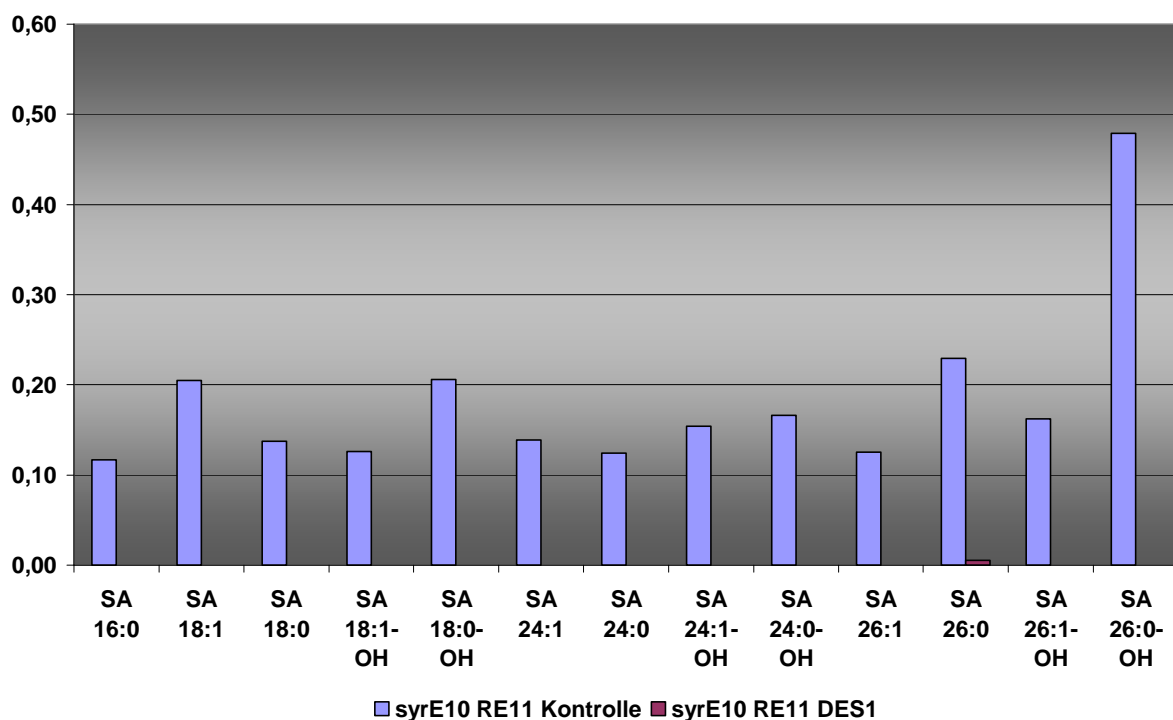


Abbildung 25: Vergleich der Dihydroceramid-Konzentrationen in *P. ciferrii* *syrE10 RE11* mit und ohne Überexpression des *DES1*-Gens mittels ESI-MS/MS. Angegeben sind die Konzentrationen der Dihydroceramide (SA: Sphinganin) mit unterschiedlichen Fettsäureseitenketten in nmol/mg Protein (z.B. 24:1-OH: C24 mit einer Doppelbindung und einer Hydroxylgruppe).

Zusätzlich zur Analyse der Dihydroceramid-Fractionen in beiden Stämmen wurde auch die Phytoceramid-Fraktion charakterisiert (Abb. 26).

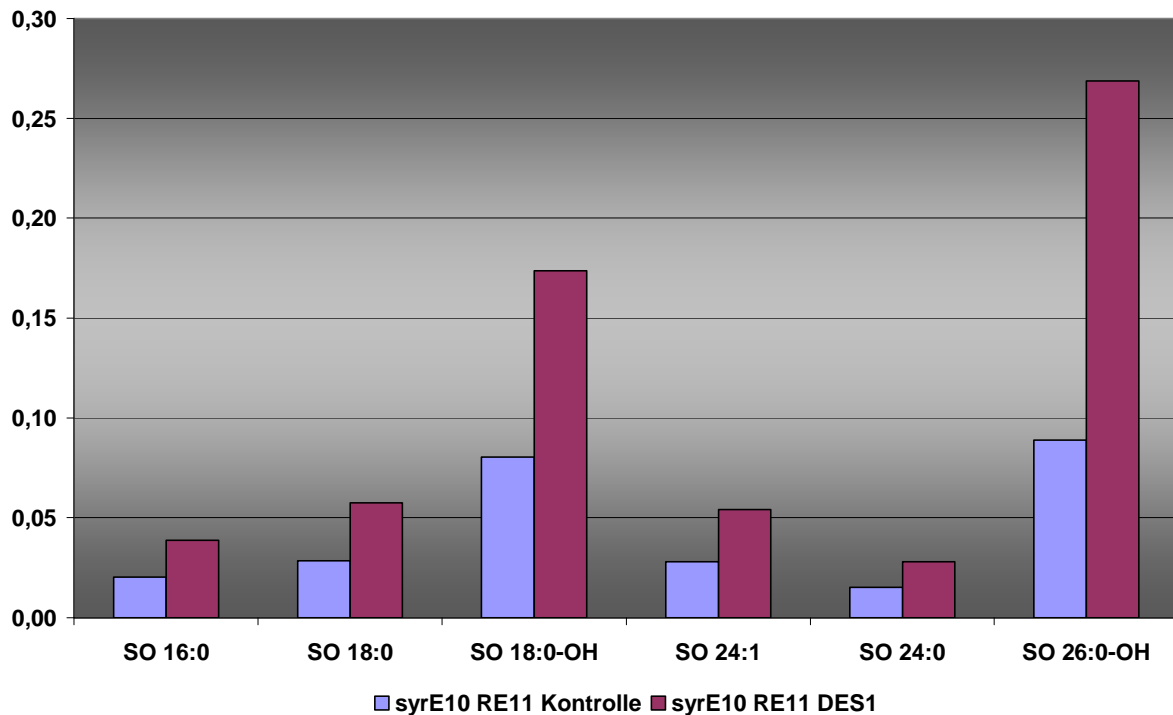


Abbildung 26: Vergleich der Ceramid-Konzentrationen in *P. ciferrii* syrE10 RE11 mit und ohne Überexpression des *DES1*-Gens mittels ESI-MS/MS. Angegeben sind die Konzentrationen der Ceramide (SO: Sphingosin) mit unterschiedlichen Fettsäureseitenketten in nmol/mg Protein (z.B. 24:1: C24 mit einer Doppelbindung). Detektiert wurde hier lediglich eine geringere Anzahl verschiedener Ceramide.

In Übereinstimmung mit der Hypothese, dass *P. ciferrii* Des1p Dihydroceramide mit sehr verschiedenen Fettsäureseitenketten als Substrat akzeptiert, nehmen bei Überexpression von *DES1* die Konzentrationen aller Ceramidspezies zu. Die signifikantesten Unterschiede finden sich beim Dihydroceramid bzw. Ceramid mit einer C_{26:0-OH}-Seitenkette, so dass davon auszugehen ist, dass dies das vornehmlich durch die Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase aus *P. ciferrii* umgesetzte Substrat ist. Ob dies allerdings in den kinetischen Parametern des Enzyms oder der Dominanz des Substrates begründet ist, bleibt unklar. Aufgrund der sehr niedrigen Ausgangswerte im Kontrollstamm ist die Signifikanz der Werte bezüglich kürzerkettiger Fettsäuren fraglich, so dass hier keine abschließende Aussage getroffen werden kann.

3.3 Sphingolipid-Zusammensetzung und Sphingolipid-Biosynthese in verschiedenen *P. ciferrii*-Stämmen

3.3.1 Zwei Gruppen von *P. ciferrii* Stämmen: TAPS- vs. TriASa-Produzenten

Im Zuge der klassischen Stammentwicklung wurden von *P. ciferrii*-Stämmen für deren Einsatz bei der biotechnologischen Herstellung von Sphingoidbasen verschiedene Stämme generiert, die Phytosphingosin und Sphinganin, jeweils im Wesentlichen in acetylierter Form, in unterschiedlichen Mengen akkumulieren.

Die Mutagenese zur Generierung von TAPS-Produzenten erfolgte mittels der Behandlung mit chemischen Reagenzien bzw. der Bestrahlung mit UV-Licht.

Zur Selektion der Sphinganin-Produzenten ist eine Blockade des Wegs zum Phytosphingosin nötig, welche durch die Inaktivierung der Sphinganin-Hydroxylase, codiert durch *SYR2*, erzielt wird. Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass *syr2Δ*-Mutanten (in *S. cerevisiae* *SUR2* genannt) resistent gegenüber dem Fungizid Syringomycin-E sind (Adetuyi *et al.*, 1995). Dieses Wissen wurde durch Bae *et al.* (2004) auf *P. ciferrii* übertragen und durch die Firma Cosmoferm genutzt, indem Syringomycin-E zur Selektion von *syr2*-Mutanten verwendet wurde, die Sphinganin akkumulieren (Patentanmeldung: WO 2006/048458). Aus dem WT sind die Syringomycin-E-resistenten TriASa-Produzenten *syrE10* RE11 und SPS103 entstanden. Die beiden Stämme *syr2* 1-3 RE10 und 23 sind aus einem TAPS-Produzenten mittels Selektion über Syringomycin-E isoliert worden.

Zur Aufklärung der Zusammensetzung der Phytoceramid-, Dihydroceramid- und Ceramidfraktionen bezüglich der Fettsäureseitenkette in diesen *P. ciferrii*-Stämmen wurden ESI-MS/MS-Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse in Bezug auf die Zusammensetzung der Phytoceramide in den TAPS-Produzenten - überwiegend PS-C_{24:0-OH} und PS-C_{26:0-OH} - und der Dihydroceramid-Fraktion in den TriASa-Produzenten - SA-C_{26:0-OH} und SA-C_{2:0} - wurde bereits im Rahmen der Klärung der Substratspezifität der Ceramid-Synthasen im vorigen Abschnitt erläutert. In Bezug auf die Ceramid-Konzentration zeigt sich im Vergleich TAPS- zu TriASa-Produzenten ein deutlicher Anstieg in der Konzentration der Ceramide mit einer Fettsäurekettenlänge von C_{18:0-OH}, C_{26:0-OH} und zusätzlich bei den beiden COS22A abgeleiteten Stämmen *syr2* 1-3 RE10 und 23 mit C_{18:0} Kohlenstoffatomen (Abb. 27). Das ist in Übereinstimmung mit den bereits gezeigten Ergebnissen zur Substratspezifität der Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase aus *P. ciferrii* und deutet darauf hin, dass die Blockierung des

Biosyntheseweges zum Phytosphingosin und die damit verbundene Akkumulation von Sphinganin, im Wesentlichen in seinen acetylierten Formen, zu einem verstärkten Umsatz von Sphinganin zu Sphingosin, oder Sphingosin-basierten Ceramiden, führt.

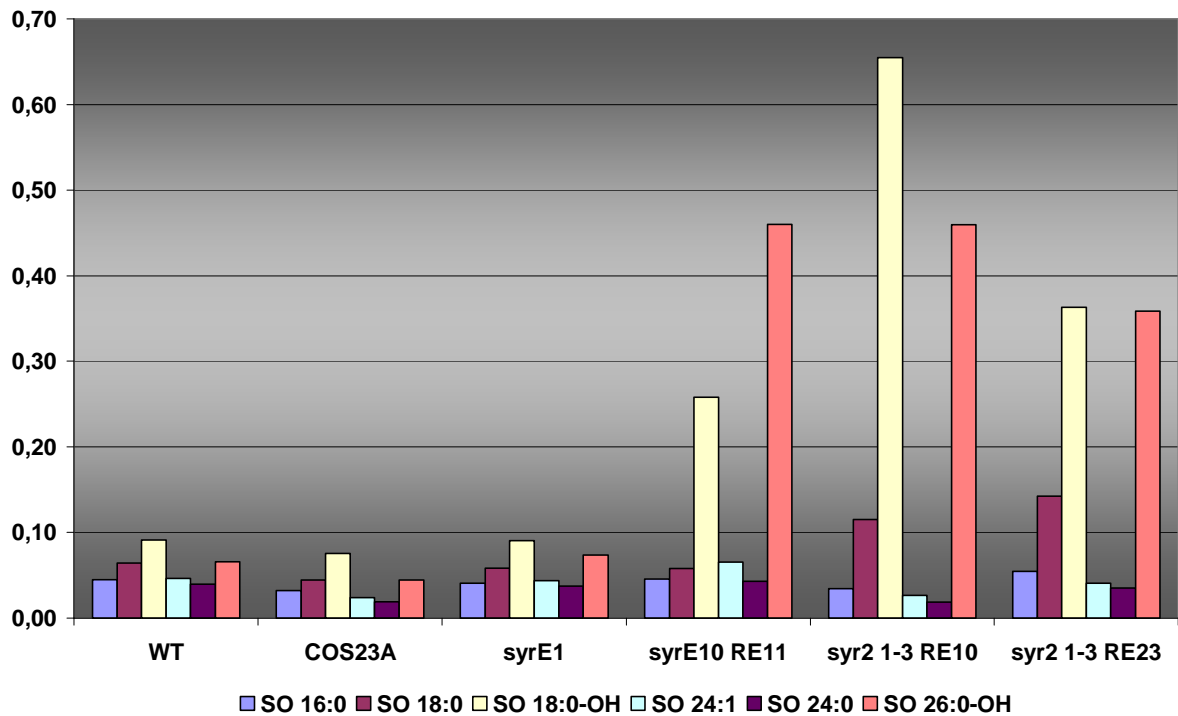


Abbildung 27: Konzentration der Ceramide in TAPS- und TriASa-Produzenten ermittelt durch ESI-MS/MS-Analysen. Angegeben sind die Konzentrationen der Ceramide (SO: Sphingosin) mit unterschiedlichen Fettsäureseitenketten in nmol/mg Protein (z.B. 26:0-OH: C26 mit einer Hydroxylgruppe).

Zusätzlich zu dem Anstieg der Ceramid-Level in den TriASa-Produzenten, kommt es, verglichen mit den TAPS-Produzenten, zudem noch zu einem Konzentrations-Anstieg der Ceramide mit Δ^4 - Δ^8 -Sphingadienin als Sphingoidbase (Abb. 28).

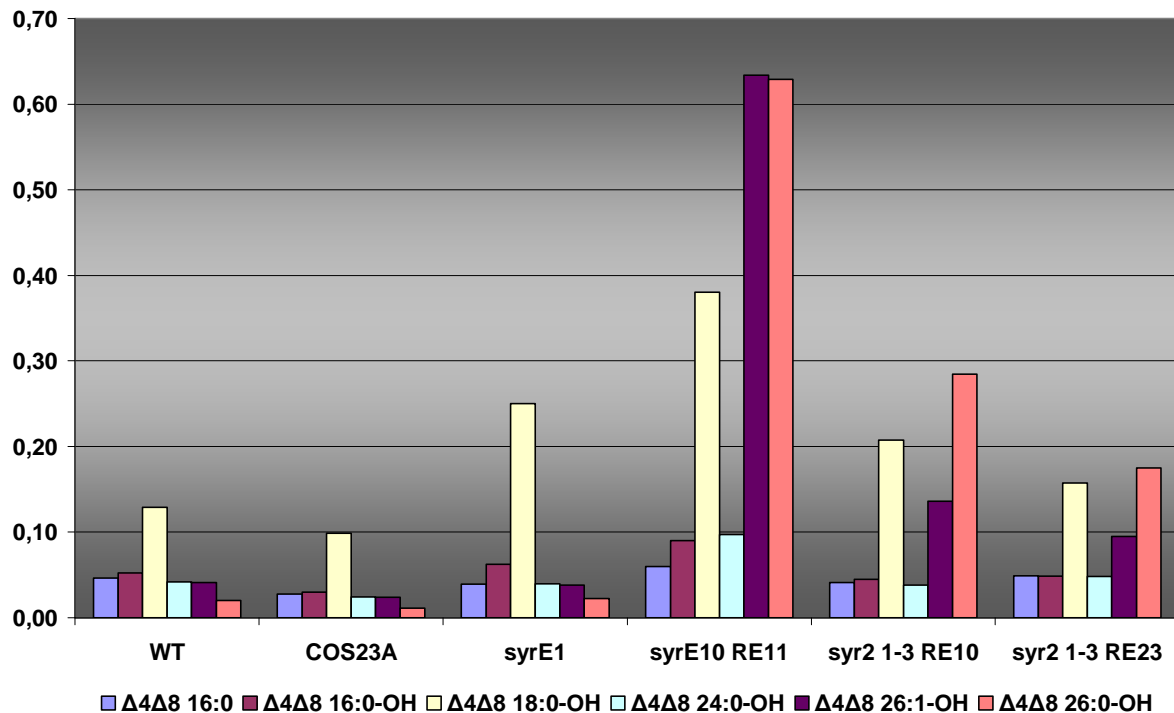


Abbildung 28: Konzentration der Ceramide mit Δ^4 - Δ^8 -Sphingadienin als Sphingoidbase in TAPS- und SA-Produzenten ermittelt durch ESI-MS/MS-Analysen. Angegeben sind die Konzentrationen der Ceramide ($\Delta^4\Delta^8$: Δ^4 - Δ^8 -Sphingadienin) mit unterschiedlichen Fettsäureseitenketten in nmol/mg Protein (z.B. 26:1-OH: C26 mit einer Doppelbindung und einer Hydroxylgruppe).

Dominiert bei den TAPS-Produzenten noch Sphingadienin-basiertes Ceramid mit einer $C_{18:0-OH}$ -Fettsäure, so kommt es bei den TriASa-Produzenten zu einem drastischen Anstieg der Konzentration der Sphingadienin-basierten Ceramide mit einer $C_{26:0-OH}$ und $C_{26:1-OH}$ -Fettsäure, was als ein Indiz für die Bevorzugung von Ceramiden mit einer C_{26} -Fettsäure durch die Sphingolipid- Δ^8 -Desaturase gewertet werden kann.

3.3.2 Molekulare Charakterisierung von *P. ciferrii* TAPS-Produzenten

Da die oben eingeführten *P. ciferrii* TAPS-Produzenten alle durch so genannte klassische Stammentwicklung, also wiederholte Runden von Mutagenese und Selektion, erzeugt wurden, sind die molekularen Grundlagen der im Vergleich zum WT stark erhöhten TAPS-Produktion nicht bekannt. Daher sollte untersucht werden, ob diese ihre Ursache in Mutationen in jenen Genen hat, die für die Biosynthese von Phytosphingosin, ausgehend von Serin und Palmitoyl-CoA, benötigt werden.

Die Amplifikation und anschließende Sequenzierung der Gene *LCB1*, *TSC10* und *SYR2* in den Stämmen COS22A und COS23A ergab jedoch keinerlei Unterschiede

zwischen den Sequenzen der beiden TAPS-Produzenten und jenen des WT. Lediglich in der *LCB2*-Sequenz beider Stämme fand sich ein Basenpaar-Austausch im Promotor-Bereich, 111 bp stromaufwärts des Start-Codons. Zusätzlich fanden sich elf Abweichungen in der *LCB2*-Sequenz des WT's (F-60-10A NRRL 1031) zu der von Bae *et al.* (2003) publizierten Sequenz des gleichen WT's (Genbank-Eintrag # AF053456). Um festzustellen ob die in den TAPS-Produzenten COS22A und COS23A gefundene Mutation im Promotor-Bereich des *LCB2*-Gens einen Einfluss auf dessen Transkriptionsrate hat, wurden qRT-PCR's durchgeführt. Der Vergleich der mRNA-Spiegel des *LCB2*-Gens zeigte keinerlei Unterschiede zwischen dem WT und den TAPS-Produzenten (0,6 mit *TDH1* als interner Referenz und 1,2 mit *ACT1* als interner Referenz). Die im *LCB2*-Promotor festgestellte Mutation hat somit vermutlich keine Auswirkung auf die Transkription des *LCB2*-Gens. Darüber hinaus wurden auch die mRNA-Spiegel der anderen Phytosphingosin-Biosynthesegene, *LCB1*, *TSC10* und *SYR2*, in den drei Stämmen verglichen. Es konnten keinerlei signifikante Unterschiede in den relativen mRNA-Spiegeln der Gene *LCB1* (0,7 / 1,4), *TSC10* (0,5 / 1,1) und *SYR2* (0,9 / 1,8) festgestellt werden (Tab. 15 im Anhang). Somit bleibt der molekulare Hintergrund der gesteigerten TAPS-Synthese ungeklärt. Er ist jedoch nicht auf Mutationen in den Phytosphingosin-Biosynthesegenen zurückzuführen, die deren Expression oder Aktivität verstärken.

3.3.3 Molekulare Charakterisierung von *P. ciferrii* TriASa-Produzenten

Die TriASa-Produzenten syrE10 RE11 sowie syr2 1-3 RE10 und 23 wurden, wie oben beschrieben, ebenfalls mittels klassischer Stammentwicklung generiert. Die Selektionsmethode zielte auf die Anreicherung von *syr2*-Mutanten, die erhöhte TriASa-Mengen produzierten. Selektiert wurde hierfür auf eine Syringomycin-E-Resistenz, da beschrieben ist, dass diese auf eine Mutation im *SYR2*-Gen zurückzuführen ist (Adetuyi *et al.*, 1995). Diese Inaktivierung der C4-Hydroxylase führt dann zur Akkumulation von Sphingarin bzw. TriASa.

Zur näheren Charakterisierung der drei Mutanten wurden diese in Bezug auf die *SYR2*-Sequenz verglichen. Die beiden aus einem TAPS-Produzenten entstandenen TriASa-Produzenten syr2 1-3 RE10 und 23 wiesen in der *SYR2*-Sequenz keinen Unterschied zum Ausgangsstamm und somit zum WT auf. Der direkt aus dem WT entstandene syrE10 RE11 hingegen trägt eine *missense*-Mutation an Nukleotidposition +794 des *SYR2*-ORFs (AAT \Rightarrow AAA). Dies führt an Aminosäureposition 265 zu ei-

nem Austausch von Asparagin zu Lysin, welches an dieser Stelle hoch konserviert ist (Abb. 52 im Anhang). Der Austausch dieser hoch konservierten AS ist somit vermutlich als molekulare Basis für die erhöhte TriASa-Synthese in diesem Stamm anzusehen. Die mRNA-Spiegel des *SYR2*-Gens in den TriASa-Produzenten wurden wiederum durch qRT-PCR's mit denen des WT verglichen. Der die *missense*-Mutation tragende Stamm *syrE10 RE11* weist keine veränderten mRNA-Spiegel des *SYR2*-Gens verglichen mit dem WT auf (1,13 / 1,21 für *TDH1* bzw. *ACT1* als Referenz). Im Gegensatz dazu zeigten sich in den beiden, aus einem TAPS-Produzenten entstandenen Stämmen *syr2 1-3 RE10* und *23* deutlich verringerte mRNA-Spiegel (7- bis 20-fach) des *SYR2*-Gens im Vergleich zum Ausgangsstamm. Die mRNA-Spiegel liegen im Stamm *syr2 1-3 RE10* bei 0,12 (*TDH1* als Referenz), sowie 0,04 (*ACT1* als Referenz). Für den Stamm *syr2 1-3 RE23* liegt der mRNA-Spiegel bei internem Abgleich mit *TDH1* als Referenz bei 0,15, sowie bei 0,04 (*ACT1* als Referenz) (Tab. 16 im Anhang). Dieser deutlich gesenkte mRNA-Spiegel könnte seine Ursache somit in einer reduzierten Transkriptionsrate des *SYR2*-Gens haben, die zu niedrigeren zellulären Konzentrationen des Enzyms Sphingolipid-C4-Hydroxylase, welche höchstwahrscheinlich die erhöhte Sphinganin-Synthese durch partielle Blockade des Biosynthesewegs zum Phytosphingosin verursacht. Da auch die Promotorregionen des *SYR2*-Gens in diesen Stämmen identisch zu der des WT ist, muss hier davon ausgegangen werden, dass Regulationsvorgänge, die die Transkription des *SYR2*-Gens steuern, im Verlauf der klassischen Stammentwicklung verändert wurden.

3.4 Entwicklung von Selektionssystemen für *P. ciferrii*

3.4.1 Etablierung eines Uracil-basierten Selektionssystems

Zu Beginn dieser Arbeit existierte lediglich ein System zur Transformation von *P. ciferrii*. Das von Bae *et al.* (2003) ausgearbeitete Transformationssystem basiert auf der Integration eines Vektors in den intergenischen und nicht transkribierten Bereich zwischen 5S und 26S rDNA unter Vermittlung einer Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Cycloheximid. Dieses Selektions-/Transformations-System ist jedoch patentrechtlich geschützt (US 6,638,735 B1) und somit nicht kommerziell nutzbar. Darüber hinaus sind Antibiotikaresistenz-basierte Selektionssysteme für die großtechnische Anwendung wegen Sicherheitsaspekten und Kostengründen ungeeignet. Für

die Nutzfarmachung des Organismus zur fermentativen Herstellung von TriASo war es somit unumgänglich, alternative Selektionssysteme zu entwickeln.

In Hefen, insbesondere in *S. cerevisiae*, ist die Nutzfarmachung einer Uracil-Auxotrophie zu Selektionszwecken weit verbreitet. Boeke *et al.* etablierten 1984 die Positiv-Selektion von Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase-defizienten Stämmen (*ura3*-Mutanten) aus *S. cerevisiae* durch Verwendung von 5-Fluororotinsäure (5FOA). Durch Transformation dieser Mutanten mit einem *URA3*-tragenden Vektor, ließ sich die erzeugte Uracil-Auxotrophie komplementieren (Boeke *et al.*, 1987).

Um sich dieses Selektionssystem zunutze zu machen, wurden zunächst Uracil-auxotrophe *P. ciferrii*-Mutanten aus dem WT generiert. Hierzu wurden $5,1 \cdot 10^7$ Zellen einer ÜNK auf einem 5FOA-haltigen [1g/L] YNB-Medium ausplattiert und für 6d bei 30°C inkubiert. Die 28 erhaltenen 5FOA-resistenten Kolonien (entspricht einer Mutationsrate von $5,5 \cdot 10^{-7}$) wurden zum Test auf das Vorliegen einer Uracil-Auxotrophie auf YNB-Medium mit bzw. ohne Uracil vereinzelt. Drei der 28 Mutanten wiesen Wachstum ohne das Vorhandensein von Uracil im Medium auf. Die restlichen 25 Mutanten wurden unselektiv in flüssigem YPD-Medium angezogen, um diese auf die Reversion zur Uracil-Prototrophie zu testen. Nach dreitägigem Wachstum wurden jeweils 100 µl der stationären Kulturen auf YNB-Medium ohne Uracil ausplattiert und für drei Tage bei 30°C inkubiert. 16 Mutanten wiesen ein konfluentes, vier ein Wachstum in Einzelkolonien auf, was auf die Reversion der Uracil-Auxotrophie hinweist. Fünf der Uracil-auxotrophen Mutanten zeigten keinerlei Reversion nach unselektivem Wachstum. Diese wurden in einer zweiten Runde getestet, wiesen jedoch nach wie vor keine Reversion auf.

Um sicherzustellen, dass die für die Auxotrophie ausschlaggebende Mutation im *URA3*-Gen liegt, wurde zunächst das *URA3*-Gen aus dem WT von *P. ciferrii* isoliert. Die Vorgehensweise entspricht der Isolation der unbekanntenen Gene des Sphingolipid-Biosynthesewegs (s.o.). Über diesen Weg wurden 2359 bp isoliert, wovon 804 bp für das potentielle Ura3p aus *P. ciferrii* codieren. Das somit 267 AS lange Protein (Abb. 53 im Anhang) weist mit 76% (91%) positioneller Aminosäure-Identität (-Ähnlichkeit) die stärkste Ähnlichkeit zu einem potentiellen Ura3p von *Debaromyces hansenii* (Genbank-Eintrag # XP_456850) auf. Zudem findet sich eine 75%- (89%-

ige) positionelle Aminosäure-Identität (-Ähnlichkeit) zur Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase (Ura3p) aus *Candida albicans* (Genbank-Eintrag # EAL02877), deren Strukturgen in der Lage ist, Mutationen im *ura3*-Gen von *S. cerevisiae* zu komplementieren (Losberger und Ernst, 1989). Neben diesen Ähnlichkeiten in der Proteinsequenz findet sich auch noch die charakteristische AS-Abfolge für das aktive Zentrum von Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylasen höherer Eukaryonten (Jacquet *et al.*, 1988; Kimsey und Kaiser, 1992) in den AS 89-102 (Abb. 54 im Anhang). Die angestellten Vergleiche und Sequenzanalysen unterstreichen, dass es sich bei dem isolierten Gen um *P. ciferrii URA3* handelt.

Um festzustellen, ob im *URA3*-Gen der nicht revertierenden Uracil-auxotrophen Klone eine Mutation vorliegt, wurde dieses amplifiziert und sequenziert. Überraschenderweise fanden sich in den fünf analysierten Mutanten lediglich zwei verschiedene Mutationen. Die Klone 10, 14, 20 und 28 tragen alle die gleiche *missense*-Mutation: an Nukleotidposition +439 des *URA3*-ORFs kommt es zu einem Austausch von Guanin zu Thymin (GGG zu GTG), wodurch die an Position 147 liegende AS Glycin durch Valin ersetzt wird. Glycin ist an dieser Position auch in anderen Ura3p aus Hefen hoch konserviert vor (Abb. 54 im Anhang). Der Klon 6 hingegen trägt eine *nonsense*-Mutation an Nukleotidposition +348 des *URA3*-ORFs, welche das Codon TGG zu TGA verändert. Das für Tryptophan codierende Codon wird somit durch ein Stop-Codon ersetzt, was zur Translation eines um 152 AS verkürzten Proteins (115 statt 267 AS) führt.

Ein möglicher Einfluss der Mutationen auf die Transkriptionsrate des *URA3*-Gens wurde mittels qRT-PCR untersucht. In den, eine *missense*-Mutation tragenden Klonen 10, 14, 20 und 28 konnten keine Unterschiede der mRNA-Spiegel, verglichen mit dem WT, festgestellt werden. Die Werte lagen zwischen 0,8 (*TDH1* als interne Referenz) und 1,3 (*ACT1* als interne Referenz) (Tab. 17 im Anhang). Im Klon 6 fand sich jedoch ein, um den Faktor 5 verringerter mRNA-Spiegel (0,2 bei *TDH1* und *ACT1* als Referenz; Tab. 17 im Anhang). Dies geht vermutlich auf den so genannten "*nonsense-mediated mRNA decay*" zurück, der zum Abbau verkürzter mRNAs führt (González *et al.*, 2001).

Zur Bestätigung der Mutation als Ursache der Uracil-Auxotrophie, wurden die fünf auxotrophen Klone mit einem, das *URA3*-Gen aus *P. ciferrii* tragenden Vektor (pDB008, Abb. 71 im Anhang) transformiert. Als Integrationsort diente der intergenische und nicht transkribierte Bereich zwischen 5S und 26S rDNA. Der Transformationsansatz wurde auf YNB-Medium ohne Uracil ausplattiert und für drei Tage inkubiert. Bei jedem der fünf Klone bildeten sich bei den Transformationsansätzen mit dem Vektor pDB008 Kolonien, wohingegen die H₂O-Kontrollen leer blieben. Einzelne Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR auf die korrekte Integration in den 5S-26S rDNA-intergenischen Bereich untersucht. Bei ca. der Hälfte der untersuchten Transformanten lag der Vektor korrekt integriert vor. Es konnte somit gezeigt werden, dass das auf *URA3* basierende Selektionssystem aus *S. cerevisiae* auf *P. ciferrii* übertragbar ist. Somit wurde ein alternatives, Antibiotika-freies System zur Selektion von Transformanten etabliert.

Das für den WT etablierte Selektionssystem wurde auf zwei weitere Stämme übertragen - die beiden TAPS-Produzenten COS22A und COS23A. Ausgehend von beiden Stämmen wurden mittels 5FOA, nicht revertierende, Uracil-auxotrophe Mutanten isoliert. Deren Auxotrophie konnte in allen Fällen durch Transformation mit dem *URA3*-Gen tragenden Vektor pDB008 komplementiert werden. Exemplarisch wurde bei einem der aus COS23A hervorgegangenen Mutanten, das *URA3*-Gen sequenziert. Es fand sich eine Deletion an Nukleotidposition +770 des *URA3*-ORFs, welche zum Austausch des, für die AS Tryptophan codierenden Triplets TGG zu TGA (Stop-Codon) führt. Es kommt somit zur Translation eines um 11 AS verkürzten Ura3p (256 statt 267 AS), welches aufgrund der erzielten Ergebnisse offenbar katalytisch nicht oder nur geringfügig aktiv ist.

Die Übertragung des Selektionssystems auf den TriASa-Produzenten syrE10 RE11 scheiterte jedoch an dem Versuch lebensfähige, nicht revertierende Mutanten zu generieren. Es konnten deutlich weniger 5FOA resistente Klone als bei den entsprechenden Versuchen mit dem WT bzw. den TAPS-Produzenten isoliert werden. Diese erwiesen sich jedoch nach einmaligem Überstreichen auf YPD-Medium als nicht lebensfähig.

3.4.2 Etablierung eines Lysin-basierten Selektionssystems

Analog zur Etablierung eines, auf einer Uracil-Auxotrophie basierenden Selektionssystems, wurde ein System zur Transformation mittels eines *LYS2*-tragenden Vektors etabliert.

WT-Stämme von *S. cerevisiae* können α -Aminoadipat nicht als Stickstoffquelle verwenden, wohingegen *lys2*-codiert für die α -Aminoadipat-Reduktase - und *lys5*-codiert für die Phosphopantetheinyl-Transferase - Mutanten, die einen Defekt in der α -Aminoadipat-Reduktase tragen, diese Fähigkeit besitzen. Zur Selektion der entsprechenden Mutanten wurde ein synthetisches Medium gewählt, welches Lysin und alle weiteren nötigen Zusätze, jedoch als einzige Stickstoffquelle α -Aminoadipat enthält. Wachstum ist somit nur für Mutanten mit einem Defekt in der α -Aminoadipat-Reduktase möglich (Chattoo *et al.*, 1979). Hierauf aufbauend entwickelten Barnes und Thorner (1986) ein Selektionssystem zur Komplementation der Lysin-Auxotrophie von *lys2*-Mutanten und Borell und Bhattacharjee (1988) ein System zur Komplementation der Auxotrophie von *lys5*-Mutanten.

Zur Generierung von Lysin auxotrophen Mutanten aus dem WT von *P. ciferrii* wurde dieser auf α -Aminoadipat-haltigem Medium [1,5/ 2,0/ 2,5 g/L] mit bzw. ohne Lysin ausplattiert. Nach dreitägiger Inkubation bildeten sich nur auf dem Medium mit Lysin Kolonien. Von allen drei α -Aminoadipat-haltiger Medien wurden Einzelkolonien zum Test auf mögliche Reversion zum Lysin-prototrophen Phänotyp in unselektivem YPD-Medium für vier Tage inkubiert, in frisches YPD-Medium überimpft und nach weiteren zwei Tagen Wachstum auf synthetischem Medium ohne Lysin ausplattiert. Auch nach sechs Tagen Inkubation zeigten drei der 14 getesteten Klone keinerlei Wachstum und besaßen daher offenbar unter den getesteten Bedingungen eine irreversible Lysin-Auxotrophie (Klon 7: 2,0 g/L sowie Klone 12 und 13: 1,5 g/L α -Aminoadipat).

Um festzustellen, ob die vorliegende Lysin-Auxotrophie auf eine Mutation im *LYS2*- oder *LYS5*-Gen zurückzuführen ist, wurden Komplementationsversuche mit dem *LYS2*- (pDB010, Abb. 72 im Anhang) und dem *LYS5*-Gen (pDB011, Abb. 73 im Anhang) aus *S. cerevisiae* durchgeführt. Als Integrationsort wurde der intergenische Bereich zwischen der 5S und 26S rDNA verwendet. Die angestellten Versuche führten jedoch nicht zum Erhalt von Transformanten. Da in diesem Fall weder die Transkriptmenge, noch das Vorhandensein der entsprechenden Proteine in den Transfor-

manten untersucht wurde, ist nicht auszuschließen, dass das Ausbleiben der Komplementation auf Probleme bei der Synthese des entsprechenden Proteins zurückzuführen ist. Ebenso denkbar ist, dass die Proteine aus *S. cerevisiae* in *P. ciferrii* nicht funktionell sind.

Somit wurde es notwendig das *LYS2*- sowie das *LYS5*-Gen aus *P. ciferrii* zu isolieren. Dieses erfolgte im Falle des *LYS2*-Gens analog zu den oben beschriebenen Wegen. 5.900 bp konnten isoliert und sequenziert werden, wovon 4.188 bp für das potentielle *Lys2p*-Gen aus *P. ciferrii* codieren. Dieses besitzt eine Länge von 1.395 AS (Abb. 55 im Anhang) und weist mit 65% (79%) positioneller Aminosäure-Identität (-Ähnlichkeit) die stärkste Ähnlichkeit zur α -Aminoadipat-Reduktase von *Candida albicans* auf (Genbank-Eintrag # EAL02670). Das *LYS2*-Gen aus *Candida albicans* ist in der Lage *lys2*-Mutanten aus *S. cerevisiae* zu komplementieren (Suvarna *et al.*, 1998). Zudem wurde biochemisch gezeigt, dass das *Lys2p* aus *Candida albicans* eine α -Aminoadipat-Reduktase-Aktivität besitzt (Guo *et al.*, 2001), womit es sich bei dem aus *P. ciferrii* isolierten Gen höchstwahrscheinlich um *LYS2* handelt.

Im Falle des *LYS5*-Gens misslang die Isolation aus *P. ciferrii* mittels degenerierter Primer, da die Konserviertheit des Proteins innerhalb der verschiedenen Hefe-Spezies auffallend gering ist. Die Verwendung der abgeleiteten Primer führte daher zur Amplifikation unspezifischer Sequenzen.

Zum Test der Komplementierbarkeit wurde zunächst eine der drei vorliegenden, Lysin-auxotrophen Mutanten (Klon 13) mit einem *P. ciferrii* *LYS2*-Gen tragenden Vektor (pDB012, Abb. 74 im Anhang) transformiert. Dies führte zur Komplementation der Lysin-Auxotrophie und somit zum Wachstum ohne Zugabe von Lysin. Auf der korrespondierenden H₂O-Kontrolle bildeten sich keine Kolonien. Zur Bestimmung der korrekten Integration des Vektors in den intergenischen Bereich zwischen der 5S und 26s rDNA wurden Kolonie-PCR's durchgeführt, die in vier von acht Fällen eine korrekte Integration nachwiesen. Es konnte somit gezeigt werden, dass die durch Positiv-Selektion mittels α -Aminoadipat erhaltene *P. ciferrii*-Mutante, durch Transformation mit dem *P. ciferrii*-eigenen *LYS2*-Gen komplementiert werden kann.

Zur Analyse der molekularen Basis der Lysin-Auxotrophie wurde das *LYS2*-Gen der drei isolierten lys-Mutanten amplifiziert und sequenziert. Überraschenderweise fand sich jedoch in keiner der drei Mutanten eine Mutation, weder im Gen selbst, noch in der Promotor- bzw. Terminator-Sequenz. Daraufhin wurde die Transkription des *LYS2*-Gens untersucht, um einen möglichen regulatorischen Defekt zu detektieren. Die qRT-PCR-basierte Analyse der mRNA-Spiegel des *LYS2*-Gens in den drei Mutanten und drei Transformanten von Klon 13 mit pDB012 zeigte ein uneinheitliches Bild. Klon7 weist einen um $\frac{1}{3}$ niedrigeren mRNA-Spiegel des *LYS2*-Gens im Vergleich zum WT auf (0,67 bzw. 0,62 mit *TDH1* bzw. *ACT1* als Referenz), was durchaus auf einen regulatorischen Defekt der Expression des *LYS2*-Gens schließen lassen könnte, jedoch eine Mutation im *LYS5*-Gen als Ursache der Lysin-Auxotrophie nicht ausschließt. Klon12 zeigte einen deutlichen Defekt in der Regulation der *LYS2*-Transkription. Der *LYS2*-mRNA-Spiegel liegt hier um einen Faktor 10 bis 20 unter WT-Niveau (0,10 bzw. 0,05 mit *TDH1* bzw. *ACT1* als Referenz). Der zur Komplementation mit *LYS2* verwendete Lysin-auxotrophe Klon13 hingegen wies überraschenderweise keinen im Vergleich zum WT veränderten mRNA-Spiegel auf (1,12 bzw. 0,93 mit *TDH1* bzw. *ACT1* als Referenz). Die Komplementation der im Klon13 vorliegenden Lysin-Auxotrophie durch Transformation mit dem *LYS2*-Gen tragenden Vektor pDB012 führte wie erwartet zu einer Verdopplung der Transkriptionsrate bei allen drei getesteten Transformanten (Tab. 18 im Anhang). Der molekulare Hintergrund der Lysin-Auxotrophie und der Komplementierbarkeit mittels des *LYS2*-Gens im Klon13 bleibt somit unklar.

3.5 Rationale Stammentwicklung der Hefe *P. ciferrii* zur fermentativen Herstellung von TriASo

(Patentanmeldung: WO 2006/048458)

3.5.1 Spingosin: Chemische vs. fermentative Herstellung

Vor Beginn dieser Arbeiten wurde ein Weg zur chemischen Synthese von Spingosin von der Degussa GmbH entwickelt und zum Patent angemeldet (Patentanmeldung: EP1452520). Im April 2007 wurde das erste Produkt mit Spingosin-basierten Ceramiden als kosmetischem Wirkstoff in den Markt eingeführt. Aufgrund des sehr hohen Herstellungspreises von chemisch synthetisiertem Spingosin wurde ein alternativer, fermentativer Prozess für die Herstellung von Spingosin als möglicherweise deutlich

kosteneffizienter in Betracht gezogen. Ausgehend von den Erfahrungen aus der fermentativen Herstellung von TAPS durch *P. ciferrii* und den durch klassische Stammentwicklung generierten TAPS- bzw. TriASa-Produktionsstämmen, wurde daher eine entsprechende Prozessentwicklung in Angriff genommen.

3.5.2 Strategie zur Entwicklung eines Triacetylsphingosin-Produzenten

Die Entwicklung eines TriASo-Produzenten wurde ausgehend von verschiedenen Stämmen anvisiert. Zum einen von einem TAPS- und zum anderen von TriASa-Produzenten, die allesamt über die klassische Stammentwicklung generiert wurden. Zur Entwicklung eines TriASo-Produzenten aus einem TAPS-Produzenten bedarf es zunächst einmal der Inaktivierung des *SYR2*-Gens, um die Synthese von Phytosphingosin zu blockieren und somit eine Akkumulation von Sphinganin zu erreichen. Ausgehend von einem durch klassische bzw. rationale Stammentwicklung generierten Sphinganin-Produzenten finden sich drei Enzyme im Sphingolipid-Biosyntheseweg auf dem Weg zum Sphingosin, die Ziele einer potentiellen Überexpression sind, Ceramid-Synthase, Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase und Ceramidase. Zusätzlich findet sich noch der Stoffwechselweg zur Synthese von Cerebrosid als potentielles zu inaktivierendes Ziel, um den Stofffluss von Sphingosin-basiertem Ceramid zu Sphingosin zu verstärken. Auch eine Unterbrechung des Abbaus von Sphingosin und hierbei insbesondere die Markierung zum Abbau durch die Phosphorylierung stellt ein geeignetes Ziel einer gezielten Inaktivierung dar.

3.5.3 Disruption des *SYR2*-Gens zum Erhalt von SA-Produzenten

Die mittels klassischer Stammentwicklung erhaltenen TriASa-Produzenten *syr2* 1-3 RE10 und 23, die aus einem TAPS-Produktionsstamm entstanden sind, weisen beide ein deutlich verschlechtertes Wachstum auf. Die End-OD_{600nm} nach viertägiger Inkubation in TAPS-Medium lag im Durchschnitt bei ca. 10, wohingegen die übrigen *P. ciferrii*-Stämme bis zu einer OD_{600nm} von 50 - 60 wuchsen (Ergebnisse nicht gezeigt). Sowohl das schlechte Wachstum, als auch die Möglichkeit der Reversion, der durch Selektion auf Syringomycin-E generierten Stämme, von SA- zu TAPS-Produzenten, ließ es als sinnvoll erachten, SA-Produzenten rationell zu entwickeln. Um den gegenüber dem WT verbesserten Fluss der Sphingoidbasen-Biosynthese des Stammes COS22A, erkennbar an dessen hoher Produktivität bezüglich TAPS,

auch für die Sphingarin-Akkumulation bzw. die Sphingosin-Biosynthese nutzbar zu machen, wurde in einem ersten Ansatz die gezielte Disruption des *SYR2*-Gens in diesem Stamm anvisiert. Ein Vektor, der ein internes Fragment (Basenpaare 21 – 608) des *SYR2*-ORFs enthält und als Resistenzmarker die codon-optimierte Form des Nourseothricin-Resistenz-Gens (*nat1*; nähere Informationen zur Codon-Optimierung s.u.) trägt (p-mCER-nat1-SYR2, Abb. 75 im Anhang), wurde innerhalb des internen *SYR2*-Fragmentes mit der Restriktionsendonuklease *Mph1103I* linearisiert und zur Transformation des Stammes COS22A verwendet. Erwartet wurde aufgrund der homologen Bereiche auf dem Vektor eine Rekombination im *SYR2*-Gen, welche zur Disruption und somit zur Inaktivierung der C4-Hydroxylase führen sollte. Auf der korrespondierenden H₂O-Kontrolle bildeten sich keinerlei Kolonien, wohingegen auf der eigentlichen Transformationsplatte zahlreiche Kolonien zu finden waren. 20 dieser Klone wurden für die HPLC-Analytik ihrer Sphingoidbasen-Produktion analysiert und in TAPS-Medium mit Nourseothricin angezogen. Dabei zeigte sich, dass die Klone 2 und 3 lediglich bis zu einer OD_{600nm} von 0,9 bzw. 1,3 wuchsen, wohingegen alle anderen Klone wie auch der Ausgangsstamm bis zu einer OD_{600nm} von 14,2 - 38,3 wuchsen (Abb. 29). Die Analyse der Transformanten zeigte, dass nur die zwei schlecht wachsenden Klone signifikante Mengen TriASa synthetisierten, während die TAPS-Produktion drastisch reduziert war (Ergebnisse nicht gezeigt).

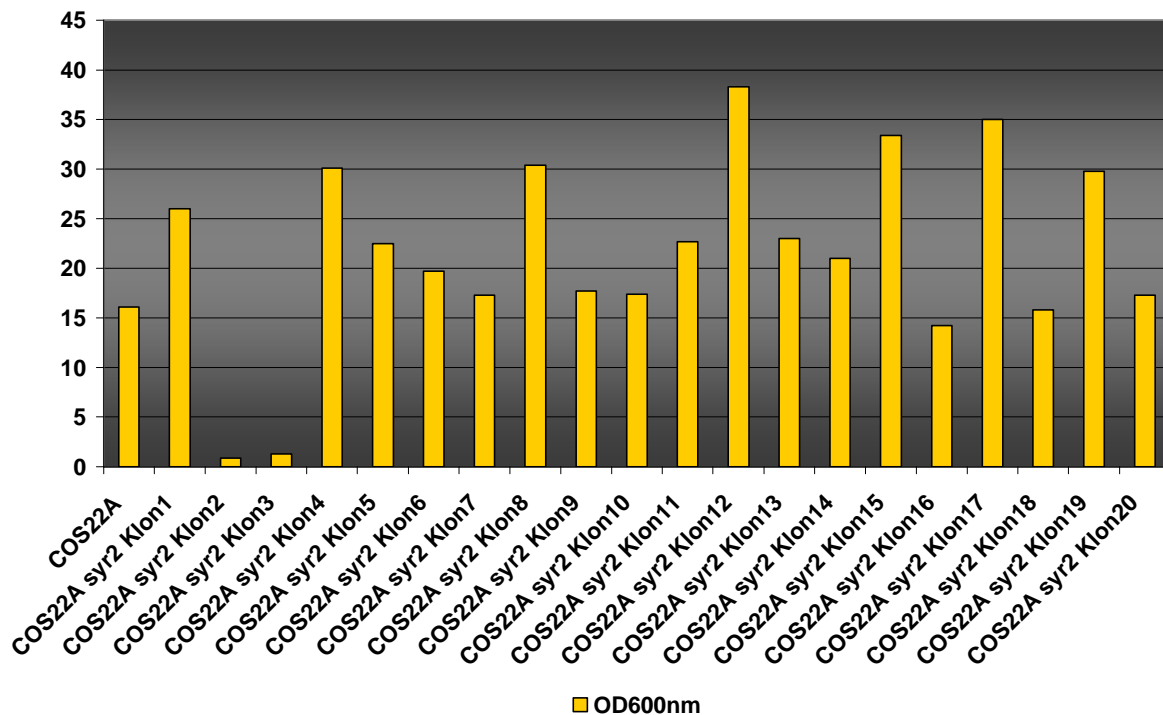


Abbildung 29: Wachstum von COS22A und COS22A p-mCER-nat1-SYR2. Gezeigt ist die OD_{600nm} nach 96 h Inkubation in TAPS-Medium bei 30°C und 250 rpm. Die Klone 2 und 3 zeigen deutlich schlechteres Wachstum.

Die Ergebnisse legen nahe, dass lediglich in den Klonen 2 und 3 eine Disruption des *SYR2*-Gens durch homologe Rekombination des Vektors p-mCER-nat1-SYR2 ins Genom von *Pichia ciferrii* COS22A erzielt wurde. Wie auch bei den auf klassischem Wege erzeugten TriASa-Produktionsstämmen, führt die Inaktivierung von *SYR2* offensichtlich zu einer Verschlechterung der Vitalität, was möglicherweise durch eine Toxizität von Sphinganolin oder seiner acetylierten Formen, oder aber durch die Abwesenheit von Phytosphingosin bzw. TAPS zu erklären wäre. Gegen letzteres spricht allerdings, dass vom *P. ciferrii* WT abgeleitete TriASa-Produktionsstämmen keinen veränderten Wachstumsphänotyp besitzen. Zur Bestätigung des Vorliegens einer korrekten Integration und somit Disruption von *SYR2*, wurden mit allen 20 Klonen Kolonie-PCR's durchgeführt, welche nur dann zum Erhalt eines Amplifikats führen, wenn der Vektor korrekt integriert vorliegt. Zur Amplifikation eines 641 bp großen Fragments kam es wie erwartet nur bei den Klonen 2 und 3, womit unterstrichen wurde, dass lediglich diese beiden Transformanten eine Disruption des *SYR2*-Gens tragen und die verminderte Vitalität damit einhergeht. Allerdings kann nicht ganz

ausgeschlossen werden, dass auch in anderen Klonen eine korrekte Integration stattfand, da prinzipiell auch Amplifikationsprobleme ins Feld geführt werden können. Aufgrund der schlechten Wachstumseigenschaften und den vermutlich daraus resultierenden sehr geringen Sphinganin-Konzentrationen der *syr2*-Mutanten, die aus TAPS-Produzenten generiert wurden - sei es durch Selektion auf Syringomycin-E-Resistenz oder gezielte Inaktivierung des *SYR2*-Gens - wurde im Weiteren die Stammentwicklung ausgehend von einem WT-basierten TriASa-Produzenten betrieben.

3.5.4 Überexpression verschiedener Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturasen in einem TriASa-Produktionsstamm

In einem ersten Schritt zur Verstärkung des Biosyntheseweges von Sphinganin zu Sphingosin wurde die Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase überexprimiert. Nachdem für das Genprodukt des *P. ciferrii*-eigenen *DES1*-Gens eine Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase-Aktivität festgestellt werden konnte und zudem gezeigt wurde, dass bei dessen heterologer Überexpression in CEN.PK2-1C *syr2::KILEU2* nicht wesentlich mehr Sphingosin bzw. Ceramid gebildet wurde, als bei Überexpression der die Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturasen aus *Candida albicans* bzw. *Yarrowia lipolytica* kodierenden Gene (siehe 3.2.2 Des1p (Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase)), wurde das *P. ciferrii* *DES1* für erste Experimente herangezogen.

Die alleinige Überexpression des *DES1*-Gens in dem Stamm *P. ciferrii* *syrE10* RE11, wie in dem Abschnitt "3.2.2 Des1p (Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase)" zur Charakterisierung der Substratspezifität beschrieben wurde, führte jedoch bei Analyse mittels RP-HPLC nicht zu einer erhöhten Sphingosin-Konzentration (Daten nicht gezeigt).

3.5.5 Überexpression von Ceramid-Synthasen und Ceramidasen verschiedener Spezies in Kombination mit der Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase aus *P. ciferrii*

Das Ausbleiben eines positiven Effekts der Überproduktion der *P. ciferrii* Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase auf die gebildete Menge Sphingosin, lässt als eine unter mehreren Möglichkeiten vermuten, dass es notwendig ist, eine oder beide weiteren Enzymaktivitäten, die für die Umsetzung von Sphinganin zu Sphingosin benötigt wer-

den, ebenfalls zu verstärken. Dies gilt insbesondere dann, wenn die Einführung der Doppelbindung in Dihydroceramid nicht der limitierende Schritt in dieser Sequenz ist. Daher wurden im Folgenden auch Gene, die für Ceramidsynthasen und Ceramidasen kodieren, zusammen mit *P. ciferrii* *DES1* co-überexprimiert. Eine Zusammenstellung der derart erzeugten *P. ciferrii*-Stämme ist in Abb. 30 zu sehen.



Abbildung 30: Übersicht zu den in dieser Arbeit erzeugten *P. ciferrii* syrE10 RE11-Derivaten, in denen wenigstens eines der Sphingosin-Biosynthesegene überexprimiert wurde. Die Erklärung findet sich im Text (Abbildung durch S. Schaffer zur Verfügung gestellt).

Auf der linken Seite der Abbildung finden sich in rot verschiedene Ceramid-Synthase Untereinheiten aus *P. ciferrii*, *Ashbya gossypii* und *Mus musculus*.

Die *LASS*-Gene aus der Maus (*Mus musculus*) codieren für Ceramid-Synthasen, die verschiedene Substratspezifitäten bezüglich der Länge der Acyl-CoA-Thioester aufweisen. Die relativ nahe verwandten *Lass5p* und *Lass6p* zeigen in Anwesenheit von $C_{14:0}CoA$ - bzw. $C_{16:0}CoA$ -Thioestern die höchste Dihydroceramid-Synthase-Aktivität (Mizutani *et al.*, 2005). Da bereits im ersten Schritt der Sphingolipid-Biosynthese Palmitoyl-CoA ($C_{16:0}CoA$) als Substrat verwendet wird, ließ sich vermuten, dass relativ hohe Konzentrationen dieses Acyl-CoA-Thioesters in *P. ciferrii*-Stämmen, die große Mengen an Sphingolipiden synthetisieren, vorliegen. Aufgrund dieser Sub-

stratspezifität wurden diese beiden Ceramid-Synthase-Gene aus der Maus zur Überexpression ausgewählt.

Die Elo-Proteine (grau) katalysieren die Verlängerung von Fettsäuren, wobei speziell Elo2p und Elo3p für die Verlängerung von C₂₀ hin zu VLCFA's (very long chain fatty acids, sehr langkettigen Fettsäuren; C_{26:0}-CoA) zuständig sind (Oh *et al.*, 1997). Die Affinität der Ceramid-Synthase aus *P. ciferrii* zu eben diesen C_{26:0}-CoA-Thioestern ist vermutlich besonders hoch (siehe 3.2.1 Lag1p & Laf1p (Ceramid-Synthasen)). Eine Verlängerung der kürzerkettigen Fettsäure-Thioester zu C_{26:0}-CoA könnte also zu einer erhöhten Umsetzung von Sphingalin zu Dihydroceramid durch *P. ciferrii* Lag1p und/oder Laf1p führen, was sich auch in erhöhten Mengen Sphingosin bemerkbar machen könnte, wenn die Aktivität dieses Enzyms in *P. ciferrii* syrE10 RE11 limitierend ist.

Zusätzlich wurden zwei Gene überexprimiert, die zwei alkalische Ceramidasen kodieren (rechte Seite in blau). Dies ist zum einen die alkalische Ceramidase aus *P. ciferrii* (Yxc1p), deren Substratspezifität bezüglich Phytoceramiden, Dihydroceramiden oder Ceramiden nicht geklärt ist. Zum anderen ist dies die alkalische Ceramidase aus *Mus musculus*. Diese hydrolysiert exklusiv Ceramide, nicht jedoch Dihydro-, oder Phytoceramide (Mao *et al.*, 2003). Eine Überexpression sollte somit nicht zu einer kontraproduktiven Hydrolyse von Dihydroceramid, welches ja das Substrat der Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase darstellt führen, sondern lediglich die gewünschten Hydrolyse von Ceramid zur freien Fettsäure und Sphingosin katalysieren.

Alle beschriebenen Überexpressionen wurden in Kombination mit Überexpressionen des *P. ciferrii* DES1-Gens durchgeführt (mittig in grün).

Die Ceramid-Synthasen standen hierbei unter Kontrolle des TDH1- bzw. des PDA1-Promotors aus *P. ciferrii*. Die Ceramidasen befanden sich ausschließlich unter der Kontrolle des TDH1- und das DES1-Gen ausschließlich unter Kontrolle des PDA1-Promotors.

Die vermehrte Transkription sämtlicher oben beschriebener Gene in den entsprechenden Transformanten wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen. Bei der Überexpression *P. ciferrii*-eigener Gene lag die Erhöhung der Transkriptmenge ca. bei einem Faktor von zehn. Im Falle einer heterologen Expression wurde jeweils nur die Transkription nachgewiesen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Jedoch konnte nach Kultivierung der derart generierten *P. ciferrii* syrE10 RE11-Derivate in keinem Fall ein gegenüber dem Ausgangsstamm signifikant erhöhter Sphingosin-Titer nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.5.6 Notwendigkeit zur Verwendung codon-optimierter Gene

Aufgrund der dargestellten Ergebnisse, galt es nach möglichen Ursachen zu suchen. Bei einer bioinformatischen Analyse der aus *P. ciferrii* isolierten Gene zeigte sich, dass die kodierenden Bereich des Organismus im Vergleich zu anderen Hefen sehr AT-reich sind (69,2%; ermittelt durch die Sequenz von 36 ORF's mit einer Gesamtgröße von 35.304 bp). Eine eingehende Analyse der Codon-Verwendung offenbarte, dass diese meist auf ein oder zwei sehr häufig genutzte Codons pro Aminosäure beschränkt ist (Tab. 9).

Tabelle 9: Übersicht über die Codon-Verwendung in *P. ciferrii*. Die Codons die häufiger als 10% pro AS verwendet werden, sind grün unterlegt. Die Codons, die zu weniger als 5% pro AS verwendet werden, sind rot unterlegt.

Aminosäure	Codon	n Gesamt	n pro codon	Prozent
Ala	GCT	656	410	62,5
	GCC		52	7,9
	GCA		184	28,0
	GCG		10	1,5
Arg	CGT	448	111	24,8
	CGC		3	0,7
	CGA		7	1,6
	CGG		1	0,2
	AGA		314	70,1
	AGG		12	2,7
Asn	AAT	596	493	82,7
	AAC		103	17,3
Asp	GAT	667	631	94,6
	GAC		36	5,4
Cys	TGT	126	119	94,4
	TGC		7	5,6
Gln	CAA	478	454	95,0
	CAG		24	5,0
Glu	GAA	714	672	94,1
	GAG		42	5,9
Gly	GGT	753	615	81,7
	GGC		15	2,0
	GGA		86	11,4
	GGG		37	4,9
His	CAT	256	234	91,4

	CAC		22	8,6
Ile	ATT	945	616	65,2
	ATC		146	15,4
	ATA		183	19,4
Leu	TTA	1123	827	73,6
	TTG		151	13,4
	CTT		82	7,3
	CTC		14	1,2
	CTA		33	2,9
	CTG		16	1,4
Lys	AAA	825	726	88,0
	AAG		99	12,0
Met	ATG	193	193	100,0
Phe	TTT	592	379	64,0
	TTC		213	36,0
Pro	CCT	484	117	24,2
	CCC		13	2,7
	CCA		341	70,5
	CCG		13	2,7
Ser	TCT	928	243	26,2
	TCC		48	5,2
	TCA		462	49,8
	TCG		11	1,2
	AGT		157	16,9
	AGC		7	0,8
Thr	ACT	634	352	55,5
	ACC		60	9,5
	ACA		215	33,9
	ACG		7	1,1
Trp	TGG	158	158	100,0
Tyr	TAT	476	418	87,8
	TAC		58	12,2
Val	GTT	707	539	76,2
	GTC		72	10,2
	GTA		53	7,5
	GTG		43	6,1

Exemplarisch für die sehr stark eingeschränkte Codon-Verwendung steht die AS Arginin. Sechs verschiedene Codons codieren für diese AS, wovon jedoch in *P. ciferrii* lediglich zwei sehr häufig (zusammen 94,9%) verwendet werden, die anderen vier nur in 0,2 bis 2,7% der analysierten Arginin kodierenden Triplets.

Die Berechnung des "codon adaptation index" (CAI), der als Maß für den *fit* der Codon-Verwendung eines heterolog überzuexprimierenden Gens bezüglich der Codon-Verwendung des Wirtsorganismus dient (Sharp und Li, 1987), ergab für die heterolog

überexprimierten Gene aus *Mus musculus* und *Ashbya gossypii* in allen Fällen CAI-Werte unter 0,3 auf (Abb. 31).

Eigene Gene	CAI	Fremd-Gene (Pc)	CAI	Fremd-Gene (Sc)	CAI
<i>PcLCB1</i>	0,802	<i>mLASS1</i>	0,096	<i>mLASS1</i>	0,532
<i>PcLCB2</i>	0,646	<i>mLASS2</i>	0,144	<i>mLASS2</i>	0,568
<i>PcTSC10</i>	0,701	<i>mLASS4</i>	0,126	<i>PcLCB1</i>	0,931
<i>PcSYR2</i>	0,645	<i>mLASS5</i>	0,146	<i>PcLCB2</i>	0,862
<i>PcDES1</i>	0,723	<i>mLASS6</i>	0,181	<i>PcTSC10</i>	0,881
<i>PcLAG1</i>	0,652	<i>mCER</i>	0,136	<i>PcDES1</i>	0,902
<i>PcLAF1</i>	0,767	<i>hDES1</i>	0,233	<i>hDES1</i>	0,667
<i>PcLIP1</i>	0,679	<i>AgDES1</i>	0,097	<i>AgDES1</i>	0,515
<i>PcYXC1</i>	0,686	<i>AgLAG1</i>	0,196	<i>AgLAG1</i>	0,639
<i>PcURA3</i>	0,643	<i>AgLAF1</i>	0,088	<i>AgLAF1</i>	0,517
<i>PcENO</i>	0,712	<i>AgLIP1</i>	0,133	<i>AgLIP1</i>	0,579
<i>PcPDA1</i>	0,858	<i>nat1</i>	0,057	<i>nat1</i>	0,431

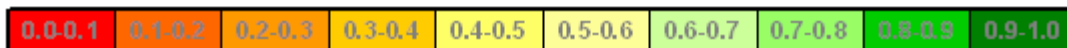


Abbildung 31: CAI verschiedener Gene bei Expression in *P. ciferrii* bzw. *S. cerevisiae*. Die linke Spalte zeigt den CAI für einige *P. ciferrii*-Gene bei Expression in *P. ciferrii* selbst. Rechts daneben sind exemplarisch CAI's für einige Fremdgene bei heterologer Expression in *P. ciferrii* angegeben. Ganz rechts finden sich als Vergleich dazu CAI's von Fremdgenen bei heterologer Expression in *S. cerevisiae* (Abbildung durch S. Schaffer zur Verfügung gestellt).

Die *P. ciferrii*-eigenen Gene weisen bei homologer Expression CAI-Werte zwischen 0,64 und 0,86 auf. Die Fremdgene haben bei heterologer Expression in *P. ciferrii* einen deutlich niedrigeren CAI (0,06-0,23), der bei einigen Genen unter 0,1 liegt (*mLASS1*, *AgDES1*, *AgLAF1* und *nat1*). Im Vergleich hierzu liegt der CAI der gleichen Gene bei heterologer Expression in *S. cerevisiae* deutlich höher (0,43-0,67). Der CAI von *P. ciferrii*-Genen bei heterologer Expression in *S. cerevisiae* liegt sogar noch höher bei 0,86-0,93. Dies zeigt, dass die stark eingeschränkte Codon-Verwendung von *P. ciferrii* zu Problemen bei der heterologen Expression eines Fremdgens führen könnte, wenn jenes aus einem Organismus stammt, der bevorzugt andere Codons nutzt. Da manche Codons nur äußerst selten verwendet werden, liegt die Vermutung nahe, dass auch die hierfür benötigten passenden tRNA's nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen. Die bisherigen Versuche zur hetero-

logen Expression von Fremdgenen scheiterten somit möglicherweise an dem Fehlen der passenden tRNA's für selten genutzte Codons, so dass die Translation der korrespondierenden cDNAs ins Stocken gerät.

Als Schlussfolgerung aus diesen Erkenntnissen erfolgte in der Folge bei heterologer Überexpression von Fremdgenen in *P. ciferrii* grundsätzlich eine Anpassung der Codon-Verwendung in den Fremdgenen an die Codon-Verwendung in *P. ciferrii*. Dies erfolgte durch Synthese der codon-optimierten Gene durch die Geneart AG in Regensburg.

3.5.7 Verwendung des Nourseothricin-Resistenz vermittelnden *nat1*-Gens in codon-optimierter Form als Selektionsmarker für *P. ciferrii*

Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten Auxotrophie-basierte Selektionssystemen auf TriASa-Produzenten zu übertragen (s.o.), wurde es notwendig nach weiteren Selektionsmarkern zu forschen. In *S. cerevisiae* werden für diese Zwecke sowohl das *kanMX*-Gen, welches eine Geneticin-Resistenz vermittelt, das *hph*-Gen welches eine Hygromycin B-Resistenz vermittelt, sowie das *nat1*-Gen, welches eine Nourseothricin-Resistenz vermittelt, verwendet. Diese dominanten Selektionsmarker werden zudem erfolgreich bei der gezielten Disruption von Genen verwendet (Goldstein and McCusker, 1999). Erste Versuche zur Verwendung dieser Selektionsmarker zur Transformation des WT's von *P. ciferrii* führten jedoch nicht zum Erhalt nachweisbarer Transformanten (*nat1*) bzw. die entsprechenden Marker erschienen für *P. ciferrii* ungeeignet, da bereits WT-Stämme recht unempfindlich gegenüber den entsprechenden Antibiotika waren (*kanMX* und *hph*) (Hüller, pers. Mitteilung).

Aufgrund der oben beschriebenen Problematik (CAI-Wert für heterologe Expression von *nat1* in *P. ciferrii*: 0,057) wurden die Versuche mit einer codon-optimierten Variante des aus *Streptomyces noursei* stammenden Genes wiederholt. Erste Versuche zur Verwendung dieser codon-optimierten Form des *nat1*-Gens unter Kontrolle des *PDA1*-Promotors aus *P. ciferrii* zur Selektion des Stammes syrE10 RE11 nach Transformation mit dem Vektor pPC-DES1-mCER-*nat1* erwiesen sich als erfolgreich. Während die H₂O-Kontrollen nicht zum Erhalt von Transformanten führten, konnte nach Transformation mit dem Vektor zahlreiche Klone isoliert werden, die auch in Anwesenheit von Nourseothricin wachsen konnten. Die korrekte Integration des Plasmids im intergenischen Bereich zwischen der 5S und der 26S rDNA konnte per Kolonie-PCR nachgewiesen werden.

Nourseothricin konnte somit, neben Cycloheximid, als zweites Antibiotikum zur dominanten Selektion von Transformanten genutzt werden.

3.5.8 Heterologe Expression des für die alkalischen Ceramidase aus der Maus kodierenden Gens in codon-optimierter Form in *P. ciferrii*

In einem ersten Schritt wurde das bereits oben erwähnte für die alkalische Ceramidase aus *Mus musculus* kodierende Gen einer Codon-Optimierung unterzogen. Der CAI der optimierten Variante lag danach bei 0,94 (0,14 für das WT-Gen) und zeigte somit eine sehr gute Anpassung an die Codon-Verwendung von *P. ciferrii*. Um alle drei enzymatischen Schritte für die Umsetzung von Sphinganin zu Sphingosin zu verstärken, wurde die codon-optimierte Variante des für die alkalische Ceramidase aus der Maus kodierenden Gens in einem Stamm exprimiert, der bereits die Gene für die beiden Ceramid-Synthase Untereinheiten Lag1p und Laf1p aus *Ashbya gossypii* und die Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase Des1p aus *P. ciferrii* nachgewiesenermaßen überexprimiert (eine zehnfache Erhöhung der *DES1*-Transkriptmengen, sowie die Transkription der beiden aus *Ashbya gossypii* stammenden Ceramid-Synthase Untereinheiten wurde mittels qRT-PCR gezeigt). Verwendet wurde hierfür der Stamm syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 Klon6. Dieser wurde mit dem Nourseothricin-Resistenz vermittelnden Vektor p-mCER-nat1 transformiert (Abb. 76 im Anhang), der neben dem *nat1*-Gen unter Kontrolle des *PDA1*-Promotors aus *P. ciferrii*, auch die codon-optimierte Form des für die alkalische Ceramidase aus der Maus kodierenden Gens (*mCER*) unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors aus *P. ciferrii* enthält. Mittels qRT-PCR wurde die Transkription des codon-optimierten *mCER*-Gens in den erhaltenen Transformanten bestätigt (Ergebnisse nicht gezeigt). Die anschließende Analyse der nach Kultivierung dreier Transformanten erzielten Sphingoidbasen-Konzentration durch RP-HPLC zeigte eine Verdopplung der C18 SO-Konzentration im Vergleich mit dem Ausgangsstamm (Abb. 32).

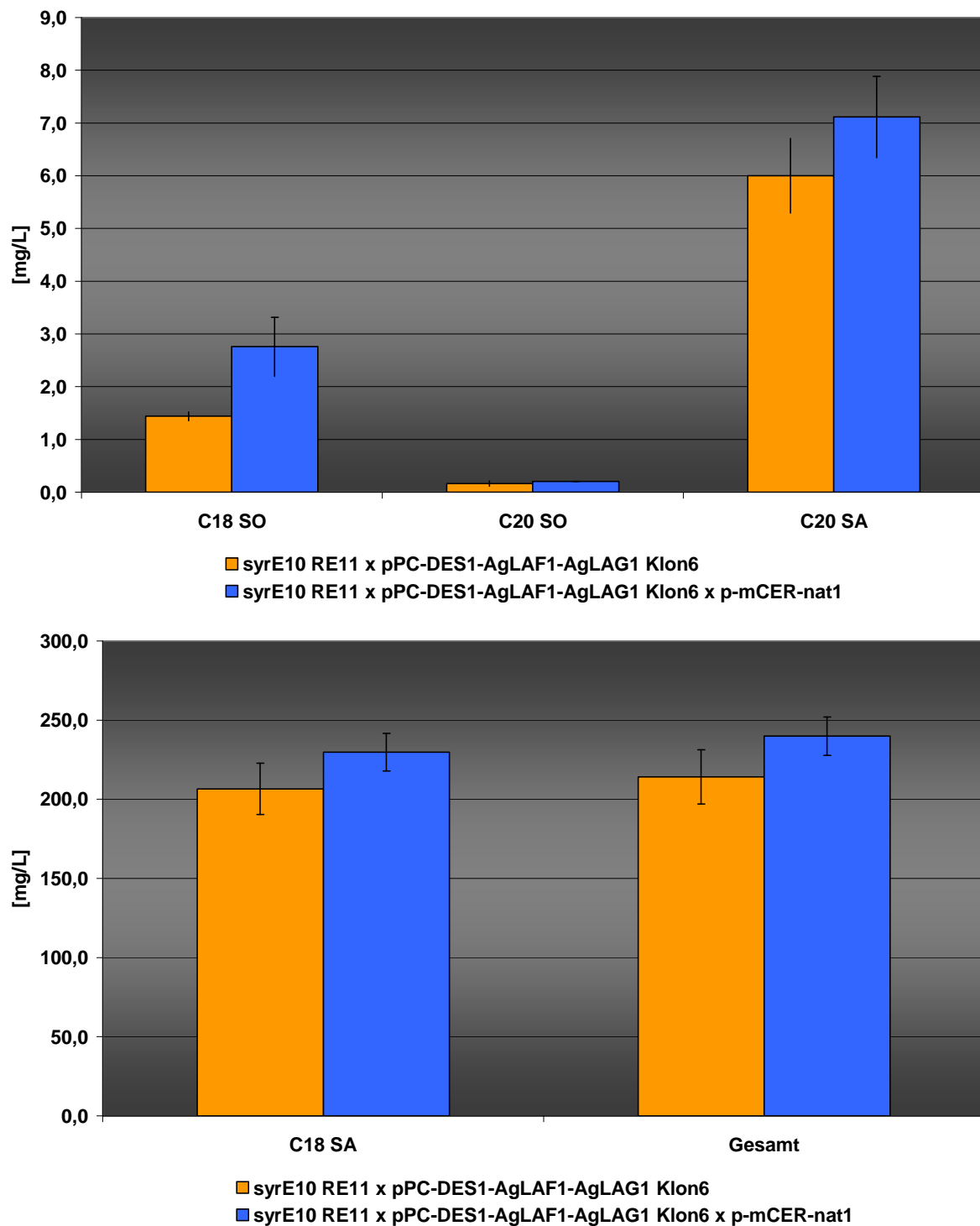


Abbildung 32: Einfluss der Überexpression der codon-optimierten Form des für die alkalische Ceramidase aus der Maus kodierenden Gens in *P. ciferrii* auf die Biosynthese von Sphingosin. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Konzentration von C18-Sphingosin (C18 SO), C20-Sphingosin (C20 SO) und C20-Sphinganin (C20 SA), der untere Teil der Abbildung die Konzentration von C18 SA- (C18 SA) und der Summe aller Sphingoidbasen (Gesamt). Man beachte die unterschiedlichen Skalierungen. (OD_{600nm} [Mittelwerte]: syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 Klon6 ⇨ 51,7 / syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 Klon6 x p-mCER-nat1 ⇨ 47,8)

3.5.9 Erhöhung der Integrationshäufigkeit durch Erhöhen der Antibiotika-Konzentration

Die Integration der Vektoren zur Überexpression bzw. zur heterologen Expression diverser Gene erfolgte jeweils im intergenischen Bereich zwischen der 5S und der 26S rDNA. Da dieser in ca. 100 Kopien in der Zelle vorliegt, wird die Wahrscheinlichkeit einer Mehrfachintegration erhöht. Zusätzlich wird eine mehrfache Integration durch Vektoren, die eine Cycloheximid-Resistenz vermitteln (wie z.B. pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1, Abb. 77 im Anhang), offensichtlich forciert. Dies mag darin begründet sein, dass erst bei deutlicher Dominanz von Cycloheximid-resistenten Ribosomen gegenüber Cycloheximid-sensitiven Ribosomen, die ja immer noch gebildet werden, solange die chromosomale WT-Kopie des *CYH2*-Gens aktiv ist, eine Resistenz gegenüber Cycloheximid ausprägt wird (Kawai *et al.*, 1992).

Um eine noch höhere Integrationshäufigkeit der Expressions-Kassetten zu erzwingen, sollte versucht werden durch Erhöhung der Antibiotika-Konzentrationen auf festem Nährmedium Klone zu isolieren, die resistenter gegenüber den entsprechenden Antibiotika sind, als der entsprechende Ausgangsstamm. Verwendet wurde hierzu die Transformante *syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 x p-mCER-nat1 Klon7*, die die höchste bisher gemessene C18 SO-Konzentration erzielte und aufgrund der integrierten Plasmide Cycloheximid- und Nourseothricin-resistent ist. Die Anzucht und das anschließende Ausplattieren der Transformante auf einer 512-fach (von 0,5 µg/ml minimaler inhibitorischer Konzentration (MIC) auf 256 µg/ml) erhöhten Cycloheximid-Konzentration bei gleichzeitigem Beibehalten der MIC von Nourseothricin, führte jedoch nach wie vor zum Erhalt eines konfluenten Wachstums. Eine weitere Verdopplung der Konzentration auf 512 µg/ml führte lediglich zu einem insgesamt schwächeren Wachstum, jedoch nicht zum Erhalt von Einzelkolonien. Es wurde somit davon abgesehen die Cycloheximid-Konzentration weiter zu erhöhen.

Analog hierzu wurden Versuche zur Selektion von Mutanten, die eine erhöhte Resistenz gegen Nourseothricin aufwiesen, durchgeführt. Ausgehend von der im Standardexperiment verwendeten Konzentration von 50 µg/ml wurde die Konzentration bis auf 3,2 mg/ml (also 64-fach) erhöht. Dies führte jedoch noch zu konfluentem Wachstum des Stammes *syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 x p-mCER-nat1 Klon7*. Nach weiterer Verdopplung bzw. Vervierfachung der Nourseothricin-Konzentration auf 6,4 mg/L bzw. 12,8 mg/L führte zum Wachstum von wenigen Ein-

zelkolonien. Acht Klone, die eine Resistenz gegenüber 12,8 mg/L Nourseothricin aufwiesen, wurden vereinzelt, in TAPS-Medium kultiviert und die LCB-Konzentrationen mittels RP-HPLC analysiert (Abb. 33).

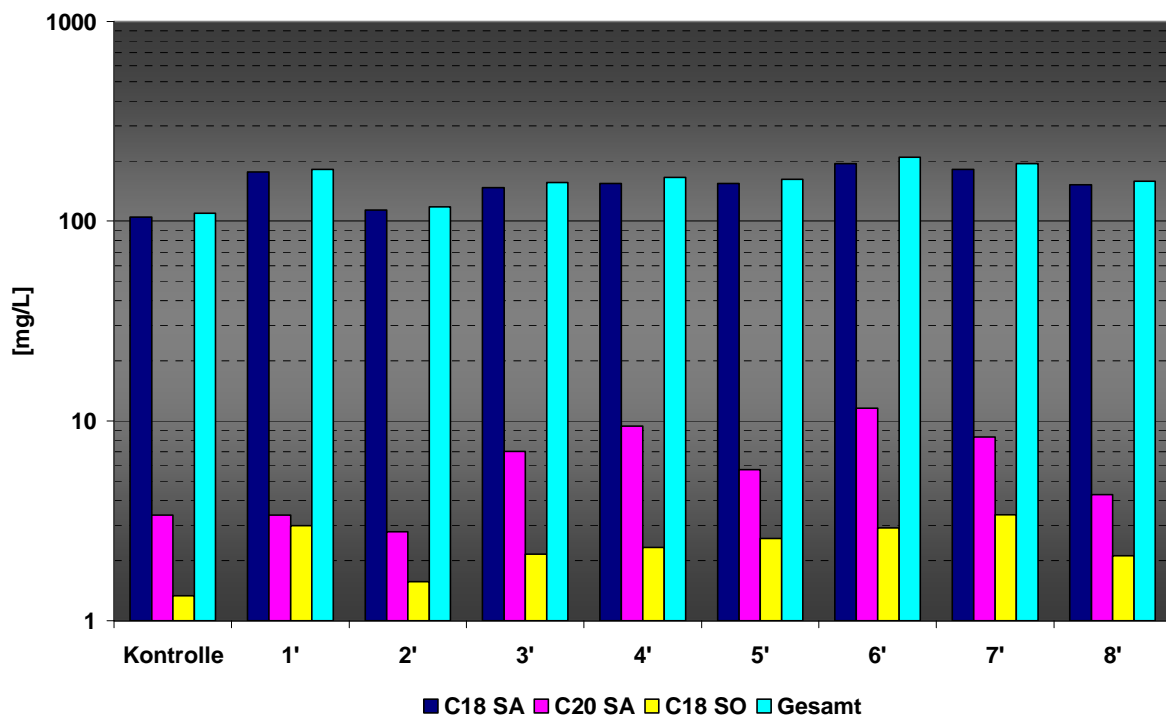


Abbildung 33: Einfluss der Resistenz von *P. ciferrii* syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 x p-mCER-nat1 Klon7 gegenüber Nourseothricin auf die Sphingosin-Produktion. Gezeigt sind Die LCB-Konzentrationen des Ausgangsstammes syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 x p-mCER-nat1 (Kontrolle) und der acht Klone die eine Resistenz gegenüber 12,8 mg/L Nourseothricin (1' bis 8') aufweisen. Die Angaben in mg/L wurden logarithmisch aufgetragen.

Die Auswertung dokumentiert, dass alle getesteten Klone mit erhöhter Resistenz gegenüber Nourseothricin auch mehr C18 Sphingosin produzieren als der Ausgangsstamm. Dies führt im besten Fall zu einer 2,5-fachen Erhöhung der C18 Sphingosin-Konzentration (Klon 6). Jedoch sind auch die Konzentrationen der anderen Sphingoidbasen erhöht.

Um zu untersuchen, ob diese Effekte auf eine erhöhte Kopiezahl des Vektors p-mCER-nat1 zurückzuführen sind, wurden die Transkriptionslevel des *omCER*-Gens untersucht. Dieses Gen befindet sich wie auch das Resistenz gegenüber Nourse-

othricin vermittelnde Gen auf dem Vektor p-mCER-nat1, auf dessen Kopiezahlerhöhung damit der Selektionsdruck zur Mehrfachintegration lag. Das *omCER*-Gen befindet sich unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors aus *P. ciferrii* und die korrespondierenden mRNA-Spiegel müssten bei einer erhöhten Integrationshäufigkeit gegenüber jenen im Ausgangsstamm erhöht sein. Ein Vergleich der mRNA-Spiegel mit dem Ausgangsstamm, der eine MIC gegenüber 50 µg/ml Nourseothricin besitzt, offenbarte jedoch keinerlei Unterschiede (Ergebnisse nicht gezeigt). Das heißt, dass in allen acht untersuchten Klonen vermutlich keine vermehrte Transkription des *omCER*-Gens stattfindet. Die erhöhten LCB-Konzentrationen sind somit wohl nicht auf eine vermehrte Integration der *omCER*-Expressions-Kassette zurückzuführen.

3.5.10 Screening von Ceramid-Synthasen auf ihre Eignung für die rationale Entwicklung eines TriASo-Produzenten

Nach dem Vorliegen eines TriASa-akkumulierenden Stammes der eine aktive Ceramid-spezifische Ceramidase und die *P. ciferrii*-eigene Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase überproduziert, wobei von letzterer aufgrund obiger Ergebnisse davon ausgegangen werden kann, dass sie nicht limitierend in der 3-Schritt-Sequenz ist, liegt nun relativ nahe, dass der weitere Umsatz durch die Aktivität der Ceramid-Synthase limitiert ist. Somit wurde der vorliegende Stamm syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 Klon6 für das Screening nach einer geeigneten Ceramid-Synthase verwendet.

Dieser Stamm wurde jeweils transformiert mit Abkömmlingen des *mCER*-tragenden Vektors p-mCER-nat1, in dem neben dem für die alkalische, ceramid-spezifische Ceramidase aus *Mus musculus* kodierenden codon-optimierten Gen *omCER* jeweils ein für eine Ceramid-Synthase kodierendes Gen, das wie *omCER* unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors aus *P. ciferrii* steht, vorlag. Die Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die auf diese Weise überexprimierten Ceramid-Synthase-Gene, deren Herkunft, die Bezeichnung des entsprechenden Vektors, sowie den CAI vor und nach der Codon-Optimierung.

Tabelle 10: Übersicht über die getesteten Ceramid-Synthasen. Aufgelistet sind die entsprechenden Quellorganismen, Expressionsvektoren sowie CAI der WT- und synthetischen codon-optimierten Gene bei Expression in *P. ciferrii*. Die Vektorkarten befinden sich im Anhang (Abb. 78-87).

Gen	Organismus	Vektor	CAI vor Codon-Optimierung	CAI nach Codon-Optimierung
LASS1	<i>M. musculus</i>	p-mCER-nat1-omLASS1	0,096	0,981
LASS2	<i>M. musculus</i>	p-mCER-nat1-omLASS2	0,144	0,972
LASS4	<i>M. musculus</i>	p-mCER-nat1-omLASS4	0,126	0,980
LASS5	<i>M. musculus</i>	p-mCER-nat1-omLASS5	0,146	0,987
LASS6	<i>M. musculus</i>	p-mCER-nat1-omLASS6	0,181	0,982
LAG1	<i>P. ciferrii</i>	p-mCER-nat1-PcLAG1	---	---
LAF1	<i>P. ciferrii</i>	p-mCER-nat1-PcLAF1	---	---
LAG1	<i>A. gossypii</i>	p-mCER-nat1-oAgLAG1	0,196	0,973
LAF1	<i>A. gossypii</i>	p-mCER-nat1-oAgLAF1	0,088	0,985
LAG1	<i>Coccolithovirus</i>	p-mCER-nat1-oCvLAG1	0,371	0,967

Neben den bereits zuvor heterolog exprimierten Ceramid-Synthase-Genen *LASS5* und *LASS6* aus der Maus, die diesmal in codon-optimierter Form verwendet wurden, wurden drei weitere bekannte Ceramid-Synthase-Gene *LASS1*, *LASS2* und *LASS4* in optimierter Form getestet (die Identifizierung des *LASS3*-Gens wurde erst nach Abschluss der Arbeiten zu dieser Dissertation veröffentlicht; Mizutani *et al.*, 2006). *Lass1p* besitzt die höchste Affinität zu C_{18:0}-Acyl-CoA-Thioestern (Venkataraman *et al.*, 2002), wohingegen *Lass2p* und *Lass4p* C_{22:0}- und C_{24:0}-Acyl-CoA-Thioester als Substrate bevorzugen (Mizutani *et al.*, 2005).

Bei der vollständigen Sequenzierung des Genoms des so genannten *Coccolithovirus* aus der Familie der *Phycodnaviridae* - ein Virus der die Mikroalge *Emiliania huxleyi* befällt - wurde überraschenderweise eine Ceramid-Synthase gefunden (Schroeder *et al.*, 2002). Diese dient womöglich der Destabilisierung der Wirts-Signaltransduktion durch eine deregulierte Ceramid-Synthase, was ein Fehlen einer Feedback-Regulation der entsprechenden Ceramid-Synthase voraussetzen würde, womit diese Ceramid-Synthase einen idealen Kandidaten für die anvisierten Ziele darstellen würde.

Dieses Gen wurde, ebenfalls codon-optimiert, heterolog in *P. ciferrii* exprimiert.

In sämtlichen, weiter zu analysierenden Transformanten wurde die Transkription der neu eingefügten Gene mittels qRT-PCR bestätigt (Ergebnisse nicht gezeigt). Pro Ceramid-Synthase-Gen wurden drei Transformanten in TAPS-Medium kultiviert und die

LCB-Konzentrationen in der Kulturbrühe plus Biomasse mittels RP-HPLC analysiert, wobei aufgrund der recht hohen LCB-Konzentrationen die Methode mit UV-Detektion zum Einsatz kam (Abb. 34).

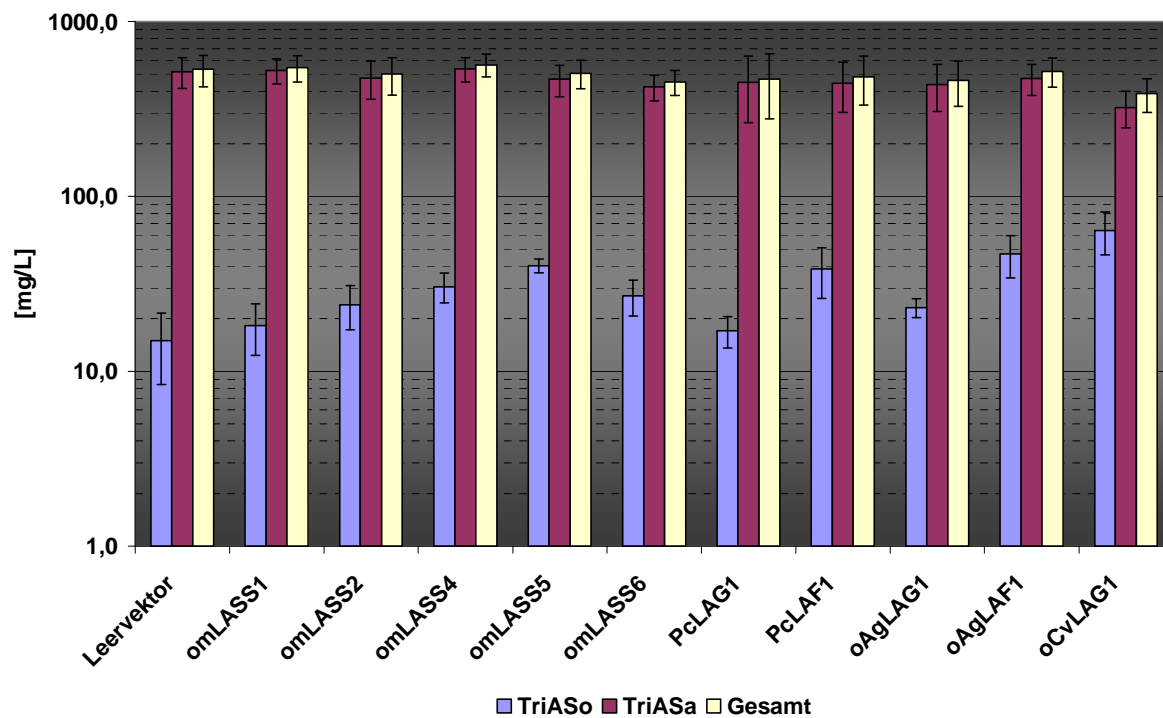


Abbildung 34: Einfluss verschiedener Ceramid-Synthasen auf die Produktion von Sphingosin durch *P. ciferrii* syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 x p-mCER-nat1. Gezeigt sind die Konzentration der acetylierten Sphingoidbasen Sphingosin (TriASo) und Sphinganin (TriASa) im Ausgangsstamm syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 x p-mCER-nat1 (Leervektor) und den daraus abgeleiteten Derivaten, die jeweils zusätzlich das angegebene Ceramid-Synthase-Gen unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors aus *P. ciferrii* im Vektor p-mCER-nat1 tragen. Die Konzentration der acetylierten Sphingoidbasen in mg/L ist logarithmisch aufgetragen. (OD_{600nm} [Mittelwerte]: Leervektor \Rightarrow 45,2 / omLASS1 \Rightarrow 42,5 / omLASS2 \Rightarrow 48,8 / omLASS4 \Rightarrow 48,7 / omLASS5 \Rightarrow 48,7 / omLASS6 \Rightarrow 53,8 / PcLAG1 \Rightarrow 42,9 / PcLAF1 \Rightarrow 54,1 / oAgLAG1 \Rightarrow 43,7 / oAgLAF1 \Rightarrow 51,6 / oCvLAG1 \Rightarrow 49,1)

Unter Berücksichtigung der Standardabweichung ist bei der Überexpression von omLASS4, omLASS5, PcLAF1, oAgLAF1, sowie oCvLAG1 im Stammhintergrund des syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 x p-mCER-nat1 eine signifikante Erhöhung der Sphingosin-Produktion durch die resultierenden Stämme zu beobachten. Diese fällt bei der Überexpression der codon-optimierten Ceramid-Synthase aus dem *Coccolithovirus* mit einer Vervielfachung von 15 mg/L auf 64 mg/L TriASo am

höchsten aus. Für die rationale Entwicklung eines Sphingosin-Produktionsstammes erschien somit die Ceramid-Synthase aus *Coccolithovirus* zumindest unter den getesteten Bedingungen als am besten geeignet. Allerdings ist nicht klar, inwieweit einzelne Aspekte der Expression, wie mRNA-Stabilität, Translationsrate, Enzymstabilität, kinetische Parameter des Enzyms oder Metabolit- und Enzymkonzentrationen im gewählten Stammhintergrund zu diesem Ergebnis beigetragen haben. Daher ist es durchaus möglich, dass unter Bedingungen, die zur Modulierung einzelner oder mehrerer dieser Parameter führen, auch andere der analysierten Ceramid-Synthasen für einen entsprechenden Einsatz geeignet wären.

Jedoch ist in eben diesem Stamm die Konzentration von TriASa am geringsten. Es kommt zu einer Verringerung von 517 mg/L auf 323 mg/L. Dieser Unterschied findet sich allerdings nicht in der TriASo-Konzentration wieder, die "nur" von 15 mg/L auf 64 mg/L ansteigt. Dies lässt eine Feedback-Inhibierung durch Sphingosin bzw. Ceramid oder die Umwandlung in eine nicht detektierte Verbindung wie z.B. eine doppelt desaturierte oder methylierte Form vermuten.

3.5.11 Eignung der *P. ciferrii*-eigenen alkalischen Ceramidase Yxc1p für die rationale Entwicklung eines TriASo-Produzenten

Die alkalische Ceramidase aus *Mus musculus* wurde im Wesentlichen deshalb für die Katalyse des letzten der drei enzymatischen Schritte der Umsetzung von Sphinganin zu Sphingosin gewählt, da sie das einzige biochemisch charakterisierte Enzym ist, welches exklusiv Ceramide, jedoch nicht Dihydroceramide oder Phytoceramide hydrolysiert (Mao *et al.*, 2003). Aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft der *P. ciferrii*-eigenen alkalischen Ceramidase Yxc1p mit den alkalischen Ceramidase Ydc1p und Ypc1p aus *S. cerevisiae*, die bevorzugt Dihydroceramide bzw. Phytoceramide hydrolysieren, wurde bisher davon ausgegangen, dass Yxc1p vermutlich auch bevorzugt Dihydroceramide und/oder Phytoceramide hydrolysiert. In diesem Fall wäre eine Überexpression des entsprechenden Gens zur Erhöhung der Ceramidase-Aktivität zur Freisetzung des Sphingosins aus dem durch Ceramid-Synthase und Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase gebildeten Ceramid vermutlich kontraproduktiv, da es auch (oder ausschließlich) das Intermediat Dihydroceramid hydrolysieren würde. Da dies auf theoretischen Erwägungen basierte, sollte im Folgenden getestet werden, welchen Einfluss der Ersatz der alkalischen Ceramidase aus *Mus musculus* durch jene aus *P. ciferrii* hat.

Verwendet wurde hierfür als Ausgangspunkt der Vektor p-mCER-nat1-oCvLAG1, das im Ceramid-Synthase-Screening zu der höchsten TriASo-Konzentration geführt hatte. In diesem Vektor wurde zunächst das *omCER*-Gen durch das *YXC1*-Gen aus *P. ciferrii* ersetzt (Vektor: pPcYXC1-nat1-oCvLAG1; Abb. 88 im Anhang). Wie *omCER* in p-mCER-nat1-oCvLAG1 steht *YXC1* in pPcYXC1-nat1-oCvLAG1 unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors aus *P. ciferrii*. Eine vergleichbare Transkriptionsrate beider Gene sollte also gegeben sein. Der Stamm syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 Klon6 wurde anschließend mit dem Vektor pPcYXC1-nat1-oCvLAG1 transformiert. Je drei Klone der Stämme syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 x p-mCER-nat1-oCvLAG1 und syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 x pPcYXC1-nat1-oCvLAG1 wurden in TAPS-Medium kultiviert und die LCB-Konzentrationen in der Kulturbrühe plus Biomasse mittels RP-HPLC analysiert, wobei aufgrund der recht hohen LCB-Konzentrationen die Methode mit UV-Detektion zum Einsatz kam (Abb. 35).

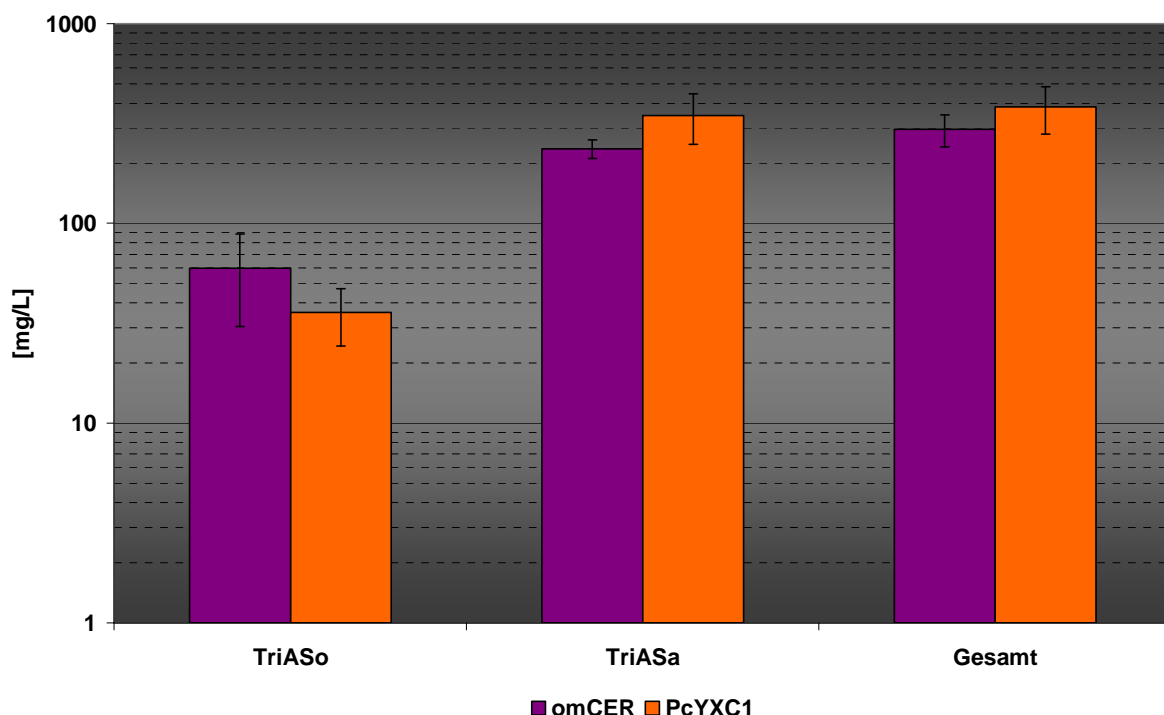


Abbildung 35: Einfluss verschiedener alkalischer Ceramidasen auf die Produktion von Sphingosin durch *P. ciferrii* syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 x p-nat1-oCvLAG1. Gezeigt sind die Konzentration der acetylierten Sphingoidbasen Sphingosin (TriASo) und Sphinganin (TriASa) in Stämmen syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 x p-mCER-nat1-oCvLAG1 und syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 x pPcYXC1-nat1-oCvLAG1. Die Konzentration der acetylierten Sphingoidbasen in mg/L ist logarithmisch aufgetragen. (OD_{600nm} [Mittelwerte]: *omCER* \Rightarrow 50,5 / *PcYXC1* \Rightarrow 66,3)

Die Ergebnisse zeigen, dass im Mittel eine höhere TriASo-Produktion bei Überproduktion der alkalischen Ceramidase aus *Mus musculus* erzielt wird. Unter Einbeziehung der Standardabweichung lässt sich allerdings kein signifikanter Unterschied feststellen. Allerdings findet sich aufgrund der höheren TriASa-Konzentration in den *PcYXC1*-tragenden Transformanten ein stark unterschiedliches Verhältnis von TriASo zu TriASa: 1:4 bei Überexpression von *omCER* gegenüber 1:10 bei Überexpression von *PcYXC1*, was auf einen stärkeren Fluss von Sphingarin zu Sphingosin unter Verwendung der codon-optimierten alkalischen Ceramidase aus Maus hindeutet. Dies schlägt sich aber unter Umständen aufgrund einer Metabolisierung des gebildeten Sphingosins, z.B. durch Phosphorylierung und anschließenden Abbau, nicht in deutlich höheren TriASo-Konzentrationen nieder. Ebenso denkbar ist, dass die niedrigere Ratio von TriASo zu TriASa in den *PcYXC1*-tragenden Transformanten auf die Rückreaktion der Ceramid-Synthase-Aktivität, die Hydrolyse des Dihydroceramids, zurückgeht.

3.5.12 Übertragen der Stammentwicklung auf den Wildtyp von *P. ciferrii*

Die bisher beschriebenen Versuche zur rationalen Stammentwicklung mit *P. ciferrii* zur Generierung eines TriASo-Produzenten wurden allesamt mit dem durch klassische Stammentwicklung aus dem *P. ciferrii* WT generierten Sphingarin-Produzenten syrE10 RE11 durchgeführt. Um zu untersuchen, ob die Aktivität der *P. ciferrii*-eigenen Ceramid-Synthase in Kombination mit der heterolog überproduzierten Ceramid-Synthase aus *Coccolithovirus* ausreicht, um den Metabolitfluss ausgehend von Phytosphingosin über Sphingarin in Richtung Sphingosin umzulenken, wurde der Versuch unternommen, den oben beschriebenen Sphingosin-Biosyntheseweg in den *P. ciferrii*-WT einzubringen, indem dieser mit der Sphingolipid-C4-Hydroxylase um das gemeinsamen Intermediat Sphingarin konkurriert. Der fast ausschließlich TAPS bildende WT wurde nacheinander mit den Vektoren p-mCER-nat1-oCvLAG1 (Abb. 87 im Anhang) und pDB006-PcDES1 (Abb. 89 im Anhang) transformiert. Die Transformanten überexprimierten somit alle Gene, die für den Umsatz von Sphingarin zu Sphingosin benötigt werden und bereits konzentriert in dem Sphingarin-Produzenten syrE10 RE11 überexprimiert wurden (TriASo-Titer: 64 mg/L). Als Kontrolle wurde der WT mit den beiden Leervektoren p-nat1 (Abb. 90 im Anhang) und pDB006 (Abb. 70 im Anhang) transformiert. Die Analyse der Transformanten wurde durch RP-HPLC durchgeführt. Je drei Klone der Stämme WT p-nat1 pDB006 und WT

p-mCER-nat1-oCvLAG1 pDB006-PcDES1 wurden in TAPS-Medium kultiviert und die LCB-Konzentrationen mittels RP-HPLC analysiert, wobei hier aufgrund der relativ geringen TriASo-Konzentrationen die OPA-Derivatisierung verwendet wurde (Abb. 36).

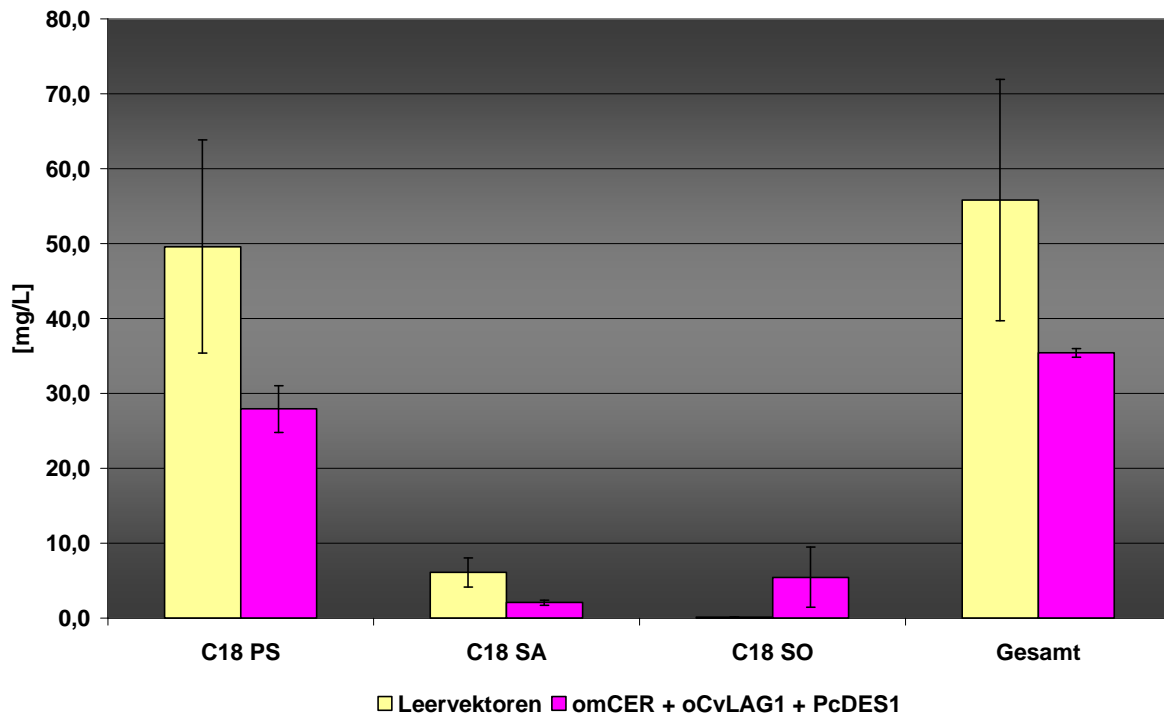


Abbildung 36: WT-Transformanten im Vergleich. Leervektoren bezeichnet Transformanten mit den Vektoren p-nat1 und pDB006. Im Vergleich hierzu sind Transformanten mit dem codon-optimierten Ceramidase-Gen aus der Maus, der codon-optimierten Ceramid-Synthase aus *Coccolithovirus* und dem überexprimierten *DES1*-Gen aus *P. ciferrii* gezeigt. (OD_{600nm} [Mittelwerte]: Leervektoren ⇒ 41,1 / omCER + oCvLAG1 + PcDES1 ⇒ 48,2)

Es zeigt sich, dass die Überexpression der drei Gene - codon optimierte alkalische Ceramidase aus Maus, codon optimierte Ceramid-Synthase aus *Coccolithovirus* und *P. ciferrii* Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase - im WT-Hintergrund zu einer messbaren Synthese von Sphingosin im WT führt (5,5 mg/L im Vergleich zur Kontrolle mit 0,1 mg/L). Diese SO-Konzentration liegt jedoch, auch unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Analyse-Methoden, deutlich unter der in dem Sphinganin-Produzenten syrE10 RE11 erzielten TriASo-Konzentration von 64 mg/L. Dies ist vermutlich im

Wesentlichen der Tatsache geschuldet, dass die Ceramid-Synthase-Aktivität im WT-Derivat nicht ausreicht, um effektiv mit der Sphingolipid-C4-Hydroxylase um das gemeinsame Substrat Sphinganin zu konkurrieren, da Phytosphingosin wie im WT selbst die dominante Sphingoidbase darstellt. Außerdem erscheint es möglich, dass die im WT-Hintergrund überproduzierte Ceramid-Synthase aus *Coccolithovirus* auch Phytosphingosin als Substrat akzeptiert, was das Ungleichgewicht noch verstärken würde.

4 DISKUSSION

4.1 Die Sphingolipid-Biosynthese in *P. ciferrii*

4.1.1 Aufklärung durch die Isolation relevanter Gene aus *P. ciferrii*

Eine Vielzahl an Genen aus dem Sphingolipid-Biosyntheseweg von *P. ciferrii* wurde mittels der Verwendung degenerierter Primer und anschließender inverser PCR vollständig isoliert. Vor Beginn dieser Arbeit waren lediglich drei Gene aus dem Sphingolipid-Stoffwechselweg von *P. ciferrii* beschrieben: *LCB2* (Bae *et al.*, 2003), *SYR2* (Bae *et al.*, 2004) und *DES1* (Patentanmeldung: WO2006/048458). Diese Arbeit führte zur Isolierung acht weiterer Gene, *LCB1*, *TSC10*, *LAG1*, *LAF1*, *LIP1*, *YXC1*, *8DES* und *GCS1*.

4.1.2 Tsc3p

Im Gegensatz zu diesen acht Genen schlugen die Versuche zur Isolation des *TSC3*-Gens allesamt fehl. Trotz der Verwendung verschiedener degenerierter Oligonukleotide - drei Vorwärts- und zwei Rückwärts-Primer - in verschiedenen Kombinationen und der Variierung der PCR-Parameter konnte das *TSC3*-Gen nicht aus *P. ciferrii* isoliert werden. Auch der Versuch über eine konservierte, benachbarte Anordnung von *RDH54* und potentiellen *TSC3*-Genen, die sich in *Candida albicans* und *Candida tropicalis* findet, zum Erfolg zu kommen, führte nicht zur Isolation des Gens. Daher liegt die Vermutung nahe, dass *P. ciferrii* Tsc3p gar nicht besitzt. Zu dem nur 80 AS langen Protein von *S. cerevisiae* finden sich lediglich in drei Hefen vermutlich homologe Proteine: *Kluyveromyces lactis*, *Ashbya gossypii* und *Candida albicans*. In vielen anderen Hefen mit vollständiger Genominformation, darunter z.B. *Gibberella zeae*, *Neurospora crassa*, *Candida glabrata*, *Debaromyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe* und insbesondere *Pichia stipitis* sind keine homologen Proteine zu finden. Dies gilt auch bei einer TBLASTN-Suche in den Genomen dieser Organismen, daher ist auszuschließen, dass lediglich deren fehlerhafte Annotation für den Befund verantwortlich ist. Der experimentelle Fehlschlag *TSC3* aus *P. ciferrii* zu isolieren in Kombination mit den bioinformatischen Resultaten, insbesondere dem Fehlen eines homologen Proteins in einem Organismus der gleichen Gattung, *Pichia*

stipitis, unterstreichen die Annahme des Fehlens des akzessorischen Proteins Tsc3p der Serin-Palmitoyltransferase in *P. ciferrii*.

Um diesbezüglich weitere Sicherheit zu gewinnen, wäre die Verwendung des *TSC3*-Gens aus *Kluyveromyces lactis*, *Ashbya gossypii* oder *Candida albicans* als heterologe Sonde in einem Southern *blot* mit genomischer *P. ciferrii*-DNA denkbar.

4.1.3 Lcb1p

Der einleitende Schritt der Sphingolipid-Biosynthese wird auch in *P. ciferrii* durch die Serin-Palmitoyltransferase katalysiert. Diese besteht, wie auch in anderen Hefen, aus zwei Untereinheiten. Neben dem bereits beschriebenen *LCB2*-Gen (Bae *et al.*, 2003) konnte in dieser Arbeit auch das *LCB1*-Gen kloniert werden, während Versuche dieses mittels Southern-Hybridisierung zu isolieren, fehlgeschlagen waren (Bae *et al.*, 2003).

Die starke Ähnlichkeit des isolierten Gens zu dem *LCB1*-Gen aus *S. cerevisiae* ist ein erster Hinweis darauf, dass es sich bei dem isolierten Gen um *LCB1* handelt. Darüber hinaus sind zur Bestätigung die Komplementation der Sphingoidbasen-Auxotrophie einer *lcb1*-Mutante von *S. cerevisiae* (Pinto *et al.*, 1992) oder die Komplementation der Sporulations-Defizienz einer homozygoten *lcb1*-Mutante von *S. cerevisiae* (Buede *et al.*, 1991) Optionen. Um sicherzustellen, dass das Lcb1p bei der Sphingolipid-Biosynthese von *P. ciferrii* eine Rolle spielt, sind die Überexpression bzw. die Inaktivierung des *LCB1*-Gens mögliche Ansatzpunkte. Aufgrund des unsicheren Ploidie-Status ist jedoch nicht zwingend mit einem Effekt bei der Deletion oder Disruption des *LCB1*-Locus zu rechnen.

Die vorherrschende Kettenlänge der Sphingoidbasen in *P. ciferrii* beträgt 18 Kohlenstoffatome, was auf eine Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA zurückzuführen ist. Jedoch finden sich in geringerem Maße ebenfalls Sphingoidbasen mit einer Kettenlänge von 20 Kohlenstoffatomen. In *S. cerevisiae* ist neben der vorherrschenden Substratspezifität der Serin-Palmitoyltransferase bezüglich Palmitoyl-CoA auch deren Akzeptanz von Stearoyl-CoA (C18) als Substrat beschrieben, was dann zur Synthese von C20-Sphingoidbasen führt (Lester und Dickson, 2001). Es liegt somit nahe, dass auch die Serin-Palmitoyltransferase von *P. ciferrii* neben Palmitoyl-CoA Stearoyl-CoA als Substrat nutzen kann.

Alle in *P. ciferrii* detektierten Sphingoidbasen - Sphinganin, Phytosphingosin und Sphingosin - sind mit Kettenlängen von 18 und 20 Kohlenstoffatomen vorzufinden.

Auf den gesamten Sphingolipid-Stoffwechselweg von *P. ciferrii* ausgedehnt, lässt sich daher vermuten, dass daher sämtliche Enzyme sowohl Sphingoidbasen mit einer Kettenlänge von 18, als auch von 20 Kohlenstoffatomen akzeptieren.

4.1.4 Tsc10p

Das *TSC10*-Gen wurde durch die starke Ähnlichkeit zu den beiden beschriebenen 3-Ketosphinganin-Reduktasen aus *Candida albicans* und *S. cerevisiae* identifiziert. Das Vorhandensein der so genannten Rossmann-Falte, die meist neben einer NADPH-Bindedomäne in einem Protein zu finden ist (Rao und Rossmann, 1973), im Tsc10p legt die Vermutung nahe, dass die Reduktion von 3-Ketosphinganin zu Sphinganin auch in *P. ciferrii* NADPH-abhängig ist. Zur näher gehenden biochemischen Untersuchung und zur Bestätigung der 3-Ketosphinganin-Reduktase-Aktivität wäre in diesem, wie auch in allen anderen Fällen z.B. die heterologe Expression einer markierten Variante in *E. coli* und die anschließende Aufreinigung, gefolgt von einem *in vitro*-Assay zur Untersuchung der Enzymaktivität angebracht.

4.1.5 Lag1p, Laf1p & Lip1p

Im Falle der beiden Ceramid-Synthase-Untereinheiten Lag1p und Laf1p aus *P. ciferrii* konnte große Ähnlichkeit zu den beiden Ceramid-Synthase-Untereinheiten Lac1p und Lag1p aus *S. cerevisiae* festgestellt werden. In beiden Fällen zeigte sich jedoch gegenüber Lac1p von *S. cerevisiae* eine geringfügig stärkere Ähnlichkeit. Während *P. ciferrii* Lag1p sowohl sehr ähnlich zum homologen Protein von *S. cerevisiae* ist, als auch Syntenie bezüglich der genetischen Organisation des korrespondierenden Gen-Locus existiert, gilt keines davon für *P. ciferrii* Laf1p im Vergleich mit *S. cerevisiae* Lac1p. Dies ist der Grund für die abweichende Bezeichnung der zweiten Ceramid-Synthase-Untereinheit aus *P. ciferrii*.

Trotz des Vorliegens vermutlich zu Lip1p, der dritten Untereinheit der Ceramid-Synthase in *S. cerevisiae*, homologer Sequenzen in lediglich drei von 18 Hefen mit vollständig sequenziertem Genom - *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis* und *Ashbya gossypii* - konnte auch aus *P. ciferrii* ein vermutlich homologes Gen isoliert werden.

Neben der für *S. cerevisiae* beschriebenen Aktivität zur Bildung von Phytoceramid aus Phytosphingosin und einem Acyl-CoA-Thioester (Schorling *et al.*, 2001) besitzt

die Ceramid-Synthase aus *P. ciferrii* zusätzlich die Aktivität zur Synthese von Dihydroceramid aus Sphinganin und einem Acyl-CoA-Thioester, wie sie aus der Maus bekannt ist (Venkataraman *et al.*, 2002).

Die Substratspezifität der *P. ciferrii*-Ceramid-Synthase bezüglich der Acyl-CoA-Thioester ist vermutlich sehr breit. Sowohl Phytoceramide, als auch Dihydroceramide mit vielen verschiedenen Fettsäure-Kettenlängen wurden nachgewiesen. Diese liegen zum Teil einfach ungesättigt und/oder hydroxyliert vor. In *S. cerevisiae* überwiegen Phytoceramide mit C_{26:0}- und C_{26:0-OH}-Fettsäureseitenketten (Lester *et al.*, 1993). In geringeren Konzentrationen finden sich jedoch auch weitere Fettsäureseitenketten: C_{20:0}, C_{20:1}, C_{22:0}, C_{22:1}, C_{24:0-OH}, C_{24:0}, sowie C_{28:0} (Oh *et al.*, 1997). Auch in *P. ciferrii* überwiegen Phytoceramide mit einer Fettsäureseitenkette von 26 Kohlenstoffatomen bei weitem. Allerdings konnte hier nur die hydroxylierte Form quantifiziert werden, was zeigt, dass die nicht hydroxylierte Form, wenn überhaupt, nur in äußerst geringer Konzentration vorliegt. Des Weiteren wurden auch in *P. ciferrii* Ceramide mit zahlreichen anderen Fettsäureseitenketten detektiert, die in deutlich geringerer Konzentration als Phytoceramide mit C_{26:0}-Fettsäureseitenketten vorlagen.

Grundlegende Unterschiede bezüglich der Anzahl und der Substratspezifität der Ceramid-Synthasen finden sich im Vergleich mit der Situation in der Maus. Es liegen dort sechs verschiedene Ceramid-Synthasen, die so genannten LASS-Proteine vor, die unterschiedliche Substratspezifitäten bezüglich der Kettenlänge der akzeptierten Acyl-CoA-Thioester aufweisen und je nach Gewebe unterschiedlich stark exprimiert werden. Diese synthetisieren Dihydroceramide mit Fettsäureseitenketten von C_{12:0} bis C_{26:0}, sowie C_{18:1} (Mizutani *et al.*, 2005 und 2006).

Aufgrund des Vorliegens von VLCFA's in Kombination mit der entsprechenden Sphingoidbase, kann postuliert werden, dass auch in *P. ciferrii* Elo2p- und Elo3p-Homologe (Oh *et al.*, 1997) vorhanden sein müssen, die für die Verlängerung von C₁₆- hin zu C₂₆-Fettsäuren notwendig sind.

4.1.6 Des1p

Bei heterologer Expression der Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase von *P. ciferrii* in einem *S. cerevisiae* *syr2Δ*-Stamm konnte die Synthese von Ceramid bzw. Sphingosin - aufgrund der Probenaufbereitung kann bei der angewandten Messmethode nicht zwischen der gebundenen und der freien Sphingoidbase unterschieden werden - gezeigt und somit die Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase-Aktivität des Des1p bestätigt

werden. Eine Umsetzung von Sphinganolin zu Sphingosin konnte erst nach Disruption des Sphinganolin-Hydroxylase-Gens und einhergehender Sphinganolin-Akkumulation erzielt werden. Die Expression dreier Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturasen - aus *Candida albicans*, *Yarrowia lipolytica* und *P. ciferrii* - in einem *S. cerevisiae* WT mit intakter Sphinganolin-Hydroxylase führte nicht zur Synthese detektierbarer Mengen von Sphingosin (nicht gezeigt). Trotz der Akkumulation des direkten Substrats Dihydroceramid bzw. der freien Sphingoidbase Sphinganolin im *S. cerevisiae* *syr2* Δ wird nur ein Bruchteil dessen - jeweils ca. $1/10$ - in das direkte Produkt Ceramid bzw. in die freie Sphingoidbase Sphingosin umgewandelt. Dies kann auf verschiedene Gründe zurückzuführen sein. So ist eine direkte Produkt-Hemmung der Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase durch Ceramid bzw. Sphingosin möglich. Alternativ ist auch eine zu geringe Aktivität der *S. cerevisiae*-Ceramid Synthase mit Sphinganolin als Substrat denkbar, was im Gegenzug zur Bildung lediglich geringer Mengen Dihydroceramids, des direkten Substrats der Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase, führt, so dass auch nur geringe Mengen Sphingosin gebildet werden können.

Die beschriebene Bifunktionalität der Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase aus *Candida albicans* als Desaturase und Hydroxylase, die neben der Desaturierung von Sphinganolin im Dihydroceramid zu Sphingosin im Ceramid, auch dessen Hydroxylierung zu Phytoceramid katalysiert (Abb. 37) (Ternes *et al.*, 2002), konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden, da kein Phytosphingosin detektiert wurde. Bei einem beschriebenen Sphinganolin/Phytosphingosin-Verhältnis von 60-70:1 würde die erwartete Konzentration jedoch auch unter die Nachweisgrenze fallen, so dass auch für die Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase von *P. ciferrii* eine geringfügige Hydroxylase-Aktivität nicht ausgeschlossen werden kann.

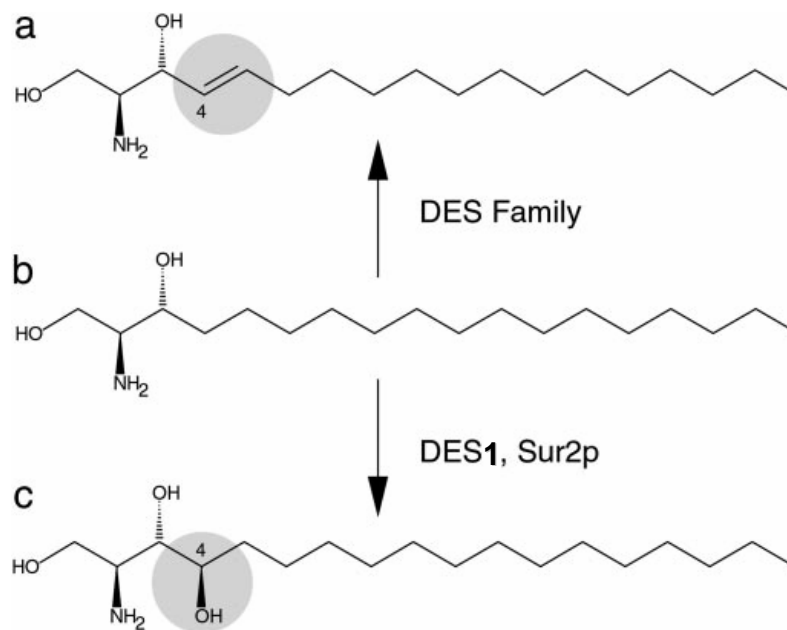


Abbildung 37: Die Bifunktionalität der Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase. Ausgehend vom Sphingamin (b), das gebunden in Dihydroceramid vorliegt, besitzt das Enzym eine Desaturase-Aktivität zum Einfügen einer Doppelbindung zwischen C4 und C5 zur Synthese von Ceramid mit Sphingosin (a) als Sphingoidbase. Analog zur Aktivität der Sphingamin-Hydroxylase (Sur2p), hydroxyliert das Enzym jedoch in Dihydroceramid gebundenes Sphingamin auch in geringem Maße an C4 zu in Phytoceramid gebundenem Phytosphingosin (c) (aus Ternes *et al.*, 2002).

Die Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase von *P. ciferrii* besitzt ein breites Substratspektrum. So wurden Dihydroceramide mit einer Fettsäureseitenkette von C16 bis zu C26, ungesättigt und einfach gesättigt, sowie hydroxyliert und nicht hydroxyliert in das entsprechende Ceramid umgewandelt.

Die Länge der akzeptierten Sphingoidbase Sphingamin in Dihydroceramid variiert zwischen 18 und 20 Kohlenstoffatomen. Das Substrat wird dann jeweils in Ceramid mit C18- bzw. C20-Sphingosin umgewandelt, wie es z.B. auch für die Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase von *Schizosaccharomyces pombe* beschrieben ist (Garton *et al.*, 2003).

4.1.7 Yxc1p

Die aus *P. ciferrii* isolierte alkalische Ceramidase ist vermutlich, ebenso wie die beiden alkalischen Ceramidasen aus *S. cerevisiae*, ein in der ER-Membran lokalisiertes integrales Membranprotein. Erste Versuche zur Bestimmung der Substratspezifität

durch Überexpression von *YXC1* in *P. ciferrii* führten nicht zu Veränderungen der Dihydroceramid-, Phytoceramid- oder Ceramid-Konzentrationen (Ergebnisse nicht gezeigt). Es bleibt somit offen, welche Substrate diese Ceramidase hydrolysieren kann. In *S. cerevisiae* sind zwei Ceramidasen beschrieben, die bevorzugt Phytoceramid bzw. Dihydroceramid hydrolysieren (Mao *et al.*, 2000a und b). Sequenzvergleiche auf Proteinebene zeigten, dass neben *S. cerevisiae* vermutlich lediglich *Candida glabrata* ebenfalls zwei alkalische Ceramidasen besitzt. Da die mit *P. ciferrii* nahe verwandten Arten *Kluyveromyces lactis*, *Debaromyces hansenii*, *Candida albicans*, *Ashbya gossypii*, sowie *Yarrowia lipolytica* lediglich eine Ceramidase besitzen, liegt die Annahme nahe, dass dies auch für *P. ciferrii* gilt. Zudem ist zu vermuten, dass die isolierte Ceramidase, sofern es tatsächlich die einzig in *P. ciferrii* vorhandene ist, auch eine Aktivität zur Hydrolyse von Ceramid in Sphingosin und in eine freie Fettsäure besitzt. Diese Aktivität findet sich nicht bei den beiden alkalischen Ceramidasen aus *S. cerevisiae*, was die fehlende Synthese von Sphingosin erklärt. Bei Säugtieren dienen jedoch hauptsächlich Sphingosin-basierte Ceramide als wichtigster Baustein komplexer Sphingolipide. So besitzen diese Organismen dann auch entsprechende Ceramidasen, die eine Ceramid-Hydrolyse-Aktivität besitzen (Koch *et al.*, 1996; Tani *et al.*, 2000a und b; El Bawab *et al.*, 2000). Wie in *Candida albicans* und *Yarrowia lipolytica* findet sich auch in *P. ciferrii* Ceramid als Baustein von komplexen Sphingolipiden, was das Vorhandensein einer Ceramidase mit entsprechender Substratspezifität zumindest nahe legt.

Eine Ceramidase, die in der Lage ist, sowohl Phytoceramid, Dihydroceramid, als auch Ceramid zu hydrolysieren ist zwar nicht die Regel, da sich z.B. in Ratte, Maus und Mensch mehrere Ceramidasen - klassifiziert als sauer, neutral und basisch nach dem pH-Optimum ihrer Enzymaktivität - mit unterschiedlichen Substratspezifitäten finden (Nikolova-Karakashian und Merrill, 2000). Dennoch sind auch Ceramidasen beschrieben, die in der Lage sind alle drei Sphingolipid-Spezies zu hydrolysieren. So bevorzugt die neutrale, aus der Ratten-Leber isolierte Ceramidase zwar Ceramid, besitzt jedoch auch eine geringe Aktivität mit Phyto- und Dihydroceramid (Mitsutake *et al.*, 2001). Ebenso ist von einer alkalischen Ceramidase des Menschen bekannt, dass Phytoceramid bevorzugt und Ceramid und Dihydroceramid mit geringerer Aktivität hydrolysiert werden (Mao *et al.*, 2001). Es ist somit nicht ausgeschlossen, dass auch die Ceramidase aus *P. ciferrii* in der Lage ist Phytoceramid, Dihydroceramid und Ceramid zu hydrolysieren.

Die beiden Ceramidasen aus *S. cerevisiae* mit einer großen Ähnlichkeit zu der aus *P. ciferrii* isolierten Ceramidase besitzen neben der Hydrolyse-Aktivität zusätzlich jeweils eine reverse Ceramid-Synthase-Aktivität zur CoA-unabhängigen Synthese von Phytoceramid aus Palmitat und Phytosphingosin (Ypc1p; Mao *et al.*, 2000a), sowie zur Synthese von Dihydroceramid aus Palmitat und Sphingalin (Ydc1p; Mao *et al.*, 2000b). Aufgrund der großen Ähnlichkeit dieser Ceramidasen zur *P. ciferrii*-Ceramidase ist auch für das Yxc1p eine reverse, CoA-unabhängige Ceramid-Synthase-Aktivität denkbar.

4.1.8 Cerebroside in *P. ciferrii*

In *Saccharomyces kluyveri* und *Kluyveromyces lactis* wurde die Akkumulation von Cerebrosiden mit Δ^4, Δ^8 -9-Methyl-Sphingadienin als Sphingoidbase gezeigt (Takakuwa *et al.*, 2002a). Die anschließende Isolierung und Charakterisierung der Gene, die für die entsprechenden Sphingolipid- Δ^8 -Desaturasen codieren (Takakuwa *et al.*, 2002b), wurde zum Anlass genommen auch in *P. ciferrii* nach einer Sphingolipid- Δ^8 -Desaturase zu suchen. Die von dem isolierten Gen abgeleitete Proteinsequenz wurde anhand des hohen Ähnlichkeits-Grades und dem Vorliegen charakteristischer Strukturelemente der Familie der Sphingolipid- Δ^8 -Desaturasen zugeordnet. Zur Bestätigung einer entsprechenden Enzymaktivität stehen jedoch entsprechende Enzym-Assays noch aus.

In beiden oben genannten Hefen, sowie in *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Magnaporthe grisea* und in *Neurospora crassa* werden die doppelt desaturierten Sphingoidbasen zusätzlich mit einer Methylgruppe an C9 versehen (Takakuwa *et al.*, 2002a). Dies legte die Vermutung nahe, dass auch in *P. ciferrii* Δ^4, Δ^8 -9-Methyl-Sphingadienin zu finden ist. Wie beispielhaft anhand von *Pichia pastoris* gezeigt, katalysiert die Sphingolipid-C9-Methyltransferase die Methylierung der doppelt desaturierten Sphingoidbasen (Ternes *et al.*, 2006). Tatsächlich konnte das vermutlich die Sphingolipid-C9-Methyltransferase in *P. ciferrii* codierende Gen isoliert (persönliche Mitteilung von Thomas Hüller) und somit gezeigt werden, dass alle Proteine, die zur Synthese von Δ^4, Δ^8 -Methyl-Sphingadienin enthaltenden Cerebrosiden benötigt werden, vorhanden sind.

Ebenfalls aus *P. ciferrii* isoliert wurde das GCS1-Gen, welches vermutlich für eine Ceramid-Glycosyltransferase codiert. Die große Ähnlichkeit zur biochemisch charakterisierten Ceramid-Glycosyltransferase von *Candida albicans*, sowie das Vorliegen

charakteristischer Merkmale der Glycosyltransferase-Familie 21 in der Aminosäureabfolge legen trotz der für das *P. ciferrii*-Enzym fehlenden biochemischen Analysen nahe, dass das isolierte Gen für Gcs1p codiert. Auch hier, wie in anderen Hefen, bleibt die Frage nach dem Substrat, welches die Glykosylierung erfährt, ungeklärt. Zu klären wäre, welche Ceramide - mit Δ^4 - Δ^8 -9-Methyl-Sphingadienin als Sphingoidbase oder Vorläufern dieses Moleküls - die Ceramid-Glycosyltransferase als Substrat akzeptiert.

Es ist weiterhin anzunehmen, dass *P. ciferrii*, wie nahezu alle Pilze, mit Ausnahme von *S. cerevisiae* und dessen nahen Verwandten, Cerebroside mit Δ^4 , Δ^8 -9-Methyl-Sphingadienin als Sphingoidbase bildet. Die in den meisten Pilzen hauptsächlich vorliegende Länge der Fettsäureseitenkette in Cerebroside beträgt 18 Kohlenstoffatome. Diese Seitenkette liegt zumeist gesättigt oder einfach ungesättigt vor (Tab. 11), wobei die Lage der Doppelbindung von Spezies zu Spezies variieren kann (Barreto-Bergter *et al.*, 2004).

Tabelle 11: Charakteristika der Cerebroside von Pilzen. Angegeben sind die in den jeweiligen Arten in Cerebroside gefundenen Fettsäureseitenketten und Zucker. Die Sphingoidbase ist in allen Fällen Δ^4, Δ^8 -9-Methyl-Sphingadienin (aus Barreto-Berger *et al.*, 2004; modifiziert).

Spezies	hauptsächlich vorliegende Fettsäure	Zucker
<i>A. fumigatus</i> <i>A. versicolor</i> <i>A. flavus</i>	C _{18:1(OH)}	Glukose/Galaktose
<i>P. boydii</i>	C _{16:0(OH)} C _{18:0(OH)}	Glukose
<i>Fusarium sp</i> <i>F. oxysporum</i> <i>F. solani</i>	C _{16:0(OH)} C _{18:0(OH)} C _{18:1(OH)}	Glukose
<i>P. brasiliensis</i>	C _{18:0(OH)} C _{18:1(OH)}	Glukose
<i>H. capsulatum</i>	C _{18:0(OH)} C _{18:1(OH)}	Glukose
<i>C. neoformans</i>	C _{18:0(OH)}	Glukose
<i>C. albicans</i>	C _{18:0(OH)}	Glukose
<i>M. grisea</i>	C _{18:1(OH)}	Glukose
<i>S. schenckii</i>	C _{18:0(OH)} C _{18:1(OH)}	Glukose/Galaktose

In *P. ciferrii* variiert die Länge der Fettsäureseitenkette in den Cerebroside zwischen C_{16:0}, C_{16:1}, C_{18:0}, C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3} und C_{18:0-OH}, während D-Glukose, wie in den meisten Pilzen, als einziger Zucker nachgewiesen wurde (Kaufman *et al.*, 1971).

4.1.9 Phosphoinositol enthaltende Sphingolipide: IPC, MIPC & M(IP)₂C

Die Sphingolipide IPC, MIPC und M(IP)₂C sind integrale Bestandteile der Plasmamembran von *S. cerevisiae*. Diese wurden aber bis dato lediglich in einigen weiteren Pilzen detektiert, in anderen Arten wurden abgewandelte Sphingolipide beschrieben (Tab. 12). Da eine entsprechende Analytik bisher nicht stattgefunden hat, ist unklar, ob *P. ciferrii* ebenfalls IPC, MIPC, sowie M(IP)₂C, oder abgewandelte Formen enthält.

Tabelle 12: Übersicht über in Pilzen nachgewiesene Inositolphosphoceramide (aus Dickson und Lester, 1999b; modifiziert).

Inositolphosphoceramide	Organismus
Cer-P-Inos (IPC)	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>Candida albicans</i> ; <i>Histoplasma capsulatum</i> ; <i>Phytophthora parasitica</i> ; <i>Cryptococcus neoformans</i> ; <i>Phytophthora capsici</i> ; <i>Aspergillus niger</i>
Cer-(P-Inos) ₂	<i>Neurospora crassa</i>
Cer-P-Inos-Man (MIPC)	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>C. albicans</i> ; <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ; <i>C. neoformans</i> ; <i>C. utilis</i>
Cer-P-Inos-Man-Man Cer-P-Inos-Man-Man-Gal _f Cer-P-Inos-Man-Man-Gal _p	<i>H. capsulatum</i>
Cer-P-Inos-(Man, Gal) Cer-P-Inos-(Man, Gal, Glc) Cer-P-Inos-(Man ₂ Gal ₃)	<i>A. niger</i>
Cer-P-Inos-Man-P-Inos (M(IP) ₂ C)	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>C. albicans</i> ; <i>C. neoformans</i>

4.1.9.1 IPC-Synthase

Der erste Schritt der Synthese von Phytosphingosin zu M(IP)₂C wird in *S. cerevisiae* katalysiert durch die IPC-Synthase, codiert durch *AUR1* (Nagiec *et al.*, 1997). IPC wurde neben *S. cerevisiae* auch in der mit *P. ciferrii* nahe verwandten Art *Candida*

albicans detektiert (Wells *et al.*, 1996). Der IPC-Synthase aus *S. cerevisiae* sehr ähnliche und vermutlich homologe Proteine finden sich in allen mit *P. ciferrii* nahe verwandten Hefen, was das Vorliegen der IPC-Synthase in *P. ciferrii* wahrscheinlich macht.

4.1.9.2 Sphingolipid- α -Hydroxylase

In *S. cerevisiae* katalysiert die Sphingolipid- α -Hydroxylase die Hydroxylierung der C26-Fettsäure in IPC-C (Dunn *et al.*, 1997). Auch in *Candida albicans* liegt IPC-C vor (Wells *et al.*, 1996). Die dazugehörige Sphingolipid- α -Hydroxylase wurde jedoch noch nicht isoliert. Bei der bioinformatische Suche nach Homologen zur Sphingolipid- α -Hydroxylase von *S. cerevisiae* konnten in *Candida albicans*, sowie in *Candida glabrata*, *Debaromyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Ashbya gossypii* und *Pichia stipitis* ORF's mit großer Ähnlichkeit zum Enzym aus *S. cerevisiae* identifiziert werden. Dies legt die Annahme nahe, dass auch in *P. ciferrii* neben dem nicht hydroxylierten IPC-A und IPC-B, auch die einfach hydroxylierten IPC-B' und IPC-C vorliegen. Die Antwort auf die Frage nach dem Vorhandensein des zweifach hydroxylierten IPC-D's bleibt jedoch weiter unklar.

4.1.9.3 Mannosyltransferase

Zur Mannosylierung von IPC zu MIPC stehen in *S. cerevisiae* zwei Enzymkomplexe bereit, Sur1p-Csg2p und Csh1p-Csg2p (Uemura *et al.*, 2003). Zu den beiden vermutlich katalytischen Untereinheiten Sur1p und Csh1p findet sich in *Candida albicans*, *Kluyveromyces lactis*, sowie *Pichia stipitis* nur ein Homolog. Lediglich in *Candida glabrata* finden sich zwei homologe Proteine. Diese Verdopplung des Vorläufergens geht, wie vermutlich auch die vieler anderer Gene (siehe z. B. auch *YDC1* und *YPC1*), auf eine frühe Duplikation des Genoms und dem anschließenden Verlust einiger dieser Duplikate bzw. deren funktioneller Differenzierung zurück. In einem gemeinsamen Vorfahren von *S. cerevisiae* und *Candida glabrata* hat die beschriebene Duplikation stattgefunden und erklärt somit das häufige Auftreten von paralogenen Genen in diesen beiden Organismen (Dujon *et al.*, 2004; Abb. 38).

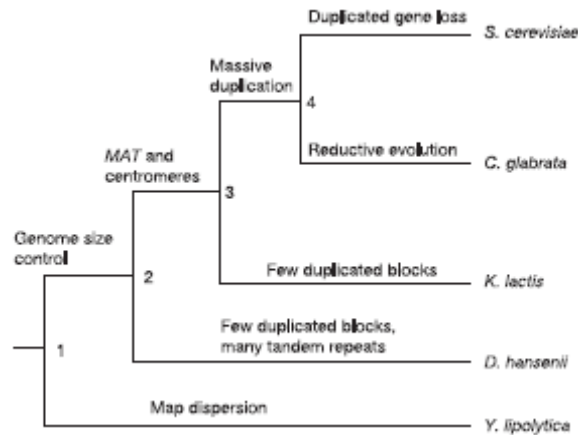


Abbildung 38: Veränderungen in der Genomstruktur von Hemiascomyzeten. Die Topologie des Baums beruht auf den Sequenzen der 25S-rDNA (aus Dujon *et al.*, 2004).

Es liegt daher die Vermutung nahe, dass es sich in der Bäckerhefe und in *Candida glabrata* um paraloge Gene handelt, die in den anderen Hefen lediglich in einfacher Kopie vorkommen. Allerdings überrascht, dass sich in *Yarrowia lipolytica* und in *Ashbya gossypii* keinerlei zu *SUR1* und *CSH1* homologe Proteine finden lassen. Zwei Gründe sind für diese Feststellung denkbar. Zum einen ist nicht auszuschließen, dass ein anderes Protein die Mannosylierung von IPC in diesen beiden Organismen übernimmt, welches keinerlei Homologie zu den beschriebenen Mannosyltransferasen besitzt. Dies erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, da ein solches Enzym bis dato noch nicht beschrieben wurde. Zum anderen könnte in diesen Organismen ein solches Enzym tatsächlich fehlen, was zu der Abwesenheit von mannosylierten Inositolphosphoceramiden führen würde. So ist z.B. für *Neurospora crassa* die Existenz von Di-Inositolphosphorylceramiden in Abwesenheit mannosylierter Inositolphosphoceramide beschrieben worden (Lester *et al.*, 1974). Somit ist auch für *P. ciferrii* die Existenz mannosylierter Inositolphosphoceramide inklusive der dazugehörigen Mannosyltransferase offen.

Ein der vermutlich regulatorischen Untereinheit Csg2p von *S. cerevisiae* sehr ähnliches und daher möglicherweise homologes Protein ist lediglich in *Candida glabrata* zu finden. Es liegt daher nahe anzunehmen, dass sich in *P. ciferrii* keine entsprechende Untereinheit der Mannosyltransferase findet.

4.1.9.4 Inositolphosphotransferase 1

Das *IPT1*-Gen codiert in *S. cerevisiae* die Inositolphosphotransferase 1, welche die Synthese von $M(IP)_2C$ katalysiert. Ein homologes Protein findet sich in allen diesbezüglich analysierten Hefen (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Debaromyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Ashbya gossypii* und *Pichia stipitis*). Es liegt somit nahe anzunehmen, dass auch in *P. ciferrii* Sphingolipide mit zwei Inositolphosphaten [$(IP)_2C$] zu finden sind. Ob diese zudem auch mannosyliert [$M(IP)_2C$] vorliegen, bleibt jedoch offen.

4.1.10 Import, Export und Abbau von Sphingoidbasen und Sphingolipiden

4.1.10.1 Phosphorylierung von Sphingoidbasen durch LCB-Kinasen

Die einzigen biochemisch charakterisierten LCB-Kinasen stammen aus *S. cerevisiae*. Hier finden sich zwei Gene, *LCB4* und *LCB5*, die beide für LCB-Kinase-Aktivitäten codieren (Nagiec *et al.*, 1988). Die bioinformatische Suche nach homologen Proteinen in 19 weiteren Pilzen zeigte, dass wiederum lediglich in *Candida glabrata* zwei LCB-Kinasen vorliegen. Es verwundert daher nicht, dass in allen anderen analysierten Hefe-Genomen nur ein vermutlich homologes Protein gefunden wurde. Es lag somit nahe anzunehmen, dass auch in *P. ciferrii* nur eine LCB-Kinase zu finden ist. Tatsächlich wurde ein Fragment eines entsprechenden Genes isoliert (persönliche Mitteilung von Thomas Hüller).

4.1.10.2 Dephosphorylierung von Sphingoidbasen-Phosphaten durch LCBP-Phosphatasen

Die Dephosphorylierung importierter Sphingoidbasen ist essentiell für die Inkorporation selbiger in komplexere Sphingolipide (Qie *et al.*, 1997). In *S. cerevisiae* gibt es zwei LCBP-Phosphatasen, Lcp3p und Ysr3p (Qie *et al.*, 1997; Mao *et al.*, 1997; Mandala *et al.*, 1998). Erneut finden sich bei einer bioinformatischen Suche nach homologen Proteinen in *Candida glabrata* zwei Paraloge, wohingegen alle anderen analysierten Pilze nur ein Homolog aufweisen. Die phylogenetische Nähe der Pilze, in denen homologe Proteine gefunden wurden, zu *P. ciferrii* legt ein Vorliegen einer LCBP-Phosphatase auch in diesem Organismus nahe.

Untersuchungen zur Membrantopologie des Lcb3p von *S. cerevisiae* haben ergeben, dass die LCBP-Phosphatase acht Transmembran-Helices besitzt und das hoch konservierte Phosphatase-Motiv innerhalb des ER-Lumens zu finden ist (Kihara *et al.*, 2003). Es bleibt somit zu klären, ob ein zusätzlicher Transporter für den Import der LCBP's in das ER-Lumen notwendig ist, oder ob das Lcb3p und/oder das Ysr3p neben der Phosphatase-Aktivität auch eine Transportfunktion übernehmen.

4.1.10.3 Abbau durch die Sphinganinephosphat-Lyase

Die Phosphorylierung der Sphingoidbasen dient entweder der Umwandlung in eine transportfähige Form für den Transport von der Plasma- zur ER-Membran (Nagiec *et al.*, 1998), oder als Voraussetzung für ihren Abbau, welcher in *S. cerevisiae* durch die Aktivität einer Sphinganinephosphat-Lyase, codiert durch *DPL1*, bewerkstelligt wird (Saba *et al.*, 1997). Letztere Aktivität ist auch in *P. ciferrii* zu finden. Hier beschränkt sich diese jedoch nicht auf Phytosphingosin und Sphinganin, sondern betrifft auch Sphingosin (Stoffel *et al.*, 1968). Der Abbau ist ATP-abhängig und die Sphinganinephosphat-Lyase an die Membranen des ER und der Mitochondrien gebunden (Stoffel *et al.*, 1969). Als Abbauprodukte entstehen ein Fettsäurealdehyd und Phosphoethanolamin (Karlsson *et al.*, 1967) (siehe Einleitung). Das dazugehörige Gen ist jedoch bis dato noch nicht isoliert worden.

4.1.10.4 Export von Sphingoidbasen

Neben dem Import, für den noch kein spezifischer Transporter identifiziert wurde, und anschließender Phosphorylierung, existiert ein weiterer Mechanismus zur Regulation der Konzentration von Sphingoidbasen in der Zelle im Export. In *S. cerevisiae* codiert *RSB1* vermutlich für einen ATP-abhängigen Transporter oder eine Flippase, der/die Sphingoidbasen, nicht jedoch deren Phosphate, von der zytoplasmatischen auf die extrazytoplasmatische Seite der Membran transloziert (Kihara und Igarashi, 2002).

Die bioinformatische Suche nach Rsb1p-homologen Proteinen in zu *P. ciferrii* nahe verwandten Arten wie *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Debaromyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Ashbya gossypii* und *Pichia stipitis* führte zum Auffinden recht ähnlicher und daher vermutlich homologer Proteine in den Genomen aller dieser Organismen. Es liegt somit nahe anzunehmen, dass auch *P. ciferrii* einen Transporter oder eine Flippase besitzt, die zur Regulation der Konzentra-

tion der Sphingoidbasen in der Zelle, Phytosphingosin, Sphinganin und Sphingosin exportiert. Es bleibt zudem fraglich ob der entsprechende Transporter die Sphingoidbasen in acetylierter Form exportiert, oder ob dafür ein weiteres Protein vorliegt.

4.1.11 Acetylierung der Sphingoidbasen in *P. ciferrii*

Die Acetylierung der Sphingoidbasen durch die LCB-Acetyl-CoA-Acetyltransferase, die vermutlich Voraussetzung für deren Export ist (Barenholz *et al.*, 1971), ist bis dato eine exklusive Eigenschaft von *P. ciferrii*. Weder in Tieren, noch in Pflanzen oder anderen Pilzen ist eine Acetylierung von Sphinganin, Phytosphingosin oder Sphingosin und deren vermutlich damit einhergehende extrazelluläre Akkumulation beschrieben worden.

Sphingoidbasen wirken in der Zelle unter anderem als *second messenger*, was voraussetzt, dass ihre Konzentrationen sehr stringent reguliert werden können. Die Acetylierung könnte hierbei, neben der Phosphorylierung, als ein zweiter Regulationsmechanismus der Konzentration freier Sphingoidbasen in der Zelle dienen. Möglicherweise entzieht die Acetylierung diese Sphingoidbasen dem stark regulierten Verhältnis und markiert diese, nicht wie bei der Phosphorylierung zum Abbau, sondern zur Exkretion. Inwiefern durch die Exkretion acetylierter Sphingoidbasen ein Vorteil für *P. ciferrii* gegenüber anderen Organismen erzielt wird, ist nicht bekannt, da eine antimikrobielle Wirksamkeit von TAPS, TriASa und TriASo nicht erforscht wurde. Jedoch ist für die nicht acetylierten Formen eine antimikrobielle Wirksamkeit beschrieben (Bibel *et al.*, 1992, 1993 und 1995), die u. U. auch auf die acetylierten Formen übertragbar sein könnte.

4.1.12 Zusammenfassung der Sphingolipid-Biosynthese von *P. ciferrii*

Die aus der Literatur bekannten sowie die in dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse fasst Abb. 39 zu einem potentiellen Gesamtbild der Sphingolipid-Biosynthese in *P. ciferrii* zusammen.

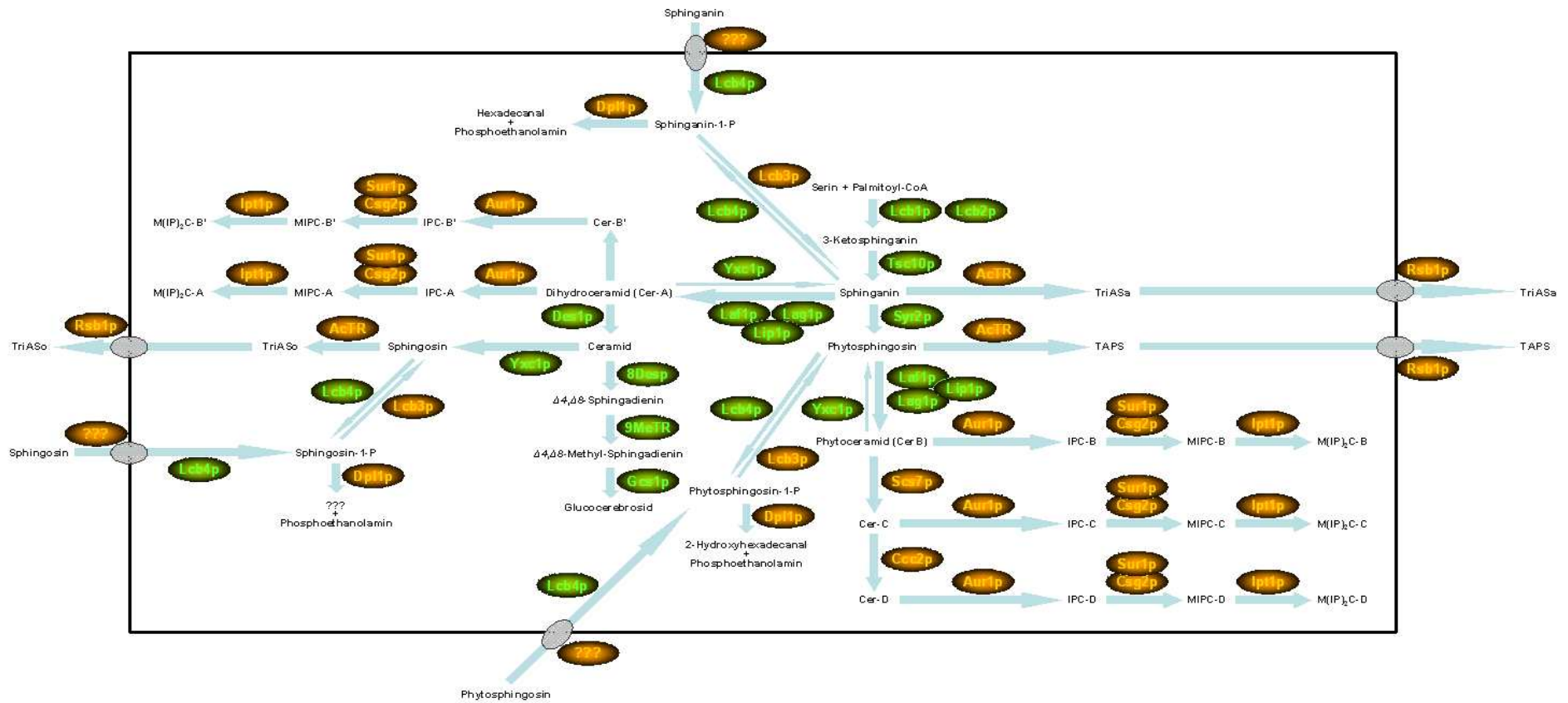


Abbildung 39: Schema der Sphingolipid-Biosynthese in *P. ciferrii*. Die Vorhersage der enzymatischen Reaktionen basiert im Wesentlichen auf der bioinformatischen Analyse der isolierten Gene und Vergleichen mit anderen Hefen. Proteine, deren Gene bereits identifiziert und isoliert wurden, sind grün, Proteine mit bis dato noch nicht isolierten Genen braun eingefärbt.

Die Anzahl der isolierten Gene aus dem Stoffwechselweg konnte von zwei - *LCB2* und *SYR2* - auf 13 gesteigert werden. Dennoch liegen einige Aspekte des Syntheseweges noch im Dunklen. Insbesondere zur Synthese Phosphoinositol-haltiger Sphingolipide sind die Erkenntnisse sehr gering. Auch der Transport - sowohl Import, als auch Export - ist noch nicht näher charakterisiert. Ein großes Interesse bei der eingehenderen Charakterisierung dürfte den Mechanismus der Acetylierung betreffen, da dieser bis dato einzigartig ist.

4.2 WT vs. TAPS- vs. TriASa-Produzent

4.2.1 Ursachen der gesteigerten TAPS-Synthese

Die Analyse der durch klassische Stammentwicklung generierten TAPS-Produktionsstämme bezüglich der molekularen Grundlage der erhöhten TAPS-Synthese war leider nicht erfolgreich. Von den relevanten Genen in der Sphingolipid-Biosynthese auf dem Weg zum Phytosphingosin, *LCB1*, *LCB2*, *TSC10* und *SYR2*, wies lediglich *LCB2* eine Mutation auf, die sich im Promotor-Bereich fand, jedoch keinen Einfluss auf die Transkription ausübte. Neben *LCB2*, wies auch keines der anderen drei Gene veränderte mRNA-Spiegel auf. Dennoch ist es nicht ausgeschlossen, dass eines der durch die vier Gene codierten Proteine ausschlaggebend für die erhöhte TAPS-Synthese ist, sei es durch eine deregulierte posttranskriptionelle Kontrolle, oder durch eine mutierte Form eines Interaktionspartners. Darüber hinaus könnte die Ursache auch eine Mutation in einem der Gene, die Enzyme kodieren, welche stromabwärts von Phytosphingosin agieren, sein, wie etwa die drei Ceramid-Synthase Untereinheiten codierenden Gene *LAF1*, *LAG1*, *LIP1* oder eines der für die Synthese Phosphoinositol-haltiger Sphingolipide notwendigen Gene. Jeweils könnte eine geringere Aktivität der entsprechenden Genprodukte zu einer Anhäufung der Vorstufe Phytosphingosin führen. Auch könnte die erhöhte Aktivität der alkalischen Ceramidase Ursache für die verstärkte TAPS-Synthese in den TAPS-Produktionsstämmen sein, wenn diese Phytoceramid als Substrat akzeptiert. Daraus ergäbe sich eine verstärkte Hydrolyse von Phytoceramid zu Phytosphingosin, welches dann leichter acetyliert und ausgeschieden werden könnte. Eine weitere mögliche Ursache könnte auch in einer verstärkten Acetylierung von Phytosphingosin liegen, welche sich in einer erhöhten Aktivität der LCB-Acetyl-CoA-Acetyltransferase

widerspiegeln könnte. Allerdings ist die Identität dieses Enzyms bzw. des kodierenden Gens nicht bekannt.

4.2.2 Die Wirkung von Syringomycin-E auf *P. ciferrii*

Zur Generierung von TriASa-Produzenten aus dem WT bzw. aus TAPS-Produzenten wurde im Zuge der klassischen Stammentwicklung von der Wirkung des Fungizids Syringomycin-E Gebrauch gemacht. In *S. cerevisiae* sind Mutationen in folgenden Genen beschrieben, die zu einer Resistenz gegen Syringomycin-E führen: *ERG3*, codierend für eine C5 Sterol-Desaturase aus der Ergosterol-Biosynthese (Taguchi *et al.*, 1994), *SYR2* (Cliften *et al.*, 1996), *ELO2*, *ELO3* und *IPT1* (Stock *et al.*, 2000), sowie *SCS7* (Hama *et al.*, 2000).

In den drei untersuchten Syringomycin-E resistenten *P. ciferrii* Stämmen betrafen die Mutationen jedoch jeweils das *SYR2*-Gen (*SUR2* in *S. cerevisiae*). Im Falle des vom WT abgeleiteten Sphingarin-Produzenten syrE10 RE11 ist vermutlich eine Punktmutation im *SYR2*-Gen ausschlaggebend für die Syringomycin-E-Resistenz und die damit einhergehende Sphingarin-Akkumulation. Es überrascht jedoch, dass der erhaltene Stamm nicht zur Reversion neigt, obwohl lediglich eine Punktmutation vorliegt. Dies könnte einerseits auf einen Selektionsvorteil des mutierten Stammes zurückzuführen sein. Allerdings zeigte der Stamm keinerlei Wachstumsvorteil gegenüber dem *P. ciferrii*-WT. Alternativ könnte dies auf das Vorliegen einer zweiten Mutation in einem der oben genannten Gene zurückzuführen sein, da unter Umständen die alleinige Mutation im *SYR2*-Gen nicht für die Ausprägung einer Resistenz ausreicht.

In den beiden von TAPS-Produktionsstämmen abgeleiteten Syringomycin-E resistenten Sphingarin-Produzenten syr2 1-3 RE10 und 23 zeichnet vermutlich eine deutlich verringerte Transkriptionsrate des *SYR2*-Gens verantwortlich für die Resistenz gegenüber dem Fungizid. Es liegt somit nahe eine Mutation in einem regulatorischen Element des *SYR2*-Gens, welcher in *trans* agiert, anzunehmen.

4.3 Entwicklung Auxotrophie-basierter Selektionssysteme für *P. ciferrii*

4.3.1 *URA3* als Auxotrophie-Marker

Die Generierung stabiler Uracil-auxotropher Stämme und die Komplementation selbiger zur Prototrophie mittels *URA3* bestätigt die erfolgreiche Etablierung eines *URA3*-basierten Selektionssystems für *P. ciferrii*.

Das Auftauchen lediglich zweier verschiedener Mutationen in den fünf isolierten nicht revertierenden Klonen überrascht, da sicher auch viele weitere Mutationen eine Inaktivierung des *URA3*-Gens zur Folge haben. Es lässt sich daher vermuten, dass der in vier der fünf Klone identifizierte Basenpaaraustausch auf eine spontane Mutation am Ende der Inkubationszeit der Vorkultur vor dem Aufbringen auf das 5-FOA-haltige Medium zurückgeht. Dies würde bedeuten, dass die vier Klone eine gemeinsame Mutterzelle besitzen.

Da die Punktmutation eine hoch konservierte Aminosäure betrifft, ist anzunehmen, dass es sich hierbei um einen, für die Aktivität des Enzyms essentiellen Bereich, wie z.B. das aktive Zentrum, oder die Substratbindungsstelle handelt.

Sowohl die Mutation der vier Klone mit selbiger *missense*-, als auch die *nonsense*-Mutation des fünften Klons gehen alle auf Punktmutationen zurück. Es verwundert daher, dass weder in den Reversions-, noch bei den anschließenden Transformationsversuchen Revertanten aufgetaucht sind. Dies lässt das Vorliegen einer zweiten Mutation möglich erscheinen. Sofern beide Mutationen einzeln bereits zu einer Uracil-Auxotrophie führen, würde erst die sehr unwahrscheinliche Reversion beider Mutationen wieder zu einer Uracil-Prototrophie führen. Voraussetzung hierfür wäre, dass erst die Kombination beider Mutationen zu einer Resistenz gegenüber 5-FOA führt, jedoch jede Mutation für sich bereits eine Uracil-Auxotrophie hervorruft. Ein nahe liegender Ort für diese zweite Mutation ist das *URA5*-Gen, da Mutationen in diesem Gen keine vollständige Resistenz gegen 5-FOA hervorbringen, jedoch aber bereits zu einer Uracil-Auxotrophie führen (Jund und LaCroute, 1972).

Den oben beschriebenen Vermutungen widerspricht jedoch die Mutationsrate. Diese liegt mit $5,5 \cdot 10^{-7}$ der für haploide *S. cerevisiae*-Stämme ermittelten Frequenz zur Bildung von *ura3*-Mutanten auf 5-FOA-haltigem Medium von $1,0 \cdot 10^{-7}$ (Boeke *et al.*,

1984) relativ nahe. Hierdurch lassen sich zwei Vermutungen ableiten. Es liegt tatsächlich nur eine einzige Mutation in den generierten *P. ciferrii*-Stämmen vor, da sonst eine deutlich niedrigere Mutationsrate zu erwarten wäre.

Zudem ist bezüglich der Kopienzahl des *URA3*-Gens ein einfaches Vorliegen zu erwarten, da hier ebenfalls mit einer sonst deutlich geringeren Mutationsrate zu rechnen wäre. Unterstützt wird diese zweite These zudem durch die eindeutigen Sequenzierungen der mutierten *URA3*-Gene, die bei einem heterozygoten Vorliegen zu Unsicherheiten bei der Sequenzanalyse geführt hätten.

Die Widersprüche zwischen den beiden aufgestellten Thesen zur fehlenden Reversion lassen sich bis dato nicht auflösen. Allerdings würde im Falle der Mis-Sense-Mutanten eine Sequenzierung des *URA5*-Gens näheren Aufschluss geben, wobei natürlich nicht ausgeschlossen ist, dass eine potentielle zweite Mutation auch in einem anderen Gen zu finden sein könnte.

Die Versuche das für den WT etablierte Selektionssystem auf den TriASa-Produzenten syrE10 RE11 zu übertragen, scheiterten an dem Versuch 5FOA resistente Klone zu isolieren. Dies könnte in dem Zusammenhang von Uracil-Aufnahme und komplexen Sphingolipiden begründet liegen, welcher sich wie folgt darstellt. Der Sphinganin-Produzent syrE10 RE11 bildet aufgrund einer Mutation im *SYR2*-Gen keinerlei Phytosphingosin mehr. Es ist daher anzunehmen, dass auch die hiervon abgeleiteten komplexen Sphingolipide Phytoceramid (Ceramid-B), Ceramid-C und Ceramid-D nicht mehr gebildet werden. In *S. cerevisiae* sind die komplexen Sphingolipide zusammen mit Ergosterol essentielle Bestandteile der "lipid rafts" in der Plasmamembran (Kubler *et al.*, 1996; Bagnat *et al.*, 2000). Vermutlich liegt somit in dem Stamm syrE10 RE11 eine massiv veränderte Zusammensetzung der "lipid rafts" vor. Der Uracil-Import erfolgt in *S. cerevisiae* über die Uracil-Permease Fur4p (Chevallier, 1982; Kurtz *et al.*, 1999). Die Inaktivierung dieser Permease ruft eine Uracil-Auxotrophie hervor (Urban-Grimal *et al.*, 1995). Funktionell ist das Fur4p allerdings nur, wenn es in der Plasmamembran assoziiert mit "lipid rafts" vorliegt (Hearn *et al.*, 2003). Es ist daher zu vermuten, dass die Assoziation mit den massiv veränderten "lipid rafts" in dem Sphinganin-Produzenten syrE10 RE11 nicht mehr möglich ist und die Versuche zur Selektion von *ura3*-Mutanten an dem fehlenden Import von Uracil scheitert.

4.3.2 *LYS2* als Auxotrophie-Marker

Auch das *LYS2*-Gen wurde erfolgreich für die Selektion von in dieser Arbeit erzeugten, Lysin-auxotrophen *P. ciferrii*-Stämmen nutzbar gemacht, obwohl nicht geklärt werden konnte worin die Lysin-Auxotrophie dieser Stämme begründet ist. Bei den beiden nicht weiter analysierten *lys*⁻-Klonen weist die verringerte Transkriptionsrate des *LYS2*-Gens auf einen möglichen Defekt in einer regulatorischen Komponente hin.

Die Versuche zur Komplementation des dritten *lys*⁻-Klons mittels des *LYS2*- bzw. *LYS5*-Gens aus *S. cerevisiae* schlugen fehl. Aufgrund der phylogenetischen Distanz von *S. cerevisiae* zu *P. ciferrii* und der relativ geringen CAI's - *ScLYS2*: 0,372, *ScLYS5*: 0,291 - überrascht dies nicht und lässt somit keine Rückschlüsse auf die Komplementierbarkeit mittels der entsprechenden Gene aus *P. ciferrii* zu. Tatsächlich wurde die Lysin-Auxotrophie dieses Stammes durch Transformation mit einem *PcLYS2*-tragenden Vektor komplementiert. Es überrascht jedoch, dass dieser *lys*⁻-Klon weder eine Mutation im *LYS2*-Gen, noch verglichen mit dem Wildtyp niedrigere *LYS2*-mRNA-Spiegel aufweist. Die mit dem *PcLYS2*-tragenden Vektor komplementierten Klone wiesen eine Verdopplung der *LYS2*-mRNA-Spiegel auf, die mit einer einfachen Integration des Vektors erklärbar wäre, da das plasmidkodierte *LYS2*-Gen unter Kontrolle seines nativen Promotors steht. Eine mögliche Erklärung der Komplementation der nicht *LYS2*-basierten Lysin-Auxotrophie mittels des *LYS2*-Gens postuliert eine Mutation im *LYS5*-Gen dieser Mutante. *Lys5p* ist in *S. cerevisiae* für die posttranslationelle Phosphopantetheinylierung von *Lys2p* zuständig, welches die inaktive Apo-Form in eine aktive Holo-Form umwandelt (Ehmann *et al.*, 1999). Postuliert man eine Mutation im *LYS5*-Gen, die zu einer verringerten Aktivität des Enzyms und über die verminderte posttranslationelle Modifikation von *Lys2p* zu einer Lysin-Auxotrophie führt, so könnte durch die Erhöhung der *LYS2*-Transkriptmengen über einen "Titrationseffekt" auch wieder eine verbesserte Modifikation des *Lys2p* erfolgen. Dies würde dann zur Komplementation der Lysin-Auxotrophie einer *lys5*-Mutante durch das *LYS2*-Gen führen. Es erscheint daher essentiell, das *LYS5*-Gen aus *P. ciferrii* zu isolieren und dessen Sequenz in Wildtyp und *lys*⁻-Mutanten zu vergleichen. Die zuvor aufgrund der in Pilzen geringen Konservierung des *Lys5p* fehlgeschlagene Isolation könnte z.B. durch die zum Teil konservierte Anordnung des *LYS5*-Gens im Genom einiger Hefen geschehen. So könnten degenerierte Primer für die Isolierung der *PEX14*- bzw. *CDC43*-Gene abgeleitet werden, die sowohl in

S. cerevisiae als auch in *Candida albicans* in direkter Nachbarschaft zum *LYS5*-Gen zu finden sind.

4.4 Entwicklung einer fermentativen Route zur TriASo-Produktion durch rationale Stammverbesserung von *P. ciferrii*

4.4.1 Inaktivierung der Sphingamin-Hydroxylase in *P. ciferrii*

Die gezielte Inaktivierung von Sur2p/Syr2p führt im *S. cerevisiae* WT zum Stopp der Synthese von Phytosphingosin und zur Akkumulation von Sphingamin, welches jedoch keinerlei Auswirkung auf die Vitalität der entsprechenden Mutanten zeigt (Haak *et al.*, 1997). Auch in *P. ciferrii* führte die im Zuge der klassischen Stammentwicklung erzielte Inaktivierung des *SYR2*-Gens zur Akkumulation von Sphingamin statt Phytosphingosin. Jedoch zeigte sich hier ein deutlicher Unterschied im Wachstum zwischen WT- und COS22A-abgeleiteten Stämmen, der sich in einer deutlich geringeren finalen optischen Dichte der COS22A-abgeleiteten Stämme manifestiert. Aufgrund der Entstehungsgeschichte der COS22A-abgeleiteten Sphingamin-Produzenten über eine ungerichtete Mutagenese ist die genaue Art der Mutation, die zu dem ausgeprägten Phänotyp führt, nicht bekannt. Dass diese nicht im *SYR2*-Gen selbst liegt, zeigte die Sequenzierung. Eine qRT-PCR-Analyse offenbarte eine potentielle regulatorische Mutation, da die mRNA-Spiegel des *SYR2*-Gens in den COS22A-abgeleiteten Sphingamin-Produzenten 7-20-fach niedriger waren als im WT.

Der Versuch, Sphingamin-Produzenten aus dem Stamm COS22A mit einer gezielten Disruption des *SYR2*-Gens und einem, für die Fermentation notwendigen, WT-ähnlichen Wachstum zu generieren, misslang. Zwar konnten Stämme mit inaktiviertem *SYR2*-Gen isoliert werden. Doch außer durch Akkumulation von Sphingamin statt Phytosphingosin waren diese durch eine deutlich herabgesetzte Vitalität gekennzeichnet, die sich in einem deutlich schlechteren Wachstum manifestierte. Es liegt damit die Vermutung nahe, dass die vermehrte Akkumulation von Sphingamin in diesen Stämmen toxisch wirkt. Allerdings sind auch in dem vom WT abgeleiteten syrE10 RE11 deutlich höhere Sphingamin-Konzentrationen erzielt worden, so dass dies nicht der eigentliche Grund für das verschlechterte Wachstum sein kann. Vielmehr ist dieser in der Kombination aus den beiden Mutationen - der ersten, die zur Phytosphingosin- und der zweiten die zur Sphingamin-Akkumulation geführt hat - zu suchen. Der

molekulare Hintergrund der verstärkten Phytosphingosin-Bildung im COS22A konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Bekannt ist jedoch, dass die Akkumulation von phosphorylierten Sphingoidbasen in *S. cerevisiae* das Zellwachstum inhibiert (Kim *et al.*, 2000). Es erscheint daher möglich, dass in den beiden vom COS22A abgeleiteten Sphinganin-Produzenten Sphinganin-1-Phosphat akkumuliert und dieses Auslöser des schlechten Wachstums ist. In Kombination mit der Inaktivierung des *SYR2*-Gens führen in *S. cerevisiae* sowohl die Inaktivierung der LCB-Phosphatase, als auch die Inaktivierung der LCB-Phosphat-Lyase zur Akkumulation von Sphinganin-1-Phosphat (Kim *et al.*, 2000). Hierbei würde eine inaktive Phosphatase als Auslöser für die Phytosphingosin-Akkumulation keinen Sinn machen, da diese eher den gegenteiligen Effekt des vermehrten Abbaus erzielen würde. Der fehlende Abbau von Sphingoidbasen wäre allerdings ein geeigneter Auslöser für die Akkumulation von Phytosphingosin.

Es erscheint daher möglich, dass die Inaktivierung der LCB-Phosphat-Lyase im COS22A zur Akkumulation von Phytosphingosin führt. Durch die zusätzliche Disruption der Sphinganin-Hydroxylase wird Sphinganin-1-Phosphat akkumuliert, welches dann das Wachstum inhibiert.

4.4.2 Überexpressionen und Codon-Optimierung

Die rationale Stammentwicklung führte in dem Stamm *syrE10 RE11*, soweit in dieser Arbeit beschrieben, zu einer 8,5-fachen Erhöhung der produzierten TriASo-Menge (Abb. 40).

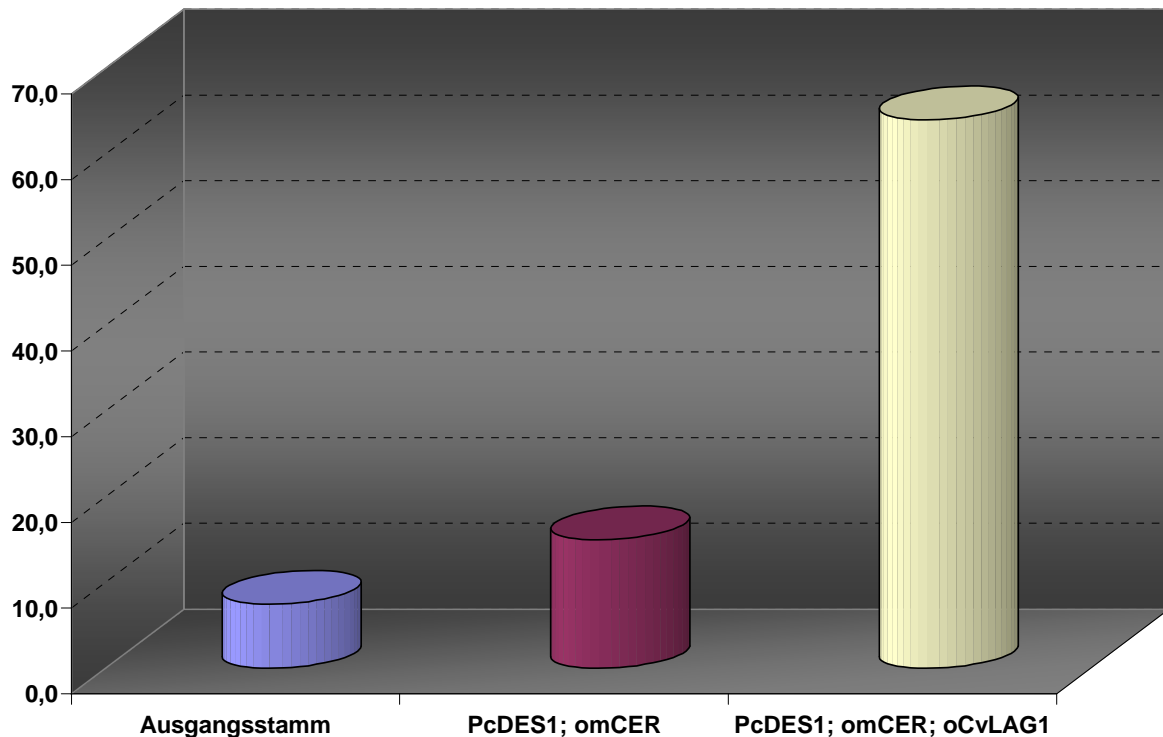


Abbildung 40: Verbesserung der TriASo-Konzentration im Zuge der rationalen Stammentwicklung in *P. ciferrii* syrE10 RE11 in mg/L (Ausgangsstamm). Lediglich die in den einzelnen Stämmen überexprimierten Gene sind vermerkt.

Ausschlaggebend für die erzielte Steigerung ist die Überexpression der Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase aus *P. ciferrii* unter Kontrolle des *PDA1*-Promotors von *P. ciferrii*, resultierend in einer 4-6-fachen Erhöhung der *PcDES1*-Transkriptmengen, sowie die heterologe Expression der alkalischen Ceramidase aus *Mus musculus* und die Ceramid-Synthase aus dem *Coccolithovirus* kodierenden Gene jeweils in codon-optimierter Form und unter Kontrolle des *TDH3*-Promotors aus *P. ciferrii*.

4.4.2.1 Die eingeschränkte Codon-Verwendung in *P. ciferrii*

Das Anpassen der Codon-Verwendung der Fremd-Gene an jene von *P. ciferrii* stellte sich bei den durchgeführten Versuchen als essentiell heraus. Dies geht darauf zurück, dass zum Teil Gene aus Organismen mit einem GC-Gehalt größer 50% Verwendung fanden, z.B. *Ashbya gossypii* mit 53% und *Mus musculus* mit 52%, die dann aufgrund des sehr geringen GC-Gehalts von *P. ciferrii* (30,8%) für eine Expression in diesem Organismus ungeeignete Codon-Verwendung aufwiesen.

Allerdings überrascht der extrem niedrige GC-Gehalt von *P. ciferrii*, da nahe verwandte Hefen zwar ebenfalls einen GC-Gehalt von unter 50% aufweisen, dieser jedoch eher bei 40% liegt - *Candida albicans*: 36%, *S. cerevisiae*: 40%, *Kluyveromyces lactis*: 40%, *Debaromyces hansenii*: 37%, *Pichia stipitis*: 43% etc. Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass der errechnete GC-Gehalt von *P. ciferrii* nicht auf die Kenntnis der Sequenz des gesamten Genoms, sondern durch die Sequenz von 36 ORF's mit einer Gesamtgröße von 35.304 bp zurückgeht.

Die eingeschränkte Codon-Verwendung in *P. ciferrii* beschränkt sich jedoch nicht nur auf GC-reiche, sondern findet sich auch bei AT-reichen Codons. Hauptmerkmal ist somit die extrem eingeschränkte und nur auf wenige Codons fokussierte Codon-Verwendung.

4.4.2.2 *nat1* als Selektionsmarker

Im Zuge der Codon-Optimierung wurde auch das *nat1*-Gen, welches eine Acetyltransferase kodiert, optimiert und konnte somit zur Selektion von Transformanten nutzbar gemacht werden. Die Optimierung wurde notwendig, da ohne diese keine Nourseothricin-resistenten Transformanten erzeugt werden konnten. Neben dem beschriebenen dominanten, auf Vermittlung einer Cycloheximid-Resistenz basierenden Selektionssystem, wurde damit ein zweites antibiotikabasiertes Selektionssystem für *P. ciferrii* etabliert.

4.4.2.3 Einfluss der heterologen Expression des die alkalische Ceramidase aus der Maus kodierenden Gens

Der erste Schritt hin zu einer Erhöhung der TriASo-Produktion in *P. ciferrii* bestand in der kombinierten Überexpression der die *Pichia*-eigenen Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase, sowie der codon-optimierten alkalischen Ceramidase aus der Maus kodierenden Gene. Die Überexpression des die Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase kodierenden Gens allein führte hingegen jedoch nicht zu einer veränderten TriASo-Produktion. Die alleinige Überexpression des die alkalische Ceramidase aus der Maus kodierenden Gens wurde nicht durchgeführt, jedoch wurde gezeigt, dass die gleichzeitige Überexpression beider Gene ausreichend für eine Erhöhung der TriASo-Produktion ist (Thomas Hüller, persönliche Mitteilung). Möglicherweise führt die Überexpression des die Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase kodierenden Gens nicht

zu einem Anstieg der Ceramid- und somit einem messbaren Anstieg der TriASo-Produktion, da die Hydrolyse von Dihydroceramid zu Sphingonin durch die *P. ciferrii* Ceramidase dies verhindert. Die Überexpression der exklusiv Sphingosin-basierte Ceramide hydrolysierenden Ceramidase aus der Maus führt eventuell zur Verschiebung des Gleichgewichts hin zur Hydrolyse von Ceramid anstelle von Dihydroceramid, was dann in einem Anstieg der Sphingosin-Konzentration resultiert.

Alternativ ist auch eine *feedback* Inhibition der Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase durch ihr Produkt denkbar, wenn dieses nicht durch die Aktivität der Ceramidase abgeführt werden kann.

Auffallend ist, dass bei Überexpression der Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase und der alkalischen Ceramidase aus der Maus lediglich die C18-Sphingosin-Konzentration ansteigt, wohingegen die Konzentration von C20-Sphingosin unverändert bleibt. Als Hinweis auf die Substratspezifität der Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase aus *P. ciferrii* kann dies jedoch nicht gewertet werden, da die in *S. cerevisiae* durchgeführten Versuche bereits die Synthese von C18- und C20-Sphingosin durch heterologe Expression der *P. ciferrii* Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase zeigten. Über die Substratspezifität der alkalischen Ceramidase aus der Maus bezüglich der Länge der Sphingoidbase ist zwar nichts bekannt. So finden sich aber sowohl C18-, als auch C20-Sphingoid-Basen in der Maus (Braun *et al.*, 1970), was annehmen lässt, dass auch Ceramide mit C18- und C20-Sphingoidbasen hydrolysiert werden. Allerdings wäre auch möglich, dass die neutrale (Tani *et al.*, 2000a und b) bzw. die saure Ceramidase (Li *et al.*, 2002) die Hydrolyse von Ceramid mit C20-Sphingosin als Sphingoidbase in der Maus katalysiert. Sofern die alkalische Ceramidase aus der Maus exklusiv Ceramid mit C18-Sphingosin als Sphingoidbase hydrolysiert, wäre dies eine plausible Erklärung für die unveränderte C20-Sphingosin-Konzentration, da Ceramid mit C20-Sphingosin zwar möglicherweise durch die Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase gebildet, aber ob fehlender Hydrolyse nur in geringen Mengen in den Membranen akkumulieren könnte, so dass diese Zunahme analytisch kaum nachweisbar sein dürfte.

4.4.2.4 Einfluss der heterologen Expression des eine virale Ceramid-Synthase kodierenden Gens

Auf der Suche nach einer für die Entwicklung eines TriASo-Produktionsstammes geeigneten Ceramid-Synthase wurde auch Lag1p aus *Coccolithovirus* analysiert. Da über die Substratspezifität dieses Enzyms noch nichts bekannt ist, lässt sich nur

vermuten, dass die Zusammensetzung der Acyl-CoA-Thioester-Fraktion in *P. ciferrii* dieser entgegenkommt. Da Dihydroceramide in *P. ciferrii* im Wesentlichen C_{26:0}-OH-Acyl-Reste enthalten, kann davon ausgegangen werden, dass Lag1p aus *Coccolithovirus* die entsprechenden Thioester als Substrat akzeptiert oder möglicherweise sogar bevorzugt.

Im Screening nach geeigneten Ceramid-Synthasen führten auch die Überexpression von *omLASS4*, *omLASS5*, *PcLAF1* bzw. *oAgLAF1* zu einem signifikanten Anstieg der TriASo-Produktion. Interessant ist hierbei, dass dies nicht für die heterologe Überexpression des *omLASS6*-Gens gilt, obwohl Lass6p ebenso wie Lass5p Acyl-CoA-Thioester mit einer Kettenlänge von C14 und C16 bevorzugt akzeptiert. Ein Unterschied findet sich jedoch hinsichtlich der Affinität zu einfach ungesättigten Acyl-CoA-Thioestern. So ist Lass5p im Gegensatz zu Lass6p in der Lage, einfach ungesättigte Acyl-CoA-Thioester mit einer Kettenlänge von 14 und 16 Kohlenstoffatomen als Substrat zu nutzen (Mizutani *et al.*, 2005). Dies könnte ein Hinweis auf eine höhere Konzentration einfach ungesättigter Acyl-CoA-Thioester in *P. ciferrii* sein.

Es überrascht jedoch, dass gerade die Überexpression von *omLASS4* und *omLASS5* eine Erhöhung der TriASo-Produktion hervorruft, da deren Substratspezifitäten bzgl. der Acyl-CoA-Thioester-Kettenlänge keinerlei Übereinstimmung zeigen. Lass4p bevorzugt C18-, C20-, C22- und C24-Acyl-CoA-Thioester, wohingegen Lass5p C14- und C16-Acyl-CoA-Thioester favorisiert (Mizutani *et al.*, 2005).

Unklar ist, warum die heterologe Überexpression von *omLASS1* nicht zu einer verbesserten TriASo-Produktion führte, da Lass1p die in *P. ciferrii* sehr häufig vorliegenden C₂₆-Acyl-CoA-Thioester bevorzugt als Substrat nutzt (Mizutani *et al.*, 2005).

Zudem fällt auf, dass insbesondere bei Überexpression des die Ceramid-Synthase aus *Coccolithovirus* kodierenden Gens die Sphingamin-Konzentration in einem deutlich höheren Maße sinkt, als die Sphingosin-Konzentration steigt. Einem Anstieg um 49 mg/L Sphingosin steht eine um 194 mg/L niedrigere Sphingamin-Konzentration gegenüber. Dies ist möglicherweise darauf zurück zu führen, dass zwar vermehrt Sphingamin umgesetzt wird, sich jedoch nur ca. ein Viertel der daraus entstandenen Metabolite im Sphingosin wieder findet. Eventuell werden ausgehend vom Dihydroceramid vermehrt M(IP)₂C-A und B' oder Glucocerebrosid gebildet. Ebenso denkbar ist eine mit der Acetylierung des Sphingosins konkurrierende Phosphorylierung durch LCB-Kinasen und anschließender Abbau des Sphingosin-1-Phosphats durch die entsprechenden LCBP-Lyasen. Alternativ könnten auch regulatorische Phänomene,

z. B. eine negative *feedback*-Inhibition des frühen Sphingolipid-Biosynthesewegs durch Sphingosin, für diese Beobachtung verantwortlich sein.

4.4.2.5 Welche Gene sind essentiell für die Erhöhung der TriASo-Konzentration auf 64 mg/L?

In dem Stamm *syrE10 RE11* x *pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1* x *p-mCER-nat1-oCvLAG1* werden eine Vielzahl von Genen überexprimiert (*PcDES1*, *AgLAF1*, *AgLAG1*, *omCER*, *oCvLAG1*). Die genaue Kombination der Gene, die zum Erreichen von 64 mg/L TriASo notwendig ist, ist jedoch nicht bekannt. Eine durch Thomas Hüller durchgeführte Versuchsreihe zeigte, dass hierzu lediglich drei der fünf Gene notwendig sind, wobei die Ceramid-Synthase Untereinheiten *LAF1* und *LAG1* aus *Ashbya gossypii* keinen Einfluss auf die Sphingosin-Konzentration ausüben. Dies lässt sich vermutlich auf die fehlende Anpassung der Sequenz dieser Gene an die Codon-Verwendung von *P. ciferrii* zurückführen. Neben der Transformation mit dem Vektor *p-mCER-nat1-oCvLAG1* reichte die Integration eines *PcDES1*-enthaltenden Plasmids, das das *PcDES1*-Gen unter Kontrolle des GAP-DH-Promotors aus *P. ciferrii* enthält, um die erzielte Erhöhung der Sphingosin-Konzentration zu ermöglichen (persönliche Mitteilung von Thomas Hüller).

4.4.2.6 Einfluss der Expression des die alkalische Ceramidase aus *P. ciferrii* kodierenden Gens

Ein Vergleich der alkalischen Ceramidase aus der Maus mit der alkalischen Ceramidase aus *P. ciferrii*, letztere mit unbekannter Substratspezifität bzgl. Sphingoidbase und Kettenlänge der Acylreste der hydrolysierten Ceramide, zeigte keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Menge des gebildeten Sphingosins. Allerdings ist bei Überexpression des die alkalischen Ceramidase aus der Maus kodierenden Gens das Verhältnis der gebildeten Sphingoidbasen mit 1:4 (Sphingosin : Sphinganin) deutlich besser als bei Überexpression des die alkalischen Ceramidase aus *P. ciferrii* kodierenden Gens (1:10). Da in *P. ciferrii* das Vorliegen nur einer Ceramidase postuliert wurde, ist davon auszugehen, dass diese in der Lage ist Phytoceramid, Dihydroceramid und Ceramid zu hydrolysieren. Möglicherweise führt die Inaktivierung der *P. ciferrii*-eigenen Ceramidase bei gleichzeitiger Überexpression der Ceramidase aus der Maus zu einer deutlich verstärkten Produktion von Sphingosin.

4.4.2.7 Ursachen des Anstiegs der TriASo-Produktion durch Erhöhung der Antibiotika-Konzentration

Die Versuche zur Erhöhung der TriASo-Produktion durch Erhöhung der Antibiotika-Konzentration verfehlten ihre Wirkung nicht. So konnte durch Erhöhung der Nourseothricin-Konzentration auf das 256-fache der üblicherweise für Selektionszwecke verwendeten Konzentration im Fall der Transformante *syrE10 RE11 x pPC-DES-AgLAF1-AgLAG1 x p-mCER-nat1 Klon 7* eine Erhöhung der Sphingosin-Konzentration um das 2,5-fache nachgewiesen werden. Allerdings handelte es sich dabei nicht um einen für Sphingosin spezifischen Effekt, da auch die Menge des gebildeten Sphinganins zunahm, und zwar sogar in stärkerem Masse, so dass bei allen analysierten Klonen der Anteil von Sphingosin an den insgesamt gebildeten Sphingoidbasen niedriger war als im Ausgangsstamm (Abb. 41).

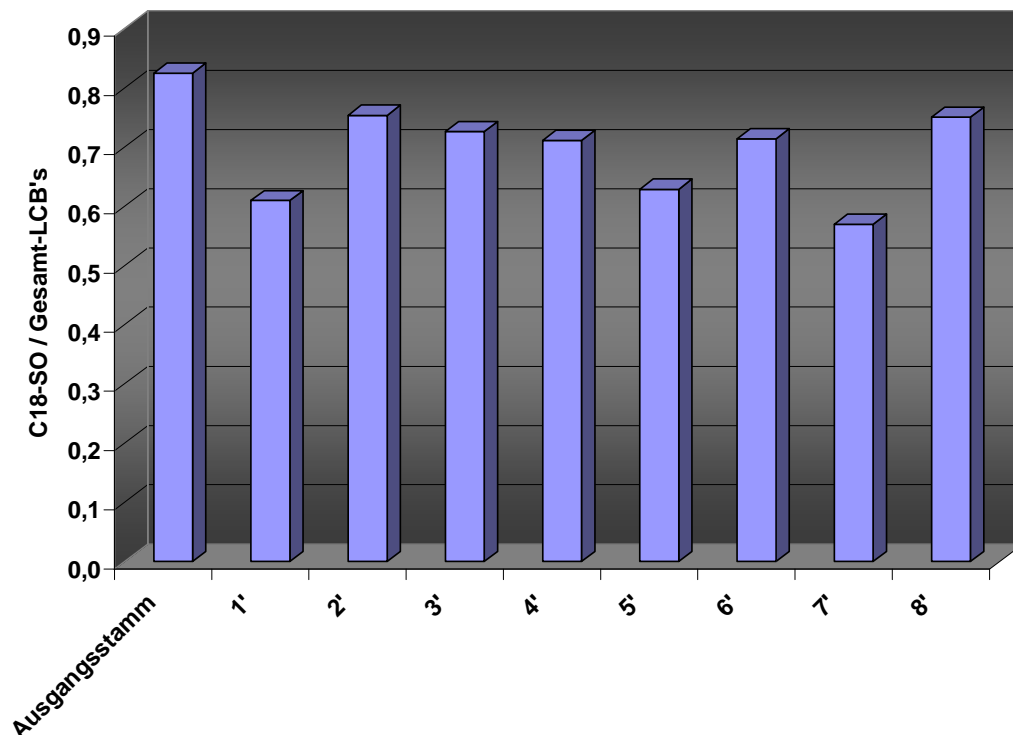


Abbildung 41: Einfluss erhöhter Resistenz von *P. ciferrii* *syrE10 RE11 x pPC-DES-AgLAF1-AgLAG1 x p-mCER-nat1 Klon 7* gegenüber Nourseothricin auf den Anteil von C18-Sphingosin an den insgesamt gebildeten Sphingoidbasen. Gezeigt sind die Anteile für 8 Klone mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Nourseothricin und den dazugehörigen Ausgangsstamm.

Die beobachteten Effekte sind vermutlich nicht auf die postulierte Mehrfach-Integration des Plasmids mit Resistenzmarker-Kassette und Expressions-Kassette zurückzuführen, da die mRNA-Spiegel des auf dem Vektor befindlichen *omCER*-Gens in Ausgangsstamm und Nourseothricin-resistenten Stämmen identisch waren. Zwei Mechanismen zur Vermittlung einer Resistenz gegenüber Nourseothricin sind beschrieben. Zum einen ist dies die Inaktivierung des Antibiotikums durch die gezielte Acetylierung über eine Acetyltransferase (Krügel *et al.*, 1988). Dieser Mechanismus wurde bei der Transformation von *P. ciferrii* mit dem *nat1*-Gen - kodierend für eine Acetyltransferase - genutzt. Darüber hinaus ist von *E. coli* bekannt, dass das Herabsetzen der Permeabilität der Zellwand für Nourseothricin zu einer Resistenz führt (Seltmann, 1989). Letzterer Mechanismus könnte eine Ursache für das beobachtete Phänomen liefern. Denkbar wäre eine Mutation, die über eine gesteigerte Sphingolipid-Biosynthese zu einer veränderten Zusammensetzung der Plasmamembran, insbesondere durch eine Erhöhung der Konzentration der Sphingoidbasen in der Zytoplasmamembran, führt. Es ist bekannt, dass dies die Permeabilitätseigenschaften von Membranen direkt oder indirekt - z.B. durch fehlerhaftes *Targeting* von Transportproteinen - beeinflusst.

4.4.2.8 Eignung des *P. ciferrii* WT's als Ausgangsstamm für die Entwicklung eines TriASo-Produktionsstammes

Ein Übertragen der erfolgreichen *metabolic engineering*-Strategie auf den WT von *P. ciferrii* führte nicht annähernd zu der, in einem Sphinganin-Produzenten erzielten Sphingosin-Konzentration. Es ist zwar ein Sinken der Phytosphingosin-Konzentration zu verzeichnen, jedoch scheint die erhöhte Aktivität der Ceramid-Synthase nicht auszureichen, um einen Abfluss des Substrats durch Umsetzung durch die Sphinganin-C4-Hydroxylase zu Phytosphingosin zu unterbinden. Es ist daher notwendig einen Sphinganin akkumulierenden Stamm als Ausgangspunkt für die Stammentwicklung zu verwenden. Alternativ kann nach Installation eines aktiven Sphingosin-Biosynthesewegs in einem TAPS-Produktionsstamm dieser durch Selektion Syringomycin-E-resistenter Stämme in einen TriASo-Produktionsstamm umgewandelt werden. Dieser Weg sollte insbesondere bei Verwendung von *URA3* als Selektionsmarker gegangen werden, da dieser in Sphinganin-Produktionsstämmen aufgrund der synthetischen Letalität entsprechender Uracil-auxotropher Mutanten hier nicht verwendet werden kann.

Erneut fällt zudem auf, dass die Gesamt-Konzentration der LCB's bei Installation eines aktiven Sphingosin-Biosynthesewegs im TAPS-Produktionsstamm sinkt. Dies deutet darauf hin, dass ein Teil des gebildeten Sphingosins degradiert oder anderweitig metabolisiert wird. Die Inaktivierung dafür verantwortlicher Stoffwechselwege ist zur Entwicklung eines TriASo-Produktionsstammes somit von außerordentlichem Interesse. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass regulatorische Phänomene, z. B. eine negative *feedback*-Inhibition des frühen Sphingolipid-Biosynthesewegs durch Sphingosin, für diese Effekte verantwortlich ist.

5 AUSBLICK

Die weitere Identifizierung der für den Sphingolipid-Stoffwechsel in *P. ciferrii* relevanten Gene durch degenerierte Primer scheint aufgrund der gemachten Erfahrungen durchaus sehr aussichtsreich. So ließen sich sicher die für den Abbau der Sphingoidbasen, deren Export, sowie die Bildung der Phosphoinositol enthaltenden Sphingolipide IPC, MIPC und M(IP)₂C verantwortlichen Gene isolieren.

Darüber hinaus bestehen natürlich auch für die neu isolierten Gene und deren zugehörige Proteine viele offene Fragen. So sind Enzym-Assays unabdingbar, um die einzelnen Enzyme näher zu charakterisieren. Es wäre daher notwendig die entsprechenden Proteine anzureichern und *in vitro*-Studien mit verschiedenen Substraten durchzuführen. Auch die Disruption einzelner Gene und die Analyse der phänotypischen Veränderungen erscheinen in diesem Zusammenhang notwendig.

Ein entscheidender wie einzigartiger Phänotyp von *P. ciferrii* ist die Acetylierung von Sphingoidbasen und deren Sekretion. Daher ist die Isolation beteiligter Gene durch die Identifikation konservierter Bereiche und das Ableiten degenerierter Primer hier nicht möglich. Barenholz und Gatt beschrieben zwar 1972 die Charakterisierung der LCB-Acetyl-CoA-Acetyltransferase, jedoch lag hierbei nicht ein reines, lösliches Protein, sondern vielmehr eine Mikrosomen-Präparation vor.

Bekannt ist jedoch, dass *P. ciferrii*-Stämme mit einer geringen LCB-Konzentration auch eine geringe LCB-Acetyl-CoA-Acetyltransferase-Aktivität aufweisen (Barenholz *et al.*, 1971). Denkbar sind somit Komplementationsversuche dieses Phänotyps mit einer Genbank, die aus einem *P. ciferrii*-Stamm mit hohen LCB-Konzentrationen erstellt wurde oder der Transfer dieser Genbank in andere Hefespezies mit anschließendem *screening* auf Klone, die acetylierte Sphingoidbasen ausscheiden.

Ein Ansatz zur Anreicherung des Enzyms bestünde zudem noch in der Ausnutzung seiner Affinität zu Acetyl-CoA (Barenholz und Gatt, 1969). So ist es denkbar das Enzym durch das Auftragen einer solubilisierten Mikrosomen-Präparation von *P. ciferrii* auf eine Säule mit immobilisiertem Acetyl-CoA anzureichern, um das Enzym näher zu charakterisieren. Freilich kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Enzym bei dieser Prozedur inaktiviert wird.

Die Acetylierung von Sphingoidbasen könnte darüber hinaus auch ein guter Ansatzpunkt für die Verbesserung der TriASo-Produktion mit *P. ciferrii* sein. Die acetylierten Sphingoidbasen werden vermutlich dem stark regulierten Sphingoidbasen-Verhältnis in der Zelle entzogen, womit die Acetylierung vermutlich eine Grundlage für die vermehrte Synthese von LCB's bildet. Eine Überexpression des die LCB-Acetyl-CoA-Acetyltransferase kodierenden Gens ist somit möglicherweise ein sehr aussichtsreicher Ansatzpunkt zur Erhöhung der Sphingosin-Konzentration. Darüber hinaus wäre das rationale Design einer LCB-Acetyl-CoA-Acetyltransferase, die Sphingosin, aber nicht Sphingamin acetyliert, ein viel versprechender Ansatz, um den Umsatz von Sphingamin zu Sphingosin zu verbessern.

Nach der gelungenen gezielten Inaktivierung der Sphingamin-Hydroxylase ist auch die Disruption weiterer Gene ein sinnvoller Ansatz zur Verbesserung des Sphingosin-Umsatzes. Lohnenswerte Ziele sind hierbei die für die Glucocerebrosid-Bildung verantwortlichen Gene, wobei bis dato noch ungeklärt ist, ob diese mit dem Einfügen einer zweiten Doppelbindung oder der Methylierung der Sphingoidbase startet. Auch die Inaktivierung der für den Sphingosin-Katabolismus verantwortlichen Gene könnte Ziel führend sein. Hier sind die LCB-Kinase und die LCBP-Lyase aussichtsreiche Ziele. Darüber hinaus ist auch die Inaktivierung der *P. ciferrii*-eigenen Ceramidase mit ihrer möglicherweise kontraproduktiven Dihydroceramidase-Aktivität ein gutes Ziel.

Allerdings darf nicht vergessen werden, dass der Ploidie-Status von *P. ciferrii* nach wie vor unbekannt ist. Das Gelingen der Disruption des *SYR2*-Gens kann ebenso gut auf eine Aneuploidie hinweisen, wie sie für industrielle Hefen nicht selten ist. Dies ließe sich über eine - allerdings sehr aufwendige - von Hadfield *et al.* (1995) beschriebene Methode klären.

Neben der Inaktivierung einzelner Gene bestehen auch noch weitere Möglichkeiten zur Verstärkung des Stoffflusses vom Sphingamin zum Sphingosin. So ist die Überexpression *P. ciferrii*-eigener Gene, deren Codon-Verwendung zuvor an jene stark transkribierter Gene von *P. ciferrii* selbst angepasst wurden, ein guter Ansatzpunkt. Die potentiellen Kandidaten hierfür sind das *DES1*- (CAI von 0,723), *YXC1*- (0,686), *LAF1*- (0,767) und das *LAG1*-Gen (0,652). Die Anpassung der Codon-Verwendung würde somit die Verwendung extrem selten genutzter Codons in den Sequenzen (Tab. 10) umgehen und könnte somit zu einer verbesserten Translation korrespondierenden mRNA's führen.

Tabelle 13: Übersicht über die Codon-Verwendung in *P. ciferrii*-eigenen Genen. Die Codons, welche mehr als 10% der für eine gegebene AS codierenden Triplets ausmachen, sind grün, jene, die weniger als 5% ausmachen, rot unterlegt. Links findet sich die anhand der bekannten *P. ciferrii*-Gene errechnete Codon-Häufigkeit. Im Vergleich dazu ist auf der rechten Seite die Häufigkeit der einzelnen Codons in den vier Genen *DES1*, *YXC1*, *LAF1* und *LAG1* angegeben.

Aminosäure	Codon	Prozent	PcDES1	PcYXC1	PcLAF1	PcLAG1
Ala	GCT	62,5	12	7	8	6
	GCC	7,9	1	2	1	0
	GCA	28	6	5	7	7
	GCG	1,5	0	0	0	0
Arg	CGT	24,8	0	0	0	7
	CGC	0,7	0	0	0	1
	CGA	1,6	0	0	1	0
	CGG	0,2	0	0	0	0
	AGA	70,1	8	4	10	12
	AGG	2,7	0	0	0	0
Asn	AAT	82,7	15	14	17	14
	AAC	17,3	5	1	1	1
Asp	GAT	94,6	12	7	26	22
	GAC	5,4	0	0	0	1
Cys	TGT	94,4	3	3	5	3
	TGC	5,6	0	0	0	0
Gln	CAA	95	9	7	18	15
	CAG	5	0	0	0	1
Glu	GAA	94,1	13	12	14	21
	GAG	5,9	1	1	0	0
Glv	GGT	81,7	8	11	11	14
	GGC	2	0	0	0	1
	GGA	11,4	2	4	5	3
	GGG	4,9	1	2	2	0
His	CAT	91,4	18	10	11	5
	CAC	8,6	0	0	0	2
Ile	ATT	65,2	19	19	23	23
	ATC	15,4	3	1	2	7
	ATA	19,4	5	10	14	5
Leu	TTA	73,6	30	32	33	37
	TTG	13,4	5	5	2	6
	CTT	7,3	4	1	1	5
	CTC	1,2	0	0	0	0
	CTA	2,9	2	1	0	2
	CTG	1,4	0	0	0	0
Lys	AAA	88	24	14	25	19
	AAG	12	2	2	2	4
Met	ATG	100	4	7	12	12
Phe	TTT	64	14	14	19	22
	TTC	36	11	6	3	10
Pro	CCT	24,2	8	3	4	5
	CCC	2,7	0	1	0	1
	CCA	70,5	15	6	0	7
	CCG	2,7	0	0	0	1
Ser	TCT	26,2	2	5	9	10
	TCC	5,2	0	1	0	4
	TCA	49,8	12	5	21	19
	TCG	1,2	0	0	0	0
	AGT	16,9	4	5	4	5
	AGC	0,8	0	0	0	4
Thr	ACT	55,5	13	8	9	13
	ACC	9,5	0	1	1	1
	ACA	33,9	10	5	9	14

	ACG	1,1	0	0	0	0
Trp	TGG	100	7	9	6	9
Tyr	TAT	87,8	22	18	29	23
	TAC	12,2	2	1	1	2
Val	GTT	76,2	13	10	16	18
	GTC	10,2	5	1	0	2
	GTA	7,5	0	0	2	4
	GTG	6,1	1	3	1	3

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Verbesserung der TriASo-Produktion in *P. ciferrii* ist die Erhöhung der Kopiezahl der für die Bildung von Sphingosin aus Sphingamin verantwortlichen Gene. So ist die Verwendung von Resistenz- oder Auxotrophie-Markergenen, deren Transkription durch die gezielte Verkürzung ihrer Promotoren oder durch die Verwendung schwacher Promotoren reduziert wird vermutlich ein wirkungsvoller Ansatz. Ebenso denkbar ist die gezielte Verringerung des CAI's dieser Gene, um die Translationseffizienz der entsprechenden mRNA's herabzusetzen. Diese Ansätze würden den Organismus dazu zwingen, die Resistenz/Auxotrophie-Markerkassette, und damit das gesamte Expressionsplasmid mehrfach zu integrieren, um die Antibiotika-Resistenz oder die entsprechende Prototrophie auszubilden. Im Falle der für die Bildung von Sphingosin aus Sphingamin verantwortlichen Gene ist zusätzlich eine Verbesserung der Transkription durch die Verwendung stärkerer Promotoren denkbar. Auch dies könnte zu einem verbesserten Umsatz von Sphingamin zu Sphingosin und somit zur Erhöhung der Sphingosin-Produktion mit *P. ciferrii* beitragen.

Langfristig erscheint auch eine Abkehr der, nicht nur in der kosmetischen Industrie problematisch gesehenen Nutzung von Antibiotika innerhalb des Produktionsprozesses als unabdingbar. So rückt die Verwendung auxotropher Stämme als Basis der rationalen Stammentwicklung in den Vordergrund.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte der Sphingolipid-Biosyntheseweg der Hefe *P. ciferrii* näher charakterisiert werden, um die Entwicklung einer fermentativen Route zur TriASo-Produktion zu ermöglichen. Darüber hinaus galt es patentierbare Selektionssysteme für diese Hefe zu etablieren.

Durch Sequenzvergleiche mit nahe verwandten Hefen und das Ableiten degenerierter Primer wurden elf für die Sphingolipid-Biosynthese von *P. ciferrii* relevante Gene isoliert und sequenziert: *LCB1* (codiert für eine UE der Serin-Palmitoyltransferase), *TSC10* (3-Ketosphinganin-Reduktase), *LAG1* und *LAF1* (Ceramid-Synthasen), *LIP1* (UE der Ceramid-Synthasen), *DES1* (Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase), *YXC1* (Ceramidase), *8DES* (Sphingolipid- Δ^8 -Desaturase), *9MTR* (Sphingolipid-C9-Methyltransferase), *GCS1* (Ceramid-Glycosyltransferase) und *LCB4* (LCB-Kinase). Bioinformatische Analysen, sowie *in vivo*-Experimente dienten der Einordnung der korrespondierenden Genprodukte in den Stoffwechselweg. Die Bestimmung der Substratspezifität einzelner Enzyme aus der Sphingolipid-Biosynthese erfolgte durch Überexpression der korrespondierenden Gene und anschließende Analyse des Einflusses auf die Zusammensetzung der Sphingolipidfraktion von *P. ciferrii*.

Zusammengenommen wurde durch die Ergebnisse ein deutlich geschärftes Bild der Biosynthese von Sphingolipiden in *P. ciferrii* erstellt.

Die gewonnenen Erkenntnisse über die Sphingolipid-Biosynthese in *P. ciferrii* fanden Anwendung auf die rationale Stammentwicklung eines TriASo-Produzenten. Durch die kombinierte Überexpression der die Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase aus *P. ciferrii*, die Ceramid-Synthase aus *Coccolithovirus* und eine alkalische Ceramidase aus *Mus musculus* kodierenden Gene wurde eine 8,5-fache Erhöhung der Sphingosin-Konzentration von 7,5 mg/L in vom Wildtyp abgeleiteten Syringomycin-E-resistenten Stämmen auf 64,0 mg/L erzielt.

Die Codon-Optimierung der heterolog exprimierten Gene zur Anpassung an die sehr eingeschränkte Codon-Verwendung von *P. ciferrii* erwies sich hierbei als essentiell.

Zur Nutzbarmachung von rekombinanten *P. ciferrii*-Stämmen für die industrielle Anwendung wurden darüber hinaus drei neue Selektionssysteme etabliert. Zum einen

wurde eine codon-optimierte Form des *nat1*-Gens genutzt, um eine Nourseothricin-Resistenz zu vermitteln. Zum anderen wurden stabile Uracil- bzw. Lysin-auxotrophe *P. ciferrii*-Stämme erzeugt, die mittels eines entsprechenden Integrationsvektors mit den Auxotrophie-Markergenen *URA3* bzw. *LYS2* aus *P. ciferrii* zu prototrophen Stämmen komplementiert werden konnten.

Zusammengenommen mit der ersten gezielten Disruption eines Gens in *P. ciferrii* (*SYR2*, codiert für die Sphinganin-Hydroxylase) konnte somit auch die molekularbiologische Handhabbarkeit von *P. ciferrii* deutlich verbessert werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Adetuyi F C, Isogai A, Di Giorgio D, Ballio A, Takemoto J Y** (1995) Saprophytic *Pseudomonas syringae* strain M1 of wheat produces cyclic lipodepsipeptides. FEMS Microbiol Lett **131**: 63-67.
- Allan D und Raval P J** (1987) A sphingomyelinase-resistant pool of sphingomyelin in the nuclear membrane of hen erythrocytes. Biochim Biophys Acta **897**: 355-363.
- Arnold W P, Glade C P, Mier P D, van de Kerkhof P C** (1993) Effects of sphingosine, isoquinoline and tannic acid on the human tape-stripping model and the psoriatic lesion. Skin Pharmacol **6**: 193-199.
- Bae J H, Sohn J H, Park C S, Rhee J S, Choi E S** (2003) Integrative transformation system for the metabolic engineering of the sphingoid base-producing yeast *Pichia ciferrii*. Appl Environ Microbiol **69**: 812-819.
- Bae J H, Sohn J H, Park C S, Rhee J S, Choi E S** (2004) Cloning and functional characterization of the *SUR2/SYR2* gene encoding sphinganine hydroxylase in *Pichia ciferrii*. Yeast **21**: 437-443.
- Bagnat M, Keranen S, Shevchenko A, Shevchenko A, Simons K** (2000) Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. Proc Natl Acad Sci USA **97**: 3254-3259.
- Barenholz Y, Edelman I, Gatt S** (1971) The metabolic basis for the accumulation of acetylated sphingosine bases in the yeast *Hansenula ciferrii*. Biochim Biophys Acta **248**: 458-465.
- Barenholz Y, Gadot N, Valk E, Gatt S** (1973) Identification of the enzymatic lesions responsible for the accumulation of acetylated sphingosine bases in the yeast *Hansenula ciferrii*. Biochim Biophys Acta **306**: 341-345.
- Barenholz Y und Gatt S** (1969) Acetylation of sphingosine bases and long-chain amines by cell-free preparations of *Hansenula ciferrii*. Biochem Biophys Res Comm **35**: 676-680.

- Barenholz Y und Gatt S** (1972) Long chain base-acetyl coenzyme A acetyltransferase from the microsomes of *Hansenula cifferi*. I. Isolation and properties. J Biol Chem **247**: 6827-6833.
- Barnes D A und Thorner J** (1986) Genetic manipulation of *Saccharomyces cerevisiae* by use of the *LYS2* gene. Mol Cell Biol **6**: 2828-2838.
- Barreto-Bergter E, Pinto M R, Rodrigues M L** (2004) Structure and biological functions of fungal cerebrosides. An Acad Bras Cienc **76**: 67-84.
- Barz W P und Walter P** (1999) Two endoplasmic reticulum (ER) membrane proteins that facilitate ER-to-Golgi transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. Mol Biol Cell **10**: 1043-1059.
- Batrakov S G, Konova I V, Sheichenko V I, Esipov S E, Galanina L A, Istratova L N** (2002) Unusual fatty acid composition of cerebrosides from the filamentous soil fungus *Mortierella alpina*. Chem Phys Lipids **117**: 45-51.
- Becker G W und Lester R L** (1980) Biosynthesis of phosphoinositol-containing sphingolipids from phosphatidylinositol by a membrane preparation from *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol **142**: 747-754.
- Becker J und Boles E** (2003) A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol. Appl Environ Microbiol **69**: 4144-4150.
- Beckmann C, Rattke J, Sperling P, Heinz E, Boland W** (2003) Stereochemistry of a bifunctional dihydroceramide Δ^4 -desaturase/hydroxylase from *Candida albicans*; a key enzyme of sphingolipid metabolism. Org Biomol Chem **1**: 2448-2454.
- Beeler T, Bacikova D, Gable K, Hopkins L, Johnson C, Slife H, Dunn T** (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* *TSC10/YBR265w* gene encoding 3-ketosphinganine reductase is identified in a screen for temperature-sensitive suppressors of the Ca^{2+} -sensitive *csg2* Δ mutant. J Biol Chem **273**: 30688-30694.

- Beeler T J, Fu D, Rivera J, Monaghan E, Gable K, Dunn T M** (1997) *SUR1* (*CSG1/BCL21*), a gene necessary for growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of high Ca^{2+} concentrations at 37°C, is required for mannosylation of inositolphosphorylceramide. *Mol Gen Genet* **255**: 570-579.
- Bernardo K, Hurwitz R, Zenk T, Desnick R J, Ferlinz K, Schuchman E H, Sandhoff K** (1995) Purification, characterization and biosynthesis of human acid ceramidase. *J Biol Chem* **270**: 11096-11102.
- Bibel D J, Aly R, Shah S, Shinefield H R** (1993) Sphingosines: antimicrobial barriers of the skin. *Acta Derm Venereol* **73**: 407-411.
- Bibel D J, Aly R, Shinefield H R** (1992) Antimicrobial activity of sphingosines. *J Invest Dermatol* **98**: 269-273.
- Bibel D J, Aly R, Shinefield H R** (1995) Topical sphingolipids in antiseptis and antifungal therapy. *Clin Exp Dermatol* **20**: 395-400.
- Boeke J D, LaCroute F, Fink G R** (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet* **197**: 345-346.
- Boeke J D, Trueheart J, Natsoulis G, Fink G R** (1987) 5-fluoro-orotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol* **154**: 164-175.
- Borell C W und Bhattacharjee J K** (1988) Cloning and biochemical characterization of *LYS5* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **13**: 299-304.
- Braun P E, Morell P, Radin N S** (1970) Synthesis of C_{18} - and C_{20} -dihydrosphingosines, ketodihydrosphingosines, and ceramides by microsomal preparations from mouse brain. *J Biol Chem* **245**: 335-341.
- Braun P E und Snell E E** (1967) The biosynthesis of dihydrosphingosine in cell-free preparations of *Hansenula ciferri*. *Proc Natl Acad Sci USA* **58**: 298-303.
- Braun P E und Snell E E** (1968) Biosynthesis of sphingolipid bases. II. Keto intermediates in synthesis of sphingosine and dihydrosphingosine by cell-free extracts of *Hansenula ciferri*. *J Biol Chem* **243**: 3775-3783.

- Buede R, Rinker-Schaffer C, Pinto W J, Lester R L, Dickson R C** (1991) Cloning and characterization of *LCB1*, a *Saccharomyces* gene required for biosynthesis of the long-chain base component of sphingolipids. *J Bacteriol* **173**: 4325-4332.
- Chattoo B B, Sherman F, Azubalis D A, Fjellstedt T A, Mehnert D, Ogur M** (1979) Selection of *lys2* mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by the utilization of α -aminoadipate. *Genetics* **93**: 51-65.
- Chen R F, Scott C, Trepman E** (1979) Fluorescence properties of o-phthaldialdehyde derivatives of amino acids. *Biochim Biophys Acta* **576**: 440-455.
- Chevallier M R** (1982) Cloning and transcriptional control of a eucaryotic permease gene. *Mol Cell Biol* **2**: 977-984.
- Chung N, Jenkins G, Hannun Y A, Heitman J, Obeid L M** (2000) Sphingolipids signal heat stress-induced ubiquitin-dependent proteolysis. *J Biol Chem* **275**: 17229-17232.
- Chung N, Mao C, Heitman J, Hannun Y A, Obeid L M** (2001) Phytosphingosine as a specific inhibitor of growth and nutrient import in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**: 35614-35621.
- Cliften P, Wang Y, Mochizuki D, Miyakawa T, Wangspa R, Hughe J, Takemoto J Y** (1996) *SYR2*, a gene necessary for syringomycin growth inhibition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **142**: 477- 484.
- Compton T** (1990) Degenerate primers for DNA amplification. In: *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J (Eds) Academic Press, London, 39-45.
- Daquinag A, Fadri M, Jung S Y, Qin J, Kunz J** (2007) The yeast PH domain proteins Slm1 and Slm2 are targets of sphingolipid signaling during the response to heat stress. *Mol Cell Biol* **27**: 633-650.

- Davies A, Verdejo P, Feinberg C, Rawlings A V** (1996) Increased *stratum corneum* ceramide levels and improved barrier function following treatment with tetraacetylphytosphingosine. *J Invest Dermatol* **106**: 918.
- de Jager M W, Gooris G S, Ponec M, Bouwstra J A** (2005) Lipid mixtures prepared with well-defined synthetic ceramides closely mimic the unique *stratum corneum* lipid phase behavior. *J Lipid Res* **46**: 2649-2656.
- Dickson R C** (1998) Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison to mammals. *Annu Rev Biochem* **67**: 27-48.
- Dickson R C und Lester R L** (1999a) Metabolism and selected functions of sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1438**: 305-321.
- Dickson R C und Lester R L** (1999b) Yeast sphingolipids. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 347-357.
- Dickson R C, Nagiec E E, Wells G B, Nagiec M M, Lester R L** (1997) Synthesis of mannose-(inositol-P)₂-ceramide, the major sphingolipid in *Saccharomyces cerevisiae*, requires the *IPT1* (*YDR072c*) gene. *J Biol Chem* **272**: 29620-29625.
- Dickson R C, Wells G B, Schmidt A, Lester R L** (1990) Isolation of mutant *Saccharomyces cerevisiae* strains that survive without sphingolipids. *Mol Cell Biol* **10**: 2176.
- Downing D T** (1992) Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *J Lipid Res* **33**: 301-313.
- Downing D T, Stewart M E, Wertz P W, Strauss J S** (1986) Essential fatty acids and acne. *J Am Acad Dermatol* **14**: 221-225.
- Duax W L, Griffin J F, Ghosh D** (1996) The fascinating complexities of steroid-binding enzymes. *Curr Opin Struct Biol* **6**: 813-823.

- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neuveglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisrame A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, De Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaia F, Wesolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL** (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35-44.
- Dunn T M, Haak D, Monaghan E, Beeler T J** (1998) Synthesis of monohydroxylated inositolphosphorylceramide (IPC-C) in *Saccharomyces cerevisiae* requires Scs7p, a protein with both a cytochrome *b₅*-like domain and a hydroxylase/desaturase domain. *Yeast* **14**: 311-321.
- Ehmann D E, Gehring A M, Walsh C T** (1999) Lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of α -amino adipate reductase (Lys2) involves posttranslational phosphopantetheinylation by Lys5. *Biochemistry* **38**: 6171-6177.
- El Bawab S, Bielawska A, Hannun Y A** (1999) Purification and characterization of a membrane-bound nonlysosomal ceramidase from rat brain. *J Biol Chem* **274**: 27948-27955.
- El Bawab S, Roddy R, Qian T, Bielawska A, Lemasters J J, Hannun Y A** (2000) Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase. *J Biol Chem* **275**: 21508-21513.
- Elias P M** (1983) Epidermal lipids, barrier function and desquamation. *J Invest Dermatol* **80**: 44-49.
- Elias P M** (1991) Epidermal barrier function: intercellular lamellar lipid structures, origin, composition and metabolism. *J Controlled Release* **15**: 199-208.

- Entian K D und Kötter P** Yeast mutant and plasmid collections. *Meth Microbiol* **26**: 431-449.
- Farwanah H, Wohlrab J, Neuberth R H, Raith K** (2005) Profiling of human *stratum corneum* ceramides by means of normal phase LC/APCI-MS. *Anal Bioanal Chem* **383**: 632-637.
- Fornarotto M, Xiao L, Hou Y, Koch K A, Chang E, O'Malley R M, Black T A, Cable M B, Walker S S** (2006) Sphingolipid biosynthesis in pathogenic fungi: Identification and characterization of the 3-ketosphinganine reductase activity of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Biochim Biophys Acta* **1761**: 52-63.
- Friant S, Lombardi R, Schmelzle T, Hall M N, Riezman H** (2001) Sphingoid base signaling via Pkh kinases is required for endocytosis in yeast. *EMBO J* **20**: 6783-6792.
- Futerman A H und Hannun Y A** (2004) The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep* **5**: 777-782.
- Gable K, Han G, Monaghan E, Bacikova D, Natarajan M, Williams R, Dunn T M** (2002) Mutations in the yeast *LCB1* and *LCB2* genes, including those corresponding to the hereditary sensory neuropathy type I mutations, dominantly inactivate serine palmitoyltransferase. *J Biol Chem* **277**: 10194-10200.
- Gable K, Slife H, Bacikova D, Monaghan E, Dunn T M** (2000) Tsc3p is an 80-amino acid protein associated with serine palmitoyltransferase and required for optimal enzyme activity. *J Biol Chem* **275**: 7597-7603.
- Garton S, Michaelson L V, Beaudoin F, Beale M H, Napier J A** (2003) The dihydroceramide desaturase is not essential for cell viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett* **538**: 192-196.
- Ghosh D, Wawrzak Z, Weeks C M, Duax W L, Erman M** (1994) The refined three-dimensional structure of 3 alpha,20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and possible roles of the residues conserved in short-chain dehydrogenases. *Structure* **2**: 629-640.

- Gietz R D und Woods R A** (2002) Transformation of yeast by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Methods Enzymol* **350**: 87-96.
- Goldstein A L und McCusker J H** (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**: 1541-1553.
- González C I, Bhattacharya A, Wang W, Peltz S W** (2001) Nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **274**: 15-25.
- Greene M L, Kaneshiro T, Law J H** (1965) Studies on the production of sphingolipid bases by the yeast, *Hansenula ciferri*. *Biochim Biophys Acta* **98**: 582-588.
- Grilley M M, Stock S D, Dickson R C, Lester R L, Takemoto J Y** (1998) Syringomycin action gene *SYR2* is essential for sphingolipid 4-hydroxylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 11062-11068.
- Guillas I, Kirchman P A, Chuard E, Pfefferli M, Jiang J C, Jazwinski J M, Conzelmann A** (2001) C26-CoA-dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* is operated by Lag1p and Lac1p. *EMBO J* **20**: 2655-2665.
- Guo S, Evans S A, Wilkes M B, Bhattacharjee J K** (2001) Novel posttranslational activation of the *LYS2*-encoded alpha-aminoacidopate reductase for biosynthesis of lysine and site-directed mutational analysis of conserved amino acid residues in the activation domain of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **183**: 7120-7125.
- Gupta A K, Fischer G J, Elder J T, Nickoloff B J, Voorhees J J** (1988) Sphingosine inhibits phorbol ester-induced inflammation, ornithine decarboxylase activity, and activation of protein kinase C in mouse skin. *J Invest Dermatol* **91**: 486-491.
- Haak D, Gable K, Beeler T, Dunn T** (1997) Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p. *J Biol Chem* **272**: 29704-29710.

- Hadfield C, Harikrishna J A, Wilson J A** (1995) Determination of chromosome copy numbers in *Saccharomyces cerevisiae* strains via integrative probe and blot hybridization techniques. *Curr Genet* **24**: 217-228.
- Hama H, Young D A, Radding J A, Ma D, Tang J, Stock S D, Takemoto J Y** (2000) Requirement of sphingolipid α -hydroxylation for fungicidal action of syringomycin E. *FEBS Lett* **478**: 26-28.
- Hanahan D** (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. *DNA Cloning*, Vol. I, Edited by D. M. Glover, IRL Press, Oxford 109-135.
- Harding C R, Moore A E, Rogers J S, Meldrum H, Scott A, McGlone F** (2002) Dandruff: a condition characterized by decreased levels of intercellular lipids in scalp *stratum corneum* and impaired barrier function. *Arch Dermatol Res* **294**: 221-230.
- Harding C R, Watkinson A, Rawlings A V, Scott I R** (2000) Dry skin, moisturisation and corneodesmolysis. *Int J Cosmet Sci* **22**: 21-52.
- Hearn J D, Lester R L, Dickson R C** (2003) The uracil transporter Fur4p associates with lipid rafts. *J Biol Chem* **278**: 3679-3686.
- Hechtberger P, Zinser E, Saf R, Hummel K, Paltauf F, Daum G** (1994). Characterization, quantification and subcellular localization of inositol containing sphingolipids of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **225**: 641-649.
- Hillig I, Leipelt M, Ott C, Zahringer U, Warnecke D, Heinz E** (2003) Formation of glucosylceramide and sterol glucoside by a UDP-glucose-dependent glucosylceramide synthase from cotton expressed in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett* **553**: 365-369.
- Holleran W M, Takagi Y, Uchida Y** (2006) Epidermal sphingolipids: Metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Lett* **580**: 5456-5466.
- Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A** (1991) Decreased level of ceramides in *stratum corneum* of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol* **96**: 523-526.

- Imokawa G, Akasaki S, Hattori M, Yoshizuka N** (1986) Selective recovery of deranged water-holding properties by *stratum corneum* lipids. *J Invest Dermatol* **87**: 758-761.
- Jacquet M, Guilbaud R, Garreau H** (1988) Sequence analysis of the *DdPYR5-6* gene coding for UMP synthase in *Dictyostelium discoideum* and comparison with orotate phosphoribosyl transferases and OMP decarboxylases. *Mol Gen Genet* **211**: 441-445.
- Jenkins G M, Richards A, Wahl T, Mao C, Obeid L, Hannun Y** (1997) Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. **272**: 32566-32572.
- Jörnvall H, Persson B, Kook M, Atrian S, González-Duarte R, Jeffery J, Ghosh D** (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**: 6003-6013.
- Jones B N und Gilligan J P** (1983) o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J Chromatogr* **266**: 471-482.
- Jund R und LaCroute F** (1972) Regulation of orotidylic acid pyrophosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **109**: 196-202.
- Kapitonov D und Yu R K** (1999) Conserved domains of glycosyltransferases. *Glycobiology* **9**: 961-978.
- Karlsson K A** (1966) Studies on sphingosines. 11. The chemical structure of phytosphingosine of human origin and a note on the lipid composition of the yeast *Hansenula ciferrii*. *Acta Chem Scand* **20**: 2884-2885.
- Karlsson K A, Samuelsson B E, Steen G O** (1967) Studies on sphingosines. 15. Degradation of phytosphingosine to hydroxyl fatty acid and ethanolamine by the yeast *Hansenula ciferrii*. *Acta Chem Scand* **21**: 2566-2567.
- Kaufman B, Basu S, Roseman S** (1971) Isolation of glucosylceramides from yeast (*Hansenula ciferrii*). *J Biol Chem* **246**: 4266-4271.

- Kawai S, Murao S, Mochizuki M, Shibuya I, Yano K, Takagi M** (1992) Drastic alteration of cycloheximide sensitivity by substitution of one amino acid in the L41 ribosomal protein of yeasts. *J Bacteriol* **174**: 254-262.
- Kihara A und Igarashi Y** (2002) Identification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene, *RSB1*, involved in sphingoid long-chain base release. *J Biol Chem* **277**: 20048-30054.
- Kihara A, Sano T, Iwaki S, Igarashi Y** (2003) Transmembrane topology of sphingoid long-chain base-1-phosphate phosphatase, Lcb3p. *Genes Cells* **8**: 525-535.
- Kim S, Fyrst H, Saba J** (2000) Accumulation of phosphorylated sphingoid long chain bases results in cell growth inhibition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **156**: 1519-1529.
- Kimsey H H und Kaiser D** (1992) The orotidine-5'-monophosphate decarboxylase gene of *Myxococcus xanthus*. Comparison to the OMP decarboxylase gene family. *J. Biol Chem* **267**: 819-824.
- Koch J, Gärtner S, Li C-M, Quintern L E, Bernardo K, Levrán O, Schnabel D, Desnick R J, Schuchman E H, Sandhoff K** (1996) Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase. *J Biol Chem* **271**: 33110-33115.
- Krügel H, Fiedler G, Haupt I, Sarfert E, Simon H** (1988) Analysis of the nourseothricin-resistance gene (*nat*) of *Streptomyces noursei*. *Gene* **62**: 209-217.
- Kubler E, Dohlman H G, Lisanti M P** (1996) Identification of Triton X-100 insoluble membrane domains in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Lipid requirements for targeting of heterotrimeric G-protein subunits. *J Biol Chem* **271**: 32975-32980.
- Kurtz J E, Exinger F, Erbs P, Jund R** (1999) New insights into the pyrimidine salvage pathway of *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of six genes for cytidine metabolism. *Curr Genet* **36**: 130-136.

- Kurtzman C P** (1984) Synonymy of the yeast genera *Hansenula* and *Pichia* demonstrated through comparisons of deoxyribonucleic acid relatedness. *Antonie van Leeuwenhoek* **50**: 209-217.
- Kurtzman C P und Robnett C J** (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 331-371.
- Leipelt M, Warnecke D, Hube B, Zähringer U, Heinz E** (2000) Characterization of UDP-glucose:ceramide glucosyltransferases from different organisms. *Biochem Soc Trans* **28**: 751-752.
- Leipelt M, Warnecke D, Zähringer U, Ott C, Müller F, Hube B, Heinz E** (2001) Glucosylceramide synthases, a gene family responsible for the biosynthesis of glucosphingolipids in animals, plants, and fungi. *J Biol Chem* **276**: 33621-33629.
- Lester R L und Dickson R C** (1993) Sphingolipids with inositol phosphate-containing head groups. *Adv Lipid Res* **26**: 253-272.
- Lester R L und Dickson R C** (2001) High-performance liquid chromatography analysis of molecular species of sphingolipid-related long chain bases and long chain base phosphates in *Saccharomyces cerevisiae* after derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. *Anal Biochem* **298**: 283-292.
- Lester R L, Smith S W, Wells G B, Rees D C, Angus W W** (1974) The isolation and partial characterization of two novel sphingolipids from *Neurospora crassa*: di(inositolphosphoryl)ceramide and [(gal)₃glu]ceramide. *J Biol Chem* **249**: 3388-3394.
- Lester R L, Wells G B, Oxford G, Dickson R C** (1993) Mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae* lacking sphingolipids synthesize novel inositol glycerophospholipids that mimic sphingolipid structures. *J Biol Chem* **268**: 845-856.

- Leverly S B, Toledo M S, Doong R L, Straus A H, Takahashi H K** (2000) Comparative analysis of ceramide structural modification found in fungal cerebrosides by electrospray tandem mass spectrometry with low energy collision-induced dissociation of Li⁺ adduct ions. *Rapid Commun Mass Spectrom* **14**: 551-563.
- Li C M, Park J H, Simonaro C M, He X, Gordon R E, Friedman A H, Ehleiter D, Paris F, Manova K, Hepbildikler S, Fuks Z, Sandhoff K, Kolesnick R, Schuchman E H** (2002) Insertional mutagenesis of the mouse acid ceramidase gene leads to early embryonic lethality in homozygotes and progressive lipid storage disease in heterozygotes. *Genomics* **79**: 218-224.
- Liu K, Zhang X, Sumanasekera C, Lester R L, Dickson R C** (2005) Signalling functions for sphingolipid long-chain bases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Soc Trans* **33**: 1170-1173.
- Livak K J und Schmittgen T D** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_T$} Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Lodder J** (1932) Über einige durch das "Centraalbureau voor Schimmelcultures" neuerworbene sporogene Hefearten. *Zentr Bakteriol Parasitenk Abt. II* **86**: 227-253.
- Lodder J und Kreger-van Rij N J W** (1952) *The yeasts, a taxonomic study*. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Losberger C und Ernst J F** (1989) Sequence and transcript analysis of the *C. albicans URA3* gene encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase. *Curr Genet* **16**: 153-157.
- Mandala S M, Thornton R, Tu Z, Kurtz M B, Nickels J, Broach J, Menzeleev R, Spiegel S** (1998) Sphingoid base 1-phosphate phosphatase: A key regulator of sphingolipid metabolism and stress response. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 150-155.
- Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J** (1982) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

- Mao C, Wadleigh M, Jenkins G M, Hannun Y A, Obeid L M** (1997) Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* dihydrosphingosine-1-phosphate Phosphatase. *J Biol Chem* **272**: 28690-28694.
- Mao C, Xu R, Bielawska A, Obeid L M** (2000a) Cloning of an alkaline ceramidase from *Saccharomyces cerevisiae*. An enzyme with reverse (CoA-independent) ceramide synthase activity. *J Biol Chem* **275**: 6876-6884.
- Mao C, Xu R, Bielawska A, Szulc Z M, Obeid L M** (2000b) Cloning and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* alkaline ceramidase with specificity for dihydroceramide. *J Biol Chem* **275**: 31369-31378.
- Mao C, Xu R, Szulc Z M, Bielawska A, Galadari S H, Obeid L M** (2001) Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase. A mammalian enzyme that hydrolyzes phytoceramide. *J Biol Chem* **276**: 26577-26588.
- Mao C, Xu R, Szulc Z M, Bielawski J, Becker K P, Bielawska A, Galadari S H, Hu W, Obeid L M** (2003) Cloning and characterization of a mouse endoplasmic reticulum alkaline ceramidase. An enzyme that preferentially regulates metabolism of very long chain ceramides. *J Biol Chem* **278**: 31184-31191.
- Mao C G, Saba J D, Obeid L M** (1999) The dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatases of *Saccharomyces cerevisiae* are important regulators of cell proliferation and heat stress responses. *Biochem J* **342**: 667-675.
- Mao-Qiang M, Feingold K R, Jain M, Elias P M** (1995) Extracellular processing of phospholipids is required for permeability barrier homeostasis. *J Lipid Res* **36**: 1925-1935.
- Marks D L, Dominguez M, Wu K, Pagano R E** (2001) Identification of active site residues in glucosylceramide synthase. A nucleotide-binding catalytic motif conserved with processive beta-glycosyltransferases. *J Biol Chem* **276**: 26492-26498.
- Matsubara T, Hayashi K, Banno Y, Morita T, Nozawa Y** (1987) Cerebroside of the dimorphic human pathogen, *Candida albicans*. *Chem Phys Lipids* **43**: 1-12.

- Menon G und Ghadially R** (1997) Morphology of lipid alterations in the epidermis: a review. *Microsc Res Tech* **37**: 180-192.
- Merrill A H Jr und Jones D D** (1990) An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1044**: 1-12.
- Michel C, van Echten-Deckert G, Rother J, Sandhoff K, Wangl E, Merrill A H Jr** (1997) Characterization of ceramide synthesis: A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-*trans*-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *J Biol Chem* **272**: 22432-22437.
- Mitsutake S, Tani M, Okino N, Mori K, Ichinose S, Omori A, Iida H, Nakamura T, Ito M** (2001) Purification, characterization, molecular cloning, and subcellular distribution of neutral ceramidase of rat kidney. *J Biol Chem* **276**: 26249-26259.
- Mizutani Y, Kihara A, Igarashi Y** (2005) Mammalian Lass6 and its related family members regulate synthesis of specific ceramides. *Biochem J* **390**: 263-271.
- Mizutani Y, Kihara A, Igarashi Y** (2006) *LASS3* (longevity assurance homologue 3) is a mainly testis-specific (dihydro)ceramide synthase with relatively broad substrate specificity. *Biochem J* **398**: 531-538.
- Monaghan E, Gable K, Dunn T** (2002) Mutations in the Lcb2p subunit of serine palmitoyltransferase eliminate the requirement for the *TSC3* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**: 659-670.
- Murray M G und Thompson W F** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**: 4321-4325.
- Nagiec M M, Baltisberger J A, Wells G B, Lester R L, Dickson R C** (1994) The *LCB2* gene of *Saccharomyces* and the related *LCB1* gene encode subunits of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7899-7902.

- Nagiec M M, Nagiec E E, Baltisberger J A, Wells G B, Lester R L, Dickson R C** (1997) Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by the *AUR1* gene. *J Biol Chem* **272**: 9809-9817.
- Nagiec M M, Skrzypek M, Nagiec E E, Lester R L, Dickson R C** (1998) The *LCB4* (*YOR171c*) and *LCB5* (*YLR260w*) genes of *Saccharomyces* encode sphingoid long chain base kinases. *J Biol Chem* **273**: 19437-19442.
- Napier L A, Michaelson L V, Sayanova O** (2003) The role of cytochrome *b₅* fusion desaturases in the synthesis of polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **68**: 135-143.
- Nieminen E, Leikola E, Kolijonen M, Kiistala U, Mustakalio K K** (1967) Quantitative analysis of epidermal lipids by thin-layer chromatography with special reference to seasonal and age variation. *Acta Derm Venereol* **47**: 327-338.
- Nikolova-Karakashian M und Merrill A H** (2000) Ceramidases. *Methods Enzymol* **311**: 194-201.
- Oh C S, Toke D A, Mandala S, Martin C E** (1997) *ELO2* and *ELO3*, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* *ELO1* gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J Biol Chem* **272**: 17376-17384.
- Patton J L und Lester R L** (1991) The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. *J Bacteriol* **173**: 3101-3108.
- Patton J L, Srinivasan B, Dickson R C, Lester R L** (1992) Phenotypes of sphingolipid-dependent strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **174**: 7180-7184.
- Pinto W J, Srinivasan B, Shepherd S, Schmidt A, Dickson R C, Lester R L** (1992) Sphingolipid long-chain-base auxotrophs of *Saccharomyces cerevisiae*: genetics, physiology, and a method for their selection. *J Bacteriol* **174**: 2565-2574.

- Puoti A, Desponds C, Conzelmann A** (1991) Biosynthesis of mannosylinositolphosphoceramide in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on genes controlling the flow of secretory vesicles from the endoplasmic reticulum to the Golgi. *J Cell Biol* **113**: 515-525.
- Qie L X, Nagiec M M, Baltisberger J A, Lester R L, Dickson R C** (1997) Identification of a *Saccharomyces gene*, *LCB3*, necessary for incorporation of exogenous long chain bases into sphingolipids. *J Biol Chem* **272**: 16110-16117.
- Rao S T und Rossmann M G** (1973) Comparison of super-secondary structures in proteins. *J Mol Biol* **76**: 241-256.
- Robson K J, Stewart M E, Michelsen S, Lazo N D, Downing D T** (1994) 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *J Lipid Res* **35**: 2060-2068.
- Rosenwald A G und Pagano E R** (1993) Intracellular transport of ceramide and its metabolites at the Golgi complex: insights from short-chain analogs. *Adv Lipid Res* **26**: 101-118.
- Rupčić J und Marić V** (2004) Cerebrosides of *Candida lipolytica* yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**: 416-420.
- Saba J D, Nara F, Bielawska A, Garrett S, Hannun Y A** (1997) The *BST1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is the sphingosine-1-phosphate lyase. *J Biol Chem* **272**: 26087-26090.
- Sakaki T, Zähringer U, Warnecke D C, Fahl A, Knogge W, Heinz E** (2001) Sterol glycosides and cerebrosides accumulate in *Pichia pastoris*, *Rhynchosporium secalis* and other fungi under normal conditions or under heat shock and ethanol stress. *Yeast* **18**: 679-695.
- Sandhoff K und van Echten G** (1993) Ganglioside metabolism: topology and regulation. *Adv Lipid Res* **26**:119-142.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A R** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.

- Schneiter R** (1999) Brave little yeast, please guide us to Thebes: Sphingolipid function in *S. cerevisiae*. *Bioessays* **21**: 1004-1010.
- Schorling S, Vallée B, Barz W P, Riezman H, Oesterhelt D** (2001) Lag1p and Lac1p are essential for the Acyl-CoA-dependent ceramide synthase reaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **12**: 3417-3427.
- Schroeder D C, Oke J, Malin G, Wilson W H** (2002) Coccolithovirus (*Phycodnaviridae*): characterisation of a new large dsDNA algal virus that infects *Emiliana huxleyi*. *Arch Virol* **147**: 1685-1698.
- Seligy V L und James A P** (1977) Multiplicity and distribution of rDNA cistrons among chromosome I and VII aneuploids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp Cell Res* **105**: 63-72.
- Seltmann G** (1989) Biochemical aspects of the resistance to nourseothricin (streptothricin) of *Escherichia coli* strains. *J Basic Microbiol* **29**: 547-559.
- Sharp P M und Li W H** (1987) The codon adaptation index - a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res* **15**: 1281-1295.
- Sickman A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer H E, Schönfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C** (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 13207-13212.
- Simons K und Ikonen E** (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572.
- Skrzypek M S, Nagiec M M, Lester R L, Dickson R C** (1998) Inhibition of amino acid transport by sphingoid long chain bases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 2829-2834.
- Smith S W und Lester R L** (1974) Inositol phosphorylceramide, a novel substance and the chief member of a major group of yeast sphingolipids containing a single inositol phosphate. *J Biol Chem* **249**: 3395-3405.

- Sperling P, Schmidt H, Heinz E** (1995) A cytochrome *b₅*-containing fusion protein similar to plant acyl lipid desaturases. *Eur J Biochem* **232**: 798-805.
- Sperling P, Zähringer U, Heinz E** (1998) A sphingolipid desaturase from higher plants. Identification of a new cytochrome *b₅* fusion protein. *J Biol Chem* **273**: 28590-28596.
- Stock S D, Hama H, Radding J A, Young D A, Takemoto J Y** (2000) Syringomycin E inhibition of *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for biosynthesis of sphingolipids with very-long-chain fatty acids and mannose- and phosphoinositol-containing head groups. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 1174-1180.
- Stodola F H und Wickerham L J** (1960) Formation of extracellular sphingolipids by microorganisms II. Structural studies on tetraacetylphytosphingosine from the yeast *Hansenula ciferrii*. *J Biol Chem* **235**: 2584-2585.
- Stodola F H, Wickerham L J, Scholfield C R, Dutton H J** (1962) Formation of extracellular sphingolipides by microorganisms. III. Triacetyl dihydrosphingosine, a metabolic product of the yeast *Hansenula ciferrii*. *Arch Biochem Biophys* **98**: 176.
- Stoffel W, LeKim D, Sticht G** (1969) Metabolism of sphingosine bases XI: Distribution and properties of dihydrosphingosine-1-phosphate aldolase (Spinganine-1-phosphate alkanal-lyase). *Hoppe-Seyler`s Z Physiol Chem* **350**: 1233-1241.
- Stoffel W, Sticht G, LeKim D** (1968) Metabolism of sphingosine bases, VI. Synthesis and degradation of sphingosine bases in *Hansenula ciferrii*. *Hoppe-Seyler`s Z Physiol Chem* **349**: 1149-1159.
- Suvarna K, Seah L, Bhattacharjee V, Bhattacharjee J K** (1998) Molecular analysis of the *LYS2* gene of *Candida albicans*: homology to peptide antibiotic synthetases and the regulation of the alpha-aminoadipate reductase. *Curr Genet* **33**: 268-275.

- Taguchi N, Takano Y, Julmanop C, Wang Y, Stock S, Takemoto J, Miyakawa T** (1994) Identification and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* *SYR1* gene reveals that ergosterol is involved in the action of syringomycin. *Microbiology* **140**: 353-359.
- Tani M, Okino N, Mitsutake S, Tanigawa T, Izu H, Ito M** (2000a) Purification and characterization of a neutral ceramidase from mouse liver. A single protein catalyzes the reversible reaction in which ceramide is both hydrolyzed and synthesized. *J Biol Chem* **275**: 3462-3468.
- Tani M, Okino N, Mori K, Tanigawa T, Izu H, Ito M** (2000b) Molecular cloning of the full-length cDNA encoding mouse neutral ceramidase. A novel but highly conserved gene family of neutral/alkaline ceramidases. *J Biol Chem* **275**: 11229-11234.
- Takakuwa N, Kinoshita M, Oda Y, Ohnishi M** (2002a) Existence of cerebroside in *Saccharomyces kluyveri* and its related species. *FEMS Yeast Res* **2**: 533-538.
- Takakuwa N, Kinoshita M, Oda Y, Ohnishi M** (2002b) Isolation and characterization of the genes encoding Δ^8 -sphingolipid desaturase from *Saccharomyces kluyveri* and *Kluyveromyces lactis*. *Curr Microbiol* **45**: 459-461.
- Ternes P, Franke S, Zähringer U, Sperling P, Heinz E** (2002) Identification and characterization of a sphingolipid Δ^4 -desaturase family. *J Biol Chem* **277**: 25512-25518.
- Ternes P, Sperling P, Albrecht S, Franke S, Cregg J M, Warnecke D, Heinz E** (2006) Identification of fungal sphingolipid C9-methyltransferases by phylogenetic profiling. *J Biol Chem* **281**: 5582-5592.
- Thudichum J L W** (1884) A treatise on the chemical constitution of brain. Bailliere, Tindall, and Cox, London S. 149.
- Uemura S, Kihara A, Inokuchi J-I, Igarashi Y** (2003) Csg1p and newly identified Csh1p function in mannosylinositol phosphorylceramide synthesis by interacting with Csg2p. *J Biol Chem* **278**: 45049-45055.

- Urban-Grimal D, Pinson B, Chevallier J, Haguenaer-Tsapis R** (1995) Replacement of Lys by Glu in a transmembrane segment strongly impairs the function of the uracil permease from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **308**: 847-851.
- Vallée B und Riezman H** (2005) Lip1p: a novel subunit of acyl-CoA ceramide synthase. *EMBO J* **24**: 730-741.
- van Echten G und Sandhoff K** (1993) Ganglioside metabolism. Enzymology, topology, and regulation. *J Biol Chem* **268**: 5341-5344.
- Venkataraman K, Riebeling C, Bodennec J, Riezman H, Allegood J C, Sullards M C, Merrill A H Jr, Futerman A H** (2002) Upstream of growth and differentiation factor 1 (*uog1*), a mammalian homolog of the yeast longevity assurance gene 1 (*LAG1*), regulates N-stearoyl-sphinganine (C18-(dihydro)ceramide) synthesis in a fumonisin B₁-independent manner in mammalian cells. *J Biol Chem* **277**: 35642-35649.
- Warnecke D und Heinz E** (2003) Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cell Mol Life Sci* **60**: 919-941.
- Wells G B, Dickson R C, Lester R L** (1996) Isolation and composition of inositolphosphorylceramide-type sphingolipids of hyphal forms of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **178**: 6223-6226.
- Wertz P W und Downing D T** (1989) Ceramidase activity in porcine epidermis. *Biochim Biophys Acta* **1002**: 213-217.
- Wertz P W und Downing D T** (1990) Free sphingosine in human epidermis. *J Invest Dermatol* **94**: 159-161.
- Wertz P W und van den Bergh B** (1998) The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chem Phys Lipids* **91**: 85-96.
- Wickerham L J** (1951) Taxonomy of yeasts. 1. Techniques of classification. 2. A classification of the genus *Hansenula*. U.S. Dept Agr Tech Bull **1029**: 56pp.

- Wickerham L J und Burton K A** (1962) Phylogeny and biochemistry of the genus *Hansenula*. *Bacteriol Rev* **26**: 382-397.
- Wickerham L J und Stodola F H** (1960) Formation of extracellular sphingolipids by microorganisms. *J Bacteriol* **80**: 484-491.
- Winter E und Ponting C P** (2002) *TRAM*, *LAG1* and *CLN8*: members of a novel family of lipid-sensing domains? *Trends Biochem Sci* **27**: 381-383.
- Wu K, Marks D L, Watanabe R, Paul P, Rajan N, Pagano R E** (1999) Histidine-193 of rat glucosylceramide synthase resides in a UDP-glucose- and inhibitor (D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholinopropan-1-ol)-binding region: a biochemical and mutational study. *Biochem J* **341**: 395-400.
- Wu W I, McDonough V M, Nickels J T Jr, Ko J, Fischl A S, Vales T R, Merrill A H Jr, Carman G M** (1995) Regulation of lipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by fumonisin B₁. *J Biol Chem* **270**: 13171-13178.
- Yaoita Y, Kohata R, Kakuda R, Machida K, Kikuchi M** (2002) Ceramide constituents from five mushrooms. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **50**: 681-684.
- Yilmaz E und Borchert H H** (2006) Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema - an *in vivo* study. *Int J Pharm* **307**: 232-238.
- Yoshimura Y, Okino N, Tani M, Iida H, Ito M** (2002) Molecular cloning and characterization of a secretory neutral ceramidase of *Drosophila melanogaster*. *J Biochem* **132**: 229-236.
- Yoshimura Y, Tani M, Okino N, Iida H, Ito M** (2004) Molecular cloning and functional analysis of zebrafish neutral ceramidase. *J Biol Chem* **279**: 44012-44022.
- Zanolari B, Friant S, Funato K, Sütterlin C, Stevenson B J, Riezman H** (2000) Sphingoid base synthesis requirement for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **19**: 2824-2833.

Zhao C, Beeler T, Dunn T (1994) Suppressors of the Ca²⁺-sensitive yeast mutant (*csg2*) identify genes involved in sphingolipid biosynthesis. *J Biol Chem* **269**: 21480-21488.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5FOA	<i>"5-fluoroorotic acid"</i>
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAI	<i>"codon adaptation index"</i>
CoA	Coenzym A
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	<i>"downstream"</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS/MS	<i>"electrospray ionisation tandem mass spectrometry"</i>
Fa.	Firma
g	Gramm
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HPLC	<i>"high pressure (performance) liquid chromatography"</i>
IPC	Inositol-Phosphorylceramid
IS	<i>"intergenic spacer"</i>
kbp	Kilobasenpaar
L	Liter
LCB	<i>"long chain base"</i>
LCBP	<i>"long chain base phosphate"</i>
M	molar
mg	Milligramm
MIC	<i>"minimal inhibitory concentration"</i>
min	Minuten
M(IP) ₂ C	Mannosyl-Di-Inositol-Phosphorylceramid
MIPC	Mannosyl-Inositol-Phosphorylceramid
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mM	Millimolar
MSA	" <i>multiple sequence alignment</i> "
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NTC	" <i>no template control</i> "
OD	Optische Dichte
OPA	<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd
ORF	" <i>open reading frame</i> "
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>pI</i>	isoelektrischer Punkt
PS	Phytosphingosin
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
rDNA	ribosomale DNA
RP-HPLC	" <i>reversed phase HPLC</i> "
rpm	" <i>rounds per minute</i> "
s	Sekunden
SA	Sphinganin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
s.o.	siehe oben
SO	Sphingosin
Syr-E	Syringomycin E
Tab.	Tabelle
TAPS	Tetraacetylphytosphingosin
TriASa	Triacetylsphinganin
TriASo	Triacetylsphingosin
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
u.a.	unter anderem

UDP	Uridindiphosphat
UE	Untereinheit
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
us	" <i>upstream</i> "
usw.	und so weiter
u. U.	unter Umständen
VLCFA	" <i>very long chain fatty acid</i> "
WT	Wildtyp
YNB	" <i>yeast nitrogen base</i> "
YPD	" <i>yeast extract, peptone, dextrose</i> "
z.B.	zum Beispiel

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Ödipus und das Rätsel der Sphinx.....	- 2 -
Abbildung 2:	Sphingoidbasen und Sphingolipide	- 3 -
Abbildung 3:	Die Komplexität der Sphingolipide.....	- 3 -
Abbildung 4:	Struktur der drei Klassen von Sphingolipiden in Hefen	- 4 -
Abbildung 5:	Sphingolipid-Biosynthese- und Abbau-Wege in <i>S. cerevisiae</i>	- 5 -
Abbildung 6:	Die Bildung von Inositolphosphoceramiden in <i>S. cerevisiae</i>	- 7 -
Abbildung 7:	Import, Phosphorylierung, Dephosphorylierung und Abbau von Sphinganin und Phytosphingosin in <i>S. cerevisiae</i>	- 9 -
Abbildung 8:	Modifikationen der Sphingoidbasen nach der Desaturierung von Sphinganin in Dihydroceramid zu Sphingosin in Ceramid....	- 11 -
Abbildung 9:	Vergleich der Sphingolipid-Biosynthesewege von <i>S. cerevisiae</i> und Tieren	- 14 -
Abbildung 10:	Modell der Organisation von "lipid rafts"	- 16 -
Abbildung 11:	Querschnitt durch die menschliche Haut von der Basalmembran zur äußersten Hautschicht, dem <i>Stratum</i> <i>corneum</i>	- 19 -
Abbildung 12:	Zusammensetzung des <i>Stratum corneum</i>	- 20 -
Abbildung 13:	Struktur der häufigsten Ceramid-Spezies des <i>Stratum</i> <i>corneum</i>	- 21 -
Abbildung 14:	Phylogenetischer Baum des <i>Pichia anomala</i> -Zweiges.....	- 25 -
Abbildung 15:	<i>P. ciferrii</i> produziert in flüssigem Nährmedium Tetraacetylphytosphingosin und Triacetylsphinganin aus	- 26 -
Abbildung 16:	MSA der Tsc10p aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>P. ciferrii</i>	- 65 -
Abbildung 17:	Vorhersage der Lokalisation von Transmembran-Helices des Lip1p von <i>P. ciferrii</i>	- 68 -
Abbildung 18:	Vorhersage der Lokalisation von Transmembran-Helices des Yxc1p von <i>P. ciferrii</i>	- 69 -
Abbildung 19:	Aminosäuresequenz des 8Desp aus <i>P. ciferrii</i>	- 71 -
Abbildung 20:	Vergleich der AS-Sequenzen der beiden Ceramid- Glycosyltransferasen aus <i>Candida albicans</i> und <i>P. ciferrii</i>	- 73 -
Abbildung 21:	Charakterisierung der Phytoceramid-Fraktion in verschiedenen <i>P. ciferrii</i> -Stämmen.....	- 74 -
Abbildung 22:	Charakterisierung der Dihydroceramid-Fraktion in verschiedenen <i>P. ciferrii</i> -Stämmen.....	- 75 -
Abbildung 23:	Konzentration der Sphingoid-Basen Phytosphingosin (PS) und Sphinganin (SA) mit einer Kettenlänge von 18 (C18) bzw. 20 (C20) Kohlenstoffatomen im <i>S. cerevisiae</i> WT und im <i>syr2Δ</i> -Stamm.....	- 77 -
Abbildung 24:	Vergleich der Umsetzung von Dihydroceramid in Ceramid durch Überexpression verschiedener Dihydroceramid- Δ^4 - Desaturasen in dem Stamm CEN.PK2-1C <i>syr2::KILEU2</i>	- 78 -
Abbildung 25:	Vergleich der Dihydroceramid-Konzentrationen in <i>P. ciferrii</i> <i>syrE10 RE11</i> mit und ohne Überexpression des <i>DES1</i> -Gens mittels ESI-MS/MS	- 80 -
Abbildung 26:	Vergleich der Ceramid-Konzentrationen in <i>P. ciferrii</i> <i>syrE10 RE11</i> mit und ohne Überexpression des <i>DES1</i> -Gens mittels ESI-MS/MS	- 81 -

Abbildung 27:	Konzentration der Ceramide in TAPS- und TriASa-Produzenten ermittelt durch ESI-MS/MS-Analysen.....	- 83 -
Abbildung 28:	Konzentration der Ceramide mit Δ^4 - Δ^8 -Sphingadienin als Sphingoidbase in TAPS- und SA-Produzenten ermittelt durch ESI-MS/MS-Analysen.....	- 84 -
Abbildung 29:	Wachstum von COS22A und COS22A p-mCER-nat1-SYR2	- 95 -
Abbildung 30:	Übersicht zu den in dieser Arbeit erzeugten <i>P. ciferrii</i> syrE10 RE11-Derivaten, in denen wenigstens eines der Sphingosin-Biosynthesegene überexprimiert wurde	- 97 -
Abbildung 31:	CAI verschiedener Gene bei Expression in <i>P. ciferrii</i> bzw. <i>S. cerevisiae</i>	- 101 -
Abbildung 32:	Einfluss der Überexpression der codon-optimierten Form des für die alkalische Ceramidase aus der Maus kodierenden Gens in <i>P. ciferrii</i> auf die Biosynthese von Sphingosin	- 104 -
Abbildung 33:	Einfluss der Resistenz von <i>P. ciferrii</i> syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 x p-mCER-nat1 Klon7 gegenüber Nourseothricin auf die TriASo-Produktion	- 106 -
Abbildung 34:	Einfluss verschiedener Ceramid-Synthasen auf die Produktion von TriASo durch <i>P. ciferrii</i> syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 x p-mCER-nat1	- 109 -
Abbildung 35:	Einfluss verschiedener alkalischer Ceramidasen auf die Produktion von TriASo durch <i>P. ciferrii</i> syrE10 RE11 x pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 x p-nat1-oCVLAG1.....	- 111 -
Abbildung 36:	WT-Transformanten im Vergleich.....	- 113 -
Abbildung 37:	Die Bifunktionalität der Dihydroceramid- Δ^4 -Desaturase	- 120 -
Abbildung 38:	Veränderungen in der Genomstruktur von Hemiascomyzeten..	- 127 -
Abbildung 39:	Schema der Sphingolipid-Biosynthese in <i>P. ciferrii</i>	- 131 -
Abbildung 40:	Verbesserung der TriASo-Konzentration im Zuge der rationalen Stammentwicklung in <i>P. ciferrii</i> syrE10 RE11.....	- 139 -
Abbildung 41:	Einfluss erhöhter Resistenz gegenüber Nourseothricin auf den Anteil von C18-Sphingosin an den insgesamt gebildeten Sphingoidbasen.....	- 144 -
Abbildung 42:	Sequenz des <i>LCB1</i> -Gens aus <i>P. ciferrii</i> inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz.	- 185 -
Abbildung 43:	Sequenz des <i>TSC10</i> -Gens aus <i>P. ciferrii</i> inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz.	- 186 -
Abbildung 44:	Sequenz des <i>LAG1</i> -Gens aus <i>P. ciferrii</i> inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz	- 187 -
Abbildung 45:	Sequenz des <i>LAF1</i> -Gens aus <i>P. ciferrii</i> inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz	- 188 -
Abbildung 46:	Sequenz des <i>LIP1</i> -Gens aus <i>P. ciferrii</i> inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz.	- 188 -
Abbildung 47:	Partielle Sequenz des <i>PDA1</i> -Gens aus <i>P. ciferrii</i> inklusive Promotor-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz.	- 189 -
Abbildung 48:	Partielle Sequenz des <i>ACT1</i> -Gens aus <i>P. ciferrii</i> inklusive der abgeleiteten Protein-Sequenz.	- 189 -
Abbildung 49:	Sequenz des <i>YXC1</i> -Gens aus <i>P. ciferrii</i> inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz	- 190 -
Abbildung 50:	Sequenz des <i>8DES</i> -Gens aus <i>P. ciferrii</i> inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz.	- 191 -

Abbildung 51:	Sequenz des <i>GCS1</i> -Gens aus <i>P. ciferrii</i> inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz.	192 -
Abbildung 52:	MSA der Syr2p-Sequenzen verschiedener Hefen.....	194 -
Abbildung 53:	Sequenz des <i>URA3</i> -Gens aus <i>P. ciferrii</i> inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz	194 -
Abbildung 54:	MSA der Ura3p-Sequenzen verschiedener Hefen	195 -
Abbildung 55:	Sequenz des <i>LYS2</i> -Gens aus <i>P. ciferrii</i> inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz.	197 -
Abbildung 56:	Sequenz des codon-optimierten <i>nat1</i> -Gens.	198 -
Abbildung 57:	Sequenz der codon-optimierten alkalischen Ceramidase aus Maus.	198 -
Abbildung 58:	Sequenz der codon-optimierten Ceramid-Synthase (<i>omLASS1</i>) aus Maus.	198 -
Abbildung 59:	Sequenz der codon-optimierten Ceramid-Synthase (<i>omLASS2</i>) aus Maus.	199 -
Abbildung 60:	Sequenz der codon-optimierten Ceramid-Synthase (<i>omLASS4</i>) aus Maus.	200 -
Abbildung 61:	Sequenz der codon-optimierten Ceramid-Synthase (<i>omLASS5</i>) aus Maus.	200 -
Abbildung 62:	Sequenz der codon-optimierten Ceramid-Synthase (<i>omLASS6</i>) aus Maus.	201 -
Abbildung 63:	Sequenz der codon-optimierten Ceramid-Synthase (<i>oAgLAG1</i>) aus <i>Ashbya gossypii</i>	201 -
Abbildung 64:	Sequenz der codon-optimierten Ceramid-Synthase (<i>oAgLAF1</i>) aus <i>Ashbya gossypii</i>	202 -
Abbildung 65:	Sequenz der codon-optimierten Ceramid-Synthase (<i>oCvLAG1</i>) aus <i>Coccolithovirus</i>	202 -
Abbildung 66:	Vektor pDB005.....	212 -
Abbildung 67:	Vektor pDB003.....	212 -
Abbildung 68:	Vektor pDB004.1	213 -
Abbildung 69:	Vektor pDB007.....	213 -
Abbildung 70:	Vektor pDB006.....	214 -
Abbildung 71:	Vektor pDB008.....	215 -
Abbildung 72:	Vektor pDB010.....	216 -
Abbildung 73:	Vektor pDB011.....	216 -
Abbildung 74:	Vektor pDB012.....	217 -
Abbildung 75:	Vektor p-mCER-nat1-SYR2	217 -
Abbildung 76:	Vektor p-mCER-nat1	218 -
Abbildung 77:	Vektor pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1.....	219 -
Abbildung 78:	Vektor p-mCER-nat1-omLASS1	219 -
Abbildung 79:	Vektor p-mCER-nat1-omLASS2.....	220 -
Abbildung 80:	Vektor p-mCER-nat1-omLASS4.....	221 -
Abbildung 81:	Vektor p-mCER-nat1-omLASS5.....	222 -
Abbildung 82:	Vektor p-mCER-nat1-omLASS6.....	222 -
Abbildung 83:	Vektor p-mCER-nat1-PcLAG1.....	223 -
Abbildung 84:	Vektor p-mCER-nat1-PcLAF1	224 -
Abbildung 85:	Vektor p-mCER-nat1-oAgLAG1	224 -
Abbildung 86:	Vektor p-mCER-nat1-oAgLAF1	225 -
Abbildung 87:	Vektor p-mCER-nat1-oCvLAG1	226 -
Abbildung 88:	Vektor pPcYXC1-nat1-oCvLAG1	226 -

Abbildung 89: Vektor pDB006-PcDES1	- 227 -
Abbildung 90: Vektor p-nat1	- 228 -

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Zusammensetzung der von <i>P. ciferrii</i> sekretierten Sphingoidbasen.....	- 27 -
Tabelle 2:	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) Stämme	- 31 -
Tabelle 3:	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Hefe-Stämme	- 31 -
Tabelle 4:	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide.....	- 34 -
Tabelle 5:	Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide.....	- 35 -
Tabelle 6:	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.....	- 37 -
Tabelle 7:	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien.....	- 49 -
Tabelle 8:	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Geräte	- 53 -
Tabelle 9:	Übersicht über die Codon-Verwendung in <i>P. ciferrii</i>	- 99 -
Tabelle 10:	Übersicht über die getesteten Ceramid-Synthasen	- 108 -
Tabelle 11:	Charakteristika der Cerebroside von Pilzen	- 124 -
Tabelle 12:	Übersicht über in Pilzen nachgewiesene Inositolphosphoceramide.....	- 125 -
Tabelle 13:	Übersicht über die Codon-Verwendung in <i>P. ciferrii</i> -eigenen Genen	- 149 -
Tabelle 14:	qRT-PCR zum Nachweis der erhöhten mRNA-Spiegel des <i>DES1</i> -Gens unter Kontrolle des <i>PDA1</i> -Promotors.	- 204 -
Tabelle 15:	qRT-PCR zum Vergleich der mRNA-Spiegel der Gene <i>LCB1</i> , <i>LCB2</i> , <i>TSC10</i> und <i>SYR2</i> des WT's und des Stammes COS22A ..	- 205 -
Tabelle 16:	qRT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Spiegel des <i>SYR2</i> -Gens in verschiedenen Syringomycin-E resistenten SA-produzierenden <i>P. ciferrii</i> -Stämmen.	- 206 -
Tabelle 17:	qRT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Spiegel des <i>URA3</i> -Gens in den vom WT abgeleiteten Uracil-auxotrophen <i>P. ciferrii</i> Mutanten.	- 208 -
Tabelle 18:	qRT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Spiegel des <i>LYS2</i> -Gens der Lysin-auxotrophen <i>P. ciferrii</i> -Stämme.	- 210 -

11 ANHANG

11.1 DNA- und Proteinsequenzen

```

1   accttttcat caatttttat tacattagca cctgggtgcaa catctttttgt ttcacttttt ggaccattaa caatatattt aaaaatttca
91  cttggagaat caccttggtg atttctataa ttaattaatc tactaatttg ataaccagca gtaccagaaa gaaaaaatt tacacttgct
181 aataaataat tttttggttt aataacaaat gaccatcttg tccatataac accagttgct aataatgata aatttttggt acctgaaact
271 ttttcaattg gtcctattaat atcagaaaata ccagcaacga ctaatgacca ttttaagaca ggggacctatt atgttagta ttgtactata
361 ttatatatat tataaacaat ggtgatttaa tgggtatgat ttttatotta totttcatct cttatagttt ccctatacta tagaaaaaaa
451 aatcaaatc tttttggatc caattgatag atataataatg aaaaataatta acatacccaa aaatgcacag tctttggacc tgtttctgaa
541 ttcaagaatc taataaaagc tgaagacatg ttgtgttata taattgatat taattgtagt atattagttg tattttgtgt ttacaattac
631 tttaatgtaa ttgaataaaa ttaattcaa atcgattcat ccaactggac tgctacactc caaatatggt gggggatatt agctagggag
721 gacttaggca gggctctgtc taagtactct gcctaagttg taactgtggt tcaactgaact ctgctcactg aacggtaaat tcaacaatc
811 acaatgttga cttcccaatg tggtaacaaat gaatgatttt tattttgtatt gtaatatcac atgtagcaga acgtgacttt tcccttgtt
901 taaattcca ttttttttta tttttttatt tttctcaatt ttaattttt aggggaacaa acaaatgta gaacaaacaa acaaaaacaa
991 aaactttgat gaaattttgac agggatataca agtaatttca actttgttca atgtttttta gttttggaaa tatactttca aatttaaatc
1081 attggaattg ttaatttttg attcttgggt atcaattaga tttagtttca tcagttggta ttggaataac tcattgcoat tttgagtata
1171 tttagcaaaa ttggtatttg acgtgtttct tctattacga aaatttacct ttgttcaaac aagcaaaatt tcaactgtga aagtaacaaa
1261 tacaacaaaca atttcaacaa aataaattca tatcaaaagag atttaaagat caagataaaa gatcttataa aacattgtta tattccatta
1351 catttgattt gtttttttat tcaactactca tcaactcacc          m n v t a t t i t t s t t t i

1441 attacaagat atttggaata caactttctga tgttgtttct cgttattttat tcattatatt aaattatatt gaattaatac ctgggtggttc
a l q d i w n t t s d v v s r y l f i i l n y i e l i p g g

1531 aattttagtt cgttatataa aatctttctca taaaatgat ccaattagaa ctttatttga aattgcttta tttatttttg caattagata
s i l v r y i k s s h k n d p i r t l f e i a l f i f a i r

1621 ttttactaca gcaaaaatg aaagatctaa aaaagatcat attaaattga aaaattctga aattgatgaa ttaattgatg attggatgcc
y f t t a k y e r s k k d h i k l k n s e i d e l i d d w m

1711 ggaaccttta gttttggata ttagtccaaa ggaacaatg caattaaatt caattccaat tgttaaagggt ccaatagata ctaaagttaa
p e p l v l d i s p k e q w q l n s i p i v k g p i d t k v

1801 cctagttggt gaagaagggt actttttaaa tttgtcttct tcaaattttt taaatttttg tattaatcca atgttataaa atgaatgtaa
n l v g e e g d f l n f a s s n f l n f g i n p i v k n e c

1891 aaaaattatt catagtaatg gtgttgggtg ttgttggcca ccaaattttt atggtaatca agatattcat attaaattag aaaatgattt
k k i i h s n g v g a c g p p n f y g n q d i h i k l e n d

1981 agcaaaaatt ttogaagggt gtgttgggtg attatattgt caagattttt gtaactgcagg ttcagtttta ccaagttttt taaaaagagg
l a k f f e v g g a v l y g q d f c t a g s v l p s f l k r

2071 tgattttggt attgctgatg cttcatcaaa tgttgcaatt caaaaagctt tacaattatc aagatgtgaa atttattggt ttaatcataa
g d f v i a d a s s n v a i q k a l q l s r c e i y w f n h

2161 tgatttggat catttagaag aaatttttaa tgatttcaaa aaaaattttt ttaaatttga aaaaccaatt tcaagaaaat ttattgttac
n d l d h l e e i l i d l q k n i f k f e k p i s r k f i v

2251 tgaaggtatt tttgcaaaat aaggtgattc accatattta ccaagattaa ttgaattaa gaaaaaattt aaatttagat tatttttggg
t e g i f a n k g d s p y l p r l i e l k k k f k f r l f l

2341 tgaatcttta tctttaggtg ttttaggtaa atctggtaaa ggtttagctg aacattataa tattaaaaga tcagaaattg atgtaactat
d e s l s l g v l g k s g k g l a e h y n i k r s e i d v t

2431 aagttcaatg gctaattcat tctcttcttc aggtgctttt tgtattgggt ataaagttat gacttatcat caaagaattg gttcaatggc
i s s m a n s f s s s g a f c i g d k v m t y h q r i g s m

2521 ttattgtttt agtgcttcat tacctgctta tgttgcaaga gctacatcag ttgcattaag attattaact gatttcaag attcccaggg
a y c f s a s l p a y v a r a t s v a l r l l t d s q d s q

2611 tgaatcatca attgtaaaaa aattacaatc aaataattat caattattta atttatttaa taaagataga aaattaagta aatatttaaa
g e s s i v k k l q s n n y q l f n l f n k d r k l s k y l

2701 aattatatca aatgaaattt caccaatttt acattttgaa attaatctag atttaagaaa acttttaaat ttccaatta gttatacagg
k i i s n e i s p i l h f e i n s d l r k l l n f p i s y t

2791 taaaggatca gaaattgaa ataaaaataa aaaaggaatt tctgataaat ttgttgaatc atttaattat gaaaatttaa tttttcaaaa
g k g s e i e y k n k k g i s d k f v e s f n y e n l i f q

2881 aattataaat ttatccaaga aacaaggat ttaataaca agatcaattt ttacaattga acaagaagct ctgctctga ttccaattt
k i i n l s k k q g i l i t r s i f t i e q e a l p l i p n

2971 aaaaattcat tcaaatgttg attttactaa ggatgaaatt gaaaaagttt ataaaattgt ttccaagta attttagatg tttttgaaaa
l k i h s n v d f t k d e i e k v y k i v s k v i l d v f e

3061 ttaactggtt gaatcattat cattattaac tgaagaagtt atttaacaaa aagtgctata aggaataaag aaattacata tgctttgatg
n l t v e s l s l l t e e v i -

3151 taatttggat aataataata tcaatttgaat ctaataaagt atttaatagc catttataat aataatata aatcataatt aatttaataa
3241 gcctgttga gtgagatatt gtatatagac tttatcgat cagaacataa catcaataga taagagtacg taccttatat aaatctagat
3331 ccatccccgg attaaatata tatagtatat atacagttaa aaggttgggg actaatcact atatatacac atagtagatt gtgactcttg

```

```

3421 tcattagact aaccaactat tttaaacatg gctatataca aatcaacaag aaaataaat atcaaatatg tttgttaggt ctctggtttt
3511 aggtacatta atcaaaghta aattactggt ctaaacttga cttgacagct ttaagttgaa tcagccctga gcctgctggc ttagtttttg
3601 ttgattgttg atccttaagtc ccatgttttt gatatacatt gagcctaggc cctttaaaaa cgccaaaaaa attataaatt ttataacaa
3691 taatgcaaaa gtctctatcg tagtctcata gtctcatagt ctctggcctg gcagtgccat gatttttgag agaagtttaa acttttacaa
3781 aggggatgat ttaattttta tcattttaaag ataaatgaaa ataactttta ttttatattt aaattattct catatattca actctttgat
3871 tatcaaghta cattattctt ctcaagtttg atcattcgct ttctttaaggt atttatatta cacgcagctg atactagtct ttoacttaac
3961 aacgcagtac ggattatata atacagctgg agtaaagaaa ttattagtac tacaagttta ttgggccata actagggtat aaaacttatc
4051 cgttataaag tttgttttaa aattgtttta aattatatta taatagaatt tattagttaa aaaaagggat tatttagaaa agattcaaac
4141 gcttcacaag gttctggagg ttctggaggt gcaaaagttc aacttacaaa agatgatgaa cgtaattata aggtccgtac cggttctggt
4231 catga

```

Abbildung 42: Sequenz des *LCB1*-Gens aus *P. ciferrii* inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz.

```

1 ggatccaatt ttctaattga attctttgaa tactagtgc aagatatttt ggataagttt taaaaaacac ttgtttttca ataatttcat
91 ttccattttt ggaatttttc cattcaattt cttcagggtg taatatgtga attaatgaat ctatgaaatc ttgacgttta taatgttttt
181 taccatcttc aatataatct aattctgtaa ttgtttgtaa tgtaaaatt tcattaattt gggttttcaa tttaaattta ttatttggga
271 atttttaatt ttccaactgaa acaaaatttaa aaatatcatt taattcaggt tcaattgaaat caattttatc aattaaataa ttccaaaatt
361 cataagcadc ttgtgtcttc attgaaactaa attcttcact attttgacca atcaaaattt taaaagaagt ttggtgaata ccaatttgat
451 aaccatcaga acttggtttt gaaaaatcac cagattgcaa accttttagt aatttgggta attgaaatga taaatcatct ttttcattaa
541 atgattctaa tgatttagat gcaaaattttt gttgatattc ttggaagggaa aataatgatt gaacaacaga tgataaataa catgaattac
631 ctaaaattttt caaacctggt aattctggac cataaacact ttgtaatttt tcacctttat cattttccat attaaattcc catctcaggt
721 ttgttctaa ttgtaattca acaagtgatt ttccagctct gacaaaatta ttaaatcaa taccaaaagt ttcaaaattt tcaactaatc
811 cagggaaatt aatttcatca ttacatgcat aacaataaac atcagtgata tcttttgata atgaacctaa ttaacagca attggatgat
901 ttgcagtttc ataattgtgt aaagcatgag tattaccagc aacaccacca aattgagcac gtccacaacc taatttccca catgttaaac
991 atatccataa gttttctttt aattccactt caccacattg ttgtaagctc aatgttgaat ttggggatg tttaaattca attgtatggt
1081 cacatggtaa aatttctgtt tgccatggtt tcaattcttc ctttttggtt atagaatcgg agtttataat tttatcaata gtggctaaag
1171 tatctgaatt caaatcaaca ataacatctt ttgtgttacc attgaaactg aacaattcag tattgatatc atataaatct tgttctcttt
1261 cttgtttgat ttctaatttg atgattttat ttggtgtttc ctctctttct tccaatggtt tacttaattt taaataaatt gtgtcaattg
1351 aatcatgttg ataattgtaat tgaagatgct catcacataa agctctgttt gaaactgtac taatattgat tccctctggg tcgaacgggtg
1441 ctttgaacaa aaagaagcac tggctctttg caattggctg tctctgaatg gaaatcaaac tcaatctttt ttggtggttt ttgtgtgttt
1531 tgttttggtg attgtttggt tcttgccaact ttaatttgat tttttttagc gatctcgaga aacttcaatg aaaaagtgc ttaactatgg
1621 gaaatacaag aacaggaaca aaaagacaca caaaacaag agattcaaa gatttaattg tcaattgaa atgtctcttat catcaccaaa
1711 agattatata accaattact aggtctgccc tcaatttacc ctgtattttg tcaatcaatt agatctctgc tgacataatc gcagatatac
1801 aattccaatc aaacaaggggt agaaatcctt ctttttttaa aacatttttc tcaattcaac agaattcaag gacaataagg ggatagtggg
m w

1891 tttactaaag gtcattttca tgtaaacgac aaattagcaa tcaattctg tggttctcaa ggtgttggtg ctgaatttgc aaaacaatta
f t k g h f d v k h k l a i i s g g s q g v g a e f a k q l

1981 gttgaaaaag gttcagatgt tattatagtt tcaagaactg aatcaaaatt aaaaaagtt gttgaacaaa tttcaaaatt tagattagag
v e k g s d v i i v s r t e s k l k k v v e q i s k f r l e

2071 aaaaatcaaaa ttgtttctta tatagttgct gatattttca attatgaaga agctgaaaaa gtttttgcaa aattagatca atcacctgat
k f q i v s y i v a d i s n y e e a e k v f a k l d q s p d

2161 attgttggtt gttgtgctgg ttcatctgta ccaaaattat tcttagattt atctccaaat gaattaaata atggatttac aacaaattat
i v v c c a g s s v p k l f l d l s p n e l n n g i t t n y

2251 aatactgcag ttaattttgc tcatgctgca atgaaaaaaa tgtcactaga aaaatcaaca gatccaagac atttaattat tttcagttca
n t a v n f a h a a m k k m s l e k s t d p r h l i f f s s

2341 gttgtggcat ttttccatt tattggttat ggccaatag cacctttaa agctgcagtt cgtgccctag ctgatgtct gagacaagaa
v v a f f p f i g y g q y a p l k a a v r a l a d v l r q e

2431 gctatacctt ataacattag ggtatcaagt gttttccctg gtaattttga ttctgaagga tttttggaag aaaataaaac aaaactgaa
a i p y n i r v s s v f p g n f d s e g f l e e n k t k p e

2521 attactaaaa aaattgaagg tccctcttat ccaattagtg ttgaaaactg tgcaaaaatt attattgatt ctttagatcg ttggtatgaa
i t k k i e g p s y p i s v e t c a k i i i d s l d r g y e

2611 actataacta cagattttat ttggttgggt ttaacttcaa tttcttttag tttaagtcca agatcttggg gggttttaca agctataaatt
t i t t d f i g w v l t s i s l g l s p r s w g v l q a i i

2701 ggatttgtca ttgcattgat tgctctata atatcatggt cttttaaactg tgatattaga aatcatttta aaaatgaaca aaatacaatt
g f v i a l i a p i i s w s f n r d i r n h f k n e q n t i

2791 agaaaactgag atcattttgt actctgtata ttacaatata tttatgctgc ctttttgat atgtgtactt otaaaacat ctattttgaa
r n -

2881 tcaatccctt tttccactct tgaactaa tcagaaccaa tcttatcaac attaattgaa taaattgac taacacttga taatatttgt
2971 tcattccata aatctgcaat ggtttgcttt atacttggct tatattgata ttcaaacact cttggaatag gtaattggtt tttccctgga
3061 ttctgtataa tagctcagat atctcttaat gccttagaga catattgctg tgatttttta aattcttgg atgtataata aactattgat
3151 gttgttaata aaacaccttt tgatattggt agtaaataac tcttataaat caacttttgg agtgcaaaaa acttggaaata actggacat
3241 aactgctaag aaccogtga ttctgttacc catgtgtgct ctatgtgatt ataccataa ttaactagtt atcaacctat ctcaatacaa
3331 tcttctata aattctagtg tgaatatctt aactttttaa tttcttttaa ttcgacaaa atcaaaattc cggaaactga aaattgggtg
3421 ttgggttttt ttctctogag gattttttca actattggaa aattttaaatt taatatcatg aaagtattga ataggttata aaccacaggt
3511 tgattgatta cgttggttat attggatcc

```

Abbildung 43: Sequenz des *TSC10*-Gens aus *P. ciferrii* inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz.

```

1   ccaccttaatt cagggtttaat tataatagtt tcttgatata atttttgaaa ttcatttggat gataacaagt catcttgacc ttgattctgg
91  gtttaataaag ttaataaattt ttcaaccttt cttgattgat ttaataattaa agtttctttt tcaacttcta attttaattc ttcaggagtt
181 ggatcatata atggagttac ataattaaaa ggaataaac caatttctcc acgtaatgaa cctttccccc aatctttata aacacgatct
271 aataactgtaa ttatatcacc tttacggaaa tgtaaaatctg cagggatcttg actaaatgaa tcoatatagag cacgggacct agagaatgaa
361 ggttgtgctt ttgagattgg tggagggtgt tgaactggag cttgtgtgtg ttgttgctgt ttgttgctgt gttgttggtt aatattctgt
451 tgaagttgaa ttgaagcttg attattttca cttagggata atgcaatagc agctttcaaa tcttctctt tcttctctt atcatatct
541 aaatttctct tttagggttt atcaggaggg aaatattgtg aataaaaact ttccacctcg ttattagcat cttggatagg tctcagtgaa
631 ggatcatttg caaatgaatc agataattgt ttgataactt ggacaactct gattttaatt tcoctatgta ctgtgggttc tcttaactta
721 ttcaacaata ttgaagtgaa tcocttagtg gcaatttctt gtttaactct tgaaccacaa ttctcagcaa tCGAAGTGA taaacttagt
811 gatctcaatt gaacattagc atctctttga cccaaccttg tggaaaacaa ttgaataact tGTTTGAAC cttcttcogg ttcttaccac
901 accaagtCAC aaacatcaag aataaactgc caattgtcog ccaacaactg cgcacocgtt gccttctcca ctgcgttctt caactgttca
991 ctataatctc tgaccatgat atcctgttga gcttctgtct aatctctgtc tagcttccct ttggcttccc ttggctccc ttcaactccc
1081 tttaaattta aatcaacgcc tcttttttaa acacgtaaaa gaattcgcga attttaacgg tttcggtttt ttttcaataa ggggaaattt
1171 aaaatttaaa tgaaaacatc aacaaaatga ttttaagtac tttagactat cattggtttt aattgattgt tCAGCTGGTt attgtctca
1261 atgtccactt ccagaccaca gttcaacctg cgcagaactt cttctgtcgg caaaactgac ttgggtgata caagagtacg ttcaattctca
      m s t s r p q f n r r r t s s v g k i d l g d t r v r s f s

1351 acttcacgta cttcacatca aagaatgct tcagattcaa gagttaaata attatcaaat tattccaaga ctgatttaga aattataaca
      t s r t s h q r n a s d s r v n e l s n y s k t d l e i i t

1441 aaaattaaaa ctggcttagt tgaattaaat tatcgtcaca catgggcttt acctgctttg atcttggttaa ttgtttatc tgcttatttc
      k i k t g l v e l s y r h t w a l p a l i l l i v y t a y f

1531 acttcaggta attatacaga atcaaatttt ttacacatgt ttgtatcaat atcatatcaa atccctggta caaatcaata tgataaagg
      t s g n y t e s n f l h m f v s i s y q i p g t n q y d k g

1621 attaaagatt tagcatttgt gctattttat atgatttttt tcaacttttt cagagaattt tgtagggaag ttatattacg tcccttgca
      i k d l a f v l f y m i f f t f f r e f c m e v i l r p l a

1711 ccaattgttg gtgttaaaaa accttctaaa atcaagagat ttatggaaca atcttattct gttatttatt ctggtttatc aggtcctttt
      p i v g v k k p s k i k r f m e q s y s v i y s g l s g p f

1801 ggtctttatg ttatgtatgg aactgattta tggttattta gaactgatac tatgtatgca acatatccag atttaacaaa tgattacttg
      g l y v m y g t d l w l f r t d t m y a t y p d l t n d y l

1891 tacaaattat tttatttagg tcaagctgca ttttgggtgc aacaatctgt tatcttgata ttacaagttg aaaaaccaag aaaagatttc
      y k l f y l g q a a f w c q q s v i l i l q v e k p r k d f

1981 aaagaattag tcttgcatca tattgttaca attttaata tttggttata atatgttttc catttcacca aaatgggatt agcaatttat
      k e l v l h h i v t i l m i w l s y v f h f t k m g l a i y

2071 attacaatgg atgtttcaga ttttttctct gcagtttcca agaatttaaa ttatttagat tctcogttaa caatgccttg gttttactct
      i t m d v s d f f l a v s k n l n y l d s p l t m p w f i l

2161 tttgttatat catggattta tttacgtcat tatattaatt taaaaatttt atggtcagtt ttaacagaat ttagaacagt gggagatttt
      f v i s w i y l r h y i n l k i l w s v l t e f r t v g d f

2251 aaattaaatt ttgcaactca acaatataaa tgttggattt cattaccaat tgtatttga ttaattggtg ctttacaatt attaaatatg
      k l n f a t q q y k c w i s l p i v f v l i g a l q l l n m

2341 tattggttat tcttaatttt aagaattctt tatagattta tctttggtag tgggtgttgg gaagatgac gtagtatga tgaagtgaa
      y w l f l i l r i l y r f i f g t g v v e d d r s d d e s e

2431 gatagtgaag atgttcaatt agaaaatgat ggtgaagaat tatctaaaaa tcaatcaatt caatcaccac cagaatttac aattgaattt
      d s e d v q l e n d g e e l s k n q s i q s p p e i t i e f

2521 aaatctgac aagaaaaaaa gagtgaataa gtcatcaact cataaaatca atttattgca tacaacatat tctcataatc atatatocca
      k s d q e k k s e -

2611 catataaaaa aaaacaaaa taaatcacat aaacacacat aaaaacatat atatatcagc taattttttt ccatTTTTTT gttcaacttg
2701 tcttatagaa gtatatatct aattcaaaact taactttaat aataatttat aatataattg togttgtagt tcttctacat ggattatct
2791 gatgtacca tttatttttc tatttcaaaa acttatatga atgtataaag atatctaatt tgattcaatt tcttttgggt atttacctt
2881 ttgtttatct tttaatcttt tttcaaaact ttgttgattt tttttataat tttcaactctt attaatcagt tcttttgac ccatttctgc
2971 agctttttgat aaaaatccaa caattaaact tattgaaaga actgaaatcat cattacctgg aattggataa gtaacaagac ttgctctga
3061 atcagtatca attaatccaa ttgttggatt tcttgattgt atacttcat taaccaagac tctattttca gttgttatta aataacaac
3151 taaatcagg ttaacaatgg ctttttcttc atctgcattt aatgaacgat ttgttggaga atttaataaa tcaacttcat gacgtgacca
3241 agttgaaatt tctgtacaat ttgttatagt accaggaacc catcttggtg ccacgtaata accatttgat ctttttgac ctaattctaa
3331 aggtctctctt aaattttctc ttgtaccaac atacaagata ataccaacc gttctgaaac tcttcaata atcttggag cacgagtaa
3421 atagttaaa gtttgttcta aatcaataat atggattcct ttatatgaac caaggataaa tggttgattt gatgatctat ataatgaagt
3511 tgattgacct aaatgaacac ctgcagctaa taattttgaa attgaaacat ctttaatagt tgccggataa aaaacatcat gatgtggtaa
3601 ataaacattt ttaaatagg aacctaatgt atcaactttt gatttagatt gttgacgacg gttgacgacg taaatataat tcttgatttg
3691 tctcttgggt gaaggatata aatatgggaa atctttattt ggaccttttt gaacttgaac agattttctt ggtaaaaatt tatcataac
3781 taaatcatca aataattttt gtaattcaat ttttaatttt ttattttgtg ctaattttaga atttaattca ttgatgatc cattattaaa
3871 taaaatatac ataatttgyt gatcaatttt ttacagttct tcttttggaa ctttaacaaa acttgaatct tcaacaattt cttgattttg
3961 ggtgctgcg gctaaagttt gttcattaac tgggtgaatct tgaacaagtt gtggatttat tgtttgatct tttgttatag tatttaact
4051 ttttatacta gttgataat gacgaatggg cgcgtgggaa ttgtttaga ataaatcaata aagagtggaa ataagaatat actcacttag
4141 tcttcgactg aacatgctca tcttgtaaaa ataactcatt agttcttoac aagtcttctt tttctattt gaaactctct caatatttca
4231 ttttgtttat ttcaataatt ttcoaatttt tcoaatgggtt attaattttc gcgaatttct atgattttga ttttttttac ccggtgttg
4321 acttttcaaa taattaacta ctataaaaaga attgaaacat cacttggaaa agtggttatt ctgagtggtc tctgagtgat ctaagtggtc
4411 ttagtgggtg gttatgcagt tgtttactgg tctttttgac caatttggag acaaaatagt tggattacga gaactgtcaa

```



```

4501 atgtaaatatt gatcaagatt tatcaaatct tccaaatfff catagatcaa gtattgaata tctttataat tcgaaatttg ttgaagttat
4591 ttatattgat actagtccaga aattattagt ttatttggct aatcaagaat tagaacaatt gaatggtgaa attaatggta atttatttat
4681 ttgggattta ccatgtcttg atttaatttg ttcaaaatta tgtaaaatga ataataattg ttttaattgg tcatcaggta ataactctga
4771 attcttatca atgattgaaa aatggatcac atgaattgaa aatcaatfff tgaaccccca gaaaaagaat ttatttttat tttaaaatgc
4861 tattatacaa atatgatcta tactcaagtg aatttatttt tcttccatat taagatcaac aattttaatt tcagatgttt cattatcata
4951 at

```

Abbildung 44: Sequenz des *LAG1*-Gens aus *P. ciferrii* inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz. Die grau unterlegte TLC-Domäne wurde mittels des Prosite-Programms (<http://au.expasy.org/prosite/>) ermittelt.

```

1 gaagaatgtc cwcaacatat aagaactatt gtttcagaag caagaaatct ttggccagaa tatataccac atgatgcaac aaaagttgca
91 gaatttgaat tttattttaa tgaagaaatg gatacttatt taattgttca tcatccttat agatctttat tacttataaa tgaagtttta
181 tcaaatatta atcaatcaca taaatcagag ggtcataatc ataataataa tagcaataac aataatgaca cttcacaaac atttgcatca
271 tcaccagaag aattacaatc atgctggcca attataaatg atagttatgt tacagattta ctttaatc atgcaccaca tattatagca
361 tccagcttcaa tttttttaa ttagtacta aaatataatc atttaaaaca tatttccaaa gattcattaa agaattcaaa accaaaataca
451 atgataaactg aagaatatct taaaagtgga tttttaaaga attttatata atttttaggt tattcaaaata tagatctcgg aggtgttata
541 gaagctgttc aagaatattt aacactttat gaaatattgg aaacttatga tgaatcaagt tgtaaaaaac attagaactc agttctttta
631 aatagataaa taccataaca aaacaataca attaaaaacca aatcaggtaa ttaaatattg aaatttgata gttaccotta tgaatcctc
721 cgcgaatfff agattttcgg tgccttttat ttttttttat tttttttttg ttggtttgat tttttctctg aaaaaagaag gatacgcctgt
811 cagaatftta aaagaogttg agaataaat ttaagatct ttgataagaa ttttgttttg tgcgtgttatt atttgctcag gggatcatca
901 tatgctggta gttcaggttt aggcctcatg gtttaggtat ctcatcactg gtttttgta ttctctgttc gttcatcoat ttttcccacg
991 cgttgcatftt agatctcagg taccattatt tcaagatcta gaagctctcc aaaaacgtca atacaattca aatcattaag aatataattca
1081 ttcattagac cactataaca ggtgtctatt ctatttattt aatctcattt tcattatcat tttcattcat tattaaaaa atttagtcac
1171 gtgatttagat ctataattat aaatatcatc aaatatcatt attatattat gatttcaact tcaacaaatt catcatctaa aaagaatgaa
m i s t s t n s s s k k n e

1261 actactatat ctcaagtttag attatcagat tcttcaagtg attcatcatc atatgaagat gaaaaatttag atataaaatc agaagaaggt
t t i s q v r l s d s s s d s s s y e d e k l d i k s e e g

1351 ttaatatcag aacatcaaga acaataaaa caacataatc aaactaaaac ttacaaaaca aataaaattg ataataatca aattgaaatt
l i s e h q e q i k q h n q t k t y k t n k i d k y q i e i

1441 tctttaattg ccttaataat attaaatftta ttaataaat ttgaaaatftt ccaaccttat acacataaat ttttacaatt acaatataaa
s l i a l i i l n l l n k f e n f q p y t h k f l q l q y k

1531 tatcctgaaa caaattatta tgatattggt aaagatgata tttatgttgt tatcacaggg atgtttgctg caacttttat aagagctftt
y p e t n y y d i g k d d i y v v i t g m f a a t f i r a f

1621 tcaatgcatt atatatftaa accttttagca aaatttaata aaatttattc acaaaaggat aaacaaagat ttatggaaca aggttggtgt
s m h y i l k p l a k f n k i y s q k d k q r f m e q g w c

1711 gtaatgttat atgcttcatc ttttagtggt ggatcctggt tatattatca ttcattatcat tcaacaatt ttgataatftt ttatataaat
v m l y a s s f s v g s w l y y h s s y f n n f d n f y i n

1801 tggcctcatg atgaaatgtc tggattattt aaattatatt atttaatgct aatagcatca tggctcctaac aaatttttac attaaatatt
w p h d e m s g l f k l y y l m s i a s w s q q i f t l n i

1891 gaagctaaaa gaaaagatca ttatcaaatg ttagtcatc atataattac cgtggcatta gttattggat catattatta ttattttact
e a k r k d h y q m f s h h i i t v a l v i g s y y y y f t

1981 agaattggga atgttatatt agttataatg gattttgttg atattttatt atcaactgca aaattattaa aatattgtgg ttatcaaaat
r i g n v i l v i m d f v d i l l s t a k l l k y c g y q n

2071 ttatgtgatt ttatgttttg tgtttctgta ttaggtttga ttgcattaag acatgggtgtt tataattata ttttttatca tgcgtctaca
l c d f m f g v f v l g w i a l r h g v y n y i f y h a a t

2161 aaagcaagag atcttatggt ttcaggtaga tgtattgatg gattaattca aaaaagatgt tatactgac gaattgttga tgttttttta
k a r d l m v s g r c i d g l i q k r c y t d r i v d v f l

2251 tctttattgg gaggtttaca aatcattaca ttgatttggga tgtatttaat tgctaaagtt attataaaag ttttaacagg taatgggtgt
s l l g g l q i i t l i w m y l i a k v i i k v l t g n g a

2341 gatgatgfta gaagtgatga tgaagatgat gatttagatta tgaaccatt taattcatta catagataaa catttttttt tcaattcgta
d d v r s d d e d d d -

2431 cctgttttta ttcattgcat ttatttttatt atatatcatg ttttaataaa aagtttaagt atctatatta aactgtgtct tattttttta
2521 tagtataaag ttgcaaaaac tgaatgcaatc ataactataa atccaaatat agttaaactt aaacttaatg atttattaat atcattatct
2611 ggaataaatt taaacccaaa taaacctggt aaatataaac aaattaatgt tgaaccagtg gcaccaacta atgataatca taattcaaat
2701 gatttaattg ataatgctaa tccatattga cccaagtfta ataaagtagt aactaataca aatctatttg ttgaaaatgg aactctatca
2791 tttgattcat taataccaga ttcttcatca ttaattaatc cagttctcttc attaacaact gttgatgtgg tttatttttt agatatttct
2881 tgttgaatcc aatgaatcat attattttgt gataaacgac atggatgaaa cattaatgga taagataaag taaccattaa tacaagagca
2971 aatttaccaa tttttgact taataattta ctttttatt cttaatatac attccatga acattatcac caaattgtaa ataacctgca
3061 atcccaacac ttaagaacaa taaacttgca attaaatttg attaaatgtt ctaaaagtat aacttttggga actgtgtatt gatcattaat ttctattata
3151 atagaacaaa tgttttgtgc agcagtgaa gcaaatacca caatggaaaa agttgaaagg atttgagata ttgaaccaat ttctaattt
3241 taaactgac cttgactctt ggaccaatca tccatattg aatgagaaat aaccaatatt gttaaataac caattgcaa taatccaatt
3331 aaagaaccaa ttttcaaaga atctaatttt ctaaaactga ttaaaggat gatgataatc aaactaaagca atataacttg atttactc
3421 aatacttcat taattaaact tgaaccaa tcaccaatca atactaaata acttaaagcc acaccaaac attgaattgc aatagaaaa
3511 tcaaaaatca aagcoaattt aggataagtt ataccacaaa gagcaaaaa tgaagtatca ccaggtaatt ttttactaac ttgactaaaca
3601 atataagac cataagaaga tgaataacca gcaattaaaa ttaattatgt acctaatac aaaccatcag ctttgaagc gaaaggaatt
3691 gccaggagac ctgctccgat gattgttttg gttaaattga tgactgatga ttgaacagaa gccattttta acaacttga cccctttttg

```

```

3781 aatcaacaat aataagttga tctttttgat ggaagtttg gaatgttctt attgttttga tggttttggt ttgattttgg tgaagaagag
3871 cgogaatatt tttgtttata tacaagagaa aaaagatcaa atttacttga agatttattt aataaagaca gaaggtgatc atgagtgagt
3961 acaaggtgac gaagaagaag agtccggctgg tggcaccgga gaacagacag agagcagcgt tcagttgtga caggtgcaag actaaaaaga
4051 tcaagtgcaa gaggattggt gacgggtggag atggtaatgg taatgtaaat ggttcacggt gtatgagtgg tgataagtta ggattggaat
4141 gottgacaag tataaccaga agaagaaggg tttatagctc atatgagaat ttagg

```

Abbildung 45: Sequenz des *LAF1*-Gens aus *P. ciferrii* inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz. Die grau unterlegte TLC-Domäne wurde mittels des Prosite-Programms (<http://au.expasy.org/prosite/>) ermittelt.

```

1 tattgataaa tatttaaaaca gagatgatgt taagaagct ttaggtgctg aaactgataa ttatgaatct tgtaactttg atgttaatag
91 aaacttttta ttgcagggtga ttggatgaaa ccatatcata aagctgtttac tgatttatta gaatcaaaaat tacctgtttt aatttatgct
181 ggtgataaaag atttcatttg taactgggta ggtaatgaag cttgggttga tgttttacca tggtcagggt ctgaaaaaatt tgcttcttca
271 aaagttaaac catggaatgt tgcaggtaaa gaagctggta ctgtcaagaa ccatgatatt ttcacattct taagagttta tgggtcagggt
361 catatgggtc cttatgatca accagcaaat gctttagatt tcttcaatga atggattggt ggtaattatg ccattatcag tgaagaaaaa
451 taatatcttc aattaccaat ttcgcttaat tgcctgactt cagtaacaat tctgataatt tttatatac cctttatgat tgttatattt
541 ttgattttat tctttgatga gaataacaaa tacttttata cttaaaaacca aaaaaaaaaa gattataagt ttaataaatt caagataaat
631 tcagttcttt atataatttt tcattgtagt attcttgaat tttaaagccc ctattaaatc gtcgcgaaaa tggttgattc ggaaaaaaag
721 atactttata aaaattaat tttgacgtga agcatgtcac caaaaatatt ttgacgatat tgtcaatcac caccacaattc tttcaacttca
811 ttcataatca tcagctctat acaatggctc caaagagtaa taatattttc aacttgatcc aagtgggtctt tatagtactt tcattgggtg
m a p k s n n i f n l i q v v f i v l s l v

901 cagcagttga atatttttaa tatagtacaa gaataaatta tgattgggtc cattgtacac cacaagttac aacattccca aattcaagta
a a v e y f k y s t r i n y d w f h c t p q v t t f p n s s

991 ttaaacaagt catatcagtt ggtggaccaa gttgtgataa aagaggtcaa acaaaatcaa toaccaaaag attatcaaga gaatttgaac
i k q v i s v g g p s c d k r g q t k s i t k r l s r e f e

1081 caaatcaaga tgatgtttta tttgtatttc aagatgatgg taataaaatt ataggttttg gttctaaatt tgaagataaa tctgaattag
p n q d d v l f c i q d d g n k i i g f g s k f e d k s e l

1171 aatctttatt tgctaatatc attgcttgggt agaaaagtat gattcatggt taaatcaaga ttttcatatt atacaacata taaatcatct
e s y c a n i i a w -

1261 caaaaattat atataacaaa taaaataact taaaagctgc tacattaatg aaatttgctg gtcttataat cttaataata atgattaat
1351 acatacata ttaaaattaa ttatataaaa caatgcattt cgtaattata aacaaaaaatt toatcaattc atagcttgac ctaagaaaat
1441 taatcatgga ttactttcat catacatagg acatgcttta ttagttotaa tatgaccaat accaccacaa ttttgacatc tacgagcagt
1531 actttttact ttaccaatc ctttaccacc catattttct ttaactaact tacgtgcatt aogacgttct tgattttttt gtaatttggc
1621 caattgttct tctaataatt ttttattttt ttgatttttt tcttcatcat ttgttaaagt aatatcatct ggtataatat cttottctaa
1711 tttttcagca cgtttaatat aagctcttat aacattttga tctttataaa tttcatggtt tctttgtaaa ataccatttt tatctctaac
1801 tcttcttgta atttttaaaa atttttattga ttcttctttt ttattttaaatt cttctgaatt tocttcatct tcatcaacat ttgatgaaat
1891 tttctgtaaat tttttctggt gattatacca agttcttgaa atttcttcat cataa

```

Abbildung 46: Sequenz des *LIP1*-Gens aus *P. ciferrii* inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz.

```

1 cgtgaaaaga actttattat cttctcatgt gtcagatcaa atgaagaatc caagattggg tttgttaaag atgaaagaag attaaatggt
91 gcattaacaa gagcaagaaa tggattaatt cttgttggta ataaagcaatg tatgagtctt ggtgatccat tatgaaaga gttgactgat
181 caacttggaa ctaatgactc catagtcaca ccagaatcat taaacttata gatttataga ctagaatgat agaataaaa ttaacttatta
271 tagtagtccc cataccaaaa ctcagatata acccttcttg aaatgacagc atgggggccc cgaaaaaaa tccaccactg caaaatttctg
361 caaataccac caaaattcgt gggtttaatt tgaagaatta atcaatgaaa tggactttaa atgaggttta aactgggtota atttgatgaa
451 aattgtacca ttatgatcca attattcaac ttagtcatag ctattcaact tcccacgcaa aattcccaat tcccactatc aaaataacca
541 ttgtcgctac gttttactcc ttgtgggtgt gctctaaatt tgcccgggtc ggcagcgcacc ggccattttc aaacacotga tgcgaaaaaa
631 cgaaaagtaa atttatcgat tttgaattca aaatccaata atacattcaa ttgataaatt gtttgggttg aaaatagtag aagtattcaa
721 cttttattag aggtttgcaa ttctccccc ttttcaacta aatattcaac acaactaaac tttcccggag gagttcagac tactatacaa
811 agatgatgtt gaagaatatt gttcgtctcc tttcaaacac aacttctttg agatcaactc aaagagtgtc cagaactatg gccactgaa
901 ccaaccaaga tgatgaagta agtagattgt tattatattt ttggatogat gatgaattgt ggataatgga gatgaattga ttggatttta
991 attggttctt tgattgtttt gtgattgttt ttttgatatt taggaaagat aggggacaat caagatttag atctatacaa ccacaaatca
1081 ccaaaatttc aatccaaatc agtgggaaac actagacaat gtttaattac taaccogttt toacacagat tgtcaactatt aacttaccag
1171 ctctcatcat tgaaggttat gaattagaag ttccagaaac tactttccaa acttcaaaat caactttatt atcaatgtac aaagaatga
m y k e m

1261 ttattattag aagaatggaa atggcttctg atgctttata taaagctaaa aaaattagag gtttytgtoa tttatctggtt ggtcaagaag
i i i r r m e m a s d a l y k a k k i r g ? c h l s v g q e

1351 ctattgctgt tggattgaa aatgccatca ctaaaaaaga ttccgttatt acttcatata gatgtcatgg tttcacttat atgagaggtt
a i a v g i e n a i t k k d s v i t s y r c h g f t y m r g

1441 ctccagttaa agatgtcttg ggtgaattaa tgggtcgtcg ttgtgggtgt tcttatggta aaggtgggtc tatgcatatg tataccactg
s p v k d v l g e l m g r r c g v s y g k g g s m h m y t t

1531 gtttctacgg tggtaatggt attgttgggt ctcaagttcc attaggtgct ggtttagctt ttgctcataa atatagaaat gaagataaatt
g f y g g n g i v g a q v p l g a g l a f a h k y r n e d n

```

1621 gttcattttac tctttatggg gatgggtgctg ctaatcaagg tcaagttttc gaatcttata acatggccaaa attatggaat ttaccatgta
c s f t l y g d g a a n q g q v f e s y n m a k l w n l p c

1711 ttttcgcttg tgaataaat aaatatggta tgggtacttc agctgctaga tottcagctt taactgatta ttacaagaga ggtcaatata
i f a c e n n k y g m g t s a a r s s a l t d y y k r g q y

1801 ttccagggtt aaaagttaat ggtatggatg ttttagcttc ttatcaagot tctaaatttg ctaaagattg ggcaatttct ggtaatggtc
i p g l k v n g m d v l a s y q a s k f a k d w a i s g n g

1891 cattagtttt agaatatgaa acttatagat atgggtgctc ttcaatgctt gatccagcta ctacttatag aacaagagaa gaaattcaac
p l v l e y e t y r y g g h s m s d p g t t y r t r e e i q

1981 atatgagatc aagaatgat ccaattgctg gattaaaagc tactttatta gaattagcta ttgctactga agaagaaatt aaatcttatg
h m r s r n d p i a g l k a t l l e l g i a t e e e i k s y

2071 ataagctgc tagatcttat gttgatgaac aagtgaatt agctgatgct tctccagctc cagaagctaa aatgtctatt ttattcgaag
d k a a r s y v d e q v e l a d a s p a p e a k m s i l f e

2161 atatttatgt tccaggttct gaagttccaa cttaagagg tcgtatctct gatgatactt gggatttcac taaaatgat tttttaaa
d i y v p g s e v p t l r g r i s d d t w d f t k n d f l

Abbildung 47: Partielle Sequenz des *PDA1*-Gens aus *P. ciferrii* inklusive Promotor-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz.

1 ggwatggggc aaaargatws wtacgttggg gatgaagctc aatcaaaaag aggtatctta actttacggt acccaattga acatgggtatt
? m ? q ? d ? y v g d e a q s k r g i l t l r y p i e h g i

91 gttaccaact gggatgatat ggaaaaaatc tggcatcata ctttctacaa tgaattacgt gttgctccag aagaacatcc agttttatta
v t n w d d m e k i w h h t f y n e l r v a p e e h p v l l

181 actgaagctc caatgaacc aaaaaccaac agagaaaaaa tgactcaaat tttatttgaa actttcaacg ttccagcttt ctacgttaac
t e a p m n p k t n r e k m t q i l f e t f n v p a f y v n

271 attcaagctg ttttatoatt atattcttca ggtagaacta ctggatttgg ttttagattca ggtgatgggt ttaactcagct tgttccaact
i q a v l s l y s s g r t t g i v l d s g d g v t h v v p i

361 tatgctgggt tcgctttacc acacgctatt ttaagaattg atttagctgg tagagattta actgattact tgatgaaaaa cttatctgaa
y a g f a l p h a i l r i d l a g r d l t d y l m k i l s e

451 cgtggttatt cattcactac tactgctgaa agagaaattg ttcgtgatat taaagaaaaa ttagcttatg ttgctttaga ttcgatcaa
r g y s f t t t a e r e i v r d i k e k l a y v a l d f d q

541 gaattacaaa cttcagctca atcatcagct attgaaaaat catatgaatt accagatggc caagttatta ccattggtaa tgaagattc
e l q t s a q s s a i e k s y e l p d g q v i t i g n e r f

631 agagctccag aagctttatt ccaccatca ttattaggtc ttgaagctgc tggatttggat caaaccactt acaactctat tatcaaaact
r a p e a l f h p s l l g l e a a g i d q t t y n s i i k t

721 gatgttgatg ttagaagaga atttatgggt aacattgttt tatctggtgg tactactatg ttoccagcta ttgctgaacg tatgcaaaaa
d v d v r r e l y g n i v l s g g t t m f p g i a e r m q k

811 gaaattactg ctttagctcc atcttcaatg aaagttaaaa ttattgctcc acctgaaaga aaatactctg tctgga
e i t a l a p s s m k v k i i a p p e r k y s v w

Abbildung 48: Partielle Sequenz des *ACT1*-Gens aus *P. ciferrii* inklusive der abgeleiteten Protein-Sequenz.

1 gattttaaatt ttaattgttt tgattttgat agtttataag ggctgctta tgtcagggat tatgtaacag tgtatgggaa tatactttaa
91 actaaaaat atgtaaatgt ttgtatgtga tggatgttt taaaatata atttataatc agtggatcaa gaggattata attatgtaac
181 ttattaatgg tttaaaagtg gtttagaaat tgatgatatt gatttcoatag attttataca ctttaataat tttatatttg gtttagaaat
271 gaaatattaa taaattaatg gaaaaaatta aattattaac ttcaaaaatc aacaatttaa actaaacata atgaaattaa ttaaattaaa
361 aacattataa acattttatt aaatcattat ctattttaata tatatattta taataactaat attaattctt cttataggta ttacataatc
451 actgacataa cgacgaatca attgtactcg tatataaaca ataaagaata aaactaaaca aaactaaaat aataaaaaac caattaatc
541 aattatataa ataatoaata taataaataa acaatataat tacttattat ttcaaatca ttttagtaac atagtgttat taaaagctg
631 aaattcggaa caaccggtg gcttagtgca gtaaattacc tcccttgttt gttttaccgc aaattacaca aattaaatta cctgaaatta
721 ctacttgta cacttggtac tattaacaat tcaatacaaa agaaagaaga gaatcaagag atcaatctca tagattttaaa atctaacta
811 atatcaattg tttatcaata ggataatcag ttaccatca aaagatcatt gcccatata toattaatac ccagacacaa tcggagtata
901 caacaacaac aaaaaatgt catatcattt accatttgc taaacctacc ccaatgaacc atatcatgct tattggaac aagtcacttc
m s y h l p f a k p y p n e p y h a y w n q v t

991 aacaatagat tgggtggaag aaaattatat tgtgactcca tatattgcag aagctataaa tactatatca aattcaattt ttattattt
s t i d w c e e n y i v t p y i a e a i n t i s n s i f i l

```

1081 agctggattt gccatgtttt ctgcatttaa aaataattta gaattgagat ttatattgat aagtttttgg tttgctttag ttgggtgagg
    l a g f a m f s a f k n n l e l r f i l i s f g f a l v g v

1171 aagttgggta tttcatatga ctttacatta tgagttccaa ttattagatg aattaccaat gatttatgca acttgtatcc caatgtggag
    g s w l f h m t l h y e f q l l d e l p m i y a t c i p m w

1261 tgttttcagt gaaggtgttt ccaagaaaaa atcaattaca attggatttt ctataatatt ggggtcaaat ttattaactg caatttattt
    s v f s e g v s k k k s i t i g i s i i l g a n l l t a i y

1351 atatttaaaa gatccaactg ttcatacaagt tgcttatgcc ttattaatag ttttcattgt ggggaaatct cattatttaa caataaaaaa
    l y l k d p t v h q v a y a l l n v f i v g k s h y l t i k

1441 cattcataat caaacaaccc aaaaacaatt atttataaca atgattaaag gaattgggat tttcctttct gggtattttct tatggaattt
    n i h n q t t q k q l f i t m i k g i g i f l s g y f l w n

1531 agatgttcat ttttgaattt cttggatttg gtaagaaga agtattggta tgccttatgg tttcctatta gaattacatg cttgggtggca
    l d v h f c n s w i w l r r s i g m p y g f l l e l h a w w

1621 tgttttaact ggtttaggtg ttttttttta tattatttat ttagaattat taagaattaa tttattgggg aaacaagatg attatgaatt
    h v l t g l g v y f y i i t l e l l r i n l l g k q d d y e

1711 gatttataaa tttggatttt tacctgaagt taattatta aaaaaggata aaaaatgaata attaatcaat caacatgatc aaatagcaat
    l i y k f g f l p e v k l l k k d k n e -

1801 caattagttc aaatggcatg attattttgat acacatatta tttatacttt atattgttct ttgttatgtg ccttcttttt tgttatacct
1891 ttttatatca taaatgctcc ttttttaaca aaaactttat atatttatac atgaaatgaa tattggatga ttttaagtga atatttatga
1981 aatattgctg ttttataatc aaaaatatac gaattgatat tataattacg tataatacgt tctctgggagt caattttcaa caaaacatta
2071 tatcaaacaa gagtaaaatt aaaaagtggt atgataattg attatatcaa ttgaaactta catagatcct attccaactt gaaagggttt
2161 agatcttttg tctctttaga tcttaacgaa taaacgtatt tgaatctaac ttcttgtttt aatccttgtt tgtgagatga tagatcta
2251 aatctaactc ataaaaaag ggtttgtaaa tattcaaat aagaaggtag aagacgctta tgccttggta ttatcctagg cattatcgga
2341 tcaatgtatt catactccgt attaatccag ggtacaatta gtcatagta catacactcc atagcctgtc aaatatggag agttcacgta
2431 gttagggagt caaagtaatt actcgtaaat attacgcaat ggagatcctt aaatgtcaaa tcacaaaaac tcgaaaaatc ttcttaagaa
2521 tttaaaaatt ttaacttttt aaattgattt gatttgttga atatatattc taacttgtac acttatcata attgtgtaatt tgattatctg
2611 ttgatcttat ttaaaagat tttatacatt agtgaagat atgaaggcat tagtgaagac atgaggcatg agggatatga ggcattgaag
2701 agttcgggta aactgatgtt gatttaaaga acaaatgaa aagtgtttaa ttcaattcaa tccaattcaa tccaattcaa ttgttaagt
2791 taatgattta tactcaactg atcaaaagt atccgatgat ttttatatta attttccgaa tatcaacct ttaatttttt cctcaatcga
2881 agcgcgttta tataaaagta acaaaaccag tttataatc atcatcaag aaaaatcact gaaactcgcg tgcgtttttt tctgaattc
2971 caagtactat atgatgttt ttggagaaca agagcttcat acatgatcgt acatgatcgt taagccttgg gtatgatgta ccgaagattg aactgaactt
3061 gatgaactga tttttttatc attctataag cagtaatcat attgatctat atgatccatg ttatcatgat tattgaaatt tatataaata
3151 ttgatcaaaa tctctgtatt taatattcaa tattttttaa tgttgatcat aaaccacaaa gottaaacaa tgattactaa aatcttttca
3241 atatttttac ttttcagttt agtaattgct gctgataaaa attataatag acctcaattc atttacacct gaaaaagggt ggatgaatga
3331 tccaaatggt ctttgggttg atcaaaagga taaaatagtg catgctatta tcaaaaaatc caaaatcaac gt

```

Abbildung 49: Sequenz des YXC1-Gens aus *P. ciferrii* inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz. Die potentielle ER-Rückhaltesequenz am C-Terminus wurde türkis hinterlegt (vorhergesagt durch das PSORT II-Programm: <http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>).

```

1 gagcatataa atataaccgt gaagggcatga cagttcatac taatttttact cattaaataag agtccaattt gattatatgt caaacttgta
91 aagaaaaaact atataagcct ccaagaatct ttoatttctat tttatttttc tttcttcttc acttcagaat ttcataacat taacaattca
181 aaacatcaaa cattcataac atcaaacatt cataatcata taaacactta acatgacaga accattagaa actaaacccc caagttcaac
271 taagattcat aagtygttta cactcttact taaagtgaac actctgaaa cactatacaa cgctttaaaa aaaactggta ttgttaccoc
361 tgatgcatc tgtgaacota cacttgaag tatctcacat tatcttgagc ttgtgatga tgaaaatatt caacttacy ttacgaattt
451 caattggaaa ctacaaaaag ttggactttg gttatagat catatttcaa agcctttcaa tttcttaag atctctttga gctcttttca
541 tgaaaaacat acaagttcaa tcatcgttt taactatct tcaaaatcaa ttaaaagaaa atttatctg acaaaaacat catcagttga
631 agaacttcca tccacaaact tcaaatcatg ttttcttatt gagatttggc ttttgattgt tgaattgggt gacgttgaac ctgcaactt
721 gattagagtg aacaagatt tgttccaagt atttgcctca gtggtttatc gctcaatcca tttagacctt ttcattagtt caagtgagat
811 tctataatgg aatcattctc attgtatgaa atttgcagac tcttgttatt tccaatcctc taatccatata caactttata acgattggaa
901 ggaagtcaa cattctgat ttgttttttg gatattgac atagggaaat cccaaatgag aaaacaactg atttagaatt cattcttgaa
991 aatggctata caataactg caagagtaga gtaatcagaa attttgaaga tgtctataaa tttctcatta gaacctctt gaatgaaaac
1081 tctataatgg tcaagtatat tgaagagatt gcaactaaca tcccgttat tgatgttgat gggtaacaaca cttaatacaa tggagatttt
1171 ggtcaaacac tcaaaagatct ttcaggtggt gagtctcaac ttattctct tgaagtcgt gcattcaaaa cttttgaaatt tgatcatgaa
1261 ctacataaga acccaatttt acaaggtggt aaaaattccag aagaagacta ttttgtcttt gagatgataa tggagatga atcatctag
1351 tttagcaactt gttctttccc agacaaccc tctcacagag aattggttat cataggtata ctcttagaca acaactgaaa tgataagaag
1441 agaattgcaa taaatgcttc aaattttaca acagactcag atgcatttgc aatttggaa gatgaattgt tatcactoca cgattatttt
1531 tcaagaagca aagctgaaga aaaaggtcct atttcaatg aagtaatgaa acataaattc acataaattc atgaatgata tcaaaactaa ctctttttg
1621 actagattca tccaactcct agcttttaaaa ggcgtaaaag aagacttga aagaacaca gtgatgatt ctgggttga taaaatcacc
1711 agaggaagag acagagcgtt aagaggtaca tttattgatg aagacaatat cccctatata aatcatccag tgatcacttt catttgatg
1801 tgcataacta agtgattcag caccacgaag tatatagata taataaaaa tccatacaat aaacttcaag tgcctggttt gttaaagacc
1891 gcatctgatt tcaaccataa tagtgttact atatcatttg tggccaaatt ttgtctctt ctggattacc tgcgtaatta aagtttatag
1981 gtttgacaca tcttttagta tttggatttg gatttggttt gttaaagat ttgatatagg gccctttctt aactatgggt tgcctcttt
2071 acaatttga tctttttttg tatacagattc agatttcaaa gccattctgt ttttaaaaaa acgttccatt ttgcaattaa tgcgaacttga
2161 cacagttgag atttggatca gatcacgcta ttttgggtgaa ccagcagttg gtataataga ctagagaagg gtcctgttga aaaaagctag
2251 gagctacaca gactgggttag gaaagagttc aaatgtccag ttccaagtg ctctccagag gtgaaatcga gcctcgtatc gctttaggtg
    m s s s k v l s r g e i e h r i a l g

2341 atgccattgt gatctttgaa aactctgtgc ttcgaatgaa caagtggttg aagttccatc ctgggtggtga taaggcctg ttcattttgg
    d a i v i f e n s v l r m n k w l k f h p g g d k a v f h l

2431 tcgggagaga tgctactgat gagatgattg cgtaccattg tgatgagacc caagccactg tcaaaagatg gaagattggt gaaatcaatt
    v g r d a t d e m i a y h c d e t q a t f k r w k i g e i n

```

2521 ataaatggat caattttgtg cgcctattc aaggtgggaa gttcagaact ttagaagaac aagagttgga tgaattataa gaggaacaac
 y k w i n f v p p i q g g k f r t l e e q e l d e i k e e q
 2611 tgagttagatc accagcttca ccagcttcaa attcatcttc aagtgaagat ttgaaacttt catcttcaac tgatccatca gatgttgagg
 l s r s p a s p a s n s s s s e d l k l s s s t d p s d v e
 2701 attctattga tacaagggc gagtctctat caaattatgc aaacaacaa caacaaaaac aacaacaacc aaaattaaac accacagcgg
 d s i d t k a e s s s n y a k q q q q k q q q p k l n t t a
 2791 gtcaatgctc agaagtccac aaaccaaaga taccacaagg acttataccg tctttatcaa caaagaagc atatgaaagg aaagtgttta
 g q c s e v t k p k i p q g l i p s l s t k e a y e r k v v
 2881 aagatccaag tgatgttatt gataattatg ataattgtca agttgaacaa gatttaaaat cttacccttc attagattat gaaactcaag
 k d p s d v i d n y d n g q v e q d l k s l p s l d y e t q
 2971 aacatttatc aaaagaatat aataaattac atgatataat tattgaaaat ggatggatc aatgtcctta ttgggaatat gcaaaaagaag
 e h l s k e y n k l h d i i i e n g w y q c p y w e y a k e
 3061 ctacaagaat tgcaacttta tttagtattt cattcacact actttatttt aaatggattt tcttagtgc aattttctta ggtttagcat
 a t r i a t l f s i s f t l l y f k w y f l s a i f l g l a
 3151 ggcaacaatt agttttcatt gcacatgatg caggtcatat ctcaataaca catcaatagc aaactgataa tataattggg atgattgttg
 w q q l v f i a h d a g h i s i t h q y e t d n i i g m i v
 3241 catcttcatc tgggtggatta tcattagggt ggtggaaaag aatcataaat gttcatcctc ttataacaaa tgatcctgtt catgatcctg
 a s f i g g l s l g w w k r n h n v h h l i t n d p v h d p
 3331 atattcaaca tttaccattt tttgcagttt caacaagatt atttggaaat gtttattcaa cttattatga aaaattttta tggtttgatg
 d i q h l p f f a v s t r l f g n v y s t y y e k f l w f d
 3421 catttgctaa aaaattaatt ccaattcaac aatttatgta ttatccaatt ttatcatttg gaagatttaa tctttataga ttatcatggg
 a f a k k l i p i q q f m y y p i l s f g r f n l y r l s w
 3511 aacatgtttt atttggccag ggtccaagac atggtaaagc tgcattggtt agatattttg aattagttgg attaactttt tccaattggg
 e h v l f g q g p r h g k a a w f r y f e l v g l t f f n w
 3601 ggttttttta ttttaattgtt tataaatcaa ttgaatcaaa ttcatacaaga tttatggttg ttatggttag tcatataaca acaatgattg
 w f f y l i v y k s i e s n s s r f m f v m v s h i t t m i
 3691 ttcattgttca aatcaactta tcacattttg caatgtcaac atcagattta ggaacttcag aaagttttgt aagtagacaa ataagaacaa
 v h v q i t l s h f a m s t s d l g t s e s f v s r q i r t
 3781 caatggatgt tgattgtcca ggatgggttg attttttcca tgggtgatta caatttcaag ctattcatca tttattccca agagttocaa
 t m d v d c p g w f d f f h g g l q f q a i h h l f p r v p
 3871 gacataattt cagaaaaatt caacotttag ttattggatt ttgtgataaa gttggattaa aatattcaat ttatggattt gttgatggta
 r h n f r k i q p l v i g f c d k v g l k y s i y g f v d g
 3961 atgaagttgt tattaataaa ttatcagata ttgctaataca agctaaaatt atgagagatt gtcataaac aatgaaaaaa gaagctattg
 n e v v i n k l s d i a k q a k i m r d c h k t m k k e a i
 4051 aagaagggaa atactttgaa ttctgaaaaa agctgaaagg gaactgaaag actagaagct tgcgtaattt atttatatta atacatattt
 e e g k y f e f -
 4141 atagatctgg atcaaaaat tgtgtaaaga atagtctctg tatgaattga tcatttatat tgtttatatt gttgtgtctc tgaccgattc
 4231 tggctatttt tcttttagac aatataaaaa caaacgtca ttaataagag aatcatcaga tcatcaaat tagttcataa aactcact
 4321 ttattagatc aacaatactc aattatagat cataatacca ggttataatt gaagaaaatg cctgaaagta cattcaccaa ttoactcaaa
 4411 ggttttttca aaaaacaaaa atcgccatct ccatcccag aatcaaacac atcatcaaaa tcaccaagta taaggaataa tgcattattc
 4501 atagaagatc caccattaac accccttgaa ctctatggat actccaaaac tactaaaaac aagatttctca cattggaatt ggtgaaagaa
 4591 ataaggaata tgttaacttc aagacatcaa gtttcatcaa attgggaatt agtttatagt tttagagcaac atggagcctc tttaaacact
 4681 ttatattcaa atattaacc atcaacaaaa tatgataaga atggttattt attagtattt aaagaccaac gtggaacaat attggggagt
 4771 tatacaaatg aacattttca tccaacagat atgaagagat tttatgggaa tgggtaatgt ttcctttgga aatcaaaatt aatagataat
 4861 aaagaatctg gagagaaatt tataagattt caagcattcc catatacagg attaaatgat ttcataatat attgtacaag taattotta
 4951 tctttagggtg tgggtgatgg tcaattatgga ctctggattg atcaagaatt attacatggt gttagtgtac attctttaac ttttggaaat
 5041 gaaccattga gctctcaggg gaataagttt agtatattag gtgttgaagt atggagaata tcatga

Abbildung 50: Sequenz des *8DES*-Gens aus *P. ciferrii* inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz.

1 ttcaaatgtg aatataataca agaattccct tcaaatctct ctctatccc caaaccaact ccaatatgat acagtaataa ccccacttt
 91 ttcatttaaat atctttaato tctggagcac tcaacatttc atatttttta taaccagctc ttaataaatg tccaatagtg gaaaattcct
 181 tctttggtaa tttttgatac tttccaaatt ctctctctga tgtattttca ttagtttttg agtttttaaat tgaaaaaatg gtatacggat
 271 catactcacc ttgtatatct gaagaattg tgtctatttt gctatcatat tgttagtttg atgttcatta attattgcat taattcattt
 361 tcaacttaac atacttcagg ctttgtataa ggggtcttta tacatgttct gtataatttt aggacttctc tctgaagtcc cgatagcttc
 451 tttactttgg atggcattgt atgggctttc attataggct tttgtgatga atacgatttc ctggagtaac actatattgat tacaatttta
 541 tttgttttcg aaatacaagc tgactactaa aatcgcgaat atatgaagta ttagtcaaac ttagtgtgtg gttataaac ttattgatag
 631 agattttccga tcaaaagatg agttgttctc tgtgttatac acaaatcatt gtgtgtgact gacctatcag ctttggcctt caatctctgt
 721 tctttgttcg gataattaac aggtgaacta gaagtgttta tgtgatggat gactcggaaq tacaggtaac caataaataa gtcagtcca
 811 tagtaactga acaatacata cagactgaag tgagctttaga cgtccaatca gaataggctc aatagcatta ttttggctct gttctctgca
 901 caaacttcga agaataatctg gatcgtttg cagttttgtc tgggttctg gttctgagtt ctgaggttct ctgctcatcg gaaaaaggta
 991 caagatctga tccatgaagt taatgctgaa ctgatcata aaacctcaa tattggagag aattcaccag tttaaagcga gctatagct
 1081 ttttgagcaa gtataaatca ctgactact tttaaacttt aataactcac tcttattaca atcataaact cttttaaat cttcccaaac

1171 ttgcgcggtt cagagccggt aaaagtaaat aatgaaatgc gcatcgacat caaaaaaatt tgacgctaaa aaaccagatc ataaactgt
 1261 aaacaataac aaccgccttc aacatctttg taaagaacca atccatcaca gaaacatc aagaagatag atacctggat aatcacatga
 1351 actaacactc tctgtcatcc acaacaacaa tctgtcgaaa aatagcatgt tttccagtgc agagtccatt attctttcct tctgcacaag
 m f s s a e s i i l s f c t
 1441 gtttggttat agtgccagta tataccctga aggttcatca ataccaata ctggaacac catggtaaat gggagcccca ttgtcatcga
 r f g y s a s i y p e g s s i p n t g n t m v n g s p i v i
 1531 gtcatttcaa ttatcaaat tacaatatgc tctatcgggt ataggtttca tttggtgggc ggttatgatg ttcattatat attatggatt
 e s f q l s n l q y a l s v i g f i w w a v m m f i i y y g
 1621 tacagagatt tatttcaaat tcaatggacc aaaaataaaa cctttagaag ttcaagtaca aagtaatgat ggtgatgttg ataaaatcat
 f t e i y f k f n g p k y k p l e v q v q s n d g d v d k i
 1711 tgatctggat gatatactgg aaggtgtcac catcttaaga ccaattnaag gtattgatcc agaactagaa atagttttag aaagttcaat
 i d l d d i l e g v t i l r p i k g i d p e l e i c l e s s
 1801 attacaaaaa taccctagtg aaaaattaca aattattttt tgtgtggaaa attcacaaga tccagctata ccaatcattg aaaaacttat
 i l q k y p s e k l q i i f c v e n s q d p a i p i i e k l
 1891 taaaaggat aatcatttag atgttgaatt attaattgat gaatcctatg aagataatca ttttggcca aacccaaaga ttaataattt
 i k r y n h l d v e l l i d e s y e d n h f g p n p k i n n
 1981 agcaaaagg tataaaatgg caaaatttga tataaatagg gtcttggact caaatgtttt cgtaaatcca ggaacattat taagatcgat
 l a k g y k m a k f d i i w v l d s n v f v n p g t l l r s
 2071 tataaattta caaaaaatc tttgataatg tgcgaaaaca ttttaatttg atactggtaa ggggaataaa attaaaatta tgcacatgat
 i i n l q k s i d n g r e t f n f d t g k g n k i k i m h h
 2161 tccattagct gtttcaataa ataattcaca tacattaggt aatttaggtg caagattaga tgaatgttt ttatttactt ctcacgtaa
 v p l a v s i n n s n t l g n l g a r l d e m f l f t s h a
 2251 attttatgtt ttttcaataa aagcttcaat tgcaccatgt gtaattggga aatcaaatat atataaaaa tctgatttag attcatctgt
 k f y v f f n k a s i a p c v n g k s n i y r k s d l d s s
 2341 tatgaaatt tctaaggct caataccatt aataaataat agagaatcta ttgctaaagc ggcttcaact tttgtaaga ctccagggtga
 v m e i s k g q i p l i n n r e s i a k a a s t f v k t p g
 2431 aggtataaga tttttttcta gatatactgg agaagataat atgattggta ttgcctctg gaatgatcca aataatgggt gtagaacagg
 e g i r f f s r y i g e d n m i g i a l w n d p n n g g r t
 2521 tatgactggt gatgttga tccaaccaat tgggtggctca acaaaatag gactaccatt tcattataca aataaaatca tggattatgt
 g m t g d v v i q p i g g s t n n g l p f h y t n k i m d y
 2611 taatagaaga gttcgttgg taagagtacg taatatatg gtgttagctg caactttagt tgaaccaact acggaaagt tattaattgg
 v n r r v r w l r v r k y m v l a a t l v e p t t e s l l i
 2701 tgtatttgg atttatggt tatcaaatat atttttccaa ggtaaatata aaaaaaat catgttttg catgaattaa tttggtgat
 g v f g t y g l s n l f f q g q y k k t i m f l h e l i w c
 2791 cactgattat actcaattta aaatattatt aaaatttggc aatcaagata aattcatga taatcagact ataccacat atttataaa
 i t d y t q f k i l l k f a n q d k l h d n q t i s p y f i
 2881 tgatcatatc gaggagaaat ataaattgat taattggta ccaatttggg ttttgagaga aatttttagca ttacctattt ggatcatggc
 n d h i e e k y k l i n w l p i w i l r e i l a l p i w i m
 2971 aatgtgtgga acagaaattg attggaggaa tagacccttc aaaataagga ctgatttatg tgcagaagag ttatagatca actaccgaat
 a m c g t e i d w r n r p f k i r t d l c a e e l -
 3061 gaaagaatgt tgctgacgat actatcctg cagttgatca tcaatnaaat tattatttca catgttacca agttttcaat tgcactactt
 3151 acactacacc aatcaactcg ttcaagttca gaaataaaaa acacatagat gatagaagtg attataaaag cattcaaaaag cataaagaac
 3241 agcgcactc agacataaaa atcttgctag atacttcaat agctcaacat atctatgagc tgaagctaat taatctaatt tatatagact
 3331 aatacattaa tacatataga aatcatacca ttctgaagta cacaaatagt aaactgtacg tattgtgcta ggctctagct atagtttga
 3421 aagaaaatgt atactgcaag taacacatgt acgtaataata tcatgtacgt gtotcatcaa gctgattctt ggatcagatc tatgtattca
 3511 tggttcacag ctgggttagaa tctagattca gcacgtatat aattttocga atctaatga ctttatcaag catcttaaca ggtgatgga
 3601 gcctttatc gctgggtttt tcaaaagctct atttatgaag acaaaatgt ggtactaata aagacgaaga tcattgaaat cggtaacctg
 3691 atccaaaaga caacgtcgca ctattagttt tatatcctct tgttcgagta aatcaacgat catatactg ggtacgatca tatcttgta
 3781 gcttccgtag actgtacta attgatcaaa atcgaatata ggtatatatc cgtggttcag ggaacaaata tactgatggt tgaaccaatg
 3871 gtatcaagta tcaagaagac taatggtaat gggatttcaa ttttatggaa ccgatttggg agctgggtacc tgatgtgctg acaatagtag
 3961 ataatttaca tgatccocaa ttgttctagg ctcatcaatt aatttgaatt atccgtcatc catggttaat tgaccttga tattcgatc
 4051 tattagtagt taaaatacca ttttgataca atttccocaa gtttattaac aatgatcca gatttcaaac tcatcagatc taaaattaga
 4141 gctttttcgg attttataca aattgatctc gtgcggttgc gagcaaaaaca tgcttatagt tgcattctca tacagggctt gatgattc
 4231 tcgaacttta actggtgaat tgaaagtta tttggcctgt gaaagtagga gaatgtccga gttgocgcat caagaacatc ggaaaacagg
 4321 ctcttcatc ccatagaaaa tttaaacttt tcaaaatag ttgcaaatg taactcaatt catgatcttg taaggcgaat gagttcaacc
 4411 tagttgatag taccaggctc cagcgaaaac gcttgataga ttattgaagg tgctcattt gcctttttga ttgtagaagg caccatactt
 4501 aaggcatgag caacgtgcca tcagaacgaa caattttatt agctttgagc tttgagggat acgtatcata cattagttt tttagcgtta
 4591 acagccttaa acatgataag ctgctacgtg gcttttagta gcctttgtaa ttaagacaag gtgctttatc aattgatttg aatcttgaac
 4681 gttgattcaa attttaacca ttaactgctc catctctgtt aaatatcgtc agatcttgat atcgatgaa agacaaagta gttacattcg
 4771 tttattagaa tacgatatat acaaaagggt tctagactgt tgaagatgca agttatattg aaattgattg ttcttccctg taaactcttg
 4861 gtgtgtagta gtaatgagct acagtagtat caagattcaa gcgatagtag cattcatcgg tttcctttcg ttaaattoac gaggccag

Abbildung 51: Sequenz des *GCS1*-Gens aus *P. ciferrii* inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz.

CLUSTAL W (1.83) Multiple sequence alignment Syr2p

```

C.alb      MS-----TFKPPANFSRVLSQPTFYEKIIITEQPSLIKGIPDGLALIVPVVAY 49
D.han      MNSIP-----INFMPPEFNSVMWQ--SYEPVVSLSLKNLIAGIPDGLALVAPI IAY 52
P.cif_syrE10_RE11 MS-----SHQFLINQTTLAAP-----PVHLVEKPSLINGIPDNILALIAPVIAY 44
S.cer      MNVTSNATAAGSFPLAFGLKTSFGFMHYAKAPAINLRPKESLLEPMSDGLVLAAPVVAY 60
C.gla      MSVNG-----TLFEQSFNLKGGYDYMHTVSAPEIKLTPREDLTSYCSGDGILALAAPVIAY 55
A.gos      MLNHTYS--DIGVRLAPRFLPDVSMDDVVAPLTAVKPRPTLVPGISDGHLSLLAPVLAY 58
K.lac      MANIVES-AVQHLYLQVKDAMDVSMNSKAPPASVITKKQDILPWIISDGLALALPVVAY 59
Y.lip      MYNG-----TFNLGPITLTAPNVSSIPPPIYKHSIPPLVSWISDENLALLLPIICY 51
          *                               :      . *  *:*  *::.*

C.alb      WSYSMFFHI IDVYELAEQYRIHPSEEEKSRNKVTLHEVVRDVIQHI IQTIAGFAVYCID 109
D.han      WGYATVFIH IDVYELAEKYRIHPSEEEEEARNKATLKDVKDVVIQHI IQTVVGGTFFLFD 112
P.cif_syrE10_RE11 YSYSGFFVYIDTLEIAELYRIHPPEEVSSRNKATKFDVLDKDVVLQHF IQSVVGYIFTYFD 104
S.cer      WALSGIFHVIDTFHLAEKYRIHPSEEVAKRNKASRMHVFLVILQHI IQTIVGLIFMHFE 120
C.gla      WAQSAFFHI IDVFLHAEKYRIHPSEIEKRNTRATRLQVLEVIQHI IQVIVQVVGILFLKFA 115
A.gos      WVFSGFLHVMMDTLRLAEKYRIHPSEEVASRNTRAGRLDVLQVVLQHI IQTLTGLVLVYVD 118
K.lac      WLYSMFFHY IDTNEVFQYRIHPSEEVQQRNKASRLEVLKEVILQHF IQTFTGLGMLYLD 119
Y.lip      WTSGIMFHI IDQYELLEQYRIHTPEEVTKRNKCTFAEVVRDVIKQHMLQTALGMLLYNFE 111
          :  . . * : * . : * * * * . * * * * : . * . * : * * : * * .

C.alb      PIPKTGYELYTMWNLNKYNLPSFVPDWAII--YGYMYGWSFLRILIAFCI IDSWQFWLHR 167
D.han      PPQTTGHEWMIMWNLKQYVPLFVDPDNNVW--VGYMYGWTFLRICIAIGI IDTWQYWLHR 170
P.cif_syrE10_RE11 PIQYTGDEEYQAWKLQQTLP--FLPFDVAY--YWNMYGWSCLKIGLAFIL IDSWQYWLHR 160
S.cer      PIYMTGFEEENAMWKLRLADLP-RIIPDAAII--YGYMYGMSALKIFAGFLFVDTWQYFLHR 177
C.gla      DESVTGFQEMMWHWRQAP-GFIPDAAVY--YAYMYGVSILKLSLGLFL IDTWQYFWHR 172
A.gos      GEPQTGMQLAMWRWRQAP-GWVSNEAII--VAYHYGLSVAKLLVGFLL IDTWQYFWLHY 175
K.lac      PVPTSGFEKYEMWKRQSLP-FFVPSVFIK--FMYCYGWSMIRIFIGFCIVDSWQYWLHR 176
Y.lip      EPNTTGHEAHDITWQVRFGGQTSAPAKAWLAAFAYTYLLPFVKISFAFFILDSWQYFLHR 171
          : * * * * : . . . * . : : : * * * * : *

C.alb      LMHINKSLYRRFHSRHHRLVYPYAFGALYNPVEGFLLDTLGTGIASLVTGLSHRESIFL 227
D.han      IMHINKTLYRKFHSRHHRLVYPYAGALYNPVEGFLLDTLGTGIATIVTNLSHRESIIL 230
P.cif_syrE10_RE11 IMHLNKTLYRKFHSRHHRLVYPYAFGALYNPVEGFLLDTLGTGIAAIVTQTPRESIVL 220
S.cer      LMHMNKTLYKWFHSHVHHELYVYPYAGALFNNPVEGFLLDTLGTGIAMTLTHLTHREQIIL 237
C.gla      VMHLSPPMYKYFHSIHHELYVYPYAGALFNNPVEGFLLDTLGTGIAMFLTGLTHREAVL 232
A.gos      LMHMNKTLYRKFHSHHRLVYPYAGALYNNPVEAFVLDSCGTALAALVTRMTHREEMLL 235
K.lac      VMHMNKTLYKFFHSRHHRLVYPYAGALYNSPVEGFLLDTLGTGIAAIVTQTPRESIVL 236
Y.lip      AMHQSKWLYKKFHSRHHRLVYPYAGALYNTALEGLMDSGAGLAYMVSGLTTREAIWF 231
          * * . : * : * * : * * * * * * * * * * . * . : : * : * : : . * :

C.alb      YTFATLKTVDHDCGYRLPFDIFQIIFPNNNSVYHDIHHQMWGIKNFSQPFFTFWDVLNNT 287
D.han      YTFATLKTVDHDCGYRLPFDIFQIIFPNNNSLYHDIHHQWTGWVKNFSQPFFTFWDKLNKT 290
P.cif_syrE10_RE11 YTFSTLKTVDHDCGYSLPYDPFQILFPNNNSIYHDIHHQQFGIKTFSQPFFTHWDVFSNT 280
S.cer      YTFATMKTVDHDCGYALPLDPFQWLFPPNAVYHDIHHQQFGIKTFAQPFFTFWDNLFQT 297
C.gla      YTFATMKTIDHDCGYALPDPFQIVFPNNNAVYHDIHHQQFGIKTFAQPFFTFWDNLFGT 292
A.gos      YTFATMKTVDHDCGYALPDPFQWLFPPNAVYHDIHHQNFGIKSNFAQPFFTIWDSFCRT 295
K.lac      YTFATLKTVDHDCGYALPLDPFQWLFSSNAVYHDIHHQSFGIKSNFSQPFFTIWDKFCDT 296
Y.lip      FCFSTLKTVDHDCGYCIPWDPFQILFPNNNAVYHDIHHQSFGIKTFSQPFFTFWDRIILNT 291
          : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

C.alb      QYKFVNEYKDLQKHITLTKYKEFLAKKSGSKSKSQELEIEEEEKSIDKETKKEI----- 342
D.han      DYKFVNEYKSMQDHI TLTKYREFLANKQ--RKPKNKPVNTEPEKK-----KDI----- 336
P.cif_syrE10_RE11 RYKEIDEYREKQKAITIAKYKEFLHDREIAKQKKKAEIYKDKKTD----- 325
S.cer      NFKGFEEYQKKQRRVTIDKYKEFLQERELEKKEKLNKFNKAMNAAENEVKKKE----- 349
C.gla      NFKGFEEYQKKQRRVTIDKYKEFLAKREAEKLEKIKNFSKK-----NENKKEK----- 340
A.gos      KFPQFEEYEKKQRRVTIDRYKQFLAERQMEREAKLTLSSKLLS----- 338
K.lac      KYHGFEEYEKKQRRVTIDKYKEFLNKRKLEHQAKLKAMKEKMS----- 339
Y.lip      EYHGTRGYVQKQKEITAQKYKEWVESRSGSSSEDENKAKATEVAGKSTGASTSEQVSSR 351
          :      * . * * : * * * : * * : * .

C.alb      --
D.han      --
P.cif_syrE10_RE11 --
S.cer      --
C.gla      --
A.gos      --
K.lac      --
Y.lip      LE 353

```

Abbildung 52: MSA der Syr2p-Sequenzen verschiedener Hefen. Der AS-Austausch an Stelle 265 (N durch K) in dem Stamm syrE10 RE11 wurde rot unterlegt. Die eigentlich an dieser Stelle hoch konserviert vorliegende AS Asparagin wurde grün unterlegt. (Abkürzungen: *C. alb*: *Candida albicans*, *D. han*: *Debaromyces hansenii*, *P. cif*: *Pichia ciferrii*, *S. cer*: *Saccharomyces cerevisiae*, *C. gla*: *Candida glabrata*, *A. gos*: *Ashbya gossypii*, *K. lac*: *Kluyveromyces lactis*, *Y. lip*: *Yarrowia lipolytica*)

```

1 aacaatttaa tactgaaata aaagttgtaa tatagtataa aatataaaat tcatgagaaa tatgtacaaa aggtttgtaa gatcaccaca
91 ttttcttttaa aatgatctca ccataataat aaaacatcta aagataaaatc aaagggaaacc cacaatgaa aatgaaaaaga attgtataaa
181 catcatgact ttaaacaatt cacttctagt atatgagaga taataaattc attaacagta tttttttttt ctaaattttt taattttttk
271 ywtstamrkk mywyrakymw ayrrarwaww wwgwyrratr mryykrwtaa atatctgaac cttaacgtct catttggtga gttataaaag
361 ctttttgttc ttggaatctt tgaccgactc tttcactgtg tttcaagaat ttttcagaac attttaaac acatgatttt tcttttgaag
451 ttaatgaagc ggaagtgaaa tcatttaacac aatcattgaa acaacgttca accaagtttg agtaaagacg catgaaatct ttcatttggc
541 taccttcaac gattctttgg aaatcttggc gttctctttg gtttaattga tccattttga tggatttgat atagatttga gctttgtagt
631 tctgatcaat taggtacaaa aggtctttca atggcaaaa gttacttttt tgatttttca atgaagtcca aaaggttcaa attttttttt
721 ggtcaacaaa acatcataaa tatccgaatt tggaaaagatt cccgatatgg acaaaatcag gaatcaattg gaattatgat tcatttgagc
811 attatagtgt gaataattct ttagttcttc tggttctttat tatatcaagc ttaaaagaga cactaggcgt occatagatc ggatggctca
901 ttcaagtgtc tcaaaagaaa aaaatagttg cttgattttg gctgtagttag agcttgtagc ggacacgctt ctatgaataa atttgcgca
991 tgagttggat aaatattaac tgaactaatt tcttctaatt gatagagcat catcaatata ttgcacataa tataattcaa aatggttacc
m v t

1081 acattatctt attctcaaa agcagaagct cacccttctc cattggcaaa gcggtttatc aatggtatgg aatcaaaaaa gtcaaaactg
t l s y s q r a e a h p s p l a k r l f n v m e s k k s n l

1171 tgtgcttcaa ttgatgtag aactacaaaa gaatttttac aattagttga cacattaggt ccatatatct gtcttgctcaa aactcatatc
c a s i d v r t t k e f l q l v d t l g p y i c l v k t h i

1261 gatattattg atgattttct attcgaaggt accattaaac cattgaaaga attagcacia aagcacaatt ttttaattct tgaagatcgt
d i i d d f s f e g t i k p l k e l a q k h n f l i f e d r

1351 aaatttgctg ataggggaa cacagtcгаа gcacaatatg caggtgggtc tttcaaaatt gcaacttggc ctgatatcac aaatgctcat
k f a d i g n t v k a q y a g g a f k i a t w s d i t n a h

1441 ggtgttactg gtggtgtag cgttagtgga ttgaaaagag ctgctaaaga agcttctgat gaaccaagag ggttggtag gttggctgaa
g v t g a g i v s g l k e a a k e a s d e p r g l l m l a e

1531 ttgagttcaa aaggttcatt agccaaaaggt gaataacta acaaaactgt tgatctgct aaaactgata aagatttctg tattggtttt
l s s k g s l a k g e y t k q t v d i a k t d k d f v i g f

1621 attgctcaaa atgatatggg tggtagagat ggaggctttg attggttaat tatgacccca ggtgttggtc ttgatgataa aggtgatgcc
i a q n d m g g r d g g f d w l i m t p g v g l d d k g d a

1711 ttaggccaac aatatagatc cgttgatacc gttgtttcaa ctggtagtga tatcattatt gttgtagag gtttggctgg taaaggaaga
l g q q y r s v d t v v s t g s d i i i v g r g l f g k g r

1801 gatccaaatg ctgaaggtga acgttacaga gctgctggtt ggaatgcta tttgaaaaga actggtcaaa tatagtatgt agtttaaatc
d p n a e g e r y r a a g w n a y l k r t g q i -

1891 taacatatta gactaaataa ttaatgggtc ataatttga attagttcaa cgactaacta actgacatta gaaggaagac tctaattgta
1981 taccatgcoa tcaactactcc taattatcaa ataaatcaaa atataacct tctatcatta attagaagat gtaatgtoga tgactaagca
2071 agataaatta aaaccgaaat ccactctgat gtaaaaatac tttcaagtaa ttaccacata gatagaagct caccaaccaa ctatcatcaa
2161 gccagtagat gccattcaag agtgacaaat gtcattggaa aatgagtcca caggatcctc ctttgagaat gagtttgaat atactactgc
2251 ccaaccagaa ttatcaataa aaggatcgag attgattggt gctagtaccg caggataaag agctctaatt tatcaattaa ccaactata
2341 ctaagaacc cctccagca

```

Abbildung 53: Sequenz des *URA3*-Gens aus *P. ciferrii* inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz. Das für Ura3p charakteristische aktive Zentrum (grau unterlegt) wurde mittels des PROSITE-Programms (<http://au.expasy.org/prosite/>) ermittelt.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment Ura3p

```

D.han      --MVKTQTYTERASAHPSVAQRLFKLMDNKKTNLCASVDVKSTEEFLTLIEKLGPIYICL 58
C.alb     -MTVNTKTYSERAEATHASPVQRLFRLMESKKTNLCSIDVDTTKEFLLEIDKLGPIYVCL 59
P.cif_ura -MVTTLSSYSQRAEAHPSPLAKRFLNFMESKKSNNLCASIDVRTTKEFLQLVDTLGPYICL 58
C.gla     ---MSSASYLQRAEAHPSVASKLLKLMHEKKTNLCSLDVTTTSELLKLVDTLGPYICL 57
K.lac     ---MSTKSYTSRAETHASPVASKLLRLMDEKKTNLCSLDVTRSTDELLKLVETLGPYICL 57
S.cer     ---MSKATYKERAATHPSVAAKLFNIMHEKQTNLCSLDVTRTTKELLELVEALGPKICL 57
A.gos     ---MSTKSYAERAKAHNSPVARKLLALMHEKKTNLCSLDVTRSRKLELADTLGPHICL 57
S.pom     MDARVFSYSARAEGMKNPIAKELLALMEEKQSNLSVAVDLTKKSEIILELVDKIGPIYVCV 60
A.ter     MSSKSQLTYGTRARTRHPNPLVKRLFVEAEAKKTNTVTSADVSTTKELLDLADRLGPHIAV 60
A.fum     MSSKSQLTYGARASKHPNPLAKRLEIAEAKKTNTVTSADVTTTRELDDLADRLGPIYIAV 60

```



```

      :*  **      .*: .*: : . *::: .: * : . : * : * : ** : :
D.han      VKTHIDIIDDFSYEGTVVPLLALAKHNFMI FEDRKFADIGNTVKSQYSGGVYKIAQWSD 118
C.alb      IKTHIDIINDFSYESTIEPLELSRKHQFMIFEDRKFADIGNTVKKQYIGGVYKISSWAD 119
P.cif_ura- VKTHIDIIDDFSFEGETIKPLKELAQKHNF LIFEDRKFADIGNTVKAQYAGGAFKIATWSD 118
C.gla      LKTHVDILSDFSFENTVKPLKEMAAXHNF LIFEDRKFADIGNTVKLYTSGVYKIAEWAD 117
K.lac      LKTHVDILDDFSYEGTVVPLKALAEKYKFLIFEDRKFADIGNTVKLYTSGVYRIAESWAD 117
S.cer      LKTHVDILTDFSMEGTVKPLKALS AKYNFL LFEDRKFADIGNTVKLYSAGVYRIAESWAD 117
A.gos      LKTHVDILTDFDIETTVPKPLQLLAAXHNFMI FEDRKFADIGNTVKLYSAGVYRIAESWAD 117
S.pom      IKTHIDVVEDFDQD-MVEKLVALGKKHRFLIFEDRKFADIGNTVKLYSAGVYKIASWAH 119
A.ter      IKTHIDILSDFSDE-TIRGLKALAEKHNF LIFEDRKFADIGNTVQKQYHGGALRISEWAH 119
A.fum      IKTHIDILTDFSVDTINGLNVLAQKHNF LIFEDRKFADIGNTVQKQYHGGALRISEWAH 119
      :***::: ** . : : * : . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
      AS 147
D.han      ITNAHGITGSGIVKGLKEAAQESS---KEPRCLLMLAELSSKGLSLAYGEYTEKTIEIAKS 175
C.alb      ITNAHGVTGNGVVEGLKQGAKEETT---NQEP RCLLMLAELSSVGLSLAYGEYSQKTVEIAKS 178
P.cif_ura- ITNAHGVTGAGIVSGLKAAKEAS---DEPRV LLLMLAELSSKGLSLAKGEYTKQTVDIAKT 175
C.gla      ITNAHGVTGQGI V TGLKQGAEEETT---NEPRCLLMLAELSSKGLSLAHGEYTKGTVDIAKS 174
K.lac      ITNAHGVTGAGIVAGLKQGAQEVTT---KEPRCLLMLAELSSKGLSLAHGEYTKGTVDIAKS 174
S.cer      ITNAHGVTGPGIVSGLKQAAEEVTT---KEPRCLLMLAELSSKGLSLATGEYTKGTVDIAKS 174
A.gos      ITNAHGVTGPGVIAGLKAAKAS---QEPRCLLMLAELSSQGLSLARGDYTAGVVEMAKL 174
S.pom      ITNCHTVPGEGIIQGLKEVGLPLG-----RGLLLLAEMSSKGLSLATGSYTEKTLEWFEK 173
A.ter      I INCSVLP GEGIVEALAQTAQAQDFPYGPERGLLILAEMTSKGLSLATGQYTTASVDYARK 179
A.fum      I INCSVLP GEGIVEALAQTAQAQDFPYGPERCLLVLAEMTSKGLSLATGEYTKASVDYARK 179
      * * . : * * : . * : . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
D.han      DKEFVIGFIAQR-----DMGGTDEGFDWIVMTPGVGLDDKGDGLGQQYRTVDQVVT-T 227
C.alb      DKEFVIGFIAQR-----DMGGQEEGFDWLIMTPGVGLDDKGDGLGQQYRTVDEVVS-T 230
P.cif_ura- DKDFVIGFIAQN-----DMGGRDGGFDWLIMTPGVGLDDKGDALGQQYRSVDTVVS-T 227
C.gla      DKDFVIGFIAQK-----DMGGRDEGFDWLIMTPGVGLDDKGDALGQQYRTVDEVFS-T 226
K.lac      DKDFVIGFIAQN-----DMGGREEGFDWLIMTPGVGLDDKGDALGQQYRTVDEVVS-G 226
S.cer      DKDFVIGFIAQR-----DMGGRDEGYDWLIMTPGVGLDDKGDALGQQYRTVDDVVS-T 226
A.gos      DKDFVIGFIAQR-----DMGGRADGFDWLIMTPGVGLDDKGDGLGQQYRTVDEVVS-D 226
S.pom      HTDFCFGF IAGR-----RFPNLQS--DYITMSPGIGLDVKGDGLGQQYRTPEEVVINC 224
A.ter      YKNFVMGFVSTRSLGEVRSVDSAPSDEEDFVVF T TGVNLSKGD KLGQQYQTPESAIG-R 238
A.fum      YKNFVMGFVSTRALTEVQSDVSSASEDEDFVVF T TGVNLSKGD KLGQQYQTPASAIG-R 238
      .: * : * : : . . * : : : . * : * : * : * : * : * : * : * : * :
D.han      GTDIIIVGRGLFGKGRDPTEGKRYRDAGWNAYLKKTGSL-- 267
C.alb      GTDIIIVGRGLFGKGRDPDIEGKRYRDAGWNAYLKKTGQL-- 270
P.cif_ura- GSDIIIVGRGLFGKGRDPNAEGERYRAAGWNAYLKRTGQI-- 267
C.gla      GTDIIIVGRGLFAKGRDPKTEGERYRKAGWDAYLKRIGN--- 265
K.lac      GSDIIIVGRGLFAKGRDPKVEGERYRNAGWEAYQKRISAPH- 267
S.cer      GSDIIIVGRGLFAKGRDAKVEGERYRKAGWEAYLRRCCQQN- 267
A.gos      GTDVIIVGRGLFDKGRDPNVEGARYRKAGWEAYLRRIGETS- 267
S.pom      GSDIIIVGRGVYGARNPVVEAKRYREAGWKAYQQLRSQH-- 264
A.ter      GADFI IAGRGIYAAA-DPVEAVQRYQKEGWEAYLKRVGNGN 279
A.fum      GADFI IAGRGIYAAP-DPVEAAQRYQKEGWEAYMARVCGKS- 278
      * : * : * : * : * : : . . * : : : . * : * : * : * : * : * : * :

```

Abbildung 54: MSA der Ura3p-Sequenzen verschiedener Hefen. Die in den Uracil-auxotrophen Klonen 10, 14, 20 und 28 vorliegende missense-Mutation, die zu einem Austausch der AS 147 von Glycin durch Valin führt, ist rot unterlegt. Die hoch konserviert an dieser Stelle vorliegende AS Glycin ist grün markiert.

```

      1  aattattctt atctttaaca tcattaccac ttaaccaatt ctttatttga tctctttgtc tttgtaattt cttgatttct cttttcaaat
      91  caccctcaat tttttctctt tgagactgac tttcacaatt ttgaagcttg tcatagtagc catcaaagat ctctagacct tctttaactt
     181  tcttgaagac tttatcaatc tcttgaata attttctttg tgacattgtt aaatctttgt ttaaatctgt atagatgatg aaactgtgtg
     271  tttatcgaag cacttttctc actcaattgg aacgtttttg acttgttaaga aaaccagcgg atagactatt gaacacgtag aattcaaaaa
     361  caattaaaaa acagacacaa taccaactat tcaacacaga attcaccggt gtttgatcca ccaaaattgt cacgtctota ttattccagc
     451  gcttttttct gattttttcc actttttttg gtgagcaaat cgagatccga ccatttttaa agatcggaac tcccggtttt ctgagatttt
     541  ttttttgaca gccgatttcc gaccgatttt ttgagattat cagtcataat gtttttgatg aaagattttg attgtatttg atattgttaa
     631  ctaagtggta agagttcaag caaggtttta tcttggttta aagtgagtaa aagtggtatt gtatcaggaa ttatcaccaat tgtgctttgt
     721  ttcgaggatc attggtgtaa atttcatcca tttcacaagg atctcttcta ctaacatttc caattgatat agatacattt tattcaaaaa

     811  tgtcttcaga tttacaacat tgggctcaaa tattgagtag tccaactctc tcagtattac ctcatgattt cttcgtctct tctaacaaca
           m s s d l q h w a q i l s s p t l s v l p h d f i r p s n n

     901  aagttgttga agctaaacac aatttttcaa ttccagcaaa agcattatca caatctataa tatcgaaagt tgaaggttca aatgaattca
           k v v e a k h n f s i p a k a l s q s i i s k v e g s n e f

```

991 tcattggctct ttcagtccttt gcagcttttga tctatagact aactgggtgat gatgacattg ttatctccac cgactctcca aatggcggta
i i g l s v f a v l i y r l t g d d d i v i s t d s p n g g

1081 aagaatttgt cattagatta accattagtc caactgtttc atttgtggaa ttagtgtaac aaattacaaa attatataat gacaatgtca
k e f v i r l t i s p t v s f v e l v e q i t k l y n d n v

1171 atagagctgt tgattatgat gaattatctg cattgatcca aaaagaaaac ggttatgaaa ctaaaccttc tttattcaga ttaagtttcc
n r a v d y d e l s a l i q k e n g y e t k p s l f r l s f

1261 aatattggtaa tgcctatcaa caattatctg aatattggttc aattagagat ttatcaatct ttgtcaatga tgattcttat gatgtctatt
q y g n a h q q l s e y g s i r d l s i f v n d d s y d v y

1351 ttaattgcttt attatacaaa gatgatcgta ttcaattttt ggctgaacaa tttaaccaat ttttggaaagc tgcgcccac gattcttcat
f n a l l y k d d r i s i l a e q f n q f l e a v a q d s s

1441 tacaagttac taaaataaat ttaatcacca aatctcaaaa acaaatctta ccagatccaa caactgattt agattggctct ggttatagag
l q v t k i n l i t k s q k q i l p d p t t d l d w s g y r

1531 gtgctatcca tgatattttc caagaaaatg cagctaaatt ccagaacgt acttggtttg tggaaactcc aagtttctta acaccagaaa
g a i h d i f q e n a a k f p e r t c v v e t p s f l t p e

1621 aacaagctag agtctttact tataaacata tcaatgaagc ttcaaacatt gttggtaact atttagttaa aactggatc aaaagaggty
k q a r v f t y k h i n e a s n i v g n y l v k t g i k r g

1711 atgttggttat gattttattc tcaagaggty ttgatttaat ggtttcagtt ctcggtgttt taaaagccgg tgctactttc tccgttattg
d v v m i y s s r g v d l m v s v l g v l k a g a t f s v i

1801 atccagctta tctctcagct cgtcaaaaata tttatttaca agttgtctaaa ccaaaaggtt taatcgctat caaaaaagct ggtgtcttgg
d p a y p p a r q n i y l q v a k p k g l i v i k k a g v l

1891 atgaacttgt tgaaaaattc atcaaatgat aattagatgt tgtttctcgt gttcctcaaa ttgaattaca agatgatggg tcagctctcg
d e l v e n y i k d e l d v v s r v p q i e l q d d g s v l

1981 gtggtaaaaa cttggaaggt gaagatgtct tagctgggtt ttcaacaagt tcaactggty ttttggttgg tccagattca aaccaacat
g g k n l e g e d v l a g v s t s s t g v l v g p d s n p t

2071 tatctttcac atcaggttct gaaggtttac caaaagggtt cttgggtaga cttttctctt tagcttatta tttcgattgg atgtccaaga
l s f t s g s e g l p k g v l g r h f s l a y y f d w m s k

2161 cttttaaatt aaactctgat gataaattca ctatgctttc aggtattgca catgatccta ttcaagaga tatgtttaca ccaatctct
t f k l n s d d k f t m l s g i a h d p i q r d m f t p i f

2251 tgggtgctca attattagtt ccaactgctg atgatatcgg taccocaggt aaattagctg aatggatggg taaatcggg gctactgta
l g a q l l v p t a d d i g t p g k l a e w m g k y g a t v

2341 ctcaattaac tccagctatg ggccaattat tctcagctca agctacatct gaaattccat cattaatca tgctttcttt gtaggtgata
t h l t p a m g q l l s a q a t s e i p s l h h a f f v g d

2431 tcttgaccaa aagagattgt ttaagattac aaacattagc taaaatggt ttcattgtca atatgatgg tactactgaa actcaagag
i l t k r d c l r l q t l a k n v f i v n m y g t t e t q r

2521 ctgtttcata ttttgaagtt gcttcaagag ctcatgattc aacattttta gaattcctaaa aagatgtcat gccagctggg aaaggtatgt
a v s y f e v a s r a h d s t f l e s q k d v m p a g k g m

2611 tgaatgttca attattagtt gttaatagaa atgatacttc tcaaacatgt ggtgttggty aagttggtya aatttatggt cgtgctgctg
l n v q l l v v n r n d t s q t c g v g e v g e i y v r a a

2701 gtttagctga aggttattct ggattacctg aattaaatga acaaaaattc gtcaaaaatt ggtagtttga tgctcaacaa tggattgatc
g l a e g y r g l p e l n e q k f v k n w y v d a q q w i d

2791 aagataatca aaaaagtcaa aatgaacctt ggagagaatt ttggaaggt ccaagagata gattatacag aactgggtgat ttaggtcgtt
q d n q k s q n e p w r e f w k g p r d r l y r t g d l g r

2881 atttaccaga tggtaatact gaattgttgg gtagagctga tgatcaagtc aaaattcgtg gggtccgtat tgaattaggt gaattgata
y l p d g n t e c c g r a d d q v k i r g f r i e l g e i d

2971 caaatatttc tcaacatctt ttagttcgtg agaattgtac attagttcgt aaagatgcta ataatgaacc aactttaatt tcttatattg
t n i s q h p l v r e n v t l v r k d a n n e p t l i s y i

3061 ttcaaaaaac tgaagttgct gatttagaaa atttcaaatc atcagttgaa gaattagaaa ataagatga tcaagttggt agtggattag
v p k t e v a d l e n f k s s v e e l e n k d d h v v s g l

3151 ttggttatcg tttattaatt aaagatatca aggcattttt gaaaaaaga tttagttcat atgotatccc aacaattatt gttccattcc
v g y r l l i k d i k a f l k k r l a s y a i p t i i v p f

3241 ataaattacc attaaatcca aatggtaaag ttgataaac aaaattacca ttccaacca ctgcacaact agaagctggt gctaaacatt
h k l p l n p n g k v d k p k l p f p t t a q l e a v a k h

3331 caagtccga ccaagatgat tctcaattca gtgaaactga aggtaaggt cgtgatggtt ggttatcagt cttacctcaa cgtccatcaa
s s a d q d d s q f s e t e g k v r d v w l s v l p q r p s

3421 ctatttccacc agaagattca ttctttgatt taggtgggtca ttcaatctta gctacaagaa tgatttttga attaaagaaa caattagtt
t i s p e d s f f d l g g h s i l a t r m i f e l r k q l v

3511 ttgatttacc attaggtact atcttcaaat tccaacctt taagctttt gctaagaaa tgaacgtgt tcaaaaagggt gatgatgctg
i d l p l g t i f k f p t i k a f a k e i e r v q k g d d v

3601 ccttaccagc tactagttgt gctgaaaata ctgatgagga tttagcaaat aaaccagctg aatattataa agatgctcaa gaattaactg
a l p a t s g a e n t d e d l a n k p a e y y k d a q e l t

3691 aaactgcatt aaaatcaaaa tatgcttcaa gattaagttt ctctaaaaat gaacaaatca gcatttttgt caccgggtgct actgggttct
e t a l k s k y a s r l s f s k n e q i s i f v t g a t g f

3781 taggttcatt cattattgct gatttattga accgtaaatc aaacatcaaaa atcctttgctc atgttcgtgc cgctgataaa gttaaaggct
l g s f i i a d l l n r k s n i k i f a h v r a a d k v k g

3871 tcgaaagatt gaaaaaagct ggtttaacct acggttaattg gaaagatgaa tttgcctcat caattgaagt tgttttaggt gattttcaaa
l e r l k k a g l t y g n w k d e f a s s i e v v l g d l s

3961 aagaacaatt tggtttagat ttccaagctt ggggtaacct gactgaaaca attgatgta ttattcataa tgggtgcttta gttcactggg
k e q f g l d f q a w g n l t e t i d v i i h n g a l v h w

4051 tgtatccata tgataaatta cgtgatgcca atgttatcgg tactatcaac gttttgaatt tagctgcttc tgtaaggct aagtatttct
v y p y d k l r d a n v i g t i n v l n l a a s g k a k y f

4141 catttgtttc ttcaacatca gctttagata ctcaacattt cgttgaatta tctgataaat tacttttga aggtaaagat ggtattccag
s f v s s t s a l d t q h f v e l s d k l l s e g k d g i p

4231 aatctgatga tttacaaggt tctgcttacg gtttaggttc aggttacggt caaagtaaat gggctgctga atatattatc cgtcgtgctg
e s d d l q g s a y g l g s g y g q s k w a a e y i i r r a

4321 gtgaacgtgg tttgaaaggt gctattatta gaccaggtta tgttactggt gaaactaata ctggttcttc aaacactgat gattttttat
g e r g l k g a i i r p g y v t g e t n t g s s n t d d f l

4411 tacgtatgtt gaaaggtgt gctgaattag gtaaatatcc aaacatataat aacaccatca atatgggtccc tgttgatcat gttgcaagag
l r m l k g c a e l g k y p n i n n t i n m v p v d h v a r

4501 ttgttgttgc agctgcctta catccaccaaa aatcagaaga attagctggt gttcaagtta ctggctatcc acgtatcaca tttattcaat
v v v a a a l h p p k s e e l a v v q v t g h p r i t f i q

4591 ttgttgggtgc attgaaaaaa tatggttatg aaattgaatt agaagattat gttacttggg aatcatcatt agaaaaattt gttttggaag
f v g a l k k y g y e i e l e d y v t w k s s l e k f v l e

4681 gtactcaaga aagtgcactt tatccattat tacatattgt tttagatgat ttaccacaag atactaaagc tccagaatta gatgatgta
g t q e s a l y p l l h f v l d d l p q d t k a p e l d d v

4771 atgctcgtac ttcattgaaa gcagatgctg aatggactgg cgttgatgcg tcagctggta gaggtattga tgaacaacaa ttaagcgttt
n a r t s l k a d a e w t g v d a s a g r g i d e q q l s v

4861 acgttgcata cttgattaaa gttggtttct taccaaaacc atcaaaagct ggccaacct taccagaagt taagttaact aaagaacaac
y v a y l i k v g f l p k p s k a g e p l p e v k l t k e q

4951 tcgatttgat tacatctggt gctggttctc gtggtagttc aaattagata gatttgaagt aaaaaaaaa cataaattac gtctgtacat
l d l i t s g a g s r g s s n -

5041 atagttaaaa tattcgtaa ataaattgat ttatagattt tgttacaatt ctgtagagtt tgttatttat taaaccgaat atattatag
5131 tgtattaacc tttgtacata tgaaatctct aattcataaa taaaaactgt aaatcatcag gggtaatctc attaattgca ccatcatcat
5221 ggttaatggt agcatgaatc atatttgctt tcttatcttg taattctata attcttgatt ctatactatc tcaatacaa aatcttgtaa
5311 ttttaacagg tctaaattga ccaattctat gaactctatc accactttgc cattcaacag atggattcca ccaaggatcc attaaagaaa
5401 cttgtgaagc ttcacataaa tttaaagcaa caccaccagc ttccaactg accaagaaaa ctccaacatt tgtattttcc ataaaatgac
5491 gaattgtatt atctctttga ataggtgaca ttgaacctg taatttaaca gttgaaaaac ctgctctttt caatctccat tcaattaaat
5581 ctaacatact tgtaaaattg gaaaacacaa tagatttaat agtttgtcta tcaacttcta atttataag ttcttctact aaagcttcaa
5671 tctttgtaga tgacotccat tcaccaccoca ttttaattct attaaacaat gatgttatta ttcataatgg tgcttttagt cactgggtgt
5761 atccatagta taaattacgt gatgccaatg ttatcggtag tatcaacggt ttgaatttag ctgcttctgg taaggctaag tattttctcat
5851 ttgtttcttc aacatcagct ttagatactc aacatttctg tgaattatct

Abbildung 55: Sequenz des *LYS2*-Gens aus *P. ciferrii* inklusive Promotor- und Terminator-, sowie der abgeleiteten Protein-Sequenz.

1 atgggtacta ctttagatga tactgcttat agatatagaa cttcagttcc agtgatgct gaagctattg aagctttaga tggttcattt
m g t t l d d t a y r y r t s v p g d a e a i e a l d g s f

91 actactgata ctgtttttag agttactgct actgggtgat gttttacttt aagagaagtt ccagttgatc caccattaac taaagttttt
t t d t v f r v t a t g d g f t l r e v p v d p p l t k v f

181 ccagatgatg aatcagatga cgagtctgat gacgggtaag atgggtgatc agattcaaga acttttggty cttatgggtga tgacggagac
p d d e s d d e s d d g e d g d p d s r t f v a y g d d g d

271 ttagctgggt ttgttgggtt tcatattca ggttgaata gaagattaac tgttgaagat attgaagttg ctccagaaca tagaggatc
l a g f v v v s y s g w n r r l t v e d i e v a p e h r g h

361 ggtgttggta gagctttaat gggtttagct actgaatttg ctagagaacg tgggtgctgt catttatggt tagaagttac taatgttaat
g v g r a l m g l a t e f a r e r g a g h l w l e v t n v n

451 gctccagcta ttcactgotta tagaagaatg ggtttcacat tatgtgggtt agatactgct ttatatgatg gtaactgctc agatgggtgaa
a p a i h a y r r m g f t l c g l d t a l y d g t a s d g e

541 caagctttat atatgtcaat gccatgtcca taa
q a l y m s m p c p -

Abbildung 56: Sequenz des codon-optimierten *nat1*-Gens.

```

1  atgcatgttc caggtactag agctaaaatg tcatcaatth ttgcttatca atcatctgaa gttgattggt gtgaatcaaa ttttcaacat
   m h v p g t r a k m s s i f a y q s s e v d w c e s n f q h
91  tcagaattag ttgctgaatt ctataaact ttttcaaatg tttttttcatt aatttttgggt ccattaatga tgtttttaat gcatccatat
   s e l v a e f y n t f s n v f f l i f g p l m m f l m h p y
181 gctcaaaaaa gaactagatg tttttatggt gtttcagttt tattcatggt aattggttta ttttcaatgt attttcatat gactttatca
   a q k r t r c f y g v s v l f m l i g l f s m y f h m t l s
271 tttttaggtc aattattaga tgaaatttca attttatggt tattagcttc aggttattca gtttggttac caagatgta ttttcaaaaa
   f l g q l l d e i s i l w l l a s g y s v w l p r c y f p k
361 tttgttaaag gtaatagatt ttattttctca tgtttagttta ctattactac tattattttca acttttttaa cttttgttaa accaaactgtt
   f v k g n r f y f s c l v t i t t i i s t f l t f v k p t v
451 aatgcttatg ctttaaatc aattgctatt catatcttat acattggttag aactgaatac aaaaaaatta gagatgatga ttttaagacat
   n a y a l n s i a i h i l y i v r t e y k k i r d d d l r h
541 ttaattgctg tttcagttgt tttatggggt gctgctttaa cttcatggat ttcagataga gttttgtggt cttttgtgca aagaattcat
   l i a v s v v l w a a a l t s w i s d r v l c s f w q r i h
631 ttctattatt tgcattcaat ttggcatggt ttaatttcaa ttacttttcc atatggatt gttactatgg ctttagttga tgcaaaaat
   f y y l h s i w h v l i s i t f p y g i v t m a l v d a k y
721 gaaatgccag ataaaacttt aaaagtccat tattggccaa gagattcttg ggttattggt ttaccatag tcgaaattca agaaaatgat
   e m p d k t l k v h y w p r d s w v i g l p y v e i q e n d
811 aaaaattggt aa
   k n c -

```

Abbildung 57: Sequenz der codon-optimierten alkalischen Ceramidase aus Maus.

```

1  atggctgctg cagctgctac tccaagatta gaagctccag aaccaatgcc atcatatgct caaatgttac aaagatcatg ggcttcagct
   m a a a a a t p r l e a p e p m p s y a q m l q r s w a s a
91  tttagctgctg ctcaagggtg ttggtgattgt ggttgggggt tagctagaag aggttttagct gaacatgctc attttagctgc tcagaatta
   l a a a q g c g d c g w g l a r r g l a e h a h l a a p e l
181 ttattagctg ttttatgtgc tttaggttgg actgctttaa gatgggctgc tactactcat attttttagac cattagctaa aagatgtaga
   l l a v l c a l g w t a l r w a a t t h i f r p l a k r c r
271 ttacaaccaa gagatgctgc tagattacca gaatcagctt ggaattatt attctattta gcttggttgt catattgtgc atatttatta
   l q p r d a a r l p e s a w k l l f y l a c w s y c a y l l
361 ttaggctact catatocatt ttttcatgat ccaccatcag tttttatga ttggagatca ggtaggctg ttccatggga tattgctggt
   l g t s y p f f h d p p s v f y d w r s g m a v p w d i a v
451 gcttatttat tacaagggtc attttattgt cattcaatth atgctactgt ttatatggat tcattggagaa aagattcagt tgttatgta
   a y l l q g s f y c h s i y a t v y m d s w r k d s v v m l
541 gttcatcatg ttgttacttt attattaatt gtttcatcat atgcttttag atatacata gttggtttat tagttttttt cttacatgat
   v h h v v t l l l i a s s y a f r y h n v g l l v f f l h d
631 gtttcagatg ttcaattaga atttactaaa ttaaatatth atttcaaagc tagagggtgt gcttatcata gattacatgg ttttagttgct
   v s d v q l e f t k l n i y f k a r g g a y h r l h g l v a
721 aatttaggtt gtttatcatt ttgtttttgt tggttttggt ttagattata ttggtttcca ttaaaagttt tatatgctac ttgtcattgt
   n l g c l s f c f c w f w f r l y w f p l k v l y a t c h c
811 tcattacaat cagttccaga tattccatat tattttctct ttaaatatth attattatta ttaatggta tgaatattta ttggttctta
   s l q s v p d i p y y f f f n i l l l l l m v m n i y w f l
901 tatattggtg cttttgctgc taaagtttta actggctcaa tgagagaatt agaagattta agagaatag atactttaga agctcaaaact
   y i v a f a a k v l t g q m r e l e d l r e y d t l e a q t
991 gcaaaacat gtaaagctga aaaocatta agaattggtt tagttaaaga taaattatc taa
   a k p c k a e k p l r n g l v k d k l f -

```

Abbildung 58: Sequenz der codon-optimierten Ceramid-Synthase (*omLASS1*) aus Maus.

```

1 atgttacaaa ctttatatga ttatTTTTGG tgggaaagat tatggttacc agttaattta acttgggctg atttagaaga taaagatggt
  m l q t l y d y f w w e r l w l p v n l t w a d l e d k d g
91 agagtttatg ctaaagcttc agatttatat attactttac cattagctttt attattctta gttattagat attttttoga attatatggt
  r v y a k a s d l y i t l p l a l l f l v i r y f f e l y v
181 gctactccat tagctgcttt attaaatggt aaagaaaaaa ctagattaag agcaccacca aatgctactt tagaacattt ttatcaaac
  a t p l a a l l n v k e k t r l r a p p n a t l e h f y q t
271 tcaggtaaac aacaaaaaca agttgaagtt gatttattat caagacaatc aggtttatca ggtagacaag ttgaaagatg gtttagaaga
  s g k q p k q v e v d l l s r q s g l s g r q v e r w f r r
361 agaagaatc aagatagacc atcttttatta aaaaaattca gagaagcttc atggagattt acttattatt taattgcttt cgttgctggt
  r r n q d r p s l l k k f r e a s w r f t y y l i a f v a g
451 atggctggtta ctggtgataa accatggttc tatgatttaa gaaaagtttg ggaaggttat ccaattcaat caattattcc atcacaatat
  m a v t v d k p w f y d l r k v w e g y p i q s i i p s q y
541 tgggtattata tgattgaatt atcattctat tggctcattat tatttctcaat tgcttcagat gttaaaagaa aagattttaa agaacaatt
  w y y m i e l s f y w s l l f s i a s d v k r k d f k e q i
631 attcatcatg ttgctactat tatttttatta tggttttcat ggtttgctaa ttatggttaga gctggtactt taattatggc tttacatgat
  i h h v a t i i l l c f s w f a n y v r a g t l i m a l h d
721 gcttcagatt atttattaga atcagctaaa atgtttaatt atgctgggtg gaaaataact tgtaataatt tattcattgt ttttgcatt
  a s d y l l e s a k m f n y a g w k n t c n n l f i v f a i
811 gttttcatta ttactagatt agttattatg ccatttttga ttttacattg tactatgatt tatccattag aattatatcc agctttttt
  v f i i t r l v i m p f w i l h c t m i y p l e l y p a f f
901 ggttattatt tctttaattt catgatggct gttttacaaa tgttacatat tttttgggct tatttcattt taagaatggc tcataaatc
  g y y f f n f m m a v l q m l h i f w a y f i l r m a h k f
991 attactggta aattaattga agatgaaaga tcagatagag aagaactga atcatcagaa ggtgaagaaa ctgctgctgg tgctggtgct
  i t g k l i e d e r s d r e e t e s s e g e e t a a g a g a
1081 aaatcaagat tattagctaa tggctcatcca attttaaata ataatcatcc taaaaatgat taa
  k s r l l a n g h p i l n n n h p k n d -

```

Abbildung 59: Sequenz der codon-optimierten Ceramid-Synthase (*omLASS2*) aus Maus.

```

1 atgtcatttt cattatcaga atggttatgg caagaaactt attggttacc accatcagtt acttgggctg aattagaaga tagagatggt
  m s f s l s e w l w q e t y w l p p s v t w a e l e d r d g
91 ttagtTTTTG ctcatocaca tcatgTTTTa gctgctTTTTc cagttgcttt agttttagtt gctggttagaa ttgTTTTtga aagattttgt
  l v f a h p h h v l a a f p v a l v l v a v r i v f e r f v
181 gctttaccat tatcaagatg gatgggtggt caagatccaa ttagaagaaa aattaaacca aatccagttt tagaaaaata tttcttaaga
  a l p l s r w m g v q d p i r r k i k p n p v l e k y f l r
271 atgaaacaat gtccagaaga aactcaaatg gttttattag ctccacaatg tggtttaaca ttaagacaaa ctcaaaagatg gtttagaaga
  m k q c p e e t q m v l l a s q c g l t l r q t q r w f r r
361 agaagaatc aagatagacc atcattatca aaaaaattct gtgaagcttg ttggagattt gttttctatt tatgttcatt ttgttggtg
  r r n q d r p s l s k k f c e a c w r f v f y l c s f v g g
451 acttcaattt tatatcatga atcatggtta tggctaccat cattatggtg ggaaaattat ccacatcaaa ctttaattt atctttatat
  t s i l y h e s w l w s p s l c w e n y p h q t l n l s l y
541 tgggtggtatt tattagaatt aggtttctat ttatctttat taattaactt accatttgat gttaaaagaa aagattttaa agaacaagtt
  w w y l l e l g f y l s l l i t l p f d v k r k d f k e q v
631 gttcatcatt ttgttctgt tggtttaatt ggtttttcat attcagttaa tttattaaga attgggtgctg ttgTTTTtatt attacatgat
  v h h f v a v g l i g f s y s v n l l r i g a v v l l l h d
721 tgttcagatt atttattaga aggttgtaaa attttaaatt atgctcattt tagaagaggt tgtgatgctt tattcattat gttcgtttta
  c s d y l l e g c k i l n y a h f r r g c d a l f i m f a l
811 gtttttttct atactagatt aattttcttt ccaactcaag ttatttatac ttcagtttat gattctatta aaaattcagg tccattttt
  v f f y t r l i f f p t q v i y t s v y d s i k n s g p f f
901 ggttattatt tctttattgt tttattagtt atgttacaaa ttttacatgt ttattggttt tgtttaattt taagaatggt atattcattt
  g y y f f i v l l v m l q i l h v y w f c l i l r m l y s f
991 ttacataaag gtcaaatgac tgaagatatt agatcagatg ttgaagaacc agattcatca gatgatgaac cagtttcaga aggtccacaa
  l h k g q m t e d i r s d v e e p d s s d d e p v s e g p q
1081 ttaaaaaatg gtatggctag aggttcaaga gttgctgTTa ctaatggTcc aagatcaaga gctgctgctt gtttaactaa tggctcact
  l k n g m a r g s r v a v t n g p r s r a a a c l t n g h t
1171 agagctactt aa
  r a t -

```

Abbildung 60: Sequenz der codon-optimierten Ceramid-Synthase (*omLASS4*) aus Maus.

```

1  atggctactg ctgctgctga aacttttaggt ttattatggg gttggttatg gtcagaatca ttttggttac cacaaaaatgt ttcattggct
   m a t a a a e t l g l l w g w l w s e s f w l p q n v s w a
91  gatttagaag gtccagggtga tggttatggg tatccaagag cacaacatgt tttatcagtt tttccattag ctgtttggat tttttcagtt
   d l e g p g d g y g y p r a q h v l s v f p l a v c i f s v
181  agaatgttat ttgaaagatt tattgctaaa ocattgtgctt taagagtggg tattaagatg tcaccagtta ataaagtga accaaatgat
   r m l f e r f i a k p c a l r v g i k d s p v n k v e p n d
271  acttttagaaa aagtttttgg ttcagttact aaatatccag atgaaaaaag attaaaagggt ttatcaaaac aattagattg gtcagttaga
   t l e k v f v s v t k y p d e k r l k g l s k q l d w s v r
361  aaaattcaat gttggtttag acatagaaga aatcaagata aaccaccaac tttaactaaa ttttggtgaat caatgtggag atttacttat
   k i q c w f r h r r n q d k p p t l t k f c e s m w r f t y
451  tatttatgta ttttttgta tggattatga tttttatggg caatgccatg gttttgggat actagacaat gttggtataa ttatccatat
   y l c i f c y g i r f l w s m p w f w d t r q c w y n y p y
541  caaccattat caagagaatt atattattat tatattactc aattagcttt ttattgggtca ttaatgtttt cacattttat tgatgttaaa
   q p l s r e l y y y y i t q l a f y w s l m f s q f i d v k
631  agaaaagatt tcttaatgat gtttattcat catatgattg gtattatggt gactactttt tcoatgtta ataatatggt tagagtgggt
   r k d f l m m f i h h m i g i m l t t f s y v n n m v r v g
721  gctttaattt tctgtttaca tgattttgct gatccattat tagaagotgc taaaatggct aattatgcta gaagagaaag attatgtact
   a l i f c l h d f a d p l l e a a k m a n y a r r e r l c t
811  actttattcg ttatttttgg tgctgctttt attgtttcaa gattagotat ttttccatta tggattttaa atactactttt atttgaatca
   t l f v i f g a a f i v s r l a i f p l w i l n t t l f e s
901  tgggaaatta ttggtccata tccatcatgg tggttattta atgctttatt attaatttta caagttttac atgctatttg gtottattta
   w e i i g p y p s w w l f n a l l l i l q v l h a i w s y l
991  attgttcaaa ctgcttcaaa agctttatca agaggtaaag ttcaaaaaga tgatagatca gatgttgaat catcatcaga agaagaagat
   i v q t a s k a l s r g k v s k d d r s d v e s s s e e e d
1081  gaaactactc ataaaaataa tttatcaggt tcatcatcat caaatggtgc taattgtatg aatggttata tgggtgggtc acatttagct
   e t t h k n n l s g s s s s n g a n c m n g y m g g s h l a
1171  gaagaacaag gtacttgtaa agctactggg aatttacatt ttagagcttc accacattta cattcatgtg attaa
   e e q g t c k a t g n l h f r a s p h l h s c d -

```

Abbildung 61: Sequenz der codon-optimierten Ceramid-Synthase (*omLASS5*) aus Maus.

```

1  atggctggta ttttagcttg gttttggaat gaaagattct gtttaccaca taatgttact tgggctgatt taaaaaatac tgaagaagct
   m a g i l a w f w n e r f w l p h n v t w a d l k n t e e a
91  acttttccac aagctgaaga tttatattta gcttttccat tagctttttg tatttttatg gtttagattaa ttttcgaaag atttattgct
   t f p q a e d l y l a f p l a f c i f m v r l i f e r f i a
181  aaaccatggt ctattgcttt aaatattcaa gctaatggct cacaaaatgc tcaaccaaat gctatttttag aaaaagtttt tactgtatt
   k p c a i a l n i q a n g p q t a q p n a i l e k v f t a i
271  actaaacatc cagatgaaaa aagattagaa gttttatcaa acaattaga ttgggatggt agatcaattc aaagatgggt tagacaaaga
   t k h p d e k r l e g l s k q l d w d v r s i q r w f r q r
361  agaaatcaag aaaaaccatc aactttaact agattttggt aatcaatggt gagattttca ttctatttat atgttttttc atatgggtgt
   r n q e k p s t l t r f c e s m w r f s f y l y v f s y g v
451  agattcttaa aacaaactcc atggttatgg aatactagac attggttgta taattatoca tatcaacctat taactgctga tttacattat
   r f l k q t p w l w n t r h c w y n y p y q p l t a d l h y
541  tattatattt tagaattatc attttattgg tcattaatgg tttcacaatt tactgatatt aaaagaaaag attttgggtat tatgttttta
   y y i l e l s f y w s l m v s q f t d i k r k d f g i m f l
631  catcatttag ctactatttt cttaaattact tttcatatg ttaataatat ggctagagtt ggtacttttag ttttatgttt acatgatcca
   h h l a t i f l i t f s y v n n m a r v g t l v l c l h d s
721  gctgatgctt tattagaagc tgctaaaatg gctaattatg ctaaatttca aaaaatgtgt gatttattat tcggtatggt tgctgttggt
   a d a l l e a a k m a n y a k f q k m c d l l f v m f a v v
811  tttattacta ctagattagg tattttttcca ttatgggttt taaatactac tttatttgaa tcoatgggaaa ttgtgtgtcc atatccatca

```

f i t t r l g i f p l w v l n t t l f e s w e i v g p y p s

901 tgggtgggttt tcaatttatt attgttatta ttacaaggtt taaattgttt ttggtcatat ttaattgtta aaattgcttg taaaactggt
w w v f n l l l l l l q g l n c f w s y l i v k i a c k t v

991 tcaaaaggta aagtttcaaa agatgataga tcagatattg aatcatcttc agatgatgaa gattcagaac caccaggtaa aaaaccacat
s k g k v s k d d r s d i e s s s d d e d s e p p g k k p h

1081 tcactcaacta ctactaatgg tacttcagggt actaatgttt atttattaac tgggtccatgt tcagttgatg attaa
s s t t t n g t s g t n g y l l t g p c s v d d -

Abbildung 62: Sequenz der codon-optimierten Ceramid-Synthase (*omLASS6*) aus Maus.

1 atggctgaaa attctttatt aaaaccacca tcattatcaa gaaaaagatc atcatcagtt ggtaaatattg gtttagtgta tactaaagtt
m a e n s l l k p p s l s r k r s s s v g n i g l g d t k v

91 ccagggttat caactatgtc agaatcaaaa gaatcaaaaa ttgctgctag agctagatta agagctttat cagggtgcttc aaaaactgat
p g l s t m s e s k e s k i a a r a r l r a l s g a s k t d

181 attgatattt attataaatt atggttatca tatagagaat taaattatag acatgcttgg ttgactccat taattatttt attcttaatt
i d i y y k l w l s y r e l n y r h a w l t p l i i l f l i

271 tattcatggt attttgcttc aggtaataga actgaatcaa atccattaca tatgtttggt gctatttcat atagagtgg taataactaat
y s c y f a s g n r t e s n p l h m f v a i s y r v g n t n

361 atgtatggta aagggtgtaa agatatgtgt tttgttttct attatatggt tttttttact tttttaagag aatttatgat ggaatgggt
m y g k g v k d m c f v f y y m v f f t f l r e f m m e m v

451 ttaagaccat taacttttag attagggtgt actaaaccac ataaagttaa aagaatgatg gaacaagctt attcaacttt ctattatggt
l r p l t f r l g v t k p h k v k r m m e q a y s t f y y g

541 ttatcaggtc catttggttt atttgttatg tatagaactg atttatggtt attcaaaact gctgaaatgt ataaaactta tcagattta
l s g p f g l f v m y r t d l w l f k t a e m y k t y p d l

631 actaatgaat attattataa aattttctat ttaggccaag ctgctttttg ggctcaacaa gcttgatttt tagttttaca attagaaaaa
t n e y y y k i f y l g q a a f w a q q a c i l v l q l e k

721 ccaagaaaag attttagaga attagttttt catcatattg ttacttttagc attaatttca ttatcatatg tttttcattt tactaaaatg
p r k d f r e l v f h h i v t l a l i s l s y v f h f t k m

811 ggtttagctg tttatattac tatggatggt tcagattttt tcttagcttt atcaaaaatt ttcaattata tggatcatc atttactgct
g l a v y i t m d v s d f f l a l s k i f n y m e s s f t a

901 ccattattct tattatttgt ttcatcatgg gtttatttaa gacattatgt taatattaaa attttatggt cagtttttaac tgaatttaga
p l f l l f v s s w v y l r h y v n i k i l w s v l t e f r

991 actggttggtg attatacttt aaatctgct actgaacaat ataaatcatg gattgcttta ccaattggtt ttggtttaat tttcgcttta
t v g d y t l n f a t e q y k s w i a l p i v f g l i f a l

1081 catttagtta atttatattg gttagcttta attttcagaa ttttatatag aatgttattt caagggttcc aaaaagatga aagatctgat
h l v n l y w l a l i f r i l y r m l f q g v q k d e r s d

1171 tcagaatctg aagataatga agaagaatta gatgattcat cagatgaaac tgataaaaa aaaaatcaat aa
s e s e d n e e e l d d s s d e t d k k k n q -

Abbildung 63: Sequenz der codon-optimierten Ceramid-Synthase (*oAgLAG1*) aus *Ashbya gossypii*.

1 atgtcaggtc aagttagaca aagatttgc aaagatcaac atgctggctc acaaatgaa gttgaatatg gttcaaaaga tctgctttt
m s g q v r q r f a k d q h a g s q i e v e y g s k d a a f

91 gaagctgata aatcagttga attagaagaa agagaagaat tattaccaat tagaggctaa tttagctggtt caaaagtga tttatatact
e a d k s v e l e e r e e l l p i r g q l a v s k v d l y t

181 gtttatgctt ctgggtgctt attagttgct tttagctgtg gttttttaag acaagctgct tgggtgata aattcttaag attacaatat
v y a s g a l l v a l a v g f l r q a a w c d k f l r l q y

271 gcttcagttg aatcaccagg taaatatgat attggattg atgatgotta tattgttgggt actttcgttg ttgttttatg tttagttaga
a s v e s p g k y d i g i d d a y i v g t f v v v l c l v r

361 tcactattat tagaatttgt tttaaaacca tttagctcatt ataaattcag aatttcatca ggtaaaatc acaaaagata tggatgaacaa
s s l l e f v l k p l a h y k f r i s s g k i q q r y g e q

451 tcactgctcaa tggttatatta tactgcttca tgggttactg gtttctattt atattatcat tcaccatatt tcttaaatg tgatcatatt
s w s m l y y t a s w v t g f y l y y h s p y f l n c d h i

```

541  tattttaaatt ggccacatga taaaatggct ggtgttttta aagtttatta tttagttcaa attgcttcat ggttacaaca aattattggt
    y l n w p h d k m a g v f k v y y l v q i a s w l q q i i v
631  ttaaattgttg aagaaaaaag aaaagattat tggcaaatgt ttgctcatca tattattact gttgctttaa ctactggttc ttattattat
    l n v e e k r k d y w q m f a h h i i t v a l t t g s y y y
721  tatttcaata gaattggcca tegtatttta attattatgg atgttggtga tattttatta tcatcagcta aaattttaaa atattgtggt
    y f n r i g h v i l i i m d v v d i l l s s a k i l k y c g
811  ttttcagttg cttgtgatta tatgtttggt gtttttttag gtttttgggt tgttttaaga catggtgttt ataattatat tttacatcat
    f s v a c d y m f v v f l g f w v v l r h g v y n y i l h h
901  gcttgggcta aatcaagagg tttaatgcaa aatcaaagat gtgggtttca tgcctcagggt actagatggt ggactccatt agttattgat
    a w a k s r g l m q n q r c g v h a p g t r c w t p l v i d
991  atttttggtt tattattagc tggtttaca ttaattactg ttatttggtc attcttaatt gttaaagttt ttaatgaaagt tattagaggt
    i f v l l l a g l q l i t v i w s f l i v k v f m k v i r g
1081 tcaggtgctg aagatggttag atcagatgat gaagaataa
    s g a e d v r s d d e e -

```

Abbildung 64: Sequenz der codon-optimierten Ceramid-Synthase (*oAgLAF1*) aus *Ashbya gossypii*.

```

1  atgtattgtg gtacttcagg tttaagagat ttcattgatg cagatattat ggaatggct caattctcag ttattatggt ttcatttgct
    m y c g t s g l r d f m y a d i m e m a q f s v i m f s f a
91  acaattttaa gaacttttgt tatgatttat attttagatc cattatcaga aattatgggt agaccagaaa gagttttaaa atttcaacaa
    t i l r t f v m i y i l d p l s e i m v r p e r v l k f q q
181 tcagcttggga gatttggttt atattcaatt gctactatct catcaattat tgtttttatg actgatgata ctggtgattt taaagaatct
    s a w r f v l y s i a t i s s i i v f m t d d t v d f k e s
271 tcattttctg aaaatgggcc attatataat ccaggttcag gtattaaatt catgtatgca ttatatgctg gtttctatat tcatcaaact
    s f f e n w p l y n p g s g i k f m y a l y a g f y i h q t
361 gtttataatt tcgggtatga aagattagat gattttaatg aacatgtttt tcatcatgct attacttttag ttttagttta tgtttcatgg
    v y i f g d e r l d d f n e h v f h h a i t l v l v y v s w
451 gttttcaatt tcaactaaaat tggtttttct attatgactt tacatgatgg ttcagatggt tttttagaat tagctaaaatg tatgaattat
    v f n f t k i g f f i m t l h d g s d v f l e l a k c m n y
541 gctaaagaaa ttagaccaag attatcaatt atttcagatg tttcatcoat tatttttgct tcatcatttt tctattttaag attatattta
    a k e i r p r l s i i s d v s f i i f a s s f f y l r l y l
631 tatccagttt atgctattgg ttcaattggt aatccatag atgcttggc tcatgtttca tgtgctttat atgaaggtgg tgtttcatat
    y p v y a i g s i v n p y d a c a h v s c a l y e g g v s y
721 tcatattgtg cttaaaaacc aatttatgct gttgctattg ctgctttaac ttcattatat attttacaag ttaattgtggc tggtagaatt
    s y c a s k p i y a v a i a a l t s l y i l q v m w a g r i
811 ataatgttta ttgctaaagt tattgctggt aatccattag aagattcaag agattaa
    i n v i a k v i a g n p l e d s r d -

```

Abbildung 65: Sequenz der codon-optimierten Ceramid-Synthase (*oCvLAG1*) aus *Coccolithovirus*.

11.2 Übersicht über die Ergebnisse der qRT-PCR's

Die Tabellen zeigen die Ergebnisse verschiedener Probenarten: die Proben selbst (*sample*) und die Leerwert-Kontrollen (*blank*; NTC: *no template control*) ohne Zugabe eines Templates.

Bei den Proben selbst ist zwischen den eigentlichen Proben und den -RT-Kontrollen zu unterscheiden. Es finden sich zu jeder Probe eine entsprechende -RT-Kontrolle. Diese -RT-Kontrolle beinhaltet als Template RNA, die nicht mittels der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben wurde. Dies dient der Sicherstellung, dass das in den eigentlichen Proben während der qRT-PCR amplifizierte Fragment auf cDNA und nicht auf genomische DNA als Template zurückgeht. Der entsprechende Unterschied zwischen diesen beiden C(T)-Werten findet sich jeweils in der letzten Spalte der Tabellen.

Der Stamm dessen mRNA-Spiegel eines bestimmten Gens in dem jeweiligen Experiment bestimmt wurden, ist blau unterlegt.

In Bezug auf die C(T)-Werte weisen rot unterlegte Kästchen entweder auf das Fehlen eines Amplifikats nach 45 Zyklen (*None*) oder auf ein Amplifikat das aufgrund seiner Abweichung von der erwarteten Schmelztemperatur als unspezifisch zu bezeichnen ist, hin. Zur Amplifikation unspezifischer Amplifikate kam es in allen Fällen lediglich bei den Leerwert-, sowie bei den -RT-Kontrollen, so dass diese das Ergebnis nicht beeinflusst haben.

Der $\Delta C(T)$ -Wert errechnet sich aus der Differenz des C(T)-Werts des untersuchten Stammes zu dem des Referenzstammes (Transformante mit Leervektor oder Ausgangsstamm). Dies wird sowohl für das Gen von Interesse, als auch für die Haushaltsgene (*ACT1* und *GAPDH = TDH1*) durchgeführt.

Der $\Delta\Delta C(T)$ -Wert errechnet sich dann aus der Differenz von $\Delta C(T)$ -Wert des Gens von Interesse zu dem eines der beiden Haushaltsgene, so dass sich jeweils ein $\Delta\Delta C(T)$ -Wert pro Haushaltsgen ergibt.

Abschließend gibt der $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ -Wert den entsprechenden Unterschied der mRNA-Spiegel des Gens von Interesse im Vergleich zu dem Ausgangsstamm oder der Transformante mit leerem Vektor normalisiert auf eines der beiden Haushaltsgene an (blau unterlegt).

Tabelle 14: qRT-PCR zum Nachweis der erhöhten mRNA-Spiegel des *DES1*-Gens unter Kontrolle des *PDA1*-Promotors.

Typ	Bezeichnung	C(T)	$\Delta C(T)$	$\Delta\Delta C(T)$ GAPDH	$\Delta\Delta C(T)$ ACT	$2^{-\Delta\Delta C(T)}$ (GAPDH)	$2^{-\Delta\Delta C(T)}$ (ACT)	Probe - (-RT Kontrolle)
Sample	syrE10 RE11 x pDB006 Klon6 DES1	27,0						7
Sample	syrE10 RE11 x pDB006 Klon6 ACT	22,3						13
Sample	syrE10 RE11 x pDB006 Klon6 GAPDH	24,0						> 21
Sample	syrE10 RE11 x pDB006 Klon6 DES1 -RT	33,5						
Sample	syrE10 RE11 x pDB006 Klon6 ACT -RT	35,5						
Sample	syrE10 RE11 x pDB006 Klon6 GAPDH -RT	None						
Sample	syrE10 RE11 x pDB007 Klon7 DES1	24,2	-2,8	-2,4	-2,0	5	4	9
Sample	syrE10 RE11 x pDB007 Klon7 ACT	21,5	-0,8					13
Sample	syrE10 RE11 x pDB007 Klon7 GAPDH	23,6	-0,4					> 21
Sample	syrE10 RE11 x pDB007 Klon7 DES1 -RT	32,9						
Sample	syrE10 RE11 x pDB007 Klon7 ACT -RT	34,8						
Sample	syrE10 RE11 x pDB007 Klon7 GAPDH -RT	None						
Blank	NTC DES1	33,3						
Blank	NTC ACT	None						
Blank	NTC GAPDH	None						

Tabelle 15: qRT-PCR zum Vergleich der mRNA-Spiegel der Gene *LCB1*, *LCB2*, *TSC10* und *SYR2* des WT's und des Stammes COS22A.

Typ	Bezeichnung	C(T)	$\Delta C(T)$	$\Delta\Delta C(T)$ GAPDH	$\Delta\Delta C(T)$ ACT	$2^{-\Delta\Delta C(T)}$ (GAPDH)	$2^{-\Delta\Delta C(T)}$ (ACT)	Probe - (-RT Kontrolle)
Sample	PcWT LCB1	20,9						>24
Sample	PcWT LCB2	20,5						16
Sample	PcWT TSC10	22,0						>23
Sample	PcWT SYR2	20,2						15
Sample	PcWT ACT	19,7						19
Sample	PcWT GAPDH	21,1						>24
Sample	PcWT LCB1 -RT	42,5						
Sample	PcWT LCB2 -RT	36,1						
Sample	PcWT TSC10 -RT	None						
Sample	PcWT SYR2 -RT	35,1						
Sample	PcWT ACT -RT	39,0						
Sample	PcWT GAPDH -RT	None						
Sample	COS22A LCB1	20,6	-0,2	0,6	-0,4	0,7	1,4	>24
Sample	COS22A LCB2	20,5	0,0	0,8	-0,2	0,6	1,2	15
Sample	COS22A TSC10	22,1	0,1	0,9	-0,1	0,5	1,1	16
Sample	COS22A SYR2	19,5	-0,7	0,1	-0,9	0,9	1,8	16
Sample	COS22A ACT	19,9	0,2					16
Sample	COS22A GAPDH	20,3	-0,8					21
Sample	COS22A LCB1 -RT	34,2						
Sample	COS22A LCB2 -RT	35,9						
Sample	COS22A TSC10 -RT	37,6						
Sample	COS22A SYR2 -RT	35,4						
Sample	COS22A ACT -RT	36,0						
Sample	COS22A GAPDH -RT	40,9						
Blank	LCB1	39,4						
Blank	LCB2	None						
Blank	TSC10	None						
Blank	SYR2	None						
Blank	ACT	None						
Blank	GAPDH	None						

Tabelle 16: qRT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Spiegel des *SYR2*-Gens in verschiedenen Syringomycin-E resistenten SA-produzierenden *P. ciferrii*-Stämmen.

Typ	Bezeichnung	C(T)	$\Delta C(T)$	$\Delta\Delta C(T)$ GAPDH	$\Delta\Delta C(T)$ ACT	$2^{-\Delta\Delta C(T)}$ (GAPDH)	$2^{-\Delta\Delta C(T)}$ (ACT)	Probe - (-RT Kontrolle)
Sample	WT SYR2	20,5						17
Sample	WT ACT	20,3						20
Sample	WT GAPDH	21,8						>23
Sample	WT SYR2 -RT	37,2						
Sample	WT ACT -RT	40,2						
Sample	WT GAPDH -RT	None						
Sample	syrE10 RE11 SYR2	20,3	-0,3	-0,2	-0,3	1,13	1,21	15
Sample	syrE10 RE11 ACT	20,3	0,0					18
Sample	syrE10 RE11 GAPDH	21,7	-0,1					>23
Sample	syrE10 RE11 SYR2 -RT	34,9						
Sample	syrE10 RE11 ACT -RT	38,2						
Sample	syrE10 RE11 GAPDH -RT	None						
Sample	SPS103 SYR2	20,5	-0,1	-0,2	0,0	1,18	1,03	17
Sample	SPS103 ACT	20,2	0,0					18
Sample	SPS103 GAPDH	22,0	0,2					>22
Sample	SPS103 SYR2 -RT	37,1						
Sample	SPS103 ACT -RT	38,2						
Sample	SPS103 GAPDH -RT	None						
Sample	COS22A SYR2	20,1						15
Sample	COS22A ACT	20,7						17
Sample	COS22A GAPDH	21,5						>23
Sample	COS22A SYR2 -RT	35,6						
Sample	COS22A ACT -RT	37,5						
Sample	COS22A GAPDH -RT	None						
Sample	syr2 1-3 RE10 SYR2	24,4	4,3	3,1	4,7	0,12	0,04	11
Sample	syr2 1-3 RE10 ACT	20,3	-0,4					16
Sample	syr2 1-3 RE10 GAPDH	22,8	1,2					>22

Sample	syr2 1-3 RE10 SYR2 -RT	35,6						
Sample	syr2 1-3 RE10 ACT -RT	36,1						
Sample	syr2 1-3 RE10 GAPDH -RT	None						
Sample	syr2 1-3 RE23 SYR2	24,3	4,1	2,8	4,6	0,15	0,04	13
Sample	syr2 1-3 RE23 ACT	20,2	-0,5					18
Sample	syr2 1-3 RE23 GAPDH	22,9	1,4					>22
Sample	syr2 1-3 RE23 SYR2 -RT	37,5						
Sample	syr2 1-3 RE23 ACT -RT	38,5						
Sample	syr2 1-3 RE23 GAPDH -RT	None						
Blank	SYR2	None						
Blank	ACT	None						
Blank	GAPDH	None						

Tabelle 17: qRT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Spiegel des *URA3*-Gens in den vom WT abgeleiteten Uracil-auxotrophen *P. ciferrii* Mutanten.

Typ	Bezeichnung	C(T)	$\Delta C(T)$	$\Delta\Delta C(T)$ GAPDH	$\Delta\Delta C(T)$ ACT	$2^{-\Delta\Delta C(T)}$ (GAPDH)	$2^{-\Delta\Delta C(T)}$ (ACT)	Probe - (-RT Kontrolle)
Sample	PcWT URA3	23,4						7
Sample	PcWT ACT	20,3						11
Sample	PcWT GAP	21,3						16
Sample	PcWT URA3 -RT	30,3						
Sample	PcWT ACT -RT	31,4						
Sample	PcWT GAP -RT	37,8						
Sample	PcWT ura- Klon6 URA3	25,9	2,5	2,6	2,5	0,2	0,2	5
Sample	PcWT ura- Klon6 ACT	20,3	0,0					11
Sample	PcWT ura- Klon6 GAP	21,2	-0,1					17
Sample	PcWT ura- Klon6 URA3 -RT	31,0						
Sample	PcWT ura- Klon6 ACT -RT	31,5						
Sample	PcWT ura- Klon6 GAP -RT	37,8						
Sample	PcWT ura- Klon10 URA3	23,3	-0,1	0,0	-0,2	1,0	1,1	8
Sample	PcWT ura- Klon10 ACT	20,4	0,1					12
Sample	PcWT ura- Klon10 GAP	21,2	-0,2					16
Sample	PcWT ura- Klon10 URA3 -RT	31,6						
Sample	PcWT ura- Klon10 ACT -RT	31,9						
Sample	PcWT ura- Klon10 GAP -RT	37,6						
Sample	PcWT ura- Klon14 URA3	23,6	0,1	0,2	-0,2	0,8	1,1	7
Sample	PcWT ura- Klon14 ACT	20,6	0,3					10
Sample	PcWT ura- Klon14 GAP	21,2	-0,1					16
Sample	PcWT ura- Klon14 URA3 -RT	30,9						
Sample	PcWT ura- Klon14 ACT -RT	31,1						
Sample	PcWT ura- Klon14 GAP -RT	37,3						
Sample	PcWT ura- Klon20 URA3	22,9	-0,5	-0,2	-0,4	1,1	1,3	8
Sample	PcWT ura- Klon20 ACT	20,2	-0,1					11
Sample	PcWT ura- Klon20 GAP	21,0	-0,3					16
Sample	PcWT ura- Klon20 URA3 -RT	30,8						
Sample	PcWT ura- Klon20 ACT -RT	31,4						

Sample	PcWT ura- Klon20 GAP -RT	37,4						
Sample	PcWT ura- Klon28 URA3	23,9	0,5	0,3	0,3	0,8	0,8	7
Sample	PcWT ura- Klon28 ACT	20,5	0,2					11
Sample	PcWT ura- Klon28 GAP	21,5	0,2					15
Sample	PcWT ura- Klon28 URA3 -RT	31,3						
Sample	PcWT ura- Klon28 ACT -RT	31,2						
Sample	PcWT ura- Klon28 GAP -RT	37,0						
Blank	URA3	31,4						
Blank	ACT	31,5						
Blank	GAP	38,0						

Tabelle 18: qRT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Spiegel des *LYS2*-Gens der Lysin-auxotrophen *P. ciferrii*-Stämme.

Typ	Bezeichnung	C(T)	$\Delta C(T)$	$\Delta\Delta C(T)$ GAPDH	$\Delta\Delta C(T)$ ACT	$2^{-\Delta\Delta C(T)}$ (GAPDH)	$2^{-\Delta\Delta C(T)}$ (ACT)	Probe - (-RT Kontrolle)
Sample	WT LYS2	21,2						17
Sample	WT ACT	19,4						19
Sample	WT GAP	20,5						>24
Sample	WT LYS2 -RT	38,5						
Sample	WT ACT -RT	38,1						
Sample	WT GAP -RT	None						
Sample	WT lys- Klon7 LYS2	22,1	0,8	0,6	0,7	0,7	0,6	>23
Sample	WT lys- Klon7 ACT	19,5	0,1					17
Sample	WT lys- Klon7 GAP	20,8	0,3					>24
Sample	WT lys- Klon7 LYS2 -RT	None						
Sample	WT lys- Klon7 ACT -RT	36,4						
Sample	WT lys- Klon7 GAP -RT	None						
Sample	WT lys- Klon12 LYS2	26,0	4,8	3,4	4,4	0,1	0,0	>19
Sample	WT lys- Klon12 ACT	19,8	0,4					17
Sample	WT lys- Klon12 GAP	21,9	1,4					>23
Sample	WT lys- Klon12 LYS2 -RT	None						
Sample	WT lys- Klon12 ACT -RT	37,2						
Sample	WT lys- Klon12 GAP -RT	None						
Sample	WT lys- Klon13 LYS2	22,0	0,8	-0,2	0,1	1,1	0,9	>23
Sample	WT lys- Klon13 ACT	20,1	0,7					>25
Sample	WT lys- Klon13 GAP	21,5	1,0					>24
Sample	WT lys- Klon13 LYS2 -RT	None						
Sample	WT lys- Klon13 ACT -RT	None						
Sample	WT lys- Klon13 GAP -RT	None						
Sample	WT lys- Klon13 x pDB012 Klon1 LYS2	20,9	-0,3	-1,3	-1,0	2,5	2,0	17
Sample	WT lys- Klon13 x pDB012 Klon1 ACT	20,1	0,7					18
Sample	WT lys- Klon13 x pDB012 Klon1 GAP	21,5	1,0					>23
Sample	WT lys- Klon13 x pDB012 Klon1 LYS2 -RT	38,0						
Sample	WT lys- Klon13 x pDB012 Klon1 ACT -RT	37,6						

Sample	WT lys- Klon13 x pDB012 Klon1 GAP -RT	None						
Sample	WT lys- Klon13 x pDB012 Klon2 LYS2	20,8	-0,4	-1,1	-0,7	2,2	1,6	17
Sample	WT lys- Klon13 x pDB012 Klon2 ACT	19,7	0,3					>25
Sample	WT lys- Klon13 x pDB012 Klon2 GAP	21,2	0,7					>24
Sample	WT lys- Klon13 x pDB012 Klon2 LYS2 -RT	37,8						
Sample	WT lys- Klon13 x pDB012 Klon2 ACT -RT	None						
Sample	WT lys- Klon13 x pDB012 Klon2 GAP -RT	None						
Sample	WT lys- Klon13 x pDB012 Klon4 LYS2	21,9	0,7	-0,6	0,0	1,5	1,0	17
Sample	WT lys- Klon13 x pDB012 Klon4 ACT	20,0	0,6					>25
Sample	WT lys- Klon13 x pDB012 Klon4 GAP	21,8	1,3					>23
Sample	WT lys- Klon13 x pDB012 Klon4 LYS2 -RT	39,0						
Sample	WT lys- Klon13 x pDB012 Klon4 ACT -RT	None						
Sample	WT lys- Klon13 x pDB012 Klon4 GAP -RT	None						
Blank	NTC LYS2	None						
Blank	NTC ACT	None						
Blank	NTC GAP	None						

11.3 Plasmide

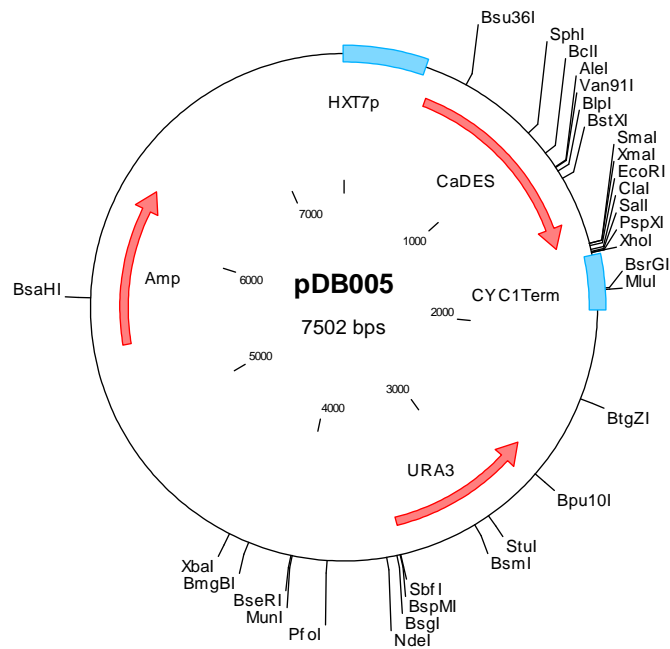


Abbildung 66: Vektor pDB005 dient der Expression des *DES1*-Gens aus *Candida albicans* in *S. cerevisiae* unter Kontrolle des *HXT7*-Promotors.

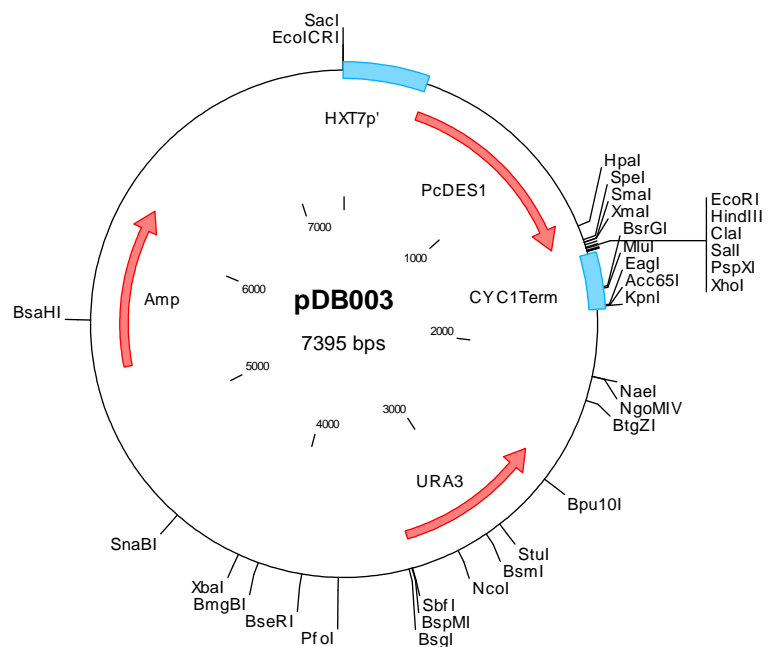


Abbildung 67: Vektor pDB003 dient der Expression des *DES1*-Gens aus *P. ciferrii* in *S. cerevisiae* unter Kontrolle des *HXT7*-Promotors.

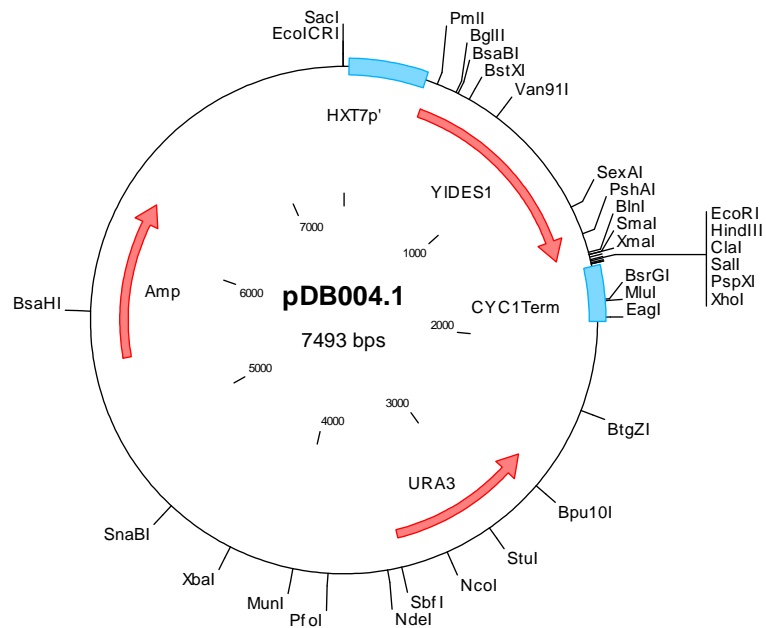


Abbildung 68: Vektor pDB004.1 dient der Expression des *DES1*-Gens aus *Yarrowia lipolytica* in *S. cerevisiae* unter Kontrolle des *HXT7*-Promotors.

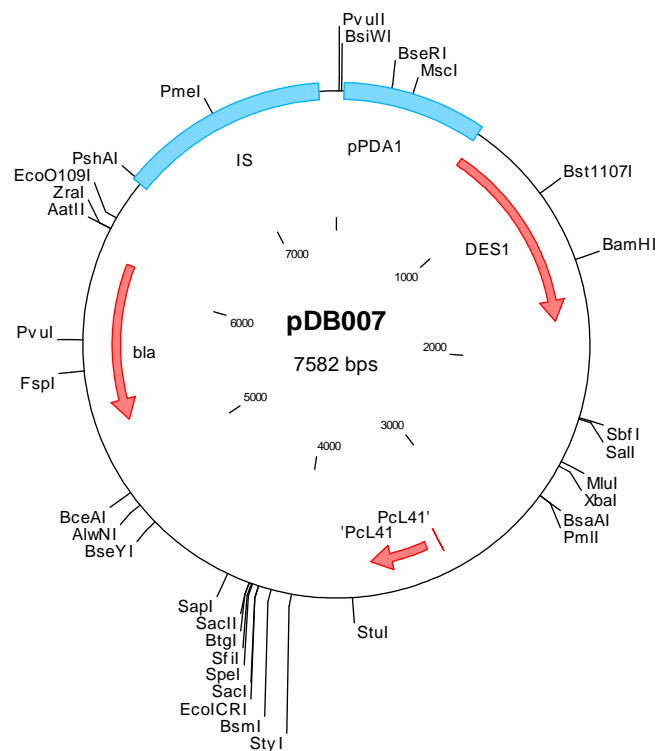


Abbildung 69: Vektor pDB007 integriert in den intergenischen Bereich zwischen der 5S- und der 26S-rDNA und dient der homologen Überexpression des *DES1*-Gens in *P. ciferrii* unter Vermittlung einer Resistenz gegen Cycloheximid. Die Linearisierung des Vektors vor der Transformation erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *PmeI*.

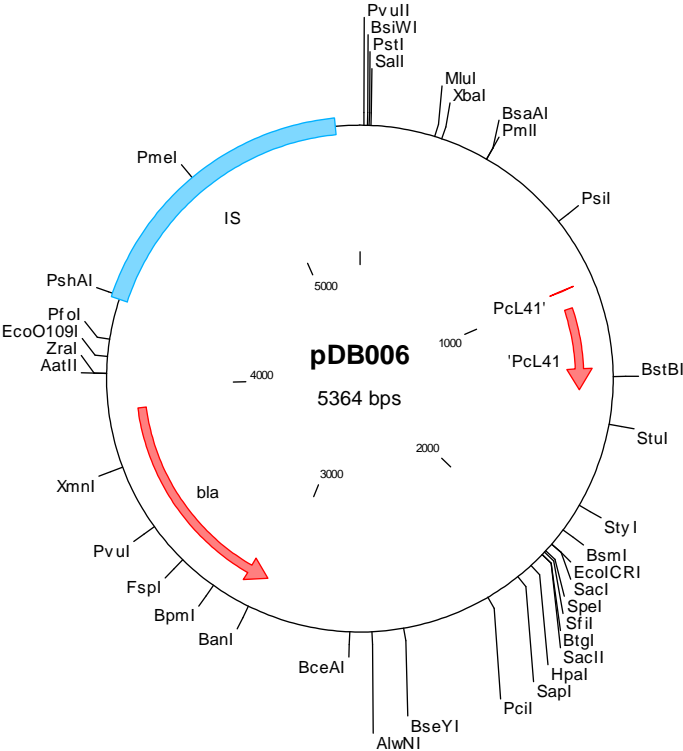


Abbildung 70: Vektor pDB006 ist der Leervektor analog zu Vektor pDB007.

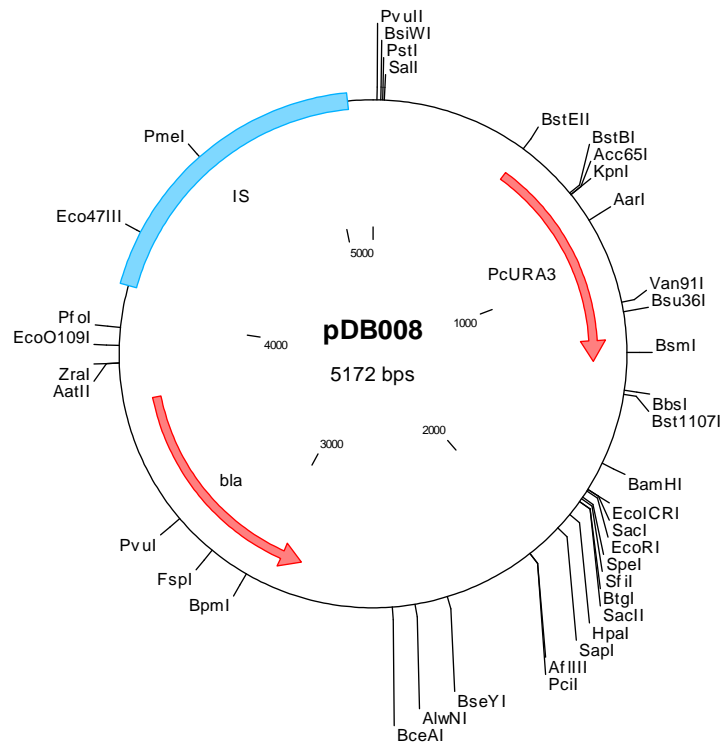


Abbildung 71: Vektor pDB008 dient der Komplementation einer *URA3*-basierten Uracil-Auxotrophie in *P. ciferrii* und integriert im intergenischen Bereich zwischen der 5S- und der 26S-rDNA. Die Linearisierung des Vektors vor der Transformation erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *PmeI*.

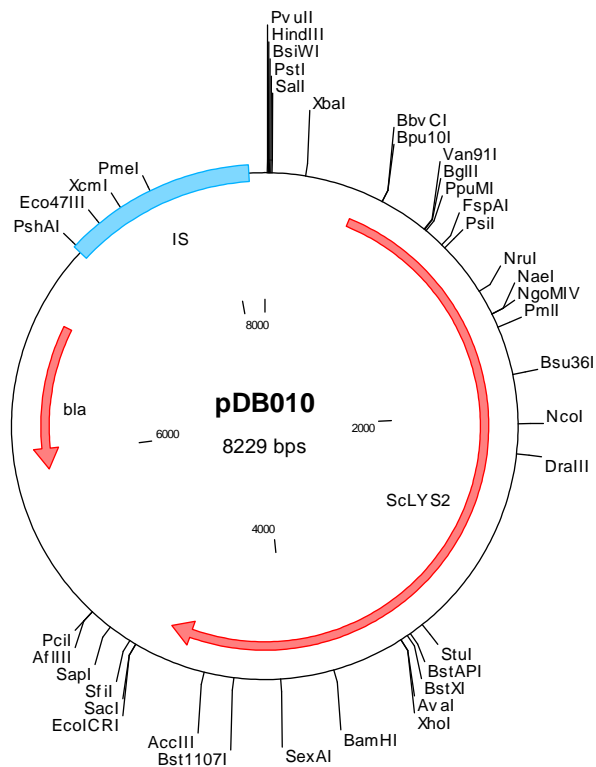


Abbildung 72: Vektor pDB010 enthält das *LYS2*-Gen aus *S. cerevisiae* und diente dem Versuch der Komplementation einer Lysin-Auxotrophie in *P. ciferrii*. Die Integration findet im intergenischen Bereich zwischen der 5S- und der 26S-rDNA statt. Die Linearisierung des Vektors vor der Transformation erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *PmeI*.

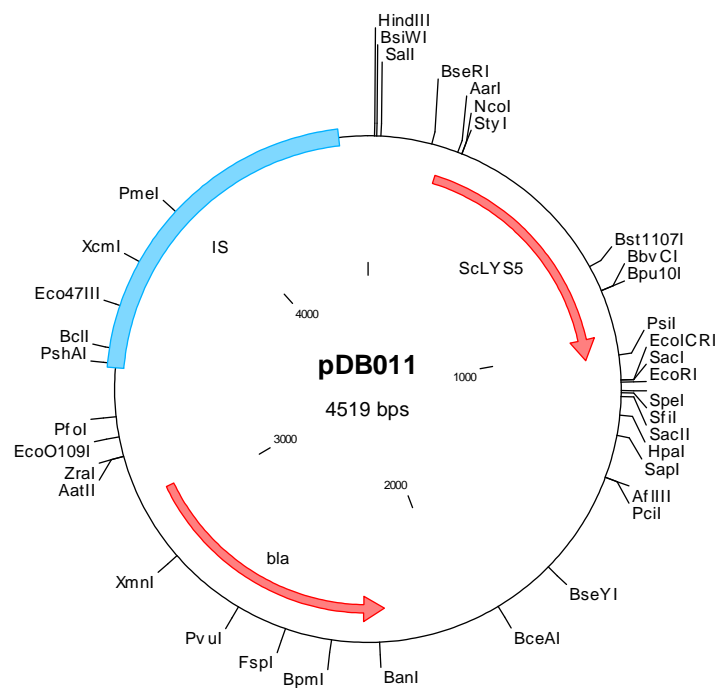


Abbildung 73: Vektor pDB011 ist das Pendant zu Vektor pDB010, enthält allerdings das *LYS5*-Gen aus *S. cerevisiae*.

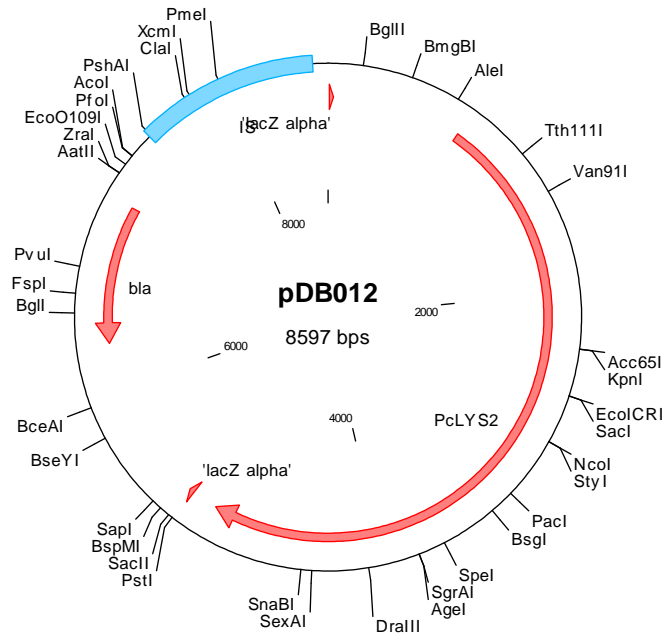


Abbildung 74: Vektor pDB012 enthält das *LYS2*-Gen aus *P. ciferrii* und dient der Komplementation eines Lysin-auxotrophen *Pichia* WT's. Die Integration findet im intergenischen Bereich zwischen der 5S- und der 26 S-rDNA statt. Die Linearisierung des Vektors vor der Transformation erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *PmeI*.

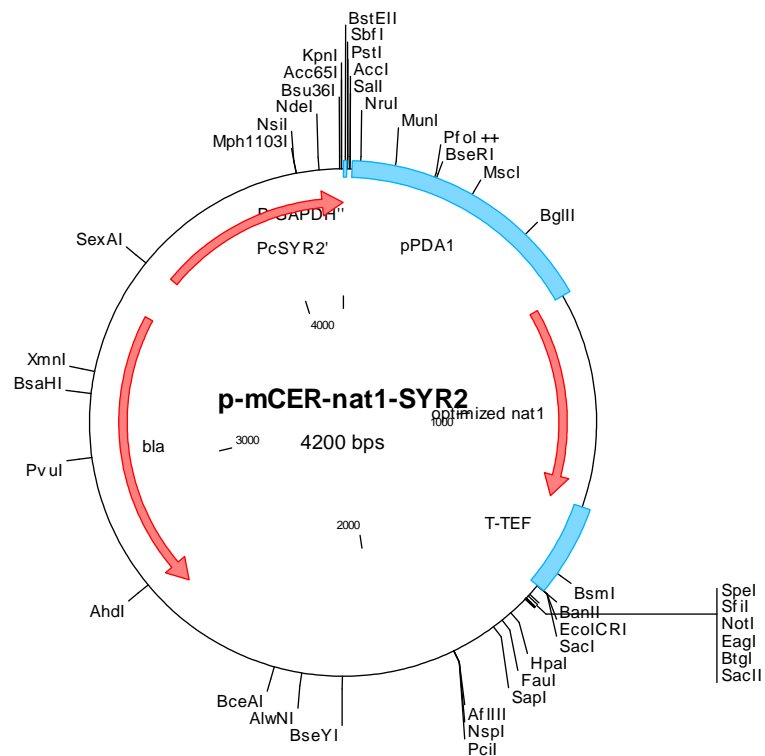


Abbildung 75: Vektor p-mCER-nat1-SYR2 dient der gezielten Disruption des *SYR2*-Gens in *P. ciferrii*. Zusätzlich zu einem 588 bp großen Bereich des *SYR2*-Gens enthält er noch eine Kasette zur Vermittlung einer Resistenz gegen Nourseothricin, bestehend aus einer codon-optimierten Form des

nat1-Gens unter Kontrolle des *PDA1*-Promotors aus *P. ciferrii*. Die Linearisierung des Vektors vor der Transformation erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *Mph11031*.

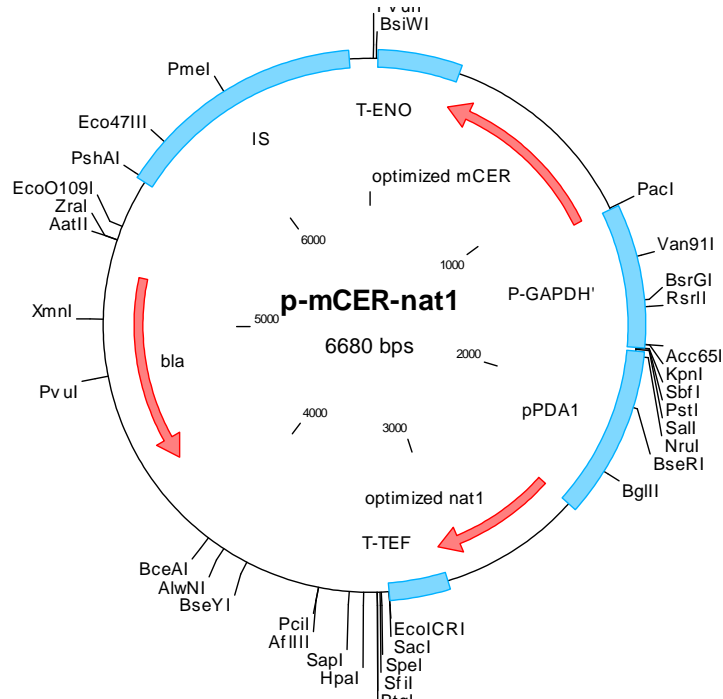


Abbildung 76: Vektor p-mCER-nat1 enthält eine Kasette zur Überexpression einer codon-optimierten Form des Gens aus Maus, welches für eine alkalische Ceramidase codiert. Als Promotor wurde der TDH1-Promotor aus *P. ciferrii* mit dem Gen fusioniert. Der Vektor vermittelt durch Tragen einer codon-optimierten Form des *nat1*-Gens unter Kontrolle des *PDA1*-Promotors aus *P. ciferrii* eine Resistenz gegen Nourseothricin. Die Integration findet im intergenischen Bereich zwischen der 5S- und der 26S-rDNA statt. Die Linearisierung des Vektors vor der Transformation erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *PmeI*.

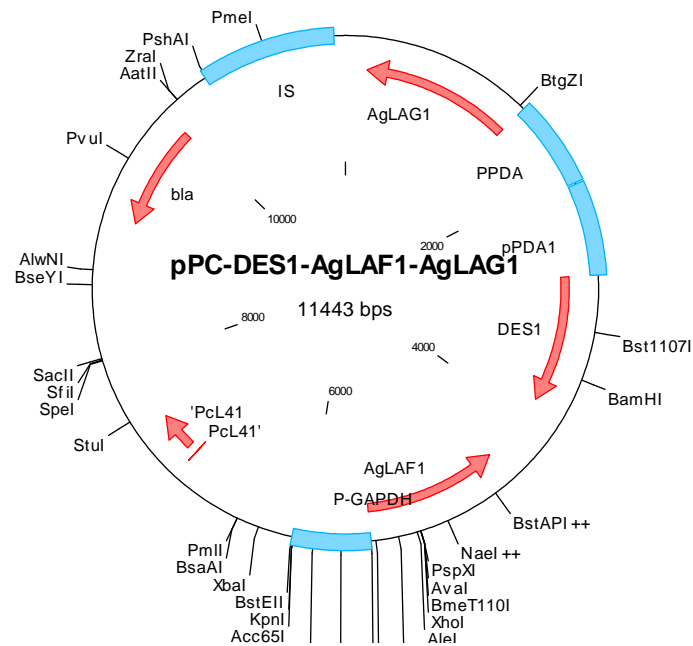


Abbildung 77: Vektor pPC-DES1-AgLAF1-AgLAG1 enthält eine Kasette zur homologen Überexpression des *DES1*-Gens aus *P. ciferrii*. Als Promotor wurde der *PDA1*-Promotor aus *P. ciferrii* mit dem Gen fusioniert. Zusätzlich trägt er das *LAG1*-Gen aus *Ashbya gossypii* unter Kontrolle des *PDA1*-Promotors aus *P. ciferrii*, sowie das *LAF1*-Gen aus *Ashbya gossypii* unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors aus *P. ciferrii*. Der Vektor vermittelt eine Resistenz gegen Cycloheximid. Die Integration findet im intergenischen Bereich zwischen der 5S- und der 26S-rDNA statt. Die Linearisierung des Vektors vor der Transformation erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *PmeI*.

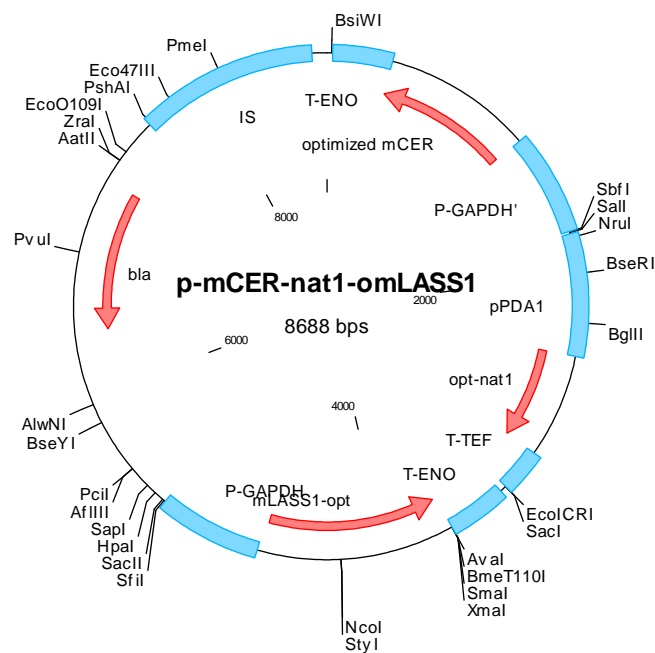


Abbildung 78: Vektor p-mCER-nat1-omLASS1 enthält eine Kasette zur Überexpression einer codon-optimierten Form des Gens aus Maus, welches für eine alkalische Ceramidase codiert. Als Pro-

motor wurde der *TDH1*-Promotor aus *P. ciferrii* mit dem Gen fusioniert. Zusätzlich trägt er die codon-optimierte Form des *LASS1*-Gens aus *M. musculus* ebenfalls unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors. Der Vektor vermittelt durch Tragen einer codon-optimierten Form des *nat1*-Gens unter Kontrolle des *PDA1*-Promotors aus *P. ciferrii* eine Resistenz gegen Nourseothricin. Die Integration findet im intergenischen Bereich zwischen der 5S- und der 26S-rDNA statt. Die Linearisierung des Vektors vor der Transformation erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *PmeI*.

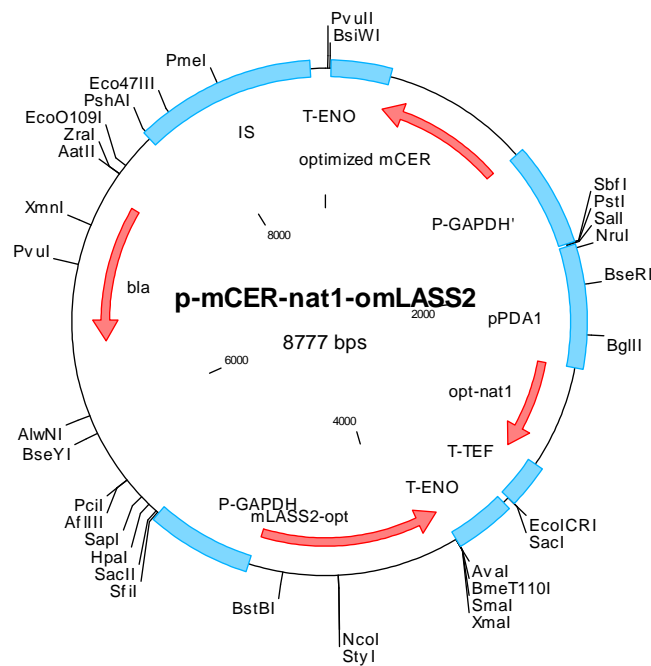


Abbildung 79: Vektor p-mCER-nat1-omLASS2 enthält eine Kasette zur Überexpression einer codon-optimierten Form des Gens aus Maus, welches für eine alkalische Ceramidase codiert. Als Promotor wurde der *TDH1*-Promotor aus *P. ciferrii* mit dem Gen fusioniert. Zusätzlich trägt er die codon-optimierte Form des *LASS2*-Gens aus *M. musculus* ebenfalls unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors. Der Vektor vermittelt durch Tragen einer codon-optimierten Form des *nat1*-Gens unter Kontrolle des *PDA1*-Promotors aus *P. ciferrii* eine Resistenz gegen Nourseothricin. Die Integration findet im intergenischen Bereich zwischen der 5S- und der 26S-rDNA statt. Die Linearisierung des Vektors vor der Transformation erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *PmeI*.

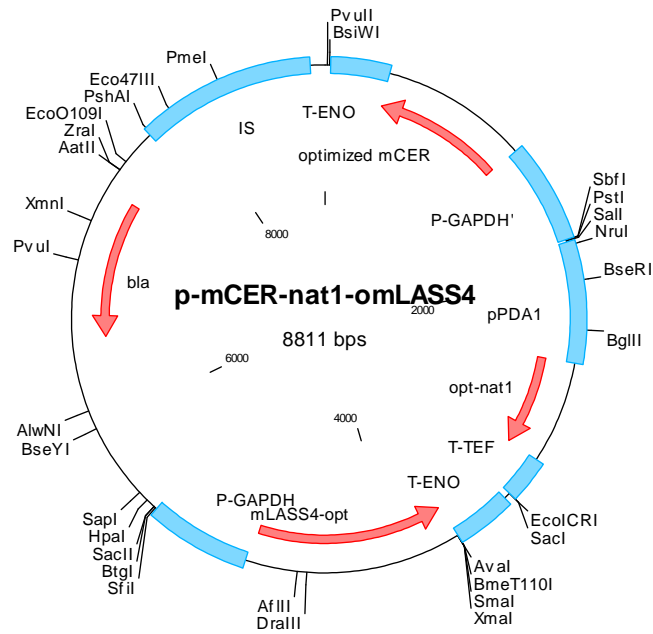


Abbildung 80: Vektor p-mCER-nat1-omLASS4 enthält eine Kasette zur Überexpression einer codon-optimierten Form des Gens aus Maus, welches für eine alkalische Ceramidase codiert. Als Promotor wurde der *TDH1*-Promotor aus *P. ciferrii* mit dem Gen fusioniert. Zusätzlich trägt er die codon-optimierte Form des *LASS4*-Gens aus *M. musculus* ebenfalls unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors. Der Vektor vermittelt durch Tragen einer codon-optimierten Form des *nat1*-Gens unter Kontrolle des *PDA1*-Promotors aus *P. ciferrii* eine Resistenz gegen Nourseothricin. Die Integration findet im intergenischen Bereich zwischen der 5S- und der 26S-rDNA statt. Die Linearisierung des Vektors vor der Transformation erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *PmeI*.

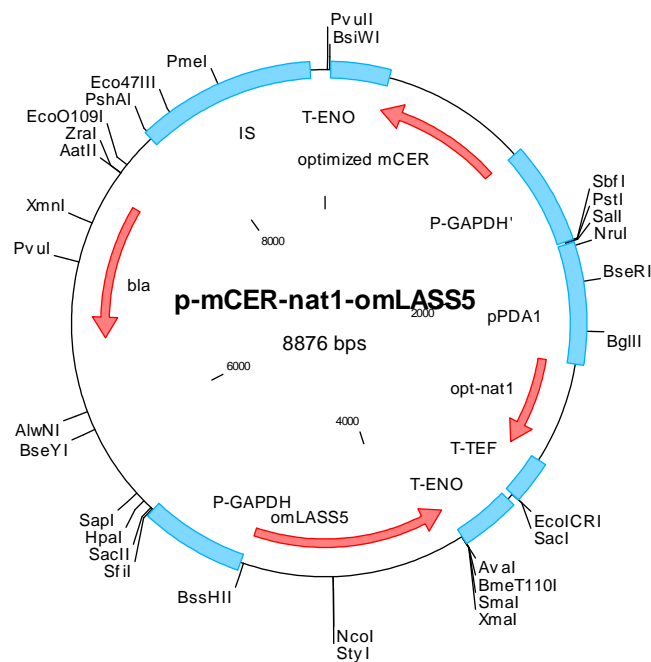


Abbildung 81: Vektor p-mCER-nat1-omLASS5 enthält eine Kasette zur Überexpression einer codon-optimierten Form des Gens aus Maus, welches für eine alkalische Ceramidase codiert. Als Promotor wurde der *TDH1*-Promotor aus *P. ciferrii* mit dem Gen fusioniert. Zusätzlich trägt er die codon-optimierte Form des *LASS5*-Gens aus *M. musculus* ebenfalls unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors. Der Vektor vermittelt durch Tragen einer codon-optimierten Form des *nat1*-Gens unter Kontrolle des *PDA1*-Promotors aus *P. ciferrii* eine Resistenz gegen Nourseothricin. Die Integration findet im intergenischen Bereich zwischen der 5S- und der 26S-rDNA statt. Die Linearisierung des Vektors vor der Transformation erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *PmeI*.

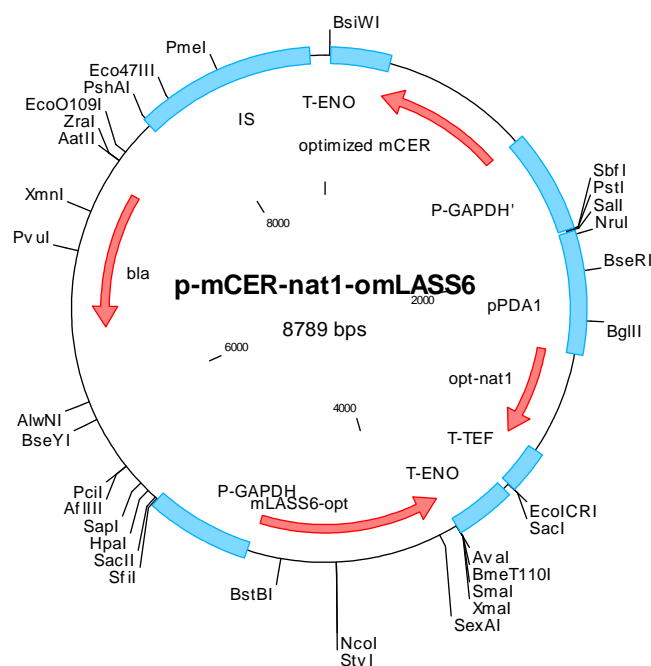


Abbildung 82: Vektor p-mCER-nat1-omLASS6 enthält eine Kasette zur Überexpression einer codon-optimierten Form des Gens aus Maus, welches für eine alkalische Ceramidase codiert. Als Promotor wurde der *TDH1*-Promotor aus *P. ciferrii* mit dem Gen fusioniert. Zusätzlich trägt er die codon-

optimierte Form des *LASS6*-Gens aus *M. musculus* ebenfalls unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors. Der Vektor vermittelt durch Tragen einer codon-optimierten Form des *nat1*-Gens unter Kontrolle des *PDA1*-Promotors aus *P. ciferrii* eine Resistenz gegen Nourseothricin. Die Integration findet im intergenischen Bereich zwischen der 5S- und der 26S-rDNA statt. Die Linearisierung des Vektors vor der Transformation erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *PmeI*.

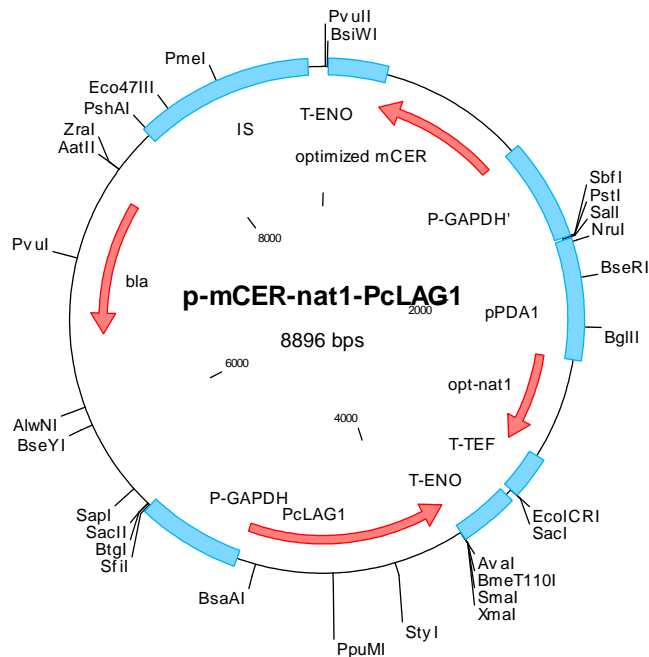


Abbildung 83: Vektor p-mCER-nat1-PcLAG1 enthält eine Kasette zur Überexpression einer codon-optimierten Form des Gens aus Maus, welches für eine alkalische Ceramidase codiert. Als Promotor wurde der *TDH1*-Promotor aus *P. ciferrii* mit dem Gen fusioniert. Zusätzlich trägt er das *LAG1*-Gen aus *P. ciferrii* ebenfalls unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors. Der Vektor vermittelt durch Tragen einer codon-optimierten Form des *nat1*-Gens unter Kontrolle des *PDA1*-Promotors aus *P. ciferrii* eine Resistenz gegen Nourseothricin. Die Integration findet im intergenischen Bereich zwischen der 5S- und der 26S-rDNA statt. Die Linearisierung des Vektors vor der Transformation erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *PmeI*.

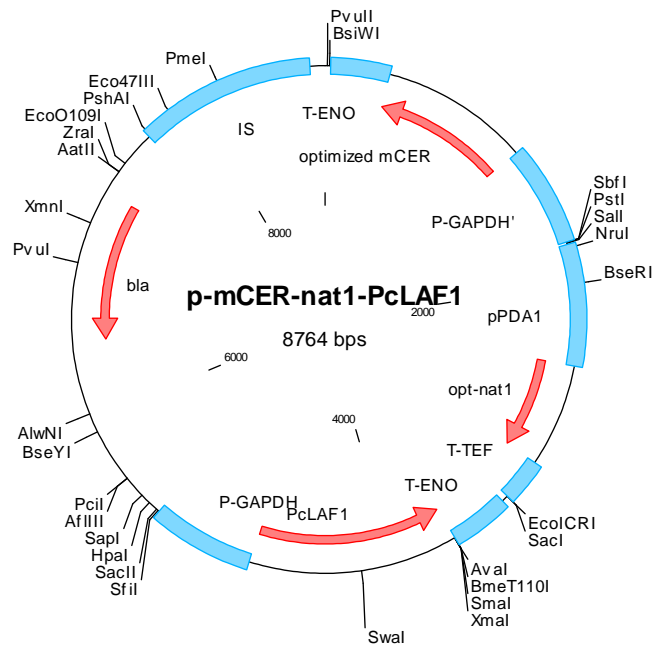


Abbildung 84: Vektor p-mCER-nat1-PcLAF1 enthält eine Kasette zur Überexpression einer codon-optimierten Form des Gens aus Maus, welches für eine alkalische Ceramidase codiert. Als Promotor wurde der *TDH1*-Promotor aus *P. ciferrii* mit dem Gen fusioniert. Zusätzlich trägt er das *LAF1*-Gen aus *P. ciferrii* ebenfalls unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors. Der Vektor vermittelt durch Tragen einer codon optimierten Form des *nat1*-Gens unter Kontrolle des *PDA1*-Promotors aus *P. ciferrii* eine Resistenz gegen Nourseothricin. Die Integration findet im intergenischen Bereich zwischen der 5S- und der 26S-rDNA statt. Die Linearisierung des Vektors vor der Transformation erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *PmeI*.

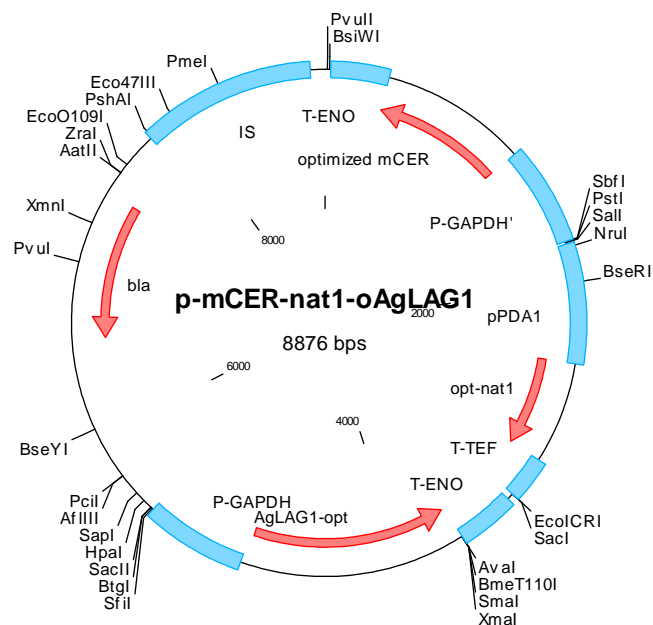


Abbildung 85: Vektor p-mCER-nat1-oAgLAG1 enthält eine Kasette zur Überexpression einer codon optimierten Form des Gens aus Maus, welches für eine alkalische Ceramidase codiert. Als Promotor wurde der *TDH1*-Promotor aus *P. ciferrii* mit dem Gen fusioniert. Zusätzlich trägt er die codon-optimierte Form des *LAG1*-Gens aus *A. gossypii* ebenfalls unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors. Der

Vektor vermittelt durch Tragen einer codon-optimierten Form des *nat1*-Gens unter Kontrolle des *PDA1*-Promotors aus *P. ciferrii* eine Resistenz gegen Nourseothricin. Die Integration findet im intergenischen Bereich zwischen der 5S- und der 26S-rDNA statt. Die Linearisierung des Vektors vor der Transformation erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *PmeI*.

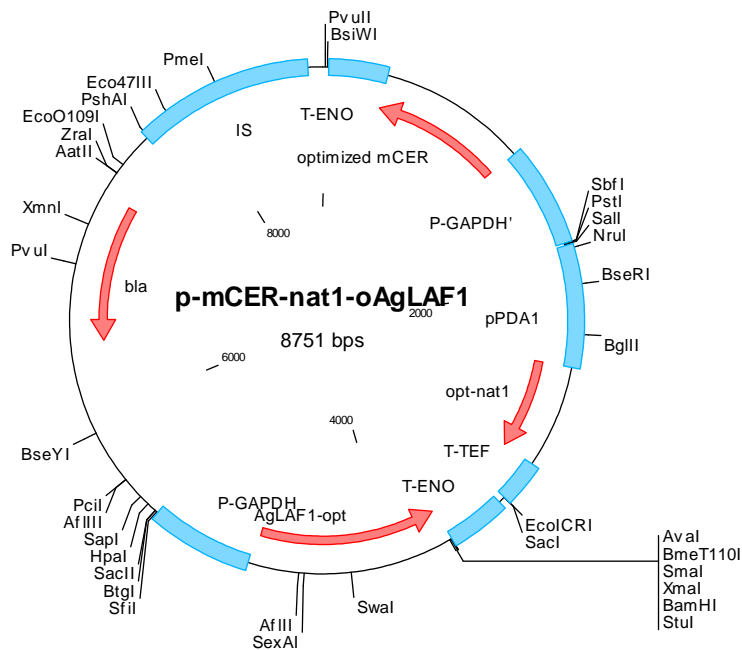


Abbildung 86: Vektor p-mCER-nat1-oAgLAF1 enthält eine Kasette zur Überexpression einer codon-optimierten Form des Gens aus Maus, welches für eine alkalische Ceramidase codiert. Als Promotor wurde der *TDH1*-Promotor aus *P. ciferrii* mit dem Gen fusioniert. Zusätzlich trägt er die codon-optimierte Form des *LAF1*-Gens aus *A. gossypii* ebenfalls unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors. Der Vektor vermittelt durch Tragen einer codon-optimierten Form des *nat1*-Gens unter Kontrolle des *PDA1*-Promotors aus *P. ciferrii* eine Resistenz gegen Nourseothricin. Die Integration findet im intergenischen Bereich zwischen der 5S- und der 26S-rDNA statt. Die Linearisierung des Vektors vor der Transformation erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *PmeI*.

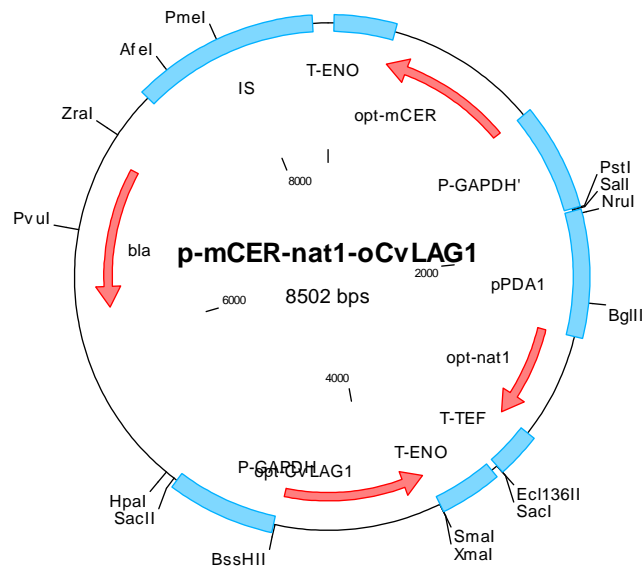


Abbildung 87: Vektor p-mCER-nat1-oCvLAG1 enthält eine Kasette zur Überexpression einer codon-optimierten Form des Gens aus Maus, welches für eine alkalische Ceramidase codiert. Als Promotor wurde der *TDH1*-Promotor aus *P. ciferrii* mit dem Gen fusioniert. Zusätzlich trägt er die codon-optimierte Form des *LAG1*-Gens aus *Coccolithovirus* ebenfalls unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors. Der Vektor vermittelt durch Tragen einer codon-optimierten Form des *nat1*-Gens unter Kontrolle des *PDA1*-Promotors aus *P. ciferrii* eine Resistenz gegen Nourseothricin. Die Integration findet im intergenischen Bereich zwischen der 5S- und der 26S-rDNA statt. Die Linearisierung des Vektors vor der Transformation erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *PmeI*.

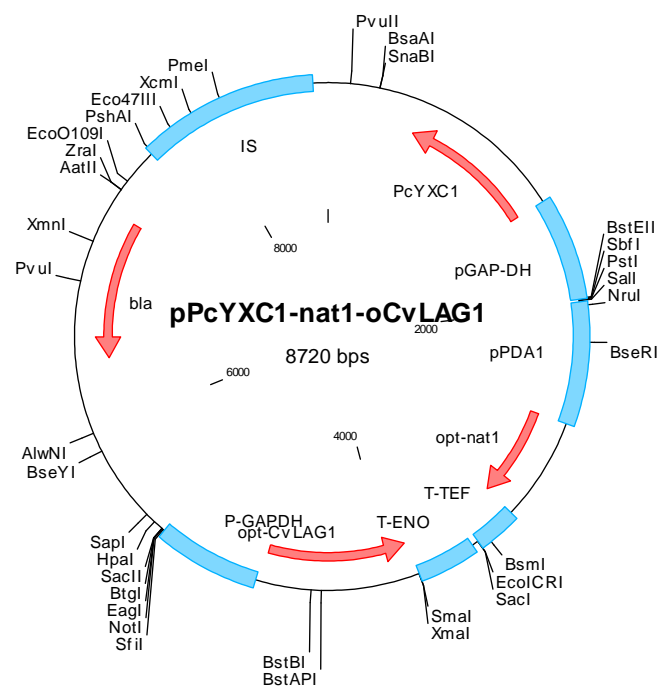


Abbildung 88: Vektor pPcYXC1-nat1-oCvLAG1 ist aus dem Vektor p-mCER-nat1-oCvLAG1 durch Austauschen der Kasette zur Überexpression des *omCER*-Gens mit dem *PcYXC1*-Gen unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors entstanden. Die Linearisierung des Vektors vor der Transformation erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *PmeI*.

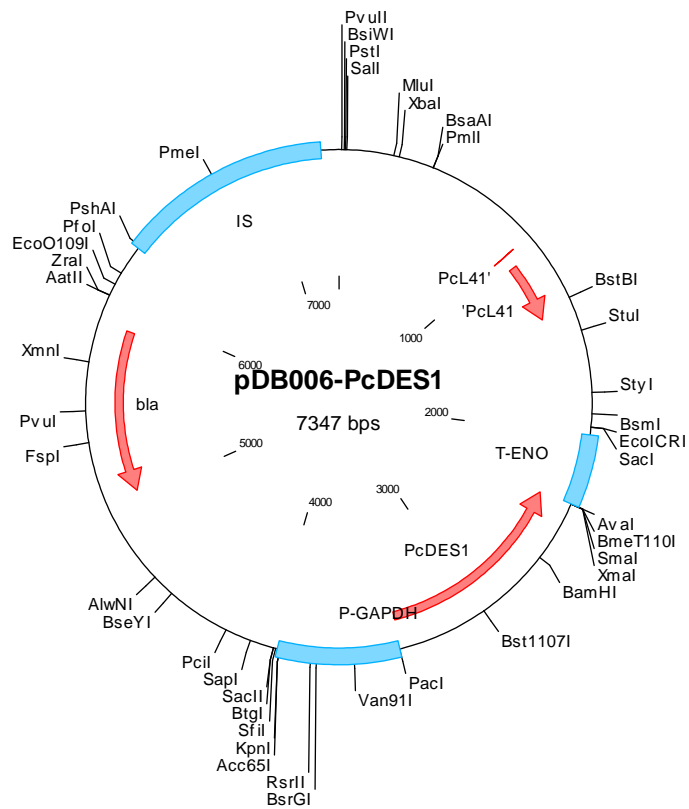


Abbildung 89: Vektor pDB006-PcDES1 ist durch Einfügen des *DES1*-Gens unter Kontrolle des *TDH1*-Promotors aus *P. ciferrii* in den Vektor pDB006 entstanden.

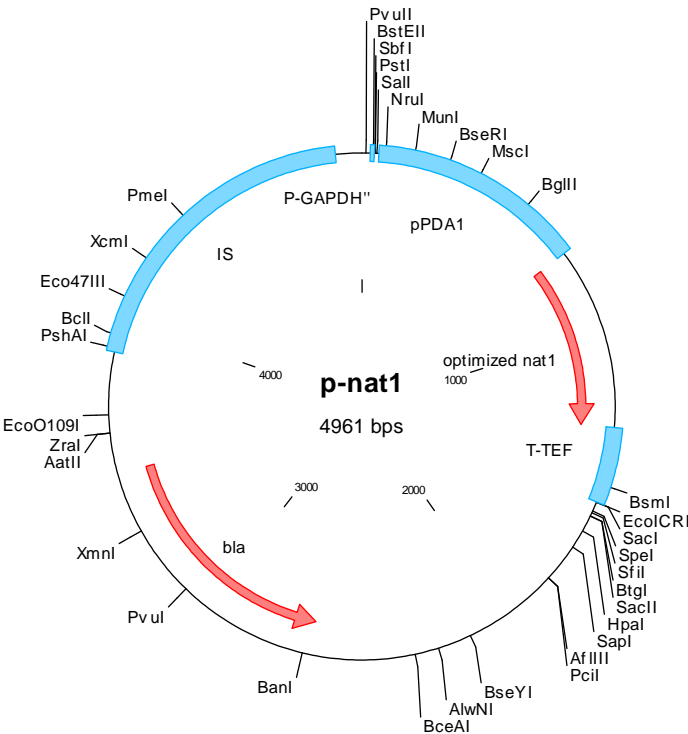


Abbildung 90: Vektor p-nat1 ist der Leervektor zum Vektor p-mCER-nat1.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main im Arbeitskreis und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Eckhard Boles angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Eckhard Boles für die fachliche Betreuung und vielfältige Unterstützung, sowie für die Möglichkeit zur externen Bearbeitung des Themas meiner Doktorarbeit.

Ich danke außerdem Herrn PD Dr. Torsten Stein für das Erstellen des Zweitgutachtens der vorliegenden Dissertation.

Herrn Dr. Steffen Schaffer danke ich für die Betreuung meiner Arbeit, für seine große Geduld, Hilfsbereitschaft und ständige Diskussionsbereitschaft in fachlichen Fragen.

Bei Dipl.-Ing. Thomas Hüller und Dr. Tim Köhler möchte ich mich für ihre fruchtbaren Ratschläge, ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und die kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Den Kollegen- insbesondere Nicole Albrecht und Benjamin Stichel - gebührt Dank für ihre tatkräftige Unterstützung im Arbeits- und Laboralltag.

Dr. Mike Farwick danke ich für das Initiieren des behandelten Projekts und das Vertrauen in meine Person.

Der Arbeitsgruppe um Herrn Dr. Gerhard Liebisch von der Universität Regensburg gebührt Dank für die zahlreichen ESI-MS/MS-Analysen.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung - nicht nur in finanzieller Hinsicht - und unerschütterlichen Glauben an mich, mein Studium, das Erreichen des Diploms und die Promotion nicht möglich gewesen wären.

Darüber hinaus danke ich meinem Bruder Dennis, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Kathrin Schulz möchte ich für die tatkräftige Unterstützung und die Hilfsbereitschaft ganz herzlich danken.

Nicht mit Dank vergessen möchte ich auch meine ehemaligen Kommilitonen und jetzigen Freunde - insbesondere Eva Kestner, Susanne Kirr, Matthias Kehm, Holger Both und Annette Dorn. Ohne sie hätten Studium und Doktorarbeit einiges an Spaß, Ablenkung und Motivation verloren.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freunden Christian Rölver, Ralf Kohn, Mustafa Sari, Thomas Wiegelmann und Alexander Kirr, die immer ein offenes Ohr für Probleme aller Art hatten und mich immer wieder zum Lachen gebracht haben und auf diesem Wege zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Daniel Börgel
Geburtsdatum: 26.05.1978 in Münster (Westfalen)

Berufserfahrung

04/04 – 04/07 **Degussa AG, Hanau-Wolfgang**
Projekthaus ProFerm
Rationale Stammentwicklung zur fermentativen Herstellung von Sphingosin in der Hefe *Pichia ciferrii*

Bildungsweg

04/04 – 04/07 **Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main**
Promotion
Thema der Doktorarbeit:
Untersuchungen zur Sphingolipid-Biosynthese in der Hefe *Pichia ciferrii*

10/98 – 11/03 **Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main**
Studium der Biologie (Diplom)
Thema der Diplomarbeit:
Charakterisierung einer Glutathion unabhängigen Nitrosoguanidin-Resistenz in *Saccharomyces cerevisiae*

08/88 - 06/97 **Johann-Conrad-Schlaun-Gymnasium, Münster**
Abitur

Praxiserfahrung

02/02 - 04/02 **Biotest Pharma GmbH, Dreieich**
Praktikum im Bereich Forschung und Entwicklung

Zivildienst

07/97 - 07/98 **Caritasverband für die Diözese Münster**

Veröffentlichungen

Patentanmeldung #06009809.2: Improved production of sphingoid bases using genetically engineered microbial strains

Patentanmeldung #06113772.5: Methods and materials for the transformation of the yeast *Pichia ciferrii*