

# Untersuchung molekularer Mechanismen bei der Assemblierung der Pilz-Fettsäuresynthase

Dissertation  
zum Erlangen des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von

Manuel Fischer

aus

Frankfurt am Main

Frankfurt 2016  
(D 30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Grininger
2. Gutachter: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Datum der Disputation: 13.06.2017



*Denn was ihm offenbart worden war, ist kein Geheimnis. Weil es denkbar ist. Alles Denkbare wird einmal gedacht. Jetzt oder in Zukunft.*

*Friedrich Dürrenmatt, Die Physiker, 1962*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Wissenschaftlicher Hintergrund</b>	<b>3</b>
2.1	Die Fettsäurebiosynthese . . . . .	3
2.2	Strukturelle Unterscheidung von Fettsäuresynthasen . . . . .	5
2.2.1	Fettsäuresynthasen vom Typ II . . . . .	6
2.2.2	Fettsäuresynthasen vom Typ I . . . . .	6
2.3	Strukturelle Beschreibung der Pilz-Fettsäuresynthase (fFAS) . . . . .	8
2.4	Protein-Protein-Kontakte in der fFAS . . . . .	10
2.4.1	$\alpha$ - $\alpha$ -Kontakte . . . . .	11
2.4.2	$\beta$ - $\beta$ -Kontakte . . . . .	11
2.4.3	$\alpha$ - $\beta$ -Kontakte . . . . .	11
2.5	Phosphopantetheinylierung von ACP in der fFAS . . . . .	12
2.6	Die unterschiedlichen Typen der fFAS . . . . .	13
2.6.1	Fettsäuresynthasen in Sekundärmetabolismen . . . . .	14
2.7	Regulation der fFAS-Biosynthese in <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	16
2.7.1	Transkription von <i>FAS1</i> und <i>FAS2</i> . . . . .	16
2.7.2	Proteolyse von Fas1p und Fas2p . . . . .	17
2.8	Relevanz der Assemblierungsinhibierung der fFAS zu therapeutischen Zwecken . . . . .	18
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>21</b>
3.1	Materialien . . . . .	21
3.1.1	Wasser . . . . .	21
3.1.2	Chemikalien . . . . .	21
3.1.3	Enzyme . . . . .	21
3.1.4	Synthetische Oligonukleotide / <i>Primer</i> . . . . .	21
3.1.5	Plasmide . . . . .	21
3.1.6	Synthetische Peptide . . . . .	22
3.1.7	Antikörper . . . . .	22
3.1.8	<i>E. coli</i> -Stämme . . . . .	22
3.1.9	<i>S. cerevisiae</i> -Stämme . . . . .	23

3.1.10	Puffer . . . . .	23
3.1.11	Nährmedien . . . . .	25
3.1.12	Kommerzielle Kits . . . . .	27
3.1.13	Geräte . . . . .	28
3.1.14	Verbrauchsmaterialien . . . . .	28
3.1.15	Software und Datenbanken . . . . .	28
3.1.16	Proteinsequenzen . . . . .	28
3.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	29
3.2.1	Konzentrationsbestimmungen von DNA-Lösungen . . . . .	29
3.2.2	Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	29
3.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	29
3.2.4	Präparative Amplifikation von Plasmid-DNA . . . . .	30
3.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	30
3.2.6	DNA-Gelelektrophorese . . . . .	30
3.2.7	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA . . . . .	31
3.2.8	Klonierung von Plasmiden in <i>E. coli</i> . . . . .	31
3.2.9	Klonierung von Plasmiden durch homologe Rekombination in <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	31
3.2.10	Erzeugung von Deletionen auf Plasmiden . . . . .	31
3.2.11	Erzeugung von Punktmutationen auf Plasmiden . . . . .	32
3.2.12	Sequenzierung von Plasmid-DNA . . . . .	32
3.3	Mikrobiologische Methoden . . . . .	32
3.3.1	Generelles zur Hefekultivierung . . . . .	32
3.3.2	DNA-Transformation in <i>E. coli</i> . . . . .	33
3.3.3	DNA-Transformation in <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	33
3.3.4	Erzwungener Plasmid-Verlust bei <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	34
3.3.5	Enzymatische Lyse von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen . . . . .	34
3.3.6	<i>S. cerevisiae</i> -Spotting-Test . . . . .	34
3.3.7	FAS-Komplementationstest . . . . .	35
3.4	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	35
3.4.1	Expression und Isolierung von ScFAS aus <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	35
3.4.2	Konzentrationsbestimmung und Aufkonzentrierung von Prote- inlösungen . . . . .	35
3.4.3	Größenausschlusschromatographie . . . . .	36
3.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	36
3.4.5	<i>Native</i> PAGE- <i>Western Blot</i> -Analyse von FAS . . . . .	36
3.4.6	CD-Spektroskopie . . . . .	37
3.4.7	<i>Split</i> -GFP-Test . . . . .	37
3.4.8	FAS-Aktivitätstest . . . . .	37

3.4.9	Disassemblierung der Fettsäuresynthase aus <i>S. cerevisiae</i> mit 2,3-Dimethylmaleinsäureanhydrid . . . . .	38
<b>4</b>	<b>Projektrelevante Vor- und Kooperationsarbeiten</b>	<b>39</b>
4.1	Proteinbiochemische Experimente zum Verständnis der Assemblierung der Pilz-Fettsäuresynthase (fFAS) . . . . .	39
4.1.1	Expression der Pilz-Fettsäuresynthase (fFAS) in <i>E. coli</i> . . . . .	40
4.1.2	Phylogenetische Analyse der Fettsäuresynthase aus <i>Rhodospo-</i> <i>ridium toruloides</i> . . . . .	40
4.1.3	Untersuchung der Assemblierungs- und Phosphopantetheiny- lierungsrelevanz von Domänen der ScFAS- $\alpha$ -Kette . . . . .	43
4.1.4	Untersuchung der Rolle der ACP-PPT-Interaktion bei der Assemblierung . . . . .	45
4.2	Erzeugung eines $\Delta fas1/\Delta fas2$ - <i>S. cerevisiae</i> -Stamms . . . . .	46
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>49</b>
5.1	<i>In-silico</i> -Analyse zentraler Protein-Protein-Interaktionen in Fettsäure- synthasen des <i>Ascomycota</i> -Typs . . . . .	49
5.2	<i>In-vitro</i> -Disassemblierung der Fettsäuresynthase aus <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	52
5.3	<i>In-vivo</i> -Evaluierung der Bedeutung von Schnittstellenmotiven der Fett- säuresynthase aus <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	54
5.4	<i>In-vivo</i> -Komplementation der FS-Synthese durch artifizielle Nachbau- ten anderer fFAS-Typen in <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	60
5.5	<i>In-vivo</i> -Experimente zur kompetitiven Inhibierung der Assemblierung von Fettsäuresynthasen . . . . .	64
5.6	Sekundärstrukturanalyse von Schnittstellenmotiven der Fettsäuresyn- thase aus <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	67
5.7	Entwicklung eines <i>split</i> -GFP-Tests zur Anwendung für Schnittstellen- interaktionen der Fettsäuresynthase aus <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	68
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick</b>	<b>71</b>
6.1	Assemblierung der fFAS in drei Schlüsselschritten . . . . .	71
6.2	$\beta$ - $\alpha$ -Schnittstellenmotive als potentielles Ziel zum Ausschalten der fFAS-Assemblierung . . . . .	73
<b>A</b>	<b>Anhang Materialien</b>	<b>77</b>
<b>B</b>	<b>Anhang Zusätzliche Ergebnisse</b>	<b>101</b>
<b>C</b>	<b>Anhang Sequenzen</b>	<b>105</b>
C.1	Plasmidkarten . . . . .	105

C.1.1	pRS-Plasmide . . . . .	105
C.1.2	pAG-Plasmide . . . . .	106
C.2	DNA-Sequenzen . . . . .	107
C.2.1	Gene . . . . .	107
C.2.2	Plasmide . . . . .	114
C.2.3	Daten-CD . . . . .	114
<b>D</b>	<b>Abkürzungen und Nomenklatur</b>	<b>115</b>
D.1	Abkürzungen . . . . .	115
D.2	Nomenklatur von Genen . . . . .	118
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>120</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>121</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>123</b>

# 1 Einleitung

Fettsäuresynthasen vom Typ I (FAS I) sind Multienzymkomplexe, in denen sämtliche funktionellen Domänen für die *de novo* Synthese vollständig gesättigter Fettsäuren einen räumlichen Verbund eingehen. Auch das für den Transport von Edukten und sämtlicher Intermediate nötige *Acyl Carrier Protein* (ACP) ist kovalent gebundener Teil dieses Komplexes, der so zu einer hocheffizienten Megasyntase zur Produktion dieser grundlegend essentiellen Zellbausteine wird.

FAS I kommen sowohl in Eukaryoten als auch wenigen Prokaryoten vor, unterscheiden sich dabei aber teilweise stark in ihrem Aufbau. Die FAS I aus Pilzen (fFAS) mit einer Masse von bis zu 2,7 MDa leistet sich dazu einen architektonisch besonderen Aufwand, bei dem acht funktionelle Domänen auf einer einzelnen oder zwei Polypeptidketten in sechs Kopien zu einer „Fass-ähnlichen“ Struktur multimerisieren. Dabei werden zwei separate Reaktionskammern gebildet, in deren Innenräumen flexibel gebundene ACP-Domänen den Substrattransfer verrichten. Somit ist die komplette Fettsäuresynthese räumlich eingeschlossen. 50% aller Aminosäuren dienen in der fFAS allein dem strukturellen Aufbau in Form von Insertionen und Expansionen der enzymatischen Kerndomänen (Bukhari *et al.* (2014)) und machen die fFAS zu einem der komplexesten heute bekannten Proteine. Daneben trägt auch das Interesse aus ihrer biologischen Relevanz dazu bei, dass ihre Kristallstruktur inzwischen durch verschiedene Studien bis auf atomare Auflösung aufgeklärt ist (Jenni *et al.* (2007); Johansson *et al.* (2009); Leibundgut *et al.* (2007); Lomakin *et al.* (2007)). Im Gegensatz zu diesen wertvollen, aber statischen Strukturinformationen ist noch wenig über den Assemblierungsweg dieser molekularen Maschine verstanden. Dies macht die fFAS zu einem interessanten Modellprotein, um über die Assemblierung multifunktionaler Proteinkomplexe im Generellen zu lernen.

Erkenntnisse über den Assemblierungsmechanismus der fFAS legen im Weiteren das Fundament für Überlegungen zu inhibitorischen Eingriffen in diesen Prozess. Nur wenn zentrale Mechanismen und Wechselwirkungen offen gelegt sind, lassen sie sich gezielt attackieren, um die Ausbildung der fFAS als für den Organismus unverzichtbare Fettsäurequelle zu unterbinden. Eine solche Assemblierungsinhibierung stellt gegenüber dem Ausschalten häufig stark konservierter aktiver Zentren einen alternativen und hoch selektiven Ansatz für antimykotische Wirkstoffe dar.

Diese Arbeit soll das Verständnis der Assemblierung der fFAS vorantreiben und einen Akzent auf ihre Inhibierung legen.





## 2 Wissenschaftlicher Hintergrund

### 2.1 Die Fettsäurebiosynthese

Fettsäuren (FS) sind zentrale Bausteine des Lebens. In großer Menge dienen sie dabei als Phospholipide dem Aufbau von Zellmembranen, sind aber auch wichtig für posttranslationale Modifikationen von eukaryotischen Proteinen (z.B. Myristoylierung (Cok *et al.* (1998))) und sind Vorläufermoleküle für Substanzen mit zellulären Signalaufgaben (Tehlivets *et al.* (2007); Schweizer and Hofmann (2004)) oder zum Aufbau von Sekundärmetaboliten (Watanabe and Townsend (2002); Crawford *et al.* (2009); Balakrishnan *et al.* (2014)). Zudem bilden sie gebunden in Triacylglycerolen einen wichtigen Energiespeicher (Kohlwein (2010); Schweizer and Hofmann (2004)). Die Chemie ihrer Biosynthese ist trotz unterschiedlicher enzymatischer Systeme hierfür (vgl. Kap. 2.2) stets gleich und geht von den jeweils Coenzym A (CoA)-gebundenen Edukten Acetyl und Malonyl aus, die in einem iterativen Zyklus aus Kondensation und Reduktionsschritten kontrolliert zu vollständig reduzierten FS polymerisiert werden (Schweizer and Hofmann (2004); Jenni *et al.* (2007); Maier *et al.* (2010)) (siehe Abb. 2.1). Die Reaktionsabfolge ist im Folgenden am Beispiel der *de-novo* FS-Synthese in Pilzen erklärt.

Substrate und Intermediate sind bei jeder Reaktion kovalent Enzym-gebunden und werden vom mobilen *Acyl-Carrier-Protein* (ACP) zwischen den katalytischen Domänen weitergereicht. Das ACP ist für diesen Zweck an einem definierten Serinrest, S180 in Fas2p aus *S. cerevisiae*, posttranslational durch Bindung einer Phosphopantethein-Gruppe modifiziert (vgl. Kap. 2.5). Hierdurch wird nicht nur eine prothetische Verlängerung für die Substratübergabe erreicht, sondern auch durch die terminale Thiol-Gruppe die Substratbindung als Thioester ermöglicht. Die höhere Reaktivität gegenüber einem Ester gewährleistet so einen einfachen, reversiblen Substrattransfer. Jeder Reaktionszyklus zur Synthese einer neuen Fettsäure wird initiiert durch die ACP-vermittelte Beladung der Ketoacylsynthase (KS) -Domäne mit einem Acetyl-Rest durch Thioesterbindung an Cystein.

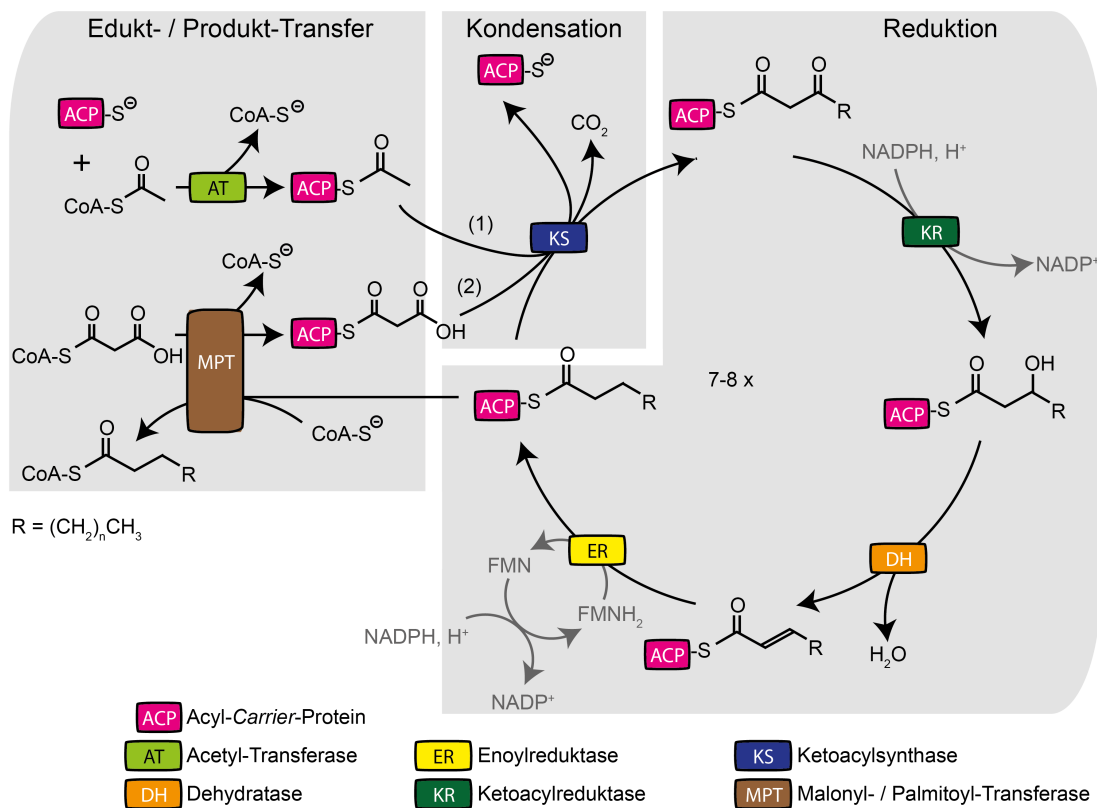


Abb. 2.1: Formaler Reaktionszyklus der FS-Biosynthese in Pilzen. Enzymatische Domänen sind durch farbige Kästchen repräsentiert und abgekürzt wie angegeben. Nach dem initialen Beladen der KS-Domäne mit Acetyl als Startsubstrat (1) wird ein iterativer Zyklus aus decarboxylierender Kondensation von Malonyl als Propagationssubstrat (2) und Reduktionsschritten sieben- bis achtmal durchlaufen, um Acylketten mit einer Länge von 16 oder 18 Kohlenstoffatomen zu erhalten. Diese werden sodann durch die MPT-Domäne von ACP auf CoA übertragen und verlassen das Enzym-System.

Die Verlängerung der Acylkette und entscheidende C-C-Bindungsknüpfung gelingt in der KS-Domäne durch eine *Claisen*-Kondensation unter Decarboxylierung von Malonyl-ACP und sorgt so für eine Kettenverlängerung um jeweils zwei Kohlenstoffatome. Das Zwischenprodukt ist ein  $\beta$ -Ketoacyl-ACP, das in der Folge die reduzierenden Schritte des Zyklus durchläuft. Die Ketoacylreduktase (KR) -Domäne reduziert zunächst mittels NADPH zum  $\beta$ -Hydroxyacyl-ACP, gefolgt von einer Wassereliminierung durch die Dehydratase (DH) -Domäne zum  $\alpha$ - $\beta$ -ungesättigten Acyl-ACP. Dieses wird daraufhin durch die Enoylreduktase (ER) -Domäne mittels NADPH und FMN zum vollständig reduzierten Acyl-ACP umgesetzt. Ob nun ein weiterer Zyklus durch erneute *Claisen*-Kondensation an der verlängerten Acyl-Kette beginnt, oder das Produkt vom Enzym freigesetzt wird und eine neue FS-Synthese ausgehend von Acetyl startet, ist entscheidend für die Kontrolle der FS-Kettenlängen. Die Termination des iterativen Zyklus und damit die Produktfreisetzung erfolgt in den hier betrachteten Systemen zur FS-Biosynthese in Pilzen und Bakterien (vgl.

Kap. 2.2) durch Transthioesterifizierung der Acylkette von ACP auf CoA durch die Malonyl- / Palmitoyl-Transferase (MPT)-Domäne. Diese katalysiert neben dem spezifischen Import von Malonyl-Resten aus Malonyl-CoA ebenso den Export von Palmitoyl- und Stearyl-Resten unter Kontrolle der Kettenlänge (Sumper and Lynen (1972)).

Die direkte Produktion von Fettsäuren als CoA-Ester ist plausibel, da sie in dieser Form universell in nachgeschalteten Stoffwechselfvorgängen eingesetzt werden können. Freie Fettsäuren aus extrazellulären Quellen müssen in *S. cerevisiae* zunächst durch das FS-aktivierende Protein Faa1p zu CoA-Estern derivatisiert werden (Robert *et al.* (1992)).

Das FAS-Produktspektrum wird von Kettenlängen mit 16 (Palmitinsäure) und 18 (Stearinsäure) Kohlenstoffatomen durch deren Wichtigkeit für Zellmembranen dominiert (Hofbauer *et al.* (2014)). Zudem ist von Myristinsäure (14 Kohlenstoffatome) als Minderprodukt zur Deckung des vergleichsweise geringen, aber essentiellen Bedarfs zur Proteinmyristoylierung in *S. cerevisiae* auszugehen (Robert *et al.* (1992); Cok *et al.* (1998)).

Zur Synthese von FS mit sehr langen Kettenlängen dienen die FAS-Produkte Palmitin- und Stearinsäure, bzw. deren CoA-Ester als Vorläufer, indem sie von FAS-unabhängigen Multienzymkomplexen verlängert werden (Tehlivets *et al.* (2007)).

Auch ungesättigte FS, etwa die für Zellmembranen wichtige Ölsäure mit einer Präsenz von 80% aller FS in *S. cerevisiae*, werden nicht *ab-initio* von den in dieser Arbeit behandelten FAS I-Systemen, sondern ausgehend von den gesättigten FS durch desaturierende Enzyme, in *S. cerevisiae* etwa die  $\Delta 9$ -Desaturase Ole1p, synthetisiert (Stukey *et al.* (1989); Tehlivets *et al.* (2007)). Zur Synthese mehrfach ungesättigter FS finden sich in manch anderen Organismen aber auch spezialisierte Enzyme für deren direkte Produktion, die PUFA (*Poly unsaturated fatty acids*) -Synthasen (Harwood and Guschina (2009); Uemura (2012); Gemperlein *et al.* (2014)).

## 2.2 Strukturelle Unterscheidung von Fettsäuresynthasen

Trotz stets gleicher chemischer Mechanismen zur FS-Synthese und damit einhergehend auch starker Konservierung von Sekundär- und Tertiärstrukturen der enzymatischen Kerndomänen für die einzelnen Reaktionsschritte (Jenni *et al.* (2007)) hat die Natur unterschiedliche räumliche Organisationen dieser Domänen entwickelt.

Die erste und grundlegendste Differenzierung tritt durch die räumlich verschiedenen Konzepte von FAS-Systemen der Typen I und II auf.

### 2.2.1 Fettsäuresynthasen vom Typ II

Typ II FAS (FAS II) weisen alle synthetisch relevanten Enzymaktivitäten durch separate und monofunktionelle Proteine vor, die ohne feste physische Interaktion untereinander im Zytosol, in Chloroplasten oder Mitochondrien vorliegen (Erwin (1973)). Sie repräsentieren mit ihrer minimalen strukturellen Komplexität den evolutionären Ursprung der Maschinerie zur FS-Biosynthese, bei der in diesem Fall die ACP-gebundenen Substrate durch Diffusion zu den diskreten Enzymen eines jeden Reaktionsschritts gelangen.

FAS II zur primären FS-Produktion sind verbreitet in den meisten Bakterien sowie Pflanzen und kommen untergeordnet auch in FAS I-verfügbaren Eukaryoten für die mitochondriale FS-Synthese vor (Hoja *et al.* (2004); Tehlivets *et al.* (2007); Bunkoczi *et al.* (2009)).

### 2.2.2 Fettsäuresynthasen vom Typ I

In Typ I FAS (FAS I) sind alle für die FS-Synthese nötigen Enzyme räumlich verbunden in einem Multienzymkomplex arrangiert, der aus multifunktionellen Polypeptidketten gebildet wird. ACP als kovalent gebundene Domäne dieser Megaenzyme ermöglicht den Substraten kurze Wege zwischen den aktiven Zentren und damit eine hohe Effizienz des Enzyms (McCarthy and Hardie (1984)). Nach heutigem Wissensstand kommen FAS I in Bakterien der Gattungen *Corynebacterium*, *Mycobacterium* und *Nocardia*, allesamt Organismen mit einem unter Prokaryoten besonders hohen FS-Bedarf (Radmacher2005, Takayama2005, Grzegorzewicz2012), sowie in Pilzen und allen Metazoen vor. Hierbei kommt es zu einer weiteren, vornehmlich strukturellen Differenzierung der bisher erforschten FAS I-Systeme in bakterielle FAS (bFAS), Pilz-FAS (fFAS) und Metazoen-FAS (mFAS) (Maier *et al.* (2010); Grninger (2014)).

#### mFAS

Am deutlichsten grenzt sich dabei die mFAS ab, die ein 544 kDa schweres Homodimer mit einer offenen und flexiblen, X-förmigen Struktur ist (Maier *et al.* (2008)). Durch Verdrehung und Kippen der funktionellen Domänen tragenden Ausleger relativ zueinander um eine zentrale Taille (siehe Abb. 2.2) besteht eine große konformationelle Freiheit (Grninger (2014); Herbst *et al.* (2016)). Zwischen diesen Auslegern bilden ACP und eine Thioesterase (TE)-Domäne das flexible C-terminale Ende des Enzyms. Durch diese flexible Anbindung ist das ACP in der Lage, sämtliche Domänen des Enzyms zu erreichen. Die TE-Domäne katalysiert am Ende der FA-Synthese die Freisetzung der freien Fettsäure als Endprodukt des Enzyms und schafft damit einen funktionellen Unterschied zu bFAS und fFAS, bei denen CoA-Ester als Endprodukte das Enzym über die MPT-Domäne verlassen. Des Weiteren existiert mit der Malonyl-

/Acetyl-Transferase (MAT)-Domäne eine gemeinsame Domäne für den Transfer von Acetyl sowie Malonyl-Resten, während bFAS und fFAS eine monofunktionelle AT-Domäne und die bifunktionelle MPT-Domäne aufweisen (vgl. Kap. 2.1). Mit ihrem strukturellen Aufbau erinnert die mFAS stark an iterative Typ I Polyketidsynthasen (PKS I), mit denen sie eine gemeinsame evolutionäre Entwicklung zu teilen scheint (Herbst *et al.* (2016)).

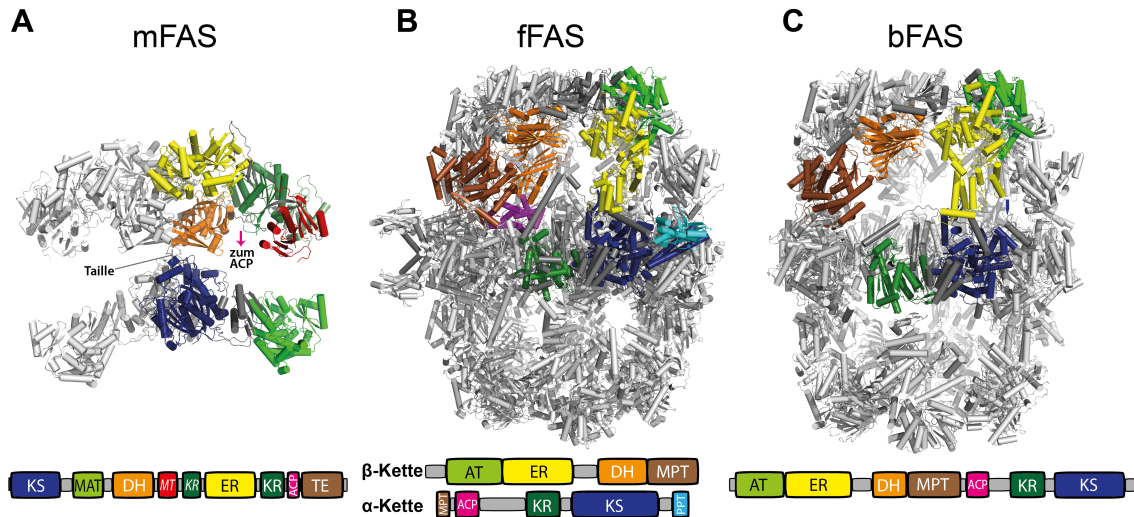


Abb. 2.2: Strukturvergleich der drei FAS I-Varianten (entnommen aus Grninger (2014) und verändert). Es ist jeweils ein Satz katalytischer Domänen farblich entsprechend der jeweiligen Domänenübersicht hervorgehoben. In dunkelgrau sind zwischen den Domänen liegende strukturebende Elemente hervorgehoben. Nomenklatur und Einfärbung der katalytischen Domänen entsprechen dem in Abb. 2.1 eingeführten Schema. **A** Kristallstrukturmodell der homodimeren mFAS aus *Sus scrofa* (PDB-Code: 2vZ8) in *Cartoon*-Repräsentation und Domänenverteilung auf ihrer Polypeptidkette. In kursiver Schrift sind die katalytisch inaktiven Domänen Pseudo-Ketoacylreduktase (KR) und Pseudo-Methyltransferase (MT) angegeben, die offenbar aus strukturebenden Gründen in der mFAS konserviert wurden (Jenni *et al.* (2007); Maier *et al.* (2010)). Strukturell nicht aufgelöst sind die C-terminal gebundenen, sehr flexiblen Domänen ACP und TE. **B** Kristallstrukturmodell der heterododecameren fFAS aus *S. cerevisiae* (PDB-Code: 3hmj) in *Cartoon*-Repräsentation und Domänenverteilung auf ihren beiden Polypeptidketten  $\beta$  und  $\alpha$ . **C** Strukturrekonstruktion aus *Cryo*-EM-Experimenten der homohexameren bFAS aus *Mycobacterium smegmatis* (Boehringer *et al.* (2013)) in *Cartoon*-Repräsentation und Domänenverteilung auf ihrer Polypeptidkette. Strukturell nicht aufgelöst sind die ACP-Domänen im Inneren der Reaktionskammern.

## bFAS und fFAS

Die bereits augenscheinlich sehr ähnlichen bFAS und fFAS als „fassförmige“ Homo- bzw. Heterododecamere (Lomakin *et al.* (2007); Leibundgut *et al.* (2007); Boehringer *et al.* (2013)) haben gegenüber der mFAS eine separate, untereinander allerdings verwandte Entwicklung erfahren (Bukhari *et al.* (2014)). Beide weisen

die gleiche Anordnung der enzymatischen Domänen auf (siehe Abb. 2.2), die in Bakterien stets auf einer und in Pilzen abteilungs- oder klassenspezifisch auf einer, oder aufgeteilt auf zwei Polypeptidketten liegen (siehe Abb. 2.7).

Zum Verständnis der evolutionären Entwicklung von bFAS und fFAS wurde in einer umfangreichen Abstammungsanalyse von Bukhari *et al.* (2014) dargelegt, dass zunächst die bFAS aus sukzessiver Rekrutierung von monofunktionellen Einzelenzymen aus FAS II, Polyketid- und PUFA-Biosynthesewegen zu einem integrierten Multi-enzymkomplex hervorgegangen ist. Durch Insertionen immer weiterer struktureller Domänen zur Stabilisierung immer komplexerer Verbände aus solchen separaten Enzymen verlief diese Entwicklung über Homomultimere, größere Multidomänenproteine und Genfusionsereignisse zur bekannten bFAS. Aus der weiteren Stabilisierung der Architektur der bFAS durch Vergrößerung von Interaktionsflächen (vgl. Kap. 2.4) und der C-terminalen Fusion der PPT-Domäne ist schließlich eine einzelgenodierte fFAS hervorgegangen (Bukhari *et al.* (2014)), deren weitere Entwicklung unterschiedliche Strangbrüche in zwei separat codierte Polypeptidketten und in manchen Fällen die Duplizierung der ACP-Domäne umfasst (siehe Abb. 2.3, Abb. 2.7) (Grininger (2014); Fischer *et al.* (2015)).

## 2.3 Strukturelle Beschreibung der Pilz-Fettsäuresynthase (fFAS)

Kristallstrukturen der fFAS aus dem thermophilen Pilz *Thermomyces lanuginosus* (TlanFAS) (Jenni *et al.* (2007)) und der Bäckerhefe *S. cerevisiae* (ScFAS) (Leibundgut *et al.* (2007); Lomakin *et al.* (2007); Johansson *et al.* (2008)) liefern heute detaillierte Einblicke in die atomare Struktur dieser molekularen Maschine, die unter den Pilzen in Sequenz und Struktur stark konserviert ist (Jenni *et al.* (2007); Fischer *et al.* (2015)) und im Folgenden am Beispiel der ScFAS beschrieben wird.

Die beiden multifunktionellen Polypeptidketten  $\beta$  (Fas1p, 2051 AS, 229 kDa) und  $\alpha$  (Fas2p, 1887 AS, 207 kDa) bilden ein Heterododecamer mit einer Masse von 2,6 MDa und einer  $D_3$ -symmetrischen, „Fass-ähnlichen“ Struktur. Die sechs  $\alpha$ -Ketten bilden hierbei durch mehrere Dimerisierungsmodule (DM) ein hoch strukturiertes, sogenanntes „zentrales Rad“, das beidseitig von je drei  $\beta$ -Ketten unter Ausbildung von sogenannten „Domen“ flankiert wird (siehe Abb. 2.4). So ergeben sich zwei getrennte Reaktionskammern mit je drei Sätzen katalytischer Domänen, in deren Innenräumen ACP über flexible Linker kovalent an der „Fassinnenwand“ und im Zentrum an einer sogenannten „Nabe“ gebunden ist, um so zwischen den katalytischen Domänen die Substrate weiter zu reichen (vgl. Kap. 2.1).

Gegenüber der bFAS wendet die fFAS wesentlich mehr Aminosäuren auf, um die „Fass-Struktur“ zu stabilisieren, indem 50% aller Aminosäuren allein dem strukturellen Bau des Enzyms zuzurechnen sind (35% in bFAS). Dies umfasst Insertionen

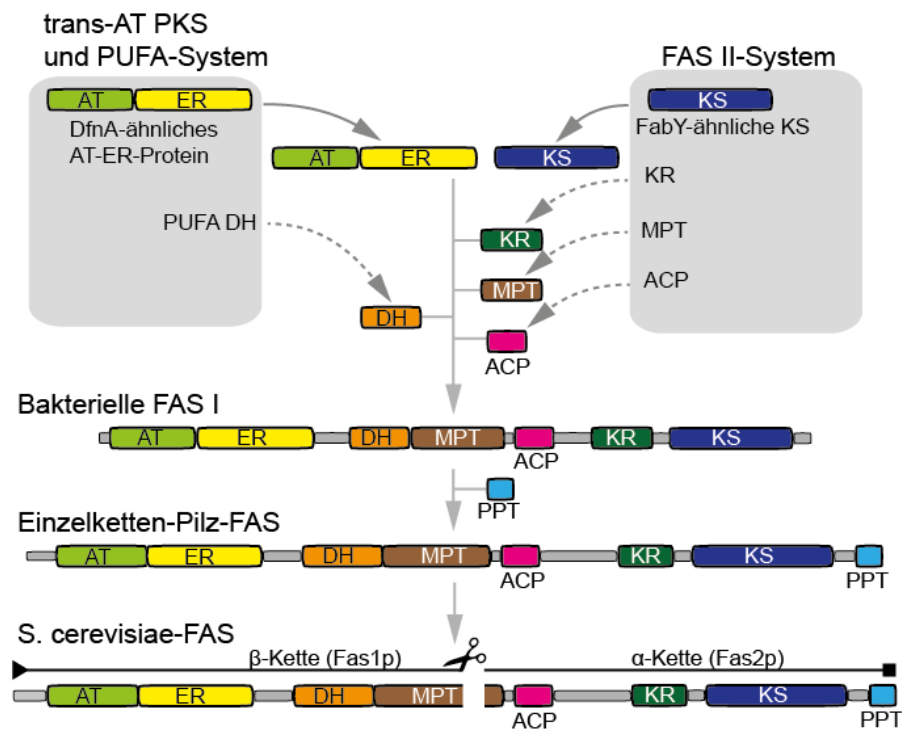


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Entwicklung der Pilz-FAS aus *S. cerevisiae*. Adaptiert von Bukhari *et al.* (2014). Der evolutionäre Verlauf ist von oben nach unten abgebildet. Gebogene Pfeile repräsentieren die Herkunft der einzelnen integrierten Domänen aus konkreten Analoga in *trans*-AT-PKS-Systemen oder FAS II-Systemen, wie sie anhand von strukturell markanten Gemeinsamkeiten identifiziert wurden. Gestrichelte symbolisieren eine mutmaßliche Herkunft aus PUFA-Synthasen oder FAS II-Systemen.

in den sonst zu FAS II-Systemen sehr homologen Kerndomänen sowie Interdomänenmodule (Bukhari *et al.* (2014); Grninger (2014)) (siehe Abb. 2.5, Abb. 2.6). Die N-terminale Trimerisierungsdomäne, die die fFAS an ihren Polen schließt, fehlt in der bFAS komplett und weitere Interaktionsdomänen fehlen ebenso, oder sind verkürzt (Enderle *et al.* (2015)). Während hierdurch die bFAS eine vergleichsweise dynamische Flexibilität aufweist (Cicarelli *et al.* (2013)), ist die fFAS wesentlich rigider gebaut, wodurch ihre „Fass-Struktur“ schon früh durch EM charakterisiert werden konnte (Oesterhelt *et al.* (1969); Wieland *et al.* (1978)).

Eine weitere Besonderheit der fFAS gegenüber der bFAS ist die C-terminale Fusion der Phosphopantetheintransferase (PPT)-Domäne, die für die posttranslationale Aktivierung des ACP nötig ist (vgl. Kap. 2.5) und sich in der Kristallstruktur an der Außenseite des „Fasses“ und damit räumlich getrennt vom ACP im Inneren aufhält (siehe Abb. 2.2, Abb. 2.4).

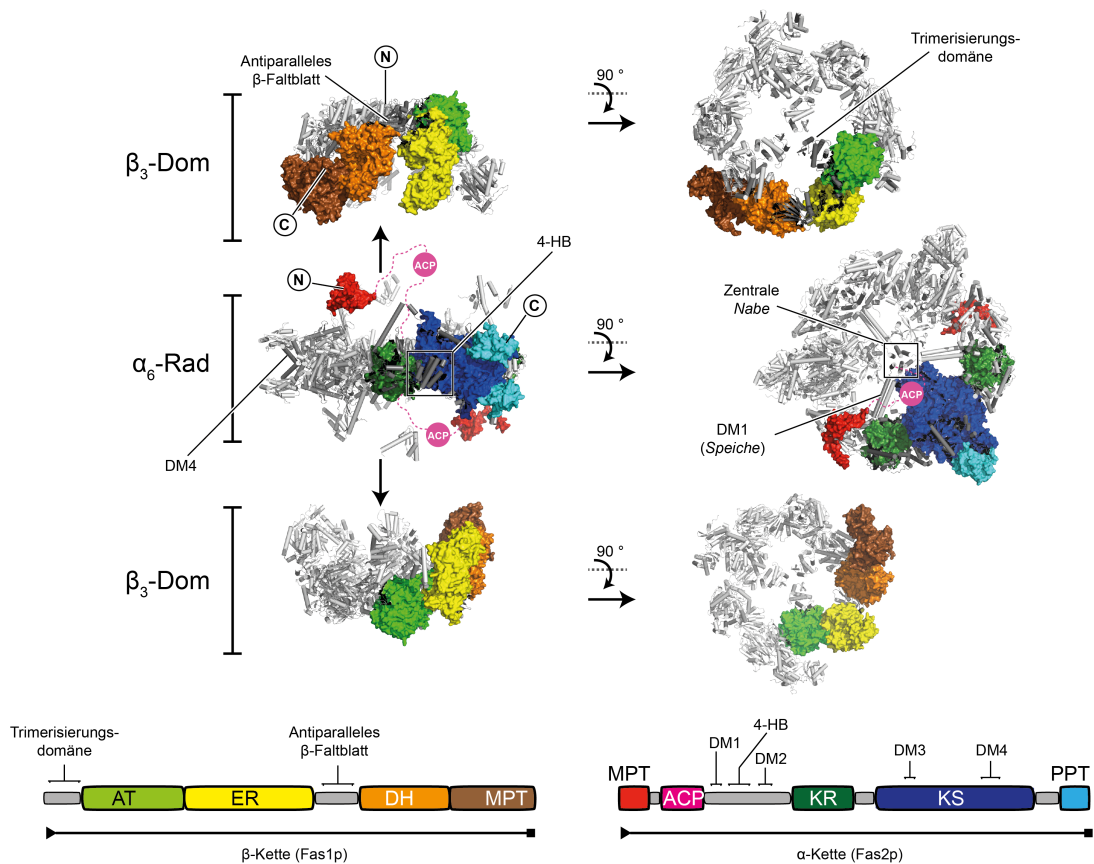


Abb. 2.4: Quartärstrukturorganisation der ScFAS. Die Kristallstruktur der ScFAS (PDB-Code: 3hmj) in kombinierter *Cartoon*- und Oberflächenrepräsentation wurde in zwei  $\beta_3$ -Untereinheiten und eine  $\alpha_6$ -Untereinheit separiert und diese voneinander entfernt (durch Pfeile angezeigt), ungeachtet einer physiologischen Relevanz dieser Zustände. Drehungen um  $90^\circ$  zeigen das  $\alpha_6$ -Rad und die Dome von oben bzw. von innen entlang der  $C_3$ -Achse. Darunter ist eine Domänenübersicht mit Aufteilung auf den beiden Polypeptidketten  $\beta$  und  $\alpha$  abgebildet. ACP wurde aus der Struktur gelöscht und stattdessen durch einen magenta-farbenen Ball ersetzt, der über flexible Linker (gestrichelte Linien, magenta) kovalent am Enzym gebunden ist. Zwei gegenüberliegende Sätze enzymatischer Domänen in Oberflächenrepräsentation sind nach dem in Abb. 2.1 eingeführten Farbschema eingefärbt. Der auf der  $\alpha$ -Kette liegende Teil der MPT-Domäne ist in rot abgebildet. Die Termini je einer  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette sind durch eingekreistes „N“ bzw. „C“ angezeigt. Wichtige strukturelle Domänen sind in der Struktur und der Domänenübersicht eingezeichnet. DM1-4: Dimerisierungsmodul 1-4, 4-HB: 4-helikales Bündel.

## 2.4 Protein-Protein-Kontakte in der fFAS

Mehrere Insertionen innerhalb katalytischer Domänen und Bindungsmodule zwischen diesen Domänen (siehe Abb. 2.4: Domänenübersicht) vermitteln starke Bindungen für die Statik der „Fass-Architektur“. Aufgrund der nicht vollständigen Strukturierung aller dieser Module in der ScFAS-Kristallstruktur (PDB-Code: 3hmj, (Johansson *et al.*



(2008)) sind sämtliche Wechselwirkungen im Folgenden anhand der hoch homologen (Sequenzidentität Fas1p: 57%, Fas2p: 63% (*Clustal Omega*))<sup>1</sup>, aber diesbezüglich besser strukturierten Kristallstruktur der TlanFAS (PDB-Codes: 2uva, 2uvb, (Jenni *et al.* (2007))) beschrieben.

### 2.4.1 $\alpha$ - $\alpha$ -Kontakte

Zum Aufbau des  $\alpha_6$ -Rads, bei dem insgesamt eine Interaktionsfläche von 77.000 Å<sup>2</sup> abgesättigt wird (Jenni *et al.* (2007)), interagieren die  $\alpha$ -Ketten durch homodimere Kontakte in *head-head-tail-tail*-Manier bis zum Ringschluss des Rads. Hierzu tragen vor allem die hoch konservierten Homodimerisierungsflächen der Kerndomänen von KR und KS bei und werden ergänzt durch die zusätzlichen Dimerisierungsmodule DM1-4 (Jenni *et al.* (2007)) (siehe Abb. 2.5 A). Innerhalb einer  $\alpha$ -Kette findet eine Interaktion zwischen KR- und KS-Domäne statt, die durch das zwischen diesen Domänen liegende 4-helikale Bündel (siehe Abb. 2.4) stabilisiert wird.

### 2.4.2 $\beta$ - $\beta$ -Kontakte

Vergleichsweise gering fällt demgegenüber die Interaktionsfläche der  $\beta$ - $\beta$ -Kontakte aus, die pro  $\beta_3$ -Dom weniger als 5.000 Å<sup>2</sup> ausmacht und durch die N-terminale Trimerisierungsdomäne (siehe Abb. 2.4) und durch den Kontakt der DH- mit der AT-Domäne der benachbarten Kette gebildet wird (Jenni *et al.* (2007)).

### 2.4.3 $\alpha$ - $\beta$ -Kontakte

Für die  $\alpha$ - $\beta$ -Wechselwirkung gibt es neben der Interaktion, die sich aus der Rekonstitution der MPT-Domäne ergibt (vgl. Kap. 5.1), drei weitere maßgebliche Kontakte, C1-3, die allesamt durch strukturelle Insertionen oder Expansion bezüglich der enzymatischen Kerndomänen gebildet werden. In C1 sitzt eine helikale Domäne unterhalb der ER-Domäne der  $\beta$ -Kette auf einer  $\alpha$ -Helix oberhalb der KS-Kerndomäne und bindet seitlich an den Linker zwischen KR- und KS-Domäne. Dieser bildet daneben über eine 55 AS lange  $\alpha$ -Helix an einen *Hot-Dog-Fold* innerhalb der DH-Domäne derselben  $\beta$ -Kette C2. C3 wird hingegen mit einer KR-KR-benachbarten  $\alpha$ -Kette zwischen einer Expansion in der MPT-Domäne und der KR-Domäne ausgebildet (siehe Abb. 2.5 B) (Jenni *et al.* (2007)).

---

<sup>1</sup><http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (17.09.2016, 11:20 Uhr)

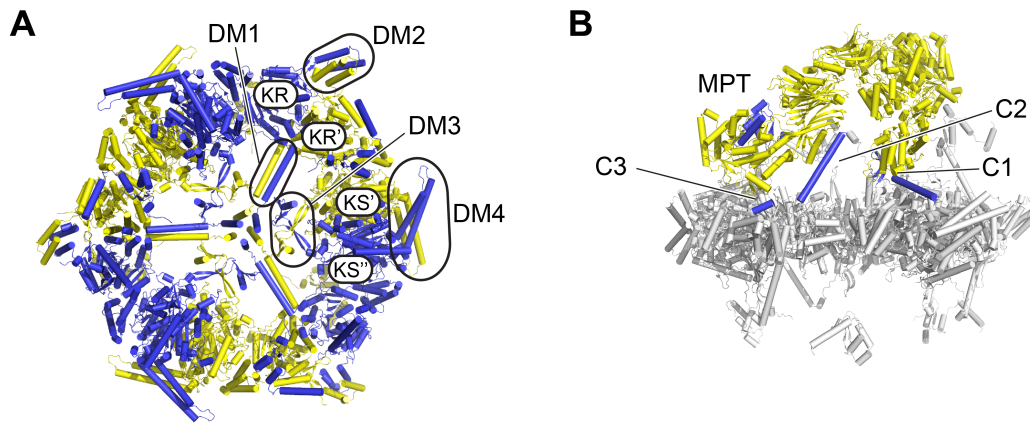


Abb. 2.5:  $\alpha$ - $\alpha$ - und  $\alpha$ - $\beta$ -Interaktionen in der fFAS. **A**  $\alpha_6$ -Rad aus der Kristallstruktur der TlanFAS (PDB-Code: 2uvb, Jenni *et al.* (2007)) in *Cartoon*-Repräsentation mit Blick entlang der  $C_3$ -Achse. Die Dimerisierungsmodule DM1-4 sind exemplarisch für einen Satz entsprechend ihrer Beiträge aus unterschiedlichen  $\alpha$ -Ketten jeweils in gelb und blau eingefärbt. Die angehörigen katalytischen Domänen, KR und KS, sind beschriftet und ihre Herkunft von unterschiedlichen  $\alpha$ -Ketten durch Apostroph gekennzeichnet. Die PPT-Domäne ist in dieser Kristallstruktur nicht sichtbar. **B**  $\alpha_6$ -Rad (grau) mit einzelner  $\beta$ -Kette (gelb) aus der Kristallstruktur der TlanFAS (PDB-Codes: 2uva, 2uvb, Jenni *et al.* (2007)) in *Cartoon*-Repräsentation mit Blick von außen entlang DM1. Beiträge der  $\alpha$ -Kette zu den  $\alpha$ - $\beta$ -Kontakten C1-3 und innerhalb der MPT-Domäne sind blau gefärbt. Nähere Beschreibung im Text.

## 2.5 Phosphopantetheinylierung von ACP in der fFAS

Für seine Funktion muss das ACP posttranslational aktiviert werden, indem ein aus CoA stammender Phosphopantetheinrest kovalent an eine spezifische Serinseitenkette, S180 der  $\alpha$ -Kette bei *S. cerevisiae*, gebunden wird. Man unterscheidet dabei zwischen *apo*-ACP, als inaktives, unmodifiziertes ACP, und *holo*-ACP, als aktive, phosphopantetheinylierte Form (siehe Abb. 2.6). Diese Phosphopantetheinylierung wird durch eine spezifische Phosphopantetheintransferase (PPT) katalysiert, die bei allen fFAS als außenliegende Domäne Teil des Enzymkomplexes ist (siehe Abb. 2.4) (Johansson *et al.* (2009)). Dies steht im Kontrast zu FAS I aus Bakterien und Metazoen, die hierfür separate Proteine besitzen. Das ACP der ScFAS kann nicht durch andere Phosphopantetheintransferasen, nicht einmal Ppt2p für die Aktivierung des mitochondrialen FAS II ACPs in *S. cerevisiae*, aktiviert werden. Umgekehrt kann die PPT der ScFAS genauso wenig fremdes ACP phosphopantetheinylieren (Stuible *et al.* (1998)).

Die sich aus räumlicher Separation von ACP und PPT in der fertigen fFAS sowie Einschluss des ACP im Inneren der „Fass-Struktur“ ergebende Konsequenz, dass die Phosphopantetheinylierung vor dieser finalen Strukturausbildung stattfinden muss, wurde *in-vitro* durch entsprechend zeitliche Variation der CoA-Zugabe bei chemisch

gesteuert reversibler Dissoziation der ScFAS gezeigt (Fichtlscherer *et al.* (2000)). Analog zur bakteriellen *holo*-ACP-Synthase (AcpS), die als Homotrimer katalytisch aktiv ist (Lambalot *et al.* (1996)), wurden bei Analysen der isolierten PPT-Domäne der ScFAS ebenso Trimere festgestellt, wobei das aktive Zentrum genauso wie bei bakteriellen Phosphopantetheintransferasen (Chirgadze *et al.* (2000); Parris *et al.* (2000)) durch die dimeren Schnittstelle zweier PPT-Monomere gebildet wird. Hierbei binden der Nukleotidteil und der Pantetheinteil von CoA über polare Wechselwirkungen an jeweils eine PPT-Untereinheit und präsentieren den Pyrophosphat-Linker frei in geeigneter Orientierung für den nukleophilen Angriff am  $\beta$ -Phosphat durch die zuvor deprotonierte Serinseitenkette des an der Schnittstelle andockenden *apo*-ACPs (Johansson *et al.* (2009)).

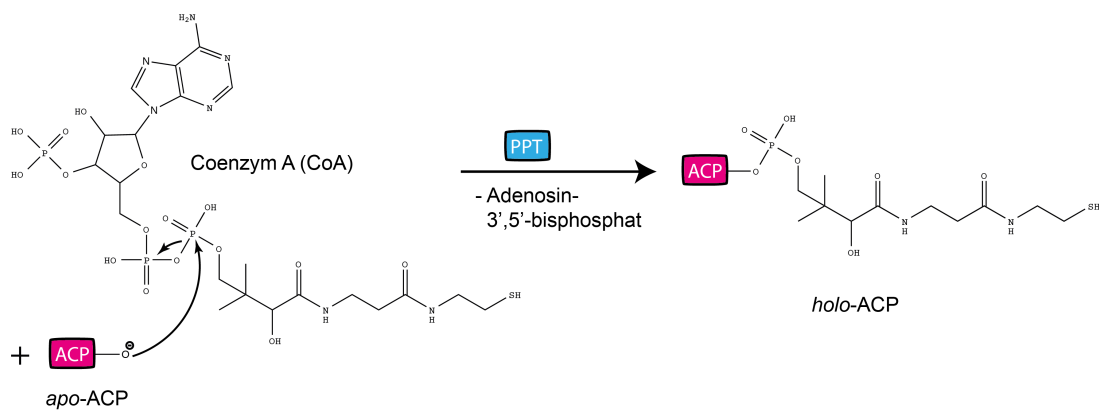


Abb. 2.6: Phosphopantetheinylierung von ACP. ACP und PPT sind analog Abb. 2.1 und Abb. 2.3 skizziert. Beschreibung siehe Text.

## 2.6 Die unterschiedlichen Typen der fFAS

Die umfangreichen und stetig expandierenden Analysen von Genomen und Proteinssequenzen und deren bibliographische Organisation in Datenbanken ermöglichen heutzutage leicht einen speziesübergreifenden Vergleich der fFAS. Es sind bisher vier verschiedene Varianten bekannt, die sich hinsichtlich der Position ihres Strangbruchs in zwei separate Polypeptidketten voneinander unterscheiden und in dieser Arbeit als unterschiedliche Typen entsprechend ihrer charakteristischen Präsenz innerhalb Abteilungen oder Klassen benannt werden. Ein Strangbruch tritt dabei entweder gar nicht (*Agaricomycetes*- und *Ustilaginomycetes*-Typ) oder stets in strukturell definierten Domänen auf: beim *Pucciniomycotina*-Typ innerhalb der antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt-Domäne, beim ScFAS-einschließenden *Ascomycota*-Typ sogar innerhalb der katalytisch aktiven MPT-Domäne und beim *Tremellomycetes*-Typ innerhalb des 4-helikalen Bündels (siehe Abb. 2.7). Aufgrund der starken, strukturellen Konservierung der fFAS (Fischer *et al.* (2015)) lassen sich diese Positionen über ein

Sequenz-*Alignment* (vgl. Kap. 5.4) gut in der Kristallstruktur der ScFAS nachvollziehen (siehe Abb. 2.7).

### 2.6.1 Fettsäuresynthasen in Sekundärmetabolismen

Neben diesen fFAS für den Primärmetabolismus tauchen in manchen Pilzen fFAS-abgeleitete, aber distinkte FAS I gemeinsam mit Polyketidsynthasen in Genclustern zur Biosynthese von Sekundärmetaboliten auf. In *Aspergillus flavus* ist dies etwa der Komplex NorS zur Synthese des Aflatoxinvorläufers Norsolorinsäure (Brown *et al.* (1996); Watanabe and Townsend (2002); Crawford *et al.* (2009)) oder in *Monascus purpureus* MAzPs zur Synthese roter Azaphilonepigmente (Balakrishnan *et al.* (2014)). In beiden Fällen dienen hier FAS I der Bereitstellung kurzkettiger Fettsäuren mit einer Länge von sechs (NorS, Watanabe and Townsend (2002)) oder acht und zehn Kohlenstoffatomen (MAzPs, Balakrishnan *et al.* (2014)), die von kanonischen Polyketidsynthasen weiter umgesetzt werden (Foulke-Abel and Townsend (2012)). Watanabe and Townsend (2002) haben Indizien für NorS als  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Proteinkomplex aus den beiden Fas1p- und Fas2p-Analoga HexB und HexA (Sequenzidentität Fas2p/HexA 38%, Fas1p/HexB 36% (Johansson *et al.* (2009))) und der iterativen Typ I-Polyketidsynthase PksA herausgearbeitet, die zusammen mit einem Vergleich aus Sequenz-*Alignments* HexA / HexB als strukturelle Minimalvariante einer fFAS mit niedriger Multimerisierung aufgrund fehlender Bindungsdomänen (siehe Abb. 2.7) annehmen lassen (Jenni *et al.* (2007)). Konkretere Informationen zur Struktur des NorS-Komplexes sind gegenwärtig jedoch leider nicht vorhanden.

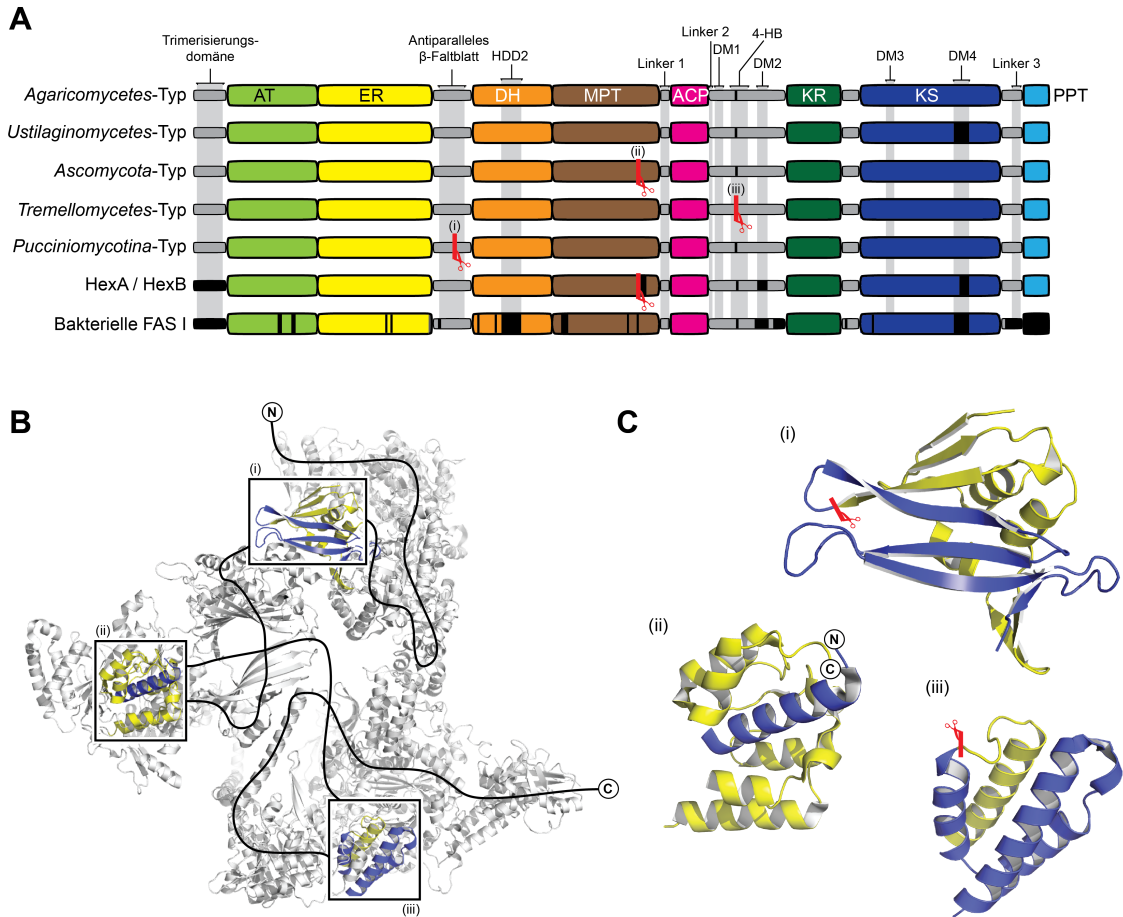


Abb. 2.7: Übersicht der unterschiedlichen fFAS-Typen. **A** Adaptiert von Grninger (2014). Abgebildet sind die übereinandergelegten Domänenübersichten zum Vergleich verschiedener fFAS-Typen, der sekundären FAS HexA / Hex B aus *Aspergillus flavus* und der bFAS. Die Abkürzungen der Domänennamen entsprechen Abb. 2.1 und sind nur für den *Agaricomycetes*-Typ angegeben, aber für alle weiteren gültig. *Agaricomycetes*- und *Ustilaginomycetes*-Typ und bakterielle FAS repräsentieren FAS mit einzelner, multifunktionaler Polypeptidkette. In den anderen Fällen ist die Position der Trennung in zwei separat codierte Polypeptidketten durch einen roten Balken mit Schere angezeigt. Indices (i-iii) referenzieren auf die betreffenden Schnittstellen in den Sektionen B und C. Nicht-katalytische Abschnitte sind in grau abgebildet und wichtige Strukturelemente sind zur Verfolgung grau hinterlegt und oben benannt. HDD2: *Hot-Dog*-Domäne 2, DM1-4: Dimerisierungsmodule 1-4, 4-HB: 4-helikales Bündel. Schwarze Bereiche kennzeichnen Abwesenheiten gegenüber den anderen Typen. **B** Separiertes  $\alpha\beta$ -Fragment aus der Kristallstruktur der ScFAS (PDB-Code: 3hmj) in *Cartoon*-Repräsentation. die Schnittstellenmotive der Teilung in zwei separate Polypeptidketten sind für den *Pucciniomycotina*- (i), *Ascomycota*- (ii) und *Tremellomycetes*-Typ (iii) angezeigt und farblich in gelb für das C-terminale Ende der jeweils ersten Kette und blau für das N-terminale Ende der zweiten Kette hervorgehoben. Eine schwarze Linie skizziert zudem grob den Verlauf der kompletten Peptidkette vom N-Terminus der ersten Kette (N) zum C-Terminus der zweiten Kette (C). **C** Vergrößerungen der Schnittstellenmotive aus B mit Angabe der Termini durch (N) und (C) in (ii) bzw. der Positionen des Kettenbruchs entsprechend *Sequenz-Alignments* (vgl. Kap. 5.4) durch rote Balken in (i) und (iii).

## 2.7 Regulation der fFAS-Biosynthese in *S. cerevisiae*

Die regulatorischen Prozesse, denen die ScFAS seitens Transkription, aber auch seitens proteolytischem Abbau unterworfen ist, sind durch intensive Bemühungen unterschiedlicher Forschungsgruppen heute gut verstanden. Gegenüber den aus einer einzelnen Polypeptidkette bestehenden fFAS aus anderen Pilzen (siehe Abb. 2.7) ergibt sich für die ScFAS die Notwendigkeit einer stöchiometrisch balancierten Bereitstellung ihrer beiden Ketten  $\alpha$  und  $\beta$ , die durch eine koordinierte Transkription und selektive Proteolyse erreicht wird (siehe Abb. 2.8) (Schueller *et al.* (1992); Schweizer and Hofmann (2004)).

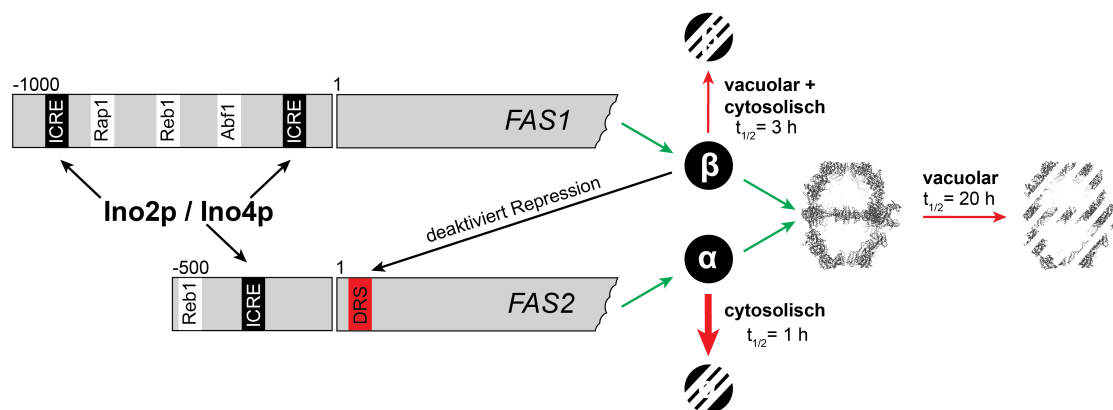


Abb. 2.8: Regulation der ScFAS in Expression und Proteolyse. Schematische Darstellung des 5'-Beginns für die Gene *FAS1* und *FAS2* inklusive ihrer Promotorbereiche mit 1.000 bzw. 500 bp *upstream* zum Leserahmens nach Idee von Schweizer and Hofmann (2004) erweitert. Regulatorische Sequenzen für die Expression sind eingezeichnet mit konstitutiv wirkenden Elementen in weiß, dem Inositol-/Cholin-abhängigen Element (ICRE) in schwarz und der *Downstream Repression Site* (DRS) in rot. Darauf wirkende Faktoren sind über schwarze Pfeile zugeordnet. Grüne Pfeile stellen die Erschaffung der Polypeptidketten  $\beta$  und  $\alpha$ , bzw. des  $\alpha_6\beta_6$ -Komplexes, repräsentiert als Querschnitt der Kristallstruktur (PDB-Code\_ 3hmj), dar. Rote Pfeile zeigen unter Angabe der Halbwertszeiten den proteolytischen Abbau an, wobei der schnelle Abbau der  $\alpha$ -Kette in fett hervorgehoben ist.

### 2.7.1 Transkription von *FAS1* und *FAS2*

Bei anderen *Ascomyceten*, wie etwa *Neurospora crassa* und *Aspergillus nidulans*, wird die Transkription der Gene *FAS1* und *FAS2* für die beiden Polypeptidketten  $\beta$  und  $\alpha$  vermutlich durch eine gemeinsame Promotorsequenz gekoppelt, die in diesen Fällen zwischen den benachbarten, aber in entgegengesetzter Richtung laufenden Genen liegt (Brown *et al.* (1996); Schweizer and Hofmann (2004)). In *S. cerevisiae* finden sich *FAS1* und *FAS2* hingegen isoliert voneinander auf unterschiedlichen Chromosomen (XI und XVI). Die Promotorsequenzen sind mit 1000 bp für *FAS1* bzw. 500 bp für *FAS2* in beiden Fällen gut identifiziert und hinsichtlich regulatorischer

Elemente charakterisiert (Chirala (1992)). Durch Erkennungssequenzen der generellen Transkriptionsfaktoren Rap1p, Abf1p und Reb1p auf der *FAS1*-Promotorsequenz und Reb1p auf der *FAS2*-Promotorsequenz ist die ScFAS-Expression prinzipiell konstitutiv reguliert, um eine haushälterisch wichtige Grundaktivität der Fettsäuresynthese in der Zelle zu gewährleisten (Schüller *et al.* (1994)). Eine direkte Abhängigkeit der *FAS1*- oder *FAS2*-Transkription von extern zugeführten freien Fettsäuren ist nicht pauschal annehmbar und zeigt sich gegensätzlich in unterschiedlichen Hefestämmen (Meyer and Schweizer (1976); Schweizer *et al.* (1978); Chirala (1992)). Stattdessen wird die Transkription jedoch definitiv über die intrazellulären Inositol- und Cholin-Pegel gesteuert, wodurch über diese Vorläufer in der Phospholipidsynthese die ScFAS-Biosynthese an den Bedarf aus der Phospholipidproduktion gekoppelt ist. Dies geschieht über eine Ino2p/ Ino4p-sensitive Sequenz, genannt ICRE (inositol/ cholin *responsive element*), die bereits gut aus den Promotoren anderer Gene für die Phospholipidsynthese bekannt ist und in der *FAS1*-Promotorsequenz als doppeltes Motiv und in der *FAS2*-Promotorsequenz als einfaches Motiv vorliegt. Es wirkt bei Inositol-/ Cholin-Mangel aktivierend und bei Überangebot unterdrückend (Schwank S (1997); Schweizer and Hofmann (2004)).

Neben diesen externen regulatorischen Faktoren unterliegt die *FAS1*-/*FAS2*-Transkription für deren stöchiometrische Koordination aber auch einer strengen Autoregulation, bei der maßgeblich *FAS1* eine bestimmende Rolle gegenüber *FAS2* einnimmt. Denn während sich die *FAS1*-Transkription unbeeinflusst gegenüber einer Deletion von *FAS2* zeigt, fällt die detektierbare Menge an *FAS2*-mRNA bei Deletion von *FAS1* auf 35% des Wildtyp-Pegels herab (Schueller *et al.* (1992); Wenz *et al.* (2001)). Zudem zeigt ein Überangebot an *FAS1* einen stark aktivierenden Effekt auf die *FAS2*-Transkription gegenüber dem Wildtyp-Niveau (Chirala (1992); Wenz *et al.* (2001)). Der Wirkungsort für die *FAS1*-vermittelte Regulation von *FAS2* liegt hierbei nicht in der Promotorsequenz von *FAS2*, sondern ist auf den ersten 66 Nukleotiden der proteincodierenden Sequenz von *FAS2* lokalisiert und wird somit als *Downstream Repression Site* bezeichnet. Das genaue Wirkprinzip dieses Repressors, der nur bei Anwesenheit unkomplexierter  $\beta$ -Kette direkt oder über weitere Co-Faktoren deaktiviert wird, um die *FAS2*-Transkription zu ermöglichen, ist bisher nicht aufgeklärt. Jedoch determiniert dieser Mechanismus die balancierte Anpassung der Produktion der  $\alpha$ -Kette (*FAS2*-Produkt) an die Menge vorhandener  $\beta$ -Kette (*FAS1*-Produkt) (Wenz *et al.* (2001); Schweizer and Hofmann (2004)).

### 2.7.2 Proteolyse von Fas1p und Fas2p

Zusätzlich zur Transkriptionskontrolle wird eine Feinjustierung der Mengen an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten durch deren unterschiedliche Abbaumechanismen im vakuolaren und zytosolischen System von *S. cerevisiae* gewährleistet. Für den assemblierten

$\alpha_6\beta_6$ -Komplex ist eine Halbwertszeit von über 20 h beschrieben, wohingegen die unassemblierten Ketten  $\alpha$  (1 h in  $\Delta fas1$ -Stamm) und  $\beta$  (3 h in  $\Delta fas2$ -Stamm) wesentlich kurzlebiger sind (Egner *et al.* (1993)), und sich dadurch eine generelle Intoleranz der Zelle gegenüber überschüssiger  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Ketten zeigt (Schueller *et al.* (1992); Egner *et al.* (1993)). Assemblierte ScFAS wird ausschließlich durch die vakuolaren Proteinasen yscA und yscB abgebaut und unterliegt dabei unter Hungerbedingungen einer selektiven Autophagie (Shpilka *et al.* (2015)). Für den Abbau der relativ kurzlebigen, unassemblierten  $\alpha$ -Kette ist die zytosolische Proteinase yscE zuständig, die als Hefe-Analogon des Proteasoms beschrieben wird. Vacuolare Abbauprozesse können für die  $\alpha$ -Kette ausgeschlossen werden. Die unassemblierte  $\beta$ -Kette findet sich hingegen trotz festgestellter, jedoch gegenüber der  $\alpha$ -Kette langsamerer zytosolischer Degradation unter Hungerstress ebenfalls in Vakuolen und unterliegt dort der Proteolyse durch yscA und yscB (Egner *et al.* (1993)). Somit ist die differentielle Proteolyse von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette neben deren koordinierter Synthese ein komplementärer Mechanismus zur Stöchiometriekontrolle, der durch den beschleunigten Abbau der  $\alpha$ -Kette gegenüber der  $\beta$ -Kette letztere wiederum verstärkt als kausalen Ursprung in der Regulation der ScFAS-Biosynthese manifestiert.

## 2.8 Relevanz der Assemblierungsinhibierung der fFAS zu therapeutischen Zwecken

Unter den humanpathogenen Pilzen sind besonders Vertreter der Gattungen *Aspergillus*, *Candida* und *Cryptococcus* für Mykosen verantwortlich, unter denen vor allem immungeschwächte Menschen teilweise lebensbedrohlich leiden, indem diese kommunalen Organismen opportunistische Infektionen verursachen (Hedayati *et al.* (2007); Miceli *et al.* (2011); Turner and Butler (2014)). Während hierbei *Cryptococcus*-Arten durch Befall von Lunge bis hin zum zentralen Nervensystem bei HIV-Patienten den Ausbruch von AIDS als zentrale Pathogene definieren und eine der Haupttodesursachen ausmachen (Njei *et al.* (2013); Tripathi *et al.* (2012)), bilden *Candida*-Arten ein hohes und wachsendes Gefährdungspotential durch systemische nosokomiale Infektionen (Miceli *et al.* (2011)). In einer dreijährigen, USA-weiten Studie (Edmond *et al.* (1999)) werden *Candida*-Infektionen mit immerhin 8% aus 10.000 untersuchten, systemischen Infektionen in 49 Krankenhäusern beziffert und stellen mit einer Mortalität von 40% sämtliche viel prominentere Vertreter der 91% bakteriellen Infektionen in den Schatten. Wey *et al.* (1988) kommen in ihrer Studie sogar zu dem Schluss, dass zwischen 1983 und 1986 40% aller Todesfälle durch in den untersuchten Krankenhäusern zugezogene Infektionen auf Pilze zurückzuführen sind, obwohl diese auch hier nur 10% aller auslösenden Erreger ausmachen.

Eine besondere Brisanz erfahren diese Zahlen, wenn man die lange unterschätzte, aber



zunehmende Resistenzbildung gegenüber bisher etablierten Standardmedikamenten, vor allem Azole und 5-Flucytosin, vergegenwärtigt (Iwata (1992); Prole and Taylor (2012); Ford *et al.* (2015); Caban *et al.* (2016)). Dies führt inzwischen bereits zur Ausbreitung multiresistenter *Candida auris* in Krankenhäusern (Chatterjee *et al.* (2015)).

Um diesen Resistenzen zu entgegnen, wird heute in schweren Fällen oft auf eine Kombination von 5-Flucytosin (Inhibierung der DNS-Synthese) mit dem orthogonal wirkenden Reserveantimykotikum Amphotericin B (Bindung an Ergosterin) zurückgegriffen, wovon letzteres durch schwere Nebenwirkungen und inzwischen ebenfalls Resistenzbildungen begleitet wird (Miceli *et al.* (2011); Ford *et al.* (2015)). Komplizierte Kombinationstherapien unter individueller Abwägung der oft nicht tolerierbaren Nebenwirkungen mit teilweise lebenslanger Erhaltungstherapie sind auch charakteristisch für *Cryptococcus*-Infektionen bei Vorliegen einer HIV-Infektion (Perfect *et al.* (2010)). Neue Antimykotika mit veränderter Wirkstrategie sind folglich aus Sicht zunehmender Resistenzen sowie starker Nebenwirkungen dringend erforderlich.

Die Wichtigkeit der endogenen *de-novo*-Fettsäuresynthese durch die fFAS für die Virulenz unterschiedlicher *Candida*-Arten und *Cryptococcus neoformans* wurde in Tiermodellen gezeigt (Nguyen *et al.* (2009); Zhao *et al.* (1996); Chayakulkeeree (2007)). Diese unabhängigen Ergebnisse belegen die unbedingte Notwendigkeit dieses Primärmetabolismus und widerlegen die mögliche Annahme, dass die untersuchten Organismen ihren Fettsäurebedarf durch Aufnahme von externen Fettsäuren aus ihrem Wirt ohne Verlust ihrer Virulenz ausreichend decken könnten.

Das Konzept der Inhibierung der Fettsäuresynthese erweist sich ebenfalls in der Tuberkulose-Therapie mit Isoniazid und Pyrazinamid als erfolgreich (Banerjee *et al.* (1994); Zimhony *et al.* (2000)). Das in dieser Arbeit relevante Anvisieren der fFAS-Assemblierung als therapeutisches Angriffsziel ist prinzipiell neu, aber verspricht durch den einzigartigen Aufbau der fFAS gegenüber der mFAS, und damit des menschlichen Analogons, eine hohe Spezifität. Hingegen sind Wirkstoffe, die auf aktive Zentren zielen, aufgrund derer weitläufigen Konservierung in allen Lebewesen vergleichsweise unspezifisch und lassen dadurch bereits a priori unerwünschte Nebenwirkungen erwarten (Kathiravan *et al.* (2012)). So wirkt etwa der starke FAS-Inhibitor Cerulenin (Johansson *et al.* (2008); Nguyen *et al.* (2009)) durch kovalente Bindung im aktiven Zentrum der KS ebenso auf die humane FAS (Agostini *et al.* (2004); Ruth and Javier (2006)).



## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Wasser

Wasser wurde für sämtliche Experimente in dieser Arbeit mit einem Wasseraufbereitungssystem auf eine Restleitfähigkeit von  $0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$  entionisiert. Für mikrobiologische oder DNA-beteiligte Anwendungen wurde dieses Wasser zusätzlich autoklaviert.

#### 3.1.2 Chemikalien

Die im Anhang A, Tabelle A.2 befindliche Liste umfasst sämtliche Feinchemikalien sowie Zubereitungen und Mischungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

#### 3.1.3 Enzyme

Alle in Anhang A, Tabelle A.1 gelisteten Restriktionsenzyme und Polymerasen wurden, falls nicht anders angegeben, im jeweiligen, vom Hersteller empfohlenen und bezogenen Puffer angewendet.

#### 3.1.4 Synthetische Oligonukleotide / *Primer*

Alle synthetischen Oligonukleotide zur Verwendung als *Primer* (siehe Anhang A, Tabelle A.3) in PCR oder als Klonierungsfragmente wurden entsalzt in Lösung mit einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  in Wasser von Sigma Aldrich (Sigma Aldrich Co. LLC., USA) bezogen.

#### 3.1.5 Plasmide

Die hier verwendeten Hefe-Vektoren (siehe Anhang A, Tabelle A.4) weisen einen pRS-Hintergrund mit CEN/ARS-Replikationssequenz (Sikorski and Hieter (1989)) auf und wurden von Euroscarf<sup>1</sup> bezogen. Ein Ampicillin-Resistenzgen sowie eine Replikationssequenz für *E. coli* ermöglichen zudem die Vermehrung und Klonierung in diesem Organismus. Die Templat-Plasmide mit den Kennungen Mgfas oder VR (siehe Tabelle A.4) stammen aus Vorarbeiten zu diesem Projekt durch Martin Grininger und

---

<sup>1</sup>EUROSCARF, Goethe-Universität, Frankfurt, Deutschland

Ronald Vollrath am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. pAG-Vektoren wurden von Susan Lindquist über Addgene<sup>2</sup> bereitgestellt. Zur Lagerung wurden Plasmide generell bei -20 °C im Elutionspuffer des *GeneJET Plasmid Midiprep Kits* aufbewahrt und bei Bedarf langsam auf Eis aufgetaut.

### 3.1.6 Synthetische Peptide

Peptide für die CD-spektroskopischen Untersuchungen wurden bei Caslo Aps (Dänemark) als lyophilisierte Chloridsalze in 95%iger Reinheit synthetisiert und dabei in Abhängigkeit ihres jeweiligen biologischen Kontexts C-terminal amidiert oder N-terminal acetyliert.

Tab. 3.1: Synthetische Peptide

Name	Sequenz
$\alpha 1_{K2S/E8R}$	MSPEVEQRLAHILLTELLAYQ-NH <sub>2</sub>
$\alpha 67/68$	Ac-VTKEYFQDVYDLTGSEPIKEIIDNWEKYEQ
$\alpha 1$	MKPEVEQELAHILLTELLAYQ-NH <sub>2</sub>

### 3.1.7 Antikörper

Tab. 3.2: Antikörper

Antikörper	Hersteller
<i>Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP conjugate</i> (polyclonal)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
<i>Rabbit anti-ScFAS</i> Antiserum	Egner <i>et al.</i> (1993)

### 3.1.8 *E. coli*-Stämme

Zur Klonierung und Präparation von Plasmid-DNA wurden stets *Stellar™ Competent Cells* der Firma Clontech (Clontech® Laboratories, Inc., USA) verwendet.

Genotyp:

*F*<sup>-</sup>, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *phoA*,  $\phi 80d$  *lacZ* $\Delta$  *M15*,  $\Delta$ (*lacZYA* - *argF*) *U169*,  $\Delta$ (*mrr* - *hsdRMS* - *mcrBC*),  $\Delta$ *mcrA*,  $\lambda$ <sup>-</sup>

<sup>2</sup>(<https://www.addgene.org>)

### 3.1.9 *S. cerevisiae*-Stämme

In Tabelle 3.3 sind sämtliche in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme gelistet.

Tab. 3.3: *S. cerevisiae*-Stämme. *YKL182w* entspricht *FAS1*, *YPL231w* entspricht *FAS2*.

Name	Genotyp	Quelle
<i>BY4742</i>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i>	1
<i>Y25032</i>	<i>BY4743</i> ; <i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>met15<math>\Delta</math>0/MET15</i> ; <i>LYS2/lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>YKL182w/YKL182w::kanMX4</i>	1
<i>Y21061</i>	<i>BY4743</i> ; <i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>met15<math>\Delta</math>0/MET15</i> ; <i>LYS2/lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>YPL231w/YPL231w::kanMX4</i>	1
<i>BY.PK1238_1A</i>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>MET15</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>YKL182w::kanMX4</i> ; <i>YPL231w::kanMX4</i> <i>+ PRS416_FAS1_FAS2</i>	2
<i>BY.PK1238_1A_KO</i>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>MET15</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>YKL182w::kanMX4</i> ; <i>YPL231w::kanMX4</i>	2
<i>ATCC 201388_fas1-GFP</i>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>met15<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>YKL182w-GFP</i> <i>met15<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>YKL182w-GFP</i>	3

<sup>1</sup> EUROSCARF, Goethe-Universität, Frankfurt, Deutschland

<sup>2</sup> Diese Arbeit

<sup>3</sup> Thermo Fisher Scientific Inc., USA

### 3.1.10 Puffer

#### MES-Puffer

50 mM MES

50 mM Tris, pH 7,3

0,1% SDS

1 mM EDTA

#### TE-Puffer

1,0 M Tris-HCl, pH 7,4

0,5 M EDTA

**Lämmli-Probenpuffer**

(4x konzentriert)  
278 mM Tris-HCl, pH 6,8  
44% Glycerin  
4% Lithiumdodecylsulfat  
0,02% Bromphenolblau  
1420mM 2-Mercaptoethanol

**Blue-Native-Probenpuffer**

(2x konzentriert)  
1 M 6-Aminocapronsäure  
100 mM BisTris-HCl, pH 7,0  
100 mM NaCl  
20% Glycerin  
0,1% *Serva Blue G250*

**Blue-Native-Kathodenpuffer**

50 mM Tricin  
15 mM BisTris  
0,002% *Serva Blue G250*

**Blue-Native-Anodenpuffer**

50 mM BisTris-HCl, pH 7,0

**WB-Transferpuffer**

500 mM Bis-Tris, pH 7.2  
500 mM Bicin  
20 mM EDTA  
10% Methanol

**TBST**

50 mM Tris-HCl, pH 7,6  
150 mM NaCl  
0,05% *Tween® 20*

**FAS-SEC-Puffer**

100 mM NaPi, pH 7,2  
200 mM NaCl  
1 mM EDTA

**TSN**

50 mM TRIS-HCl, pH 7,5  
100 mM NaCl  
1% Natriumdodecylsulfat

**Aufbruch-Puffer**

10 mM Tris-HCl, pH 8,0  
100 mM NaCl  
1 mM EDTA  
2% *Triton X-100*  
1% Natriumdodecylsulfat

**TBE-Puffer**

100 mM Tris  
83 mM Borsäure  
1 mM EDTA

## **ScFAS-Auflösungspuffer**

100 mM NaPi, pH 7,4

100 mM NaCl

1 Spatelspitze DNase-I

1 Tablette/25 mL Proteaseinhibitor-Cocktail

### **3.1.11 Nährmedien**

#### **Sterilisation**

Alle Nährmedien wurden mit Reinstwasser hergestellt und stets steril eingesetzt. SD-Medien wurden durch Sterilfiltration durch Polystyrolfilter (*Millex*, 0,45 µm) sterilisiert, alle anderen durch Autoklavieren. Glucose wurde dabei stets separat gelöst autoklaviert und erst danach zugesetzt.

#### **Zugabe von Fettsäuren**

In SD-Medien und den YPD-basierten Medien für den FAS-Komplementationstest (vgl. Kap. 3.3.7) wurden Fettsäuren nach dem Sterilfiltrieren aus einer autoklavierten Stammlösung (10% Tergitol® NP-40, 500 mg/L Myristinsäure, 500 mg/L Palmitinsäure, 500 mg/L Stearinsäure) nach deren Emulsion durch Erhitzen bis zur gewünschten Fettsäurekonzentration zugesetzt und, falls nötig, wurde durch Zugabe von 10%igem Tergitol® NP-40 dessen Endkonzentration im Medium von stets 1% eingestellt.

#### **Zugabe von Antibiotika**

Antibiotika wurden nach Bedarf nach dem Sterilisieren aus sterilfiltrierten (*Millex*-Polystyrolfilter, 0,45 µm) Stammlösungen mit 50 g/L Geneticin·2H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bzw. 100 g/L Ampicillin bis zur angegebenen Endkonzentration zugesetzt.

## ***E. coli*-Nährmedium**

### **LB<sup>3</sup>**

Trypton 10 g/L  
Hefeextrakt 5 g/L  
NaCl 5 g/L  
pH 7,0±0,2

### **LB-Agar<sup>4</sup>**

Trypton 10 g/L  
Hefeextrakt 5 g/L  
NaCl 5 g/L  
Agar-Agar 15 g/L  
pH 7,0±0,2

### **SOC<sup>5</sup>**

2,0% Pepton  
0,5% Hefeextrakt  
10,0 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
10,0 mM MgCl<sub>2</sub>  
10,0 mM MgSO<sub>4</sub>  
20,0 mM Glucose

## ***S. cerevisiae*-Nährmedium**

### **YPD**

1% Hefeextrakt  
2% Pepton  
2% Glucose

### **YPDF**

1% Hefeextrakt  
2% Pepton  
2% Glucose  
1% Tergitol<sup>®</sup> NP-40  
50 mg/L Myristinsäure  
50 mg/L Palmitinsäure  
50 mg/L Stearinsäure

## **SD-Medien**

SD (= *synthetic defined*)-Medien greifen an Stelle von Hefeextrakt und Pepton auf definierte Mischungen aller lebensnotwendigen Stoffe als Feinchemikalien zurück, um gezielt einzelne Bestandteile auszuschließen. Die Fertigmischungen hierfür wurden für diese Arbeit von Sigma Aldrich Co. LLC., USA bezogen und wie angegeben zubereitet:

---

<sup>3</sup>Fertigmischung von Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

<sup>4</sup>Fertigmischung von Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

<sup>5</sup>steriles Fertigmedium von New England Biolabs, USA



## **SD**

6,8 g/L *Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids*

1,4 g/L *Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements (without histidin, leucin, tryptophan, uracil)*

76 mg/L L-Histidin

76 mg/L L-Leucin

76 mg/L Uracil

## **SD (-his; -leu; -trp)**

6,8 g/L *Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids*

1,4 g/L *Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements (without histidin, leucin, tryptophan, uracil)*

76 g/L Uracil

## **SD (-trp; -ura)**

6,8 g/L *Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids*

1,4 g/L *Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements (without histidin, leucin, tryptophan, uracil)*

76 mg/L L-Histidin

76 mg/L L-Leucin

## **SDF**

analog SD-Medien

zusätzlich:

1% Tergitol® NP-40

50 mg/L Myristinsäure

50 mg/L Palmitinsäure

50 mg/L Stearinsäure

Zur Präparation von Agarplatten wurden diese Medien zusätzlich mit 1,5% Agar-Agar versetzt.

### **3.1.12 Kommerzielle Kits**

DNA-Präparationen aus *E. coli* und DNA-Aufreinigung nach Agarosegelelektrophorese wurden stets mit kommerziell bezogenen Kits durchgeführt, die in Anhang A, Tabelle A.5 gelistet sind.

### **3.1.13 Geräte**

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Anhang A, Tabelle A.6 aufgelistet.

### **3.1.14 Verbrauchsmaterialien**

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Anhang A, Tabelle A.7 aufgelistet.

### **3.1.15 Software und Datenbanken**

Die in dieser Arbeit verwendete Software und Datenbanken sind in Anhang A, Tabelle A.8 aufgelistet.

### **3.1.16 Proteinsequenzen**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Proteinsequenzen sind mit ihren UniProt-Zugangsnummern in Anhang A, Tabelle A.9 aufgelistet.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Konzentrationsbestimmungen von DNA-Lösungen

DNA-Konzentrationen wurden spektroskopisch durch Absorption bei 260 nm bestimmt.

### 3.2.2 Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Zum Erhalt von chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae* für PCR-Anwendungen wurden Standardmethoden adaptiert (Lundblad and Struhl (2001)). Eine 10 mL-Kultur des entsprechenden *S. cerevisiae*-Stamms in YPD-Medium wurde bei 30 °C und 200 Upm 24 h kultiviert (typische OD(600)=25). Nach Zentrifugation der Kultur (3.200 g; 5 min; 24 °C) wurde das Zellpellet zum Waschen in 500 µL Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert (20.800 g; 5 s; 24 °C). Die Zellen wurden in 200 µL Aufbruch-Puffer resuspendiert und es wurden 0,3 g Glasperlen (0,25 mm-0,50 mm) sowie 200 µL Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol-Mischung hinzugegeben. Nach fünfminütigem Wirbeln mittels Vortexmischer auf Stufe 8, wurden 200 µL TE-Puffer zugegeben und der Ansatz nach sorgfältigem Mischen zentrifugiert (20.800 g, 5 min; 24 °C). Der abgenommene Überstand wurde mit 1 mL Ethanol versetzt, gemischt und erneut zentrifugiert (20.000 g, 3 min, 24 °C). Der Überstand wurde verworfen und der sedimentierte Rückstand in 400 µL TE-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 30 µL RNase A-Lösung (1 mg/mL in Wasser) wurde die Mischung 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 10 µL Ammoniumacetatlösung (4 M in Wasser) sowie 1 mL Ethanol versetzt. Erneutes Zentrifugieren (20.800 g, 3 min, 24 °C) lieferte nach Verwerfen des Überstands die sedimentierte, chromosomale DNA, die in 100 µL DNA resuspendiert und zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert wurde.

### 3.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* wurden Standardmethoden (Lundblad and Struhl (2001)) adaptiert und durch Kombination mit kommerziellen Kits (siehe Anhang A, Tabelle A.5) verändert. Eine 8 mL-Kultur des transformierten *S. cerevisiae*-Stamms in entsprechendem SD-Medium wurde bei 30 °C und 200 Upm 24 h inkubiert. Nach Zentrifugation der Kultur (3.200 g; 5 min; 24 °C) wurde das Zellpellet in 200 µL TSN-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 mL-Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,3 g Glasperlen (0,25 mm -0,50 mm) wurde der Ansatz 5 min mittels Vortexmischer auf Stufe 8 gewirbelt. Anschließend wurden 400 µL Resuspensionspuffer (*GeneJET Plasmid Midiprep Kit*) sowie 100 µL Lyse-Puffer (*PureYield™ Plasmid Miniprep System*) hinzu pipettiert und nach sorgfältigem Mischen 2 min bei 24 °C inkubiert. Nach Zugabe von 250 µL Neutralisationspuffer (*PureYield™*

*Plasmid Miniprep System*) und sorgfältigem Mischen wurde der Ansatz zentrifugiert (20.800 *g*; 5 min; 24 °C), der Überstand in ein Silica-Säulchen (*Pure Yield™ Plasmid Miniprep System*) überführt und ab hier weiter nach Herstellerprotokoll des *Miniprep-Kits (Pure Yield™ Plasmid Miniprep System)* verfahren. Eine Amplifikation der Plasmid-DNA in präparativem Maßstab wurde anschließend durch Vermehrung in *E. coli*-Kultur erreicht.

### 3.2.4 Präparative Amplifikation von Plasmid-DNA

Zur generellen Vermehrung von Plasmid-DNA wurden 50 mL LB-Medium unter Zugabe von Ampicillin (100 mg/L Endkonzentration) mit monoklonalen Zellen des transformierten *E. coli*-Stamms beimpft und 15 h bei 37 °C und 180 Upm im Erlenmeyerkolben inkubiert. Die Kultur wurde zentrifugiert (3.200 *g*, 10 min, 4 °C) und entsprechend Herstellerprotokoll mittels *Midiprep*-Kit weiter behandelt.

### 3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCRs wurden mit den Polymerasen *Phusion High Fidelity DNA-Polymerase*, *Q5 High Fidelity DNA-Polymerase* oder zur analytischen Anwendung *Taq DNA-Polymerase* der Firma New England Biolabs nach Herstellerangaben in 25 µL-Ansätzen zur analytischen Anwendung oder 50 µL-Ansätzen zur präparativen Anwendung durchgeführt. Die *Annealing*-Temperaturen wurden 0-10 °C unterhalb der berechneten Schmelztemperaturen (siehe Anhang A, Tabelle A.8) gewählt. Ein typisches PCR-Programm sah wie folgt aus:

Initiale Denaturierung: 98 °C 45 s	} 30 Zyklen präparative Anwendung 40 Zyklen analytische Anwendung
Denaturierung 98 °C 2 s	
<i>Annealing</i> ( $T_M-3$ ) °C 20 s	
Elongation 72 °C 22 s/kb	
Finale Elongation 2-10 min	

Nach präparativer PCR zur Linearisierung von Vektoren für eine spätere Klonierung wurde im Anschluss stets ein DpnI-Verdau durchgeführt.

### 3.2.6 DNA-Gelelektrophorese

Zur Aufreinigung oder Analyse von PCR-Produkten wurde eine Agarosegelelektrophorese in TBE-Puffer durchgeführt. Für die FAS-Konstrukte wurden zur Auftrennung Agarosegele zwischen 0,5% und 0,7% verwendet, für kleinere Konstrukte bis zu 1,5%. Zur Fluoreszenzdetektion der DNA wurde *Roti®-GelStain* nach Herstellerangaben zugesetzt. Zur Größenabschätzung der Fragmente wurden DNA-Marker von New

England Biolabs verwendet. Alle Proben wurden in Probenpuffer von New England Biolabs aufgetragen. Die Detektion erfolgte unter UV-Einstrahlung. Ausgeschnittene DNA-enhaltende Gelstücke wurden mit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* aufgearbeitet.

### 3.2.7 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde zum analytischen Verdau oder zur Linearisierung für Klonierungen mit Restriktionsenzymen von New England Biolabs entsprechend Herstellerangaben verdaut und anschließend über DNA-Gelelektrophorese aufgereinigt. Beim Einsatz mehrere Enzyme wurden diese gleichzeitig verwendet.

### 3.2.8 Klonierung von Plasmiden in *E. coli*

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide außer pMF001 wurden in *E. coli* mit dem *In-Fusion® HD Cloning Kit* der Firma Clontech entsprechend Herstellerangaben kloniert. Dazu wurden die Vektoren mittels Restriktionsverdau oder PCR linearisiert (siehe Anhang A, Tabelle A.4) und die zu klonierenden Gene mittels PCR (Anhang A, Tab. A.3) amplifiziert.

### 3.2.9 Klonierung von Plasmiden durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae*

Das Plasmid pMF001 wurde durch homologe Rekombination in *BY4742* kloniert. Dazu wurde der Vektor pRS416 (Euroscarf<sup>6</sup>) mit den Restriktionsenzymen Sac-I und Sal-I linearisiert und mit einer Menge von 68 ng gemeinsam mit PCR-Amplifikaten für *FAS1* (116 ng; *Primer* FAS1-GR1 + FAS1-GR2, Anhang A, Tab. A.3) und *FAS2* (166 ng; *Primer* FAS2-GR1 + FAS2-GR2, Anhang A, Tab. A.3) in den Hefestamm transformiert. Nach Selektion auf SD(-trp; -ura)-Agarplatten wurde das Plasmid nach (vgl. Kap. 3.2.3) isoliert.

### 3.2.10 Erzeugung von Deletionen auf Plasmiden

Über Linearisierung mit *Primern* (Anhang A, Tab. A.3) wurden gezielt Bereiche ausgeschlossen und gleichzeitig die für die *In-Fusion®*-Klonierung nötigen homologen Bereiche zur Recyclisierung und evtl. Start- oder Stopp-Codons eingeführt. Durch *In-Fusion®*-Klonierung wurden die so verkürzten Plasmide wieder geschlossen. In Anhang A, Tabelle A.4 sind sämtliche verwendeten Plasmide gelistet und ihre Historie reproduzierbar dargestellt. Dabei wird zwischen Plasmiden der Generationen 1 und 2 unterschieden, da sie zunächst ohne native *FAS1*-/*FAS2*-Terminatoren

---

<sup>6</sup>EUROSCARF, Institut für Molekulare Biowissenschaften, Goethe-Universität, Frankfurt, Deutschland, <http://www.euroscarf.de>

(295 bp bzw 258 bp downstream des Leserahmens) (Generation 1) kloniert wurden, diese aber nachträglich eingefügt wurden (Generation 2).

### **3.2.11 Erzeugung von Punktmutationen auf Plasmiden**

Zur schnellen und universellen Erzeugung verschiedener Punktmutationen im  $\alpha 1$ -Helix-codierenden Bereich von *FAS2* wurde pMF011 mit den Primern MF520 FOR und MF520 REV via PCR linearisiert. Durch *In-Fusion*<sup>®</sup>-Klonierung mit synthetischen DNA-Fragmenten MF515 oder MF545 mit den jeweiligen Mutationen wurde das Plasmid wieder geschlossen.

### **3.2.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA**

Alle klonierten Plasmide wurden bei den Firmen SeqLab (SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Deutschland) oder GATC Biotech (GATC Biotech AG, Köln, Deutschland) mit individuellen Sequenzier-*Primern* mit Schmelztemperaturen im Bereich um 60 °C sequenziert.

## **3.3 Mikrobiologische Methoden**

### **3.3.1 Generelles zur Hefekultivierung**

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Medien und Materialien durchgeführt.

#### **Lagerung**

Hefestämme und Transformanten hiervon wurden auf Agarplatten maximal einen Monat bei 4 °C gelagert. Über diesen Zeitpunkt hinaus wurden Replikate der Stämme durch Ausstreichen auf frische Agarplatten und anschließender zweitägiger Kultivierung bei 30 °C erstellt. Zur längeren und stabileren Lagerung wurden Kulturen 1:1 mit 86%igem Glycerin verdünnt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert. Bei Bedarf wurden hieraus durch Überführung geringer Zellmengen mittels steriler Pipettenspitzen neue Kulturen herangezogen.

#### **Kulturgefäße**

50 mL-Kulturen wurden stets in 100 mL-Erlenmeyerkolben angesetzt, 1 L- oder 2 L-Kulturen für die Proteinexpression in 3 L- bzw. 5 L-Erlenmeyerkolben. 5 mL-Kulturen wurden in Reagenzgläsern (16x160 mm) mit Aluminiumkappe angesetzt und stets bei 50° Neigung und 200 Upm geschüttelt, um die Sedimentation von Zellen zu vermeiden.

### 3.3.2 DNA-Transformation in *E. coli*

Plasmid-DNA, sowie DNA-Fragmente zur Klonierung (vgl. Kap. 3.2.8) wurden stets mittels Hitzeschock in kommerziell bezogene kompetente *E. coli*-Zellen (Clontech Stellar™) nach Herstellerprotokoll transformiert und anschließend auf LB-Agarplatten mit 100 mg/L Ampicillin selektiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die Transformanten direkt weiterverarbeitet.

### 3.3.3 DNA-Transformation in *S. cerevisiae*

Zur Transformation von Plasmid DNA oder DNA-Fragmenten für die Klonierung durch homologe Rekombination wurde eine etablierte LiOAc-Methode (Gietz and Schiestl (2007)) unter Anpassung verwendet. Falls nicht anders angegeben, wurden die Zellen dabei immer auf Eis gehalten.

Stets 1 µg jeder Plasmid-DNA, falls nicht anders angegeben, wurden dabei simultan co-transformiert. Eine 5 mL-Übernachtskultur des Hefestamms in YPD oder YPDF bei 30 °C und 200 Upm wurde verwendet, um eine 50 mL-Hauptkultur im gleichen Medium auf eine OD(600) von 0,2 zu beimpfen. Nach Inkubation bei 30 °C und 200 Upm bis OD(600)=0,8 wurden pro Transformationsansatz je 5 mL dieser Kultur zentrifugiert (3.200 g, 5 min, 4 °C) und die Zellen je einmal durch Resuspension in 1 mL Wasser und erneutem Zentrifugieren (3.200 g, 5 min, 4 °C) gewaschen. Die Zellen wurden in je 500 µL Lithiumacetatlösung (0,1 M in Wasser) resuspendiert, 5 min bei 24 °C inkubiert und durch Zentrifugation (5.000 g, 15 s, 4 °C) wieder sedimentiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in folgender Mischung resuspendiert:

240,0 µL PEG-1.500-Lösung (50% in Wasser)  
76,0 µL Wasser  
36,0 µL Lithiumacetatlösung (1,0 M in Wasser)  
5,0 µL Heringssperma-DNA-Lösung (10 g/L in Wasser)  
je 2,0 µL Lösung der zu transformierenden DNA

Die Suspension wurde vorsichtig und vollständig durchmischt und 30 min bei 30 °C, gefolgt von 20 min bei 42 °C und 450 Upm inkubiert. Nach dem Sedimentieren der Zellen durch Zentrifugation (4.000 g, 15 s, 4 °C) und Waschen mit je 1 mL Wasser wurden die Zellen in je 100 µL Wasser resuspendiert und auf entsprechenden Agar-Platten zur Selektion ausgestrichen. Hefekolonien waren abhängig vom Selektionsdruck nach zwei bis vier Tagen sichtbar.

### 3.3.4 Erzwungener Plasmid-Verlust bei *S. cerevisiae*

Zur Erzeugung des Stamms *BY.PK1238\_1A\_KO* aus *BY.PK1238\_1A* wurde dieser einer Negativselektion gegen pMF001 unterworfen. Dazu wurde *BY.PK1238\_1A* in 5 mL SD(-trp; -ura)-Medium mit 200 mg/L G418 bis OD(600)=1,8 kultiviert und von dieser Kultur 28 µL auf einer SDF(-trp)-Agarplatte mit 1 g/L 5-Fluororotsäure ausgestrichen. Nach drei Tagen bei 30 °C wurde bei den Kolonien durch Test auf Auxotrophie gegenüber Uracil sowie den FAS-Komplementationstest (vgl. Kap. 3.3.7) die Abwesenheit von pMF001 bestätigt.

### 3.3.5 Enzymatische Lyse von *S. cerevisiae*-Zellen

Zum proteinschonenden Aufschluss von *S. cerevisiae*-Zellen in analytischem Maßstab hinsichtlich *Western Blot* von ScFAS wurde eine enzymatische Methode unter Verdau der *S. cerevisiae*-Zellwand, gefolgt von osmotischem Schock gewählt. Eine 5 mL-Übernachtskultur in YPD- (bei *BY4742*), YPDF- (bei *BY.PK1238\_1A\_KO*) oder entsprechendem SDF-Medium (bei *BY.PK1238\_1A\_KO*-Transformanten) bei 30 °C und 200 Upm wurde verwendet, um eine 50 mL-Hauptkultur im jeweils gleichen Medium auf eine OD(600) von 0,2 zu beimpfen. Nach Inkubation bei 30 °C und 200 Upm bis zu einer OD(600) von 1,5 wurde diese Hauptkultur zentrifugiert (3.200 g, 8 min, 4 °C), in 40 mL eiskaltem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert (3.200 g, 8 min, 4 °C). Die Zellen wurden daraufhin in 7,5 mL Verdauungsmedium (20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1,1 M Sorbitol; 1 mM DTT, 57 units/mL Zymolyase) resuspendiert und darin 2 h bei 30 °C und kurzem Schwenken alle 30 min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (3.200 g, 5 min, 4 °C) und die sedimentierten Spheroplasten in 2,5 mL Homogenisierungsmedium (50 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1,1 M Glycerin; 5 mM EDTA; 1 mM DTT, 1% einer Proteaseinhibitortablette) resuspendiert. Diese Suspension wurde 2 h auf Eis inkubiert und daraufhin die Zelltrümmer durch Zentrifugation sedimentiert (3.200 g, 15 min, 4 °C), während der Zellysate-enthaltende Überstand für weitere Experimente verwendet wurde.

### 3.3.6 *S. cerevisiae*-Spotting-Test

Zellen von einer einzelnen Hefekolonie nach Plasmid-Transformation wurden zum Beimpfen einer 5 mL-Kultur in SDF (-his, -leu, -trp)-Medium mit 200 mg/L G418 verwendet. Nach Inkubation dieser Kultur bei 30 °C und 200 Upm bis zur stationären Phase wurde daraus eine weitere 5 mL-Kultur im gleichen Medium inokuliert und diese bei 30 °C und 200 Upm bis OD(600)=11-14 inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3.000 g, 5 min, 4 °C) sedimentiert, einmal mit 1 mL Wasser gewaschen und nach erneuter Resuspension in Wasser auf OD(600)=1 verdünnt. Hieraus wurden vier weitere serielle 1:10-Verdünnungen in Wasser hergestellt und



gleiche Aliquote aller Zellsuspensionen wurden gleichzeitig mittels Metallstempel auf eine YPD-Agarplatte übertragen. Nach zweitägiger Inkubation bei 30 °C wurden die Platten abgelichtet.

### 3.3.7 FAS-Komplementationstest

Eine zweistufige Vorkultur der entsprechenden Hefetransformanten wurde analog zu (Kap. 3.3.6) herangezogen, woraus die 5 mL-Hauptkulturen angeimpft wurden. Reproduzierbare Inokula wurden dabei gewährleistet, indem die leichten Unterschiede in den OD(600)-Werten durch angepasste Inokulationsvolumen ausgeglichen wurden. So wurden die Hauptkulturen immer auf  $OD(600)=32 \cdot 10^{-3}$  inokuliert und anschließend 24 h bei 30 °C und 200 Upm inkubiert. Die Messung der OD(600) erfolgte in 20- oder 50-facher Verdünnung der Kulturen in Wasser und in einer 10 mm-Polystyrolküvette.

## 3.4 Proteinbiochemische Methoden

### 3.4.1 Expression und Isolierung von ScFAS aus *S. cerevisiae*

Der Stamm *BY.PK1238\_1A\_KO* wurde mit den Plasmiden pMF011 und pMF014 transformiert und Zellen von einer einzelnen Kolonie wurden in 50 mL YPD-Medium mit 200 mg/L G418 2,5 Tage bei 30 °C und 200 Upm bis zur stationären Phase der Kultur inkubiert. Hiervon wurde eine 2 L-Hauptkultur in YPD auf  $OD(600)=0,5$  inokuliert und diese 10 h bei 30 °C und 120 Upm bis  $OD(600)=10$  inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4.000 g, 10 min, 4 °C) sedimentiert, zur Waschung in 80 mL Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert (4.000 g, 10 min, 4 °C). Nach anschließender Resuspension in 35 mL ScFAS-Auflösungspuffer wurden 10 mL Glycerperlen (0,25 mm-0,50 mm) hinzugegeben, die zuvor in konzentrierter Salzsäure gewaschen wurden, und die Zellen durch Schütteln der Mischung mittels *FastPrep*<sup>®</sup>-24 aufgeschlossen (10x 15 s bei 5 m/s, dazwischen jeweils 45 s auf Eis pausiert). Nach Sedimentieren durch Zentrifugation von intakten Zellen (3.200 g, 10 min, 4 °C) und Zelltrümmern sowie unlöslichen Proteinbestandteilen (20.000 g, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand zunächst über Glaswolle und anschließend durch einen Polystyrolfilter (*Millex*, 22 µm Porengröße) gefiltert. Die Isolation der *Strep-I*-markierten ScFAS wurde durch Affinitätschromatographie an 5 mL *Strep-Tactin*<sup>®</sup> *Sepharose*<sup>®</sup>-Material erreicht und lieferte 3,5 mg Protein.

### 3.4.2 Konzentrationsbestimmung und Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Proteinkonzentrationen wurden spektroskopisch durch Absorption bei 280 nm bestimmt. Zur Erzielung höherer Konzentrationen wurden Proteinlösungen bei 4 °C

durch Querstromfiltration mit Membranfiltern (*Amicon® Ultra*) unterschiedlicher Ausschlussgrößen und Volumenkapazitäten aufkonzentriert.

### 3.4.3 Größenausschlusschromatographie

Größenausschlusschromatographie (SEC) der fFAS wurde mittels *ÄKTAexplorer* und Säule *Superose 6 10/300 GL* im FAS-SEC-Puffer durchgeführt. Dabei wurden 500 µL Proteinlösung mit typischen Konzentrationen von 1 g/L bis 2 g/L auf die Säule geladen und 1 mL-Fractionen bei einer Flussrate von 0,3 mL/min gesammelt. Die Absorption bei 280 nm wurde dabei aufgezeichnet. Während aller Schritte wurde das Protein stets auf Eis bzw. bei 4 °C gehalten. Die Kalibrierung des chromatographischen Systems wurde mithilfe eines *Gel-Filtration HMW Calibration Kit* vorgenommen.

### 3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur denaturierenden PAGE wurden die Proteinproben nach Zusatz von Lämmli-Puffer 5 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert und abhängig von Proteinkonzentrationen in variierenden Volumen auf ein kommerziell bezogenes Fertiggel (*Novex® NuPAGE™ 3-12% Bis-Tris*) geladen.

Nach Elektrophorese (200 V, 1 h, Eiskühlung) in MES-Puffer wurde das Gel 1 h bei 24 °C unter konstantem Schwenken in *InstantBlue Coomassie®*-Fertiglösung gefärbt.

### 3.4.5 Native PAGE-Western Blot-Analyse von FAS

Zellysate wurden, wie unter (Kap. 3.3.5) beschrieben, hergestellt und zur Vergleichbarkeit unterschiedlicher Proben auf eine gemeinsame Gesamtproteinkonzentration im Lysat zwischen 1 g/L und 5 g/L durch Zentrifugenfilter mit einer Ausschlussgröße von 100 kDa gebracht. Die Proben wurden 1:1 mit *Native PAGE*-Probenpuffer gemischt und zur Feinjustierung von Abweichungen in den Proteinkonzentrationen in variierenden Volumen auf ein kommerziell bezogenes Fertiggel (*Novex® NativePAGE™ 3-12% Bis-Tris*) geladen. Als Referenz wurde eine Gesamtmenge von 0,1 µg bis 0,2 µg gereinigte ScFAS (vgl. Kap. 3.4.1) in 2,0 µL bis 4,0 µL finaler *Blue Native*-Probe verwendet.

Nach der Elektrophorese (150 V, 2 h, Eiskühlung) im *Blue Native*-Puffersystem wurden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran durch Elektrotransfer (25 V, 1 h, Eiskühlung) in WB-Transferpuffer übertragen. Die Membran wurde daraufhin dreimal je 20 min in 30 mL TBST-Puffer mit 0,2% *iBlock™* am Drehrad bei 24 °C inkubiert. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte über Nacht mit einer 1:5.000-Verdünnung eines *Rabbit-anti-FAS*-Antiserums (Egner *et al.* (1993)) in 15 mL TBST-Puffer mit 0,2% *iBlock™* bei 4 °C am Drehrad. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit je 20 mL TBST mit 0,2% *iBlock™* für je 20 min bei

24 °C wurde der sekundäre Antikörper, HRP-konjugiertes *Goat-anti-Rabbit-IgG*, mit einer Konzentration von 200 ng/mL in 15 mL TBST-Puffer mit 0,2% *iBlock<sup>TM</sup>* 1 h bei 24 °C am Drehrad inkubiert. Abschließend wurde die Membran dreimal 30 min mit 15 mL TBST-Puffer mit 0,2% *iBlock<sup>TM</sup>* sowie einmal 30 min mit 20 mL TBST-Puffer am Drehrad bei 24 °C gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran mit 14 mL *Roti<sup>®</sup>-Lumin* nach Herstellerangaben behandelt und daraufhin die Lumineszenz für 12 s bis 20 s (*Peqlab Fusion SL* aufgezeichnet).

### 3.4.6 CD-Spektroskopie

Die synthetischen Peptide (siehe Tab. 3.1) wurden mit einer Konzentration von 1 g/L in Wasser gelöst und filtriert (*Millex*, 0,22 µm PES-Membran). Hieraus wurden die Messproben mit 40 µM Peptid in gefiltertem (*Millex*, 0,22 µm MCE-Membran) Phosphatpuffer (100 mM NaPi, pH 7,2) mit variierenden Volumenanteilen Trifluorethanol angesetzt. Die Messungen erfolgten in einer Quarzglasküvette mit 1 mm Schichtdicke (Hellma GmbH & Co. KG, Deutschland) bei 22 °C in Stickstoffatmosphäre im Wellenlängenbereich von 260-190 nm. Von jeder Probe wurden zehn Wiederholungen gemessen und am Ende gemittelt. Spektren zur Hintergrundmessung wurden mit jeweiligem Puffer ohne Peptidzugabe unter sonst gleichen Bedingungen aufgenommen und von den Probenspektren subtrahiert.

### 3.4.7 Split-GFP-Test

Transformanten des Stamms *BY.PK1238\_1A\_KO* mit den Plasmiden pMF038 und pMF039 wurden bis OD(600)=1,3 bei 30 °C und 200 Upm in 5 mL YPD-Medium kultiviert und Zellysate nach Kap. 3.3.5 hergestellt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mit 100 µL Zellysate an einem Mikroplattenleser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und Detektion bei 510 nm.

### 3.4.8 FAS-Aktivitätstest

FAS-Aktivitäten wurden durch die spektroskopische Messung des NADPH-Umsatzes ermittelt. Dazu wurde die Enzymreaktion von 25 µg SEC-aufgereinigtem Protein in 120 µL gepufferter, wässriger Lösung (200 mM Kaliumphosphat pH 7,3; 87 µM DTT; 250 µM NADPH, 417 µM Acetyl-CoA, 500 µM Malonyl-CoA) bei 24 °C durchgeführt. Die Absorption bei 334 nm wurde zunächst ohne Malonyl-CoA 2 min gemessen und erst danach die Reaktion durch Malonyl-CoA-Zugabe gestartet. Zur Berechnung der Aktivität wurde nur der unmittelbar darauf folgende lineare Abfall der Absorptionskurve herangezogen (Lynen (1969)). Eine Einheit ist dabei definiert als der Umsatz von 1 µmol Malonyl-CoA, bzw. 2 µmol NADPH, wodurch ein

kompletter Zyklus zur Verlängerung der Alkylkette um zwei CH<sub>2</sub>-Einheiten im Reaktionsmechanismus der FAS beschrieben wird.

#### **3.4.9 Disassemblierung der Fettsäuresynthase aus *S. cerevisiae* mit 2,3-Dimethylmaleinsäureanhydrid**

1,5 mg affinitätschromatographisch aufgereinigte ScFAS (vgl. Kap. 3.4.1) in 500 µL Puffer (100 mM NaPi, pH 7,5; 100 mM NaCl; 10 mM DTT) wurde unter Eiskühlung alle 10 min mit jeweils 1,0 µL einer 10%igen Lösung von 2,3-Dimethylmaleinsäureanhydrid (DMMA) in wasserfreiem THF versetzt. Nach sechsmaliger DMMA-Zugabe und insgesamt einstündiger Inkubation unter Eiskühlung wurden weitere 1,5 µL der DMMA-Lösung sowie 1,5 µL Natriumhydroxidlösung (1 M in Wasser) zugegeben und der Ansatz 0,5 h bei 24 °C inkubiert. Zur weiteren Verwendung in SEC- (vgl. Kap.3.4.3) oder *Native* PAGE-Experimenten (vgl. Kap. 3.4.5) wurde die Probe filtriert (0,22 µm PVDF-Membran).

## 4 Projektrelevante Vor- und Kooperationsarbeiten

### 4.1 Proteinbiochemische Experimente zum Verständnis der Assemblierung der Pilz-Fettsäuresynthase (fFAS)

#### Vorarbeiten

Seit 2008 wurden in der Forschungsgruppe von Martin Grninger am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried Experimente zum Verständnis des Assemblierungsmechanismus der Fettsäuresynthase aus *S. cerevisiae* (ScFAS) unter wesentlicher Beteiligung von Barbara Mulinacci und Ronald Vollrath durchgeführt. Diese umfassten rekombinante Versuche in *E. coli* mit Fokus auf Assemblierung und Phosphopantetheinylierung im heterologen Wirt und *in-vitro*-Untersuchungen von Wechselwirkungen an rekombinanten Konstrukten der ScFAS- $\alpha$ -Kette (vgl. Kap. 4.1.3, Kap. 4.1.4). Sie liefern neben meinen in Kap. 5 vorgestellten Ergebnissen zusätzlich nötige Erkenntnisse zum Verständnis des Assemblierungsmechanismus der fFAS.

Die Resultate dieser Vorarbeiten sind ebenfalls im Manuskript „Molecular mechanisms in fungal fatty acid synthase assembly“ (Fischer *et al.* (2016)) eingebettet und in Kap. 4.1.3 und Kap. 4.1.4 in Abgrenzung zu meinen eigenen Arbeiten in Auszügen für wichtige Schlussfolgerungen herangezogen.

Das in Kap. 4.1.4 genannte Ergebnis zur *Native PAGE-Western-Blot*-Analyse der ACP\_S180A-Mutante stammt aus meinen eigenen Arbeiten analog zu Kap. 5.3 und ist hier als thematisch ergänzende Erkenntnis integriert.

#### Kooperationen

In Kap. 4.1.1 sind Ergebnisse zur rekombinanten Expression der Fettsäuresynthase aus *Rhodospiridium toruloides* (RtFAS) gezeigt, die aus einer Kooperation mit den Forschungsgruppen von Zongbao K. Zhao am Dalian Institute of Chemical Physics in Dalian, China und Janet Vonck sowie Daniel Rhinow am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt stammen. Sie sind in „*Cryo*-EM structure of fatty acid synthase (FAS) from *Rhodospiridium toruloides* provides insights into the evolutionary development of fungal FAS“ (Fischer *et al.* (2015)) veröffentlicht. Klonierung, Expression und Isolierung der RtFAS wurden hierbei von Zhiwei Zhu, Größenausschlusschromatographie (vgl. Kap. 3.4.3), die Analyse der FAS-Aktivität (vgl. Kap.

3.4.8) und die phylogenetische Analyse (vgl. Kap. 4.1.2) von mir durchgeführt. *Cryo*-EM, Datenprozessierung und strukturelle Modellierung wurden von Daniel Rhinow, Deryck J. Mills und Janet Vonck durchgeführt.

#### **4.1.1 Expression der Pilz-Fettsäuresynthase (fFAS) in *E. coli***

Die erfolgreiche Exprimierbarkeit von fFAS in *E. coli* konnte anhand der RtFAS gezeigt werden, indem neben korrekter struktureller Assemblierung (siehe Abb. 4.1 A) auch funktionell die Phosphopantetheinylierung des ACPs stattfindet, wie anhand der Aktivität des Enzyms bestätigt wurde (siehe Abb. 4.1 B). Ein hervorragend passendes *Docking* der Kristallstruktur der TlanFAS (PDB-Codes: 2uva, 2uvb, (Jenni *et al.* (2007))) in die 7,8 Å-aufgelöste Elektronendichtekarte aus *Cryo*-EM der RtFAS bezeugt die hohe strukturelle Akkuratessse des rekombinant exprimierten Enzyms (Fischer *et al.* (2015)). Folglich ist eine korrekte fFAS-Assemblierung ohne zusätzliche *trans*-wirkende Faktoren, wie spezifische Chaperone, auch im heterologen Wirt durch einen intrinsischen Trieb zur Phosphopantetheinylierung sowie Ausbildung der „Fass-Struktur“ gewährleistet. Dabei gilt besonders zu bemerken, dass die RtFAS als Vertreter des *Pucciniomycotina*-Typs eine Teilung in zwei separate Polypeptidketten zwischen ER- und DH-Domäne aufweist und die erste strukturell charakterisierte fFAS ist, die nicht dem *Ascomycota*-Typ entspricht. Somit wird mit der *Cryo*-EM-Struktur der RtFAS neben der hohen Sequenzhomologie von fFAS aus unterschiedlichen Pilzen (vgl. Kap. 2.6) die ebenso anzunehmend starke Konservierung ihrer Struktur trotz unterschiedlicher Positionen zur Separation in zwei Polypeptidketten bestätigt.

#### **4.1.2 Phylogenetische Analyse der Fettsäuresynthase aus *Rhodospordium torulooides***

Die rekombinante Expression der Fettsäuresynthase aus *Rhodospordium torulooides* (RtFAS) in *E. coli* konnte erfolgreich gezeigt werden und durch *Cryo*-EM wurde ihre hohe Strukturhomologie zur TlanFAS aufgedeckt (vgl. Kap.4.1.1). Nicht nur die Variation in der Position zur Aufteilung in  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette zwischen diesen beiden fFAS-Vertretern machen die RtFAS dabei zu einem interessanten Untersuchungsobjekt. Eine weitere Besonderheit wird ihr durch eine Duplizierung der ACP-Domäne zuteil. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass es sich bei *R. torulooides* um einen starken Lipidproduzenten handelt (Shen *et al.* (2013)), ist es schlüssig, dies mit einer gesteigerten Produktivität der RtFAS durch Verdopplung der ACP-vermittelten Transportkapazität für Edukte und Intermediate in den Reaktionskammern in Verbindung zu bringen. Messungen der Enzymaktivität von rekombinanter RtFAS lieferten aus drei individuellen Expressionen spezifische Aktivitäten von  $618 \pm 132$  mU/mg,  $506 \pm 85$  mU/mg und  $304 \pm 31$  mU/mg (der jeweils angegebene Fehler ist  $3 \sigma$  der Stan-

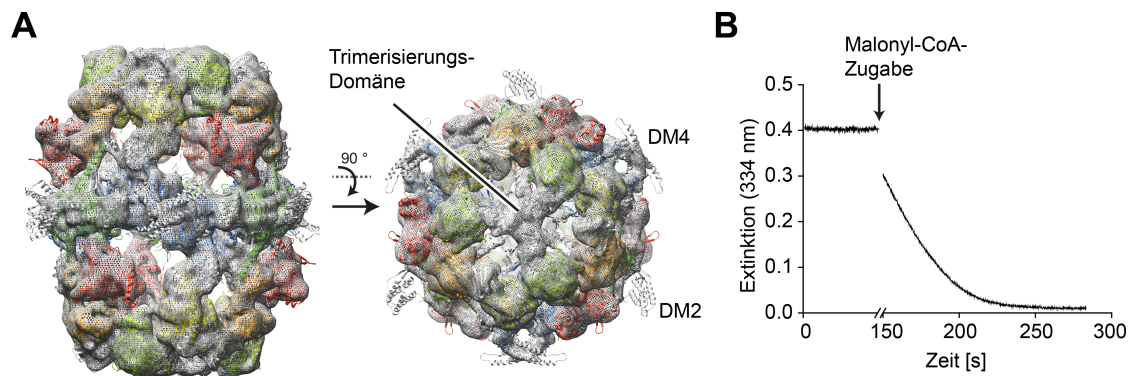


Abb. 4.1: Struktur und Aktivität der Fettsäuresynthase aus *R. toruloides* (RtFAS). Adaptiert von Fischer *et al.* (2015). **A** Cryo-EM-Elektronendichtekarte der RtFAS bei 7,8 ÅAuflösung mit eingepasster Kristallstruktur der TlanFAS (PDB-Codes: 2uva, 2uvb (Jenni *et al.*, 2007)) in *Cartoon*-Repräsentation und eingefärbt entsprechend des Schemas in Abb.1.1: hellgrün, AT; gelb, ER; orange DH, rot, MPT; dunkelgrün, KR; blau, KS. Die Dimerisierungsmodule DM2 und DM4 zeigen keine Elektronendichte aufgrund konformationeller Flexibilität. Ebenso ist keine Elektronendichte für die PPT-Domäne sichtbar. **B** Extinktionsprofil des FAS-Aktivitätstest von RtFAS (vgl. Kap. 3.4.8). Der Start der enzymatischen Aktivität durch Malonyl-CoA-Zugabe ist durch einen Pfeil angezeigt und von einem raschen Abfall der Extinktion bei 334 nm durch Umsatz des hier absorbierenden NADPH gefolgt.

dardabweichung aus drei individuellen Messungen) (vgl. Kap. 3.4.8). Verglichen mit publizierten Werten für die spezifische Aktivität der ScFAS zwischen 343  $\text{mU}/\text{mg}$  (Morisaki *et al.* (1993)) und 3.500  $\text{mU}/\text{mg}$  (Fichtlscherer *et al.* (2000); Wieland *et al.* (1979)) liegen diese Werte deutlich unter den Erwartungen an eine umsatzoptimierte fFAS. Da die *Cryo*-EM-Experimente eine hohe Proteinqualität/ -homogenität zeigten, können Erklärungen für eine reduzierte Aktivität eine unzureichende Phosphopantetheinylierung der ACP-Domänen aufgrund des heterologen Expressionssystems oder mangelhafte Bindung des Co-Faktors FMN sein (Fischer *et al.* (2015)).

Jede der beiden ACP-Domänen kann mit jeder enzymatischen Domäne in ihrem jeweiligen Reaktionsraum interagieren, womit eine kategorische Aufgabenteilung im Reaktionszyklus der FS-Synthese ausgeschlossen werden kann. Dies folgt aus der bestehenden Enzymaktivität in beiden Fällen eines mutagenetischen Austauschs des aktiven Serins gegen Alanin in jeweils einer der beiden ACP-Domänen (unveröffentlichte Daten, Zhiwei Zhu, schriftliche Mitteilung, 16.06.2015).

Ohnehin zeigt der Vergleich beider ACP-Domänen eine hohe Sequenzidentität (76%, Zhu *et al.* (2012)) und kann evolutionär betrachtet das Resultat einer Gen- bzw. Domänenduplizierung aus dem gesteigerten FS-Bedarf des Organismus sein (Marsh and Teichmann (2010)). Bei der sequenzbasierten Suche (*Uniprot BLAST*-Suche) weiterer FAS I mit doppeltem ACP ausgehend von der RtFAS-Sequenz zeigt sich dieser Phänotyp verstärkt in einzelncodierten FAS und ein Kladogramm (*Clustal*

*Omega*<sup>1</sup>, Sievers *et al.* (2011)) deckt dabei ihre Verwandtschaftsverhältnisse auf (siehe Abb. 4.2). So tragen ausschließlich alle in der Analyse berücksichtigten Spezies der Gruppe der Stramenopilen dieses Merkmal, darunter auch Protisten, die als pilzähnliche Mikroalgen mit einer starken Lipidproduktion beschrieben sind (Xie and Wang (2015)) (siehe Abb. 4.2). Per se ist hierbei interessant, dass FAS I, wie wir sie aus Pilzen kennen, mindestens in ihrer Sequenz auch in entfernteren nicht-pilzlichen Eukaryoten konserviert ist, die in der Evolutionsgeschichte aber schon früh eine eigene Entwicklung genommen haben.

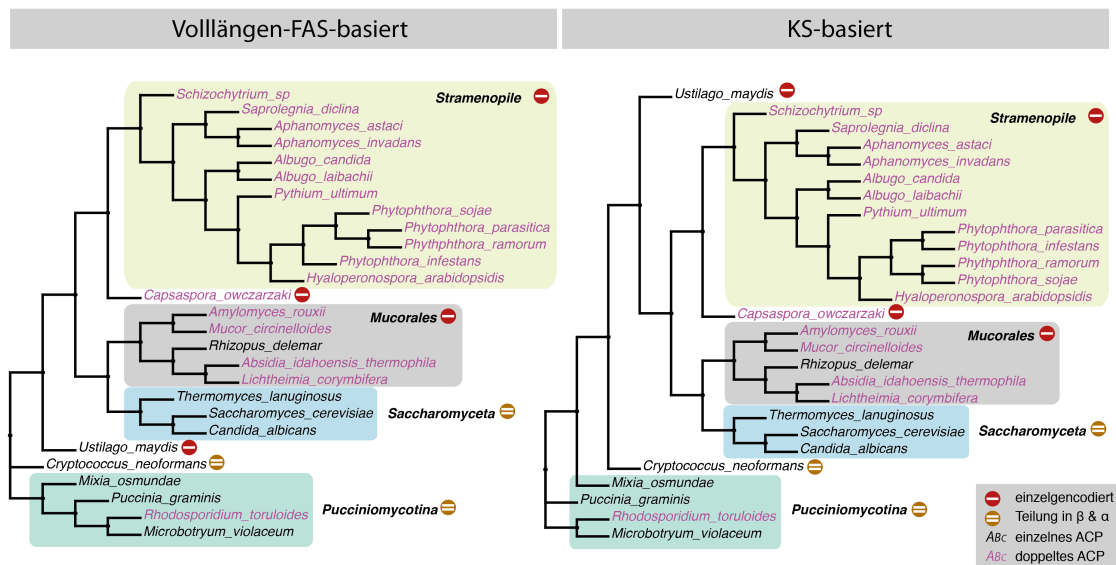


Abb. 4.2: Phylogenetische Analyse von ffAS mit dupliziertem ACP. Adaptiert aus Fischer *et al.* (2015). Zwei separate Kladogramme wurden basierend auf der vollen Länge der FAS-Proteinsequenz und zum Vergleich basierend auf einem die KS-Domäne umfassenden Bereich mit *Clustal Omega* mittels *Neighbor-Joining*-Algorithmus (Sievers *et al.* (2011)) erstellt. Verwendet wurden alle kompletten FAS I-Sequenzen mit dupliziertem ACP in der Uniprot-Datenbank nach *BLAST*-Suche (Stand 19.12.2014) sowie weitere ffAS mit einzeltem ACP. In  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette geteilte FAS wurden als fusionierte Konstrukte verwendet. Unterschiedliche Abstammungsgemeinschaften sind farblich hervorgehoben und eine Teilung in  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette, sowie ACP-Duplizierung angezeigt.

Auch Pilze der Ordnung *Mucorales* verfügen über dupliziertes ACP in ihren ffAS. Zu bemerken ist hierbei jedoch, dass es unter ihnen mit *Rhizopus delemar* mindestens eine Spezies gibt, deren ffAS nur ein ACP pro Satz enzymatischer Domänen besitzt. Ein komplementäres Bild zeichnet sich in der Unterabteilung *Pucciniomycotina*, in der *Rhodosporidium toruloides* die einzige Spezies mit dem Auftreten von dupliziertem ACP ist.

<sup>1</sup><http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (17.09.2016, 11:20 Uhr)



Das FAS-basierte Kladogramm lässt eine gute Zuordnung der gewählten Spezies zu ihren tatsächlichen Abstammungsgemeinschaften zu und die Spezies ordnen sich dabei entsprechend des Auftretts bzw. der Position zur Teilung in  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette ihrer FAS. Anhand dieser Analyse wurde in dieser Arbeit die Bezeichnung *Puccinomycotina*-Typ für solche fFAS gewählt, die eine Teilung in  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette zwischen ER- und DH-Domäne vorweisen. Das Auftreten duplizierter ACP-Domänen zeigt sich hingegen verstreut über die Klade und dabei nicht immer als gemeinschaftliches Merkmal. In Konsequenz ist für die ACP-Duplizierung von einem späteren Ereignis in der Evolutionsgeschichte auszugehen, das nach einer Teilung in  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette stattgefunden haben muss. Die weite Verbreitung einzelncodierter FAS auch in evolutionär entfernten Pilzen oder sogar Protisten spricht erneut für eine Entwicklung dieser Ausprägung, bevor sich in unterschiedlichen Abstammungsgemeinschaften unterschiedliche Strangbrüche in  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette an geeigneten Positionen entwickelt haben.

#### **4.1.3 Untersuchung der Assemblierungs- und Phosphopantetheinylierungsrelevanz von Domänen der ScFAS- $\alpha$ -Kette**

Aufgrund der strengen Regulation der ScFAS in *S. cerevisiae* (vgl. Kap. 2.7) sind ihre einzelnen Polypeptidketten,  $\alpha$  und  $\beta$  oder davon abgeleitete künstliche Konstrukte nicht aus ihrem natürlichen Wirt zugänglich. In *E. coli* zeigt die  $\alpha$ -Kette alleine exprimiert im Kontrast zur erfolgreichen Coexpression von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette sowie Expression einer kovalenten Fusion von  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette zudem einen starken Trang zur Aggregation. Dies erschwert *in-vitro*-Experimente mit separaten Protomeren zur Untersuchung ihrer Assemblierung und Phosphopantetheinylierungsfähigkeit.

Sukzessive Verkürzungen der ScFAS- $\alpha$ -Kette aus N-terminaler Richtung sollten die Aggregationsverantwortlichen Bereiche aufdecken und Auskunft über die Phosphopantetheinylierungsfähigkeit der verbliebenen C-terminalen Abschnitte geben. Der Multimerisierungsgrad wurde dabei mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) beurteilt und die Phosphopantetheinylierung von ACP über Massenspektrometrie nachgewiesen (Fischer *et al.*, 2016).

Dass die separierte PPT-Domäne der ScFAS Trimere bildet und diese in der Lage sind, ACP zu phosphopantetheinylieren, ist bereits literaturbekannt (Johansson *et al.*, 2009). N-terminal verlängert um die KS-Domäne sind durch Größenausschlusschromatographie hingegen lediglich Dimere feststellbar, ein Ergebnis, das durch die in Kap. 5.1 folgende energetische Quantifizierung der starken KS-KS-Dimerisierung verständlich ist und möglicherweise bereits den Zustand im  $\alpha_6$ -Rad der ScFAS repräsentiert (siehe Abb. 2.4). Dafür spricht auch die Fähigkeit von KS-PPT, separates ACP *in-vitro* zu phosphopantetheinylieren, womit gleichzeitig gezeigt ist, dass PPT als Dimer aktiv ist. Durch positionelle Flexibilität der als Monomere, aber benachbart

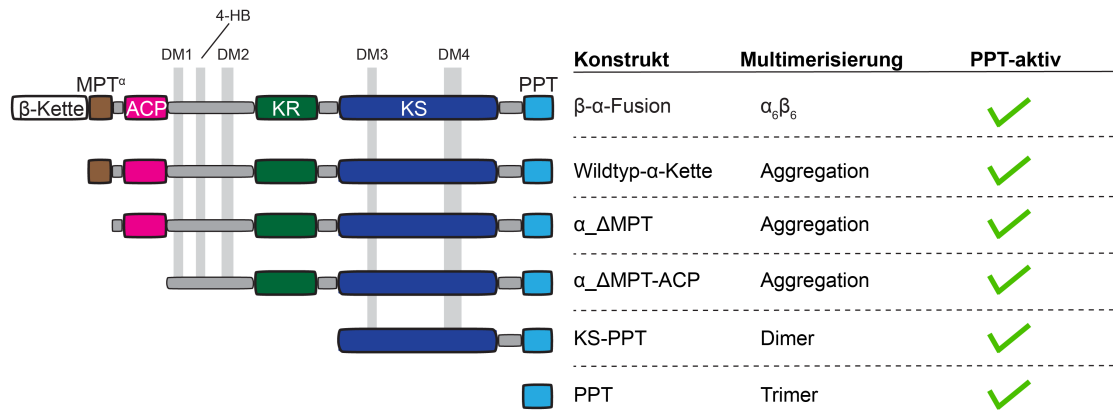


Abb. 4.3: Übersicht rekombinanter artifizierender Konstrukte der ScFAS- $\alpha$ -Kette und ihrer Eigenschaften. Beruhend auf Ergebnissen aus nicht eigenen Vorarbeiten wie im Text beschrieben. Sukzessive verkürzte Konstrukte sind in Domänenübersicht abgebildet und nebenstehend ihre Multimerisierungsstufen, wie durch SEC ermittelt, angegeben. Die Dimerisierungsmodule DM1-4 und das 4-helikale Bündel (4-HB) sind zur Nachverfolgung durch graue Balken angezeigt. Die komplette  $\beta$ -Kette ist im Fall der  $\beta$ - $\alpha$ -Fusion durch ein weißes Segment abgekürzt. Die Fähigkeit, eigenes oder separates ACP zu phosphopantetheinylieren, ist durch grüne Haken angezeigt.

auf DM4 ruhenden PPT-Domänen, wie durch die Schwierigkeit ihrer Strukturierung in der TlanFAS-Kristallstruktur (Jenni *et al.*, 2007) und fehlende Elektronendichte bei *Cryo*-EM an der RtFAS (Fischer *et al.*, 2015) deutlich wird, können diese offensichtlich ihren aktiven, dimeren Zustand erreichen. Gleiches spiegelt sich auch in der Phosphopantetheinylierungsfähigkeit assemblierter ScFAS gegenüber separatem ACP (Johansson *et al.*, 2009).

Eine weitere N-terminale Verlängerung der KS-PPT-Einheit um KR inklusive der Dimerisierungsmodule DM1 und DM2 führt bereits zur unspezifischen Aggregation des Proteins, die auch nicht durch Verlängerung um ACP oder bis hin zur Wildtyp- $\alpha$ -Kette vermieden werden kann (siehe Abb. 4.3). Während das KS-PPT-Konstrukt neben der Homodimerisierungsfläche der KS-Domäne lediglich über die zur selben Dimerisierung führenden Dimerisierungsmodule DM3, DM4 verfügt und damit auf der dimeren Stufe abgesättigt ist, führt die angeschlossene KR-Domäne inklusive DM1 und DM2 ebenso durch Homodimerisierung insgesamt zu einem linearen *head-head-tail-tail*-Wechselwirkungsmuster (vgl. Kap. 2.4.1). Die Abwesenheit der  $\beta$ -Kette, die offenbar nötig ist, um diese Paarungen in die cyclische Form des  $\alpha_6$ -Rads zu dirigieren, resultiert in der Aggregation des Proteins. Eine dennoch präsente PPT-Aktivität spricht für eine katalytisch aktive Anordnung der KS-PPT-Kerneinheit, wie oben beschrieben. Entsprechend zeigt die Aufreinigung von  $\alpha$ \_ΔMPT-ACP unter denaturierenden Bedingungen, gefolgt von Rückfaltung durch SEC, neben höheren und unspezifischen oligomeren Zuständen bei geringeren Proteinkonzentrationen

einen Trend zu dimeren Spezies.

Die intrinsisch fehlende strukturelle Information der  $\alpha$ -Kette zur Ausbildung eines  $\alpha_6$ -Rads schließt dieses als eine isolierte Vorstufe im Assemblierungsprozess der ScFAS aus. Vielmehr scheint die  $\beta$ -Kette eine zur  $D_3$ -Symmetrie führende Rolle zu übernehmen.

Die der KS-Domäne anhängliche PPT-Domäne wird durch die KS-KS-Wechselwirkung zu ihrer als Dimer aktiven Stufe geführt, womit  $(\text{KS-PPT})_2$  den für die Phosphopantetheinylierung relevanten strukturellen Kern bildet (Fischer *et al.*, 2016). Für die nicht-ACP-tragenden Konstrukte in diesen Experimenten (siehe Abb. 4.3) bedeutet dies eine intermolekulare Reaktion bzgl. separatem ACP, während dies für die ACP-tragenden Konstrukte nicht geklärt ist, aber nachfolgend betrachtet wird.

#### **4.1.4 Untersuchung der Rolle der ACP-PPT-Interaktion bei der Assemblierung**

Die nötige posttranslationale Phosphopantetheinylierung (Aktivierung) des ACP stellt an den Assemblierungsmechanismus der ffAS die Anforderung eines Zustands, in dem ACP und mindestens dimeres PPT in einer für diese Reaktion geeigneter Weise zusammen finden (vgl. Kap. 2.5). Zur Charakterisierung der ACP-PPT-Wechselwirkung wurden verschiedene ACP- und PPT-Konstrukte durch Größenausschlusschromatographie, *Crosslinking*- und *Pull-down*- Experimente untersucht (Fischer *et al.*, 2016). In keinem Fall waren ACP/PPT-Komplexe feststellbar, weshalb von einer geringen Affinität zwischen ACP und PPT auszugehen ist. Dies ist gegensätzlich zur Interaktion bakterieller ACP/PPT-Paare, für die heteromultimer Komplexe beschrieben sind (Parris *et al.* (2000); Bunkoczi *et al.* (2007)). Dass die Interaktion von ACP und dimerem PPT in einem Vorkomplex, bzw. niederen strukturellen Rahmen vor der finalen  $\alpha_6\beta_6$ -Ausprägung stattfinden muss, ist durch die geschlossene Struktur der ffAS mit räumlicher Trennung von ACP und PPT plausibel (vgl. Kap. 2.3) und experimentell bestätigt (Fichtlscherer *et al.* (2000)). Obschon bereits früher experimentell gezeigt werden konnte, dass der assemblierte ScFAS-Komplex fähig ist, zusätzlich präsenten ACP intermolekular zu aktivieren (Johansson *et al.* (2009)), spricht allein die Masse von 2,6 MDa der ScFAS gegen eine intermolekulare ACP-Aktivierung. Solch einem entsprechend langsamen, diffusiven Prozess (Berg and Hippel (1985)) müsste der Assemblierungsmechanismus zeitlich untergeordnet sein und müsste idealer Weise über einen Kontrollmechanismus verfügen, der die Durchführung der Phosphopantetheinylierung sicherstellt, bevor ACP im Innenraum der „Fass-Struktur“ eingeschlossen wird. Andernfalls würde eine zur unabänderbaren Inaktivität geführte ScFAS einen hohen Ressourcenverlust für den Organismus bedeuten. Durch die deutliche Präsenz assemblierter ScFAS im *Native PAGE-Western Blot* (siehe Anhang B, Abb. B.4 A Spur 2) trotz

Phosphopantetheinylierungs-verhindernder Punktmutation des aktiven Serins im ACP (S180A) ist jedoch die korrekte Assemblierung ohne ACP-Aktivierung belegt und diese Ergebnisse bestätigen frühere vergleichbare Beobachtungen mittels Dichtegradientenzentrifugation (Fichtlscherer *et al.* (2000)). Das Fortlaufen des Assemblierungsmechanismus ohne eine thermodynamisch stabilisierte Stufe, die eine erfolgreiche ACP-Aktivierung abwartet, in Kombination mit den oben beschriebenen Experimenten zur schwachen Wechselwirkung von ACP und PPT *in-vitro* zeichnet ein Bild von sehr transient interagierenden Partnern ACP und PPT. Die räumliche Nähe durch kovalente Fusion beider Domänen auf einer Polypeptidkette kann hierbei wohl die geringe Affinität kompensieren, indem ACP durch einen eingeschränkten Bewegungsfreiraum vor weiteren Assemblierungsschritten auf phosphopantetheinylierendes (KS-PPT)<sub>2</sub> trifft.

## 4.2 Erzeugung eines $\Delta fas1/\Delta fas2$ -*S. cerevisiae*-Stamms

Zum Test artifizierlicher fFAS-Konstrukte *in-vivo* (vgl. Kap. 5.3 und folgende) sowie als Wirt für die präparative Produktion modifizierter ScFAS wurde ein *S. cerevisiae*-Stamm ohne endogene ScFAS-Produktion benötigt.

In Kooperation mit Dr. Peter Kötter vom Institut für Molekulare Biowissenschaften der Goethe-Universität in Frankfurt wurde wesentlich durch seinen Beitrag ein Hefestamm generiert, in dem die beiden ScFAS-codierenden Gene *FAS1* und *FAS2* vollständig deletiert sind (siehe Abb. 4.4). Hierzu wurden die beiden heterodiploiden *FAS1/\Delta fas1*- und *FAS2/\Delta fas2*-Stämme *Y25032* und *Y21061* (siehe Tab. 3.3, Kap. 3) mit dem *FAS1*- und *FAS2*-komplementierenden Plasmid pMF001 transformiert (i), das beide Wildtyp-Gene unter Kontrolle ihrer nativen Promotoren und Terminatoren (Chirala (1992)) trägt. Die Transformanten wurden sporuliert (ii) und resultierende, Geneticin-resistente  $\Delta fas1$ - und  $\Delta fas2$ -Segreganten miteinander gekreuzt (iii). Erneute Sporulation der erhaltenen heterodiploiden Doppelmutante (*FAS1/\Delta fas1*; *FAS2/\Delta fas2*) ergab nach Tetradenanalyse den haploiden, doppelmutierten ( $\Delta fas1$ ;  $\Delta fas2$ ) Stamm *BY.PK1238\_1A* (iv). Die Entfernung des Plasmids pMF001 wurde durch Gegenselektion mit 5-Fluororotsäure (5-FOA) erreicht (v) und der erhaltene Stamm *BY.PK1238\_1A\_KO* konnte gut in Medien mit externer Fettsäuresupplementierung (vgl. Kap. 3.1.11) kultiviert werden. Die Klonierung des Plasmids pMF001 (vgl. Kap.3.2.9) sowie Schritt (v) (vgl. Kap. 3.3.4) sind dabei meine Beiträge, die Schritte (i) - (iv) sind Beiträge durch Dr. Peter Kötter.

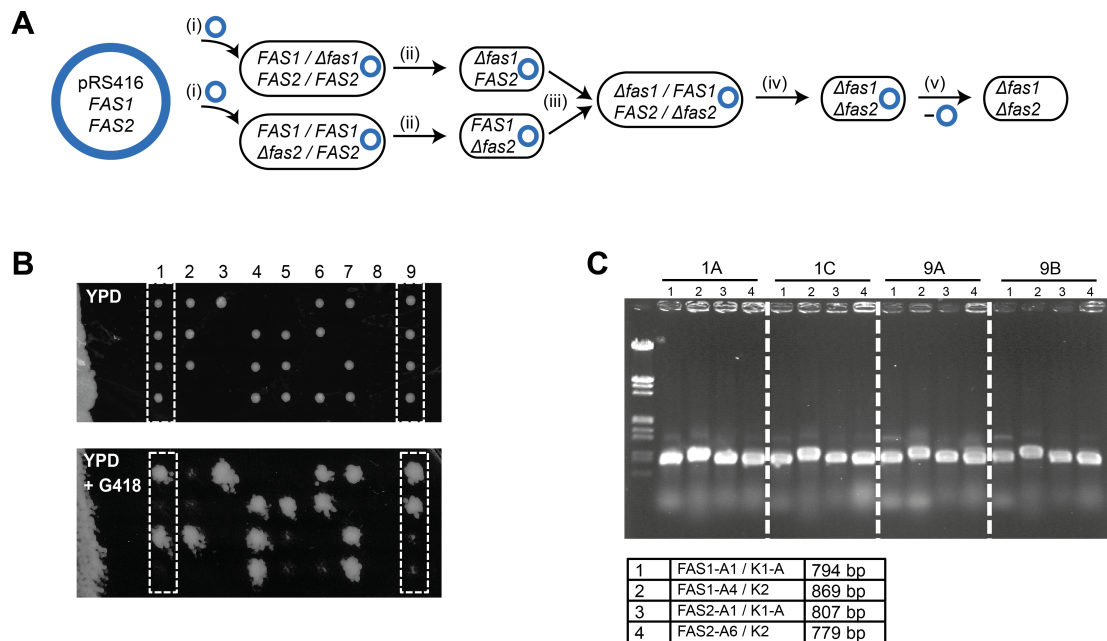


Abb. 4.4: Erzeugung des  $\Delta fas1/\Delta fas2$ -Deletionsstamms *BY.PK1238\_1A\_KO*. **A** Schematischer Arbeitsablauf mit Schritten (i)-(v). Das Plasmid pMF001 ist mit blauem Kreis symbolisiert, Hefezellen durch schwarzes Oval unter Angabe des Genotyps bzgl. *FAS1* und *FAS2*. Beschreibung siehe Text. **B** Tetradenanalyse nach Sporulation der heterodiploiden Doppelmutante (A (iv)). Die Segreganten von neun Tetraden sind horizontal auf YPD-Medium aufgetragen. Zwei vollständige Tetraden sind mit weiß gestricheltem Kasten umrahmt, unvollständige Tetraden durch Überlebensunfähigkeit einzelner Segreganten sind wahrscheinlich das Ergebnis des Verlusts von pMF001. Replikation auf G418-enthaltendem Medium indiziert den nicht-parentalen Dityp (zwei lebensfähige Segreganten) mit ( $\Delta fas1$ ;  $\Delta fas2$ )-Doppelmutation wie in **C** durch diagnostische PCR mit angegebenen *Primer*-Paaren über den Nachweis der *kanMX4*-Kassette bestätigt.



## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 *In-silico*-Analyse zentraler Protein-Protein-Interaktionen in Fettsäuresynthasen des *Ascomycota*-Typs

Fettsäuresynthasen des *Ascomycota*-Typs weisen den Strangbruch in  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette innerhalb der katalytisch relevanten MPT-Domäne auf (vgl. Kap. 2.6), wodurch deren Rekonstitution nicht nur funktionell von essentieller Wichtigkeit ist, sondern zugleich auch die Schnittstelle der beiden komplementären Polypeptidketten gestaltet. Dabei fällt durch einen Strukturvergleich der MPT-Domäne mit der bakteriellen FAS II-Transferase FabD (Verwoert *et al.* (1992)), als katalytische Kerndomäne, auf, dass die MPT gegenüber dieser Minimalstruktur vergrößert ist. Insbesondere an den Termini der Polypeptidketten  $\beta$  und  $\alpha$  offenbaren sich  $\alpha 67$  und  $\alpha 68$  ( $\alpha 67/68$ ) sowie eine Verlängerung von  $\alpha 1$  um 10 Aminosäuren ( $\alpha 1(2-11)$ ) als strukturelle Expansionen (siehe Abb. 5.1), die die Voraussetzung zum Strangbruch in  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette aus einem einzelkettigen Vorfahren (vgl. Kap. 2.2.2) geschaffen haben könnten. Malonyltransferasen bestehen aus einer  $\alpha/\beta$ -Hydrolasekernstruktur (TlanFAS: etwa 370 Aminosäuren) und einer kleineren (TlanFAS: etwa 120 Aminosäuren) Ferredoxin-ähnlichen Unterdomäne (siehe Abb. 5.1 B), die sich in strukturellen Untersuchungen flexibel zueinander zeigen und gemeinsam das aktive Zentrum bilden (Maier *et al.* (2008)). In fFAS des *Ascomycota*-Typs wird die  $\alpha/\beta$ -Hydrolasestruktur aus den beiden auf  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette liegenden Fragmenten rekonstituiert, während die Ferredoxinstruktur komplett auf der  $\beta$ -Kette liegt. Die N-terminale  $\alpha$ -Helix  $\alpha 1$  der  $\alpha$ -Kette wird dabei zwischen den Helices der  $\beta$ -Kette  $\alpha 67/68$  und einem „Spangen-ähnlichen“ Element aus  $\alpha 65$  und eines strukturierten *Loops* C-terminal hierzu eingebettet (siehe Abb. 5.1 B).

Eine Betrachtung der Interaktionsoberfläche der  $\beta$ - $\alpha$ -Schnittstelle und bei Bindung resultierender Energiegewinne liefert quantitative Beiträge zum Interaktionsnetzwerk der fFAS und kann zum Verständnis ihres Assemblierungsablaufs näherungsweise beitragen. Dass sich diejenigen Interaktionen mit großen Oberflächen früh ausbilden, ist für viele andere Proteinkomplexe gezeigt (Marsh *et al.* (2013); Marsh and Teichmann (2014)). Dies gilt selbstverständlich vorausgesetzt der gleichzeitigen und equimolaren Präsenz sämtlicher komplett translaterter Monomere in Lösung und ignoriert dabei Einschränkungen, die sich aus diesem Zustand beeinflussenden zellulären Abläufen ergeben, wie evtl. Co-Translationalität (Duncan and Mata (2011)) oder einer in Kap.

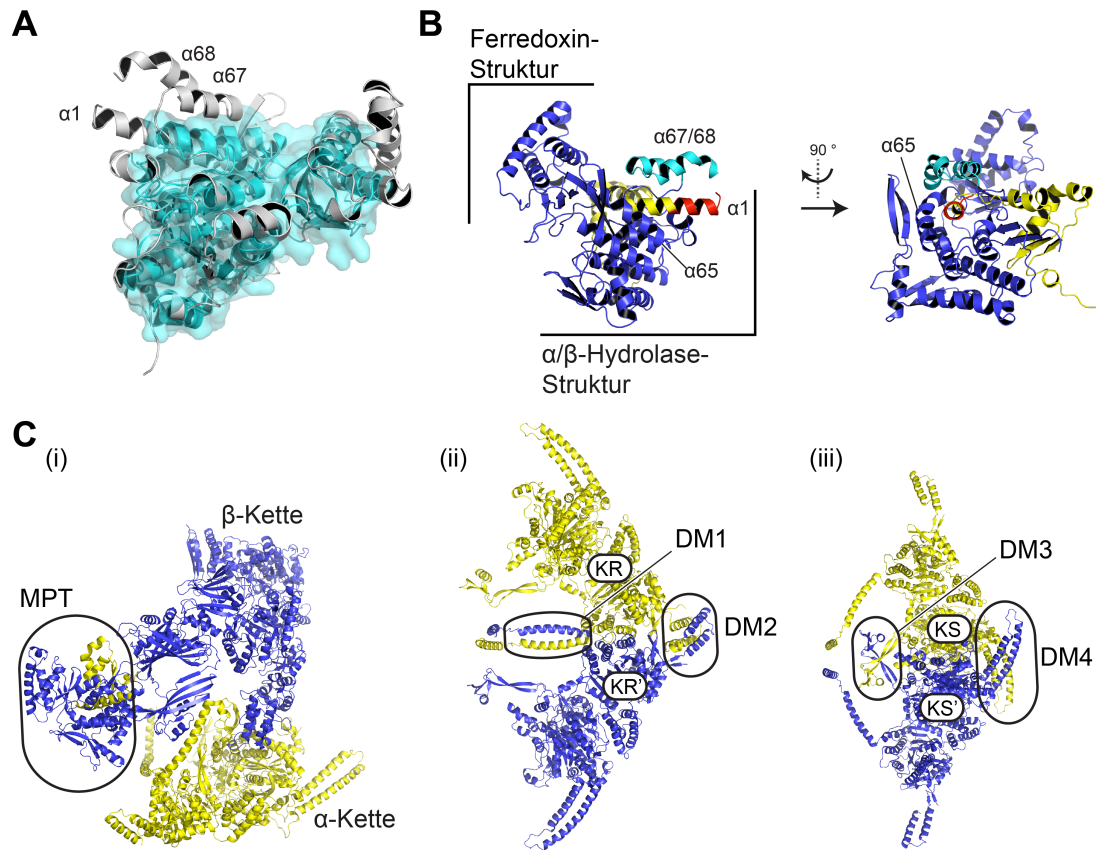


Abb. 5.1: Strukturelle Charakterisierung der MPT-Domäne und Ansichten weiterer Protein-Protein-Kontakte in der TlanFAS. **A** Struktur-Alignment (erzeugt mit PyMOL) der MPT Domäne aus der Kristallstruktur der TlanFAS (PDB-Code:4v58; Fas1p(Q1687-E2078), Fas2p(M1-P94)) in grauer *Cartoon*-Repräsentation mit der Kristallstruktur von FabD (PDB-Code: 2g2z) in *Cartoon*-Repräsentation sowie transparenter Oberfläche in cyan.  $\alpha$ -Helices  $\alpha 1$ ,  $\alpha 67$  und  $\alpha 68$  der TlanFAS sind nach Nomenklatur aus (Jenni *et al.* (2007)) benannt. **B** *Cartoon*-Repräsentation der MPT-Domäne aus der Kristallstruktur der TlanFAS (PDB-Code: 4v58; Fas1p(Q1687-E2078), Fas2p(M1-P94)) mit dem auf der  $\beta$ -Kette liegenden Anteil in blau bzw. cyan (Helices  $\alpha 67$  und  $\alpha 68$ ) und dem auf der  $\alpha$ -Kette liegenden Anteil in gelb bzw. rot (M1-Y11) aus zwei Perspektiven. **C** Aus der Kristallstruktur der TlanFAS (PDB-Code: 4v58) fragmentierte Dimere zur Berechnung der Werte in Tab. 5.1 aus  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette mit Blick entlang DM1 (i), zweier über KR-KR-Kontakt dimerisierter  $\alpha$ -Ketten (ii) und zweier über KS-KS-Kontakt dimerisierter  $\alpha$ -Ketten (iii) (vgl. Kap. 2.4) in *Cartoon*-Repräsentation. Die separaten Peptidketten sind jeweils in blau und gelb unterschieden und Dimerisierungsmodule sind eingezeichnet.

2.7 begründeten stöchiometrischen Kontrolle der Protomere.

Sämtliche Berechnungen in diesem Kapitel basieren auf der Kristallstruktur der TlanFAS (PDB-Code: 4v58, Jenni *et al.* (2007)), um das hierin gut strukturierte und für die KR-KR-Interaktion wichtige Dimerisierungsmodul DM2 mit zu berücksichtigen (vgl. Kap. 2.4). Die Berechnungen wurden mit der *Online-Software* PISA (*Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies*) (Krissinel and Henrick (2007)) durch-



Tab. 5.1: Interaktionsflächen und Energiegewinne in der TlanFAS. Unterschiedliche, aus der Kristallstruktur der TlanFAS (PDB-Code: 4v58) abgeleitete Dimere von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, MPT-Schnittstellenfragmenten und Dimerisierungsmodulen (DM1-4) (siehe Abb. 5.1) sind nach aufsteigendem  $\Delta^iG$  (Krissinel (2010)) gelistet. Die jeweils durch Bindung abgeschirmten Proteinoberflächen und die resultierenden Bindungseffizienzen (Kastritis and Bonvin (2013)) sind angegeben. Die zur Berechnung beteiligten Peptidketten, wie in der PDB-Datei festgelegt, sind benannt.

Dimer	$\Delta^iG$ [kcal/mol]	Abgeschirmte Oberfläche [Å <sup>2</sup> ]	Beteiligte Ketten	Schnittstellen- oberfläche [Å <sup>2</sup> ]	Bindungs- effizienz [cal/molÅ <sup>2</sup> ]
$\alpha\beta$	-71	11,286	EK	5643	-6
$\alpha\beta_{\Delta\alpha1(1-11)}$	-64	10,196	EK	5098	-6
$\alpha\beta_{\Delta\alpha67/68}$	-64	10,448	EK	5224	-6
MPT-Domäne ( $\alpha/\beta$ )	-60	7,102	EK	3551	-8
$\alpha_2$ (KR-dimerisiert)	-55	10,014	BE	5007	-5
$\alpha_2$ (KS-dimerisiert)	-53	15,434	AE	7717	-3
$\alpha65-68/\alpha1$	-28	3,014	EK	1507	-9
DM1	-26	2,464	BE	1232	-11
DM2	-17	1,834	BE	917	-9
DM3	-15	2,518	AE	1259	-6
DM4	0	2,518	AE	1259	0

geführt. Betrachtet wurden dabei die durch Interaktion zweier Monomere geschaffene Schnittstellenoberfläche und der daraus resultierende Energiegewinn  $\Delta^iG$  gegenüber den freien Strukturen in Lösung (Krissinel (2010)). Der Fokus lag dabei auf den dimeren Strukturen, um frühe Interaktionen der Monomere abzuschätzen. Diese strukturbasierte Vorhersage identifiziert das  $\beta\alpha$ -Heterodimer, wie es in der fertigen Kristallstruktur vorliegt, mit  $\Delta^iG = -71$  kcal/mol als energetisch gewinnbringendstes Dimer vor den KR- bzw. KS-dimerisierten  $\alpha_2$ -Homodimeren (siehe Abb. 5.1 C) mit  $-55$  kcal/mol bzw.  $-53$  kcal/mol. Den größten Beitrag in der  $\beta\alpha$ -Interaktion liefert dabei die Rekonstitution der MPT-Domäne mit  $\Delta^iG = -60$  kcal/mol, deren Ausbildung damit alleine schon einen größeren Energiegewinn liefert als eine der beiden denkbaren  $\alpha$ - $\alpha$ -Dimerisierungen. Hiervon wiederum macht das durch die Termini beider komplementärer Peptidketten geschaffene helikale Arrangement  $\alpha65-68/\alpha1$  bereits knapp 50% aus ( $\Delta^iG = -28$  kcal/mol) (siehe Tab. 5.1). Das Fehlen einer stringenten Korrelation dieser Energiewerte mit den Schnittstellenoberflächen resultiert aus gegenseitiger elektrostatischer Beeinflussung der Bindungspartner und ist ein von den Entwicklern der *Software* beschriebenes Phänomen (Krissinel and Henrick (2007)). Es werden hierdurch variierende Bindungseffizienzen deutlich (Kastritis and Bonvin (2013)), die eine übliche Beobachtung bei Protein-Protein-Wechselwirkungen in Proteinkomplexen sind. Eine Bewertung der Bindungsaffinitäten durch exklusive Oberflächenbetrachtung wäre demnach naiv (Day *et al.* (2012)). Nicht zu vernachlässi-

gen ist hierbei der Effekt einer konformationellen Änderung der Schnittstellenmotive, die direkt durch die Bindungspartner selbst induziert wird, oder durch allosterischen Einfluss (Kastritis and Bonvin (2013)). Zudem ist eine aus der fertig assemblierten fFAS entnommene dimere Anordnung zweier Untereinheiten zwar sicher im fertigen Komplex die thermodynamisch stabilste, aber nicht zwangsläufig ein physiologisch durchlaufener Zustand in Isolation zweier Monomere. Dies schränkt Zahlenwerte aus Rechnungen anhand der statischen Kristallstruktur ein. Deren Interpretation für einen Assemblierungsablauf ist zudem nur in einem idealisierten System bei gleichzeitigem Vorliegen sämtlicher Monomere in gleicher Menge und Zugänglichkeit zulässig. Unter Vorbehalt dieser Einschränkungen ist die durch Rekonstitution der MPT-Domäne getriebene Bildung einer Pseudoeinzelkette aus den beiden Polypeptidketten  $\beta$  und  $\alpha$  als früher Schritt im Assemblierungsablauf von Fettsäuresynthasen des *Ascomycota*-Typs thermodynamisch wahrscheinlich. Die vergleichsweise hohe Bindungseffizienz des gegenüber der enzymatischen Kernstruktur vergrößerten Schnittstellenmotivs ( $\alpha65-68/\alpha1$ ) innerhalb der MPT-Domäne (Tab. 5.1) trägt dazu massiv bei und stellt dadurch einen möglichen Angriffspunkt zur Assemblierungsinhibierung dar.

## 5.2 *In-vitro*-Disassemblierung der Fettsäuresynthase aus *S. cerevisiae*

In vielen Studien wird die Dissoziation von Proteinkomplexen unter vergleichbaren physiologischen Bedingungen als linear reversibler Prozess ihrer Assemblierung betrachtet und die Gültigkeit hierfür an verschiedenen Beispielen überprüft (Levy *et al.* (2008); Quintyn *et al.* (2015)). Während bei den dort getesteten Komplexen die Dissoziation über die Variation der Ionenstärke in Lösung steuerbar ist, sind vergleichbar einfache und milde Methoden auf die ScFAS nicht anwendbar (Sumper *et al.* (1969); Wieland *et al.* (1979)). Dimethylmaleinsäureanhydrid (DMMA) kann pH-abhängig Proteinkomplexe reversibel dissoziieren (Mehrishi (1972); Pintor-Toro *et al.* (1981)). In Anwendung dieser Methode auf die ScFAS wurde dabei eine Reaktivierungsrate von bis zu 50% der FAS-Aktivität beschrieben (Fichtlscherer *et al.* (2000)). Separate Arbeiten lassen bei der DMMA-induzierten Dissoziation der ScFAS mehrere Rückschlüsse ziehen, die in ihrer Gesamtheit jedoch ein Bild unspezifischer Dissoziation zeichnen:

1. Eine Auflösung der KR-KR-Dimerisierung als Konsequenz des Verlusts der Dimer-benötigenden KR-Aktivität (Werkmeister *et al.* (1981)).
2. Eine Auflösung der KS-KS-Dimerisierung durch Wiederherstellung der PPT-Aktivität nach hybrider Reassoziaton zweier ScFAS mit zwei unterschiedlichen PPT-Defekten durch Punktmutationen (Fichtlscherer *et al.* (2000)). Dies folgt

vorausgesetzt der Annahme, dass die Dimer-erfordernde PPT-Aktivität (Johansson *et al.* (2009)) durch den dimeren Charakter der angrenzenden KS-Domäne gewährleistet wird (vgl. Kap. 4.1.3). In hybriden PPT-Dimeren werden beide unterschiedlichen Punktmutationen offensichtlich gegenseitig kompensiert.

3. Eine Auflösung der  $\beta$ - $\alpha$ -Verbindung durch Identifizierung zweier Fraktionen nach Zentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten, wovon ausschließlich eine die Präsenz der AT-Domäne ( $\beta$ -Kette) und ausschließlich die andere die Präsenz der KS-Domäne ( $\alpha$ -Kette) zeigt. Bei der im Gradienten langsamer migrierenden Fraktion handelt es sich dabei um die  $\alpha$ -Ketten-Fraktion (Lynen *et al.* (1980)).
4. Die Reassoziierung der ScFAS *in-vitro* durchläuft eine phosphopantetheinlylierungsfähige Stufe (Fichtlscherer *et al.* (2000))

Eigene Experimente zur DMMA-induzierten Disassemblierung der ScFAS zeigen nach *Native* PAGE und Größenausschlusschromatographie Mindermengen an Protein mit einem niederen Multimerisierungsstatus (siehe Abb. 5.2).

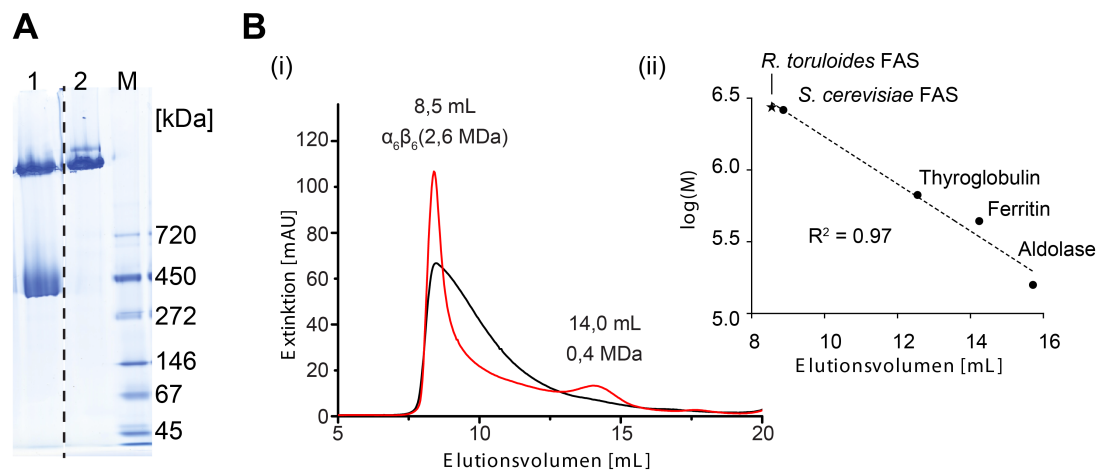


Abb. 5.2: Disassemblierung der ScFAS mit Dimethylmaleinsäureanhydrid. **A** Coomassiegefärbtes *Blue Native* PAGE -Gel mit einer DMMA-behandelten (1) neben einer unbehandelten ScFAS-Probe (2). M = Proteinmarker. Der gezeigte Ausschnitt ist aus Bereichen des selben Gels horizontal zusammengesoben, wie durch die gestrichelte Linie angezeigt. Das volle Gel ist in Anhang B, Abb. B.1 gezeigt. **B** Größenausschlusschromatographie von Proben analog A. (i) Absorptionsprofile bei 280 nm von un behandelter (schwarze Linie) und DMMA-behandelter ScFAS (rote Linie) in gleichem Puffer (FAS-SEC-Puffer). Neben dem intensiven Signal der assemblierten ScFAS mit bekannter Masse von 2,6 MDa ist die Masse der bei 14,0 mL eluierenden Spezies anhand einer Größenkalibration des chromatographischen Systems (ii) auf 0,4 MDa geschätzt.

Über Größenermittlung entsprechend des Proteinmarkers im *Native* PAGE und der Kalibration der Größenausschlusschromatographie kann es sich dabei um nicht näher charakterisierte Dimere handeln ( $\alpha_2$ : 414 kDa;  $\beta_2$ : 458 kDa;  $\alpha\beta$ : 436 kDa), wobei

$\beta_2$ -Dimere aufgrund der symmetrischen, homotrimeren Kontakte im  $\beta_3$ -Dom und insgesamt schwachen Wechselwirkungen (vgl. Kap. 2.4.2) unwahrscheinlich sind. Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse (3), sowie (1) und (2) aus der Literatur bleiben  $\alpha_2$  und  $\alpha\beta$  denkbar.

Obschon nach DMMA-Behandlung die Assemblierung der ScFAS *in-vitro* eingeschränkt funktional (50% Aktivitätsverlust) inklusive Phosphopantetheinylierung nachgestellt werden kann (Fichtlscherer *et al.* (2000)), konnten in keiner der obigen Arbeiten konkrete Assemblierungsvorstufen oder Dissoziationsprodukte charakterisiert werden. Eigene Versuche hierzu lieferten nur Mindermengen disassemblierten Proteins. Zudem bleibt die Frage nach Gültigkeit und Einschränkungen der Annahme eines reversibel anwendbaren Pfads für Assemblierung und Dissoziation der ScFAS. Denn im Gegensatz zu den simplen binären Interaktionen der in der Literatur betrachteten Modellproteine ist sie nicht nur strukturell durch massive Verwindungen der Peptidketten ineinander (vgl. Kap. 2.4) wesentlich komplexer aufgebaut, sondern kann ihr Assemblierungsmechanismus darüber hinaus *in-vivo* durch die strenge Kontrolle ihrer Monomer-Synthese (vgl. Kap. 2.7) beeinflusst sein.

Demnach ständen die Protomere gerade nicht, wie oben vorausgesetzt, in gleicher Menge räumlich und zeitlich zur Verfügung. Stattdessen dominiert die  $\beta$ -Kette die Produktion der  $\alpha$ -Kette und ist durch eine relativ geringere Proteolyse im Verhältnis zur  $\alpha$ -Kette überrepräsentiert. Eine reversible Betrachtung ist durch den Verlust dieser Kausalitäten in Dissoziationsexperimenten nicht anwendbar. Aus diesen Gründen wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf Erkenntnisse aus *in-vivo*-Experimenten mit rational entworfenen ScFAS-Mutanten gezielt.

### **5.3 *In-vivo*-Evaluierung der Bedeutung von Schnittstellenmotiven der Fettsäuresynthase aus *S. cerevisiae***

In Kap. 5.1 wird die durch die beiden Termini der komplementären Polypeptidketten  $\beta$  und  $\alpha$  gebildete Schnittstelle  $\alpha_{65-68}/\alpha_1$  als wichtiges Interaktionsmotiv vorgeschlagen, das in einem frühen Schritt der ScFAS-Assemblierung zur Bildung einer Pseudoeinzelkette aus  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette führen könnte. Eine Störung dieser Schnittstelle sollte einen unterbindenden Einfluss auf die Assemblierung nehmen, wenn sie als frühe Interaktion eine wichtige Rolle spielt und als ein Schlüsselschritt den weiteren Assemblierungsverlauf bedingt.

Zur Überprüfung, ob die Vergrößerung der Interaktionsfläche dieser Schnittstelle innerhalb der MPT-Domäne gegenüber der enzymatisch relevanten Kernstruktur einer Transferase (vgl. Kap. 5.1) eine Notwendigkeit für die Assemblierung ist, wurde die  $\beta$ -Kette der ScFAS um die Helices  $\alpha_{67}$  und  $\alpha_{68}$  C-terminal verkürzt ( $\Delta\alpha_{67/68}$ ) und die  $\alpha$ -Kette N-terminal auf der  $\alpha_1$ -Helix um die Aminosäuren K2-H11 ( $\Delta\alpha_1(2-11)$ ). Die

mutierten Gene *fas1\** und *fas2\** standen stets unter Kontrolle der jeweiligen, nativen *FAS1*-/ *FAS2*-Promotoren und -Terminatoren aus *S. cerevisiae* (Chirala (1992)). Als Vektorsystem wurden pRS-Vektoren (Sikorski and Hieter (1989)) mit orthogonalen Auxotrophiemarkern gewählt, die durch eine *CEN/ ARS*-Replikationsstelle eine geringe Kopienzahl und gemeinsam mit dem Promotor/Terminator-System basale Expressionslevel gewährleisten, wie für den Vergleich mit dem Wildtyp-Fall nötig. Jeweils in Kombination mit ihrer komplementären Wildtyp- $\alpha$ - bzw. Wildtyp- $\beta$ -Kette wurden beide Mutanten im ScFAS-deletierten *S. cerevisiae*-Stamm *BY.PK1238\_1A\_KO* (siehe Tab. 5.2) durch Wachstum der entsprechenden Transformanten in Abhängigkeit externe Fettsäuresupplementierung bewertet. Dazu wurden diese in einer siebenstufigen Konzentrationsreihe bzgl. einer 1:1:1-Mischung an Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure für 24 h kultiviert und ihr Wachstum über die optische Dichte bei 600 nm (OD(600)) ausgelesen (siehe Abb. 5.3 A). Der maximale Fettsäurebedarf von *BY.PK1238\_1A\_KO* für optimales Wachstum innerhalb dieses Zeitraums ohne *de-novo*-FS-Synthese wurde zuvor auf 50 mg/L jeder der drei FS ermittelt (siehe Anhang B, Abb. B.2). Ergänzend hierzu wurden die selben Transformanten in einem sogenannten *Spotting*-Test (vgl. Kap. 3.3.6) als etablierte Methode zur Bewertung von Zellwachstum bei *S. cerevisiae* (Kötter *et al.* (2009)) in seriellen Verdünnungen einer Vorkultur auf Medium ohne Fettsäuresupplementierung analysiert (siehe Abb. 5.3 B).

Tab. 5.2: Übersicht der *S. cerevisiae*-Stämme zur Evaluierung der Schnittstellenmotive in der ScFAS.

Stamm	fFAS-Typ	Genotyp (siehe Anhang A; Tab.A.4)	Modifikation
Sc_KO	—	$\Delta fas1/\Delta fas2$	Volle Deletion
Sc_WT	<i>S. cerevisiae</i>	<i>FAS1/FAS2</i>	Keine
Sc_K2S	<i>S. cerevisiae</i>	<i>FAS1/fas2_K2S</i>	Punktmutation
Sc_E8R	<i>S. cerevisiae</i>	<i>FAS1/fas2_E8R</i>	Punktmutation
Sc_K2S/E8R	<i>S. cerevisiae</i>	<i>FAS1/fas2_K2S/E8R</i>	Punktmutation
Sc_ $\Delta\alpha1(2-11)$	<i>S. cerevisiae</i>	<i>FAS1/fas2_<math>\Delta\alpha1(2-11)</math></i>	Deletion
Sc_ $\Delta\alpha67/68$	<i>S. cerevisiae</i>	<i>fas1_<math>\Delta\alpha67/68</math>/FAS2</i>	Deletion

Da aufgrund der Modifikationen innerhalb der MPT-Domäne in den hier getesteten ScFAS-Mutanten nicht festgestellt werden kann, ob der Ausfall der *de-novo*-FS-Synthese tatsächlich Resultat einer Assemblierungsunfähigkeit ist, oder sich stattdessen aus einer allosterisch invasiven Störung dieser katalytischen Domäne trotz peripherer Lage der Eingriffe zum aktiven Zentrum (Verwoert *et al.* (1992)) ergibt, wurde zur direkten Visualisierung assemblierter FAS, und damit komplementär zur rein funktionellen Betrachtung in den Wachstumsexperimenten, eine Methode zur *Western Blot*-Analytik nach nativer Gelelektrophorese (*Native PAGE*) mit Immunodetektion durch ScFAS-Antikörper (Egner *et al.* (1993)) entwickelt (vgl. Kap.

3.4.5). Kulturen der Transformanten wie zuvor wurden dazu enzymatisch lysiert und das Zelllysate appliziert (siehe Abb. 5.3 C). Durch den Vergleich mit präparativ aufgereinigter ScFAS und Zelllysate einer Wildtyp-Referenz (*Sc\_WT*) sowie des untransformierten Stamms *BY.PK1238\_1A\_KO* kann die An- oder Abwesenheit von assemblierter FAS im *Western Blot* eindeutig festgestellt werden.

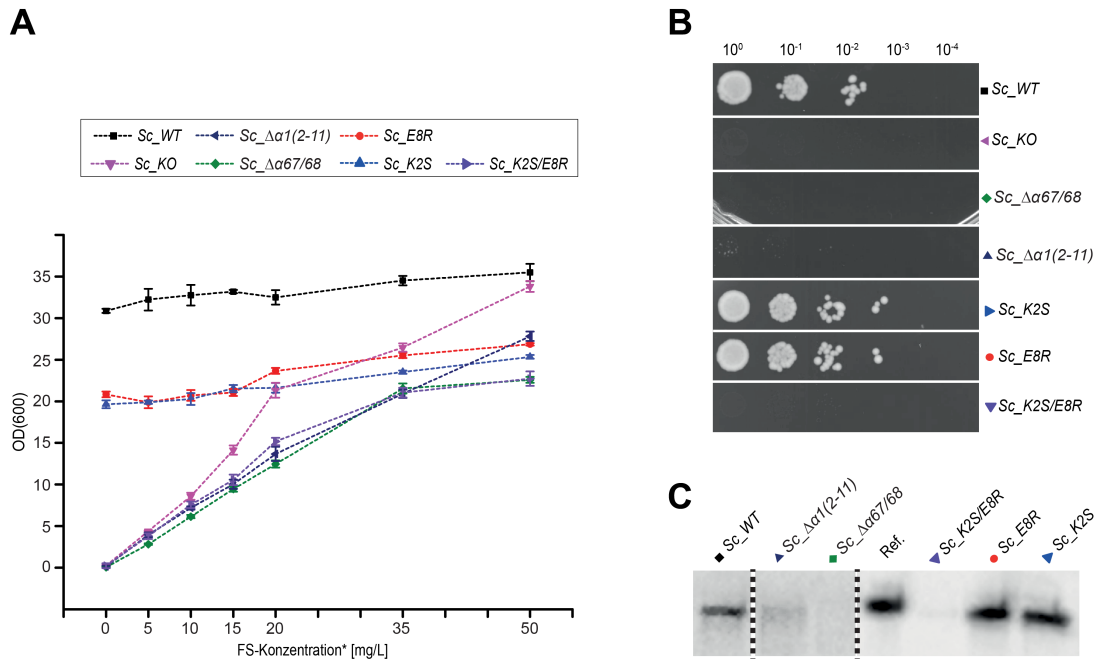


Abb. 5.3: *In-vivo*-Evaluierung des  $\beta$ - $\alpha$ -Schnittstellenmotivs in der ScFAS. **A** FAS-Komplementationstest von *S. cerevisiae*-Stämmen mit unterschiedlichen Punktmutationen oder kompletten Deletionen im MPT-rekonstituierenden Schnittstellenbereich wie angegeben. Die angegebenen FS-Konzentrationen beziehen sich auf jede der drei FS (\*). Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen  $\pm 3\sigma$  der Standardabweichung aus 5 technischen Replikationen der OD(600)-Messung. Die gestrichelten Linien dienen nur zur Orientierung im Trend einzelner Stämme und stellen keinen durch Messwerte begründeten Kurvenverlauf dar. Das insgesamt höhere Niveau im Wachstum von *Sc\_WT* sowie von *Sc\_KO* bei hohen FS-Konzentrationen ist das Resultat abweichender Anfangsbedingungen gegenüber den anderen Stämmen durch Kultivierung der Vorkultur in YPD- statt SD-Medium. Biologische Replikationen sind in Anhang B, Abb. B.3 gezeigt. **B** Spotting-Test der Stämme aus A. Die gezeigten Ausschnitte stammen teilweise von unterschiedlichen Kulturplatten bei gleichem Medium und Bedingungen. **C** Native PAGE-Western Blot-Analyse von assemblierter fFAS in Zelllysaten der Stämme aus A. Die Abbildung zeigt lediglich einen die ScFAS-Bande umfassenden Ausschnitt und ist, wie durch gestrichelte Linien angegeben, aus Aufnahmen separater Western Blots unter Orientierung an einer jeweils präsenten Bande aufgereinigter ScFAS (Ref.) zusammengesetzt. Die kompletten Western Blots sind in Anhang B, Abb. B.4 gezeigt.

Bei *SC\_WT* als Wildtyp-Referenz handelt es sich zur optimalen Vergleichbarkeit ebenso um Transformanten von *BY.PK1238\_1A\_KO*, jedoch mit den Wildtyp-Genen *FAS1* und *FAS2* auf pRS-Plasmiden. Dem gegenüber steht der massive Wachstumseinbruch des untransformierten Stamms (*Sc\_KO*) bei Reduktion der FS-Zugabe (siehe Abb. 5.3 A).

Sowohl die  $\Delta\alpha67/68$ - als auch die  $\Delta\alpha1(2-11)$ -Mutation verursachen eine Überlebensunfähigkeit der Hefetransformanten ohne externe FS-Supplementierung (siehe Abb. 5.3 A, B). Die *Native PAGE-Western Blot* Analytik (siehe Abb. 5.3 C) bestätigt durch Abwesenheit von Banden auf Höhe der ScFAS, dass diese Wirkung tatsächlich aus einem Ausfall der Assemblierung resultiert und nicht aus einem katalytischen Defekt der MPT-Domäne.

Auch auf anderen Migrationsweiten sind im *Western Blot* keine Banden detektierbar, die Hinweise auf Assemblierungsvorstufen geben könnten, doch ist in Einzelfällen eine erhöhte Inhomogenität feststellbar (siehe Anhang B, Abb. B.4). Beides lässt sich durch die strikte Proteolyse unassemblierter  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten (vgl. Kap. 2.7.2) erklären. Ausgeschlossen werden kann ein Eingriff in die *FAS2*-Transkription im Fall der  $\Delta\alpha1(2-11)$ -Mutation, da der *FAS2*-Leserahmen zwar über ein regulatorisches Element auf den ersten 66 Nukleotiden verfügt (vgl. Kap. 2.7.1), dieses aber repressiv wirkt und dessen Verlust experimentell bestätigt zu einer konstanten Transkription führt (Wenz *et al.* (2001)).

Zur weiterführenden Feststellung der molekularen Schlüsselwechselwirkungen in der  $\beta$ - $\alpha$ -Schnittstelle der ScFAS wurden Punktmutationen auf der  $\alpha1$ -Helix der  $\alpha$ -Kette eingeführt. Ihre rationale Auswahl basiert auf einem Sequenz-*Alignment* eines  $\alpha1$ -Helix-umfassenden Bereichs von FAS-Sequenzen des *Ascomycota*-Typs mit Sequenzen anderer fFAS-Typen, die im Gegensatz über eine ungeteilte MPT-Domäne verfügen. Eine Notwendigkeit der starken Konservierung von K/R2, E6 und E8 im *Ascomycota*-Typ bei gleichzeitig chemisch gegensätzlichen Aminosäuren an diesen Positionen in den Sequenzen der anderen FAS-Typen mit teilweise gegensätzlichen Ladungen unter physiologischen Bedingungen wurde experimentell evaluiert. Neben den Einzelmutationen der ScFAS- $\alpha$ -Kette K2S, E6V, E8R und H11A, in denen jeweils gegen Aminosäuren aus der *U. maydis*-Sequenz mutiert wurde, wurden diese Punktmutationen paarweise kombiniert. Während sämtliche Einzelmutationen keinen Effekt auf die Assemblierung zeigen, weist lediglich die Kombination K2S/E8R einen kompletten Assemblierungsdefekt auf (siehe Abb. 5.3, weitere Mutationen in Anhang B, Abb. B.3). Dass diese zwei *Hotspot*-Aminosäuren tatsächlich Schlüsselinteraktionen zur Zusammenführung von  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette der ScFAS bilden, ist zudem später durch die uneingeschränkte Funktionalität bei analoger K2S/E8R-Mutation im FAS-Nachbau des MPT-fusionierten *Tremellomyces*-Typs gezeigt (siehe Abb. 5.6 A, Stamm *Sc\_Tre\_E8R*).

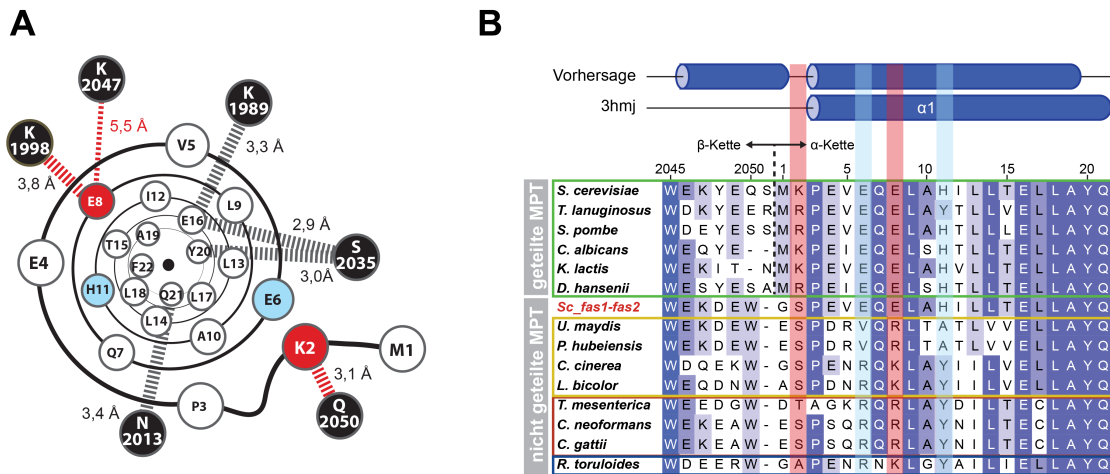


Abb. 5.4: Primärstrukturanalyse der  $\alpha 1$ -Helix in der ScFAS. **A** Artifizielle Repräsentation von  $\alpha 1$  von oben aus N-terminaler Richtung. Aminosäurepositionen der  $\alpha$ -Kette sind durch weiße, rote oder blaue Kreise dargestellt. Schwarze Kreise zeigen an die Kristallstruktur (PDB-Code: 3hmj) angelehnte Positionierungen von denjenigen Aminosäuren der  $\beta$ -Kette, die bis zu einer Obergrenze von 4,0 Å mit Seitenketten der  $\alpha$ -Kette sowie K2 polar wechselwirken (rot bzw. schwarz gestrichelte Balken). Eine Ausnahme hierunter bildet E8-K2047 mit größerer Distanz. Die für die Assemblierung der ScFAS wichtigen Aminosäuren K2 und E8 sind in rot hervorgehoben, die gegenüber Mutation toleranten Aminosäurepositionen von E6 und H11 in blau. **B** Multiples Sequenz-Alignment von Proteinsequenzen von fFAS verschiedener Pilze. Der gezeigte Ausschnitt umfasst einen C-terminalen Abschnitt der ScFAS- $\beta$ -Kette, wie angegeben, und den  $\alpha 1$ -abdeckenden Bereich der  $\alpha$ -Kette. Er basiert auf einem Alignment der Vollständigensequenzen (Verbindung von Fas1p und Fas2p falls nötig) mittels *Clustal Omega* (siehe Anhang A, Tab. A.8). Farblich eingerahmt sind die unterschiedlichen fFAS-Typen: grün, *Ascomycota*-Typ; gelb, *Agaricomycetes*- und *Ustilaginomycetes*-Typ; rot, *Tremellomycetes*-Typ; blau, *Pucciniomycotina*-Typ. Mit rotem Namen ist zudem die in dieser Arbeit stets verwendete Fusion von  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette der ScFAS angegeben (vgl. Kap. 5.4). Zylinder über den Sequenzen repräsentieren die Sekundärstruktur für die ScFAS nach Vorhersage durch *PSIPRED* (siehe Anhang A, Tab. A.8) und tatsächlicher Erscheinung in der Kristallstruktur (PDB-Code: 3hmj). In rot und blau sind die Aminosäuren aus A hervorgehoben, die in fFAS des *Ascomycota*-Typs stark konserviert sind, sich aber gegenüber anderer Typen unterscheiden.

Bei Betrachtung der polaren Wechselwirkungen der  $\alpha 1$ -Helix in der Kristallstruktur der ScFAS (PDB-Code: 3hmj) fällt auf, dass gerade K2 und E8 Bindungen zu Aminosäuren der  $\beta$ -Kette auszubilden vermögen (siehe Abb. 5.4). K2, N-terminal vor Prolin positioniert, ist nicht Teil von  $\alpha 1$ , weshalb hier nicht von einer klassischen Interaktion eines Helixbündels ausgegangen werden kann. Die mögliche Salzbrücke E8-K1998 wurde zudem experimentell als unwichtig befunden, indem eine Kombination der K2S-mutierten ScFAS- $\alpha$ -Kette mit der K1998A-mutierten ScFAS- $\beta$ -Kette als angenommen komplementärer Wechselwirkungsbruch einer K2S/E8R-Mutation der ScFAS- $\alpha$ -Kette keine Beeinträchtigung der Assemblierung zeigt (siehe Anhang B,



Abb. B.6). Denkbar bleibt eine wichtige Rolle eines mit 5,5 Å weiter entfernten Lysins an Position 2047 der  $\beta$ -Kette. Abseits von bindungsvermittelnden Energiebeiträgen durch Salzbrücken können K2 und E8 auch essentiell in der molekularen Erkennung der Bindungspartner und Vermittlung einer korrekten Wechselwirkungsgeometrie sein (Kastritis and Bonvin (2013)).

Die Sensibilität der ScFAS-Assemblierung gegenüber einer minimalsten Modifikation an 2 aus 1887 Aminosäurepositionen spricht für eine wichtige  $\beta$ - $\alpha$ -Kupplung über die Schnittstelle  $\alpha$ 65-68/ $\alpha$ 1 als Initialschritt im Assemblierungsablauf. Eine kovalente Fusion der geteilten MPT-Domäne, wie im folgenden Kapitel beschrieben (vgl. Kap. 5.4, Stamm *Sc\_Tre\_E8R*), dient trotz Beibehalt des K2S/E8R-Musters diesen andernfalls disruptiven Punktmutationen entgegenend als Korrektiv für die Assemblierung. Die Fusion schreibt die Verbindung innerhalb der MPT-Domäne bereits auf Gen-Ebene fest und macht dadurch eine posttranslationale Verknüpfung überflüssig.

## 5.4 *In-vivo*-Komplementation der FS-Synthese durch artifizielle Nachbauten anderer fFAS-Typen in *S. cerevisiae*

Die evolutionäre Analyse der fFAS (vgl. Kap. 2.2.2) zeigt das Auftreten einer „Fass-Struktur“ bereits früh auf der Stufe der einzelncodierten bFAS. Ab der Stufe der fFAS haben sich zudem kaum mehr strukturelle Veränderungen zwischen derer unterschiedlichen Typen ereignet (Fischer *et al.* (2015)). Vergleichsweise spät tritt das Ereignis der Aufteilung in zwei separat codierte Polypeptidketten ein. Diese Separation kann unter der Annahme eines konservierten Assemblierungsmechanismus (Marsh *et al.* (2013)) der fFAS – in Konsequenz zur starken Sequenz- und Strukturkonservierung – also nur dann stattfinden, wenn sie von diesem Assemblierungsmechanismus toleriert wird.

Die Verknüpfung des Evolutionsverlaufs von Proteinkomplexen mit deren Assemblierungspfad zeigt an vielen Beispielen Korrelation, indem Gen- bzw. Proteinfusionsergebnisse frühe Schritte auf Assemblierungspfaden verwandter, aber unfusionierter Homologe repräsentieren (Levy *et al.* (2008); Marsh and Teichmann (2015)). Ein Fusionsereignis konserviert dabei einen Assemblierungsschritt unter gleichzeitiger Verminderung der Notwendigkeit aufwendiger Schnittstellen durch die kovalente Verbindung (Marsh *et al.* (2013)). Im Umkehrschluss bedeutet dies für die fFAS, dass ein Kettenbruch in zwei separate Polypeptidketten  $\alpha$  und  $\beta$  deren Rekonstitution zu einem  $\alpha\beta$ -Dimer als Schritt während der Assemblierung notwendig macht. Eine solche Dimerisierung zu einer Pseudoeinzelkette als frühes Ereignis in der Assemblierung ist folglich sehr wahrscheinlich, da somit sämtliche fFAS-Typen, ob einzelncodiert oder geteilt, entsprechend früh in einen universell gültigen Assemblierungsmechanismus laufen. Zudem würde so der fundamentale Unterschied im Hinblick auf die Phosphopantetheinylierung des ACP beim *Tremellomyces*-Typ, bei dem im Gegensatz zu allen anderen Typen ACP und PPT auf getrennten Ketten liegen, durch vorhergehende Bildung einer Pseudoeinzelkette nicht notwendigerweise einen alternativen Mechanismus der Phosphopantetheinylierung bedeuten.

Zur Überprüfung der Gültigkeit dieser Annahme wurde die Toleranz der ScFAS in ihrem nativen Wirt, *S. cerevisiae*, gegenüber (1) der Fusion von  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette zu einer Einzelkette, die konzeptionell dem *Agaricomycetes*-Typ entspricht, und (2) gegenüber der Einführung von Kettenbrüchen entsprechend des *Pucciniomycotina*- sowie *Tremellomyces*-Typs getestet (siehe Abb. 5.5, Tabelle 5.3). Der Peptidlinker für die Fusion der ScFAS- $\beta$ - und - $\alpha$ -Kette wurde basierend auf einem Sequenz-*Alignment* analog zu einzelncodierten Sequenzen gestaltet (siehe Abb. 5.4) und für alle weiteren Konstrukte in dieser Arbeit mit MPT-Fusion beibehalten. Die artifiziellen Gene *fas1\** und *fas2\** standen stets unter Kontrolle der jeweiligen, nativen *FAS1*-/*FAS2*-Promotoren und -Terminatoren aus *S. cerevisiae* (Chirala (1992)).

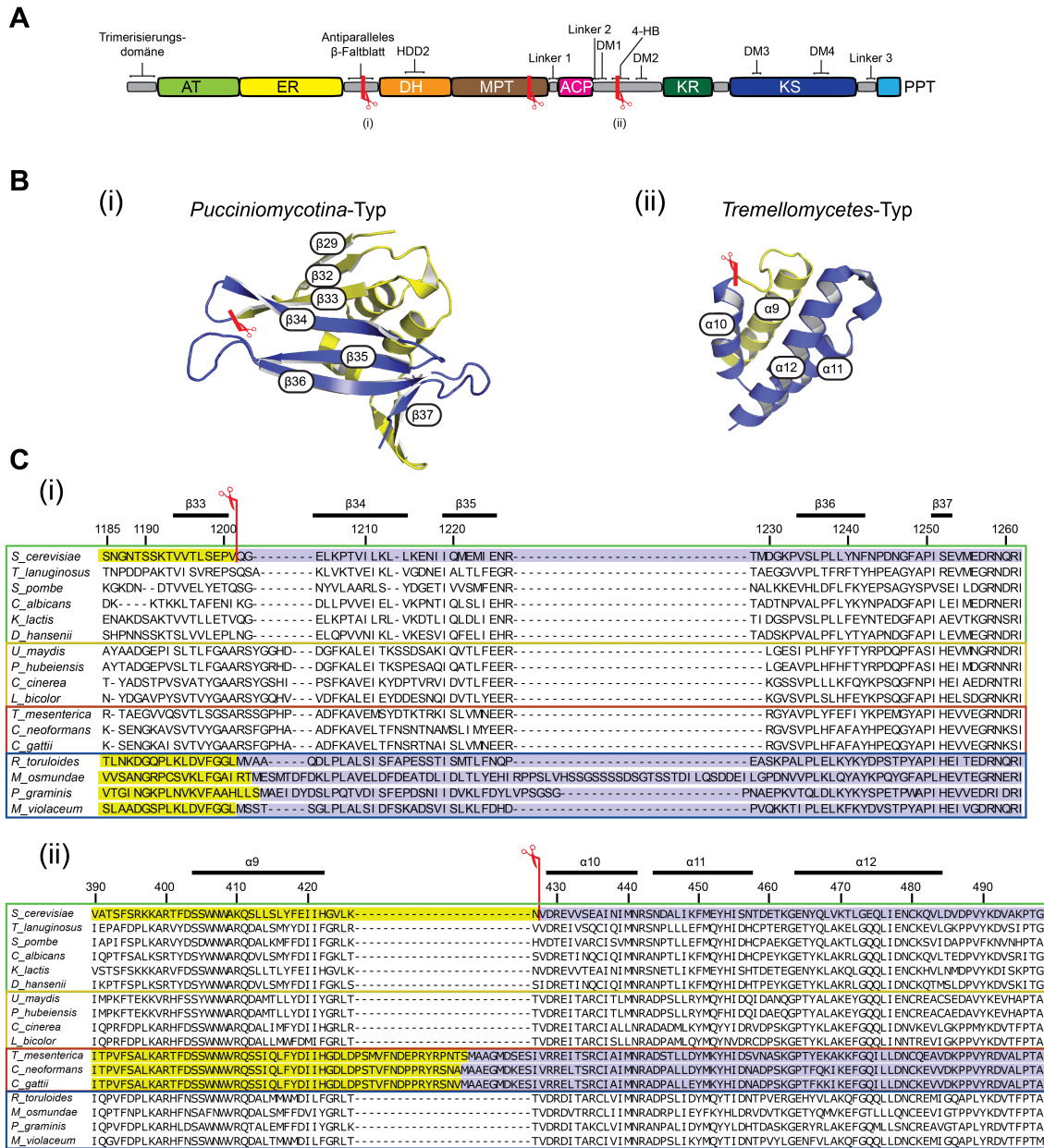


Abb. 5.5: Strukturelle Grundlage zur Konstruktion der fFAS-Nachbauten. **A** Domänenübersicht der fFAS mit unterschiedlichen Positionen des Strangbruchs analog Abb. 2.7. **B** Ausschnitte aus der Kristallstruktur der ScFAS (PDB-Code: 3hmj) in *Cartoon*-Repräsentation des antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts (i) und des 4-helikalen Bündels (4-HB) (ii). Rote Balken mit Schere markieren die zum Nachbau artifizierender fFAS-Typen gesetzten Schnitte zur Separation in zwei Polypeptidketten. Die jeweils resultierende C-terminalen und der N-terminalen Anteile sind in gelb bzw. blau eingefärbt. Sekundärstrukturelemente sind nach Jenni *et al.* (2007) benannt. **C** Multiples Sequenz-*Alignment* verschiedener fFAS mit farblicher Einrahmung der verschiedenen Typen analog Abb. 5.4 und um drei Vertreter des *Pucciniomycotina*-Typs (blauer Rahmen) erweitert. Die Ausschnitte decken das antiparallele  $\beta$ -Faltblatt (i) und das 4-helikale Bündel (ii) ab. Die Numerierung folgt der Sequenz der  $\beta$ - (i) bzw.  $\alpha$ -Kette (ii) aus *S. cerevisiae*. Einfärbung, Schnitte (rote Balken) und Sekundärstrukturangaben zur *S. cerevisiae*-Sequenz entsprechen B. Ebenso eingefärbt sind C- und N-Termini der *Pucciniomycotina*-fFAS ((i), blauer Rahmen) und der *Tremellomycetes*-fFAS ((ii), roter Rahmen).

Tab. 5.3: Übersicht der *S. cerevisiae*-Stämme zur Evaluierung von artifiziellen fFAS-Nachbauten und deren Schnittstellenmotiven. Die Positionsbeschreibung E8 im Namen von *Sc\_Tre\_E8R* bezieht sich analog zum Stamm *Sc\_E8R* auf die Positionierung der Aminosäure in der ScFAS, während im Genotyp des Stamms die entsprechende Positionierung E2058 im *Tremellomyces*-Typ-Nachbau angegeben ist.

Stamm	fFAS-Typ	Genotyp (siehe Anhang A; Tab.A.4)	Modifikation
<i>Sc_fas1-fas2</i>	<i>Agaricomycetes</i> -Typ-Nachbau	<i>fas1-fas2</i> -Fusion	Fusion
<i>Sc_Tre</i>	<i>Tremellomyces</i> -Typ-Nachbau	<i>fas1<sup>Tre</sup>/fas2<sup>Tre</sup></i>	Strangbruch
<i>Sc_Tre_E8R</i>	<i>Tremellomyces</i> -Typ-Nachbau	<i>fas1<sup>Tre_E2058R</sup>/fas2<sup>Tre</sup></i>	Strangbruch & Punktmutation
<i>Sc_Tre_Δα10-12</i>	<i>Tremellomyces</i> -Typ-Nachbau	<i>fas1<sup>Tre</sup>/fas2<sup>Tre</sup>_Δα10-12</i>	Strangbruch & Deletion
<i>Sc_Puc</i>	<i>Pucciniomycotina</i> -Typ-Nachbau	<i>fas1<sup>Puc</sup>/fas2<sup>Puc</sup></i>	Strangbruch
<i>Sc_Puc_Δβ34-37</i>	<i>Pucciniomycotina</i> -Typ-Nachbau	<i>fas1<sup>Puc</sup>/fas2<sup>Puc</sup>_Δβ34-37</i>	Strangbruch & Deletion

Das fusionierte Konstrukt *fas1-fas2* verfügte über *FAS1*-Promotor und *FAS2*-Terminator. Die Komplementationsfähigkeit der artifiziellen FAS-Konstrukte wurde analog zu Kap. 5.3 auf pRS-Vektoren im FAS-deletierten *S. cerevisiae*-Stamm *BY.PK1238\_1A\_KO* bzgl. Komplementation der FS-Synthese evaluiert. Beide Wachstumsexperimente zeigen übereinstimmend eine volle Komplementation der *de-novo*-FS-Synthese für alle fFAS-Nachbauten, wie durch Wachstum ohne externe FS-Zugabe ersichtlich ist (siehe Abb. 5.6 A). Konsistent hierzu ist auch die Detektion von FAS-Banden im *Western Blot* auf Migrationsweite entsprechend der Wildtyp-Referenzen. Nicht komplementierend sind hingegen solche Konstrukte dieser Nachbauten, die analog zur Vorgehensweise bzgl. der MPT-Domäne in Kap. 5.3 um Sekundärstrukturelemente ihrer Schnittstellenmotive reduziert sind (*Sc\_Tre\_Δα10-12* und *Sc\_PucΔβ34-37*).

Die Ergebnisse belegen, dass die Assemblierung der ScFAS unterschiedliche Positionen des Kettenbruchs in  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette uneingeschränkt toleriert. Die kovalente Verknüpfung beider Ketten durch Genfusion von *FAS1* und *FAS2* als Vorwegnahme der posttranslationalen Verbindung der codierten Proteine steht im Einklang mit einem Assemblierungsmechanismus der in einem ersten oder sehr frühen Schritt eben dieses Ereignis enthält. Dieses Prinzip ist für viele Beispiele anderer Multi-domänenproteine ebenfalls beschrieben (Marsh *et al.* (2013)). Ebenso wie bei der ScFAS treten auch bei den anderen fFAS-Typen die Positionen zum Strangbruch in strukturell geordneten Motiven auf, die wichtig für die Assemblierung sind und auch hier die frühe Verknüpfung beider Polypeptidketten verantworten. Bei FAS des *Tre*-

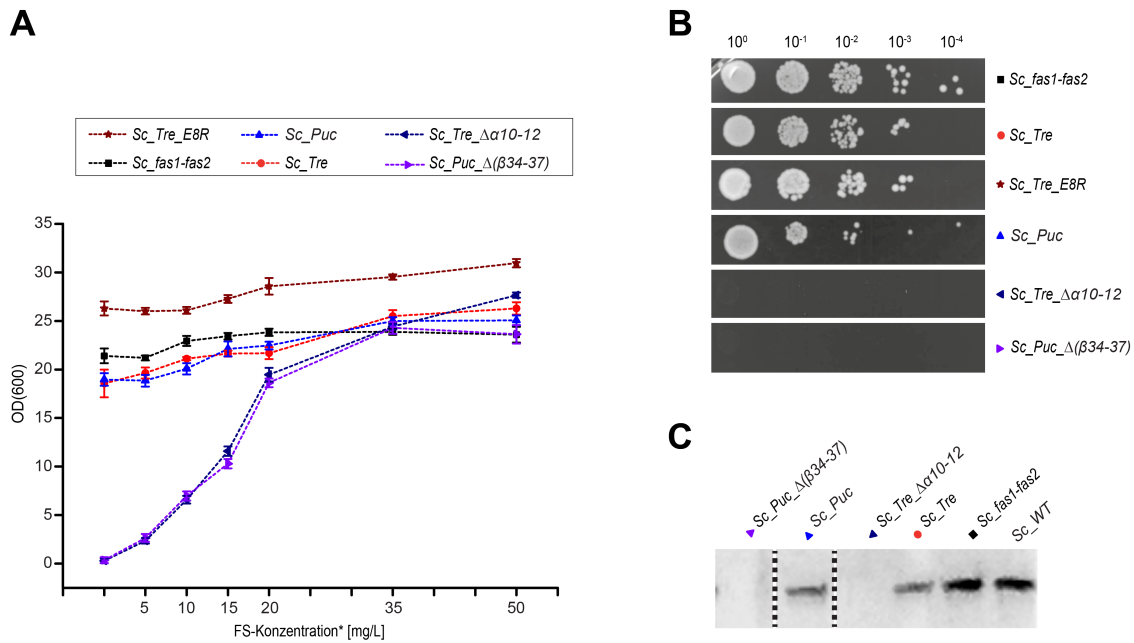


Abb. 5.6: *In-vivo*-Evaluierung von artifiziellen Nachbauten anderer fFAS-Typen. **A** FAS-Komplementationstest von *S. cerevisiae*-Stämmen mit unterschiedlichen, auf der ScFAS-Sequenz beruhenden Nachbauten anderer fFAS-Typen sowie Schnittstellenmutierten Varianten hiervon. Die angegebenen FS-Konzentrationen beziehen sich auf jede der drei FS (\*). Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen  $\pm 3\sigma$  der Standardabweichung aus fünf technischen Replikationen der OD(600)-Messung. Die gestrichelten Linien dienen nur zur Orientierung im Trend einzelner Stämme und stellen keinen durch Messwerte begründeten Kurvenverlauf dar. Das insgesamt höhere Niveau im Wachstum von *Sc\_Tre\_E8R* ist das Resultat von abweichenden Anfangsbedingungen gegenüber den anderen Stämmen durch Kultivierung der Vorkultur in YPD- statt SD-Medium. Biologische Replikationen sind in Anhang B, Abb. B.3 gezeigt. **B** Spotting-Test der Stämme aus A. Die gezeigten Ausschnitte stammen teilweise von unterschiedlichen Kulturplatten bei gleichem Medium und Bedingungen. **C** Native PAGE-Western Blot-Analyse von assemblierter fFAS in Zellysaten der Stämme aus A. Die Abbildung zeigt lediglich einen die ScFAS-Bande umfassenden Ausschnitt und ist, wie durch gestrichelte Linien angegeben, aus Aufnahmen separater Western Blots unter Orientierung an einer jeweils präsenten Bande aufgereinigter ScFAS zusammengesetzt. Die kompletten Western Blots sind in Anhang B, Abb. B.4 gezeigt.

*mellomyces*-Typs sind dabei Insertionen um insgesamt ca. 25 Aminosäuren an den interagierenden Termini auffällig. Während die umgebende Sequenz sehr stark auch gegenüber der ScFAS konserviert ist (siehe Abb.5.5 C), womit von ihrer strukturellen Entsprechung des 4-helikalen Bündels aus der ScFAS auszugehen ist, können diese Verlängerungen zur Verstärkung der Interaktion zwischen beiden Peptidketten als Notwendigkeit des hier vorhandenen Strangbruchs dienen. Dies scheint analog des Falls zur Vergrößerung der MPT-Domäne zu sein (vgl. Kap. 5.1), jedoch präsentieren sich hier diese Expansionen verzichtbar, da sie im *Tremellomyces*-Nachbau in diesen Experimenten fehlen.

## 5.5 *In-vivo*-Experimente zur kompetitiven Inhibierung der Assemblierung von Fettsäuresynthasen

Die Sensibilität der  $\beta$ - $\alpha$ -Schnittstelle in der ScFAS-Assemblierung (vgl. Kap. 5.4) weckt die Neugier nach der Möglichkeit zur Inhibierung durch externen Eingriff. Dies wäre insbesondere für die weiterführende Evaluierung als *Drug-Target* für neuartige Antimykotika hoch interessant (vgl. Kap. 2.8) und ist durch die minimale Störung von Wechselwirkungen mit maximalem Effekt (vgl. Kap. 5.4) für kleine Moleküle als Wirkstoff vielversprechend.

In dieser Arbeit wurde eine Inhibierung der ScFAS-Assemblierung durch kompetitive Wechselwirkung ihrer Polypeptidketten mit Proteinfragmenten getestet, die Sekundärstrukturelemente oder größere Bereiche der Schnittstellenmotive umfassen (Anhang B, Abb. B.5). Sowohl der C-Terminus der  $\beta$ -Kette wurde dazu adressiert durch die  $\alpha$ 1-Helix oder den gesamten *FAS2*-codierten Teil der MPT-Domäne ( $\alpha$ -MPT) als auch der N-Terminus der  $\alpha$ -Kette durch ein die Helices  $\alpha$ 65-68 umfassendes Fragment ( $\alpha$ 65-68) oder den gesamten *FAS1*-codierten Teil der MPT-Domäne ( $\beta$ -MPT). Zudem wurde der fusionierte Bereich  $\alpha$ 65 der  $\beta$ -Kette bis einschließlich  $\alpha$ 1 der  $\alpha$ -Kette ( $\alpha$ 65-68- $\alpha$ 1) getestet. Auch das 4-helikale Bündel als Schnittstelle im *Tremellomyces*-FAS verfügenden Stamm *Sc\_Tre* (siehe Tab. 5.3) wurde analog durch Angebot isolierter  $\alpha$ 9-Helix hinsichtlich kompetitiver Inhibierung untersucht (Anhang B, Abb. B.5).

Die Experimente verliefen *in-vivo* unter starker konstitutiver Expression der Konstrukte durch den starken GPD-Promotor auf pAG-Vektoren (Alberti *et al.* (2007)) im *S. cerevisiae*-Stamm *Sc\_WT* für alle ScFAS-Kompetitoren, bzw. im Stamm *ScTre* für die  $\alpha$ 9-Helix (siehe Tab. 5.3).

In keinem der Fälle konnte ein signifikanter Einfluss auf das Wachstum der entsprechenden Transformanten ohne FS-Supplementierung festgestellt werden. Auch eine Inhibierung der putativ vulnerablen Mutanten K2S und E8R (Stämme *Sc\_K2S* und *Sc\_E8R*, siehe Tab. 5.3) durch die native  $\alpha$ 1-Helix blieb aus (siehe Anhang B, siehe Abb. B.5).

Weitere Experimente zu Expressionsmengen und Stabilitäten der getesteten Kompositionsstrukturen stehen jedoch aus, wodurch keine abschließende Beurteilung dieser Ergebnisse möglich ist.

Stattdessen wurde eine kompetitive Bindung *in cis* untersucht, indem im ScFAS-Fall die  $\alpha$ 1-Helix (Stamm *Sc\_fas1- $\alpha$ 1*, siehe Tab. 5.4) oder der komplette *FAS2*-codierte Teil der MPT-Domäne (Stamm *Sc\_fas1-full\_MPT*, siehe Tab. 5.4) C-terminal an die  $\beta$ -Kette fusioniert wurde. Eine intramolekulare Absättigung der  $\beta$ - $\alpha$ -Schnittstelle bzw. der kompletten MPT-Domäne sollte gegenüber der intermolekularen  $\beta$ - $\alpha$ -Kupplung bevorzugt sein und bestätigt sich in analog zu Kap. 5.3 durchgeführten

Experimenten (siehe Abb. 5.7).

Während beim Angebot der kompletten MPT-Domäne auf der  $\beta$ -Kette eine Assemblierung bis auf eine sehr schwache Bande im *Western Blot* nahezu völlig ausbleibt, führt die Fusion von  $\alpha 1$  lediglich zu eingeschränkten, aber dennoch signifikanten Vitalitätseinbußen der entsprechenden Transformanten. Im Fall des *Tremellomyces*-FAS-Nachbaus wurde die  $\alpha$ -Kette N-terminal um  $\alpha 9$  verlängert (Stamm *Sc $\alpha 9$ -fas2<sup>Tre</sup>*, Tab. 5.4) und zeigt ebenso bis auf eine sehr schwache Bande im *Western Blot* einen nahezu kompletten Assemblierungsdefekt durch interne Absättigung des 4-helikalen Bündels, wodurch ebenso wie im Fall *Sc $\alpha 1$ -full\_MPT* kein Wachstum entsprechender Kulturen in Medium ohne FS-Zugabe möglich ist.

Tab. 5.4: Übersicht der *S. cerevisiae*-Stämme zur Evaluierung einer Assemblierungsinhibierung durch intramolekulare Konkurrenz.

Stamm	fFAS-Typ	Genotyp (siehe Anhang A; Tab.A.4)	Modifikation
<i>Sc<math>\alpha 1</math></i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>fas1-<math>\alpha 1</math>/FAS2</i>	Verlängerung
<i>Sc<math>\alpha 1</math>-full_MPT</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>fas1-full_MPT/FAS2</i>	Verlängerung
<i>Sc<math>\alpha 9</math>-fas2<sup>Tre</sup></i>	<i>Tremellomyces</i> - Typ-Nachbau	<i>fas1<sup>Tre</sup>/<math>\alpha 9</math>-fas2<sup>Tre</sup></i>	Verlängerung

Diese Ergebnisse zeigen zum einen die prinzipielle Möglichkeit zum Ausschalten dieses Ablaufs durch Interaktion an den Schnittstellen der separaten Polypeptidketten bei ausreichender lokaler Konzentration, wie hier durch Fusion erreicht, und des weiteren liefern sie für den Assemblierungsmechanismus der fFAS weitere Unterstützung für die Annahme einer frühen  $\beta$ - $\alpha$ -Interaktion, da durch interne Absättigung der  $\beta$ - $\alpha$ -Schnittstellen vor einem Zugriff der Polypeptidketten aufeinander über eben diese initiale Schnittstelle die Assemblierung unterbunden wird. Die unvollständige Assemblierungsinhibierung bei Fusion von lediglich  $\alpha 1$  gegenüber vollständiger Inhibierung bei Fusion des kompletten  $\alpha$ -Ketten-Teils der MPT-Domäne an das C-terminale Ende der  $\beta$ -Kette steht im Einklang mit der Annahme einer reversiblen Bindung im  $\alpha 65$ - $68/\alpha 1$ -Motiv. Diese würde in einem der Assemblierungsbeeinträchtigung entsprechenden Maß die Verdrängung der kovalent gebundenen  $\alpha 1$ -Helix durch  $\alpha 1$  einer separaten Wildtyp- $\alpha$ -Kette ermöglichen, wohingegen der Umkehrfall durch die subsequente stabilisierende Ausbildung der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasestruktur (siehe Abb. 5.1) thermodynamisch gehemmt wäre.

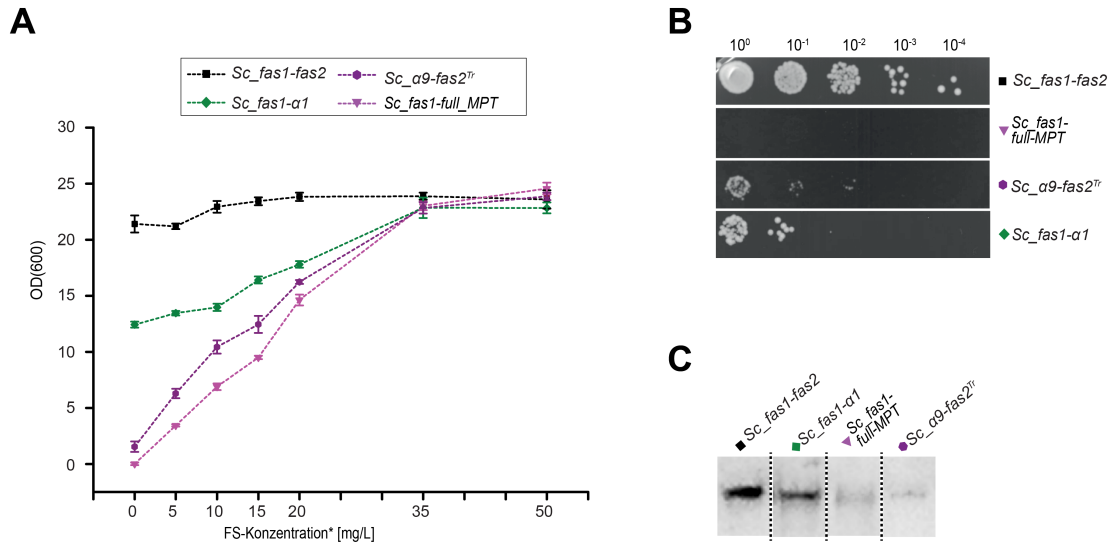


Abb. 5.7: *In-vivo*-Evaluierung intramolekular Assemblierungs-inhibierter FAS-Konstrukte. **A** FAS-Komplementationstest von *S. cerevisiae*-Stämmen mit unterschiedlichen Kompetitionsstrukturen, wie angegeben, sowie dem *fas1-fas2*-Fusionskonstrukt als voll komplementierende Referenz. Die angegebenen FS-Konzentrationen beziehen sich auf jede der drei FS (\*). Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen  $\pm 3\sigma$  der Standardabweichung aus fünf technischen Replikationen der OD(600)-Messung. Die gestrichelten Linien dienen nur zur Orientierung im Trend einzelner Stämme und stellen keinen durch Messwerte begründeten Kurvenverlauf dar. Biologische Replikationen sind in Anhang B; Abb.B.3 gezeigt. **B** *Spotting*-Test der Stämme aus A. Die gezeigten Ausschnitte stammen teilweise von unterschiedlichen Kulturplatten bei gleichem Medium und Bedingungen. **C** *Native PAGE-Western Blot* -Analyse von assemblierter fFAS in Zellysaten der Stämme aus A und B. Die Abbildung zeigt lediglich einen die ScFAS-Bande umfassenden Ausschnitt und ist, wie durch gestrichelte Linien angegeben, aus Aufnahmen separater *Western Blots* unter Orientierung an einer jeweils präsenten Bande aufgereinigter ScFAS zusammengesetzt. Die kompletten *Western Blots* sind in Anhang B; Abb. B.4 gezeigt.



## 5.6 Sekundärstrukturanalyse von Schnittstellenmotiven der Fettsäuresynthese aus *S. cerevisiae*

Mittels Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie an synthetischen Peptiden wurde der helikale Charakter der isolierten Fragmente  $\alpha 1$  (N-Terminus ScFAS- $\alpha$ -Kette) und  $\alpha 67/68$  (C-Terminus ScFAS- $\beta$ -Kette) (siehe Abb. 5.1) ermittelt. Hierdurch sollte die Frage geklärt werden, ob ihre  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur in der Kristallstruktur das Resultat gegenseitiger Induktion intrinsisch ungeordneter Sequenzen ist, wie es für Proteininteraktionen oft beschrieben wird (Marsh and Teichmann (2011)), oder ob diese Termini der beiden ScFAS-Ketten über vorausgebildete  $\alpha$ -Helices der isolierten Sequenzen interagieren.

Zur Wahrung des chemischen Kontexts im Peptidrückgrad des Proteins wurde  $\alpha 1$  C-terminal amidiert und  $\alpha 67/68$  N-terminal acetyliert. Neben der Wildtyp- $\alpha 1$ -Helix wurde zudem eine K2S/E8R-mutierte  $\alpha 1$ -Helix ( $\alpha 1\_K2S/E8R$ ) getestet, um einen Einfluss dieser Mutationen auf die Sekundärstruktur als Grund ihres invasiven Effekts in der Assemblierung (vgl. Kap. 5.3) zu überprüfen. Durch Zusatz von Trifluorethanol (TFE) in unterschiedlichen Konzentrationen wurde Sekundärstruktur induziert, um die Tendenz zur  $\alpha$ -Helix-Bildung abzuschätzen (Hite *et al.* (2012)).

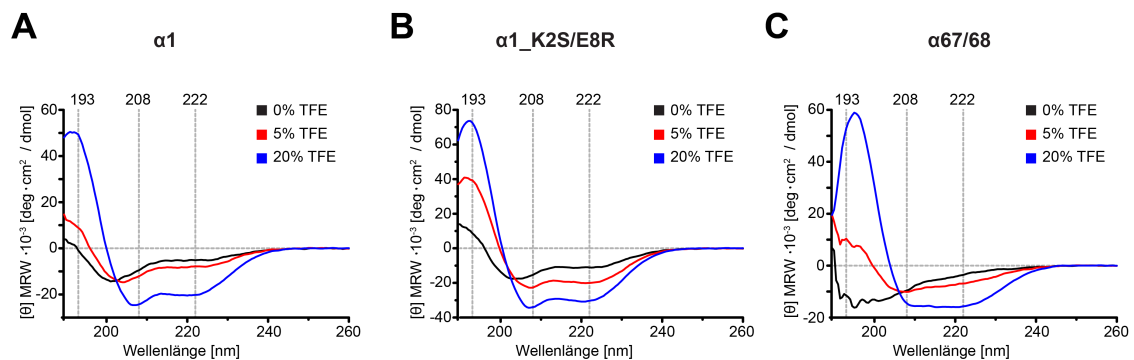


Abb. 5.8: Sekundärstrukturanalyse der interagierenden Termini von  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette der ScFAS. CD-Spektren der isolierten Peptide. **A**  $\alpha 1$ , **B**  $\alpha 1\_K2S/E8R$  und **C**  $\alpha 67/68$  in gepufferter Lösung bei unterschiedlichen Volumenanteilen Trifluorethanol (TFE) wie angegeben. Aufgetragen ist die molare Elliptizität pro Peptidbindung gewichtet ( $[\theta]$  MRW). Vertikale gestrichelte Linien markieren Wellenlängen, bei denen die für  $\alpha$ -Helices charakteristischen Extrema zu erwarten sind (Greenfield (2006)).

Beide  $\alpha 1$ -Helices, Wildtyp und K2S/E8R-Mutante, zeigen ohne TFE eine geringe Neigung zur Helixbildung, die durch Zugabe von TFE verstärkt werden kann. Dieses Verhalten ist bei  $\alpha 1\_K2S/E8R$  sogar noch ausgeprägter und schließt damit einen durch diese Mutationen hervorgerufenen Defekt der Helizität aus. Während das Peptid  $\alpha 67/68$ , angezeigt durch geringe Elliptizität oberhalb 210 nm und ein Minimum bei 195 nm, im rein wässrigen Puffer eindeutig unstrukturiert vorliegt, lässt sich auch

dieses durch TFE-Zugabe eindeutig  $\alpha$ -helikal induzieren (siehe Abb. 5.8). Entgegen einer Interaktion von  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette über beiderseits konformationell ungeordnete Termini, deuten diese Daten darauf hin, dass sich ein zur  $\alpha$ -Helix tendierender N-Terminus der  $\alpha$ -Kette in den strukturell flexiblen C-Terminus der  $\beta$ -Kette bettet und dabei Helizität induziert, um das Schnittstellenbündel  $\alpha_{65-68}/\alpha_1$  auszubilden. Die Mutationen K2S/E8R haben keinen destruktiven Einfluss auf die Helizität von  $\alpha_1$ , womit K2 und E8 eine Wichtigkeit in der molekularen Erkennung für die Assemblierung der ScFAS bleibt (Kastritis and Bonvin (2013)).

## **5.7 Entwicklung eines *split*-GFP-Tests zur Anwendung für Schnittstelleninteraktionen der Fettsäuresynthase aus *S. cerevisiae***

Zur weiteren Untersuchung von kompetitiv an den Schnittstellen bindenden Peptiden oder Proteinfragmenten, wie in Kap. 5.6, aber auch in einem über diese Arbeit hinausgehenden Verlauf zum Test nicht-peptidischer Inhibitoren, wie Helixmimetika (Pelay-Gimeno *et al.* (2015)), sollte eine Methode entwickelt werden, die eine direkte Visualisierung der Wechselwirkungen der  $\beta$ - $\alpha$ -Schnittstelle oder Wechselwirkungen von peptidischen Kompetitoren an der Schnittstelle ohne Umwege über Betrachtung der Zellvitalität oder *Western Blot* gewährleistet.

Die Möglichkeiten zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen sind mannigfaltig (Arkin *et al.* (2012)). Viele erfordern jedoch eine posttranslationale Modifikation der aufgereinigten Proteine durch Konjugation mit signalgebenden Sonden und die experimentelle Durchführung *in-vitro*. Wie in Kap. 4.1.3 beschrieben, sind die Ketten  $\alpha$  und  $\beta$  der ScFAS jedoch nicht getrennt isolierbar, um ihre Wechselwirkung durch nachträgliche Mischung zu untersuchen. Gleichzeitig sind die räumliche Nähe des C-Terminus der  $\beta$ -Kette zum N-Terminus der  $\alpha$ -Kette mit 8,3 Å in der Kristallstruktur (PDB-Code: 3hmj, Q2050-C1 bis M1-C1) und deren frei zugängliche Lage an der Außenseite der „Fass-Struktur“ aber ideal geeignet für Sonden, die durch räumliche Nähe zueinander ein Signal liefern. Für gerade solche Anwendungen sind heute geteilte Protein-Reporter etabliert, unter denen vor allem geteiltes Grün-Fluoreszierendes-Protein (*split*-GFP) durch sein optisches Signal ohne Bedarf weiterer Substrate einfach auszulesen ist (Cabantous *et al.* (2013)). GFP lässt sich bereits über die Gensequenz in die zu untersuchenden Proteinpaare einbringen und entsprechende Bindungstests funktionieren dadurch sehr gut *in-vivo*. Das Funktionsprinzip beruht auf der Rekombination fragmentierter Untereinheiten zur Wiederherstellung der Funktionalität, indem sie durch die gegenseitige Bindung ihrer fusionierten Proteine in räumliche Nähe zueinander gebracht werden, ohne dass sie diesen Zustand selbstständig erreichen könnten.

In dieser Arbeit wurde zunächst die gesamte ScFAS als untersuchtes System gewählt, um das Prinzip zur *split*-GFP-Modifizierung zu prüfen. In weiteren Arbeiten könnte dann eine Reduktion auf die wesentlich wechselwirkenden Proteinmotive der  $\beta$ - $\alpha$ -Schnittstelle stattfinden.

Ein modifiziertes GFP mit verbesserten Faltungseigenschaften und Signalstärke (Pedelacq *et al.* (2006)), um einer Beeinträchtigung durch die Teilung und Fusion an die ScFAS entgegen zu wirken, wurde nach Literaturangaben (Cabantous *et al.* (2005)) in ein N-terminales (<sup>N</sup>GFP, M1-E172) und ein C-terminales Fragment (<sup>C</sup>GFP, D173-K238) geteilt (siehe Abb. 5.9 B ii).

Jeweils über die Linkersequenz (GGSG)<sub>2</sub> wurde <sup>N</sup>GFP an den N-Terminus der  $\alpha$ -Kette und <sup>C</sup>GFP an den C-Terminus der  $\beta$ -Kette fusioniert (siehe Abb. 5.9 B i). Die *split*-GFP-markierte ScFAS wurde auf pRS-Vektoren unter Kontrolle ihrer nativen Promotoren und Terminatoren (Chirala (1992)) in *BY.PK1238\_1A\_KO* exprimiert und die GFP-Fluoreszenz im Zelllysate einer Kultur früher logarithmischer Phase an einem Mikroplattenleser detektiert. Als Negativkontrolle (neg. Ref.) wurde Zelllysate mit Wildtyp-ScFAS (*Sc\_WT*, Tab. 5.2) und als Positivkontrolle Zelllysate des Stamms *ATCC 201388\_fas1-GFP* (Huh *et al.* (2003)), der über eine chromosomal integrierte Fusion einer S65T-Mutante von GFP C-terminal an die  $\beta$ -Kette verfügt (Fas1p-GFP/Fas2p), herangezogen.

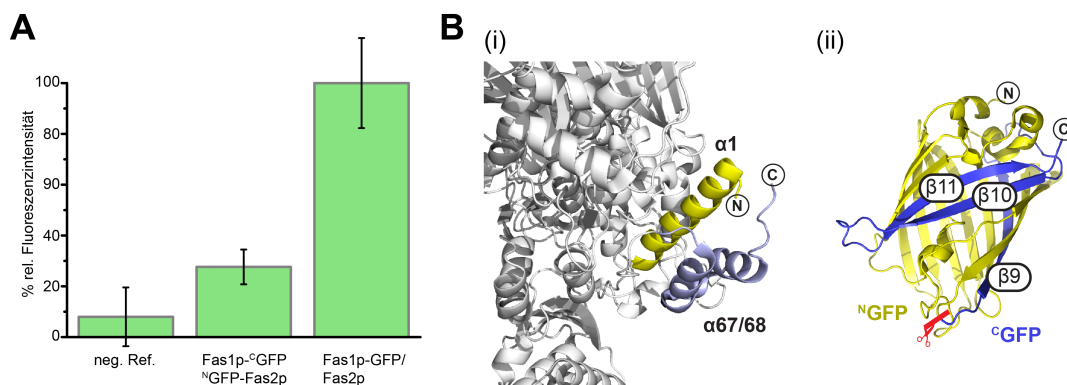


Abb. 5.9: Ergebnis und strukturelle Grundlagen des *split*-GFP-Tests. **A** Relative Fluoreszenzintensitäten in Prozent bzgl. der C-terminalen Fusion von GFP an die ScFAS- $\beta$ -Kette (Fas1p-GFP) auf eine Proteinkonzentration von 1 g/L gerechnet. Die Fehlerbalken entsprechen  $\pm 3\sigma$  aus zehn Messungen. Beschreibung siehe Text. **B** (i) Ausschnitt aus der Kristallstruktur der ScFAS (PDB-Code: 3hmj) in *Cartoon*-Repräsentation, der die Exponiertheit und relative Nähe der Termini (N) der  $\alpha$ -Kette (Fas2p) mit der Helix  $\alpha 1$  in gelb und (C) der  $\beta$ -Kette mit den Helices  $\alpha 67/68$  in blau zeigt. (ii) Kristallstruktur von GFP (PDB-Code: 1q4a) in *Cartoon*-Repräsentation. Die Fragmente <sup>N</sup>GFP und <sup>C</sup>GFP entsprechend des *split*-GFP-Tests sind in gelb bzw. blau eingefärbt und die Position ihrer Trennung sind durch einen roten Balken angezeigt. Die nativen Termini (N) und (C) sind eingezeichnet sowie die Sekundärstrukturelemente  $\beta 9-11$ , die <sup>C</sup>GFP ausmachen.

Im Ergebnis wurde eine Fluoreszenz des *split*-GFP-Reporters detektiert, die mit 28% ( $\pm 7\%$ ) Signalintensität zwar deutlich unter dem Wert der Positivkontrolle liegt, aber trotz konservativer Fehlerbetrachtung mit  $\pm 3\sigma$  auch ebenso signifikant über dem Hintergrund aus der Negativkontrolle, der bei 8% ( $\pm 12\%$ ) der Signalintensität der Positivkontrolle liegt (siehe Abb. 5.9 A). Die Hintergrundfluoreszenz ist das Resultat der Autofluoreszenz des applizierten Zelllysats in diesem Experiment. Die quantitative Vergleichbarkeit von *split*-GFP mit der Positivkontrolle ist hier bisher nicht gewährleistet, da es sich um unterschiedliche Expressionssysteme handelt (Positivkontrolle: chromosomal integriert, *split*-GFP: pRS-Vektorsystem) und unterschiedliche GFP-Mutanten im Einsatz sind.

Entscheidend sind die erwiesene Toleranz der beiden Termini der ScFAS gegenüber der Fusion der GFP-Fragmente und dabei die Rekonstitution des Proteinchromophors. Durch Optimierung der verwendeten Peptidlinker für die Fusion, der Position zur Teilung des GFP oder Änderung der Orientierung der GFP-Fragmente besteht Potential zur Erhöhung der Sensitivität dieser Methode. In der Literatur sind hierzu selbst dreigeteilte GFP-Reporter beschrieben, die mit der paarweisen Fusion von  $\beta 10$  und  $\beta 11$  (siehe Abb. 5.9) an die wechselwirkenden Proteinpartner in Gegenwart des N-terminalen Rests als separates Proteinfragment auskommen (Cabantous *et al.* (2013)). Dies würde den Vorteil sehr kleiner Proteinanhänge mit weniger Einfluss auf die FAS-Assemblierung bieten. Darüber hinaus kann durch Anwendung rotverschobener GFP-Varianten, die Autofluoreszenz des Zelllysats verringert werden (Jung *et al.* (2005)).

## 6 Schlussfolgerung und Ausblick

### 6.1 Assemblierung der fFAS in drei Schlüsselschritten

Die Typ I-Fettsäuresynthase aus Pilzen (fFAS), ein Multienzymkomplex in der Größenordnung um 2.6 MDa (Wert der ScFAS aus *S. cerevisiae*), assembliert je nach betreffendem Organismus aus sechsmal einer multifunktionalen Polypeptidkette zu einem Homohexamere oder aus je dreimal zwei separaten Polypeptidketten ( $\beta$  und  $\alpha$ ) durch Teilung der selben Sequenzabfolge auf Gen-Ebene zu einem Heterododecamer. Diese Teilung tritt dabei in unterschiedlichen Abstammungsgemeinschaften zudem an drei unterschiedlichen Positionen bzgl. der ursprünglichen und als evolutionärer Vorläufer annehmbaren einzelncodierten Sequenz auf, dabei aber immer innerhalb strukturell gut definierter Motive, wie etwa interagierenden  $\alpha$ -Helices. Hiervon ist aus Einblicken in die Kristallstruktur der ScFAS als meist erforschter Repräsentant der bzgl. Sequenz und Struktur hoch konservierten fFAS auszugehen. Die aus der Teilung in zwei Polypeptidketten neu resultierenden freien Termini bilden somit eine geordnete Schnittstelle für die Rekonstitution zu einer Pseudoeinzelkette durch solche interagierenden Sekundärstruktur motive. Sowohl die Tatsache, dass beim *Ascomycota*-Typ diese Teilung innerhalb einer katalytischen Domäne stattfindet, sowie die phylogenetische Analyse von fFAS aus unterschiedlichen Organismen begründen eine einzelncodierte fFAS als evolutionären Vorläufer der geteilten Typen. Es wird heute angenommen, dass Proteinkomplexe unter evolutionärem Druck stehen, auf geordneten Pfaden zu assemblieren (Marsh *et al.* (2013)), wonach die verschieden geteilten fFAS-Typen noch immer einem Mechanismus einer einzelncodierten fFAS folgen müssten. Die ScFAS-Sequenz toleriert, wie in dieser Arbeit gezeigt, sowohl eine kovalente Fusion von  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette durch Genfusion als auch durch Verschiebung ihrer Teilung in  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette an Positionen der anderen bekannten fFAS-Typen. Ein konservierter Assemblierungsmechanismus ist damit stark anzunehmen, der in einem ersten oder zumindest frühen Schritt die Bildung einer Pseudoeinzelkette umfasst (siehe Abb. 6.1, **Schlüsselschritt 1**), wodurch alle fFAS-Typen frühzeitig auf einen gemeinsamen Assemblierungspfad geleitet werden würden.

Evidenz für eine frühe  $\beta$ - $\alpha$ -Verknüpfung lässt sich auch aus der Sensibilität der Assemblierung gegenüber relativ subtilen Modifikationen an den  $\beta$ - $\alpha$ -Schnittstellen ziehen. Gegenüber den relativ großflächigeren und zahlreichen Domänen-Domänen-Interaktionen in der fFAS kann die hohe Bedeutsamkeit der  $\beta$ - $\alpha$ -Schnittstellen am

besten durch ihre wichtige Rolle in einem initialen Kontakt erklärt werden. Ein wichtiger Aspekt für die Assemblierung der fFAS resultiert aus der Notwendigkeit zur posttranslationalen Phosphopantetheinylierung von ACP für dessen Aktivität durch mindestens dimeres PPT. Gleichwohl wurde in dieser Arbeit anhand assemblierender ScFAS-Mutante mit entsprechendem ACP-Defekt die Unabhängigkeit dieses Akts für die rein strukturelle Assemblierung gezeigt. In Übereinstimmung mit in Kap. 4 gezeigten Ergebnissen aus Vorarbeiten zu diesem Projekt zum Fehlen einer stabilen ACP-PPT-Interaktion tritt die Phosphopantetheinylierung offensichtlich in einem sehr transienten Zustand ohne thermodynamische Stabilisierung dieser Partner ein. Da sowohl fertig assemblierte fFAS als auch ein  $\alpha_6$ -Rad als in-cis phosphopantetheinylierungsfähige Struktur bereits durch experimentelle Arbeiten bzw. Schlussfolgerungen ausgeschlossen werden können (Fichtlscherer *et al.* (2000); Johanson *et al.* (2009)), ist hierzu eine niederoligomere Vorstufe während der Assemblierung vonnöten. Diese muss offensichtlich nicht einen Vorkomplex darstellen, der auf eine erfolgreiche Phosphopantetheinylierung wartet. In den in Kap. 4 genannten Vorarbeiten zu diesem Projekt konnten bereits Daten gesammelt werden, die eine dimere KS-PPT-Einheit als phosphopantetheinylierungsfähig gegenüber ACP charakterisieren. Diese könnte der strukturelle Kern einer Anordnung zweier Pseudoeinzelketten zur Phosphopantetheinylierung sein, der PPT zur Dimerisierung treibt und das transiente Aufeinandertreffen mit ACP zu dessen Aktivierung in einer schnellen Reaktion gewährleistet (siehe Abb. 6.1, **Schlüsselschritt 2**). Denn diese muss zeitlich vor der Ausbildung des Dimerisierungsmoduls DM1 bei KR-KR-Kontakt mit einem weiteren  $\alpha_2\beta_2$ -Protomer stattfinden, um die räumliche Freiheit des ACP zu gewährleisten. Die KR-Domäne selbst wird dabei zunächst von den Interdomänensequenzen zur KS-Domäne einerseits und zum ACP andererseits umschlungen (siehe Abb.6.1). Die bereits initial angedockte  $\beta$ -Kette leitet über Interdomänenkontakte die Interaktion dreier solch dimerisierter Pseudoeinzelketten in die  $D_3$ -symmetrische „Fass-Struktur“ (**Schlüsselschritt 3**). Ihr früher Zugriff auf die  $\alpha$ -Kette wird auch hierbei wieder deutlich, um auf der kurzen Zeitskala von Proteinfaltungsabläufen rechtzeitig die Assemblierung in dieser Weise zu dirigieren. Im Fall des *Tremellomyces*-Typs wird so zudem das auf der  $\beta$ -Kette getragene ACP in einem konservierten Mechanismus in gleicher Weise berücksichtigen. Bzgl. ScFAS bringt die  $\beta$ -Kette dabei erst die entsprechende Strukturinformation ein, während die  $\alpha$ -Kette alleine, experimentell gezeigt (vgl. Kap. 4), zur unkontrollierten Aggregation neigt. Ein co-translatinaler Assemblierungsmechanismus, ein weit verbreitetes Phänomen in Hefen (Duncan and Mata (2011)), ist zur Gewährleistung der frühen Bildung einer Pseudoeinzelkette denkbar, bei dem die fertig translatierte  $\beta$ -Kette auf die naszierende  $\alpha$ -Kette zugreift. Experimentell wäre zur Aufklärung einer co-translationalen Interaktion von  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette die Isolierung von pausierenden Ribosomen an N-terminalen Fragmenten

naszierender  $\alpha$ -Kette weiterführend. Signalsequenzen, in *E. coli* z.B. SecM (*Secretion Monitoring Protein*), können Ribosomen bis auf weiteres anhalten und gewährleisten dabei deren Aufreinigung in Komplexen mit der naszierenden Peptidkette und deren Wechselwirkungspartner zur späteren Charakterisierung (Rutkowska *et al.* (2009)).

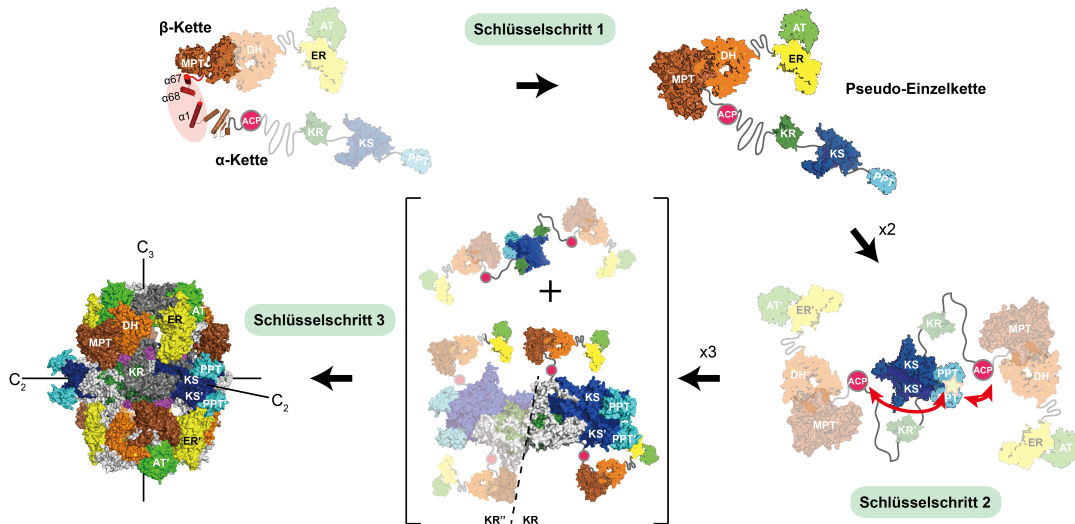


Abb. 6.1: Postuliertes Modell zur Assemblierung der Fettsäuresynthase aus *S. cerevisiae*. Unterschiedliche Domänen oder deren Formationen sind aus der Kristallstruktur der ScFAS (PDB-Code: 3hmj) entnommen und in teilweise abstrahierter Oberflächenrepräsentation dargestellt. Die Domäneneinfärbung entspricht dem Standardschema wie in Abbildungen zuvor, Interdomänen-Abschnitte sind in grau gehalten. Einzelne Domänen oder Strukturen sind blass gehalten, um den Fokus auf den essentiellen Schlüsselschritten zu halten oder im Fall der KR'-KR-Interaktion die dimerisierten Struktureinheiten zu unterscheiden. Symmetrieachsen  $C_2$  und  $C_3$  im fertigen Komplex sind eingezeichnet.

## 6.2 $\beta$ - $\alpha$ -Schnittstellenmotive als potentielles Ziel zum Ausschalten der fFAS-Assemblierung

In den fFAS der medizinisch besonders relevanten human-pathogenen Pilze der Gattungen *Cryptococcus* (*Tremellomyces*-Typ) sowie *Aspergillus* und *Candida* (*Ascomycota*-Typ) werden die komplementären Polypeptidketten  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette durch Interaktion im 4-helikalen Bündel bzw. der MPT-Domäne zur Pseudo-einzelkette verknüpft. Beide Motive konnten in dieser Arbeit als sensible Schnittstellen festgestellt werden, deren Unversehrtheit essentiell für die Assemblierung ist. In der ScFAS, und damit ebenso repräsentativ für den gesamten *Ascomycota*-Typ, sind nicht weniger als zwei Punktmutationen nötig, um ihre Assemblierung und damit die Überlebensfähigkeit ihres Organismus ohne ausreichende Fettsäuresupplementierung komplett auszuschalten. Die N-terminale Hälfte von  $\alpha 1$ , die in dieser Arbeit als für die Assemblierung essentielle Expansion bzgl. der enzymatischen Kerndomäne

charakterisiert wurde, ist von zahlreichen polaren Seitenketten geprägt. Sie könnten die korrekte Koordination von  $\alpha 1$  in der Schnittstelle verantworten, wovon K2 und E8 essentiell sind. Die C-terminale Hälfte von  $\alpha 1$  sorgt durch einen hohen Lysin-Anteil für hohe energetische Beiträge zur Interaktion aus der Absättigung hydrophober Oberflächen (siehe Abb. 6.2 A). Ein Inhibitor, der ein ausreichendes Wechselwirkungsmuster imitieren kann, könnte am C-Terminus der  $\beta$ -Kette binden und so die  $\beta$ - $\alpha$ -Kupplung als ersten und unumgehbaren Assemblierungsschritt verhindern (siehe Abb. 6.2 B). Eine weiterführende Analyse dieser Schnittstelle mit erweiterten Punktmutationen insbesondere bzgl. komplementärer Aminosäuren auf der  $\beta$ -Kette ist zum tiefgehenden Verständnis der molekularen Wechselwirkungen nötig und liefert wertvolle Informationen für ein rationales Inhibitor-Design.

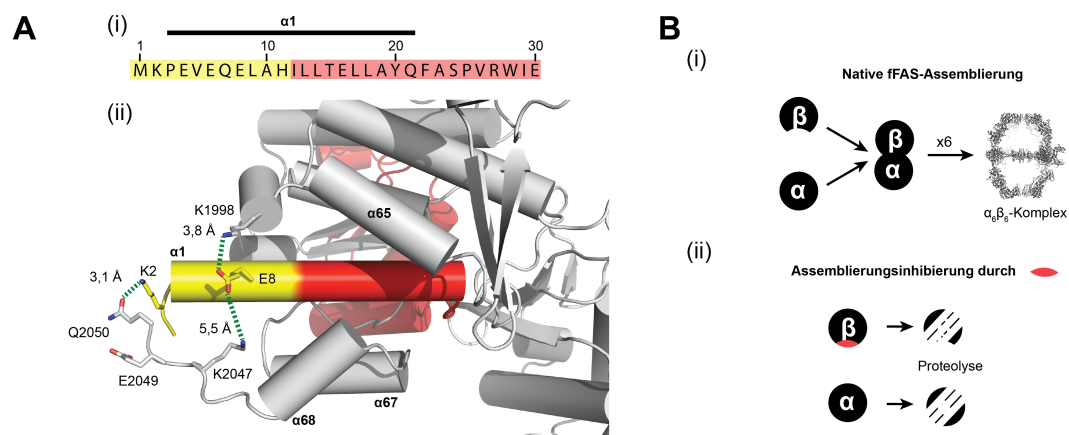


Abb. 6.2: Assemblierungs-Inhibierung der ScFAS. **A** (i) Proteinsequenz eines N-terminalen Abschnitts der ScFAS- $\alpha$ -Kette und (ii) Ausschnitt aus Kristallstruktur der ScFAS (PDB-Code: 3hmj) in *Cartoon*-Repräsentation mit C-terminalem Abschnitt der  $\beta$ -Kette in grau und N-terminalem Abschnitt der  $\alpha$ -Kette in gelb (M1-H11) und rot (I12-P94). Für die Assemblierung wichtige Aminosäurereste K2 und E8 auf  $\alpha 1$  sind eingezeichnet sowie ihre polaren Wechselwirkungen zu Aminosäureresten der  $\beta$ -Kette durch grün gestrichelte Linien unter Angabe der Abstände in der Kristallstruktur. **B** Konzept eines möglichen Wirkprinzips von Assemblierungs-Inhibitoren in schematischer Darstellung und generell auf heterododecamere fFAS übertragbar.

Das 4-helikale Bündel als Schnittstelle im *Tremellomyces-Typ* konnte in dieser Arbeit noch nicht bis auf einzelne Aminosäurepositionen charakterisiert werden. Hier zeigt sich jedoch bereits durch die Assemblierungsinhibierung bei intramolekularer struktureller Absättigung des Bündels hohes Potential zu einer Inhibierung durch Bindung kompetitiver Wechselwirkungspartner.

Weiterführende Experimente sollten für fFAS des *Ascomycota*- sowie *Tremellomyces-Typs* die intermolekulare Bindung mit separaten Peptiden gezielter untersuchen, da den Experimenten in dieser Arbeit hierzu konkrete Betrachtungen von Expressionsniveaus und Peptidstabilitäten fehlen. Eine Reduzierung des untersuchten Systems auf die wesentliche Schnittstelle durch separate Präparation der bindungsbeteilig-



ten Motive, evtl. fusioniert an stabile und lösliche Trägerproteine, und Analysen *in-vitro* wären hier sinnvoll, dies bedarf aber zunächst der Entwicklungsarbeit zur erfolgreichen Expression von den entsprechenden Substrukturen. Der in dieser Arbeit eingeführte *split*-GFP-Test wäre sodann ein geeignetes Werkzeug zur Untersuchung der Wechselwirkungen. Dieser bietet auf dem aktuellen Status durch Entwicklung optimaler Linker-Sequenzen für die Proteinfusion, veränderter Orientierung der GFP-Untereinheiten und Variation der spektralen Eigenschaften Potential zur Verbesserung seiner Sensitivität. Auch andere Reporter, wie *split*-Luciferase (Luker *et al.* (2004); Paulmurugan and Gambhir (2007)) wären denkbar.

In weiteren Schritten wären Inhibitor- bzw. Bindungsstudien mit rational entworfenen Helixmimetika (Pelay-Gimeno *et al.* (2015)) oder im Hochdurchsatz mit Bibliotheken kleiner Moleküle (z.B. Prestwick Chemical Library<sup>1</sup>) möglich. Ein Computer-gestütztes Auffinden von Leitstrukturen potentieller Inhibitoren aus den strukturbasierten Erkenntnissen kann hierfür sinnvoll sein.

---

<sup>1</sup>Prestwick Chemical, France, <http://www.prestwickchemical.com>



## A Anhang Materialien

Tab. A.1: Restriktionsenzyme und Polymerasen

Sonstige Enzyme	
Zymolyase <sup>®</sup> 20T Rnase A DNase I	AMS Biotechnology Ltd., UK AppliChem GmbH, Deutschland AppliChem GmbH, Deutschland
Restriktionsenzyme	
Dpn-I BamH-I xho-I Sac-I Sal-I Nde-I	New England Biolabs, USA
DNA-Polymerasen	
Phusion High Fidelity DNA-Polymerase Taq DNA-Polymerase Q5 High Fidelity DNA-Polymerase Q5 Hot Start High Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs, USA

Tab. A.2: Chemikalien

Chemikalie	Lieferant
Feinchemikalien	
1,4-Dithiothreitol ( $\geq 99\%$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
5-Fluororotsäure ( $\geq 98\%$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Aceton (99,5%)	Bernd Kraft GmbH, Deutschland
Acetonitril (Chromanorm)	VWR Chemicals, USA
Agarose (BioReagent, for molecular biology, low EEO)	Sigma Aldrich Co. LLC., USA
Ammoniumacetat	Merck KGaA, Deutschland
Ampicillin (Natriumsalz) ( $\geq 97\%$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Bicin (99%)	Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (BIS-TRIS) ( $\geq 98\%$ )	Sigma Aldrich Co. LLC., USA
Borsäure (p.a.)	Merck KGaA, Deutschland
D-Desthiobiotin	IBA GmbH, Germany
D-Glucose*H <sub>2</sub> O ( $\geq 99,5\%$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Dimethylmaleinsäureanhydrid (97%)	Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Dimethylsulfoxid (100%)	New England Biolabs, USA
D-Sorbitol (98%)	Sigma Aldrich Co. LLC., USA
Ethanol (96%)	VWR Chemicals, USA
Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA) (Titriplex® III)	Merck KGaA, Deutschland
Geneticin*2H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (98%) (G418)	Sigma Aldrich Co. LLC., USA
Glycerin (86%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Isoheptadecanoyl-CoA (Lithiumsalz) ( $\geq 90\%$ )	Sigma Aldrich Co. LLC., USA

Chemikalie	Lieferant
L-Histidin (≥99%)	Sigma Aldrich Co. LLC., USA
LiOAc*2H <sub>2</sub> O	Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
L-Leucin (≥98%)	Sigma Aldrich Co. LLC., USA
Methanol (Chromanorm)	VWR Chemicals, USA
Myristinsäure (≥99%)	Sigma Aldrich Co. LLC., USA
NaCl (99%)	VWR Chemicals, USA
NADPH (Tetranatriumsalz) (≥97%)	Sigma Aldrich Co. LLC., USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	VWR Chemicals, USA
Na <sub>2</sub> H(PO <sub>4</sub> ) (≥99,5%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
NaH <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) · H <sub>2</sub> O (p.a.)	Merck KGaA, Deutschland
Natriumhydroxid	AppliChem GmbH, Deutschland
Palmitinsäure (≥99%)	Sigma Aldrich Co. LLC., USA
PEG (1.500)	Sigma Aldrich Co. LLC., USA
Salzsäure (37% in H <sub>2</sub> O)	VWR Chemicals, USA
Stearinsäure (Grade I, ≥98.5% (capillary GC))	Sigma Aldrich Co. LLC., USA
Tergitol® solution Tergitol, Type NP-40, 70% in Wasser	Sigma Aldrich Co. LLC., USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) (99,9%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Uracil (≥99,0%)	Sigma Aldrich Co. LLC., USA
Sonstige Reagenzien und Zubereitungen	
10x Native Anode Buffer for BN/CN	SERVA Electrophoresis GmbH, Deutschland
10x Native Cathode Buffer for BN/CN	SERVA Electrophoresis GmbH, Deutschland
2x Sample Buffer Blue Native	SERVA Electrophoresis GmbH, Deutschland

Chemikalie	Lieferant
Agar-Agar: Bacto™ Agar	Becton, Dickinson and Company, USA
Agarosegelelektrophorese DNA-Marker (1 kb DNA Ladder)	New England Biolabs, USA
Agarosegelelektrophorese DNA-Marker (100 bp DNA Ladder)	New England Biolabs, USA
Agarosegelelektrophorese-Probenpuffer (Gel Loading Dye, Purple)	New England Biolabs, USA
Blue G250 Coomassie®-Lösung (1%)	SERVA Electrophoresis GmbH, Deutschland
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Deoxyribonucleic acid, single stranded from salmon testes	Sigma Aldrich Co. LLC., USA
Hefeextrakt: Bacto™ Yeast Extract	Becton, Dickinson and Company, USA
iBlock™ (Casein-Zubereitung)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
InstantBlue Coomassie®-Fertiglösung	Expedeon Ltd., UK
Lämmli-Probenpuffer	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
LB-Agar (Lennox), granuliert	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Native PAGE-Proteinmarker (SERVA Native Marker Liquid Mix for BN/CN)	SERVA Electrophoresis GmbH, Deutschland
NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Pepton: Bacto™ Peptone	Becton, Dickinson and Company, USA
Roti®-GelStain	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Roti®-Lumin (Chemolumineszenz-Substrat)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung	Carl Roth GmbH & Co. KG
SDS PAGE-Proteinmarker (Novex® Sharp unstained Protein Standard)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids	Sigma Aldrich Co. LLC., USA
Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements (without histidin, leucin, tryptophan, uracil)	Sigma Aldrich Co. LLC., USA

Tab. A.3: Synthetische Oligonukleotide / Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
FAS1-GR1	GGCAGTGAGCGCGGTAATACGACTCACTATAGGGGAAACTATGCGGTCTCGTCCTC
FAS1-GR2	CCACAATTCTGTAGTCTCGCTTCGCTAATCATCAAGGTC
FAS1-A1	GTGCCCTTCCCAATCACCG
FAS1-A4	ACCCAACCTCTGGGTGAGAG
FAS2-A1	TGTTGGTTGATTGTATTCCGC
FAS2-A6	CGGCATCGAGGATGCTGG
fas12pRS for	TAGAACTAGTGGATCCTGCGGTC
fas12pRS rev	CGGGCCCCCCTCGAGC
K1-A	GGATGTATGGGCTAAATGTACG
K2	GTTTCATTTGATGCTCGATGAG
FAS2-GR1	GACCTTGATGATTAGCGAAGCCAGGACTACAGAAATTGTGG
FAS2-GR2	CAAAGCGGCAATTAACCCCTCACTAAAGGGAACA AAAGCTGAGAGCTGCTACGCGGACTTC
FAS2pRS for	TAGAACTAGTGGATCCTTCTATCCGAAC
FAS2pRS rev	CCCCCTCGAGGTCGACC
MF153_C3_fas2*_for	GTTGATAGAGAGGTTGTTAGTGAAGCTATC
MF153_C3_fas2*_rev	CATAATGATGGTATTTCAATTGGTGTGCTGTAGC
MF223_C8_fas1*_for	TTGTTAGCTTATTAGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAG
MF223_C8_fas1*_rev	AAAAGCTGGGTACCCTAATAAGCTAACAAATTCAGTTAGCAAAAATATGAGC
MF223_C8_fas1*_for	TTGTTAGCTTATTAGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAG
MF223_C8_fas1*_rev	AAAAGCTGGGTACCCTAATAAGCTAACAAATTCAGTTAGCAAAAATATGAGC
MF315_313fas12 FOR	TAAGAAAATAGCTCGAAGAGAGCAGCTACGTTAGTCCCTC
MF315_313fas12 REV	CGGGCCCCCCTCGAAGAGCTGCTACGCGGACTTC

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
MF315 315fas2* FOR	TAAGAAAATAGGTCGAAAGAGAGACACTACGTAGTCCCTC
MF315 315fas2* lin FOR	TCGACCCTCGAGGGGG
MF315 315fas2* lin REV	TCGACCCTATTCTTAGTAGAAACGG
MF315 315fas2* REV	CCCCCTCGAGGTCGAAGAGCTGCTACGCGGACTTC
MF316 313_C3 FOR	GAAAAACTAGCTCGATTCTTAAAGTGATTATATAACCG
MF316 313fas1* REV	CGGGCCCCCTCGACTTCGCTAATCATCAAGGTC
MF316 315 C6 Term FOR	CCATTCCAGGTTTAATTTCTTAAAGTGATTATATAACCG
MF316 315 C6/C8 Term REV	ACAAAAGCTGGGTACCTTCGCTAATCATCAAGGTC
MF316 315 C8 Term FOR	TTGTTAGCTTATTAGTTTCTTAAAGTGATTATATAACCG
MF316 PRS315 C6 lin REV	TTAAAACCTGGAATGGTTTTGCGAG
MF316 PRS315 C6/C8 lin FOR	GTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAG
MF316 PRS315 C8 lin REV	CTAATAAGCTAACAAATTCAGTTAGCAAATATG
MF316 PRS315FAS1 lin FOR	TAAGTCGACCTCGAGGGG
MF316 PRS315FAS1 lin REV	CCAGTTGTCGATGATTTCCCTTGATAG
MF316 PRS315FAS1 Term FOR	ATCATCGACAACCTGGGAAAAG
MF316 PRS315FAS1Term REV	CTCGAGGTCGACTTACTTCGCTAATCATCAAGGTCATC
MF316 PRS315FAS1Term REV	CTCGAGGTCGACTTACTTCGCTAATCATCAAGGTCATC
MF351 C4fas1* FOR	CCAGATCCATAGCTCGTTTCTTAAAGTGATTATATAACCG
MF351 C4fas1* REV	GAGCTATGGATCTGGGGGTATAATAAATCTCTTTG
MF379 fas2* C10 FOR	TGAAATACCATCATTATGAAGCCTACCCGGTCCAAAAAC
MF379 fas2* C10 REV	AATGATGGTATTTC AATTGGTGTTG
MF390 C11 α FOR	CAAGGTGAATTGAAACCAAC
MF390 C11 β REV	TCACTTAAAGAAATTAAACACAGGTTCTGAAAGAGTGAC



Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
MF390 C11/12/13 $\alpha$ REV	GGATCCACTAGTTCAGAGCG
MF390 C11/C12/C13a Prom FOR	AGAACTAGTGGATCCTTCTATC
MF390 C11/C12/C13b FOR	TAATTTCTTAAGTGATTATATAACCG
MF390 C11a Prom REV	TTTCAATTACCTTGCATAATGATGGFATTTCAATTG
MF390 C13 $\alpha$ FOR	GAGACAGAAACCAAGAATTAAAG
MF390 C13 $\beta$ REV	TCACHTTAAGAAATTACATAAACTTCAGAGATGGAGC
MF390 C13a Prom REV	TTGGTTTCTGTCCCTCCATAATGATGGTATTTCAATTG
MF395 C14 FOR	CATCAATTATGTCTTCCTGGAACTGGGGCTAAAC
MF395 C14 REV	GAAGACATAATGATGGTATTTCAATTGGTGTTG
MF515 E8R antisense	CACAGGAGAGGCCAAATTGATAAGCTAACAAATTCAGTTAGCAAATAATGAGCTAAATCTTTG CTCAACTTCGGGCTTCATAATGATGGTATTTCA
MF515 E8R sense	TGAAATACCATCATATATGAAGCCGGAAGTTGAGCAAAGATTAGCTCATATTTTGCTAACT GAATTGTTAGCTTATCAATTTGCCCTCCTCCTGTG
MF515 K2S antisense	CACAGGAGAGGCCAAATTGATAAGCTAACAAATTCAGTTAGCAAATAATGAGCTAAATCTTTG CTCAACTTCGGGGACATAATGATGGTATTTCA
MF515 K2S sense	TGAAATACCATCATATATGTCCCCGGAAAGTTGAGCAAAGAATTAGCTCATATTTTGCTAACT GAATTGTTAGCTTATCAATTTGCCCTCCTCCTGTG
MF515 K2S/E8R antisense	CACAGGAGAGGCCAAATTGATAAGCTAACAAATTCAGTTAGCAAATAATGAGCTAAATCTTTG CTCAACTTCGGGGACATAATGATGGTATTTCA
MF515 K2S/E8R sense	TGAAATACCATCATATATGTCCCCGGAAAGTTGAGCAAAGAATTAGCTCATATTTTGCTAACT GAATTGTTAGCTTATCAATTTGCCCTCCTCCTGTG
MF520 FOR	TTTGCCCTCCTGTGAGATGG
MF520 REV	AATGATGGTATTTCAATTGGTGTTGC

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
MF545 E6V antisense	CACAGGAGAGGCAAATTTGATAAGCTAACAAATTCAGTTAGCAAAAATATGAGCTAATTCCTTG AACAACTTCCGGCTTCATAATGATGGTATTTCA
MF545 E6V sense	TGAAATACCATCATATGAAAGCCGGAAGTTGTTCAAGAATTAGCTCATATTTTGCTAACT GAATTTAGCTTATCAATTTGCCCTCTCCCTGTG
MF545 E6V / E8R antisense	CACAGGAGAGGCAAATTTGATAAGCTAACAAATTCAGTTAGCAAAAATATGAGCTAATTCCTTTG AACAACTTCCGGCTTCATAATGATGGTATTTCA
MF545 E6V / E8R sense	TGAAATACCATCATATGAAAGCCGGAAGTTGTTCAAGAATTAGCTCATATTTTGCTAACT GAATTTAGCTTATCAATTTGCCCTCTCCCTGTG
MF545 E6V / H11A antisense	CACAGGAGAGGCAAATTTGATAAGCTAACAAATTCAGTTAGCAAAAATAGCAGCTAATTCCTTG AACAACTTCCGGCTTCATAATGATGGTATTTCA
MF545 E6V / H11A sense	TGAAATACCATCATATGAAAGCCGGAAGTTGTTCAAGAATTAGCTGCTATTTTGCTAACT GAATTTAGCTTATCAATTTGCCCTCTCCCTGTG
MF545 E8R / H11A antisense	CACAGGAGAGGCAAATTTGATAAGCTAACAAATTCAGTTAGCAAAAATAGCAGCTAATTCCTTTG CTCAACTTCCGGCTTCATAATGATGGTATTTCA
MF545 E8R / H11A sense	TGAAATACCATCATATGAAAGCCGGAAGTTGAGCAAAGATTAGCTGCTATTTTGCTAACT GAATTTAGCTTATCAATTTGCCCTCTCCCTGTG
MF545 H11A antisense	CACAGGAGAGGCAAATTTGATAAGCTAACAAATTCAGTTAGCAAAAATAGCAGCTAATTCCTTG CTCAACTTCCGGCTTCATAATGATGGTATTTCA
MF545 H11A sense	TGAAATACCATCATATGAAAGCCGGAAGTTGAGCAAAGATTAGCTGCTATTTTGCTAACT GAATTTAGCTTATCAATTTGCCCTCTCCCTGTG
MF545 K2S / E6V antisense	CACAGGAGAGGCAAATTTGATAAGCTAACAAATTCAGTTAGCAAAAATATGAGCTAATTCCTTG AACAACTTCCGGGGACATAATGATGGTATTTCA

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
MF545 K2S/E6V sense	TGAAATACCATCATATATGTCCCCGGAAAGTTGTTCAAGAATTAGCTCATATTTTGCTAACT GAATTGTTAGCTTATCAATTTGCCTCTCCCTGTG
MF545 K2S/H11A antisense	CACAGGAGAGGCAAATTTGATAAGCTAACAAATTCAGTTAGCAAAATAGCAGCTAATTCTTTG CTCAACTTCCGGGACATAATGATGGTATTTCA
MF545 K2S/H11A sense	TGAAATACCATCATATATGTCCCCGGAAAGTTGAGCAAGAATTAGCTGCTAATTTTGCTAACT GAATTGTTAGCTTATCAATTTGCCTCTCCCTGTG
MF551 FOR	TTGTTAGCTTATCAATTTGCCTCTCCCTGTG
MF551 REV	TTCCCAGTTGTCGATGATTTCCCTTG
MF566 fas12 E8R antisense	TTGATAAGCTAACAAATTCAGTTAGCAAAATATGAGCTAATCTTTGCTCAACTTCCGGGGCT GCCCATTCATCCTTTTCCCAGTTGTCGAT
MF566 fas12 E8R sense	ATCGACAACCTGGGAAAAGGATGAATGGGGCAGCCCGGAAGTTGAGCAAAAGATTAGCTCAT ATTTTGCTAACTGAATTTGTTAGCTTATCAA
MF571 ACP Lin FOR	GGTGATTTAGGTAAGAATTTGG
MF571 ACP Lin REV	TTTGATTTGCTTTGGACATTTG
MF571 synth DNA antisense	TTTACCCTAAATCACCCCAAATTTCAATTTTGGACTGTAGCTTTACCACCGACCAAGTCTTT GATTGTCTTGGAA
MF571 synth DNA sense	TCCAAGACAATCAAAGACTTGGTCCGGTGGTAAAGCTACAGTCCAAAATGAAAATTTTGGGT GATTTAGGTAAA
MF631 FAS1 lin FOR	TGATCACTCTCGGCATGGACG
MF631 FAS1 lin REV	ACCACCGGATTTGTTCACTTTTCC
MF631 Strep FOR	GAACAATCCGGTGGTAGCGCTTGGAGCCATCC
MF631 Strep REV	TGCCGAGAGTGATCATTTTTCGAACTGCCGGGTGG
mfs342_pRSfas1_iF_for	TAGAACTAGTGGATCCTGCGGTCTCGTCTCTACGGAATATG

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
mfs342_pRsfas2_iF_for	TAGAACTAGTGGATCCCTTCTATTCTATCCGAACCTCCCCTTTTG
mfs381_C2_fas12_for	CCATCTACCCTTTTAAATGACCCACCAAGATACAGATCTAACGCCCTAGCTCGAGGGGGGG CCCGGTAC
mfs381_C2_fas12_rev	GGCGTTAGATCTGTATCTTGGTGGTCAATTAACCGGTAGATGGTTTCAAGACACCATG AATTATCTCAAAGTATAATG
mfs381_C2_fas2*_for	ATGGCTGCTGAAGGTATGGACAAAGAATCTATCGTTAGAAAGAGAGGTTGTTAGTGAAGCT ATCAATATC
mfs381_C2_fas2*_rev	CTCTCTTCTAACGATAGATTCTTTTGTCCATACCTTCAGCAGCCATAATGATGGTATTTC ATTGGTGTGTGCTAGC
mfs381_C3_fas12_for	ATAATTCATGGTGTCTTGAAAAAACTAGCTCGAGGGGGGGCCCCGGTAC
mfs381_C3_fas12_rev	GGCCCCCCTCGAGCTAGTTTTCAAAGACACCATGAATTATCTCAAAGTATAATG
mfs381_C6_fas1*_for	TTGACTGCAAAACCATTCCAGGTTTAAGTCGACCTCGAGGGGGGCC
mfs381_C6_fas1*_rev	CCCCCTCGAGGTCGACTTAAACCTGGAATGGTTTTCGACGTCAAAGTTTGG
mfs381_C7_fas2*_for	CCAAATTGAAAATACCATCATTATGATTTTGGCTAACTGAATTGTTAGCTTATCAATTGGCC
mfs381_C7_fas2*_rev	TAACAATTCAGTTAGCAAAATCATAATGATGGTATTTCAAAATTGGTGTGCTG
MF378 CX FOR	GGTGTCTTGAAAAAACTAGCTCGAAGAGAGACTACG
MF378 CX REV	GTTTTTCAAGACACCATGAATTATC
MF488 a1 sense	TAGAACTAGTGGATCATGAAGCCGGAAGTTGAGCAAGAATTAGCTCATATTTTGCTA ACTGAATTGTTAGCTTATTAATCGAGTCATGTAATT
MF488 a1 antisense	AATTACATGACTCGATTATAAAGCTAACAAATTCAGTTAGCAAAATATGAGCTAATTC TTGCTCAACTCCGGCTTCATGATCCACTAGTTCTA
MF518 Cx FOR	TAGAACTAGTGGATCATGAAGCCGGAAGTTGAG
MF518 Cx REV	AATTACATGACTCGACTAGTGTCTCTTTCGAGC

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
MF488 helix clamp FOR	TAGA A C T A G T G G A T C A T G T T C C A T T C C A C C T A C T T G A T G
MF488 helix clamp REV	A A T T A C A T G A C T C G A T T A G G A T T G T T C A T A C T T T T C C C
MF488 Cheo helix sense	T A G A A C T A G T G G A T C A T G G A T T C T T C C T G G A A C T G G G C T A A A C A A T C T T T T A T T A T C A T T A T A C T T T G A G A T A A T T C A T T A A T C G A G T C A T G T A A T T
MF488 Cheo helix antisense	A A T T A C A T G A C T C G A T T A A T G A A T T A T C T C A A A G T A T A A T G A T A A T A A A G A T T G T T T A G C C C A G T T C C A G G A A G A A T C C A T G A T C C A C T A G T T C T A
MF569 MPT FOR	T A G A A C T A G T G G A T C A T G G T T A C T A C C T T C G T T T T C A C T G G
MF569 MPT REV	A A T T A C A T G A C T C G A T T A G G A T T G T T C A T A C T T T T C C C
MF488 a-Rest FOR	T A G A A C T A G T G G A T C A T G A A G C C G G A A G T T G A G
MF488 a-Rest REV	A A T T A C A T G A C T C G A T G G A T C T G G G G T A T A A T A A A T C
MF628b FOR	T A G A A C T A G T G G A T C A T G C A G G T T A C T A A G G A A T A T T T C C A G G A C
MF628 a/b REV	A A T T A C A T G A C T C G A T C A G G C A A A T T G A T A A G C T A A C A A T T C A G
MF628a FOR	T A G A A C T A G T G G A T C A T G C A T T C C A C C T A C T T G A T G A T G A A T G G
MF417 FAS2_in FOR	A A G C C G G A A G T T G A G C A A G
MF417 FAS2_in REV	C A T A A T G A T G G T A T T T C A A T T G G T G
MF417 FAS1_in FOR	T A A T T T C T T A A G T G A T T A T A T A A C C G
MF417 FAS1_in REV	G G A T T G T T C A T A C T T T T C C C
MF417 (2) GFP-FAS2 FOR	A A T A C C A T C A T T A T G T G A G C A A G G G C G A G G A G C T G
MF417 (2) GFP-FAS2 REV	C T C A A C T T C C G G C T T A C C A G A A C C A C C A C C A C C C T C G A C G T T G T G G C G G A T C
MF417 (2) FAS1 GFP FOR	A A G T A T G A A C A A T C C G G T G T T C T G G T G G T T C T G G T G A C G G C A C G G T G C A G C T C
MF417 (2) FAS1 GFP REV	T C A C T T A A G A A A T T A C T T G T A C A G C T C G T C C A T G C C G

Tab. A.4: Plasmide.

Primäre Plasmidinformationen			Plasmid-Ursprung					
Plasmid	Vektor	Gen	P	T	Primer/Enzyme zur Vektor-linearisierung	Templat zur Vektor-linearisierung	Primer/Enzyme zur Amplifizierung des Insertionsfragments	Templat zur Amplifizierung des Insertionsfragments
Generation 1								
Mgfas360_M_5	pRS315	<i>FAS1</i>	<i>FAS1</i>	-			Sequenz siehe Daten-CD	
Mgfas360_M_12	pRS315	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	-			Sequenz siehe Daten-CD	
VR749_3_4	pRS314	textit <i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	-			Sequenz siehe Daten-CD	
VR788_1_1	pRS314	<i>fas1-fas2</i>	<i>FAS1</i>	-			Sequenz siehe Daten-CD	
VR788_2_1	pRS315	<i>fas1-fas2</i>	<i>FAS1</i>	-			Sequenz siehe Daten-CD	
pMF002	pRS313	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	-	<i>BamH-I + Sal-I</i>	<i>pRS313</i>	FAS2pRS for + FAS2pRS rev	VR749_3_4
pMF003	pRS313	<i>fas1-fas2</i>	<i>FAS1</i>	-	<i>BamH-I + xho-I</i>	pRS313	fas12pRS for + fas12pRS rev	VR788_1_1
pMF004	pRS315	<i>fas2<sup>Tre</sup></i>	<i>FAS2</i>	-	MF153_C3_fas2* _for + MF153 _C3_fas2*_rev	Mgfas360_M_12	-	-

Primäre Plasmidinformationen				Plasmid-Ursprung				
Plasmid	Vektor	Gen	P	T	Primer/Enzyme zur Vektor-linearisierung	Templat zur Vektor-linearisierung	Primer/Enzyme zur Amplifizierung des Insertionsfragments	Templat zur Amplifizierung des Insertionsfragments
pMF005	pRS313	<i>fas1<sup>Tre</sup></i>	<i>FAS1</i>	-	mfs381_C3_fas12_for + mfs381_C3_fas12_rev	pMF003	-	-
pMF006	pRS315	<i>fas2<sup>Tre</sup></i>	<i>FAS2</i>	-	mfs381_C2_fas2*_for + mfs381_C2_fas2*_rev	Mgfas360_M_12	-	-
pMF007	pRS313	<i>fas1<sup>Tre</sup></i>	<i>FAS1</i>	-	mfs381_C2 + _fas12_for mfs381_C2_fas12_rev	pMF003	-	-
pMF008	pRS313	<i>fas2_Δ<sub>α1(2-11)</sub></i>	<i>FAS2</i>	-	mfs381_C7_fas2*_for + mfs381_C7_fas2*_rev	pMF002	-	-
pMF009	pRS315	<i>fas1_Δ<sub>α67/68</sub></i>	<i>FAS1</i>	-	mfs381_C6_fas1*_for + mfs381_C6_fas1*_rev	Mgfas360_M_5	-	-
pMF010	pRS315	<i>fas1-α1</i>	<i>FAS1</i>	-	MF223_C8_fas1*_for + MF223_C8_fas1*_rev	VR788_2_1	-	-

Primäre Plasmidinformationen				Plasmid-Ursprung				
Plasmid	Vektor	Gen	P	T	Primer/Enzyme zur Vektor-linearisierung	Templat zur Vektor-linearisierung	Primer/Enzyme zur Amplifizierung des Insertionsfragments	Templat zur Amplifizierung des Insertionsfragments
Generation 2								
pMF001	pRS416	<i>FAS1</i> & <i>FAS2</i>	<i>FAS1</i> & <i>FAS2</i>	<i>FAS1</i> & <i>FAS2</i>	Sac-I, xho-I	pRS416	FAS1-GR1 + FAS1-GR2, FAS2-GR1 + FAS2-GR2	Chromosomale DNA aus BY4742
pMF011	pRS313	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	xho-I	pMF002	MF315 313fas12 FOR + MF315 313fas12 REV	pMF001
pMF012	pRS315	<i>FAS1</i>	<i>FAS1</i>	<i>FAS1</i>	MF316 PRS315FAS1 lin FOR + MF316 MF316 PRS315 FAS1 lin REV	Mgfas360_M_5	MF316 PRS315FAS1 Term FOR + MF316 MF316 PRS315 FAS1 Term REV	pMF001
pMF013	pRS315	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	MF315 315fas2* lin FOR + MF315 315fas2* lin REV	Mgfas360_M_12	MF315 315fas2 *FOR + MF315 315fas2*REV	pMF001
pMF014	pRS315	<i>FAS1</i> - <i>TST</i>	<i>FAS1</i>	<i>FAS1</i>	MF631 FAS1 lin FOR + MF631 FAS1 lin REV	pMF012	MF631Strep FOR + MF631 Strep REV	pET22b_ TST-PksA-H8 (VR641_1_3)
pMF015	pRS313	<i>fas2</i> _S180A	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	MF571 ACP Lin FOR + MF571 ACP Lin REV	pMF011	MF571 synth DNA sense + MF571 synth DNA antisense	← synth. DNA
pMF016	pRS313	<i>fas1</i> - <i>fas2</i>	<i>FAS1</i>	<i>FAS2</i>	xho-I	pMF003	MF315 313fas12 FOR + MF315 313fas12 REV	pMF001



Primäre Plasmidinformationen				Plasmid-Ursprung				
Plasmid	Vektor	Gen	P	T	Primer/Enzyme zur Vektor-linearisierung	Templat zur Vektor-linearisierung	Primer/Enzyme zur Amplifizierung des Insertionsfragments	Templat zur Amplifizierung des Insertionsfragments
pMF017	pRS313	<i>fas1<sup>Trc</sup></i>	<i>FAS1</i>	<i>FAS1</i>	xho-I	pMF005	MF316 313_C3 FOR + MF316 313fas1*REV	pMF001
pMF018	pRS315	<i>fas2<sup>Trc</sup></i>	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	MF315 315fas2* lin FOR + MF315 315 fas2*lin REV	pMF004	MF315 315fas2 *FOR + MF315 315fas2*REV	pMF001
pMF019	pRS315	<i>fas1<sup>Puc</sup></i>	<i>FAS1</i>	<i>FAS1</i>	MF390 C11/C12/ MF390 C13b FOR + C11 β REV	pMF012	-	-
pMF020	pRS313	<i>fas2<sup>Puc</sup></i>	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	MF390 C11 α FOR + MF390 C11/12/13 α REV	pMF016	MF390 C11/C12/C13a Prom FOR + MF390 C11a Prom REV	pMF011
pMF021	pRS315	<i>fas1_Δ</i> α67/68	<i>FAS1</i>	<i>FAS1</i>	MF316 PRS315 C6/C8 lin FOR + MF316 PRS315 C6 lin REV	pMF009	MF316 315 C6 Term FOR + MF316 315 6/C8 Term REV	pMF001
pMF022	pRS313	<i>fas2_Δ</i> α1(2-11)	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	xho-I	pMF008	MF315 313fas12 FOR + MF315 313fas12 REV	pMF001
pMF023	pRS315	<i>fas2<sup>Trc</sup></i> Δα10-12	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	MF379 fas2*C10 FOR + MF379 fas2* C10 REV	pMF018	-	-

Primäre Plasmidinformationen				Plasmid-Ursprung				
Plasmid	Vektor	Gen	P	T	Primer/Enzyme zur Vektor-linearisierung	Templat zur Vektor-linearisierung	Primer/Enzyme zur Amplifizierung des Insertionsfragments	Templat zur Amplifizierung des Insertionsfragments
pMF024	pRS313	<i>fas2<sup>Puc</sup></i> $\Delta\beta_{34-37}$	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	MF390 C13 $\alpha$ FOR + MF390 C11/12/13 $\alpha$ REV	pMF016	MF390 C11/ C12/C13a Prom REV	pMF001
pMF025	pRS315	<i>fas1<sup>Puc</sup></i> $\beta_{34-37}$	<i>FAS1</i>	<i>FAS1</i>	MF390 C11/C12/C13b FOR + MF390 C13 $\beta$ REV	pMF012	-	-
pMF026	pRS315	<i>fas1-<math>\alpha</math>1</i>	<i>FAS1</i>	<i>FAS1</i>	MF316 PRS315 C6/C8 lin FOR + MF316 PRS315 C8 lin REV	pMF010	MF316 315 C8 Term FOR + MF316 315 C6/C8 Term REV	pMF001
pMF027	pRS313	<i>fas1-full</i> _MPT	<i>FAS1</i>	<i>FAS2</i>	MF351 C4fas1* FOR + MF351 C4fas1* REV	pMF016	-	-
pMF028	pRS315	$\alpha$ 9- <i>fas2<sup>Tr</sup></i>	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	MF395 C14 FOR + MF395 C14 REV	pMF013	-	-
pMF029	pRS313	<i>fas2_K2S</i>	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	MF520 FOR + MF520 REV	pMF011	MF515 K2S sense + MF515 K2S antisense	$\leftarrow$ synth. DNA
pMF030	pRS313	<i>fas2_E8R</i>	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	MF520 FOR + MF520 REV	pMF011	MF515 E8R sense + MF515 E8R antisense	$\leftarrow$ synth. DNA

Primäre Plasmidinformationen				Plasmid-Ursprung				
Plasmid	Vektor	Gen	P	T	Primer/Enzyme zur Vektor-linearisierung	Templat zur Vektor-linearisierung	Primer/Enzyme zur Amplifizierung des Insertionsfragments	Templat zur Amplifizierung des Insertionsfragments
pMF031	pRS313	<i>fas2_K2S_E8R</i>	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	MF520 FOR + MF520 REV	pMF011	MF515 K2S/E8R sense + MF515 K2S/E8R antisense	← synth. DNA
pMF032	pRS313	<i>fas2_K2S_E6V</i>	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	MF520 FOR + MF520 REV	pMF011	MF515 K2S/E6V sense + MF515 K2S/E6V antisense	← synth. DNA
pMF033	pRS313	<i>fas2_K2S_H11A</i>	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	MF520 FOR + MF520 REV	pMF011	MF515 K2S/H11A sense + MF515 K2S/H11A antisense	← synth. DNA
pMF034	pRS313	<i>fas2_E6V_E8R</i>	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	MF520 FOR + MF520 REV	pMF011	MF515 E6V/E8R sense + MF515 E6V/E8R antisense	← synth. DNA
pMF035	pRS313	<i>fas2_E6V_H11A</i>	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	MF520 FOR + MF520 REV	pMF011	MF515 E6V/H11A sense + MF515 E6V/H11A antisense	← synth. DNA
pMF036	pRS313	<i>fas1<sup>Trc</sup>_E2058R</i>	<i>FAS1</i>	<i>FAS1</i>	MF551 FOR + MF551 REV	pMF017	MF566 fas12 E8R sense + MF566 fas12 E8R antisense	← synth. DNA

Primäre Plasmidinformationen				Plasmid-Ursprung				
Plasmid	Vektor	Gen	P	T	Primer/Enzyme zur Vektor-linearisierung	Templat zur Vektor-linearisierung	Primer/Enzyme zur Amplifizierung des Insertionsfragments	Templat zur Amplifizierung des Insertionsfragments
pMF037	pRS313	<i>fas2_Δ</i> ( $\geq 427$ )	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	MF378 CX FOR + MF378CX REV	-	-	-
pMF038	pRS313	<i>N GFP-FAS2</i>	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>	MF417 FAS2_lin FOR + MF417 FAS2_lin REV	pMF011	MF417 (2) GFP-FAS2 FOR + MF417 (2) GFP-FAS2 REV	pET GFP LIC*
pMF039	pRS315	<i>FAS1-C GFP</i>	<i>FAS1</i>	<i>FAS1</i>	MF417 FAS1_lin FOR + MF417 FAS1_lin REV	pMF011	MF417 (2) FAS1 GFP FOR + MF417 (2) FAS1 GFP REV	pET GFP LIC*
pMF040	pAG426	<i>α1-Helix</i>	<i>GPD</i>	<i>CYC1</i>	BamH-I + xho-I	pAG426GPD**	MF488 a1 sense + MF488 a1 antisense	← synth. DNA
pMF041	pAG426	<i>α-MPT</i>	<i>GPD</i>	<i>CYC1</i>	BamH-I + xho-I	pAG426GPD**	MF488 a-Rest FOR + MF488 a-Rest REV***	pMF011
pMF042	pAG426	<i>α-MPT-ACP</i>	<i>GPD</i>	<i>CYC1</i>	BamH-I + xho-I	pAG426GPD**	MF518 Cx FOR + MF518 Cx REV	pMF037
pMF043	pAG425	<i>α65-68</i>	<i>GPD</i>	<i>CYC1</i>	BamH-I + xho-I	pAG425GPD**	MF488 helix clamp FOR + MF488 helix clamp REV	pMF012
pMF044	pAG425	<i>β-MPT</i>	<i>GPD</i>	<i>CYC1</i>	BamH-I + xho-I	pAG425GPD**	MF569 MPT FOR + MF569 MPT FOR	pMF012

Primäre Plasmidinformationen				Plasmid-Ursprung				
Plasmid	Vektor	Gen	P	T	Primer/Enzyme zur Vektor-linearisierung	Templat zur Vektor-linearisierung	Primer/Enzyme zur Amplifizierung des Insertionsfragments	Templat zur Amplifizierung des Insertionsfragments
pMF045	pAG425	$\alpha 65-68-\alpha 1$	<i>GPD</i>	<i>CYC1</i>	BamH-I + xho-I	pAG425GPD**	MF628b FOR + MF628 a/b REV	pMF017
pMF046	pAG425	$\alpha 67-68-\alpha 1$	<i>GPD</i>	<i>CYC1</i>	BamH-I + xho-I	pAG425GPD**	MF628a FOR + MF628 a/b REV	pMF017
pMF047	pAG426	$\alpha 9-Helix$	<i>GPD</i>	<i>CYC1</i>	BamH-I + xho-I	pAG426GPD**	MF488 Cneo helix sense + MF488 Cneo helix antisense	← synth. DNA
*Templat wurde von Scott Gradia über Addgene ( <a href="https://www.addgene.org">https://www.addgene.org</a> ) bereitgestellt (Addgene-Plasmid # 29772)								
**Vektoren wurden von Susan Lindquist über Addgene ( <a href="https://www.addgene.org">https://www.addgene.org</a> ) bereitgestellt (Addgene-Plasmide # 14154 und # 14156)								
***Aufgrund fehlenden Stopp-Codons im REV-Primer wurde dieses nachträglich einkloniert								

Tab. A.5: Kommerzielle Kits

Produkt	Hersteller	Anwendung
Gel Filtration HMW Calibration Kit	GE Healthcare, USA	Kalibrierung von SEC-Säulen
GeneJET Plasmid Midiprep Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	Isolierung & Aufreinigung von Plasmid-DNA
In-Fusion <sup>®</sup> HD Cloning Kit	Clontech <sup>®</sup> Laboratories, Inc., USA	Ligationsfreie Klonierung von Plasmiden
PureYield <sup>™</sup> Plasmid Miniprep System	Promega Corporation, USA	Isolierung & Aufreinigung von Plasmid-DNA
Wizard <sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega Corporation, USA	Isolierung & Aufreinigung von PCR-Produkten

Tab. A.6: Geräte

Gerät	Hersteller	Verwendung
Zentrifugen		
Avanti J25 <sup>1</sup>	Beckman Coulter, USA	
Avanti J20-XP <sup>2</sup>	Beckman Coulter, USA	
5810R <sup>3</sup>	Eppendorf AG, DE	
5417R <sup>4</sup>	Eppendorf AG, DE	
Chromatographiesysteme		
ÄKTAplore <sup>5</sup>	GE Healthcare, USA	Größenausschlusschromatographie
UltiMate™ 3000 UHPLC <sup>6</sup>	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	HPLC-MS-Analytik
Spektroskopie, bildgebende Geräte		
Jasco J810 CD-Spektrometer	Jasco Labor- u. Datentechnik GmbH	Sekundärstrukturanalyse von Peptiden
Expression 1680 Pro	Seiko Epson K.K., JP	Ablichtung von SDS-PAGE-Gelen & Agar-Platten
Fusion SL <sup>7</sup>	Vilber Lourmat GmbH, DE	Detektion & Ablichtung von Agarosegelen & Western Blot-Membranen
Lambda 25, UV-Vis Spektrometer	Perkin Elmer Inc., USA	FAS-Aktivitätstest
Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	Protein-, DNA Konzentrationsbestimmung, Messung von OD(600)

<sup>1</sup>Ausstattung: Rotor JLA-25.500

<sup>2</sup>Ausstattung: Rotor JLA-8.100

<sup>3</sup>Ausstattung: Rotor A-4-62

<sup>4</sup>Ausstattung: Rotor FA45-30-11

<sup>5</sup>Ausstattung: Säule: Superose 6 10/300 GL

<sup>6</sup>Ausstattung: Säule: Luna®, 2.5 µm C18(2) 100 Å, LC Column, 100 x 2 mm, Ea

<sup>7</sup>Ausstattung: UV-Tisch, Filter F-590

Gerät	Hersteller	Verwendung
Massenspektrometrie		
microTOF-Q II <sup>8</sup>	Bruker, USA	HPLC-MS-Analytik
Sonstige Geräte		
Block Thermostat	Grant Instruments, UK	Inkubation von SDS-PAGE-Proben
EnVision Multilabel Reader	PerkinElmer Inc., USA	<i>Split</i> -GFP-Test
FastPrep <sup>®</sup> -24	MP Biomedicals GmbH, DE	Mechanischer Zellaufschluss von <i>S. cerevisiae</i>
Intelli-Mixer	Elmi Ltd, UK	Drehrad-Inkubator
Mikrobiologischer Inkubator	Heraeus / Thermo Fisher Scientific Inc., USA	Kultivierung von <i>E. coli</i> auf Agar-Platten
Savant <sup>™</sup> Speed Vac <sup>™</sup> Concentrator	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	Entfernung von Lösungsmittel im Vakuum
Schüttelinkubator CH4103	Infors AG, CH	Kultivierung von <i>E. coli</i> & <i>S. cerevisiae</i>
Schwenkplattform KS250 basic	IKA Labortechnik GmbH & Co. KG	Färbung von SDS-PAGE-Gelen
T3000 Thermocycler	Biometra GmbH, DE	PCR
Thermomixer comfort <sup>9</sup>	Eppendorf AG, DE	Inkubation von Proben
TKA GenPure <sup>10</sup>	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, DE	Wasseraufbereitung
Vortexmischer Vortex Genie 2 <sup>™</sup>	Bender & Hobein AG, Schweiz	Mischen von Proben
Wasserbadthermostat Julabo C	JULABO GmbH, DE	Inkubation von Proben
XCell II <sup>™</sup> Blot Module	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	Western Blot-Transfer
XCell SureLock <sup>™</sup> Mini-Cell	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	SDS- & NativePAGE
Electrophoresis System		

<sup>8</sup> Ausstattung: ESI

<sup>9</sup> Ausstattung: 1,5 mL

<sup>10</sup> Ausstattung: X-CAD

Tab. A.7: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Glasperlen (0.25 mm - 0.50 mm)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Filterpapier	Whatman plc, USA
Immobilon-FL PVDF-Transfermembran (Porengröße: 0,45 $\mu\text{m}$ )	Merck Millipore, Deutschland
NuPAGE <sup>TM</sup> Novex <sup>TM</sup> 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1,0 mm, 15-well	Novex, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
<i>NativePAGE</i> <sup>TM</sup> Novex <sup>TM</sup> 3-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 10-well	Novex, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Millex(R) Sterilfilter 0,22 $\mu\text{m}$ PES-Membran	Merck KGaA, Deutschland
Millex(R) Sterilfilter 0,45 $\mu\text{m}$ MCE-Membran	Merck KGaA, Deutschland
Glaswolle	Carl Roth GmbH & Co. KG
Reagenzgläser (16x160 mm)	Schott AG, Deutschland
Labocap Reagenzglasdeckel (Chromnickelstahl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Amicon <sup>®</sup> Ultra Centrifugal Filters (100 kDa; 0,5 mL, 4 mL und 15 mL)	Merck Millipore, Deutschland
Gravity flow Strep-Tactin <sup>®</sup> Sepharose <sup>®</sup> column (5 mL)	IBA GmbH, Germany
Zentrifugenfilter UFC30GV00 Ultrafree <sup>®</sup> MC GV 0.5mL, 0,22 $\mu\text{m}$ PVDF-Membran	Merck Millipore, Deutschland



Tab. A.8: Software und Datenbanken

Name	Firma / Organisation	Verwendung
Online-Software		
TM Calculator <sup>11</sup>	New England Biolabs, USA	Berechnung von Schmelztemperaturen für Primer in PCR-Anwendungen
Clustal Omega <sup>12</sup>	University College Dublin, Irland	Sequenz-Alignments
PISA <sup>13</sup>	((Krissinel and Henrick, 2007))	Berechnung von Proteininteraktionen
PSIPRED <sup>14</sup>	University College London, UK	Sekundärstrukturvorhersage aus Proteinsequenzen
Software		
SnapGene <sup>15</sup>	GSL Biotech LLC, USA	Abbildungen von Plasmidkarten
Bruker Data Analysis <sup>16</sup>	Bruker Corporation, USA	Analyse von HPLC-MS
Ugene <sup>17</sup>	UniPro, Russland	Graphische Darstellung von Sequenz-Alignments
PyMOL <sup>18</sup>	DeLano Scientific LLC, USA	Darstellung von Proteinstrukturen, Erzeugung von Struktur-Alignments
Datenbanken		
NCBI Taxonomie-Datenbank <sup>19</sup>	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, USA	Taxonomische Informationen
UniProt <sup>20</sup>	UniProt Consortium	Quelle für Proteinsequenzen

<sup>11</sup>Quelle: <http://tmcalculator.neb.com>; zuletzt überprüft am 19.08.2016; 14:00 Uhr

<sup>12</sup>Quelle: EBI-Webserver; zuletzt überprüft am 19.08.2016; 14:00 Uhr

<sup>13</sup>(Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies), Version 1.51; Quelle <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>; zuletzt überprüft am 19.08.2016; 14:00 Uhr

<sup>14</sup>Quelle: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>; zuletzt überprüft am 19.08.2016; 14:00 Uhr

<sup>15</sup>Quelle: <http://www.snapgene.com>; zuletzt überprüft am 19.08.2016; 14:00 Uhr

<sup>16</sup>Quelle: Bruker Corporation, USA; Version: 4.0

<sup>17</sup>Quelle: <http://ugene.net>; zuletzt überprüft am 19.08.2016; 14:00 Uhr

<sup>18</sup>Version 1.3 <https://www.pymol.org>; zuletzt überprüft am 19.08.2016; 14:00 Uhr

<sup>19</sup>Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; zuletzt überprüft am 19.08.2016; 14:00 Uhr

<sup>20</sup>Quelle: <http://www.uniprot.org>; zuletzt überprüft am 19.08.2016; 14:00 Uhr

Tab. A.9: Proteinsequenzen. Die Tabelle enthält die UniProt-Zugangsnummern (GenBank-Zugangsnummern im Fall (*Tremella mesenterica*) der in dieser Arbeit verwendeten Proteinsequenzen für verschiedene ffAS.

Organismus	UniProt-Zugangsnummer	
	Fas1p	Fas2p
<i>Absidia idahoensis thermophila</i>	A0A077WZ31	
<i>Albugo candida</i>	A0A024G5L5	
<i>Albugo laibachii</i>	F0WVF1	
<i>Amylomyces rouxii</i>	E2DDL2	
<i>Aphanomyces astaci</i>	W4GDM9	
<i>Aphanomyces invadans</i>	A0A024TSY3	
<i>Candida albicans</i>	P34731	P43098
<i>Coprinopsis cinerea</i>	A8NUB3	
<i>Cryptococcus gattii</i>	E6R622	E6R621
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Q5KG98	Q5KG99
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Q6BWV8	Q6BWN1
<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	M4BNV4	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Q6CWN6	Q6CT25
<i>Laccaria bicolor</i>	B0D9Q1	
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	A0A068S7Q9	
<i>Microbotryum violaceum</i>	U5HCL8	U5HCL7
<i>Mixia osmundae</i>	G7DTS8	G7DY64
<i>Mucor circinelloides</i>	S2KJ19	
<i>Phytophthora infestans</i>	D0NFR3	
<i>Phytophthora parasitica</i>	W2RBA8	
<i>Phytophthora ramorum</i>	H3GFG1	
<i>Phytophthora sojae</i>	G4Z031	
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	R9P8H2	
<i>Puccinia graminis</i>	E3K822	H6QS39
<i>Pythium ultimum</i>	K3WEQ6	
<i>Rhizopus delemar</i>	I1CSN0	
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	M7WSW5	M7XM89
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P07149	P19097
<i>Saprolegnia diclina</i>	T0QIJ7	
<i>Schizochytrium sp</i>	A0FJY8	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Q9UUG0	Q10289
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	A4VCJ6	A4VCJ7
<i>Tremella mesenterica</i>	XP_007006732.1	XP_007006745.1
<i>Ustilago maydis</i>	A0A0D1C5S0	

## B Anhang Zusätzliche Ergebnisse

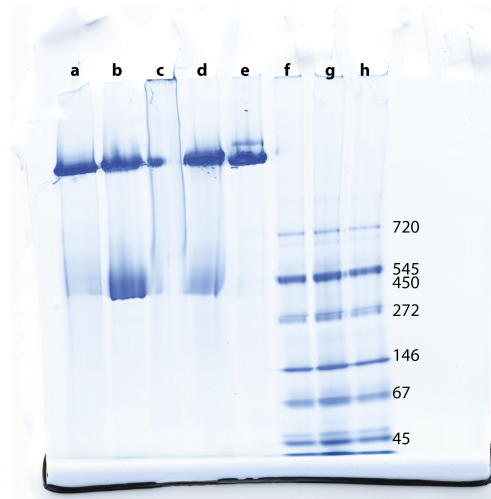


Abb. B.1: *Blue Native* PAGE nach Disassemblierung der ScFAS mit Dimethylmaleinsäureanhydrid. Coomassie-gefärbtes *Blue Native* PAGE-Gel mit DMMA-behandelten ScFAS-Proben bei unterschiedlichen Bedingungen. Abweichungen zum Protokoll (vgl. Kap. 3.4.9) wie folgt: a: Lagerung der Probe für für 20 h bei 4 °C; b: keine Abweichung; c: pH 9,0; d: DMMA als methanolische Lösung; e: unbehandelte ScFAS; f-h: Marker.

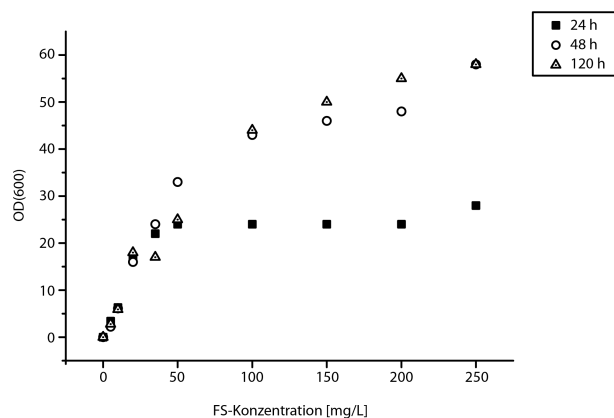


Abb. B.2: Fettsäurebedarf von *BY.PK1238\_1A\_KO*. Das Wachstum von 5 mL -Kulturen bei 30 °C und 200 Upm wurde durch Messung der OD(600) nach unterschiedlichen Inkubationszeiten in Abhängigkeit der FS-Konzentration im Medium ermittelt. Die FS-Konzentration bezieht sich auf jede einzelne der drei FS (Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure).

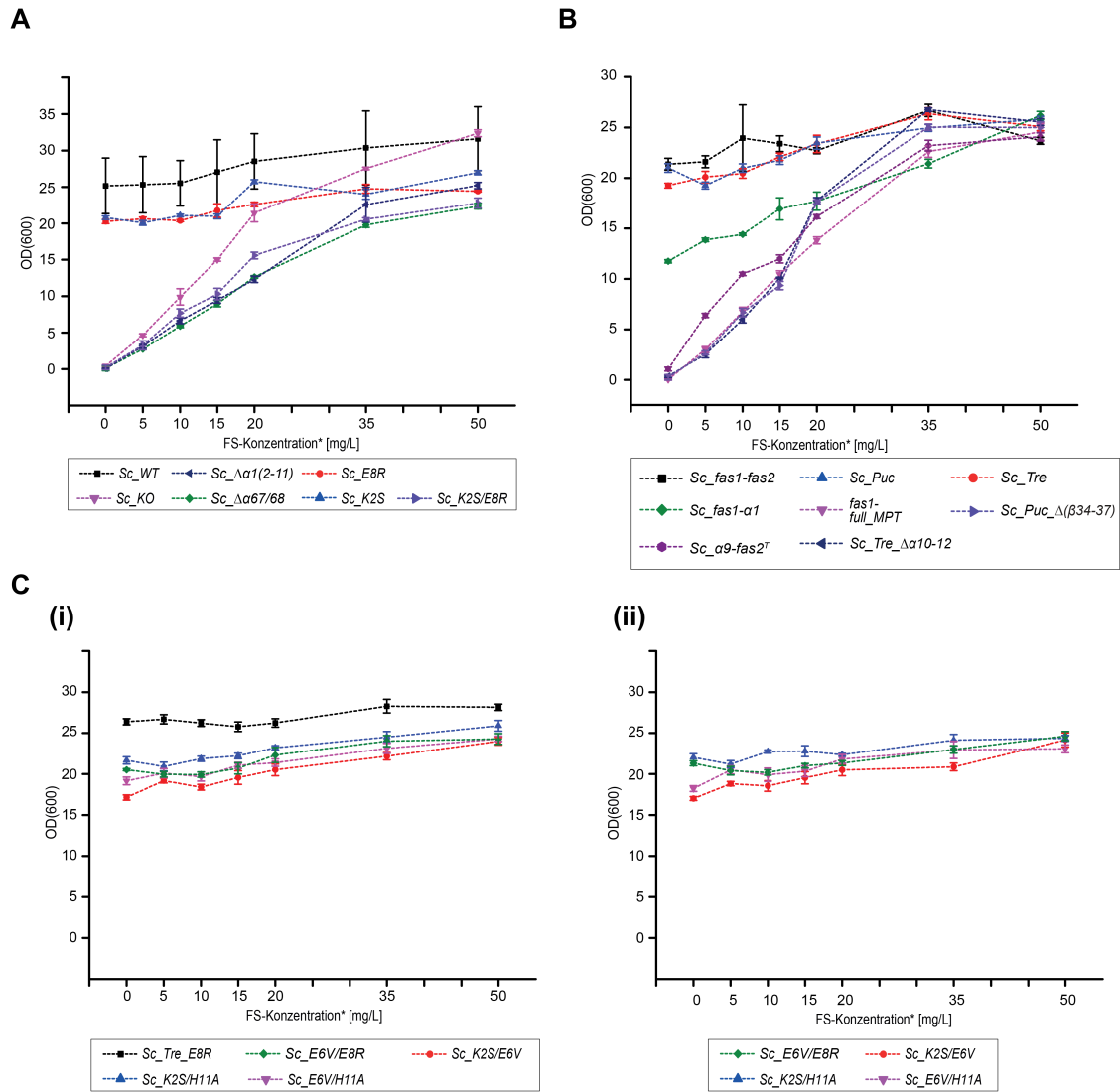


Abb. B.3: Biologische Replikationen zu Ergebnissen in Kap. 5.3 ff. Daten entstammen Experimenten aus separaten Transformationsansätzen der entsprechenden Stämme. **A** analog Abb. 5.3 A. **B** analog Abb. 5.6 A und Abb. 5.7 A. **C** Biologische Replikation des Stamms *Sc\_Tre\_E8R* in (i) analog Abb. 5.6 A. Zudem in zwei biologischen Replikationen ((i) und (ii)) Ergebnisse zu weiteren Kombinationen von Punktmutationen, wie in Kap. 5.3 und Abb. 5.4 genannt.

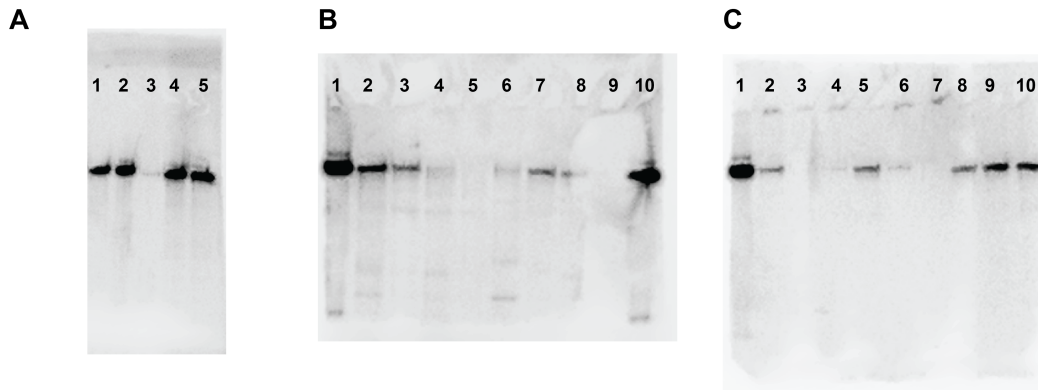


Abb. B.4: Ungeschnittene *Western Blot*-Aufnahmen zu den Abbildungen in Kap. 5.3 ff. **A** Spuren 1, *Sc\_fas1-fas2*; 2, aufgereinigte ScFAS; 3, *Sc\_K2S/E8R*; 4, *Sc\_E8R*; 5, *Sc\_K2S*. **B** Spuren 1, aufgereinigte ScFAS; 2, *Sc\_S180A*; 3, *Sc\_fas1- $\alpha$ 1*; 4, *Sc\_ $\Delta\alpha$ 1(2-11)*; 5, *Sc\_??67/68*; 6, *Sc\_fas1-full\_MPT*; 7, *Sc\_WT*; 8, Laborstamm *BY4742*; 9, *SC\_KO*; 10, aufgereinigte ScFAS. Spuren 8-10 sind von einer Blase während des Elektrotransfers gekennzeichnet. **C** Spuren 1, aufgereinigte ScFAS; 2, keine Relevanz für diese Arbeit; 3, *Sc\_Puc\_ $\Delta\beta$ 34-37*; 4, keine Relevanz für diese Arbeit; 5, *Sc\_Puc*; 6, *Sc\_ $\alpha$ 9-fas2Tr*; 7, *Sc\_Tre\_ $\Delta\alpha$ 10-12*; 8, *Sc\_Tre*, 9, *Sc\_fas1-fas2*; 10, *Sc\_WT*.

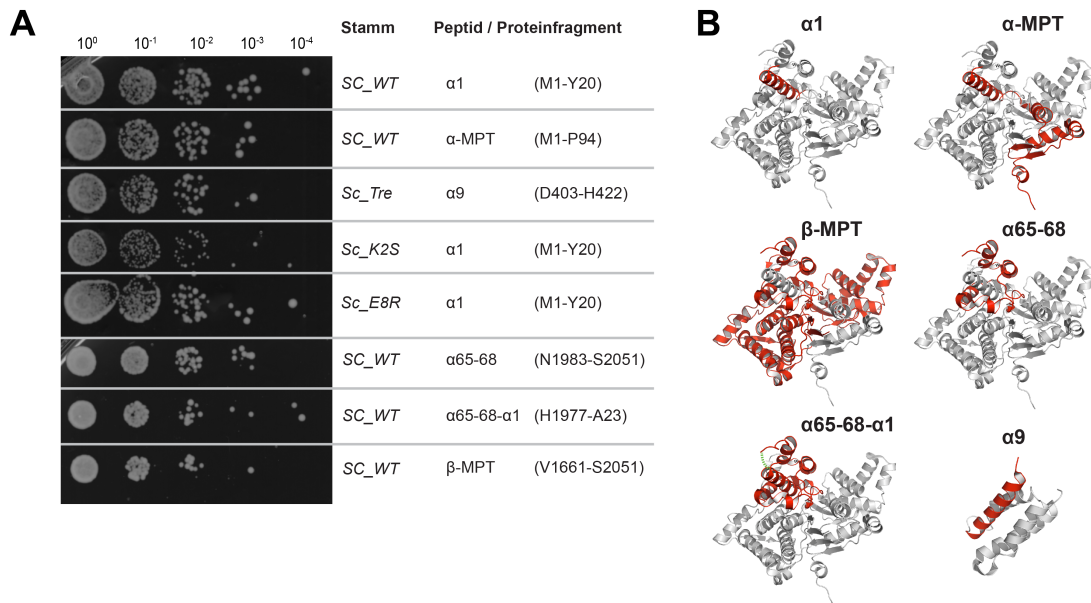


Abb. B.5: *Spotting*-Test peptidischer Inhibitoren. **A** Transformanten der *S. cerevisiae*-Stämme, wie angegeben (siehe Tab. 5.2 und 5.3), mit für die jeweiligen Peptide codierenden Sequenzen auf pAG-Vektoren wurden auf entsprechendem SD-Medium ohne FS-Zugabe getestet. **B** Ansichten der MPT-Domäne und des 4-helikalen Bündels (im Fall  $\alpha$ 9) aus der Kristallstruktur der ScFAS (PDB-Code: 3hmj) in *Cartoon*-Repräsentation. Jeweils in rot ist der namentlich genannte Bereich, wie in A eingesetzt, hervorgehoben. Eine grün gestrichelte Linie bei  $\alpha$ 65-68- $\alpha$ 1 symbolisiert die kovalente Fusion analog Abb. 5.4 B (*Sc\_fas1-fas2*).

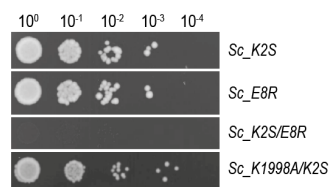


Abb. B.6: *Spotting*-Test weiterer Punktmutationen. *Spotting*-Test analog Abb. 5.3 B für die Kombination der Punktmutationen K1998A auf der  $\beta$ -Kette der ScFAS mit K2S auf der  $\alpha$ -Kette. Im Vergleich dazu nochmals die Punktmutanten aus Abb. 5.3 B.

# C Anhang Sequenzen

## C.1 Plasmidkarten

### C.1.1 pRS-Plasmide

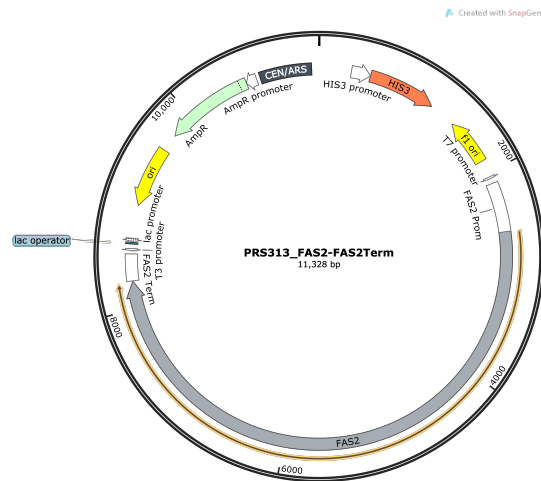


Abb. C.1: pRS313-Vektor mit einkloniertem *FAS2*-Gen (exemplarisch).

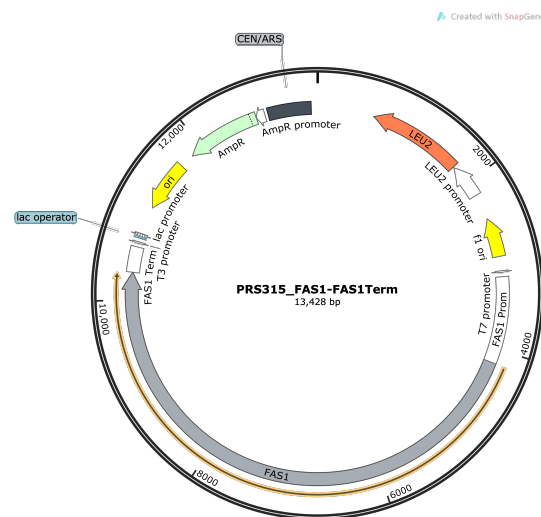


Abb. C.2: pRS315-Vektor mit einkloniertem *FAS1*-Gen (exemplarisch).

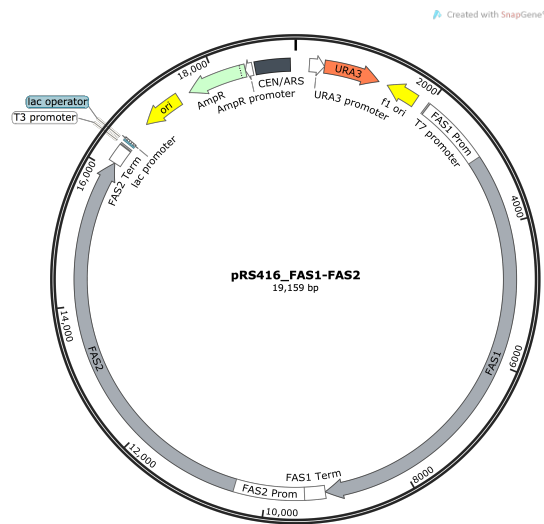


Abb. C.3: pRS416-Vektor mit inklonierten Genen *FAS1* und *FAS2* (pMF001).

### C.1.2 pAG-Plasmide

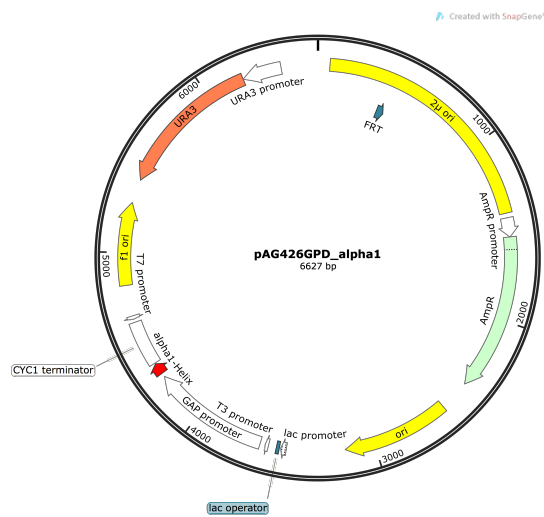


Abb. C.4: pAG426-Vektor mit inklonierter  $\alpha$ 11-Helix (exemplarisch). pAG425-Plasmide hierzu analog mit *LEU2*-Auxotrophie-Marker-Kassette (siehe Abb. C.2) statt *URA3*.



## C.2 DNA-Sequenzen

### C.2.1 Gene

Im Folgenden sind die ursprünglichen DNA-Sequenzen der Wildtyp-Gene *FAS1* und *FAS2* aus *S. cerevisiae* mit Ihren Promotor- und Terminatorbereiche, wie in dieser Arbeit verwendet, angegeben. Alle weiteren hier eingesetzten Konstrukte sind hiervon, wie in Anhang A, Tabelle A.4 aufgestellt, abgeleitet. Zudem ist die Sequenz des verwendeten GFP gezeigt.

#### ***FAS1*-Promotor:**

```
TGCGGTCTCGTCTCTACGAATATGGCTATTTGCOCTTCGTATATAACCTTTCTAT
ATGTTTCAGCAAACGGCAGCATGTGAAAAAACCCGTAGAAGGTCCGCATCAGCCT
TCCATACCAAGTAATGAATGTCTTGAGGGCCCGTATGGCCGCGGAAGGCTTAG
TTAAGGCCCGTGCACCCACGGCTCCTCGGAGGCOGGGTTATAGCAGCGTCTGCT
CCGCATCACGATACACGAGGTGCAGGCACGGTTCCTACTCCCTGGCTCCAA
CAAACGACGGCCAAAAACTTCACATGCCGCCAGCCAAGCATAATTACGCAACA
GCGATCTTTCCGTCGCACAAGTTAAAAGAAATTGTTGAAAAATACAAATAATCG
CGAACAAATACGTTGTTGCTATTTAACGCTTTTGGTCTGACAGTAAGTGTGCCCTT
TCCCAATCACCGAAAAGTGTGAAACGATTCCTGCGACAATAATCAGAGATTAC
AGTCGGCATTFTGGCATTFTGGCATACTFTTTATCGATTGAACCATCTTCTCC
AAACACTTTTCTTTTCTCTATTTCTGCAGGACCAACTAAAACCTGGGTATAT
ATATCATTATCTATATATATAAAACGGCTTTCAACAAAGTTATAGGGGAAAACCTA
AAAATATAAGAAAAAAAAGGTATTGATTGATAAGGAAAAAGAACCAAGGGAAA
AATATAAAAAAGTACATTGGGCCCTTTTCATACTTGTTATCACTTACATTACAAA
GAAGAACAAACAACCTTTTAAACGAATTTCTTTCTTCTTTTCAATTTATT
AATTTCTTTTTTCCATACAATTCAAGGTCAAATATATTCTTATATGCTCTTTGA
ATATTTCTGAAAAATATATAAAGAAAAGAACTACAAGAACATCATCCGGAAAA
TCAGATTATAGACTAGGATTCGGCTCTTTTTFAGTATATTTATTGCCCACACCTA
ACTGCTCTATTATTGCTCATT
```

#### ***FAS1*-Leserahmen:**

```
ATGGACGCTTACTCCACAAGACCATTAACCTATCTCACGGTCTTTAGAGCAC
GTGCTTCTGGTACCAACCGCTTCATTTTTTCATTGCTTCGCAATTACAAGAACAA
TTTAATAAAATTTTGCCCGAACCCACTGAAGGGTTTGCTGCAGATGACGAGCCT
ACCACACCTGCTGAACTAGTGGGGAAATTCCTTGGCTACGTATCTTCTCTAGTC
GAACCTTCCAAGTTCGGTCAATTCGATCAGGTCCTGAACCTTTGCTTAACAGAA
TTTGAAAACCTGTTATTTAGAAGGCAATGACATTCACGCCCTTGGCTGCTAAACTA
TTACAGGAAAACGACACAACCTTTAGTGAAGACTAAAGAACTAATTAATAAATTAT
ATTACCGCCAGAATAATGGCTAAGAGACCATTTGACAAAAAATCCAACCTCTGCT
CTTTTTFAGGGCCGTGCGGAGGGTAAOCGCACAATTGGTACCCATTTTGGGTGGT
CAAGGTAACACCGACGACTACTTTGAAGAATTGCGTGATCTATATCAAACCTTAT
```

CATGTCCTTAGTGGGAGATTTAATCAAGTTCTCCGCTGAAACTTTAAGTGAAC TG  
ATTAGAACTACTTTAGATGCTGAAAAAGTCTTTACTCAAGGTTTAAACATATTG  
GAATGGTTGGAGAACCCTTCAAATACCCCAGACAAGGACTATTTACTTTCCATT  
CCAAATTTTCATGCCCTTAATTGGTGTTCATTCAATTGGCTCACTACGTAGTTACT  
GCCAAGCTTTTGGGTTTCACTCCAGGTGAGTTAAGATCTTACTTAAAAGGTGCT  
ACAGGTCACTCTCAAGGTTTGGTTACTGCTGTCCGATAGCTGAGACGGATTCC  
TGGGAATCCTTCTTCGTCTCCGTAAGAAAAGCAATTACTGTATTATTCTTCATC  
GGTGTTCGTTGTTACGAAGCATACCCAAACACTTCCCTACCACCATCCATCTTG  
GAAGATTCCTTGGAACAATGAAGGTGTTCCATCTCCAATGTTGTCCATTTCC  
AATCTAACTCAAGAACAAGTTCAAGACTATGTAAATAAGACTAACTCTCATTTG  
CCAGCTGGTAAACAAGTTGAAATTTCTCTAGTCAATGGTGCGAAGAATCTAGTC  
GTATCGGGCCCACCACAATCATTATATGGTTTAAACTTGACTTTAAGAAAAGGCC  
AAGGCCCCATCTGGACTGGATCAATCAAGAATCCCATTCAGCGAAAGAAAATTG  
AAGTTCTCCAATAGGTTCTTACCTGTTGCATCACCATTCCATTCOCATCTATTG  
GTTCCAGCTTCAGATTTGATTAACAAAGACTTAGTCAAAAACAATGTCAGCTTT  
AACGCTAAAGATATTCAAATCCCCGTTTACGACACTTTTGTATGGTTCAGATCTA  
AGAGTCCTTTTCCAGGTTCCATTTCCGAGAGAATCGTCCGACTGCATCATTAGATTA  
CCTGTCAAATGGGAAACTACTACACAATTCAAAGCCACCCACATATTAGACTTT  
GGTCCAGGTGGAGCTTCCGGTTTAGGTGTTTAAACCCATCGTAATAAAGATGGT  
ACTGGTGTTCGTGTTATCGTTGCCGGTACTCTCGACATTAACCCAGATGATGAT  
TACGGATTCAAGCAAGAAATCTTTGATGTTACTAGTAATGGTTTGAAGAAAAAT  
CCAAACTGGTTGGAAGAATACCATCCAAAATTAATTAAGAACAATCAGGCCAAA  
ATTTTTGTGCAAAAATTTTCTAAATTAATCGGTAGACCACCTTTATTGGTT  
CCTGGTATGACACCATGTACTGTTTCTCCAGATTTCCGTAGCTGCTACCACAAAT  
GCTGGTTATACCATTGAGTTGGCCGGTGGTGGTTACTTTTCCGCAGCAGGTATG  
ACCGCCGCTATTGATTCGTGTGGTTTCTCAGATAGAAAAGGGTAGTACCTTCCGGT  
ATCAACTTGATCTACGTCAATCCATTTATGTTACAATGGGGTATTCCATTAATC  
AAGGAACTAAGAAGCAAAGGTTATCCAATTCAAATCTTGACCATTGGTGTGGT  
GTCCCATCATTGGAAGTTGCTAGTGAATACATAGAGACATTAGGTTTGAAGTAC  
TTGGGTTTGAACCAGGTTCCATTGATGCTATTTCCGCAAGTTATAAACATTGCT  
AAAGCACATCCAAACTTCCCAATAGCTTTACAATGGACCGGTGGTAGAGGTGGT  
GGTCATCATTCTTTCGAAGATGCCACACTCCAATGTTACAAATGTACTCCAAG  
ATTAGAAGACATCCAAACATTTATGTTGATATTCGGTTCTGGTTTCCGGTTCTGCT  
GATGACACTTACCATACTTAACCGGTGAATGGTCCACAAAATTCGATTATCCA  
CCAATGCCATTCGATGGTTTCCATTTGGTTCCGAGGGTCATGATTGCTAAGGAA  
GTTAAAACCTTCTCCTGATGCTAAGAAGTGTATTGCTGCTTGTACTGGTGTTCCT  
GATGATAAATGGGAACAAACCTACAAGAAGCCAACTGGTGGTATTGTCACGTGTT  
CGCTCTGAAATGGGTGAACCAATTCACAAAATTCGCACTCGTGGTGTATTGCTA  
TGGAAGGAATTCGACGAAACCATCTTCAACTTACCAAAGAATAAGTTGGTACCA  
ACTTTGGAAGCAAAGAGAGATTACATTATCTCAAGATTGAACGCCGATTTCCAA  
AAACCATGGTTTGGTACCGTCAACGGTCAAGCCCGTGACCTAGCCACAATGACA

TACGAAGAAGTTGCAAAGAGATTGGTGGAATTAATGTTTCATCAGATCTACCAAC  
TCTTGGTTTTGATGTCACATGGAGAACCCTTTACTGGTGATTTCCCTACGTCTGTGTC  
GAAGAACGTTTTACTAAAAGTAAGACATTGTCTTTAATCCAATCCTATTCTCTA  
CTAGACAAGCCTGATGAAGCTATTGAAAAAGTATTTAATGCTTATCCTGCCGCT  
AGGGAACAGTTCTTGAATGCGCAAGATATTGATCACTTTTTGAGCATGTGTCAA  
AATCCAATGCAAAAACCAGTGCCTTTTGTTCCAGTTTTGGATCGTAGATTGAG  
ATTTTTTTCAAAAAGATTTCGTTATGGCAATCTGAGCACTTGGAAGCCGTGTC  
GACCAAGACGTTCAAAGAACATGTATCCTACATGGACCTGTTGCAGCACAAATTC  
ACTAAAGTCATCGATGAACCAATTAAGAGCATTATGGATGGTATTACAGATGGT  
CACATCAAAAAGTTACTACATCAATATTACGGTGACGATGAGTCAAAGATTCCA  
GCAGTTGAGTACTTTGGTGGTGAAAGCCCTGTAGACGTACAAAGTCAAGTTGAT  
TCTTCCCTCTGTATCTGAAGACTCAGCTGTTTTTAAGGCAACATCCTCTACTGAT  
GAAGAAAGCTGGTTTTAAGGCTTTGGCGGGATCCGAAATTAAGTGGAGACATGCA  
AGTTTTCTTATGTTCCCTTATCACTCAAGATAAAAATGTTTGTCTAACCCTAATT  
AGAAAAGTTTTCAAGCCAAGCCAAGGAATGGTTGTTGAGATTTCCAACGGCAAT  
ACTTCTTCAAAGACTGTTGTCACCTCTTTCAGAACCCTGTTCAAGGTGAATTGAAA  
CCAACCTGTTATTTTGAAGTTGTTGAAGGAGAACATAATCCAATGGAAATGATT  
GAGAACAGAACTATGGATGGTAAGCCCGTCAGCTTGCCATTGTTGTACAACTTC  
AACCAGATAATGGTTTTGCTCCAATCTCTGAAGTTATGGAGGACAGAAACCAA  
AGAATTAAGGAAATGTACTGGAAATTATGGATTGATGAGCCTTTCAATTTGGAC  
TTTGACCCAAGAGATGTCATTAAGGGCAAAGATTTCCGAGATCACCGCTAAAGAA  
GTTTTATGACTTTACACACGCTGTTGGAAACAATTGTGAAGACTTCGTTTTCTAGA  
CCTGATAGAACGATGTTGGCCCCAATGGACTTTGCTATTGTTGTTCGGATGGAGA  
GCCATCATCAAGGCCATTTTTCCCTAATAACGGTCGATGGTGACTTATTGAAGTTG  
GTTCAATTTGTCTAACGGCTACAAGATGATTCCTGGCGCTAAGCCACTGCAAGTT  
GGTGATGTTGTTTCAACTACTGCTGTTATTGAATCTGTCTCAACCAACCTACA  
GGAAAGATTGTGATGTGGTAGGTACATTATCGAGAAATGGCAAGCCTGTCATG  
GAAGTCACCTCCTCATTCTTCTACAGAGGCAACTATACTGACTTTGAAAACACT  
TTCCAAAAGACTGTTGAACCTGTTTATCAAATGCACATCAAAAACCTCTAAAGAT  
ATAGCTGTCTTGGCTCTAAGGAGTGGTTCCAATTGGACGATGAAGACTTCGAT  
CTGTTAAACAAAACCTTTGACTTTTCGAAACTGAAACTGAAGTTACTTTCAAGAAT  
GCTAACATCTTCTCTTCAGTGAAATGTTTTTGGCCCAATTAAGTTGAATTGCCA  
ACCAAAGAAACCGTGGAGATCGGTATTGTGATTACGAAGCCGGTGCCCTCTCAC  
GGTAACCCCTGTTGTTGATTTCTTGAAGAGAAACGGTTCCACATTGGAACAAAAG  
GTCAATCTAGAAAATCCTATTCCAATTGCAGTACTTGATTTCGTACACTCCAAGT  
ACCAACGAACCATACGCTAGAGTTTCTGGTGATTTGAATCCAATTCACGTTTCA  
CGTCATTTTGCCTCTTACGCAAACTTGCCAGTACTATCACGCAOCCGATGTTTT  
TCTTCTGCTTCCGTCCGTGCTTTGATTGAAAACCTGGGCTGCTGACAGTGTFTCA  
TCCAGGTACGTGGCTACACTTGTCAATTTGTTGACATGGTTTTGCCTAACACT  
GCTTTGAAAACATCGATTCAACATGTTGGTATGATCAATGGTAGAAAATTGATA  
AAGTTTGAACCTAGAAAATGAAGATGACGTTGTAGTTTTGACTGGTGAAGCCGAA

ATTGAACAACCTGTTACTACCTTCGTTTTCTACTGGTCAAGGTTCAACAAGAACAA  
GGTATGGGTATGGACTTATACAAAACCTTCTAAAGCTGCTCAAGATGTTTTGGAAT  
AGAGCTGACAACCATTTCAAGGACACTTATGGTTTTCTCTATCTTAGACATTGTC  
ATTAACAACCCAGTTAACTTAACAATTCACCTTCGGTGGTGAAAAGGGTAAGAGG  
ATCAGAGAAAACCTATTCTGCTATGATCTTTGAGACTATCGTGGATGGAAAATTG  
AAGACTGAAAAAATTTTTCAAGGAAATTAATGAGCACAGTACTTCTTACACATTT  
AGATCTGAAAAAGGTTTTATTGTCTGCTACTCAATTTACACAACCAGCTTTAACT  
TTGATGGAAAAAGCTGCTTTTCGAAGACTTGAAATCTAAAGGTTTGATCCCAGCC  
GATGCTACTTTTGGCTGGTCACTCTTTAGGTGAGTATGCTGCTTTGGCCTCTTTG  
GCTGATGTTATGCTATCGAATCTTTAGTTGAAGTTGTGTTCTACAGAGGTATG  
ACTATGCAAGTTGCTGTTCCAAGAGATGAGTTGGGCAGATCCAACCTATGGTATG  
ATTGCCATTAACCCAGGTAGAGTCGCTGCATCATTCTCTCAAGAAGCTTTGCAA  
TATGTTGTTGAGAGAGTTGGTAAGAGAACCGGCTGGTTGGTTGAAATCGTCAAC  
TACAACGTTGAAAACCAACAATATGTTGCAGCTGGTGATCTAAGAGCTTTAGAC  
ACCGTTACCAATGTTCTAAACTTCATCAAATTCAAAAAATTGATATTATTGAA  
CTACAAAAGTCCTTATCTTTGGAAGAAGTTGAAGGTCATTTGTTTGAGATCATT  
GACGAAGCTTCCAAGAAATCTGCTGTCAAGCCTCGCCCACTTAAATTGGAGAGA  
GGTTTTGCTTGTATCCCATFAGTTGGFATTTCTGTTCCFTTCCATTCCACCTAC  
TTGATGAATGGTGTAAACCATTCAGAGTTTCTTGAAGAAGAATATCATAAAA  
GAAAATGTGAAGGTTGCTAGATTGGCCGAAAGTACATTCCAAACCTTGACTGCA  
AAACCATTCCAGGTTACTAAGGAATATTTCCAGGACGTTTATGATTTGACTGGC  
TCCGAACCTATCAAGGAAATCATCGACAACCTGGGAAAAGTATGAACAATCCTAA

***FAS1*-Terminator:**

TTTCTTAAGTGATTATATAACCGTAAGAAATATTTAACTTTGAAACTCCTGTAT  
ACTAATGTTTAATATAGCTGGCTTATGATTTTAGTTCTCTTCTCCTATTATAAA  
TAGATACATTGATTAGGTATTTTATAATATACTTGGGATTAACAGATGCTATA  
TGAATTTTTTTTTCCGCGCAAGCCCTCGCTAGGGCGGGGCAGATGCTGAAGAA  
AAAATTTTCTGTTCATTGGGTTATGTTTAAAAATCAACGATATTCGAACATAA  
TCGATGACCTTGATGATTAGCGAAG

***FAS2*-Promotor:**

TTCTATCCGAACCTCCCTTTTTGTATATCAATATATCTTAATACTTTTCGCCTATT  
CTTTACTATATTTCCCTAAATTTTCTCTGGTCTGCAGGCCAAAAACAACAACCTTA  
CTACTGAATCATGGACGTGATTTAGTTTAGCCAAGCAATATTTAAATATCACT  
CTTCCATAAAAATACATTGGGCATTACCCGCAAACCTAACCATCGCTTAGCAAAA  
TCCAACCATTTTTTTTTTATCTCCCGGTTTTTCACATGCTACCTCATTTCGCCTC  
GTAACGTTACGACCGAAATCTCACTAAGGCACGGTTTGTGGGCAGTTTACAGA  
TGTTGGATAACCAGTTGTTTCTAAACGGTTATGCCTCATATATAACTTGTAAAC  
TGAAGGTTACACAAGACCACATCACCACTGTGCTGCTTTTCTAATAACCGCTAT  
ATTAGACGTTTAAAGGGCTACAGCAACACCAATTGAAATACCATCATT

## **FAS2-Leserahmen:**

ATGAAGCCGGAAGTTGAGCAAGAATTAGCTCATATTTTGCTAACTGAATTGTTA  
GCTTATCAATTTGCCCTCCTGTGAGATGGATTGAAACTCAAGATGTTTTTTTG  
AAGGATTTTAACTGAAAGGGTTGTTGAAATCGGTCCCTCTCCAACCTTTGGCT  
GGGATGGCTCAAAGAACCTTGAAGAATAAATAACGAATCTTACGATGCTGCTCTG  
TCTTTACATAGAGAAATCTTATGCTATTGGAAGGATGCCAAAGAGATTTATTAT  
ACCCAGATCCATCCGAACTAGCTGCAAAGGAAGAGCCCGCTAAGGAAGAAGCT  
CCTGCTCCAACCTCAGCTGCTAGTGTCTCCTGCTCCTGCAGCAGCAGCCCCAGCT  
CCCGTCGCGCAGCAGCCCCAGCTGCAGCAGCTGCTGAGATTGCCGATGAACCT  
GTCAAGGCTTCCCTATTGTTGCACGTTTTGGTTGCTCACAAGTTGAAGAAGTCG  
TTAGATTOCATTCCAATGTCCAAGACAATCAAAGACTTGGTTCGGTGGFAAATCT  
ACAGTCCAAAATGAAATTTTGGGTGATTTAGGTAAAGAATTTGGTACTACTCCT  
GAAAAACCAGAAGAACTCCATTAGAAGAATTGGCAGAACTTTCCAAGATACC  
TTCTCTGGAGCATTGGGTAAGCAATCTTCCCTCGTTATTATCAAGATTAATCTCA  
TCTAAGATGCCTGGTGGGTTTACTATTACTGTGCTAGAAAATACTTACAACT  
CGCTGGGGACTACCATCTGGTAGACAAGATGGTGTCCTTTTGGTAGCTTTATCT  
AACGAGCCTGCTGCTCGTCTAGGTTCTGAAGCTGATGCCAAGGCTTTCTTGGAC  
TCCATGGCTCAAAAATACGCTTCCATTGTTGGTGTGACTTATCATCAGCTGCT  
AGCGCTAGTGGTGTGCTGCCGGTGCAGGTGCTGCTGCCGGTGCAGCTATGATCGAT  
GCTGGCGCTCTGGAAGAAATAACCAAAGACCACAAGGTTTTGGCGCGTCAACAA  
CTGCAAGTATTGGCTCGTTATCTAAAAATGGACTTGGATAACGGTGAAAGAAAG  
TTCTTGAAAGAAAAGGACACTGTTGCTGAACTTCAAGCTCAGTTGGATTACTTG  
AATGCCGAATTAGGTGAATCTTTGTTAACGGTGTGCTACTTCTTTCTCTAGA  
AAAAAGGCCAGAACCCTTCGATTCTTCCCTGGAACCTGGGCTAAACAATCTTTATTA  
TCATTATACTTTGAGATAATTCATGGTGTCTTGAAAAACGTTGATAGAGAGGTT  
GTTAGTGAAGCTATCAATATCATGAACAGATCTAACGATGCTTTGATTAAATTC  
ATGGAATACCATATCTCTAACACTGATGAAACAAAAGGTGAAAACCTATCAATTG  
GTTAAAACCTTTGGTGAGCAGTTGATTGAAAACGTGAAACAAGTTTTGGATGTT  
GATCCAGTTTACAAAGATGTTGCTAAGCCTACCGGTCCAAAAACTGCTATTGAC  
AAGAACGGTAACATTACATACTCAGAAGAGCCAAGAGAAAAGGTTAGGAAATTA  
TCTCAATAOCTACAAGAAATGGCCCTTGGTGGTCCAATCACCAAAGAATCTCAA  
CCTACTATTGAAGAGGATTTGACTCGTGTTFACAAGGCAATCAGTGTCAAGCT  
GATAAACAAGATATTTCCAGCTCCACCAGGGTTGAATTTGAAAAACTATATAGT  
GATTTGATGAAGTTCTTGAAAGCTCCAAAGAAATCGATCCTTCTCAAACAACC  
CAATTTGGCCGTTATGGATGTTGAGGATGCTTTGGACAAAAGATTOCACCAAAGAA  
GTTGCTTCTTTGCCAAACAAATCTACCATTTCTAAGACGGTATCTTCAACTATT  
CCAAGAGAAAACCTATTCGGTTCTTACATTTGAGAAAAGAAGACTCCTGCCGGAGAT  
TGGAATATGACCGCCAATTGCTTCTCTTTTCTTAGATGGTTTAGAAAAGGCT  
GCCTTCAACGGTGTACCTTCAAGGACAAATACGTCTTGTATCACTGGTGTGCTGGT  
AAGGGTTCTATTGGTGTGCTGAAGTCTTGCAAGGTTTTGTTACAAGGTGGTGTAAAG  
GTTGTTGTTACCACCTCTCGTTTCTCTAAGCAAGTTACAGACTACTACCAATCC

ATTTACGCCAAATATGGTGCTAAGGGTTCTACTTTGATTGTTGTTCCATTCAAC  
CAAGGTTCTAAGCAAGACGTTGAAGCTTTGATTGAATTTATCTACGACACTGAA  
AAGAATGGTGGTTTAGGTTGGGATCTAGATGCTATTATTCATTTCGCGGCCATT  
CCAGAACAAGGTATTGAATTAGAACATATTGATTCTAAGTCTGAATTTGCTCAT  
AGAATCATGTTGACCAATATCTTAAGAATGATGGGTTGTGTCAAGAAGCAAAAA  
TCTGCAAGAGGTATTGAAACAAGACCAGCTCAAGTCATTCTACCAATGTCTCCA  
AACCATGGTACTTTTCGGTGGTGATGGTATGTATTCAGAATCCAAGTTGTCTTTG  
GAACTTTGTTCAACAGATGGCACTCTGAATCCTGGGCCAATCAATTAACCGTT  
TGCGGTGCTATTATTGGTTGGACTAGAGGFACTGGTTTAATGAGCGCTAATAAC  
ATCATTGCTGAAGGCATTGAAAAGATGGGTGTTTCGTACTTTCTCTCAAAGGAA  
ATGGCTTTCAACTTATTGGGTCTATTGACTCCAGAAGTCGTAGAATTGTGCCAA  
AAATCACCTGTTATGGCTGACTTGAATGGTGGTTTGCAATTTGTTCCCTGAATTG  
AAGGAATTCCTGCTAAATTGCGTAAAGAGTTGGTTGAAACTTCTGAAGTTAGA  
AAGGCAGTTTCCATCGAAACTGCTTTGGAGCATAAGGTTGTCAATGGCAATAGC  
GCTGATGCTGCATATGCTCAAGTCGAAATTCACCAAGAGCTAACATTCAACTG  
GACTTCCCAGAATTGAAACCATACAAACAGGTTAAACAAATGCTCCCGCTGAG  
CTTGAAGGTTTGTGGATTTGGAAAGAGTTATTGTAGTTACCGGTTTTGCTGAA  
GTCGGCCCATGGGGTTTCGGCCAGAACAAGATGGGAAATGGAAGCTTTTGGIGAA  
TTTTTCGTTGGAAGGTTGCGTTGAAATGGCCTGGATTATGGGCTTCATTTCCATAC  
CATAACGGTAATTTGAAGGGTCGTCCATACACTGGTTGGGTTGATTCCAAAACA  
AAAGAACCAGTTGATGACAAGGACGTTAAGGCCAAGTATGAAACATCAATCCTA  
GAACACAGTGGTATCAGATTGATCGAACCAGAGTTATTCAATGGTTACAACCCA  
GAAAAGAAGGAAATGATTCAAGAAGTCATTGTGCGAAGAAGACTTGGAACCATTT  
GAGGCTTCGAAGGAAACTGCCGAACAATTTAAACACCAACATGGTGACAAAGTG  
GATATCTTCGAAATCCCAGAAACAGGAGAGTACTCTGTTAAGTTACTAAAGGGT  
GCCACTTTATACATTTCCAAAGGCTTTGAGATTTGACCGTTTGGTTGCAGGTCAA  
ATTCCAACTGGTTGGAATGCTAAGACTTATGGTATCTCTGATGATATCATTTCT  
CAGGTTGACCCAATCACATTATTCGTTTTGGTCTCTGTTGTGGAAGCATTTATT  
GCATCTGGTATCACCGACCCATACGAAATGTACAAATACGTACATGTTTCTGAG  
GTTGGTAACTGTTCTGGTTCTGGTATGGGTGGTGTCTCTGCCTTACGTGGTATG  
TTTAAGGACCGTTTCAAGGATGAGCCTGTCCAAAATGATATTTTACAAGAATCA  
TTTATCAACACCATGTCCGCTTGGGTTAATAATGTTGTTGATTTCCCTCATCTGGT  
CCAATCAAGACACCTGTTGGTGCCGTGCCACATCCGTGGAATCTGTTGACATT  
GGTGTAGAAACCATCTGTCTGGTAAGGCTAGAATCTGTATTGTCCGGTGGTTAC  
GATGATTTCCAAGAAGAAGGCTCCTTTGAGTTCCGTAACATGAAGGCCACTTCC  
AACACTTTGGAAGAATTTGAACATGGTTCGTACCCAGCGGAAATGTCCAGACCT  
GCCACCACTACCCGTAACGGTTTTTATGGAAGCTCAAGGTGCTGGTATTCAAATC  
ATCATGCAAGCTGATTTAGCTTTGAAGATGGGTGTGCCAATTTACGGTATIGTT  
GCCATGGCTGCTACCGCCACCGATAAGATTGGTAGATCTGTGCCAGCTCCAGGT  
AAGGGTATTTTAACCACTGCTCGTGAACACCACTCCAGTGTAAAGTATGCTTCA  
CCAAACTTGAACATGAAGTACAGAAAGCGCCAATTGGTTACTCGTGAAGCTCAG

ATTAAGATTGGGTAGAAAACGAATTGGAAGCTTTGAAGTTGGAGGCCGAAGAA  
ATTCCAAGCGAAGACCAAAAACGAGTTCTTACTTGAACGTACCAGAGAAAATCCAC  
AACGAAGCTGAAAAGTCAATTGAGAGCTGCACAACAACAATGGGGTAACGACTTC  
TACAAGAGGGACCCACGTATTGCTCCATTGAGAGGAGCACTGGCTACTTACGGT  
TTAACTATTGATGACTTGGGTGTGCTTCATTCACCGGTACATCCACAAAAGGCT  
AATGACAAGAACGAATCTGCCACAATTAATGAAATGATGAAGCATTGGGTAGA  
TCTGAAGGTAATCCCGTCATTGGTGTTCCTCCAAAAGTTCTTGACTGGTCATCCA  
AAGGGTGCTGCTGGTGCATGGATGATGAATGGTGTCTTTGCAAATTCCTAAACAGT  
GGTATTATTCCAGGTAACCGTAACGCTGATAACGTGGATAAGATCTTGGAGCAA  
TTTGAATACGCTCTGTACCCATCCAAGACTTTAAAGACCGACGGTGTGAGAGCC  
GTGTCCATCACTTCTTTGGTTCCTTGGTCAAAAAGGGTGGTCAAGCTATTGTGGTT  
CATCCAGACTACTTATAACGGTGCCTATCACTGAAGACAGATAACAACGAGTATGTC  
GCCAAGGTTAGTGCAGAGAGAAAAGTGCCTACAAATTCCTTCCATAATGGTATG  
ATCTACAACAAGTTGTTCGTAAGTAAAGAGCATGCTCCATACACTGATGAATTG  
GAAGAGGATGTTTACTTGGACCCATTAGCCCGTGTATCTAAGGATAAGAAATCA  
GGCTCCTTGACTTCAACTCTAAAAACATCCAAAGCAAGGACAGTTACATCAAT  
GCTAACACCATTGAAACTGCCAAGATGATTGAAAACATGACCAAGGAGAAAAGTC  
TCTAACGGTGGCGTGGTGTAGATGTTGAATTAATCACTAGCATCAACGTTGAA  
AATGATACTTTTATCGAGCGCAATTTACCCCGCAAGAAATAGAGTACTGCAGC  
GCGCAGCCTAGTGTGCAAAGCTCTTTGCTGGGACATGGTCCGCCAAAGAGGCT  
GTTTCAAGTCCTTAGGCGTCAAGTCCTTAGGCGGTGGTGCATTGAAAGAC  
ATCGAAATCGTACGCGTTAACAAAAACGCTCCAGCCGTTGAACTGCACGGTAAAC  
GCCAAAAGGCTGCCGAAGAAGCTGGTGTACCGATGTGAAGGTATCTATTTCT  
CACGATGACCTCCAAGCTGTGCGGTGCGGTTTCTACTAAGAAATAG

**FAS2-Terminator:**

AGAGAGCACTACGTAGTCCCTCTTTTAATATGTAACGTGTGCTTCTATTTATC  
AGACATAATAGTAATTACTTTGTTATTTTCTATCGTTTCCTTACTTTAGCCTC  
TGATTTGATCTGGCCTAATCATTTGTGTACGTCATAATCATATGGCCCTGAGC  
GTACACACCGTTCAATTTCTTCTATTTGGTGGCCACACAAATTCGCGCGGGG  
CATATTGACCGTGAAGAATAGAAGTCCGCGTAGCAGCTCT

**GFP:**

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTGGAG  
CTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGGCGGGCGAGGGGAGGGC  
GATGCCACCAACGGCAAGCTGACCCGTAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTG  
CCCGTGGCCACCCCTCGTGAACACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTC  
AGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC  
GAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTCCTTCAAGGACGACGGCACCTACAAG  
ACCCGCGCGGAGGTGAAGTTCGAGGGGCGACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTG  
AAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTAC

AACTTCAACAGCCACAACGTCTATATCACGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATC  
AAGGCGAACTTCAAGATCCGCCACAACGTTCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCC  
GACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC  
AACCACTACCTGAGCACCCAGTCCAAGCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGC  
GATCACATGGTCCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATG  
GACGAGCTGTACAAGTAG

### **C.2.2 Plasmide**

Die kompletten Sequenzen der Ausgangsplasmide Mgf360\_M\_5, Mgf360\_M12, VR749\_3\_4, VR788\_1\_1 und VR788\_2\_1 befinden sich auf der beiliegenden Daten-CD.

### **C.2.3 Daten-CD**

Dieser Dissertation liegt eine Daten-CD mit den folgenden Inhalten bei:

- Elektronische Fassung dieser Dissertation
- DNA-Sequenzen der Plasmide:
  - Mgf360\_M\_5
  - Mgf360\_M\_12
  - VR749\_3\_4
  - VR788\_1\_1
  - VR788\_2\_1



## D Abkürzungen und Nomenklatur

### D.1 Abkürzungen

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen gelistet. Nicht extra ausgewiesen sind die Standardeinheitenzeichen aus dem internationalen Einheitensystem (SI), Aminosäuren, die ausschließlich im Einbuchstabencode angegeben sind, sowie Gen-Namen, die unten separat beschrieben sind.

°C	Grad Celsius (als Einheit der Temperatur)
4-HB	4-helikales Bündel
5-FOA	5-Fluororotsäure
Abf1p	<i>ARS-binding factor 1</i>
Ac	Acetyl
ACP	<i>Acyl Carrier Protein</i>
AcpS	<i>holo-acyl carrier protein synthase</i>
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ARS	<i>Artificial replication site</i>
AS	Aminosäure(n)
Asc	<i>Ascomycota</i>
AT	Acetyltransferase
bFAS	Bakterielle FAS
BIS-TRIS	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
CD	Circulardichroismus
CEN	<i>(Yeast) centromere</i>
CoA	Coenzym A
CYC1	Cytochrom C, Isoform 1
Da	Dalton (1 Da = 1 g/mol)
DH	Dehydratase
DMMA	2,3-Dimethylmaleinsäureanhydrid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DRS	<i>Downstream Repression Site</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat- $\text{Na}_4$ -Salz
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Enoylreduktase
ESI	<i>Electrospray ionisation</i>
EUROSCARF	<i>European Saccharomyces Cervisiae Archive For Functional Analysis</i>
evtl.	eventuell
Faa1p	<i>Fatty acid activation Protein 1</i>
FAS	<i>Fatty acid synthase</i> (Fettsäuresynthase)
FAS I	Typ I FAS
FAS II	Typ II FAS
fFAS	Fungal FAS (Pilz-FAS)
FMN	Flavinmononukleotid
FS	Fettsäure(n)
g	Gramm
<i>g</i>	mittlere Erdbeschleunigung
G418	Geneticin*2 · $\text{H}_2\text{SO}_4$
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPD	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
h	Stunde(n)
his	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	Horseradish peroxidase
ICRE	Inositol/ cholin responsive element
IgG	Immunglobulin G
Ino2p	inositol-1-phosphate synthase assoziiertes Protein 2
Ino4p	inositol-1-phosphate synthase assoziiertes Protein 4
kb	Kilobasenpaare
KR	Ketoreduktase
KS	Ketoacylsynthase
LB	Lysogeny Broth
leu	Leucin
LiOAc	Lithiumacetat
lys	Lysin
MAT	Malonyl-/ Acyltransferase
MCE	<i>Mixed Cellulose Esters</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mFAS	Metazoen-FAS
min	Minute(n)
MPT	Malonyl-/ Palmitoyltransferase
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MRW	<i>Mean residue weight</i>

NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphathydrid
NaPi	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> und NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in veränderlichem Verhältnis
neg. Ref.	Negativreferenz
OD(600)	Optische Dichte bei 600 nm
Ole1p	<i>Oleic acid requiring</i> Protein 1
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDB	Protein <i>data base</i>
PEG	Polyethylenglycol
PES	Polyethylenstyrol
PISA	Protein <i>interfaces, surfaces and assemblies</i>
PKS I	Polyketidsynthase(n) vom Typ I
PPT	Phosphopantetheintransferase
PUFA	<i>Poly unsaturated fatty acids</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
<i>R. toruloides</i>	<i>Rhodospiridium toruloides</i>
<i>R. toruloides</i>	<i>Rhodospiridium toruloides</i>
Rap1p	<i>Repressor/activator protein 1</i>
Reb1p	RNA <i>polymerase enhancer binding protein 1</i>
Ref.	Referenz
rel.	relativ(e)
Rho	<i>Rhodospiridium</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RtFAS	Typ I FAS aus <i>Rhodospiridium toruloides</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ScFAS	Typ I FAS aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	<i>Synthetic Defined</i>
SDF	<i>Synthetic Defined plus free Fatty acids</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfat</i>
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
SecM	<i>Secretion Monitoring Protein</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TlanFAS	Typ I FAS aus <i>Thermomyces lanuginosus</i>
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
Tre	<i>Tremellomycetes</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
trp	Tryptophan
TST	Twin-Strep-tag(R)

Upm	Umdrehungen pro Minute
ura	Uracil
WB	Western Blot
WT	Wildtyp (im genetischen Kontext)
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
YPDF	<i>Yeast Peptone Dextrose Fatty acids</i>
z.B.	zum Beispiel

## D.2 Nomenklatur von Genen

Hefegene werden in Anwendung etablierter Systematik (Saccharomyces Genome Database, <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>) mit drei kursiven Buchstaben und einer hinten angestellten Zahl beschrieben. Die Zahl benennt separate Gene für eine gemeinsame Funktion der resultierenden Proteine, z.B. einen Stoffwechselprozess. Unmutierte WT-Gene werden hier simplifiziert in Großbuchstaben (z.B. *FAS1*) und mutierte Gene in Kleinbuchstaben unter Angabe der Mutation (z.B. *fas2\_K2S*, Punktmutation von Lysin an Position zwei zu Serin) angegeben. Die komplette Deletion eines Gens wird durch das Voranstellen von  $\Delta$  gekennzeichnet (z.B.  $\Delta fas1$ ), während partielle Deletionen unter Angabe der deletierten Strukturelemente (Nummerierung nach (Jenni *et al.*, 2007)) oder Aminosäuren (Nummerierung 1-n beginnend mit N-Terminus) hinten angestellt sind (z.B. *fas2- $\Delta\alpha 67/68$* , *Deletion der  $\alpha$ -Helices 67 und 68*). Der Austausch von Genen, formal durch vollständige Deletion eines Ursprungsgens bei gleichzeitiger Insertion eines neuen Gens an diese Stelle, wird mit „::“ angezeigt (z.B. *fas1::uptag-kanMX4-downtag*, Austausch von *FAS1* gegen eine *kanMX4*-Kassette inklusive flankierender Bereiche (Wach *et al.* (1994))). Genfusionen werden durch Bindestrich gekennzeichnet (z.B. *fas1- $\alpha 1$* , bzgl. des codierten Proteins C-terminale Fusion der  $\alpha 1$ -Helix an das *FAS1*-codierte Protein). Die jeweilig codierten Proteine werden, falls nicht mit einem Trivialnamen benannt, unter ihrem Gennamen mit angefügtem, kleinem “p“ geführt (z.B. Fas1p für die *FAS1*-codierte  $\beta$ -Kette der ScFAS).

## Abbildungsverzeichnis

2.1	Formaler Reaktionszyklus der FS-Biosynthese in Pilzen. . . . .	4
2.2	Strukturvergleich der drei FAS I-Varianten. . . . .	7
2.3	Schematische Darstellung der Entwicklung der Pilz-FAS aus <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	9
2.4	Quartärstrukturorganisation der ScFAS. . . . .	10
2.5	$\alpha$ - $\alpha$ - und $\alpha$ - $\beta$ -Interaktionen in der fFAS. . . . .	12
2.6	Phosphopantetheinylierung von ACP. . . . .	13
2.7	Übersicht der unterschiedlichen fFAS-Typen. . . . .	15
2.8	Regulation der ScFAS in Expression und Proteolyse. . . . .	16
4.1	Struktur und Aktivität der Fettsäuresynthase aus <i>R. toruloides</i> (RtFAS). . . . .	41
4.2	Phylogenetische Analyse von fFAS mit dupliziertem ACP. . . . .	42
4.3	Übersicht rekombinanter artifizierender Konstrukte der ScFAS- $\alpha$ -Kette und ihrer Eigenschaften. . . . .	44
4.4	Erzeugung des $\Delta fas1/\Delta fas2$ -Deletionsstamms <i>BY.PK1238_1A_KO</i> . . . . .	47
5.1	Strukturelle Charakterisierung der MPT-Domäne und Ansichten weiterer Protein-Protein-Kontakte in der TlanFAS. . . . .	50
5.2	Disassemblierung der ScFAS mit Dimethylmaleinsäureanhydrid. . . . .	53
5.3	<i>In-vivo</i> -Evaluierung des $\beta$ - $\alpha$ -Schnittstellenmotivs in der ScFAS. . . . .	56
5.4	Primärstrukturanalyse der $\alpha$ 1-Helix in der ScFAS. . . . .	58
5.5	Strukturelle Grundlage zur Konstruktion der fFAS-Nachbauten. . . . .	61
5.6	<i>In-vivo</i> -Evaluierung von artifizierender Nachbauten anderer fFAS-Typen. . . . .	63
5.7	<i>In-vivo</i> -Evaluierung intramolekular Assemblierungs-inhibierter FAS-Konstrukte. . . . .	66
5.8	Sekundärstrukturanalyse der interagierenden Termini von $\beta$ - und $\alpha$ -Kette der ScFAS. . . . .	67
5.9	Ergebnis und strukturelle Grundlagen des <i>split</i> -GFP-Tests. . . . .	69
6.1	Postuliertes Modell zur Assemblierung der Fettsäuresynthase aus <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	73
6.2	Assemblierungs-Inhibierung der ScFAS. . . . .	74
B.1	<i>Blue Native</i> PAGE nach Disassemblierung der ScFAS mit Dimethylmaleinsäureanhydrid. . . . .	101
B.2	Fettsäurebedarf von <i>BY.PK1238_1A_KO</i> . . . . .	101
B.3	Biologische Replikationen zu Ergebnissen in Kap. 5.3 ff. . . . .	102
B.4	Ungeschnittene <i>Western Blot</i> -Aufnahmen. . . . .	103

B.5	<i>Spotting</i> -Test peptidischer Inhibitoren. . . . .	103
B.6	<i>Spotting</i> -Test weiterer Punktmutationen. . . . .	104
C.4	pAG426-Vektor mit inklonierter $\alpha$ 1-Helix (exemplarisch). . . . .	106

## Tabellenverzeichnis

3.1	Synthetische Peptide . . . . .	22
3.2	Antikörper . . . . .	22
3.3	<i>S. cerevisiae</i> -Stämme. . . . .	23
5.1	Interaktionsflächen und Energiegewinne in der TlanFAS. . . . .	51
5.2	Übersicht der <i>S. cerevisiae</i> -Stämme zur Evaluierung der Schnittstellenmotive in der ScFAS. . . . .	55
5.3	Übersicht der <i>S. cerevisiae</i> -Stämme zur Evaluierung von artifiziellen ffAS- Nachbauten und deren Schnittstellenmotiven. . . . .	62
5.4	Übersicht der <i>S. cerevisiae</i> -Stämme zur Evaluierung einer Assemblierungs- inhibierung durch intramolekulare Konkurrenz. . . . .	65
A.1	Restriktionsenzyme und Polymerasen . . . . .	77
A.2	Chemikalien . . . . .	78
A.3	Synthetische Oligonukleotide / <i>Primer</i> . . . . .	81
A.4	Plasmide. . . . .	88
A.5	Kommerzielle Kits . . . . .	95
A.6	Geräte . . . . .	96
A.7	Verbrauchsmaterialien . . . . .	98
A.8	Software und Datenbanken . . . . .	99
A.9	Proteinsequenzen. . . . .	100





## Literaturverzeichnis

- Agostini, M., Silva, S. D., Zecchin, K. G., Coletta, R. D., Jorge, J., Loda, M., and Graner, E.: *Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells*, *Oral Oncology*, 40, 728–735, 2004.
- Alberti, S., Gitler, A. D., and Lindquist, S.: *A suite of Gateway cloning vectors for high-throughput genetic analysis in Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 24, 913–919, 2007.
- Arkin, M. R., Glicksman, M. A., Haiyan, F., Havel, J. J., and Du, Y.: *Inhibition of Protein-Protein Interactions: Non-Cellular Assay Formats*, *Assay Guidance Manual*, 2012.
- Balakrishnan, B., Kim, H.-J., Suh, J.-W., Chen, C.-C., Liu, K.-H., Park, S.-H., and Kwon, H.-J.: *Monascus azaphilone pigment biosynthesis employs a dedicated fatty acid synthase for short chain fatty acyl moieties*, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 57, 191–196, 2014.
- Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K., Wilson, T., Collins, D., de Lisle, G., and Jacobs, W.: *inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis*, *Science*, 263, 227–230, 1994.
- Berg, O. G. and Hippel, P. H. v.: *Diffusion-Controlled Macromolecular Interactions*, *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 14, 131–158, 1985.
- Boehringer, D., Ban, N., and Leibundgut, M.: *7.5-Å Cryo-EM Structure of the Mycobacterial Fatty Acid Synthase*, *Journal of Molecular Biology*, 425, 841–849, 2013.
- Brown, D., Adams, T., and Keller, N.: *Aspergillus has distinct fatty acid synthases for primary and secondary metabolism*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 14 873–14 877, 1996.
- Bukhari, H. T., Jakob, R., and Maier, T.: *Evolutionary Origins of the Multienzyme Architecture of Giant Fungal Fatty Acid Synthase*, *Structure*, 22, 1775–1785, 2014.
- Bunkoczi, G., Pasta, S., Joshi, A., Wu, X., Kavanagh, K. L., Smith, S., and Oppermann, U.: *Mechanism and Substrate Recognition of Human Holo ACP Synthase*, *Chemistry & Biology*, 14, 1243–1253, 2007.
- Bunkoczi, G., Misquitta, S., Wu, X., Lee, W. H., Rojkova, A., Kochan, G., Kavanagh, K. L., Oppermann, U., and Smith, S.: *Structural Basis for Different Specificities of Acyltransferases Associated with the Human Cytosolic and Mitochondrial Fatty Acid Synthases*, *Chemistry & Biology*, 16, 667–675, 2009.

- Caban, M., Strapagiel, D., Dziadek, J., Korycka-Machala, M., and Grzelak, A.: *Principles of a New Protocol for Prediction of Azole Resistance in Candida albicans Infections on the Basis of ERG11 Polymorphisms*, Current Microbiology, 73, 172–182, 2016.
- Cabantous, S., Terwilliger, T. C., and Waldo, G. S.: *Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein*, Nature Biotechnology, 23, 102–107, 2005.
- Cabantous, S., Nguyen, H. B., Pedelacq, J.-D., Koraichi, F., Chaudhary, A., Ganguly, K., Lockard, M. A., Favre, G., Terwilliger, T. C., and Waldo, G. S.: *A New Protein-Protein Interaction Sensor Based on Tripartite Split-GFP Association*, Scientific Reports, 3, 2013.
- Chatterjee, S., Alampalli, S. V., Nageshan, R. K., Chettiar, S. T., Joshi, S., and Tatu, U. S.: *Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen Candida auris*, BMC Genomics, 16, 1–16, 2015.
- Chayakulkeeree, M.: *Fatty Acid Synthesis Is Essential for Survival of Cryptococcus neoformans and a Potential Fungicidal Target*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51, 3537–3545, 2007.
- Chirala, S.: *Coordinated regulation and inositol-mediated and fatty acid-mediated repression of fatty acid synthase genes in Saccharomyces cerevisiae*, PNAS, 89, 10 232–10 236, 1992.
- Chirgadze, N. Y., Briggs, S. L., McAllister, K. A., Fischl, A. S., and Zhao, G.: *Crystal structure of Streptococcus pneumoniae acyl carrier protein synthase: an essential enzyme in bacterial fatty acid biosynthesis*, The EMBO Journal, 19, 5281–5287, 2000.
- Ciccarelli, L., Connell, S., Enderle, M., Mills, D., Vonck, J., and Gringer, M.: *Structure and Conformational Variability of the Mycobacterium tuberculosis Fatty Acid Synthase Multienzyme Complex*, Structure, 21, 1251–1257, 2013.
- Cok, S. J., Martin, C. G., and Gordon, J. I.: *Transcription of INO2 and INO4 is regulated by the state of protein N-myristoylation in Saccharomyces cerevisiae*, Nucleic Acids Research, 26, 2865–2872, 1998.
- Crawford, J. M., Korman, T. P., Labonte, J. W., Vagstad, A. L., Hill, E. A., Kamari-Bidkorpeh, O., Tsai, S.-C., and Townsend, C. A.: *Structural basis for biosynthetic programming of fungal aromatic polyketide cyclization*, Nature Chemical Biology, 461, 1139–1143, 2009.
- Day, E. S., Cote, S. M., and Whitty, A.: *Binding Efficiency of Protein-Protein Complexes*, Biochemistry, 51, 9124–9136, 2012.
- Duncan, C. D. S. and Mata, J.: *Widespread Cotranslational Formation of Protein Complexes*, PLoS Genetics, 7, e1002398, 2011.

- Edmond, M. B., Wallace, S. E., McClish, D. K., Pfaller, M. A., Jones, R. N., and Wenzel, R. P.: *Nosocomial Bloodstream Infections in United States Hospitals: A Three-Year Analysis*, *Clinical Infectious Diseases*, 29, 239–244, 1999.
- Egner, R., Thumm, M., Straub, M., Simeon, A., Schüller, H. J., and Wolf, D. H.: *Tracing intracellular proteolytic pathways. Proteolysis of fatty acid synthase and other cytoplasmic proteins in the yeast Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry*, 268, 27 269–27 276, 1993.
- Enderle, M., McCarthy, A., Paithankar, K. S., and Grininger, M.: *Crystallization and X-ray diffraction studies of a complete bacterial fatty-acid synthase type I*, *Acta Crystallographica, Section F*, 71, 1401–1407, 2015.
- Erwin, J. A.: *Lipids and biomembranes of eukaryotic microorganisms*, Academic Press, New York, pp. 42–80, 1973.
- Fichtlscherer, F., Wellein, C., Mittag, M., and Schweizer, E.: *A novel function of yeast fatty acid synthase*, *European Journal of Biochemistry*, 267, 2666–2671, 2000.
- Fischer, M., Rhinow, D., Zhu, Z., Mills, D. J., Zhao, Z. K., Vonck, J., and Grininger, M.: *Cryo-EM structure of fatty acid synthase (FAS) from Rhodosporidium toruloides provides insights into the evolutionary development of fungal FAS*, *Protein Science*, 24, 987–995, 2015.
- Fischer, M., Mulinacci, B., Vollrath, R., Konstantinidis, K., Kötter, P., Ciccarelli, L., Vonck, J., Oesterhelt, D., and Grininger, M.: *Molecular mechanisms in fungal fatty acid synthase assembly*, PNAS, Manuskript eingereicht, 2016.
- Ford, C. B., Funt, J. M., Abbey, D., Issi, L., Guiducci, C., Martinez, D. A., Delorey, T., Li, B. y., White, T. C., Cuomo, C., Rao, R. P., Berman, J., Thompson, D. A., and Regev, A.: *The evolution of drug resistance in clinical isolates of Candida albicans*, *eLIFE*, 4, e00 662, 2015.
- Foulke-Abel, J. and Townsend, C. A.: *Demonstration of Starter Unit Interprotein Transfer from a Fatty Acid Synthase to a Multidomain, Nonreducing Polyketide Synthase*, *ChemBioChem*, 13, 1880–1884, 2012.
- Gemperlein, K., Rachid, S., Garcia, R. O., Wenzel, S. C., and Muller, R.: *Polyunsaturated fatty acid biosynthesis in myxobacteria: different PUFA synthases and their product diversity*, *Chemical Science*, 5, 1733–1741, 2014.
- Gietz, R. D. and Schiestl, R. H.: *High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method*, *Nature Protocols*, 2, 31–34, 2007.
- Greenfield, N. J.: *Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure*, *Nature Protocols*, 1, 2876–2890, 2006.

- Grininger, M.: *Perspectives on the evolution, assembly and conformational dynamics of fatty acid synthase type I (FAS I) systems*, Current Opinion in Structural Biology, 25, 49–56, 2014.
- Harwood, J. L. and Guschina, I. A.: *The versatility of algae and their lipid metabolism*, Biochimie, 91, 679–684, 2009.
- Hedayati, M. T., Pasqualotto, A. C., Warn, P. A., Bowyer, P., and Denning, D. W.: *Aspergillus flavus: human pathogen, allergen and mycotoxin producer*, Microbiology, 153, 1677–1692, 2007.
- Herbst, D. A., Jakob, R. P., Zähringer, F., and Maier, T.: *Mycocerosic acid synthase exemplifies the architecture of reducing polyketide synthases*, Nature, 531, 533–537, 2016.
- Hite, K. C., Kalashnikova, A. A., and Hansen, J. C.: *Coil-to-helix transitions in intrinsically disordered methyl CpG binding protein 2 and its isolated domains*, Protein Science, 21, 531–538, 2012.
- Hofbauer, H., Schopf, F., Schleifer, H., Knittelfelder, O., Pieber, B., Rechberger, G., Wolinski, H., Gaspar, M., Kappe, C. O., Stadlmann, J., Mechtler, K., Zenz, A., Lohner, K., Tehlivets, O., Henry, S., and Kohlwein, S.: *Regulation of Gene Expression through a Transcriptional Repressor that Senses Acyl-Chain Length in Membrane Phospholipids*, Developmental Cell, 29, 729–739, 2014.
- Hoja, U., Marthol, S., Hofmann, J., Stegner, S., Schulz, R., Meier, S., Greiner, E., and Schweizer, E.: *HFA1 Encoding an Organelle-specific Acetyl-CoA Carboxylase Controls Mitochondrial Fatty Acid Synthesis in Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Biological Chemistry, 279, 21 779–21 786, 2004.
- Huh, W.-K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., and O’Shea, E. K.: *Global analysis of protein localization in budding yeast*, Nature, 425, 686–691, 2003.
- Iwata, K.: *Drug Resistance in Human Pathogenic Fungi*, European Journal of Epidemiology, 8, 407–421, 1992.
- Jenni, S., Leibundgut, M., Boehringer, D., Frick, C., Mikolajsek, B., and Ban, N.: *Structure of Fungal Fatty Acid Synthase and Implications for Iterative Substrate Shuttling*, Science, 316, 254–261, 2007.
- Johansson, P., Wiltschi, B., Kumari, P., Kessler, B., Vonnheim, C., Vonck, J., Oesterhelt, D., and Grininger, M.: *Inhibition of the fungal fatty acid synthase type I multienzyme complex*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 105, 12 803–12 808, 2008.
- Johansson, P., Mulinacci, B., Koestler, C., Vollrath, R., Oesterhelt, D., and Grininger, M.: *Multimeric Options for the Auto-Activation of the Saccharomyces cerevisiae FAS Type I Megasyntase*, Structure, 17, 1063–1074, 2009.

- Jung, G., Wiehler, J., and Zumbusch, A.: *The Photophysics of Green Fluorescent Protein: Influence of the Key Amino Acids at Positions 65, 203, and 222*, *Biophysical Journal*, 88, 1932–1947, 2005.
- Kastritis, P. L. and Bonvin, A. M. J. J.: *Molecular origins of binding affinity: seeking the Archimedean point*, *Current Opinion in Structural Biology*, 23, 868–877, 2013.
- Kathiravan, M. K., Salake, A. B., Chothe, A. S., Dudhe, P. B., Watode, R. P., Mukta, M. S., and Gadhwe, S.: *The biology and chemistry of antifungal agents: A review*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 5678–5698, 2012.
- Kohlwein, S. D.: *Obese and anorexic yeasts: Experimental models to understand the metabolic syndrome and lipotoxicity*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801, 222–229, 2010.
- Kötter, P., Weigand, J. E., Meyer, B., Entian, K.-D., and Suess, B.: *A fast and efficient translational control system for conditional expression of yeast genes*, *Nucleic Acids Research*, 37, 2009.
- Krissinel, E.: *Crystal contacts as nature's docking solutions*, *Journal of Computational Chemistry*, 31, 133–143, 2010.
- Krissinel, E. and Henrick, K.: *Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State*, *Journal of Molecular Biology*, 372, 774–797, 2007.
- Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C., and Walsh, C. T.: *A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases*, *Chemistry & Biology*, 3, 923–936, 1996.
- Leibundgut, M., Jenni, S., Frick, C., and Ban, N.: *Structural Basis for Substrate Delivery by Acyl Carrier Protein in the Yeast Fatty Acid Synthase*, *Science*, 316, 288–290, 2007.
- Levy, E. D., Erba, E. B., Robinson, C. V., and Teichmann, S. A.: *Assembly reflects evolution of protein complexes*, *Nature*, 453, 1262–1265, 2008.
- Lomakin, I. B., Xiong, Y., and Steitz, T. A.: *The Crystal Structure of Yeast Fatty Acid Synthase, a Cellular Machine with Eight Active Sites Working Together*, *Cell*, 129, 319–332, 2007.
- Luker, K. E., Smith, M. C. P., Luker, G. D., Gammon, S. T., Piwnica-Worms, H., and Piwnica-Worms, D.: *Kinetics of regulated protein-protein interactions revealed with firefly luciferase complementation imaging in cells and living animals*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 12 288–12 293, 2004.
- Lundblad, V. and Struhl, K.: *Yeast*, *Current Protocols in Molecular Biology*, 2001.
- Lynen, F.: *Yeast Fatty Acid Synthase*, vol. 14, pp. 17–33, Academic Press, 1969.

- Lynen, F., Engeser, H., Foerster, E.-C., Fox, J. L., Hess, S., Kresze, G.-B., Schmitt, T., Schreckenbach, T., Siess, E., Wieland, F., and Winnewisser, W.: *On the Structure of Fatty Acid Synthetase of Yeast*, European Journal of Biochemistry, 112, 431–442, 1980.
- Maier, T., Leibundgut, M., and Ban, N.: *The Crystal Structure of a Mammalian Fatty Acid Synthase*, Science, 321, 1315–1322, 2008.
- Maier, T., Leibundgut, M., Boehringer, D., and Ban, N.: *Structure and function of eukaryotic fatty acid synthases*, Quarterly Reviews of Biophysics, 43, 373–422, 2010.
- Marsh, J. and Teichmann, S.: *Relative Solvent Accessible Surface Area Predicts Protein Conformational Changes upon Binding*, Structure, 19, 859–867, 2011.
- Marsh, J., Hernandez, H., Hall, Z., Ahnert, S., Perica, T., Robinson, C., and Teichmann, S.: *Protein Complexes Are under Evolutionary Selection to Assemble via Ordered Pathways*, Cell, 153, 461–470, 2013.
- Marsh, J. A. and Teichmann, S. A.: *How do proteins gain new domains?*, Genome Biology, 11, 1–4, 2010.
- Marsh, J. A. and Teichmann, S. A.: *Parallel dynamics and evolution: Protein conformational fluctuations and assembly reflect evolutionary changes in sequence and structure*, Bioessays, 36, 209–218, 2014.
- Marsh, J. A. and Teichmann, S. A.: *Structure, Dynamics, Assembly, and Evolution of Protein Complexes*, Annual Review of Biochemistry, 84, 2015.
- McCarthy, A. D. and Hardie, D. G.: *Fatty acid synthase an example of protein evolution by gene fusion*, Trends in biochemical sciences, 9, 60–63, 1984.
- Mehrishi, J. N.: *Molecular aspects of the mammalian cell surface*, Progress in Biophysics and Molecular Biology, 25, 1–68, 1972.
- Meyer, K.-H. and Schweizer, E.: *Control of Fatty-Acid Synthetase Levels by Exogeneous Long-Chain Fatty Acids in the Yeasts Candida lipolytica and Saccharomyces cerevisiae*, European Journal of Biochemistry, 65, 317–324, 1976.
- Miceli, M. H., Diz, J. A., and Lee, S. A.: *Emerging opportunistic yeast infections*, The Lancet Infectious Diseases, 11, 142–151, 2011.
- Morisaki, N., Funabashi, H., Shimazawa, R., Furukawa, J., and Kawaguchi, A.: *side-chain structure on inhibition*, European Journal of Biochemistry, 211, 111–115, 1993.
- Nguyen, L. N., Trofa, D., and Nosanchuk, J. D.: *Fatty Acid Synthase Impacts the Pathobiology of Candida parapsilosis In Vitro and during Mammalian Infection*, PLoS ONE, 4, e8421, 2009.

- Njei, B., Kongnyuy, E. J., Kumar, S., Okwen, M. P., Sankar, M. J., and L, M.: *Optimal timing for antiretroviral therapy initiation in patients with HIV infection and concurrent cryptococcal meningitis.*, Cochrane Database of Systematic Reviews, 2013.
- Oesterhelt, D., Bauer, H., and Lynen, F.: *Crystallization of a Multienzyme Complex: Fatty Acid Synthetase from Yeast*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 63, 1377–1382, 1969.
- Parris, K. D., Lin, L., Tam, A., Mathew, R., Hixon, J., Stahl, M., Fritz, C. C., Seehra, J., and Somers, W. S.: *Crystal structures of substrate binding to Bacillus subtilis holo-(acyl carrier protein) synthase reveal a novel trimeric arrangement of molecules resulting in three active sites*, Structure, 8, 883–895, 2000.
- Paulmurugan, R. and Gambhir, S. S.: *Combinatorial Library Screening for Developing an Improved Split-Firefly Luciferase Fragment-Assisted Complementation System for Studying Protein-Protein Interactions*, Analytical Chemistry, 79, 2346–2353, 2007.
- Pedelacq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C., and Waldo, G. S.: *Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein*, Nature Biotechnology, 24, 79–88, 2006.
- Pelay-Gimeno, M., Glas, A., Koch, O., and Grossmann, T. N.: *Structure-Based Design of Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Mimicking Peptide Binding Epitopes*, Angewandte Chemie (International Edition), 54, 8896–8927, 2015.
- Perfect, J. R., Dismukes, W. E., Dromer, F., Goldman, D. L., Graybill, J. R., Hamill, R. J., Harrison, T. S., Larsen, R. A., Lortholary, O., Nguyen, M.-H., Pappas, P. G., Powderly, W. G., Singh, N., Sobel, J. D., and Sorrell, T. C.: *Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America*, Clinical Infectious Diseases, 50, 291–322, 2010.
- Pintor-Toro, J. A., Hernandez, F., Lopez-Rivas, A., and Palacian, E.: *Protein-deficient ribosomal particles obtained by reversible modification with dimethylmaleic anhydride*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 210, 786–789, 1981.
- Prole, D. L. and Taylor, C. W.: *Identification and Analysis of Cation Channel Homologues in Human Pathogenic Fungi*, PLoS ONE, 7, e42404, 2012.
- Quintyn, R., Yan, J., and Wysocki, V.: *Surface-Induced Dissociation of Homotetramers with D2 Symmetry Yields their Assembly Pathways and Characterizes the Effect of Ligand Binding*, Chemistry & Biology, 22, 2015.
- Robert, J., Duronio, L., Knoll, J., and Gordon, J. I.: *Isolation of a Saccharomyces cerevisiae long chain fatty acyl:CoA synthetase gene (FAA1) and assessment of its role in protein N-myristoylation*, The Journal of Cell Biology, 117, 515–529, 1992.

- Ruth, L. and Javier, A. M.: *Pharmacological Inhibitors of Fatty Acid Synthase (FASN)-Catalyzed Endogenous Fatty Acid Biogenesis: A New Family of Anti-Cancer Agents?*, Current Pharmaceutical Biotechnology, 7, 483–494, 2006.
- Rutkowska, A., Beerbaum, M., Rajagopalan, N., Fiaux, J., Schmieder, P., Kramer, G., Oschkinat, H., and Bukau, B.: *Large-scale purification of ribosome-nascent chain complexes for biochemical and structural studies*, FEBS Letters, 583, 2407–2413, 2009.
- Schueller, H.-J., Foertsch, B., Rautenstrauss, B., Wolf, D. H., and Schweizer, E.: *Differential proteolytic sensitivity of yeast fatty acid synthetase subunits*, European Journal of Biochemistry, 203, 607–614, 1992.
- Schüller, H.-J., Schütz, A., Knab, S., Hoffmann, B., and Schweizer, E.: *Importance of General Regulatory Factors Rap1p, Abf1p and Reb1p for the Activation of Yeast Fatty Acid Synthase Genes FAS1 and FAS2*, European Journal of Biochemistry, 225, 213–222, 1994.
- Schwank S, Hoffmann B, S. H.: *Influence of gene dosage and autoregulation of the regulatory genes INO2 and INO4 on inositol/choline-repressible gene transcription in the yeast Saccharomyces cerevisiae*, Current Genetics, 31, 462–468, 1997.
- Schweizer, E. and Hofmann, J.: *Microbial Type I Fatty Acid Synthases (FAS): Major Players in a Network of Cellular FAS Systems*, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 68, 501–517, 2004.
- Schweizer, E., Meyer, K.-H., Schweizer, M., Werkmeister, K., and Fischer, W.: *Regulation of Fatty Acid Synthesis in Yeast Mutants A2 - Dils Raymond*, pp. 11–19, Pergamon, 1978.
- Shen, H., Gong, Z., Yang, X., Jin, G., Bai, F., and Zhao, Z. K.: *Kinetics of continuous cultivation of the oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides*, Journal of Biotechnology, 168, 85–89, 2013.
- Shpilka, T., Welter, E., Borovsky, N., Amar, N., Shimron, F., Peleg, Y., and Elazar, Z.: *Fatty acid synthase is preferentially degraded by autophagy upon nitrogen starvation in yeast*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 112, 1434–1439, 2015.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., and Higgins, D. G.: *Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega*, Molecular Systems Biology, 7, 2011.
- Sikorski, R. S. and Hieter, P.: *A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in Saccharomyces Cerevisiae*, Genetics, 122, 19–27, 1989.



- Stuible, H.-P., Meier, S., Wagner, C., Hannappel, E., and Schweizer, E.: *A Novel Phosphopantetheine:Protein Transferase Activating Yeast Mitochondrial Acyl Carrier Protein*, Journal of Biological Chemistry, 273, 22 334–22 339, 1998.
- Stukey, J. E., McDonough, V. M., and Martin, C. E.: *Isolation and characterization of OLE1, a gene affecting fatty acid desaturation from Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Biological Chemistry, 264, 16 537–16 544, 1989.
- Sumper, M. and Lynen, F.: *Substrate specificity of fatty acid synthetase from yeast*, FEBS Letters, 28, 142–144, 1972.
- Sumper, M., Riepertinger, C., and Lynen, F.: *Dissociation and reconstitution of the stable multienzyme complex fatty acid synthetase from yeast*, FEBS Letters, 5, 45–49, 1969.
- Tehlivets, O., Scheuringer, K., and Kohlwein, S. D.: *Fatty acid synthesis and elongation in yeast*, Biochimica et Biophysica Acta, 1771, 255–270, 2007.
- Tripathi, K., Mor, V., Bairwa, N., Del Poeta, M., and Mohanty, B.: *Hydroxyurea treatment inhibits proliferation of Cryptococcus neoformans in mice*, Frontiers in Microbiology, 3, 2012.
- Turner, S. A. and Butler, G.: *The Candida pathogenic species complex*, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 4, 2014.
- Uemura, H.: *Synthesis and production of unsaturated and polyunsaturated fatty acids in yeast: current state and perspectives*, Applied Microbiology and Biotechnology, 95, 2012.
- Verwoert, I., Verbree, E. C., van der Linden, K. H., Nijkamp, H. J., and Stuitje, A. R.: *Cloning, nucleotide sequence, and expression of the Escherichia coli fabD gene, encoding malonyl coenzyme A-acyl carrier protein transacylase*, Journal of Bacteriology, 174, 2851–2857, 1992.
- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R., and Philippsen, P.: *New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in Saccharomyces cerevisiae*, YEAST, 10, 1793–1808, 1994.
- Watanabe, C. M. H. and Townsend, C. A.: *Initial Characterization of a Type I Fatty Acid Synthase and Polyketide Synthase Multienzyme Complex NorS in the Biosynthesis of Aflatoxin B1*, Chemistry & Biology, 9, 981–988, 2002.
- Wenz, P., Schwank, S., Hoja, U., and Schueller, H.-J.: *A downstream regulatory element located within the coding sequence mediates autoregulated expression of the yeast fatty acid synthase gene FAS2 by the FAS1 gene product*, Nucleic Acids Research, 29, 4625–4632, 2001.

- Werkmeister, K., Johnston, R. B., and Schweizer, E.: *Complementation in vitro between Purified Mutant Fatty Acid Synthetase Complexes of Yeast*, European Journal of Biochemistry, 116, 303–309, 1981.
- Wey, S. B., Mori, M., Pfaller, M. A., Woolson, R. F., and Wenzel, R. P.: *Hospital-acquired candidemia: The attributable mortality and excess length of stay*, Archives of Internal Medicine, 148, 2642–2645, 1988.
- Wieland, F., Siess, E. A., Renner, L., Verfürth, C., and Lynen, F.: *Distribution of yeast fatty acid synthetase subunits: three-dimensional model of the enzyme*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 75, 5792–5796, 1978.
- Wieland, F., Renner, L., Verfürth, C., and Lynen, F.: *Studies on the Multi-Enzyme Complex of Yeast Fatty-Acid Synthetase*, European Journal of Biochemistry, 94, 189–197, 1979.
- Xie, Y. and Wang, G.: *Mechanisms of fatty acid synthesis in marine fungus-like protists*, Applied Microbiology and Biotechnology, 99, 8363–8375, 2015.
- Zhao, X.-J., McElhaney-Feser, G. E., Bowen, W. H., Cole, M. F., Broedel, S. E., and Cihlar, R. L.: *Requirement for the Candida albicans FAS2 gene for infection in a rat model of oropharyngeal candidiasis*, Microbiology, 142, 2509–2514, 1996.
- Zhu, Z., Zhang, S., Liu, H., Shen, H., Lin, X., Yang, F., Zhou, Y. J., Jin, G., Ye, M., Zou, H., and Zhao, Z. K.: *A multi-omic map of the lipid-producing yeast Rhodosporidium toruloides*, Nature Communications, 3, 11, 2012.
- Zimhony, O., Cox, J. S., Welch, J. T., Vilcheze, C., and Jacobs, W. R.: *Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of Mycobacterium tuberculosis*, Nature Medicine, 6, 1043–1047, 2000.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation:

**Untersuchung molekularer Mechanismen bei der Assemblierung der  
Pilz-Fettsäuresynthase**

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet, und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ort, Datum

(Manuel Fischer)

