

**Molekulargenetische Optimierung der
Sphingoidbasen-Produktion der
nicht-konventionellen Hefe *Pichia ciferrii***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von Christoph Schorsch
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2011

(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der
Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekanin: Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz

Gutachter: Prof. Dr. Eckhard Boles

Prof. Dr. Beatrix Süß

Datum der Disputation:

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 Sphingolipide.....	1
1.2 Sphingolipid-Metabolismus in Hefen.....	4
1.2.1 Biosynthese von Sphingoidbasen	4
1.2.2 Metabolismus von komplexen Sphingolipiden.....	7
1.2.1 Regulation des Sphingolipid- bzw. LCB-Metabolismus	11
1.2.2 Funktionen von Sphingolipiden in Hefe.....	13
1.3 <i>Pichia ciferrii</i>.....	15
1.3.1 <i>de novo</i> Biosynthese von Sphingoidbasen: <i>P. ciferrii</i> vs. <i>S. cerevisiae</i>	16
1.4 Serin-Metabolismus in Hefen	18
1.5 Biosynthese von Palmitoyl-CoA in Hefen	21
1.6 Sphingolipide und die menschliche Haut	23
1.7 Ziele der Arbeit.....	25
2. Material & Methoden.....	27
2.1 Stämme & Medien.....	27
2.1.1 Bakterienstämme	27
2.1.2 Medien & Anzucht von <i>E. coli</i>	27
2.1.3 Hefestämme	27
2.1.4 Medien & Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> & <i>P. ciferrii</i>	28
2.2 Enzyme, Chemikalien & weitere Materialien	28
2.3 Plasmide	29
2.4 Synthetische Oligonukleotide.....	30
2.5 Bioinformatische Analysen.....	30
2.5.1 Identifizierung von bislang unbekanntem Genen aus <i>P. ciferrii</i>	30
2.5.2 <i>in silico</i> Charakterisierung von Proteinen	31
2.6 Arbeiten mit <i>E. coli</i>	31
2.6.1 Transformation von <i>E. coli</i>	31
2.6.2 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
2.7 Arbeiten mit Hefe	32
2.7.1 Klonierung von Plasmiden durch <i>in vivo</i> Rekombination in <i>S. cerevisiae</i>	32
2.7.2 Konstruktion von <i>P. ciferrii</i> Stämmen mit genomisch integrierten DNA-Konstrukten	32
2.7.2.1 Konstruktion von Gen-Deletionskassetten	32
2.7.2.2 Konstruktion von Promotor-Substitutionskassetten	34
2.7.2.3 Transformation von <i>P. ciferrii</i>	36
2.7.2.4 Isolation von chromosomaler DNA aus <i>P. ciferrii</i>	37
2.7.2.5 Nachweis von genomisch integrierten DNA-Konstrukten	37
2.7.2.6 Entfernung von dominanten genomischen Selektionsmarkern	38
2.7.3 Inaktivierung von putativen Acetyl-Transferase-Genen.....	38

2.7.4	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> & <i>Cyberlindnera (Pichia) jadinii</i>	39
2.7.5	Isolation von DNA aus <i>S. cerevisiae</i> & <i>C. jadinii</i>	40
2.8	Arbeiten mit Nukleinsäuren	40
2.8.1	Enzymatische Modifikation von DNA	40
2.8.1.1	Ligation.....	40
2.8.1.2	Dephosphorylierung von DNA	41
2.8.1.3	DNA Restriktion.....	41
2.8.1.4	Enzymatischer Abbau von DNA mittels DNase I	41
2.8.2	Sequenzierung von DNA	41
2.8.3	Bestimmung der DNA-Konzentration	41
2.8.4	DNA-Amplifikation mittels PCR.....	42
2.8.4.1	Cross over PCR.....	42
2.8.5	Genome walking: Spezifische Amplifikation von partiell unbekanntem chromosomalen DNA-Sequenzen	43
2.8.6	Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	43
2.8.7	Aufreinigung von PCR-Produkten & Gel-Extraktion von DNA	43
2.8.8	Codon-Optimierung von Genen & <i>in vitro</i> Gen-Synthese.....	44
2.8.9	Quantifizierung von mRNA in <i>P. ciferrii</i>	44
2.8.9.1	Preparation von mRNA	44
2.8.9.2	Synthese von cDNA aus mRNA (reverse Transkription).....	44
2.8.9.3	Quantitative <i>real time</i> PCR.....	45
2.9	Biotechnologische Methoden.....	45
2.9.1	Bestimmung der optischen Zelldichte & Zell-Trockenmasse.....	45
2.9.2	Fermentationen mit <i>P. ciferrii</i> & <i>S. cerevisiae</i>	46
2.9.3	Preparation von acetylierten Sphingoidbasen & Quantifizierung mittels RP-HPLC	46
2.9.4	Bestimmung von relativen Metabolit-Konzentrationen.....	47
2.9.5	Charakterisierung von Sphingolipiden mittels LC-MS/MS.....	48
2.9.6	Bestimmung von LCB-Phosphaten.....	48
2.9.7	Protein-Isolation & Bestimmung von spezifischen Enzymaktivitäten	48
3.	Ergebnisse.....	51
3.1	Verbesserung der genetischen Handhabbarkeit von <i>P. ciferrii</i>	51
3.1.1	Optimierung der Genzerstörungseffizienz in <i>P. ciferrii</i>	51
3.1.1.1	Isolierung des <i>S. cerevisiae</i> <i>DNL4</i> Homologs in <i>P. ciferrii</i> (<i>PcLIG4</i>).....	52
3.1.1.2	Inaktivierung von <i>PcLIG4</i>	55
3.1.1.3	Entfernung von <i>loxP</i> -flankierten Markergenen	56
3.1.1.4	Deletion von <i>PcLIG4</i>	59
3.1.1.5	Ermittlung der Genzerstörungseffizienz im <i>P. ciferrii lig4Δ</i> Stamm.....	61
3.1.1.6	Test von heterologen autonom replizierenden Sequenzen in <i>P. ciferrii</i>	63
3.2	Optimierung der TAPS-Produktion	65
3.2.1	Metabolic engineering des L-Serin Metabolismus in <i>P. ciferrii</i>	65
3.2.1.1	Konstruktion von <i>P. ciferrii</i> Stämmen mit reduziertem L-Serin-Katabolismus	65
3.2.1.2	Engineering der <i>de novo</i> Biosynthese von L-Serin	71
3.2.2	Optimierung der <i>de novo</i> LCB-Biosynthese	76
3.2.3	Konstruktion und Charakterisierung eines Hochleistungs-TAPS-Produzenten	83
3.3	Optimierung der TriAsa-Produktion	88

3.4 Optimierung der TriASo-Produktion	89
3.4.1 Konstruktion eines Sphingosin-produzierenden <i>P. ciferrii</i> Stammes.....	89
3.4.1.1 Optimierung der TriASo-Produktion im Stamm 125Δ+.....	91
3.4.2 Konstruktion eines alternativen Plasmids zur TriASo-Produktion	96
3.4.2.1 Transformation eines für die LCB-Biosynthese optimierten Stammes mit pCS.426.So.V _{XbaI}	99
3.4.3 Suche nach Wachstumsvorteilen eines TriASo-Produzenten mittels <i>Phenotype MicroArray</i> [™] Analyse.....	100
3.5 Suche nach putativen Transportern von acetylierten LCBs in <i>P. ciferrii</i>	102
3.6 Suche nach potentiellen LCB-Acetyl-Transferase-Genen.....	103
3.6.1 Identifizierung zweier putativer LCB-Acetyl-Transferasen	104
4. Diskussion	107
4.1 Optimierung der genetischen Handhabbarkeit von <i>P. ciferrii</i>	107
4.2 Optimierung der TAPS-Produktion durch <i>genetic engineering</i> des L-Serin-Metabolismus	112
4.3 Optimierung der <i>de novo</i> LCB-Biosynthese	117
4.3.1 Der Hochleistungs-TAPS-Produzent CSS.L4.O.L2.L1.S2	121
4.4 Engineering der Palmitoyl-CoA-Biosynthese	123
4.5 Optimierung der TriASa-Produktion	124
4.6 Optimierung der TriASo-Produktion	125
4.6.1 Das Plasmid pCS.426.So.V.....	129
4.6.2 <i>Phenotype MicroArray</i> [™]	131
4.7 Transport acetylierter LCBs in <i>P. ciferrii</i>	132
4.8 Acetylierung von LCBs.....	133
5. Zusammenfassung.....	138
6. Anhang	140
Abbildungen	140
Tabellen	143
7. Literaturverzeichnis	172
Danksagung.....	190

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Summenformeln von chemischen Substanzen sind anhand von (McNAUGHT *et al.*, 1997) bzw. <http://goldbook.iupac.org> nachzuvollziehen. Aminosäuren wurden gemäß IUPAC-IUB JCBN (1984 / 1993) abgekürzt.

Abkürzung	Bedeutung	ATP	Adenosin-Triphosphat
%	Prozent	BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
∅	Durchmesser	BLASTP	Protein-Protein BLAST
Ω	Ohm	bp(s)	Basenpaar(e)
*	(mathematisches) Malzeichen	BSA	Rinderserum-Albumin
~	proportional	BTM	Bio-Trockenmasse
-Δd (XYΔd)	disruptiertes XY-Gen	bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius	C	Kohlenstoff
μF	Mikrofarad	<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
μg	Mikrogramm	<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
μl	Mikroliter	<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
μM	Mikromolar	<i>C. jadinii</i>	<i>Cyberlindnera (Pichia) jadinii</i>
μ _{max}	höchste maximale Wachstumsrate	ca.	Zirka
μmol	Mikromol	cDNA	<i>complementary DNA</i>
2,3-bP-G	2,3-bisphospho-Glycerat	CDP	Cytidin-Diphosphat
2-PG	2-Phosphoglycerat	Cer	Ceramid
3-KSA	3-Ketosphingarin	CMP	Cytidin-Monophosphat
3-PG	3-Phosphoglycerat	CoA	Coenzym A
3-P-HP	3-Phospho-Hydroxypyruvat	CP	<i>crossing point</i>
5,10-mTHF	5,10-Methylen-Tetrahydrofolat	CTAB	Cetyltrimethylammonium-bromid
<i>A. gossypii</i>	<i>Ashbya gossypii</i>	d	di- (griechischer Präfix: zwei)
Abb.	Abbildung	D-	Stereodeskriptor in der „Fischer-Projektion“ (<i>dexter</i> = rechts)
ACP	<i>acyl carrier protein</i>	d.h.	das heißt
ACS(s)	ARS Konsensus-Sequenz(en)	Del.	Deletion
ACT	<i>aspartate kinase - chorismate mutase - TyrA</i> (Protein-Domäne)	DiASa	Di-Acetyl-Sphingarin
AcTr	Acetyl-Transferase	Dis.	Disruption
ADP	Adenosin-Diphosphat	DNA	Desoxyribonukleinsäure
AE	Amplifikations-Effizienz	dNTP	Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
AK	Arbeitskreis	DSB	Doppelstrangbruch
Amp	Ampizillin	DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ARS(s)	autonom replizierende Sequenz(en)	E	Konfiguration (<i>trans</i>)
AS	Aminosäure(n)	EDTA	Ethyl-Diamin-Tetra-Acetat

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ER(s)	endoplasmatisches Retikulum(s)	MIPC(s)	Mannosyl-Inositol-Phosphorylceramid(e)
ESI	Elektrospray-Ionisation	ml	Milliliter
et al.	und andere (lateinisch)	mm	Millimeter
F-1,6-bP	Fruktose-1,6-Bisphosphat	mM	millimolar
FAS	<i>fatty acid synthase</i>	mod.	modifiziert
FS	Fettsäure	mol	SI-Basiseinheit der Stoffmenge
g	Gramm / Erdbeschleunigung	MS	Massenspektrometrie
GC	Gas-Chromatographie	mündl.	mündlich
GDB-ID	GenDB-Identifikations-Nr.	N	Stickstoff
ges.	gesamt	n	Anzahl der Versuche
ggf.	gegebenenfalls	NAD(H)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol	NADP(H)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
h	Stunde(n)	NaFo	Natrium-Formiat
H	Wasserstoff	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
H⁺	Proton(en)	ng	Nanogramm
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>	NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
HR	homologe Rekombination	nm	Nanometer
i.d.R.	in der Regel	Nr.	Nummer
IP	Inositol-Phosphat	OD_{600nm}	optische Dichte bei 600 nm
IPC(s)	Inositol-Phosphorylceramid(e)	opt.	(Codon-) optimiert
IUPAC-IUB	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry - and International Union of Biochemistry</i>	ORF	offener Leserahmen
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	ORI	<i>origin of replication</i>
kb	Kilobasen	P	Phosphat
kV	Kilovolt	<i>P. ciferrii</i>	<i>Pichia ciferrii</i>
L	Liter	<i>P. guilliermondii</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>
L-	Stereodeskriptor in der „Fischer-Projektion“ (<i>laevus</i> = links)	PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
LB	Luria Bertani	PEG	Polyethylenglykol
LB	<i>lysogeny broth</i>	PEP	Phosphoenol-Pyruvat
LC	<i>liquid chromatography</i>	PGDH	3-Phospho-Glycerat Dehydrogenase
LCB(s)	<i>long chain base(s)</i>	pH	negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
LCB-P(s)	LCB-Phosphat(e)	PHS	Phytosphingosin
LDH	Laktat-Dehydrogenase	PHS-1P	Phytosphingosin-1-Phosphat
M	Molarität (molar)	PI	Phosphatidyl-Inositol
m	Meter	pmol	Pikomol
M(IP)₂C(s)	Mannosyl-Di-Inositol-Phosphorylceramid(e)	PtdSer	Phosphatidyl-L-Serin
mA	Milliampere	put.	putativ
max.	maximal	P-XY / XYp	Promotor (von Gen XY)
mg	Milligramm	PYK	Pyruvat-Kinase
min	Minute(n)	q_{Pmax}	maximale spezifische

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

	Produktbildungsrate	u.a.	unter anderem
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> PCR	u.U.	unter Umständen
R	Konfiguration (<i>rectus</i> = rechts), relative Transkriptmenge	UPR	<i>unfolded protein response</i>
rDNA	ribosomale DNA	ÜS	Überstand
RNA	Ribonukleinsäure	UV	ultraviolett
RP-HPLC	<i>reversed phase</i> HPLC	V	Volt
rpm	Umdrehungen pro Minute	v	Version
S	Svedberg / Schwefel / Konfiguration (<i>sinister</i> = links)	V. polyspora	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>
s.	siehe	v.a.	vor allem
S. cerevisiae	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	vgl.	Vergleich
S. stipitis	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	VLCFA(s)	<i>very long chain fatty acid(s)</i>
SA	Sphinganin	X::Y	(Genotyp) X ersetzt durch Y
SA-1P	Sphinganin-1-Phosphat	X:Y	(Genotyp) X gefolgt von Y
SC	synthetisch komplett	YEPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat	YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
Sek.	Sekunde(n)	z.B.	zum Beispiel
SHMT(s)	L-Serin-Hydroxy-Methyl- Transferase(n)	z.T.	zum Teil
SM	synthetisch minimal	α	Alpha
SOB	<i>super optimal broth</i>	β	Beta
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>	Δ	Delta
sog.	sogenannte(n)		
SPH	Sphingosin		
SPT	Serin-Palmitoyl-Transferase		
t	tri- (griechischer Präfix: drei)		
T-	Terminator		
Tab.	Tabelle		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
TAPS	Tetra-Acetyl-Phytosphingosin		
TBLASTN	Protein-DNA BLAST (s. Seite 52)		
TBLASTX	s. Seite 53		
TCA	Trichloressigsäure		
TFA	Tri-Fluor-Essigsäure		
TMHs	Transmembran-Helices		
TriAPS	Tri-Acetyl-Phytosphingosin		
TriASa	Tri-Acetyl-Sphinganin		
TriASd	Tri-Acetyl-Sphingadienin		
TriASo	Tri-Acetyl-Sphingosin		
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)- Aminomethan		
U	Einheit (Unit; $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$)		

1. EINLEITUNG

1.1 Sphingolipide

Der Begriff Sphingolipide bezeichnet eine Unterklasse von Lipiden, deren systematische Einteilung bzw. Klassifizierung 2005 in aktualisierter Form vorgeschlagen wurde (FAHY *et al.*, 2005). Sphingolipide kommen in nahezu allen tierischen, pflanzlichen und pilzartigen Zellen, sowie in einigen Prokaryonten (z.B. *Sphingomonas spec.* und wenige Myxobakterien) und Viren vor. Dort sind sie ein wesentlicher Bestandteil von zellulären Membranen (insbesondere von Plasmamembranen). Außerdem sind sie wichtige Komponenten von Lipoproteinen, der multilamellaren Barriere der Haut (*stratum corneum*) und gewinnen aktuell als Signalmoleküle bzw. *second messenger* in der Sphingolipid-Forschung („*sphingolipidomics*“) immer mehr an Bedeutung. Die Gesamtheit aller Lipide (Lipidom) unterliegt in Hefen einem relativ einfachen und konservierten Netzwerk aus Lipid-Biosynthesewegen, die in *S. cerevisiae* für die Produktion von über 250 verschiedenen Lipid-Spezies verantwortlich sind (YETUKURI *et al.*, 2008; EJSING *et al.*, 2009). Die Diversität der Fettsäure-Komponenten z.B. wird dabei im Wesentlichen von drei Faktoren bestimmt: dem FAS (*fatty acid synthase*) Komplex (TEHLIVETS *et al.*, 2007), der $\Delta 9$ -Fettsäure Desaturase Ole1 (MARTIN *et al.*, 2007) und dem Fettsäure-Elongations-Komplex (DENIC & WEISSMAN, 2007), wodurch in *S. cerevisiae* fast nur gesättigte oder einfach ungesättigte Fettsäuren mit 10 - 26 C-Atomen synthetisiert werden. Diese Fettsäuren stehen der Synthese von Glycerolipiden, Glycerophospho-lipiden und Sphingolipiden zur Verfügung. Sphingolipide machen in Hefe etwa 7 % der Plasmamembran-Masse aus und stellen etwa 30 % der Phospholipid-Fraktion dar (PATTON & LESTER, 1991).

Sphingolipide sind amphipatische Moleküle, deren Grundbausteine (neben einer Fettsäure und einer meist polaren Kopfgruppe) Aminoalkohole sind, die als Sphingoidbasen oder synonym als *long-chain bases* (LCBs) bezeichnet werden (**Abb. 1**).

EINLEITUNG

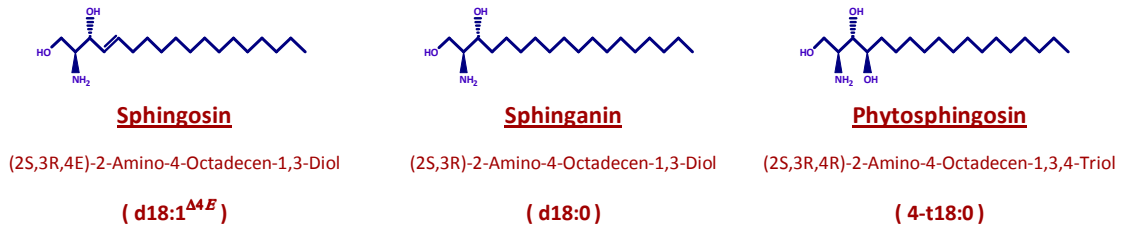


Abb. 1: Struktur der drei in der Natur am häufigsten vorkommenden Sphingoidbasen. Die Sphingoidbasen in *S. cerevisiae* z.B. sind Dihydrosphingosin (Sphinganine) und Phytosphingosin. In *P. ciferrii* und beispielsweise Säugerzellen kommt zusätzlich (u.a.) noch Sphingosin vor.

Im Allgemeinen sind die häufigsten LCBs **Sphingosin** (SPH), **Sphinganine** (SA; oder Dihydrosphingosin) und **Phytosphingosin** (PHS), wobei die Länge der Kette vorwiegend 18 C-Atome beträgt. Charakteristisch für LCBs sind Hydroxylgruppen am C-Atom 1 und 3, sowie eine Aminogruppe am C-Atom 2 (2-Amino-1,3-Dihydroxyalkan). Die Konfiguration der Chiralität am C-Atom 2 und 3 ist bei natürlich vorkommenden Sphingoidbasen *D-erythro* (2S, 3R) [(bzw. *D-ribo* bei Phytosphingosin (2S,3R,4R)] (HIRABAYASHI *et al.*, 2006). Eine gebräuchliche Abkürzung für z.B. Sphingosin ist d18:1^{Δ4E}. Dabei steht „d“ für die beiden (di-) Hydroxylgruppen, die erste Zahl für die Anzahl der C-Atome (18) und die zweite Zahl repräsentiert die Anzahl der Doppelbindungen, wobei der Exponent die Position(en) der Doppelbindung(en) in der C-Kette und deren Konfigurations-Isomerie beschreibt (Position 4; *E* = *trans*). Dieser allgemeinen Nomenklatur folgend ist PHS mit 18 C-Atomen als 4-t18:0 zu bezeichnen [drei (tri-) Hydroxylgruppen, wobei das C-Atom 4 zusätzlich hydroxyliert ist] und Sphinganine als d18:0.

Eine Prozessierung bzw. Modifikation von LCBs kann z.B. die Addition von zusätzlichen Hydroxyl- bzw. Methylgruppen sein. Wird an der LCB über eine Amidbindung am C-Atom 2 eine Fettsäure verknüpft, erhält man **Ceramide**, einfache Sphingolipide deren Kopfgruppe eine Hydroxylgruppe darstellt. Die Länge der Fettsäurekette in Ceramiden kann zwischen 14 und 30 C-Atomen variieren (HIRABAYASHI *et al.*, 2006). Zusätzlich sind sowohl Sättigungs-, Methylierungs- als auch Hydroxylierungsgrad variabel. In *S. cerevisiae* und *P. ciferrii* beträgt die Länge der Ceramid-gebundenen (meist gesättigten) Fettsäureketten hauptsächlich 26 C-Atome, die als „*very long chain fatty acids*“ (VLCFAs) bezeichnet werden. Diese tragen in der Regel entweder keine, eine oder zwei Hydroxylgruppen und sind (zumindest in *S. cerevisiae*) nicht methyliert (DICKSON & LESTER, 2002; BÖRGEL, 2007; EJSING *et al.*, 2009).

Eine weitere Komponente von Sphingolipiden sind die (meist) polaren Kopfgruppen, die häufig durch Hexosen (wie z.B. Glukose, Galaktose oder Mannose), Phosphat, Phospho-Inositol oder Phosphatidyl-Cholin repräsentiert werden. Beispiele für den generellen Aufbau von Sphingolipiden sind in **Abb. 2** dargestellt.

Die Vielfalt an Sphingolipiden ist enorm hoch, wodurch eine beträchtliche Komplexizität an Struktur und Funktion von Sphingolipiden gewährleistet werden kann. So sind beispielsweise in Säugerzellen fünf verschiedene Sphingoidbasen, 20 verschiedene Fettsäure-Spezies und über 500 Kohlenhydratreste bekannt (FUTERMAN & HANNUN, 2004). Allerdings gibt es *in vivo* oft, abhängig von Gewebe und / oder Organismus, Präferenzen für bestimmte Sphingolipid-Spezies (s. 1.6). So hoch die Komplexität von Sphingolipiden auch sein kann, ihre Grundbausteine sind i.d.R. die Sphingoidbasen Phytosphingosin, Sphinganin oder Sphingosin.

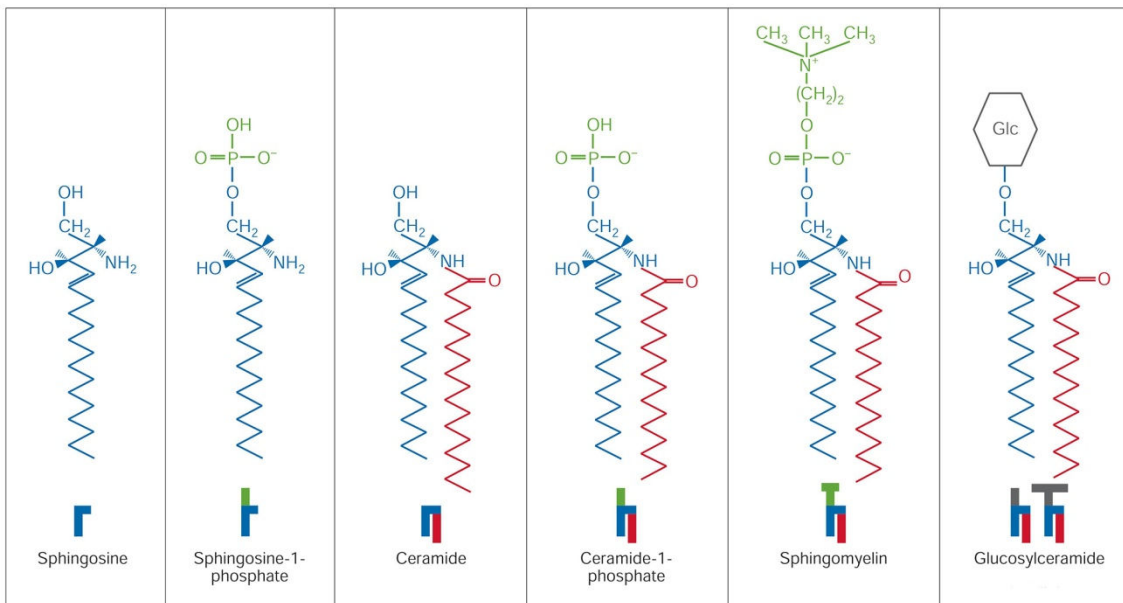


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung vom generellen Aufbau von Sphingolipiden. Als Sphingoidbase (LCB) ist nur Sphingosin (blau) dargestellt, welche mit nur einer Art von Fettsäure (Palmitat: rot) N-acyliert ist. Sowohl LCBs als auch Ceramide können mit polaren Kopfgruppen ergänzt werden (hier Phosphat bzw. Phosphatidyl-Cholin: grün). Des Weiteren ist nur ein einfaches Glykosphingolipid dargestellt, bei dem durch Addition von Glukose (schwarz) an Ceramid Glucosylceramid entsteht. Mod. nach (FUTERMAN & HANNUN, 2004).

1.2 Sphingolipid-Metabolismus in Hefen

Die *de novo* Synthese von Sphingoidbasen, den Grundbausteinen der Sphingolipide, ist in allen bekannten Sphingolipid-produzierenden Organismen stark konserviert, wohingegen der Metabolismus von komplexeren Sphingolipiden spezifisch an den jeweiligen Organismus angepasst ist. Die am Sphingolipid-Stoffwechsel beteiligten Gene wurden weitestgehend im Modellorganismus *S. cerevisiae* aufgeklärt und charakterisiert (DICKSON, 2010). Der Sphingolipid-Metabolismus dieser Hefe gilt daher bis heute als am besten verstanden, weshalb im Folgenden hauptsächlich anhand von *S. cerevisiae* die Biologie der Sphingoidbasen und komplexeren Sphingolipide erläutert werden soll.

1.2.1 Biosynthese von Sphingoidbasen

Der erste Schritt in der *de novo* LCB-Biosynthese ist die Kondensation von cytosolischem L-Serin und Palmitoyl-CoA zu 3-Ketosphinganin (3-KSA) unter Abspaltung von CO₂ und CoA (**Abb. 3**). Diese Pyridoxal-5'-P abhängige Reaktion wird von der Serin-Palmitoyl-Transferase (SPT) katalysiert (NAGIEC *et al.*, 1994), was erstmals in Experimenten mit Mikrosomen-Präparaten von *P. ciferrii* beschrieben wurde (GREENE *et al.*, 1965; BRAUN & SNELL, 1967). Die SPT stellt ein Heterodimer dar, bestehend aus den Untereinheiten **Lcb1** und **Lcb2**. Beide Untereinheiten sind in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ERs) lokalisiert, wobei das katalytische Zentrum der SPT der cytosolischen Seite zugeneigt ist (HAN *et al.*, 2004; FUTERMAN & RIEZMAN, 2005). Der genaue Reaktionsmechanismus der SPT wurde kürzlich aufgeklärt (IKUSHIRO & HAYASHI, 2011). Ein Hefestamm, der eine Deletion eines der beiden korrespondierenden Gene *LCB1* oder *LCB2* trägt, ist auxotroph für Sphingoidbasen und nicht lebensfähig, solange keine exogenen Sphingoidbasen zur Verfügung stehen (WELLS & LESTER, 1983; PINTO *et al.*, 1992; GABLE *et al.*, 2002). Neben Palmitoyl-CoA (C₁₆) kann auch Stearoyl-CoA (C₁₈) als Substrat von der SPT verwendet werden, was allerdings vornehmlich unter Hitzeschock-Bedingungen (37° C) der Fall ist (DICKSON *et al.*, 1997a; HAAK *et al.*, 1997). Zusätzlich zu Lcb1 und Lcb2 ist in Hefe ein akzessorisches, SPT assoziiertes Protein beschrieben (**Tsc3**). Tsc3 ist ein kleines hydrophobes Protein welches für eine optimale Aktivität der SPT notwendig und unter Hitzeschock-Bedingungen essentiell ist (GABLE *et al.*, 2000). Vermutlich interagiert Tsc3

dabei mit der Lcb2-Untereinheit der SPT (MONAGHAN *et al.*, 2002). *TSC3* gehört zur Familie der Gene für „*temperature-sensitive suppressors of calcium sensitivity*“ (TSC) und kommt in Säugerzellen wahrscheinlich nicht vor (GABLE *et al.*, 2000). *Tsc3* spielt zudem wahrscheinlich bei der Substratauswahl / -verfügbarkeit der SPT eine Rolle, da in einem *tsc3Δ* Stamm die Umsetzung von Stearoyl-CoA stark vermindert ist (COWART & HANNUN, 2007).

3-KSA ist die erste Sphingoidbase in der *de novo* LCB Biosynthese und gleichzeitig ein sehr kurzlebiges Intermediat (BEELER *et al.*, 1998), das biologisch wahrscheinlich nicht aktiv ist. 3-KSA wird sehr schnell und unter Verwendung von NADPH zu Sphinganin reduziert. Dieser Schritt wird von der 3-KSA Reduktase **Tsc10** katalysiert. *Tsc10* ist ein essentielles Protein und gehört zur Familie der "kurzkettigen Dehydrogenasen / Reduktasen". Es ist ebenfalls in der ER-Membran lokalisiert und besitzt eine putative Transmembrandomäne sowie eine sog. Rossmann-Falte zur NADPH-Bindung. Ein *tsc10Δ* Stamm ist nicht lebensfähig bzw. auxotroph für Sphingoidbasen (BEELER *et al.*, 1998). Als Produkt der von *Tsc10* katalysierten Reaktion entsteht aus 3-KSA die Sphingoidbase Sphinganin, welche durch Hydroxylierung am C4-Atom weiter zur Sphingoidbase Phytosphingosin umgewandelt werden kann. Katalysiert wird diese Reaktion von der Sphinganin C4-Hydroxylase **Syr2**. *Syr2* besitzt eine Cytochrom *b₅* Domäne, vier putative Transmembrandomänen und ist vermutlich ebenfalls in der ER-Membran lokalisiert. Phytosphingosin ist die am häufigsten vorkommende LCB in *S. cerevisiae* (LESTER & DICKSON, 1993) und z.B. in vielen Hefen der Gattung *Candida* (SINGH *et al.*, 2010). Eine Deletion von *SYR2* unterbindet die Synthese von Phytosphingosin und geht mit einer Substitution von Phytosphingosin durch Sphinganin in Ceramiden und komplexen Sphingolipiden einher, was jedoch zu keinem erkennbaren Phänotyp führt (HAAK *et al.*, 1997; GRILLEY *et al.*, 1998).

EINLEITUNG

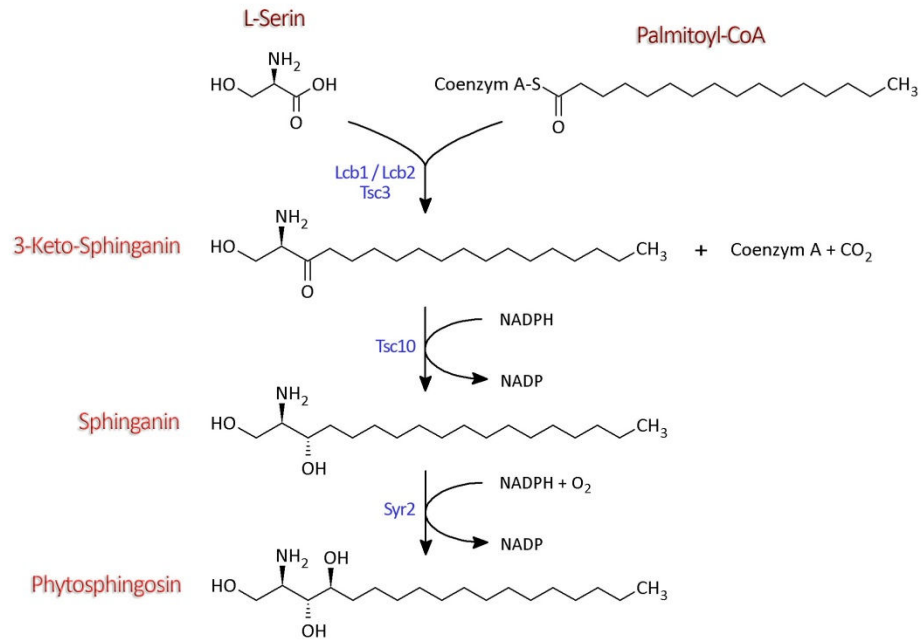


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der *de novo* LCB-Biosynthese in *S. cerevisiae*. Details s. Text.

Der Hefe *S. cerevisiae* fehlen die nötigen Enzyme zur Bildung der Sphingoidbase Sphingosin. Hefen wie z.B. *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Schizosaccharomyces pombe* oder *P. ciferrii* sind hingegen dazu fähig (TERNES *et al.*, 2002; BECKMANN *et al.*, 2003; GARTON *et al.*, 2003; BÖRGEL, 2007; BÖRGEL *et al.*, nicht publiziert). Bei diesen und anderen Hefen, sowie bei höheren Eukaryonten, wird im Zuge der Biosynthese von Sphingosin dieses nicht direkt aus Sphinganine hergestellt, sondern über zwei Zwischenschritte: Sphinganine wird zunächst durch N-Acylierung, katalysiert von Ceramidsynthasen, zu Dihydroceramid umgewandelt. Das Sphinganine im Dihydroceramid kann dann von einer $\Delta 4$ -Desaturase zu Sphingosin desaturiert werden, wodurch Dihydroceramid zu Ceramid umgesetzt wird. Um die freie Sphingoidbase Sphingosin zu erhalten bedarf es der Hydrolyse von Ceramid in Sphingosin (und einen Acylrest), was wiederum von Ceramidasen katalysiert wird. Sphingosin ist die am häufigsten vorkommende Sphingoidbase in menschlichen Sphingolipiden (DICKSON, 1998; HANNICH *et al.*, 2011).

Neben der *de novo* Synthese von Sphingoidbasen sind Hefen außerdem in der Lage exogen vorliegende LCBs aufzunehmen und im ER zu verwerten. Dazu bedarf es einer Phosphorylierung mit anschließender Dephosphorylierung der aufgenommenen LCBs, woran in *S. cerevisiae* die LCB-Kinase Lcb4 (und Lcb5) und die ER-membranständige LCB-

P Phosphatasen Lcb3 und Ysr3 beteiligt sind (MAO *et al.*, 1997; MAO *et al.*, 1999; FUNATO *et al.*, 2003). Die Aufnahme der LCBs erfolgt wahrscheinlich über den Transporter **Rsb1** (KIHARA & IGARASHI, 2002). Wie LCB-Ps ins ER gelangen ist bislang nicht aufgeklärt. Ferner können LCBs aus Ceramiden freigesetzt und verwertet werden (*salvage pathway*). *S. cerevisiae* besitzt zwei alkalische Ceramidasen (**Ypc1** und **Ydc1**) in der ER-Membran zur hydrolytischen Spaltung von Ceramiden in eine Sphingoidbase und einen Acyl-Rest. Ypc1 spaltet bevorzugt Phytoceramide, wohingegen Ydc1 bevorzugt Dihydroceramide spaltet (MAO *et al.*, 2000b). Ypc1 besitzt auch Ceramidsynthese-Aktivität und ist somit in der Lage die reverse Reaktion (CoA-unabhängig) zu katalysieren (MAO *et al.*, 2000a). Ceramide selbst können aus komplexeren Sphingolipiden durch die Inositol Phosphosphingolipid Phospholipase C (**Isc1**) freigesetzt werden (SAWAI *et al.*, 2000).

1.2.2 Metabolismus von komplexen Sphingolipiden

Wie bereits erwähnt ist Phytosphingosin die am häufigsten vorkommende Sphingoidbase in *S. cerevisiae*. Im ER synthetisiert, wird der größte Teil des Phytosphingosins hauptsächlich durch N-Acylierung zu Phytoceramid (Ceramid B) umgewandelt (**Abb. 4**). Diese Reaktion, sowie die N-Acylierung der weniger redundanten LCB Sphinganin zu Dihydroceramid (Ceramid A), wird von einem Ceramidsynthese-Komplex katalysiert, bestehend aus den drei Untereinheiten **Lac1**, **Lag1** und **Lip1** (GUILLAS *et al.*, 2001; SCHORLING *et al.*, 2001; VALLEE & RIEZMAN, 2005). Lag1 und Lac1 sind stark homolog zueinander und funktionell redundant. Eine Einzeldelation von *LAC1* oder *LAG1* führt zu einer reduzierten Acyl-CoA abhängigen Ceramidsynthese, wohingegen eine Doppeldelation als letal (JIANG *et al.*, 1998) bzw. wachstumshemmend (BARZ & WALTER, 1999) beschrieben wird. Beide Proteine sind in der ER Membran lokalisiert und besitzen jeweils acht putative Transmembran-Domänen, wobei N- und C-Termini im Cytoplasma liegen (KAGEYAMA-YAHARA & RIEZMAN, 2006). Lip1 bildet einen Heteromerkomplex mit Lag1 und Lac1, ist essentiell für die Ceramidsynthese-Aktivität und kommt wahrscheinlich nicht in höheren Eukaryonten vor. Vermutlich ist Lip1 eine für Hefe spezifische regulatorische Untereinheit des Ceramidsynthese-Komplexes. Als Substrate der Ceramidsynthese werden zum größten Teil Acyl-CoAs mit C₂₆ Fettsäuren und zu geringen Anteilen mit C₂₂ und C₂₄ Fettsäuren verwendet (OH *et al.*, 1997; SCHNEITER *et al.*, 1999). Unter aeroben

Bedingungen können die im ER synthetisierten Ceramide Phyto- (Ceramid B) bzw. Dihydroceramid (Ceramid A) am Fettsäurerest zu Ceramid C bzw. Ceramid B' α -hydroxyliert werden (HAAK *et al.*, 1997; DUNN *et al.*, 1998). Diese Hydroxylierung der VLCFAs am C-Atom 2 wird von der Sphingolipid Alpha-Hydroxylase **Scs7** katalysiert. Scs7 ist nicht essentiell und besitzt wie Syr2 eine Cytochrom b_5 Domäne sowie eine C-terminale ER-Retentions-Sequenz (KMKYE) und ist wahrscheinlich ebenfalls im ER lokalisiert (HUH *et al.*, 2003).

De novo synthetisierte Ceramide gelangen via vesikulären und nicht-vesikulären Transport zum Golgi-Apparat (FUNATO & RIEZMAN, 2001), wo die weitere Prozessierung zu komplexeren Sphingolipiden stattfindet. Die Ceramide A / B / B' / C und D können im Golgi-Apparat durch Transfer von Inositol-Phosphat (IP) auf die Hydroxylgruppe am LCB C-Atom 1 zu Inositol-Phosphorylceramiden (IPCs) umgewandelt werden, den ersten komplexen und gleichzeitig essentiellen Sphingolipiden in *S. cerevisiae* (CERANTOLA *et al.*, 2009). Katalysiert wird dieser Transfer von der IPC Synthase **Aur1**, die die polare Kopfgruppe (IP) von Phosphatidyl-Inositol (PI) für die Transferreaktion verwendet (NAGIEC *et al.*, 1997). Als weiteres Produkt dieser Reaktion entsteht Diacylglycerol (DAG). Aur1 besitzt mehrere putative Transmembrandomänen und dessen katalytisches Zentrum ist vermutlich dem Lumen des Golgi-Apparates zugewandt, in dem sich auch das Substrat (PI) befindet (LEVINE *et al.*, 2000). Wie Ceramide dabei von der äußeren zur inneren Schicht der Phospholipid-Doppelschicht gelangen ist unklar. Es wird jedoch angenommen, dass Aur1 an dieser Verlagerung beteiligt sein könnte (DICKSON *et al.*, 2006). Die von Aur1 katalysierte Reaktion ist charakteristisch für Pilze und Pflanzen und kommt in Säugern nicht vor (DICKSON & LESTER, 1999). Eine Deletion von *AUR1* ist letal, was verdeutlicht, dass IPCs essentiell für das Wachstum von Hefe sind (NAGIEC *et al.*, 1997; CERANTOLA *et al.*, 2009). IPC-C bzw. dessen VLCFA kann in Abhängigkeit des Cu^{2+} -Transporters Ccc2 zusätzlich hydroxyliert werden (BEELER *et al.*, 1997). In *S. cerevisiae* sind fünf verschiedene IPC-Spezies bekannt (**Abb. 4**), die sich in Position und Anzahl an Hydroxylgruppen im Ceramidteil unterscheiden und somit unterschiedliche Hydrophobizitäten aufweisen (BEELER *et al.*, 1997; HAAK *et al.*, 1997; DUNN *et al.*, 1998). IPCs können anschließend durch Mannosylierung weiter zu Mannosyl-Inositol-Phosphorylceramiden (MIPCs) prozessiert werden. Dabei wird Mannose von GDP-Mannose auf die 2-Hydroxylgruppe des

Inositolrestes im IPC übertragen. Dieser Schritt findet ebenfalls im Golgi-Apparat statt und wird von einer Inositol-Phosphorylceramid-Mannosyltransferase katalysiert, von der in *S. cerevisiae* zwei Isoformen existieren. Dabei setzt sich eine Isoform aus den Proteinen **Csg1** und **Csg2** und die andere Isoform aus den Proteinen **Csh1** und **Csg2** zusammen. Csg1 und Csh1 sind die katalytischen Untereinheiten mit jeweils verschiedenen Substratspezifitäten, wobei Csg2 vermutlich eine regulatorische Funktion besitzt (UEMURA *et al.*, 2003; LISMAN *et al.*, 2004). Die Umsetzung von IPCs zu MIPCs wird durch Ca^{2+} stimuliert (UEMURA *et al.*, 2007), wohingegen ein *csg2Δ* Stamm hauptsächlich IPC-C akkumuliert und dadurch Ca^{2+} -sensitiv wird (BEELER *et al.*, 1997; UEMURA *et al.*, 2003). Vermutlich sind MIPCs [bzw. $\text{M}(\text{IP})_2\text{Cs}$] bei der Ausbildung von Mikrodomänen (*lipid rafts*) beteiligt, die wiederum für Ca^{2+} - / IPC-C-vermittelte Signaltransduktionen notwendig sein könnten (UEMURA *et al.*, 2007).

Alle fünf vorkommenden MIPC-Spezies können durch den Transfer einer weiteren IP-Gruppe (von PI) zu den komplexesten und gleichzeitig abundantesten Sphingolipiden in *S. cerevisiae* umgewandelt werden, den Mannosyl-Di-Inositol-Phosphorylceramiden [$\text{M}(\text{IP})_2\text{Cs}$].

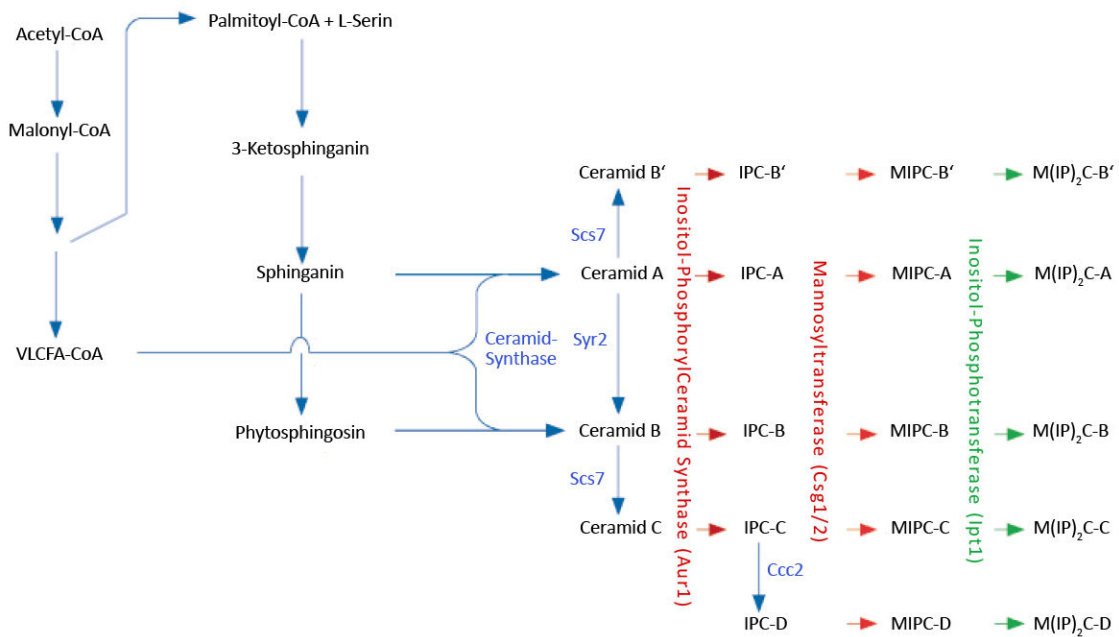


Abb. 4: Schematische Darstellung der *de novo* Biosynthese von komplexen Sphingolipiden in *S. cerevisiae* [Mod. nach (SCHNEITER, 1999); Details s. Text.]

Die Synthese von M(IP)₂Cs setzt die Aktivität der Inositol-Phosphotransferase **Ipt1** voraus (DICKSON *et al.*, 1997b). Zusätzlich zu Ipt1 konnte ein weiteres Protein (**Skn1**) identifiziert werden, welches ebenfalls an der Synthese von M(IP)₂Cs beteiligt ist, wobei dessen genaue Funktion unklar ist. Sowohl eine Deletion von *IPT1* als auch von *SKN1* unterbindet die Synthese von M(IP)₂Cs und führt zu einem kompensierenden Anstieg von MIPCs (DICKSON *et al.*, 1997b; THEVISSSEN *et al.*, 2005), was darauf hindeutet, dass Hefen in der Lage sind relative Mengen an Sphingolipiden zu erkennen und diese anzugleichen. Dieser Effekt einer *ipt1* bzw. *skn1* Deletion wird allerdings nur in nährstoffreichem Medium beobachtet. In nährstoffarmen Medium (*half-strength potato dextrose broth*) verhindert lediglich eine Doppeldelation von *IPT1* und *SKN1* die Synthese von M(IP)₂Cs (THEVISSSEN *et al.*, 2005). M(IP)₂Cs stellen die Hauptsphingolipid-Spezies in *S. cerevisiae* dar und machen mehr als drei Viertel der Sphingolipidmasse aus, wobei der Rest der Sphingolipide überwiegend durch IPC- und MIPC-Sphingolipide repräsentiert wird (**Abb. 5**) (SMITH & LESTER, 1974; EJSING *et al.*, 2009). Komplexe Sphingolipide, vor allem M(IP)₂Cs, kommen hauptsächlich in der Plasmamembran vor (HECHTBERGER *et al.*, 1994), zu der sie über vesikulären Transport gelangen (FUNATO *et al.*, 2002). Geringe Konzentrationen von Sphingolipiden (insbesondere IPC) finden sich in den Membranen des Golgi-Apparates und der Vakuole, wohingegen in den Mitochondrien-Membranen nur Spuren von Sphingolipiden auftreten (HECHTBERGER *et al.*, 1994). Über die Verteilung und Topologie von Sphingolipiden in Membranen ist ansonsten nur wenig bekannt.

S. cerevisiae bildet ausschließlich Inositol-Phosphoceramide und ist im Gegensatz zu vielen anderen Hefen sowie Pflanzen und Säugern nicht in der Lage Glykosyl-Ceramide zu synthetisieren (DICKSON & LESTER, 1999; MARKHAM *et al.*, 2006). Glykosyl-, Galaktosylceramide und Sphingomyelin sind die wesentlichen komplexen Sphingolipide in menschlichen Zellen (GAULT *et al.*, 2010).

Exkurs: Ceramid-Synthese in Säugerzellen

Säugerzellen besitzen mindestens sechs (Dihydro)Ceramidsynthasen (LASS1-6), die im Gegensatz zu Hefen (und Pflanzen) als Substrat vornehmlich Sphinganin verwenden (PEWZNER-JUNG *et al.*, 2006; LAHIRI *et al.*, 2007). Phytoceramide entstehen deshalb vermutlich eher auf Ceramid-Ebene via C4-Hydroxylierung von Dihydroceramid, katalysiert von DES2 (MIZUTANI *et al.*, 2004). Phytoceramide beschränken sich im Menschen auf wenige Gewebe wie Darm, Niere und Haut (OKABE *et al.*, 1968; IWAMORI *et al.*, 1979; CODERCH *et al.*, 2003).

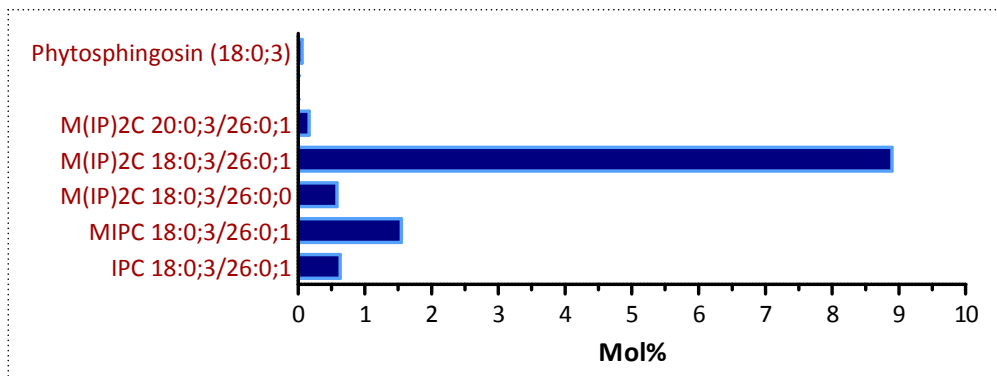


Abb. 5: Die häufigsten Sphingolipid-Spezies in *S. cerevisiae*. Gezeigt sind die Sphingolipid-Mengenanteile in Mol% des *S. cerevisiae* Lipidoms. Sphingolipide mit Mengenanteilen unter 0,1 Mol% sind nicht gezeigt, mit Ausnahme der LCB Phytosphingosin (ca. 0,06 Mol%). Das mit Abstand häufigste Sphingolipid in *S. cerevisiae* ist M(IP)₂C (-B) mit C₁₈-Phytosphingosin (18:0;3) als LCB und einer einfach hydroxylierten, gesättigten C₂₆-Fettsäure (26:0;1). Daten aus (EJSING *et al.*, 2009).

1.2.1 Regulation des Sphingolipid- bzw. LCB-Metabolismus

Plasmamembranen sind je nach Umgebung und Zustand der Zelle aus bestimmten Lipiden zusammengesetzt. Eine definierte Sphingolipid-Komposition ist essentiell für spezielle biophysikalische Eigenschaften der Zellmembran und die Physiologie der Zelle. Zudem sind einige Intermediate des Sphingolipid-Metabolismus (z.B. LCBs und LCB-Ps) biologisch aktiv und u.a. bei der Regulation des Zellwachstums beteiligt. Eine Regulation des Sphingolipid-Metabolismus ist daher von großer Bedeutung und unerlässlich für die Aufrechterhaltung vieler zellulärer Prozesse. So ist ein dysregulierter Sphingolipid-Metabolismus im Menschen z.B. Ursache von Krankheitsbildern wie dem Tay-Sachs-, Niemann-Pick-, Krabbe-, Farber-, Fabry- oder Gaucher-Syndrom (GINZBURG *et al.*, 2004; BRESLOW & WEISSMAN, 2010). Die Regulation des Sphingolipid-Metabolismus ist enorm komplex,

weitestgehend unverstanden und kann theoretisch auf vielen Ebenen stattfinden (z.B. Transkription, Translation, Enzymaktivität, Enzym-Substrat-Verfügbarkeit, Kompartimentierung, Nährstoff-Verfügbarkeit, etc.). Für weitere Informationen über mögliche Regulations-Mechanismen sei hier aufgrund des hohen Umfangs an folgende Reviews verwiesen: (DICKSON *et al.*, 2006; COWART & OBEID, 2007; BRESLOW & WEISSMAN, 2010; DICKSON, 2010).

Im Folgenden wird kurz auf die Regulation des Sphingolipid-Metabolismus (hauptsächlich) auf Ebene der Sphingoidbasen genauer eingegangen. In *S. cerevisiae* sind kürzlich die Proteine Orm1 und Orm2 charakterisiert und als Mediatoren der Sphingolipid-Homöostase beschrieben worden (BRESLOW *et al.*, 2010; HAN *et al.*, 2010). Eine Deletion der Gene *ORM1* und *ORM2* führt zu einer dysregulierten LCB-Synthese mit dem Resultat, dass LCBs intrazellulär akkumulieren. Zusätzlich wird in einem *orm1Δ orm2Δ* Stamm die sog. *unfolded protein response* induziert, eine Stress-Antwort, die normalerweise bei einer unkontrollierten Protein-Biosynthese im ER einsetzt (HAN *et al.*, 2010). Orm1 und Orm2 sind in der ER-Membran lokalisierte Proteine, die einen Heteromerkomplex bilden der mit der SPT interagiert. In diesem Zustand wirkt der Orm1/2 Komplex hemmend auf die SPT Aktivität bzw. *de novo* LCB-Synthese. Wird der Orm1/2 Komplex jedoch phosphoryliert, wird dessen inhibitorische Wirkung auf die SPT aufgehoben und die LCB-Synthese enthemmt. Die Phosphorylierung des Orm1/2 Komplexes kann dabei als homöostatische Antwort auf niedrige intrazelluläre LCB-Level gesehen werden. Orm1 und Orm2 sind also nicht nur an der Regulation der LCB-Synthese, sondern auch an der Membran-Biogenese beteiligt, die sowohl eine Lipid-Homöostase als auch eine Protein-Qualitätskontrolle im ER für eine korrekte Funktion der Zellmembran voraussetzt. Welche Kinase(n) für die Phosphorylierung der Orm Proteine verantwortlich ist (sind), wie intrazelluläre LCB-Level erkannt werden und wie die SPT Aktivität moduliert wird ist bislang unklar.

Eine weitere Möglichkeit der Regulation des Sphingolipid- bzw. LCB-Metabolismus ist das Abführen von Überschüssigen Intermediaten. Dies kann beispielsweise über den Export von LCBs ins extrazelluläre Medium geschehen. Der Export von LCBs wird von Rsb1 bewerkstelligt, einem integralen Protein der Plasmamembran, welches LCBs ATP-

abhängig transportiert (KIHARA & IGARASHI, 2002). Rsb1 besitzt zudem eine mutmaßliche Flippase-Aktivität und könnte für den Transport (*flop*) von LCBs von der cytoplasmatischen zur extrazellulären (evtl. auch ER-luminalen) Seite der Phospholipid-Doppelschicht verantwortlich sein. Zudem spielen möglicherweise ABC-Transporter beim Export (oder auch Import) eine Rolle.

Überschüssige Sphingoidbasen können außerdem phosphoryliert und anschließend entweder mittels des ABC-Transporters Yor1 exportiert (BOUJAOUDE *et al.*, 2001) oder zu Phosphoethanolamin und einem langkettigen Aldehyd gespalten werden. Die durch Lcb4 phosphorylierten LCBs werden dabei von der LCB-P-Lyase Dpl1 irreversibel gespalten und so aus dem Sphingolipid-Stoffwechsel entfernt (SABA *et al.*, 1997). Dieser irreversible Abbau von LCB-Ps wurde bereits in den 60er Jahren in *P. ciferrii* beschrieben (KARLSSON *et al.*, 1967; STOFFEL *et al.*, 1968). Alternativ können LCB-Ps durch Lcb3 bzw. Ysr3 wieder dephosphoryliert werden (MAO *et al.*, 1997). In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass Lcb3 und Ysr3 wahrscheinlich vornehmlich für die Dephosphorylierung von C₁₈ bzw. C₂₀ LCB-P-Spezies verantwortlich sind, wohingegen Dpl1 vermutlich LCB-Ps mit 16 C-Atomen als Substrat präferiert (ZHANG *et al.*, 2001).

Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass die Ceramid-Synthese in *S. cerevisiae* durch den TORC2-Komplex (*target of rapamycin complex 2*) reguliert wird (ARONOVA *et al.*, 2008). Die TOR Protein-Kinasen sind am *nutrient* und *stress sensing* beteiligt und koordinieren so Metabolismus und Zell-Wachstum (WULLSCHLEGER *et al.*, 2006).

1.2.2 Funktionen von Sphingolipiden in Hefe

Sphingolipide besitzen neben ihren biophysikalischen Eigenschaften in Zellmembranen zahlreiche Funktionen in zellulären Prozessen. Aufgrund des enormen Umfangs an beschriebenen Funktionen von Sphingolipiden in Hefen (und Säugern) wird hier ein kurzer Abriss über dieses Thema gegeben. Interessierte Leser finden ausführlichere Informationen in folgenden Artikeln: (COWART & HANNUN, 2004; COWART & OBEID, 2007; DICKSON, 2008 / 2010).

Sphingolipide bilden zusammen mit Sterolen die wesentlichen Bestandteile von Membran-Mikrodomänen (*lipid rafts*) (BAGNAT *et al.*, 2000). *Lipid rafts* wiederum sind essentiell für z.B. Zell-Zell-Interaktionen während der Paarung von *S. cerevisiae* (BAGNAT &

SIMONS, 2002a) sowie für die Funktionalität, Assemblierung und Adressierung von vielen Membran-Proteinen, wie z.B. Pma1 (WANG & CHANG, 2002; TOULMAY & SCHNEITER, 2007), Can1 (OPEKAROVA *et al.*, 2005), Fur4 (HEARN *et al.*, 2003) oder Gap1 (BAGNAT & SIMONS, 2002b). Im Gegensatz zu höheren Säugetieren, wo Ceramid, Ceramid-P und LCB-Ps als biologisch aktive Signalmoleküle (*second messenger*) beschrieben sind (ZHENG *et al.*, 2006; HANNUN & OBEID, 2008; PITSON, 2011), sind in der Hefe wahrscheinlich hauptsächlich LCBs als *second messenger* biologisch aktiv, die Prozesse wie Zell-Zyklus, Hitzeschock-Antwort, Zell-Alterung, Protein-Faltung, etc. regulieren (COWART & OBEID, 2007; DICKSON, 2010). Erkenntnisse über deren biologisch aktive Eigenschaften basieren hauptsächlich auf Studien, bei denen ein Anstieg von LCBs als Antwort auf Hitze-Stress in *S. cerevisiae* beobachtet wurde (DICKSON & LESTER, 2002; DICKSON *et al.*, 2006; COWART & OBEID, 2007). So ist z.B. bekannt, dass die Sphingoidbase PHS die Aufnahme von Tryptophan, Leucin, Histidin und Uracil hemmt (CHUNG *et al.*, 2001). Wahrscheinlich reguliert PHS die Nährstoffaufnahme durch die Aktivierung von Kinasen wie Pkh1/2, Ypk1 oder Sch9, die an Vorgängen wie *nutrient sensing* beteiligt sind (KRAAKMAN *et al.*, 1999; GELPERIN *et al.*, 2002; ROOSEN *et al.*, 2005). Dies führt im Falle der Uracil-Permease Fur4 zur Endozytose und zur Ubiquitin-vermittelten Proteolyse (CHUNG *et al.*, 2000; DICKSON *et al.*, 2006). Somit sind Sphingolipide wesentlich am Transport von Nährstoffen wie Aminosäuren beteiligt. Sphingolipide spielen zudem eine Rolle bei der Exozytose (bzw. Protein-Sortierung) von Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol- (GPI-) verankerten Proteinen (BOSSON & CONZELMANN, 2007) oder dem Arginin-Transporter Can1 (DAQUINAG *et al.*, 2007). PHS-1P wurde kürzlich in *S. cerevisiae* als Modulator der Expression von Genen, die für die Atmung benötigt werden, beschrieben (COWART *et al.*, 2010). Wahrscheinlich sind LCB-Ps (wie auch LCBs) an der Regulation des Zell-Zyklus in Hefe beteiligt (GOTTLIEB *et al.*, 1999; JENKINS & HANNUN, 2001) und spielen möglicherweise bei der Regulation der Ceramid-Synthese eine Rolle (KOBAYASHI & NAGIEC, 2003).

Eine anti-mikrobielle Wirkung von Phytosphingosin (und evtl. Sphinganin) konnte erstmals 1966 in einem „Spot-Test“ erkannt werden (KARLSSON, 1966). 26 Jahre später konnte dies auch für Sphingosin festgestellt werden (BIBEL *et al.*, 1992). In wie weit dies für die acetylierten LCB-Derivate zutrifft ist nicht bekannt.

1.3 *Pichia ciferrii*

Die Hefe *Pichia ciferrii* gehört in der Ordnung der sprossenden Hefen (*Saccharomycetales*) zur Familie der *Saccharomycetaceae* und wurde 1932 erstmals als *Hansenula ciferrii(i)* beschrieben (LODDER, 1932). Die Zuordnung in die Gattung *Pichia* erfolgte 1984 aufgrund von DNA Verwandtschafts-Analysen (KURTZMAN, 1984).

Die physiologische Charakterisierung dieses Organismus ergab, dass es sich dabei um eine im Erdboden, Wasser und auf Pflanzen-Exsudaten befindliche Hefe handelt, die fähig ist Nitrat zu assimilieren und die C-Quellen Glukose, Galaktose, Maltose, Saccharose und Raffinose fermentieren kann. Ferner wurde *P. ciferrii* als Hefe beschrieben, die sich asexuell durch Sprossung und mittels Bildung von Pseudohyphen (oder echten Hyphen) reproduzieren kann und in der Lage ist eine bis vier Ascisporen zu bilden (WICKERHAM & BURTON, 1962). Die Sequenzierung des *P. ciferrii* Genoms ergab, dass es sich um einen aneuploiden Organismus handelt, der durch Vergleich der 18S rDNA Sequenz mit anderen komplett sequenzierten Hefen in phylogenetische Nähe zu *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* einzuordnen ist (nicht publiziert; **Abb. 6**).

Anders als bei anderen Organismen, die Sphingoidbasen hauptsächlich als Baustein für komplexe Sphingolipide verwenden, schleust *P. ciferrii* große Mengen davon aus der Zelle und somit aus dem Sphingolipid-Metabolismus aus. So wurde erstmals 1960 diese einzigartige Eigenschaft, extrazelluläre und kristallin vorliegende Sphingolipide zu bilden, beschrieben (WICKERHAM & STODOLA, 1960). Es stellte sich heraus, dass es sich dabei hauptsächlich um die Sphingoidbase (C₁₈)Phytosphingosin handelte, die überwiegend

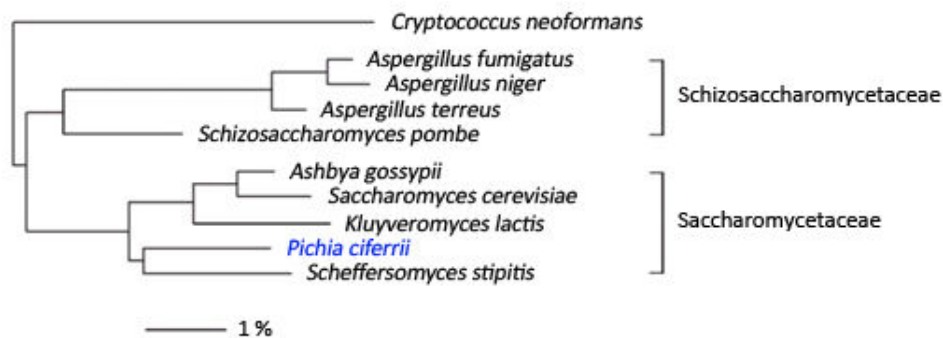


Abb. 6: Phylogenetischer Baum von komplett sequenzierten Hefearten der Familien *Saccharomycetaceae* und *Schizosaccharomycetaceae*. Die Verwandtschafts-Beziehungen basieren auf den 18S rDNA Sequenzen des jeweiligen Organismus. Der Maßstabsbalken gibt die Sequenz-Unterschiede in % an [Daten nicht publiziert (Stand: 2008); mit freundlicher Genehmigung von Karina Brinkroff, Universität Bielefeld].

komplett acetyliert als Tetra-Acetyl-Phytosphingosin (TAPS) vorliegt. Zudem wurden geringe Mengen der ebenfalls meist komplett acetylierten Sphingoidbase (C₁₈)Sphinganin (Tri-Acetyl-Sphinganin: TriASa) entdeckt (STODOLA & WICKERHAM, 1960; GREENE *et al.*, 1965). Für industrielle Zwecke wurden bereits 1962 Fermentationen mit *P. ciferrii* in 750-Liter Pilot-Anlagen durchgeführt, wobei bis zu 233 Milligramm TAPS pro Liter erhalten werden konnten (MAISTER *et al.*, 1962). Einige Dekaden später wurde *P. ciferrii* durch rationale Stammentwicklung bzw. Blockade der Phytosphingosin-Synthese für die Produktion der acetylierten Sphingoidbasen Sphinganin bzw. Tri-Acetyl-Sphinganin (TriASa) optimiert (BAE *et al.*, 2004). Die Gene für die intrinsische Synthese der Sphingoidbase Sphingosin konnten 2007 in *P. ciferrii* isoliert werden. Allerdings wurden erst durch Überexpression z.T. heterologer Gene signifikante Mengen an Tri-Acetyl-Sphingosin produziert (BÖRGEL, 2007).

1.3.1 *de novo* Biosynthese von Sphingoidbasen: *P. ciferrii* vs. *S. cerevisiae*

Bislang konnten dreizehn Gene der Sphingolipid-Biosynthese von *P. ciferrii* isoliert, sequenziert und zum Teil charakterisiert werden (BAE *et al.*, 2003 / 2004; BÖRGEL, 2007; BÖRGEL *et al.*, nicht publiziert). Zudem konnten die überwiegend voll acetylierten Derivate der Sphingoidbasen Phytosphingosin und Sphinganin (MAISTER *et al.*, 1962; GREENE *et al.*, 1965), Sphingosin (BÖRGEL, 2007) und Sphingadienin (d18:2^{Δ4E,Δ8E}) (BÖRGEL *et al.*, nicht publiziert) nachgewiesen werden. Weiterhin ist bekannt, dass *P. ciferrii* Glukosyl-Ceramide (Cerebroside) synthetisiert (KAUFMAN *et al.*, 1971). Anhand dieser Daten lässt sich ein Stoffwechselweg ableiten, der in **Abb. 7** schematisch dargestellt ist und im Folgenden Basis zur Erläuterung der Unterschiede im Sphingolipid-Metabolismus zwischen *P. ciferrii* und *S. cerevisiae* ist. Ein wesentlicher Unterschied zu *S. cerevisiae* besteht darin, dass *P. ciferrii* in der Lage ist desaturierte Sphingoidbasen wie Sphingosin zu produzieren. Die Synthese von Sphingosin wird durch eine Δ4-Desaturase (PcDes1) katalysiert, die Sphinganin (unter Verwendung von Sauerstoff und NADPH) im Dihydroceramid zu Sphingosin desaturiert. Sphingosin-haltige Ceramide können weiterhin von einer Δ8-Desaturase (PcSld1) desaturiert werden, wodurch Sphingadienin-haltige Ceramide (Ceramid') gebildet werden. Schließlich kann Ceramid-gebundenes Sphingadienin am C-Atom 9 S-Adenosyl-Methionin-abhängig methyliert werden, wodurch

9-Methyl-Sphingadienin-haltige Ceramide (Ceramid“) entstehen. Ein putatives Sphingolipid-C9-Methyl-Transferasegen wurde bereits isoliert (BÖRGEL, 2007), jedoch konnte 9-Methyl-Sphingadienin bisher nicht in *P. ciferrii* nachgewiesen werden. Ceramid-gebundene Sphingoidbasen können schließlich von einer Ceramidase (PcYxc1) freigesetzt werden.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zu *S. cerevisiae* (und zu allen anderen bekannten Organismen) besteht in der Tetra- [Tetra-Acetyl-Phytosphingosin (TAPS)] bzw. Tri-Acetylierung [Tri-Acetyl-Sphinganin (TriASa), Tri-Acetyl-Sphingosin (TriASo), Tri-Acetyl-Sphingadienin (TriASd)] der Sphingoidbasen mit anschließender Sekretion ins extrazelluläre Medium (WICKERHAM & STODOLA, 1960; BÖRGEL *et al.*, nicht publiziert). Der *P. ciferrii* Wildtypstamm F-60-10A NRRL 1031 (PCWT) z.B. produziert dabei fast ausschließlich Tetra-Acetyl-(C₁₈)Phytosphingosin (TAPS) (MAISTER *et al.*, 1962; GREENE *et al.*, 1965; KARLSSON, 1966). Die Acetylierung der LCBs geht von Acetyl-CoA aus und wurde erstmals in Mikrosomen von *P. ciferrii* detektiert (BARENHOLZ & GATT, 1969 / 1972), wobei die Acetyltransferase(n) die für die LCB-Acetylierungen verantwortlich ist (sind), bislang unbekannt ist (sind).

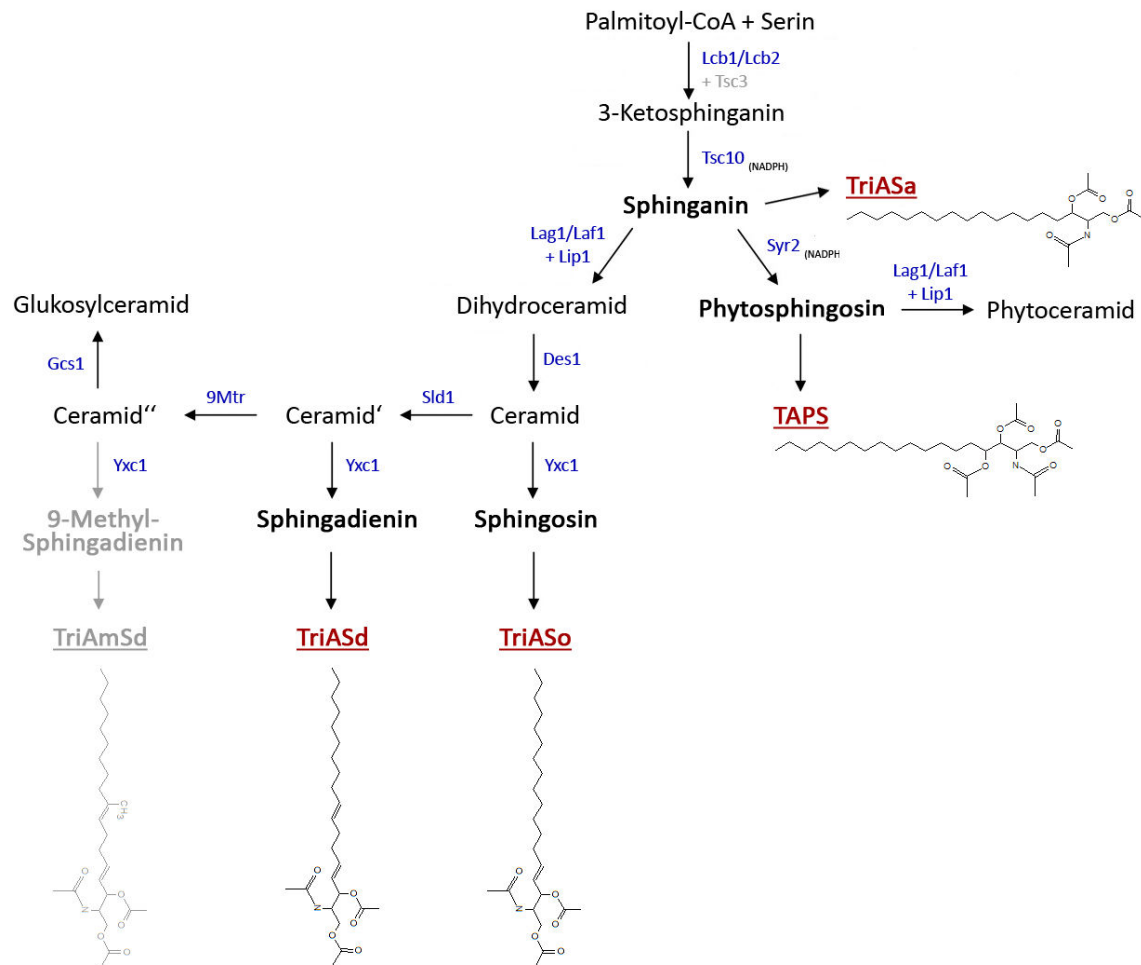


Abb. 7: Vereinfachte Darstellung des Sphingolipid-Metabolismus bzw. der *de novo* LCB-Biosynthese in *P. ciferrii*, basierend auf den bislang bekannten z.T. putativen Genen bzw. Proteinen (blau). Charakteristisch für *P. ciferrii* ist die Acetylierung der LCBs und anschließende Sekretion ins Medium. TAPS stellt im Wildtyp die nahezu einzig nachweisbare acetylierte LCB dar. Die Acetyltransferase(n) die für die LCB-Acetylierungen verantwortlich ist (sind), ist (sind) bisher nicht bekannt. Die Ceramidase Yxc1 hydrolysiert wahrscheinlich auch Dihydroceramid und Phytoceramid (nicht gezeigt). (TriASa: Tri-Acetyl-Sphingarin; TAPS: Tetra-Acetyl-Phytosphingosin; TriASo: Tri-Acetyl-Sphingosin; TriASd: Tri-Acetyl-Sphingadienin; TriAmSd: Tri-Acetyl-9-Methyl-Sphingadienin). Für Angaben in grau gibt es bislang keine konkreten Hinweise. Ebenfalls in *P. ciferrii* bekannt ist die LCB-Kinase Lcb4 (nicht gezeigt). Details s. Text.

1.4 Serin-Metabolismus in Hefen

In der *de novo* Sphingolipid-Biosynthese ist die Kondensation von L-Serin und Palmitoyl-CoA der initiale Schritt. In Hefen und Säugerzellen gilt diese Reaktion als limitierend im metabolischen Fluss hin zur Synthese von Sphingoidbasen (SMITH & MERRILL, 1995; PERRY, 2002), wobei die Aminosäure L-Serin wahrscheinlich das limitierende Edukt dieser Kondensationsreaktion darstellt (COWART & HANNUN, 2007). Für eine effiziente Produktion

von Sphingoidbasen in *P. ciferrii* ist eine ausreichende Bereitstellung von *in vivo* L-Serin möglicherweise eine wichtige Voraussetzung.

Für die Biosynthese von L-Serin existieren in Hefen mehrere Stoffwechselwege, wobei zwei Wege maßgeblich für die *de novo* Synthese verantwortlich sind. Hauptsächlich wird L-Serin (sowohl während der Glykolyse, als auch während der Glukoneogenese) aus 3-Phosphoglycerat (3-PG) hergestellt. Zusätzlich kann während der Glukoneogenese L-Serin aus L-Glycin bzw. dessen Vorstufe Glyoxylat synthetisiert werden. In Anwesenheit von fermentierbaren C-Quellen wie z.B. Glukose wird L-Serin vorwiegend aus dem Glykolyse-Intermediat 3-PG synthetisiert (**Abb. 8**), wohingegen die Gene des glukoneogenetischen Weges durch Glukose reprimiert werden. Dabei wird 3-PG zunächst NAD-abhängig von Ser3 und Ser33 (Haupt-Isoenzym) zu 3-Phospho-Hydroxypyruvat (3-P-HP) oxidiert (ALBERS *et al.*, 2003). Anschließend kommt es zu einer Transaminierung von 3-P-HP und Glutamat zu 3-Phospho-L-Serin (3-PS) und α -Ketoglutarat, was von Ser1 katalysiert wird. Ser2 katalysiert schließlich die finale Reaktion, die Dephosphorylierung von 3-PS zu L-Serin. Der *de novo* L-Serin-Biosyntheseweg wird in Hefe wahrscheinlich durch L-Serin über Ser3 *feed back* bzw. auto-reguliert (ULANE & OGUR, 1972). Zudem existieren Hinweise für eine transkriptionelle Regulation der *SER* Gene in Bezug auf C- und N-Quellen (MELCHER *et al.*, 1995; ALBERS *et al.*, 2003).

L-Serin stellt unter fermentativen Bedingungen die Hauptquelle sowohl für zelluläres L-Glycin als auch für den C₁-Donor 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat (5,10-mTHF) dar (SCHIRCH, 1982; ALBERS *et al.*, 2003). Dabei wird L-Serin von den Serin-Hydroxy-Methyl-Transferasen (SHMTs) Shm1 und Shm2 zu L-Glycin und 5,10-mTHF umgesetzt, wobei Shm1 mitochondrial und Shm2 cytosolisch vorliegt (MCNEIL *et al.*, 1994). Um cytosolisch vorliegendes L-Serin in die (im ER-stattfindende) Sphingolipid-Biosynthese einzuschleusen, existiert in Hefen ein Protein, welches die Versorgung der SPT mit L-Serin verbessert (INUZUKA *et al.*, 2005). Dieses Protein (Tms1) ist in Hefe das Homolog zu den humanen *serine incorporator* Proteinen Serinc1-5. Es ist durch elf Transmembran-Domänen in der ER-Membran verankert und wurde in einem *yeast two-hybrid screening* als Interaktionspartner von Ser3 nachgewiesen (ITO *et al.*, 2001; INUZUKA *et al.*, 2005), wodurch L-Serin- und Sphingolipid-Synthese wahrscheinlich sterisch miteinander gekoppelt sind.

Stehen der Hefe nur nicht-fermentierbare C-Quellen wie Ethanol oder Acetat zur Verfügung ($\hat{=}$ de-reprimierende Bedingungen), wird L-Serin hauptsächlich von der mitochondrialen SHMT Shm1 aus L-Glycin und 5,10-mTHF synthetisiert (SINCLAIR & DAWES, 1995; MCNEIL *et al.*, 1996; PIPER *et al.*, 2000). L-Glycin wird dabei aus Glyoxylat synthetisiert, dem anaplerotischen Produkt des Glyoxylat-Zyklus (ULANE & OGUR, 1972; MELCHER & ENTIAN, 1992), wohingegen 5,10-mTHF durch den mitochondrialen L-Glycin Decarboxylase Multienzym (GDM) Komplex aus Tetra-Hydrofolat (THF) bereitgestellt wird. Zusätzlich ist ein alternativer L-Glycin-Biosyntheseweg beschrieben, der nicht durch Glukose reprimiert wird und ursprünglich als Hauptweg für die L-Glycin-Biosynthese auf Glukose-haltigem Medium postuliert wurde (MONSCHAU *et al.*, 1997), was allerdings im Widerspruch zu den Daten von (ALBERS *et al.*, 2003) steht, da dort ein *ser3 Δ ser33 Δ S. cerevisiae* Stamm L-Serin- und L-Glycin-auxotroph war. In diesem alternativen Weg wird die Synthese von Gly1 (einer Threonin Aldolase) katalysiert, wobei L-Threonin direkt zu L-Glycin umgewandelt wird, welches wiederum theoretisch für die Synthese von L-Serin verwendet werden kann.

Neben diesen Synthesewegen ist eine reversible Umsetzung von L-Pyruvat zu L-Serin möglich. Diese findet *in vivo* allerdings kaum statt, da die Expression des korrespondierenden Gens *CHA1* durch L-Serin induziert wird und Cha1 daher hauptsächlich am Katabolismus von L-Serin beteiligt ist (RAMOS & WIAME, 1982; PETERSEN *et al.*, 1988; BORNAES *et al.*, 1993). Dieser Weg wird in Hefen vornehmlich zur Verwertung von L-Serin (als N-Quelle) genutzt. L-Serin ist auch ein wichtiges Intermediat für die *de novo* Synthese der Aminosäuren L-Tryptophan und L-Cystein. Im Falle von L-Tryptophan katalysiert die L-Tryptophan Synthase Trp5 reversibel die Umsetzung von Indol-3-Glycerin-P und L-Serin zu L-Tryptophan (und Glycerinaldehyd-3-P), den letzten Schritt der Tryptophan-Biosynthese (BAILEY & TURNER, 1983). *TRP5* unterliegt in Hefen der generellen Kontrolle der Aminosäuren-Biosynthese [*general amino acid control*, (GAAC); Review: (NIEDERBERGER *et al.*, 1981; HINNEBUSCH, 1988 / 2005)] und wird verstärkt unter Aminosäure-Mangel exprimiert (ZALKIN & YANOFSKY, 1982). Bei der L-Cystein-Biosynthese wird L-Serin von der Cystathionin- β -Synthase Cys4 mit Homocystein zu Cystathionin umgesetzt (ONO *et al.*, 1988; ONO *et al.*, 1994), welches dann von Cys3 in L-Cystein und 2-Oxobutanoat gespalten werden kann (ONO *et al.*, 1992). Theoretisch kann L-Serin auch im

L-Methionin *salvage pathway* durch Bat1, Bat2, Aro8 oder Aro9 freigesetzt werden (THOMAS & SURDIN-KERJAN, 1997; PIRKOV *et al.*, 2008).

L-Serin ist als Aminosäure außerdem eine wichtige Komponente bei der Proteinbiosynthese und ein wichtiger Metabolit für die Synthese von Phosphatidyl-L-Serin (PtdSer). Bei der Biosynthese von PtdSer wird L-Serin mit CDP-Diacyl-Glycerol via Cho1 zu PtdSer (und CMP) umgesetzt (ZINSER *et al.*, 1991), welches unter anderem ein Intermediat für die Synthese von Phosphatidyl-Cholin ist, dem abundantesten Phospholipid in Hefe (VANCE & STEENBERGEN, 2005).

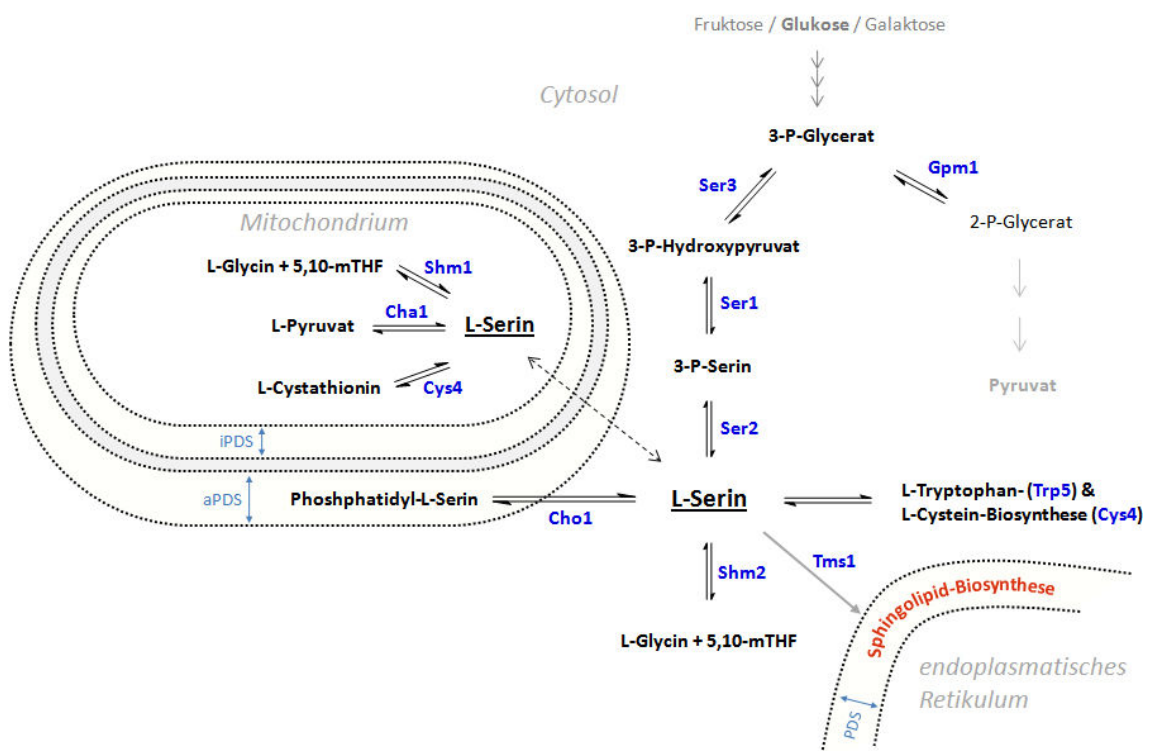


Abb. 8: Vereinfachte Übersicht des Serin-Metabolismus in Hefe unter fermentativen Bedingungen. Cho1 ist neben der aPDS ebenfalls an der PDS des endoplasmatischen Retikulums assoziiert (nicht gezeigt). (PDS: Phospholipid-Doppelschicht; iPDS: innere mitochondriale PDS; aPDS: äußere mitochondriale PDS).

1.5 Biosynthese von Palmitoyl-CoA in Hefen

Im Folgenden wird eine kurze Übersicht über die *de novo* Synthese von (für die Sphingolipid-Biosynthese relevanten) Fettsäuren gegeben. Dabei wird im Allgemeinen der Stoffwechsel von Hefen am Beispiel von *S. cerevisiae* grob erläutert.

Die *de novo* Fettsäure-Synthese findet hauptsächlich im Cytosol bzw. an der Membran des endoplasmatischen Retikulums statt und beginnt mit der Carboxylierung von aktivierter Essigsäure (Acetyl-CoA) zu Malonyl-CoA (IVESSA *et al.*, 1997) (**Abb. 9**). Dieser Schritt wird in Hefe von dem essentiellen Enzym Acc1 (und mitochondrial von Hfa1) katalysiert (HASSLACHER *et al.*, 1993; KEARSEY, 1993). Malonyl-CoA und Acetyl-CoA dienen als Substrate des 2,6 MDa gewichtigen FAS (*fatty acid synthase*) Komplexes, bestehend aus den Untereinheiten Fas1 und Fas2 (STOOPS *et al.*, 1992), der *in vitro* Fettsäuren mit bis zu 20 C-Atomen synthetisieren kann (TEHLIVETS *et al.*, 2007). Dabei wird Acetyl- bzw. Acyl-CoA schrittweise um zwei C-Atome verlängert. Für eine detailliertere Ausführung der Fettsäure-Synthese sei hier verwiesen an (LOMAKIN *et al.*, 2007; TEHLIVETS *et al.*, 2007). Der FAS-Komplex ist für den größten Teil der *de novo* Fettsäure-Synthese in Hefe verantwortlich und ist somit wesentlich an der Produktion von Palmitoyl-CoA beteiligt, welches wiederum ein wesentliches Intermediat für die *de novo* Synthese von Sphingoidbasen ist.

Die Verlängerung von aktivierten Fettsäuren (Acyl-CoA) mit 14 - 18 C-Atomen findet im endoplasmatischen Retikulum statt. Dabei wird vornehmlich (C₁₆)Palmitoyl-CoA initial in vier Schritten um zwei C-Atome verlängert (**Abb. 9**). Dieser Vier-Schritt-Elongations-Zyklus wiederholt sich in *S. cerevisiae* bis zur Bildung von Acyl-CoA mit i.d.R. 26 C-Atomen (*very long chain fatty acid*: VLCFA) und unterliegt Reaktionsmechanismen, die denen der FAS-vermittelten Fettsäure-Synthese im Cytosol ähneln [siehe: (TEHLIVETS *et al.*, 2007; DICKSON, 2008)]. VLCFAs finden hauptsächlich Verwendung für die Synthese von Ceramiden bzw. komplexen Sphingolipiden und GPI-Ankern.

Neben der *de novo* Synthese von Fettsäuren existieren grundsätzlich zwei weitere Möglichkeiten der Fettsäure-Versorgung. Fettsäuren können (wenn vorhanden) aus dem Medium aufgenommen oder aus endogenen Lipiden bereitgestellt werden. In beiden Fällen werden die Fettsäuren zu deren CoA-Derivaten verestert und somit aktiviert. Dieser Prozess ist an den Import von Fettsäuren gekoppelt und wird als „*vectorial esterification*“ bezeichnet (Zou *et al.*, 2003). Die Aktivierung der Fettsäuren zu Acyl-CoA erfolgt dabei durch die Proteine Faa1-4 / Fat1 (BLACK & DIRUSSO, 2007).

EINLEITUNG

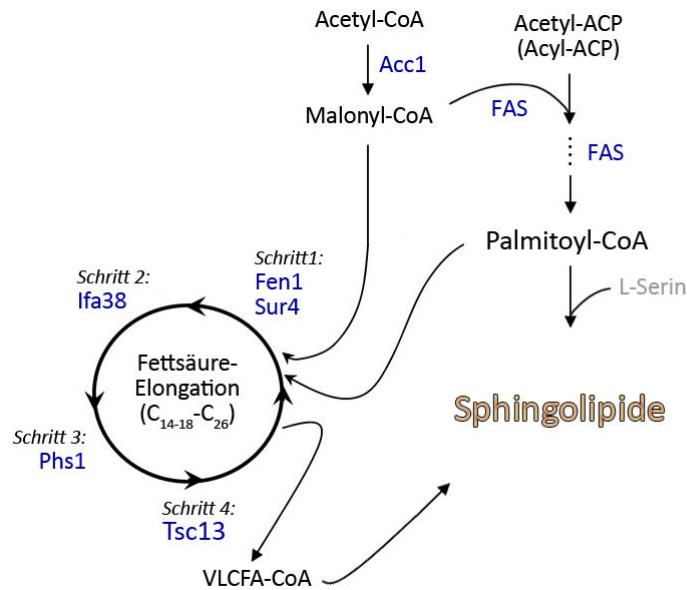


Abb. 9: Grob schematische Darstellung der für die Sphingolipid-Biosynthese relevanten aktivierten Fettsäuren. ACP: *acyl carrier protein*; C: Kohlenstoff; CoA: Coenzym A; VLCFA: *very long chain fatty acid*. Mod. nach (DICKSON, 2008). Details siehe Text.

1.6 Sphingolipide und die menschliche Haut

In menschlichen Zellen ist die Sphingolipid-Zusammensetzung stark vom jeweiligen Gewebe abhängig. So sind vor allem Ceramide die essentiellen Komponenten bei der Ausbildung der äußersten Hautschicht, dem *stratum corneum* (SC; **Abb. 10**) (CODERCH *et al.*, 2003; ABURAI *et al.*, 2011). Diese Schicht stellt eine wichtige Permeabilitäts-Barriere für die Penetration von Fremd- bzw. Schadstoffen oder Mikroorganismen dar und schützt zudem die Haut vor übermäßigem Wasserverlust (HARDING *et al.*, 2000; HOLLERAN *et al.*, 2006). Das SC besteht aus mehreren Schichten verhornter (toter) Corneocyten (ausdifferenzierte Keratinocyten), die in eine lamellare (quasikristalline) Lipid-Matrix eingebettet sind. Letztere setzt sich vornehmlich aus etwa äquimolaren Mengen an Ceramiden, langkettigen Fettsäuren und Cholesterol zusammen (NOVOTNY *et al.*, 2010). Im menschlichen SC wurden elf Ceramid-Klassen identifiziert, basierend auf vier Sphingoidbasen (Sphingosin, Dihydrosphingosin, Phytosphingosin und 6-Hydroxy-Sphingosin) und drei Acyl-Rest-Typen (MASUKAWA *et al.*, 2008). Sphingosin-haltige Ceramide stellen dabei die abundanteste Ceramid-Klasse dar (JANUSOVA *et al.*, 2011).

Eine normale Barriere-Funktion der Haut setzt ein definiertes Ceramid-Verhältnis im SC voraus. Änderungen in diesen Verhältnissen sind z.B. altersbedingt (ROGERS *et al.*, 1996), oder Ursache für Hautkrankheiten wie Schuppenflechte oder atopische Dermatitis (PROKSCH *et al.*, 2008; NOVOTNY *et al.*, 2010), weshalb für die Formulierung von regenerativen Hautcremes eine dem SC möglichst nachempfundene Ceramid-Komposition sinnvoll wäre (DE JAGER *et al.*, 2005). Die Synthese von Ceramiden, insbesondere von Sphingosin-haltigen Ceramiden, ist daher in der Kosmetik-Industrie schon seit mehreren Jahren von großem Interesse (NOVOTNY *et al.*, 2010). Regenerative Eigenschaften von Ceramid-haltigen Lotionen wurden bereits beschrieben (IMOKAWA *et al.*, 1986; YILMAZ & BORCHERT, 2006).

Immer größeres Interesse kommt der (biotechnologischen) Synthese von Sphingoidbasen für kosmetische Formulierungen zuteil. Ihnen werden anti-mikrobielle sowie entzündungshemmende Eigenschaften zugeschrieben (BIBEL *et al.*, 1992; PAVICIC *et al.*, 2007) und zudem fördern sie die Proliferation von Horn-bildenden Zellen (Keratinocyten) (PARAGH *et al.*, 2008). Während der Keratinocyten-Proliferation sind diese wesentlich an der Ausbildung der lamellaren Lipid-Matrix im SC beteiligt (SCHURER *et al.*, 1991). Ferner konnte gezeigt werden, dass Sphingosin, N-Methyl- und N-Acetyl-Sphingosin eine hemmende Wirkung auf die Entwicklung von Hautkrebs haben können (BIRT *et al.*, 1998). Für TAPS konnte ebenfalls eine (indirekte) positive Wirkung in Bezug auf die Schutzfunktion der Haut festgestellt werden. So wurden nach epidermaler Applikation von TAPS gesteigerte Ceramid-Level in Keratinocyten nachgewiesen, was mit verbesserten Barriere-Eigenschaften des SC einherging (CARLOMUSTO *et al.*, 1996; DAVIES *et al.*, 1996).

EINLEITUNG

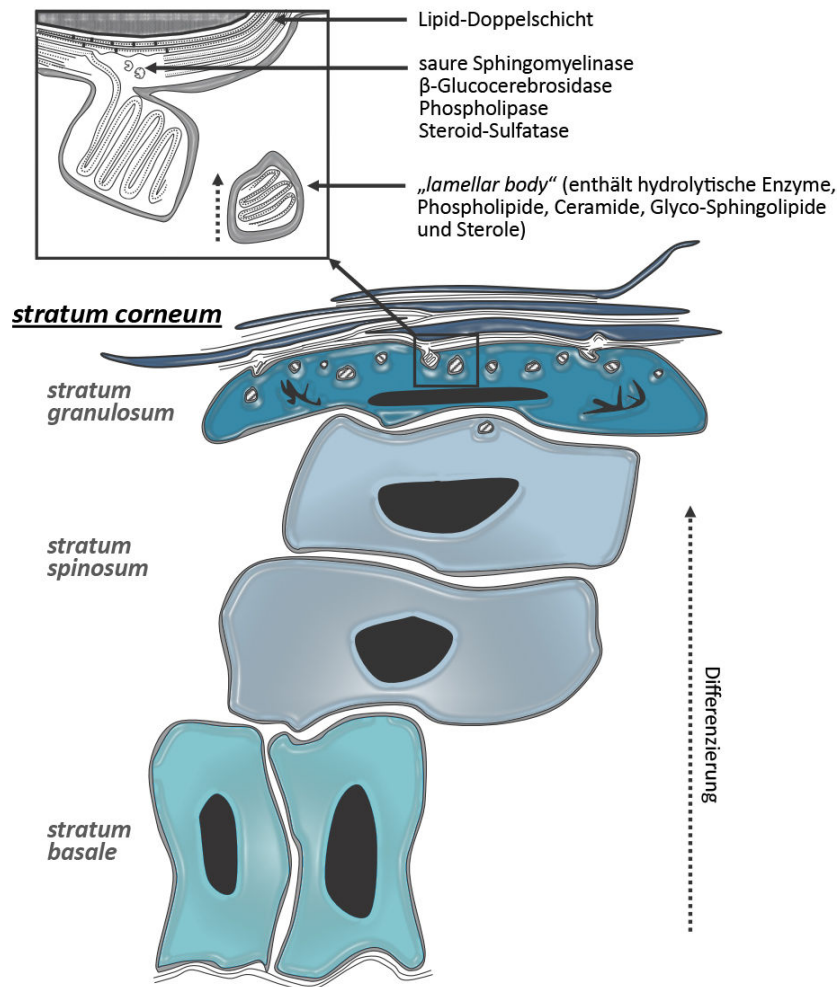


Abb. 10: Schematische Darstellung des Querschnitts der menschlichen Haut vom *stratum basale* (Basalschicht) bis zum *stratum corneum* (Hornschicht). Phospholipide, Ceramide, Glyco-Sphingolipide und Sterole werden zusammen mit lytischen Enzymen mittels Exozytose in den interzellulären Bereich zwischen *stratum granulosum* und *stratum corneum* sekretiert. Durch die enzymatische Spaltung werden dem *stratum corneum* z.B. freie Fettsäuren und Ceramide bereitgestellt. Mod. nach (PROKSCH *et al.*, 2008).

1.7 Ziele der Arbeit

Aufgrund der einzigartigen Fähigkeit von *P. ciferrii* große Mengen an (acetylierten) Sphingoidbasen zu synthetisieren, war ein Ziel dieser Arbeit die rationale Stammentwicklung hinsichtlich einer optimierten Sphingoidbasen-Produktion in *P. ciferrii*. Dies sollte auf verschiedenen Ebenen realisiert werden. Zunächst wurde angestrebt die genetische Handhabbarkeit von *P. ciferrii* zu verbessern. So integriert transformierte DNA vornehmlich ungerichtet im Genom dieser Hefe, was genetische Modifikationen stark erschwert. Durch Blockade eines bestimmten DNA-Reparaturweges, dem *non-*

homologous end joining (NHEJ), konnte bereits in anderen Hefen die Effizienz der gezielten DNA-Integration drastisch erhöht werden (KOOISTRA *et al.*, 2004; ISHIBASHI *et al.*, 2006), was daher in dieser Arbeit auf *P. ciferrii* übertragen werden sollte. Durch Deletion und Über-Expression ausgewählter Gene des L-Serin- und Sphingolipid-Metabolismus sollte in einem NHEJ-defizienten Stamm die Biosynthese von Sphingoidbasen rational optimiert werden. So wurde zunächst eine optimierte Produktion von Phytosphingosin bzw. Tetra-Acetyl-Phytosphingosin (TAPS) angestrebt, der vom Wildtyp hauptsächlich produzierten Sphingoidbase. In solch einem für die TAPS-Produktion optimierten Stamm wäre dann durch Deletion des *PcSYR2* Gens die Umwandlung in einen optimierten Sphinganin-Produzenten denkbar. PcSyr2 katalysiert die Konversion von Sphinganin zu Phytosphingosin. Eine Deletion von *PcSYR2* unterbindet daher die Produktion von TAPS und sollte in einer kompensierenden Produktion von Sphinganin bzw. Tri-Acetyl-Sphinganin (TriASa) resultieren. Die Implementierung eines z.T. heterologen Stoffwechselweges für die Produktion von Sphingosin bzw. Tri-Acetyl-Sphingosin (TriASo) wurde bereits erfolgreich in *P. ciferrii* etabliert, resultierte allerdings stets in der Co-Produktion von hohen Mengen Sphinganin bzw. TriASa (BÖRGEL, 2007). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher die Optimierung der Sphingosin-Produktion, wenn möglich ebenfalls in einem für die TAPS- bzw. LCB-Produktion optimierten Stamm.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1 Stämme & Medien

2.1.1 Bakterienstämme

Tab. M 1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
DH5α	<i>F' φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 phoA</i>	Gibco BRL
BL21(DE3)pLysS	<i>F ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cam^R)</i>	Novagen
SURE	<i>e14-(McrA-) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kanr) uvrC [F' proAB lacIqΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>	Stratagene

2.1.2 Medien & Anzucht von *E. coli*

Lysoqeny broth (LB-Medium): 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, pH 7,5. Super

optimal broth (SOB): 2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, pH 7.

Super optimal broth with catabolite repression (SOC-Medium): SOB-Medium + 20 mM Glukose. (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Für die Selektion auf eine Plasmid-codierte Antibiotikaresistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 40 µg * ml⁻¹ Ampizillin zugesetzt. Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 2 % Agar. Die Anzucht erfolgte bei 37° C.

2.1.3 Hefestämme

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Hefestämme sind in Tab. A 1 aufgelistet.

2.1.4 Medien & Anzucht von *S. cerevisiae* & *P. ciferrii*

Tab. M 2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Medien zur Kultivierung von *S. cerevisiae* und *P. ciferrii*.

Medium	Bestandteile
YEPD (<i>yeast extract peptone dextrose</i>)	1 % Hefeextrakt, 1 % Pepton, 2 % Glukose (w/v)
synthetisches Minimalmedium (SM)	0,16 % YNB, 0,5 % Ammoniumsulfat, C-Quelle in der jeweils angegebenen Konzentration, pH 6
synthetisches Kompletmedium (SC)	0,67 % YNB, C-Quelle in der jeweils angegebenen Konzentration, pH 6, Aminosäuren / Nukleobasen nach (ZIMMERMANN, 1975)
TAPS-Medium	Pro Liter: 33 g Glukose-Monohydrat, 20 g Kalium-Hydrogenphthalat, 4.83 g Ammonium-Chlorid, 1 g Hefeextrakt, 1 g Kalium-Dihydrogenphosphat, 0.88 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 0.2 g Kaliumchlorid-Dihydrat, 60 mg Natrium-Chlorid, 59 mg myo-Inositol, Spurenelemente [37.3 mg Ammonium-Eisen(II)Sulfat-Hexahydrat, 7.5 mg Kupfer(II)Sulfat-Pentahydrat, 5 mg Zinksulfat-Heptahydrat, 1.5 mg Kaliumiodid, 0.6 mg Mangan(II)Sulfat-Monohydrat, 0.6 mg Borsäure, 0.6 mg Natriummolybdat-Dihydrat], Vitamine (3 mg Nikotinsäure, 3 mg Kalium D-Pantothenat, 3 mg Thiamin, 2 mg 4-Aminobenzoessäure, 0.3 mg Pyridoxin, 10 µg Biotin) und ggf. Aminosäuren / Uracil (10 mM); pH 5,4

Für die Selektion auf eine opt.*nat1* (für *P. ciferrii* Codon-optimiertes *nat1* aus *Streptomyces noursei*) vermittelte Resistenz gegen Nourseothricin (clonNAT) Resistenz wurden dem Medium nach dem Autoklavieren 50 µg * ml⁻¹ clonNAT zugesetzt. Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 2 % Agar. Die Anzucht erfolgte bei 30° C.

2.2 Enzyme, Chemikalien & weitere Materialien

Tab. M 3: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Enzyme, Chemikalien und Materialien.

Quelle	Enzyme, Chemikalien, Material
Agilent Technologies Deutschland GmbH	ZORBAX SB-C8 Column (RP-HPLC-Säule)
AppliChem GmbH	RNase A, RNase-ExitusPlus™ (für RNase-Dekontamination)
Becton, Dickinson and Company	Bacto™ technischer Hefeextrakt, Difco™ Yeast Nitrogen Base without Amino Acids (YNB)
Bertin Technologies SAS	Precellys® Lyse-Kit VK01, Precellys® 24 <i>bead beating homogenizer</i>
biomers.net GmbH	Synthetische Oligonukleotide (Primer)
Bio-Rad Laboratories GmbH	Gene Pulser® (Elektroporations-Gerät)
Carl Roth GmbH & Co. KG	<u>Chemikalien / Material ohne Quellen-Angabe</u> , Glasperlen (0,25 - 0,5 mm Ø), Roti®-Quant Kit, ROTISOLV® Methanol (≥ 99,98 %, Ultra LC-

MATERIAL & METHODEN

	MS), ROTISOLV® Aceton (HPLC)
Clontech-Takara Bio Europe	GenomeWalker Universal Kit
Dionex Corporation	Hard- & Software für HPLC-System (außer RP-HPLC-Säule)
Eppendorf AG	Mastercycler® gradient, Thermomixer
EVONIK Degussa GmbH	HPLC-Standards
Fermentas GmbH	GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit
Finnzymes	Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase
GE Healthcare Europe GmbH	Ultrospec 2100 <i>pro</i> Photometer, SWIFT II Software
GE Water & Process Technologies	Zellulosemembranen (0,45 µm)
GeneArt®	Synthetische DNA
IKA®-Werke GmbH & CO. KG	Vibrax® (VXR basic)
Infors GmbH	Rotations-Schüttelgerät (Orbitron)
Invitrogen GmbH	Agarose, SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG	NucleoSpin® Extract II Kit
Millipore GmbH	Sterilfilter (0,2 µm)
NanoDrop Technologies, Inc.	ND-1000 Spectrophotometer
New England Biolabs GmbH	DNA-Leitern, Restriktions-Endonukleasen, <i>Taq</i> DNA Polymerase, Antarctic Phosphatase, T4 DNA Ligase
Novozymes Deutschland GmbH	Glucanex™-Lösung
Oxoid Deutschland GmbH	bakteriologisches Pepton
QIAGEN GmbH	RNase-freies Wasser, Plasmid Midi / Maxi Kit, RNeasy Mini Kit
Roche Diagnostics Deutschland GmbH	Lachs-Sperma-DNA, Hard- & Software für qRT-PCRs, LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I Kit
Sartorius AG	Feinwaage (Sartorius CP64)
Scientific & Educational Software	Clone Manager Professional v9
SEVERIN Elektrogeräte GmbH	Mikrowelle
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	<u>Medienbestandteile</u> (sofern bei Carl Roth GmbH & Co. KG nicht verfügbar), Enzyme & Chemikalien für Enzym-Aktivitäts-Tests, Tetracyclin, Doxycyclin, Ampizillin, DNase I, Tri-Fluor-Essigsäure
WERNER BioAgents	clonNAT

2.3 Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide sind in Tab. A 2 aufgelistet. Plasmide mit in dieser Arbeit konstruierten Gen-Deletionskassetten bzw. Promotor-Substitutionskassetten sind in Tab. A 4 bzw. Tab. A 5 gezeigt. Plasmide für die Disruption von putativen Acetyl-Transferase- (AcTr-) Genen sind in Tab. A 6 gelistet.

2.4 Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten synthetischen Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma biomers.net synthetisiert. Das Lösungsvolumen der Oligonukleotide in Wasser wurde so gewählt, dass eine Endkonzentration von $100 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ erreicht wurde. Tab. A 3 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Primer. Primer für die Konstruktion von Plasmiden mit Gen-Deletions- bzw. Promotor-Substitutionskassetten und Primer für deren Integrations-Nachweis sind in Abschnitt 2.7.2.1 bzw. 2.7.2.2 aufgelistet. Primer für die Konstruktion von Gen-Disruptions-Plasmiden sind in Tab. A 6 gezeigt.

2.5 Bioinformatische Analysen

2.5.1 Identifizierung von bislang unbekanntem Genen aus *P. ciferrii*

Wenn nicht anders angegeben wurden Sequenzinformationen *in silico* aus einer *P. ciferrii* Genom-Datenbank extrahiert (Universität Bielefeld; nicht publiziert). Zu diesem Zweck wurde die GenDB-Software v2.4 verwendet (MEYER *et al.*, 2003). Um unbekannte putative Gene von *P. ciferrii* zu identifizieren wurde mit den jeweiligen homologen Protein-Sequenzen (i.d.R. aus *S. cerevisiae*) eine TBLASTN-Suche durchgeführt. Bei der TBLASTN-Suche wurde eine Proteinsequenz (Matrize) mit allen sechs möglichen Leserahmen der *P. ciferrii* Genom-Datenbank verglichen. Falls kein Homolog des gesuchten Gens in *S. cerevisiae* existierte wurde die Protein-Sequenz eines bereits charakterisierten Homologs aus einer anderen Hefe als Matrize verwendet. Die abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen der extrahierten putativen Gene aus *P. ciferrii* wiederum wurden als Matrize für eine BLASTP-Suche verwendet und so mit NCBI's Datenbank für nicht-redundante Protein-Sequenzen¹ verglichen, um die erhaltenen Gene genauer verifizieren zu können.

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>

2.5.2 *in silico* Charakterisierung von Proteinen

Prinzipiell wurden Domänen und Cofaktor-Bindestellen online anhand des InterProScan Programmes² (APWEILER *et al.*, 2001; ZDOBNOV & APWEILER, 2001) identifiziert. Putative Transmembran-Domänen wurden dabei anhand der *transmembrane hidden Markov method*³ (TMHMM) nach (KROGH *et al.*, 2001) bestimmt. Mitochondriale Lokalisationen von Proteinen wurden mittels des MitoProt Programmes (CLAROS & VINCENS, 1996) vorhergesagt. *In silico* Klonierungsarbeiten, sowie einfache Sequenzanalysen wurden mit der Clone Manager Software bewerkstelligt.

2.6 Arbeiten mit *E. coli*

2.6.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* wurde mittels Elektroporation nach (DOWER *et al.*, 1988) durchgeführt. Für die Elektroporation wurde der Gene Pulser® unter folgenden Bedingungen verwendet: Spannung: 2 - 2,5 kV; Widerstand: 200 Ω; Kapazität: 25 µF.

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

Für die Isolation von Plasmid-förmiger DNA aus *E. coli* wurde das GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers verwendet.

² <http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>

³ <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

2.7 Arbeiten mit Hefe

2.7.1 Klonierung von Plasmiden durch *in vivo* Rekombination in *S. cerevisiae*

Die *in vivo* Klonierung von DNA-Fragmenten in *S. cerevisiae* wurde wie in (OLDENBURG *et al.*, 1997) beschrieben durchgeführt. Zunächst wurden die zu klonierenden DNA-Sequenzen in PCR-Reaktionen (2.8.4) amplifiziert. Die verwendeten Primer besaßen dabei jeweils am 5'-Ende Bereiche, die homolog zu dem Integrationsbereich in den Zielvektoren waren. In *S. cerevisiae* ermöglichen diese homologen Enden eine homologe Rekombination zwischen einem linearisierten Vektor und PCR-Fragmenten, um ein zirkuliertes Plasmid zu erzeugen, welches *in vivo* vermehrt werden kann (POMPON & NICOLAS, 1989). Die Vektoren für die Klonierung wurden durch Verwendung von Restriktions-Endonukleasen linearisiert, gereinigt und zusammen mit dem PCR-Produkt in *S. cerevisiae* transformiert. Die Zellen wurden im Anschluss auf Selektivmedium ausplattiert. Dadurch konnte auf Transformanten selektiert werden, die aufgrund homologer Rekombination des DNA-Fragmentes mit dem linearisierten Vektor ein stabiles, zirkularisiertes Plasmid besaßen. Die Plasmide wurden aus Hefe isoliert, in *E. coli* transformiert, aus *E. coli* isoliert und durch eine anschließende Restriktionsanalyse und / oder Sequenzierung verifiziert.

2.7.2 Konstruktion von *P. ciferrii* Stämmen mit genomisch integrierten DNA-Konstrukten

Im Folgenden wird erläutert, wie in dieser Arbeit *P. ciferrii* Stämme mit genomisch integrierten Gen-deletionskassetten bzw. Promotor-Substitutionskassetten konstruiert wurden. Die einzelnen Schritte (2.7.2.1 - 2.7.2.6) sind dabei in chronologischer Reihenfolge angegeben.

2.7.2.1 Konstruktion von Gen-Deletionskassetten

Gen-Deletionen wurden, wenn nicht anders angegeben, mittels klassischem *one-step gene replacement* durchgeführt (ROTHSTEIN, 1983). Gen-Deletionskassetten wurden über *in vivo* Rekombination kloniert, wodurch Plasmide erhalten wurden, die als Matrize zur

PCR basierten Amplifikation der Gen-Deletionskassetten eingesetzt wurden. Diese PCR Produkte wurden anschließend in *P. ciferrii* transformiert, mit dem Ziel ein bestimmtes Gen über doppeltes *cross over* zu deletieren.

Für die Konstruktion der Gen-Deletionskassetten tragenden Plasmide (s. Tab. A 4) wurden jeweils ca. 300 - 500 bps von der Promotor- (PR) und der Terminator-Region (TR) des zu deletierenden Gens aus genomischer *P. ciferrii* Wildtyp DNA mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden jeweils die Primerpaare P1 / P2 für die PR und P3 / P4 für die TR verwendet (s. Abb. M 1; Tab. A 4). Die Primer wurden so gewählt, dass diese am 5' Ende etwa 30-35 bps lange Bereiche besaßen, die homolog zur clonNAT-Resistenz-Kassette (PCR-Amplifikat des Plasmids pCS.LoxP.nat1 mit den Primern LPNTL.fw und LPNTL.rv) bzw. zum Plasmid p426HXT7-6HIS waren.

Die PCR Produkte der Primerpaare P1 / P2, P3 / P4 und LPNTL.fw / LPNTL.rv wurden zusammen mit dem zuvor linearisierten Plasmid p426HXT7-6HIS (ca. 100 ng) in den *S. cerevisiae* Stamm K26 transformiert. Der Vektor p426HXT7-6HIS wurde durch Verwendung von zwei Restriktionsendonukleasen (*Bam*HI & *Eco*RI) linearisiert, die zwischen den homologen 5'-Sequenzen der Primer P1 und P4 schnitten. *In vivo* wurden die PCR Produkte mit dem linearisierten Vektor über homologe Rekombination zusammengefügt, wodurch der linearisierte Vektor rezirkularisiert wurde und in *S. cerevisiae* vermehrt werden konnte. Erhaltene Transformanten wurden mittels des Markergens (*opt.nat1*) auf YEPD Platten mit clonNAT selektiert (ohne vorherige Regeneration in YEPD), deren DNA isoliert, in *E. coli* transformiert und die daraus re-isolierten Plasmide durch Restriktionskartierung bzw. Sequenzierung verifiziert. Zur Amplifikation der Deletionskassetten wurden (wenn nicht anders erwähnt) die Primer-Paare 426L.fw / 426R.rv oder HXT7 / CYC verwendet. Die Sequenzen der jeweiligen Gen-spezifischen Primer P1 - P4, sowie Primer für den Integrations-Nachweis und die Überprüfung der Deletion sind in Tab. A 4 aufgelistet.

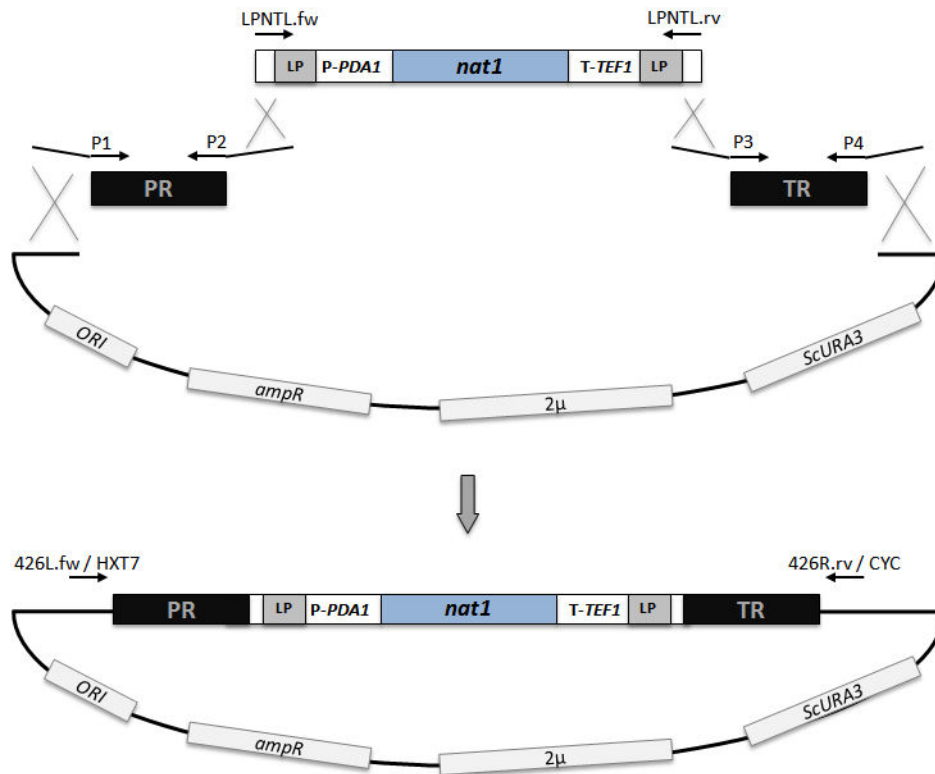


Abb. M 1: Schematische Darstellung der *in vivo* Konstruktion von Gen-Deletionskassetten tragenden Plasmiden. Durch Transformation von *S. cerevisiae* (Stamm K26) mit dem linearisierten Vektor p426HXT7-6HIS und den PCR-Produkten der Primerpaare P1 / P2, LPNTL.fw / LPNTL.rv und P3 / P4 wurden Vektoren konstruiert, deren Gen-Deletionskassetten mit dem Primerpaar 426L.fw / 426R.rv bzw. HXT7 / CYC per PCR vervielfältigt werden konnten. PR: Promotorregion; TR: Terminatorregion.

2.7.2.2 Konstruktion von Promotor-Substitutionskassetten

Für die Substitution von genomischen Promotor-Bereichen wurden in *P. ciferrii* native Promotor-Bereiche durch ausgewählte (und später im Text erwähnte) Promotor-Fragmente ausgetauscht. Zu diesem Zweck wurden analog zu den Gen-Deletionskassetten (s. 2.7.2.1) Plasmide konstruiert, welche die Promotor-Substitutionskassetten trugen und als PCR-Amplifikationsmatrize dienten. So wurden vier PCR-Produkte durch je ein Primerpaar amplifiziert (Tab. M 4 und Abb. M 2), die zusammen mit dem linearisierten Plasmid p426HXT7-6HIS in den *S. cerevisiae* Stamm K26 transformiert wurden. Die weitere Prozedur erfolgte wie in 2.7.2.1 beschrieben. Die Integration dieser Konstrukte sollte ebenfalls nach dem Prinzip des *one-step gene replacement* über doppeltes *cross over* erfolgen.

Die Sequenzen der jeweiligen Primer (P5 - P10), sowie Primer für den Integrations-Nachweis (und ggf. für die Überprüfung der Promotor-Deletion) sind in Tab. A 5 aufgelistet.

Tab. M 4: Gezeigt sind die Primerpaare P5 / P6, P7 / P8 und P9 / P10 bzw. deren jeweilige Homologie des 5'-Endes.

Primerpaar	Homologie des 5'-Endes des jeweiligen Primers zu:
P5	Klonierungsvektor p426HXT7-6HIS
P6	opt. <i>nat1</i> -Resistenzkassette (PCR-Amplifikat des Plasmids pCS.LoXP.nat1 mit den Primern LPNTL.fw und LPNTL.rv)
P7	opt. <i>nat1</i> -Resistenzkassette
P8	5'-Ende des ORFs
P9	3'-Ende des <i>PcTDH3</i> ⁻⁴²⁰⁻¹ bzw. <i>PcENO1</i> ⁻⁵⁸⁴⁻¹ Promotor-Fragments (PF)
P10	Klonierungsvektor p426HXT7-6HIS

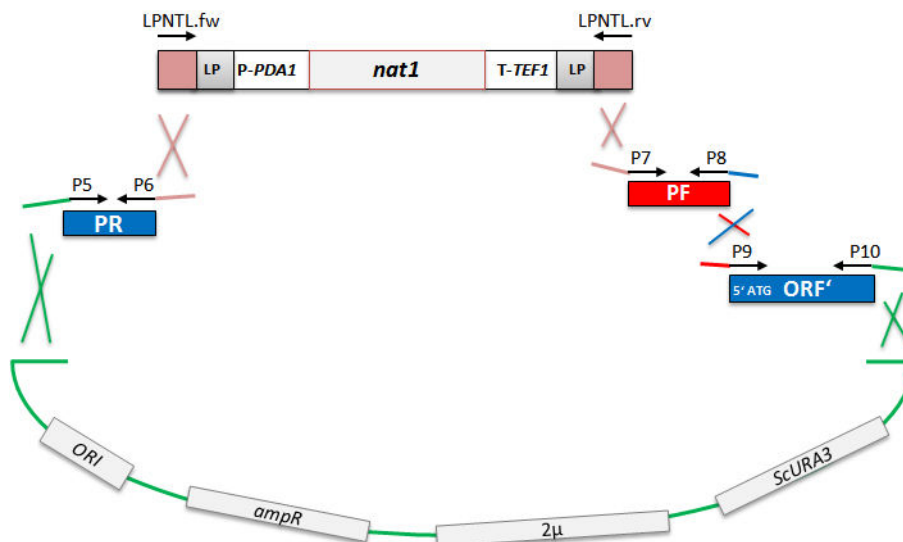


Abb. M 2: Schematische Darstellung für die *in vivo* Konstruktion von Plasmiden, die integrative Kassetten für genomische Substitutionen von Promotor-Bereichen trugen. Die Amplifikate der Primerpaare P5 / P6 und P9 / P10, die die homologen Bereiche für die genomische Integration darstellten, hatten eine Größe von 300 - 500 bps. PR: Promotor-Region; PF: Promotor-Fragment; ORF': 5'-Bereich des offenen Leserahmens.

2.7.2.3 Transformation von *P. ciferrii*

In dieser Arbeit wurde eine nach (DOHMEN *et al.*, 1991) modifizierte Gefrier-Transformations-Methode für *P. ciferrii* etabliert. Dabei wurden Zellen in YEPD kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{600nm} von 0,6 - 1 geerntet und anschließend mit einem halben Kulturvolumen Lösung A gewaschen (2.500 g, 3 min). Die gewaschenen Zellen wurden in 0,02 Kulturvolumen Lösung A resuspendiert, á 200 µl in 2 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und sofort bei -70° C gelagert.

Für die Transformation von *P. ciferrii* wurde zu transformierende DNA auf die gefrorenen Zellen gegeben und diese bei 37° C für max. 10 min unter leichtem Schütteln (650 - 800 rpm) aufgetaut. Bei Bedarf wurde zusätzlich zur DNA 12 µl einzelsträngiger Lachs-Sperma-DNA (2 mg * ml⁻¹) hinzugegeben [dies sollte in einer gesteigerten Transformations-Effizienz resultieren (SCHIESTL & GIETZ, 1989)]. Zu den aufgetauten Zellen wurde anschließend 1,5 ml Lösung B gegeben. Nach mehrmaligem Invertieren des 2 ml Reaktionsgefäßes wurde dieses für etwa 1 h bei 30° C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 11.000 g für 30 Sek. wurden die Zellen vom Überstand getrennt und sofort mit 1 ml Lösung C gewaschen (2.500 g, 3 min). Die Zellen wurden anschließend auf Selektions-Medium ausplattiert. Falls Transformanten auf Medium mit clonNAT selektiert werden sollten, wurden die Zellen zuvor für 4 - 6 h bei 30° C in 5 ml YEPD kultiviert (Regeneration) und anschließend auf clonNAT-haltigem Medium ausplattiert.

Lösung A: 1 M Sorbit (Sorbitol)
10 mM Bicin (pH 8,35)
3 % Ethylenglykol (w/v)

Lösung B: 40% PEG1000 (w/v)
200 mM Bicin (pH 8,35)

Lösung C: 150 mM NaCl
10 mM Bicin (pH 8,35)

2.7.2.4 Isolation von chromosomaler DNA aus *P. ciferrii*

Genomische DNA wurde durch eine abgewandelte Cethyltrimethylammoniumbromid-(CTAB) Methode (MURRAY & THOMPSON, 1980) aus *P. ciferrii* isoliert. Hierzu wurden Zellen einer Kultur (≥ 2 ml, $OD_{600nm} > 1$) geerntet, in 400 μ l CTAB-Puffer [2 % (w/v) CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl] resuspendiert, mit 200 μ l Glasperlen (0,25 - 0,5 mm \varnothing) versetzt und 8 min bei 4° C auf einem „Vibrax VXR basic“ (2200 rpm) aufgeschlossen. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min bei 65° C inkubiert. Nach Zugabe eines Volumens Chloroform und anschließendem Homogenisieren für 10 Sek. wurde der Ansatz für 5 min bei 16.000 g zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde entnommen und die DNA für mindestens 30 min bei -20° C mit 0,7 - 1 Volumen Isopropanol gefällt. Nach der folgenden Zentrifugation für 15 min bei 16.000 g und 4° C wurde das Sediment mit 70 %igem eiskalten Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 - 100 μ l H₂O resuspendiert.

2.7.2.5 Nachweis von genomisch integrierten DNA-Konstrukten

Erhaltene Transformanten wurden auf eine korrekte positionelle Integration der transformierten DNA-Konstrukte überprüft, indem chromosomale DNA aus den Zellen isoliert wurde (s. 2.7.2.4) und PCR-Reaktionen (s. 2.8.4) damit durchgeführt wurden.

Im Falle einer Gen-Deletion wurde für die PCR-Reaktion (wenn nicht anders angegeben) ein Gen-spezifischer Primer (Tab. A 4; bindet stromaufwärts des zu deletierenden ORFs) und der Konstrukt-spezifischer Primer PDA1.pop-in.rv4 verwendet. Nur bei einer korrekt integrierten Deletionskassette konnte ein PCR-Produkt erhalten werden. Zusätzlich wurde versucht das Wildtyp Allel des mutmaßlichen Deletionsstammes per PCR nachzuweisen. Dazu wurde erneut der Gen-spezifische Primer und ein Gen-interner Primer (Tab. A 4; bindet im ORF des zu deletierenden Gens) verwendet, wodurch nur bei noch vorhandenem Wildtyp Allel ein PCR-Produkt erhalten werden konnte (entsprechende Positivkontrolle mit genomischer Wildtyp DNA wurde stets durchgeführt). Ein Deletionsstamm wird im Folgenden als solcher bezeichnet, wenn die Integration bestätigt und ein vorhandenes Wildtyp Allel nicht nachgewiesen werden konnte.

Im Falle einer genomischen Promotor-Substitution wurde für die PCR-Reaktion ein Gen-spezifischer Primer (s. Tab. A 5; bindet in jenem ORF, dessen Promotor substituiert werden sollte, bzw. stromabwärts der P10-Bindestelle) und ein Promotor-spezifischer Primer (s. Tab. A 5; bindet in jenem Promotor, durch den der native Promotor-Bereich ersetzt wurde) verwendet. Durch Erhalt eines PCR-Produktes wurde die Promotor-Substitution verifiziert. Gegebenenfalls wurde die Deletion des nativen Promotor-Bereichs überprüft, indem versucht wurde den nativen Promotor mittels einem Promotor-spezifischen Primer (s. Tab. A 5) per PCR nachzuweisen.

2.7.2.6 Entfernung von dominanten genomischen Selektionsmarkern

Die Entfernung einer clonNAT-Markerkassette von genomisch integrierten Konstrukten wurde (wenn nicht anders angegeben) bei jeden in dieser Arbeit konstruierten *P. ciferrii* Stämmen wie in 3.1.1.3 beschrieben durchgeführt.

2.7.3 Inaktivierung von putativen Acetyl-Transferase-Genen

Im Zuge der Inaktivierung der in dieser Arbeit isolierten putativen Acetyl-Transferase-(AcTr-) Genen, wurden für 16 dieser Gene Disruptions-Plasmide konstruiert (s. Tab. A 6). Für drei weitere putative AcTr-Gene [*Pc_6875*, *Pc_5428* (zwei Allele) und *Pc_1479*] wurden Gen-Deletionskassetten wie in 2.7.2.1 beschrieben konstruiert (Primer hierfür sind in Tab. A 4 aufgelistet).

Disruptions-Plasmide wurden über *in vivo* Rekombination ausgehend vom Plasmid pCS.425nat.LP kloniert. Für die Konstruktion des Vektors pCS.525nat.LP wurde das Plasmid p425HXT7-6HIS sowie ein PCR-Amplifikat [amplifiziert mit den Primern LP-lacZ.fw2 und LP-lacZ.rv (ausgehend vom Plasmid pUG6lacZ)] mit *DraIII* und *SapI* geschnitten und das PCR-Produkt in den Vektor p425HXT7-6HIS_{*DraIII/SapI*} ligiert. Das daraus resultierende Plasmid pCS.425.LP-lacZ wurde mit *EcoRV* und *EcoRI* linearisiert und die clonNAT-Markerkassette (PCR-Amplifikat aus p-nat1 mit Primern 425-PDA1.fw und 425-TEF.rv) über *in vivo* Rekombination in den Vektor pCS.425.LP-lacZ_{*EcoRV/EcoRI*} kloniert, woraus das Plasmid pCS.525nat.LP entstand (s. Abb. M 3). Für die Konstruktion der Disruptions-Plasmide wurde pCS.425nat.LP durch Restriktions-Verdau mit *SacI* und *PvuII*

linearisiert und jeweils mit einem PCR-Produkt (ORF-Fragment ohne natives 5'- und 3'-Ende; s. Tab. A 6) durch *in vivo* Rekombination zu den in Tab. A 6 gezeigten Disruptions-Plasmiden zusammengefügt. Nach Linearisierung der Disruptions-Plasmide mit den in Tab. A 6 erwähnten Restriktions-Endonukleasen konnten diese in *P. ciferrii* transformiert werden, um so gezielt das jeweilige Gen zu zerstören.

Von erhaltenen Transformanten wurde die korrekte Integration der *pop-in* bzw. Disruptions-Plasmide mittels PCR anhand der genomischen DNA mit einem Plasmid-spezifischen Primer (*coli_ori.rv*) und einem Gen-spezifischen Primer A (s. Tab. A 6) durch Erhalt eines PCR-Produktes bestätigt. Parallel wurde mit dem Gen-spezifischen Primer A und einem weiteren Gen-spezifischen Primer B (s. Tab. A 6) versucht das korrespondierende Wildtyp Allel nachzuweisen (entsprechende Positivkontrolle mit genomischer Wildtyp DNA wurde stets durchgeführt). Die Entfernung von *clonNAT*-Markerkassetten aus den *pop-in* Konstrukten wurde nicht durchgeführt.

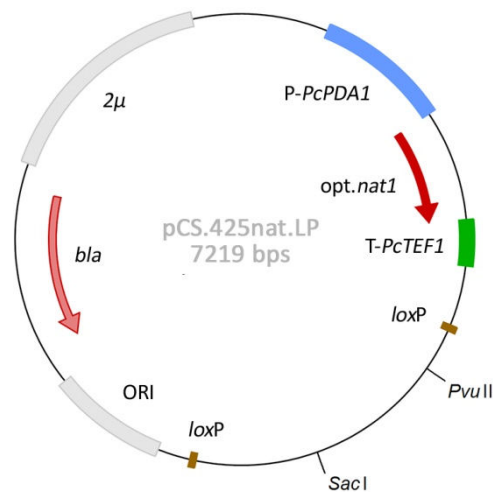


Abb. M 3: Das Plasmid pCS.425nat.LP diente als Klonierungs-Vektor für die Konstruktion von *pop-in* Plasmiden für die Disruption von putativen AcTr-Genen. Für die *in vivo* Rekombination wurde pCS.425nat.LP mit *SacI* und *PvuII* linearisiert.

2.7.4 Transformation von *S. cerevisiae* & *Cyberlindnera (Pichia) jadinii*

Die Transformation von *S. cerevisiae* und *C. jadinii* erfolgte nach dem Protokoll in Abschnitt 2.7.2.3 oder im Fall von *S. cerevisiae* alternativ nach (GIETZ & SCHIESTL, 2007).

2.7.5 Isolation von DNA aus *S. cerevisiae* & *C. jadinii*

Zellen einer 2 ml Kultur ($OD_{600nm} > 1$) wurden geerntet, gewaschen und in 400 μ l Puffer 1 [50 mM Glukose; 10 mM EDTA (Titriplex III); 25 mM Tris-HCl (pH 8); RNase A (100 μ g/ml)] resuspendiert. Nach Zugabe von 400 μ l Puffer 2 (0,2 M NaOH; 1 % SDS) und vorsichtigem Mischen, wurde ca. $\frac{2}{3}$ des Volumens an Glasperlen (0,25 - 0,5 mm \varnothing) hinzugegeben und die Zellen bei 4° C für 8 min auf einem „Vibrax VXR basic“ bei 2200 rpm aufgeschlossen. 500 μ l Überstand wurden mit 250 μ l Puffer 3 [5 M Kalium-Acetat (pH 5,5)] vermischt, 10 min auf Eis inkubiert und 5 min bei 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für mindestens 30 min bei -20° C mit Isopropanol im Verhältnis 1:1 gefällt und anschließend 20 min bei 16.000 g zentrifugiert. Die pelletierte DNA wurde mit 70 % Ethanol (-20° C) gewaschen und in 50 μ l Wasser gelöst.

2.8 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.8.1 Enzymatische Modifikation von DNA

2.8.1.1 Ligation

Zur Verknüpfung von linearisierter und dephosphorylierter Vektor-DNA mit linearer „Insert“-DNA wurde die T4 DNA Ligase eingesetzt, die in Anwesenheit von ATP eine Phosphodiesterbindung zwischen 3'-OH- und 5'-PO₄-Enden von Nukleinsäuren katalysiert. Ligationen wurden i.d.R. in einem Volumen von 20 μ l durchgeführt. Es wurden insgesamt ca. 100 ng DNA eingesetzt. Hierzu wurde vorher standardmäßig ein molares Vektor : Insert Verhältnis von 1 : 4 gewählt. Für das Einhalten dieses Verhältnisses wurden die zu verwendeten DNA Mengen mit der „GENTle“ Software (Magnus Manske, <http://gentle.magnusmanske.de>) errechnet. Der Ansatz enthielt weiterhin 400 U T4 DNA Ligase und in 1-facher Konzentration den vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer. Für die Ligation von DNA mit kohäsiven Enden wurde der Ligationsansatz mind. 20 min bei RT inkubiert. Für die Transformation in *E. coli* wurden maximal 5 μ l des Ligationsansatzes verwendet.

2.8.1.2 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung am 5'-Ende von linearer DNA erfolgte mit 1 U „Antarctic Phosphatase“ pro µg DNA pro 12 µl für 30 min bei 37° C. Der Ansatz enthielt weiterhin in 1-facher Konzentration den vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer. Die Inaktivierung erfolgte durch Inkubation bei 65° C für 10 min.

2.8.1.3 DNA Restriktion

Sequenzspezifische Spaltungen der DNA mit Restriktions-Endonukleasen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Inkubationsbedingungen für maximal 12 Stunden mit etwa 1 U Enzym pro µg DNA durchgeführt.

2.8.1.4 Enzymatischer Abbau von DNA mittels DNase I

Der Abbau von kontaminierender DNA wurde im Zuge von cDNA-Synthesen aus RNA (2.8.9.2) unter Verwendung der RNase-freien DNase I nach Angaben des Herstellers bewerkstelligt.

2.8.2 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen von genomischer und Plasmid-DNA wurden von der Firma SRD (Scientific Research & Development GmbH, Oberursel) oder von der Firma GATC Biotech AG durchgeführt. Die Sequenzierung von DNA mittels degenerierter Primer erfolgte durch die Firma Sequiserve GmbH.

2.8.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Verwendet wurde hierzu das „ND-1000 Spectrophotometer“. Zusätzlich wurden Verunreinigungen durch z.B. Salze oder Proteine im Wellenlängenbereich von 230 - 280 nm detektiert.

2.8.4 DNA-Amplifikation mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgte für Klonierungsarbeiten mittels der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase oder für analytische Zwecke mittels der *Taq* DNA Polymerase nach Angaben des Herstellers. Zu der zu amplifizierenden DNA wurden 0,2 mM dNTP-Mix, Reaktionspuffer (nach Angaben des Herstellers), 0,5 - 1 U Polymerase und je 0,1 - 1 pmol * μl^{-1} (Ansatz) der entsprechenden Primer zusammen-gegeben. Je nach Bedarf wurde dem Ansatz noch bis 3 mM MgCl_2 hinzugesetzt. Die PCR-Reaktion wurde in einem „Mastercycler® gradient“ durchgeführt. Zur Amplifikation der DNA wurden folgende Temperaturzyklen gewählt:

1x	94 - 98° C, 1-3 min	(Denaturierung)
16-50x	94 - 98° C, 5 - 20 Sek.	(Denaturierung)
	46 - 72° C, 20 - 30 Sek.	(Annealing)
	72° C, max. 1 min * kb^{-1}	(Elongation)
1x	72° C, 5 - 10 min	(Elongation)

2.8.4.1 Cross over PCR

Die *cross over* PCR wurde angewandt, um Fusionen von zwei (oder mehr) Genen bzw. Nukleotid-Sequenzen zu konstruieren (vgl. Abb. M 4). In einer ersten PCR-Reaktion wurden ein Vorwärtsprimer (Primer 1), der am 5'-Ende von Sequenz A bindet, ein Abwärtsprimer (Primer 2), der neben der Bindestelle für die 3'-Region von Sequenz A für 10 - 15 bps der 5'-Region von Sequenz B codiert, sowie Sequenz A als Template eingesetzt. In einer zweiten PCR-Reaktion wurden ein Vorwärtsprimer (Primer 3), der am 5'-Ende von Sequenz B bindet und für 10 - 15 bps der 3'-Region von Sequenz A codiert, ein Abwärtsprimer (Primer 4), der am 5'-Ende von Sequenz B bindet, sowie Sequenz B als Template verwendet. Die aufgereinigten PCR-Produkte aus Reaktion 1 und 2 wurden als Template mit den Primern 1 und 4 in einer dritten PCR-Reaktion eingesetzt. Als Resultat erhält man eine Fusionssequenz aus Sequenz A und B.

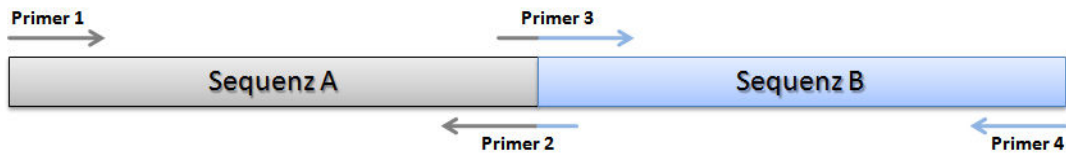


Abb. M 4: Schematische Darstellung der *cross over* PCR (Erläuterung s. Text). Gezeigt ist die Fusionierung von nur zwei Sequenzen (A & B).

2.8.5 *Genome walking*: Spezifische Amplifikation von partiell unbekanntem chromosomalen DNA-Sequenzen

Für die Identifizierung bzw. Klonierung von partiell unbekanntem DNA-Sequenzen im Genom von *P. ciferrii* wurde das „GenomeWalker Universal Kit“ nach Angaben des Herstellers verwendet. Voraussetzung hierfür war eine bereits bekannte DNA-Sequenz (für die Bindung eines spezifischen Primers), von der aus stromauf- oder -abwärts unbekanntem DNA-Sequenzen spezifisch amplifiziert werden konnten (bis maximal ca. 6 kb). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.8.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 0,15 - 20 kb erfolgte in 0,5 - 2 %igen Agarosegelen bei einer Spannung von 10 - 150 V. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) verwendet (SAMBROOK *et al.*, 1989). Als Größenstandard diente eine mit definierten Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA-Leiter. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrennen mit $\frac{1}{6}$ Volumen Blaumarker (1x TAE-Puffer, 10 % Glycerin, 0,004 % Bromphenolblau) versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation des Agarosegels in H₂O mit 0,5 µg Ethidiumbromid * ml⁻¹ wurde die Auftrennung der DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.8.7 Aufreinigung von PCR-Produkten & Gel-Extraktion von DNA

Die Aufreinigung von PCR-Produkten und Gel-Extraktion von DNA erfolgte mit dem „NucleoSpin® Extract II Kit“, nach Angaben des Herstellers.

2.8.8 Codon-Optimierung von Genen & *in vitro* Gen-Synthese

Die Codon-Optimierung von Genen erfolgte unter Berücksichtigung der bereits bekannten und stark eingeschränkten Codon-Verwendung von *P. ciferrii* (BÖRGEL, 2007). Dabei wurden endogene Codons durch die am häufigsten vorkommenden Codons bereits bekannter Gene des Sphingolipid-Stoffwechsels ersetzt. Die Synthese von Codon-optimierten DNA-Sequenzen erfolgte durch die Firma GeneArt®.

2.8.9 Quantifizierung von mRNA in *P. ciferrii*

Um den Effekt einer Promotor-Substitution auf Genexpressions-Ebene zu analysieren, wurden die Folgenden Schritte (2.8.9.1 - 2.8.9.3) zur mRNA-Quantifizierung in chronologischer Reihenfolge durchgeführt.

2.8.9.1 Preparation von mRNA

Für die Isolation von mRNA aus *P. ciferrii* wurden exponentiell wachsende Zellen in 50 ml TAPS-Medium bei einer OD_{600nm} von etwa 1 geerntet, mit RNase-freiem Wasser gewaschen und das Zell-Pellet sofort bei $-80^{\circ}C$ gelagert. Der Aufschluss von frisch auf Eis aufgetauten Zellen erfolgte mittels des „Precellys® Lyse-Kit VK01“ auf einem „Precellys® 24 bead beating homogenizer“ bei einer Geschwindigkeit von 6.500 rpm für 30 Sek. Die Zellen wurden anschließend auf Eis für ca. 2 min gekühlt, worauf eine weitere Runde des Zell-Aufschluss folgte. Der Rohextrakt wurde unter Verwendung des RNeasy Mini Kit nach Angaben des Herstellers weiter behandelt. Isolierte RNA wurde bei $-80^{\circ}C$ gelagert.

2.8.9.2 Synthese von cDNA aus mRNA (reverse Transkription)

Im Zuge der cDNA-Synthese wurden zunächst potentiell vorhandene DNA-Verunreinigungen mittels DNase I enzymatisch abgebaut. Anschließend wurde mittels des „SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix“ die reverse Transkription der mRNA in cDNA nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.8.9.3 Quantitative *real time* PCR

Die relative Quantifizierung der revers transkribierten mRNA (cDNA) erfolgte mittels quantitativer *real time* PCR (qRT-PCR). Die qRT-PCR Reaktionen wurden im LightCycler 1.5 unter Verwendung des LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Negativkontrollen während der qRT-PCR Reaktionen wurden RNA-Proben verwendet, die nicht mit reverser Transkriptase behandelt wurden. Zur *in silico* Analyse der qRT-PCR Daten wurde die LightCycler Software v3.5.3 herangezogen. Um sicherzustellen, dass die detektierten Fluoreszenz-Signale von Transkript-spezifischen Amplifikaten abstammen, wurden im Anschluss an die qRT-PCR Reaktionen Schmelzpunktbestimmungen im Bereich von 65 - 95° C angehängt und die Amplifikate mittels Gel-Elektrophorese (2.8.6) verifiziert.

Die Bestimmung der relativen Transkriptmenge (R) erfolgte nach (PFAFFL, 2001) unter Verwendung folgender Formel:

$$R = \frac{(AE)^{\Delta CP \text{ (Kontrolle - Probe)}}}{(AE_{\text{Referenz}})^{\Delta CP \text{ (Kontrolle - Probe)}}$$

Die sog. *crossing point* Werte (CP) wurden von der LightCycler Software v3.5.3 automatisch bestimmt. Die Amplifikations-Effizienz (AE) wurde ausgehend von einer Verdünnungsreihe der cDNA mittels linearer Regression errechnet ($AE = 10^{-1/\text{Steigung}}$) (HIGUCHI *et al.*, 1993). Als Referenz wurde die Transkriptmenge von *PcTDH3* und *PcACT1* in jeder Probe bestimmt. Die relativen Expressions-Werte im Text repräsentieren den Mittelwert von vier qRT-PCR Reaktionen (pro Referenzgen eine Doppelbestimmung).

2.9 Biotechnologische Methoden

2.9.1 Bestimmung der optischen Zelldichte & Zell-Trockenmasse

Zur Bestimmung der optischen Zelldichte bei 600 nm (OD_{600nm}) wurden das Ultrospec 2100 *pro* Photometer verwendet. Für die Bestimmung der Zell-Trockenmasse (bzw. Bio-Trockenmasse = BTM) wurden Zellen aus 10 ml Kulturbrühe mittels einer

Zellulosemembran (0,45 µm) vom Medium separiert, getrocknet (Mikrowelle: 140 W, 10 min) und deren BTM mittels einer Feinwaage bestimmt.

Zusätzlich wurde die BTM anhand von OD_{600nm}-Messungen bestimmt. Dazu wurden insgesamt 48 Fermentations-Proben zweier *P. ciferrii* Stämme (CS & CSS.L4; s. 2.1.3) in einem OD_{600nm}-Bereich von 0,5 - 20 genommen und deren BTM bestimmt. Es wurde eine signifikante Korrelation von OD_{600nm} und BTM (unabhängig vom Stamm) festgestellt ($R^2 = 0,98$). Durch lineare Regression dieser Daten konnte eine mathematische Funktion aufgestellt werden ($|BTM| = 0,41 * OD_{600nm} + 0,6$), die, wenn nicht anders angegeben, zur Bestimmung der BTM anhand gemessener OD_{600nm}-Werte herangezogen wurde. Bei den in dieser Arbeit konstruierten *P. ciferrii* Stämmen wurden mittels Lichtmikroskopie keine morphologischen Veränderungen festgestellt.

2.9.2 Fermentationen mit *P. ciferrii* & *S. cerevisiae*

Fermentationen mit *P. ciferrii* und *S. cerevisiae* wurden aerob bei 30° C auf einem Rotations-Schüttelgerät bei 200 - 250 rpm durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst in 5 ml TAPS-Medium als Vorkultur gezüchtet und beim Erreichen der stationären Wachstumsphase zur Inokulation von 20 ml TAPS-Medium ($\hat{=}$ Hauptkultur) verwendet. Hauptkulturen wurden mit einer OD_{600nm} von etwa 0,1 gestartet. Zur Analyse von acetylierten Sphingoidbasen mittels RP-HPLC wurden entweder 250 oder 500 µl Fermentationsbrühe entnommen und sofort bei -20° C gelagert. Die Probennahme erfolgte, abhängig vom jeweiligen Stamm, in der späten exponentiellen und / oder frühen stationären Wachstumsphase (wenn nicht anders angegeben). Für Analysen des Kultur-Überstandes wurden parallel weitere 1 ml Fermentationsbrühe entnommen, für 5 min bei 5.000 g zentrifugiert und 250 oder 500 µl des Überstandes für RP-HPLC-Analysen verwendet.

2.9.3 Preparation von acetylierten Sphingoidbasen & Quantifizierung mittels RP-HPLC

Für die Quantifizierung von acetylierten Sphingoidbasen aus Fermentationsproben (s. 2.9.2) wurden diese zunächst bei 14° C auf einem Thermomixer bei 1000 rpm aufgetaut.

Anschließend wurden die Proben mit 1 ml Aceton versetzt und für 6 min auf einem „Vibrax VXR basic“ bei 1000 rpm und 37° C inkubiert. Der Extrakt wurde anschließend für 10 min bei 5.000 g zentrifugiert und der Überstand für die RP-HPLC-Analyse verwendet. Das in dieser Arbeit verwendete HPLC-System basierte auf einer unpolaren stationären und einer isokratischen mobilen Phase (*reversed phase* HPLC: RP-HPLC). Die Detektion von acetylierten Sphingoidbasen erfolgte im UV-Bereich bei 200 nm Wellenlänge durch den UltiMate 3000 Variable Wavelength Detector. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus Methanol (81,5 %; w/w), Wasser (18,45 %; w/w) und Tri-Fluor-Essigsäure (TFA; 0,05 %; w/w) bei 40° C und einer Flussrate von 1,4 ml * min⁻¹ verwendet. Als stationäre Phase diente die ZORBAX SB-C8 Säule (4.6 * 150 mm, 3.5 µm). Von jeder Probe wurden 20 µl durch den AS50 Autosampler in die mobile Phase injiziert und die Absorption bei 200 nm für 7 min verfolgt. Das RP-HPLC-System bestand des Weiteren aus folgenden Komponenten: „GS50 Gradient Pump“, „Thermostatted Column Compartment TCC-100“, „UltiMate 3000 Variable Wavelength Detector“, „UltiMate 3000 Solvent Rack SRD-3200“. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels „Chromeleon“ Software (v6.50 SP10a Build 1065). Als Quantifizierungs-Standards dienten TAPS, TriASa und TriASo (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von **EVONIK** Degussa GmbH).

2.9.4 Bestimmung von relativen Metabolit-Konzentrationen

Die Bestimmung von relativen Metabolit-Konzentrationen (L-Serin, L-Glycin und L-Pyruvat) wurde von der Firma Metabolomic Discoveries GmbH durchgeführt. Die Proben-Aufbereitung erfolgte freundlicherweise durch Heiko Andrea (**EVONIK** Degussa GmbH). Dazu wurden Zellen aus 2 ml TAPS-Medium-Kultur (späte exponentielle Wachstumsphase) durch Filtration vom Medium entfernt und der Filter samt Zellen sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Zellen wurden von der Firma Metabolomic Discoveries GmbH weiter behandelt.

2.9.5 Charakterisierung von Sphingolipiden mittels LC-MS/MS

Für die nähere Charakterisierung von acetylierten Sphingoidbasen wurden 1 ml Fermentationsprobe (s. 2.9.2) entnommen und sofort bei -20° C gelagert. Die weitere Behandlung und Analyse erfolgte freundlicherweise durch Frank ter Veld (Ruhr-Universität Bochum) nach (TERVELD *et al.*, 2011).

2.9.6 Bestimmung von LCB-Phosphaten

Für die Bestimmung von intrazellulären LCB-P-Mengen wurden die Zellen in TAPS-Medium angezogen und in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Dazu wurden Zellen aus 10 ml Kulturbrühe zweimalig mit 10 ml einer 0,9 %igen Kochsalz-Lösung gewaschen und das Zellpellet anschließend mit 1 ml Glucanex™-Lösung [10 mg * ml⁻¹_(0,9 % NaCl)] behandelt. Nach zwei Stunden Inkubation bei 25° C wurden die so erhaltenen Sphäroplasten bei -20° C gelagert.

Die weitere Behandlung bzw. Quantifizierung wurde freundlicherweise von Gerhard Liebisch durchgeführt (Universität Regensburg). Die Quantifizierung der LCB-Ps im Zell-Homogenat erfolgte dabei nach einem Protokoll für die Quantifizierung von LCB-Ps aus menschlichem Blut-Plasma (SCHERER *et al.*, 2009). Dabei wurden ausschließlich die Phosphate von Sphingoidbasen mit 18 C-Atomen quantifiziert.

2.9.7 Protein-Isolation & Bestimmung von spezifischen Enzymaktivitäten

Protein-Rohextrakte wurden aus 10 ml Fermentationsbrühe (TAPS-Medium) gewonnen. Dazu wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zwischen einer OD_{600nm} von 1 und 1,6 geerntet (5.000 g, 4° C, 2 min) und zweimal mit eiskaltem IP-Puffer (50 mM Imidazol, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, pH 7) gewaschen. Die Zellpellets wurden anschließend sofort bei -80° C weggefroren. Der Zellaufschluss der auf Eis aufgetauten Zellen erfolgte mittels des „Precellys® Lyse-Kit VK01“ auf einem „Precellys® 24 bead beating homogenizer“ bei einer Geschwindigkeit von 6.500 rpm für 30 Sek. Die Zellen wurden anschließend auf Eis für ca. 2 min gekühlt, worauf eine weitere Runde des Zell-Aufschluss unter den gleichen Bedingungen folgte. Die so erhaltenen Rohextrakte wurden bei 4° C für 10 min bei 16.000 g zentrifugiert und der Überstand für die

Bestimmung von spezifischen Enzymaktivitäten verwendet. Die Lagerung erfolgte dabei auf Eis und nie länger als sechs Stunden. Protein-Konzentrationen wurden mittels „Roti®-Quant“ Kit (und BSA als Standard-Protein) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Enzymaktivitäts-Messungen wurden mit dem Ultrospec 2100 *pro* Photometer unter Verwendung der SWIFT II Software durchgeführt. Messungen erfolgten stets bei 30° C.

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität von PcGpm1 wurde mod. nach (MAITRA & LOBO, 1971) in IP-Puffer mit 0,23 mM NADH, 1 mM ADP, 1 mM Fruktose-1,6-bisphosphat, 1 mM 2,3-Bisphospho-Glycerat, 0,5 U Enolase (vom Hasenmuskel, etwa 1 U Pyruvat-Kinase (Typ II vom Hasenmuskel), 1 U Laktat-Dehydrogenase (vom Hasenmuskel) und 1 - 100 µg Rohextrakt-Protein durchgeführt. Die Messungen wurden durch Zugabe von 3 mM 3-PG gestartet und die Substrat-abhängige Oxidation von NADH spektral-photometrisch und kontinuierlich bei 340 nm gemessen (vgl. Abb. M 5).

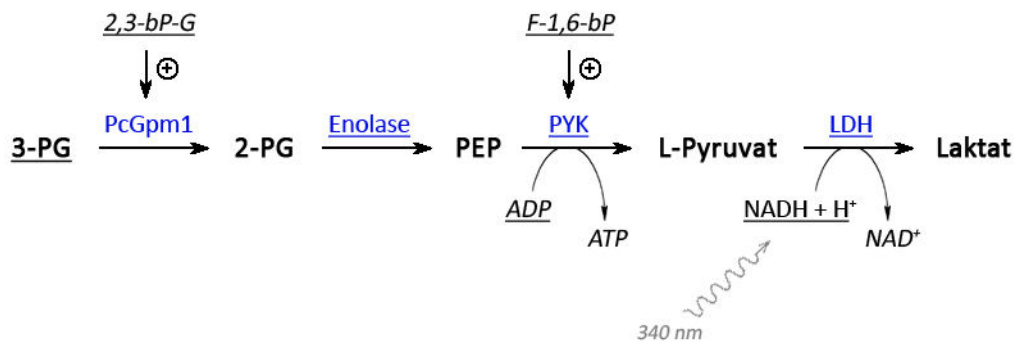


Abb. M 5: Schematische Darstellung des Prinzips der PcGpm1-Aktivitäts-Messung. Es wurde die Oxidation bzw. Abnahme von NADH + H⁺ gemessen (3-PG ~ NADH + H⁺). Unterstrichene Substanzen wurden im Überschuss hinzugegeben. F-1,6-bP diente als allosterischer Aktivator der PYK. 2,3-bP-G: 2,3-bisphospho-Glycerat (= mutmaßlicher Aktivator für PcGpm1); 3-PG: 3-Phosphoglycerat; 2-PG: 2-Phosphoglycerat; F-1,6-bP: Fruktose-1,6-Bisphosphat; PEP: Phosphoenol-Pyruvat; PYK: Pyruvat-Kinase; LDH: Laktat-Dehydrogenase.

Die Bestimmung der spezifischen PcSer3-Aktivität wurde in IP-Puffer mit 2 mM NAD, 1 - 100 µg Rohextrakt-Protein mit pH 7, 8 und 9 durchgeführt [ein hoher pH-Wert soll die gewünschte Reaktion begünstigen (ROSENBLUM & SALLACH, 1975)]. Durch Zugabe von 3 bzw. 15 mM 3-PG wurden die Messungen gestartet. Die Substrat-abhängige Reduktion von NAD wurde spektral-photometrisch und kontinuierlich bei 340 nm verfolgt (vgl. Abb. M 6).

MATERIAL & METHODEN

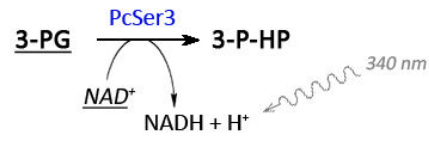


Abb. M 6: Schematische Darstellung des Prinzips der PcSer3-Aktivitäts-Messung. Es wurde die Reduktion von NAD^+ bzw. die Zunahme von $\text{NADH} + \text{H}^+$ gemessen ($3\text{-PG} \sim \text{NAD}^+$). Unterstrichene Substanzen wurden im Überschuss hinzugegeben. 3-PG: 3-Phosphoglycerat; 3-P-HP: 3-Phospho-Hydroxypyruvat.

3. ERGEBNISSE

3.1 Verbesserung der genetischen Handhabbarkeit von *P. ciferrii*

Die Hefe *P. ciferrii* war zu Beginn dieser Arbeit auf genetischer Ebene nur schwer zugänglich, wodurch sich Arbeiten in Bezug auf eine rationale Stammentwicklung nur sehr zeitaufwändig gestalten lassen würden. Eine Transformations-Methode für *P. ciferrii* war bereits beschrieben (BAE *et al.*, 2003), allerdings ist die Prozedur vergleichsweise aufwendig und in dieser Arbeit konnte damit eine nur sehr geringe Transformations-Effizienz im *P. ciferrii* Wildtypstamm (PCWT) erzielt werden (≤ 20 Transformanten $\cdot \mu\text{g}^{-1}_{\text{DNA}} \cdot \text{kb}^{-1}$). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit diverse Hefe-Transformations-Methoden für *P. ciferrii* getestet (nicht gezeigt). Mittels einer nach (DOHMEN *et al.*, 1991) modifizierten sog. Gefrier-Transformation konnte eine Transformations-Effizienz im Wildtyp von rund 300 - 350 Transformanten $\cdot \mu\text{g}^{-1}_{\text{DNA}} \cdot \text{kb}^{-1}$ erzielt werden (SCHORSCH *et al.*, 2009). Anhand dieser einfach durchzuführenden und effizienten Methode sollten genomische bzw. genetische Veränderungen leichter und bequemer durchzuführen sein, weshalb diese Methode in nachfolgenden Experimenten angewendet wurde.

Ein weiterer zu Beginn dieser Arbeit existierender Nachteil in Bezug auf die rationale Stammentwicklung von *P. ciferrii* bestand in einer sehr geringen Genzerstörungs-Effizienz, auf deren Optimierung im Folgenden eingegangen wird.

3.1.1 Optimierung der Genzerstörungseffizienz in *P. ciferrii*

Zielgerichtete genomische Integrationen von transformierten DNA Fragmenten sind in *P. ciferrii* sehr ineffizient. Transformierte DNA wird in *P. ciferrii* bevorzugt ungerichtet (ektopisch) in das Genom integriert. Für die Integration von fremder DNA in das Genom sind hauptsächlich DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) bzw. deren Reparaturmechanismen verantwortlich. In Eukaryonten koexistieren zwei Reparaturwege um diese DSBs zu reparieren: homologe Rekombination (HR) und *non-homologous end joining* (NHEJ). Bei der Integration von transformierter DNA über HR ist eine Interaktion von homologen

Sequenzen erforderlich, wodurch die Integration i.d.R. zielgerichtet ist. Die wesentlichen Schritte der HR werden von einer konservierten Enzym-Klasse (Rekombinasen) katalysiert (SAN FILIPPO *et al.*, 2008). Beim NHEJ wird DNA ektopisch integriert und erfolgt weitestgehend Sequenz-unabhängig (PAQUES & HABER, 1999). Die wichtigsten Proteine des NHEJ in Hefe sind Ku70, Ku80, Lig4, Lif1 und Nej1 (DALEY *et al.*, 2005). Ku70 und Ku80 binden als Heterodimer die Enden linearer dsDNA und initiieren den NHEJ-Prozess (MILNE *et al.*, 1996; NICK McELHINNY *et al.*, 2000). Die DNA Ligase IV (Lig4) interagiert mit Lif1 (*ligase interacting factor 1*) und katalysiert die Ligation der dsDNA-Enden als finalen Schritt des NHEJ (WILSON *et al.*, 1997; HERRMANN *et al.*, 1998; DORE *et al.*, 2006). Nej1 ist an der Regulation des NHEJ-Weges beteiligt (VALENCIA *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* weisen Höhere Eukaryonten und die meisten Pilze eine niedrige Effizienz zielgerichteter genomischer Integrationen auf. Dies lässt sich durch ein effizientes NHEJ- bzw. ineffizientes HR-System erklären. Die Blockierung des NHEJ-Reparaturweges, durch Inaktivierung der *LIG4*, *KU70* oder *KU80* homologen Gene, führte bereits in anderen Hefen zu einer starken Erhöhung der Frequenz zielgerichteter genomischer Integrationen über HR (bei gleichzeitiger Abnahme der Transformations-Effizienz) (KOOISTRA *et al.*, 2004; NINOMIYA *et al.*, 2004; UENO *et al.*, 2007). Für rationale Stammentwicklungen oder *metabolic engineering* Ansätze mit *P. ciferrii* ist eine hohe Genzerstörungseffizienz eine wichtige Voraussetzung. So sollten sich in einem NHEJ-defizienten *P. ciferrii* Stamm gezielt Gene des Sphingolipid-Biosyntheseweges vereinfacht ausschalten oder nach Promotoraustausch auf Ebene der Expression kontrollieren lassen. Daher war ein Ansatz dieser Arbeit die Inaktivierung der Gene *PcLIG4*, *PcKU70* oder *PcKU80*.

3.1.1.1 Isolierung des *S. cerevisiae* DNL4 Homologs in *P. ciferrii* (*PcLIG4*).

Da zu Beginn der Arbeit die Genomsequenz von *P. ciferrii* nicht bekannt war, wurde versucht Teile der *PcKu70*, *PcKu80* und *PcLig4* Sequenz über Sequenzvergleiche homologer Proteine aus anderen Hefen abzuleiten und das korrespondierende Gen in *P. ciferrii* zu isolieren. Hierzu wurde eine TBLASTN Suche mit jeweils der Ku70, Ku80 und DNA ligase IV (Lig4) Sequenz aus *S. cerevisiae* als Matrize durchgeführt. Bei der TBLASTN Suche wird eine Proteinsequenz (Matrize) mit allen sechs möglichen Leserahmen aus

Um den kompletten Leserahmen der *PcLIG4* Sequenz zu erhalten wurde anhand der Syntenie-Beziehungen in Hefe versucht konservierte Bereiche in Genen zu finden, die in anderen Hefen das *LIG4* Gen flankieren, um davon degenerierte Primer abzuleiten. Hierzu wurde der *Yeast Gene Order Browser* (BYRNE & WOLFE, 2005) verwendet, der in diversen Hefegenera Syntenie-Beziehungen analysiert und vergleicht. Das *S. cerevisiae* *YOR006c* Gen und dessen Homologe erwiesen sich als gute Kandidaten, um nach Sequenzvergleichen degenerierte Primer abzuleiten. So ließ sich die Region stromaufwärts der bereits bekannten *PcLIG4* Teil-Sequenz mit dem degenerierten Primer *YOR006.fw* (bindet im *P. ciferrii* homologen Gen zu *YOR006c*) und *D4.2* (bindet in *PcLIG4*) amplifizieren und sequenzieren. Eine Analyse der Syntenie-Beziehungen stromabwärts der zu *S. cerevisiae* *LIG4* homologen Gene ergab zwei potentielle Kandidaten (*YOR004w* & *YEL062w*) um degenerierte Primer abzuleiten. PCR Reaktionen mit diesen Primern ergaben allerdings nur unspezifische Produkte. Unter Verwendung des „GenomeWalker Universal Kit“ konnte der Bereich stromabwärts der bereits bekannten *PcLIG4* Sequenz amplifiziert und sequenziert werden. Nach Erhalt der kompletten *PcLIG4* Sequenz wurde diese *in silico* auf offene Leserahmen durchsucht. Die Suche ergab einen putativen ORF von 2856 bps Länge, dessen Genprodukt eine 40%ige Identität (58%ige Ähnlichkeit) zur *S. cerevisiae* *Lig4* Sequenz aufwies. Eine *in silico* Analyse dieser Sequenz zeigte zwei putative C-terminale BRCA1 Tandem-Domänen in *PcLig4*, die sowohl im *Lig4*-Homolog vom Menschen als auch in *Lig4* von *S. cerevisiae* konserviert sind (GRAWUNDER *et al.*, 1997; WILSON *et al.*, 1997). Die hier isolierte *PcLIG4* Sequenz codiert somit höchst wahrscheinlich für die DNA Ligase IV des NHEJ-Reparaturweges in *P. ciferrii*.

Ausgehend von den *Ku70* und *Ku80* Sequenzen aus *S. cerevisiae* wurden wie oben beschrieben degenerierte Primer abgeleitet und konstruiert. PCR Reaktionen mit diesen Primern lieferten allerdings nur unspezifische Produkte. Die *PcKU70* bzw. *PcKU80* Sequenzen konnten daher nicht isoliert werden.

3.1.1.2 Inaktivierung von *PcLIG4*

Für die Inaktivierung von *PcLIG4* wurde zunächst ein (*ends-in*) Disruptionsvektor konstruiert, der nach Transformation in den *P. ciferrii* Wildtyp Stamm F-60-10A NRRL 1031 (PCWT) über eine sog. *single cross over* Integration (*pop-in*) in das *PcLIG4* Gen integrieren und dieses zerstören sollte (**Abb. 12**). Zu diesem Zweck wurde die zu Beginn der Arbeit erhaltene *PcLIG4* Teilsequenz (*PcLIG4*⁹⁶²⁻¹⁴⁷⁵) als homologer Bereich für die *pop-in* Integration verwendet. Die Konstruktion des *PcLIG4* Disruptionsvektors pCS.ΔLIG4 wurde wie in (SCHORSCH *et al.*, 2009) beschrieben durchgeführt.

Insgesamt wurden nach Transformation des Stammes PCWT mit etwa 2 µg des linearisierten Vektors pCS.ΔLIG4_{NdeI} 160 Transformanten auf YEPD-Medium mit clonNAT erhalten, die alle auf eine korrekte *pop-in* Integration des Plasmids via PCR überprüft wurden. Hierzu wurde aus allen 160 Transformanten DNA isoliert und PCR Reaktionen für den Integrationsnachweis durchgeführt. Eine korrekte Integration konnte bei insgesamt sieben Transformanten nachgewiesen werden.

PcLIG4 konnte somit erfolgreich und mit einer Effizienz von 4 - 5 % im Stamm PCWT disruptiert werden. Einer der sieben Transformanten mit zerstörtem *PcLIG4* Gen (CS3) wurde für weitere Experimente ausgewählt.

ERGEBNISSE

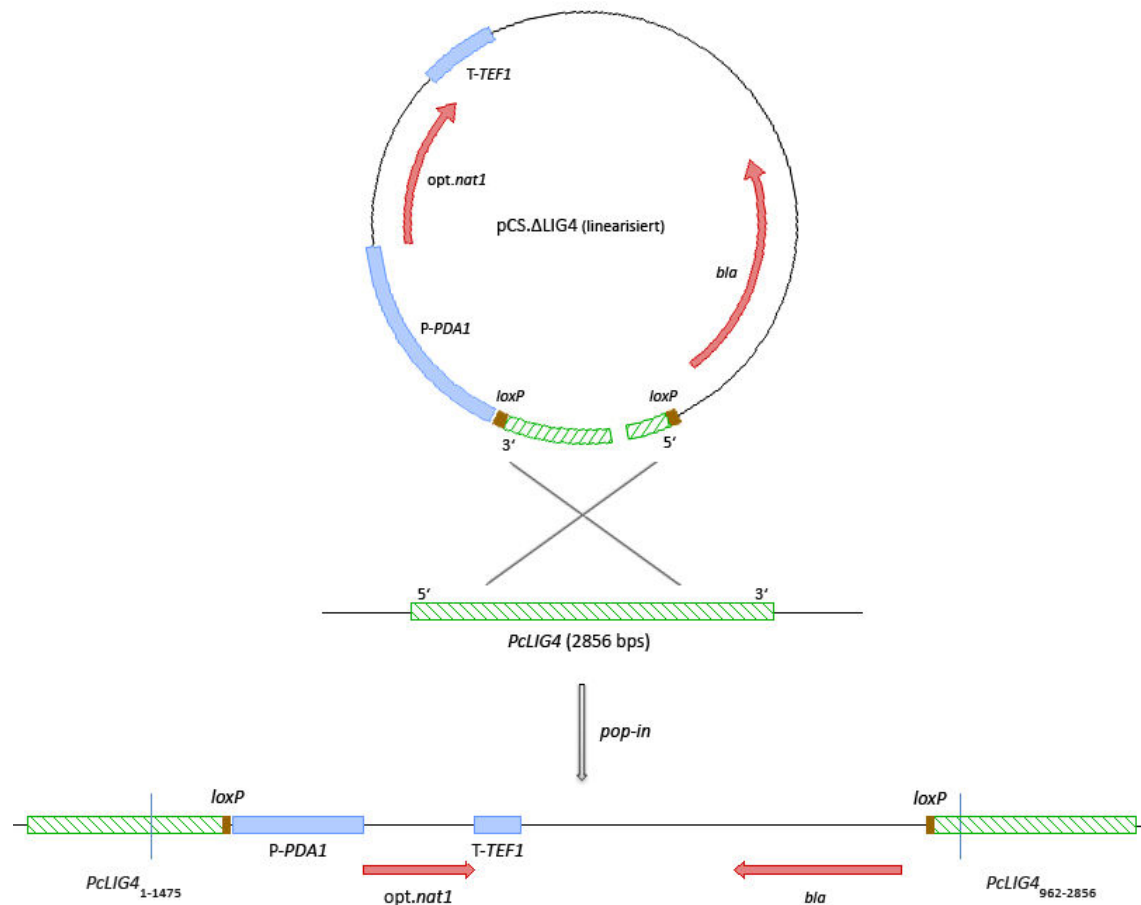


Abb. 12: Schematische Darstellung der *PclLIG4* Disruption im Stamm PCWT. Die Transformation mit dem (*NdeI*) linearisierten Plasmid *pCSΔLIG4_{NdeI}* resultierte in einem genomischen *pop-in* Konstrukt (angedeutet durch vertikale Linien), das von zwei verkürzten *PclLIG4* Allelen flankiert wurde. Mod. nach (SCHORSCH *et al.*, 2009).

3.1.1.3 Entfernung von *loxP*-flankierten Markergenen

Um einen dominanten Selektionsmarker (hier *opt.nat1*) mehrfach verwenden zu können, muss dieser nach jedem Integrationsereignis entfernt werden (*marker rescue*). Ein in Hefe häufig verwendetes System für die Entfernung von Markergenen ist das sog. Cre-*loxP* System (SAUER, 1987). Die Rekombination der *loxP* Sequenzen (*pop-out*) wird dabei von der Cre-Rekombinase katalysiert, die normalerweise auf einem autonom replizierenden Plasmid codiert und dessen Expression i.d.R. induzierbar ist. Zu Beginn dieser Arbeit war weder das Cre-*loxP* System für *P. ciferrii* etabliert, noch gab es Erkenntnisse über autonome Replikations-Sequenzen (ARS), Centromer-Sequenzen (CEN) oder 2 μ -ähnliche Sequenzen in *P. ciferrii*.

Es wurde daher versucht einen nicht-replikativen Vektor mit einem konstitutiv regulierten *cre* Gen für die Entfernung der clonNAT-Markerkassette zu transformieren. Anschließend sollte mittels PCR-Analyse und Wachstumstest überprüft werden, ob dies zum erhofften *marker rescue* führte. Exemplarisch wird diese Strategie für die Entfernung eines (clonNAT-) Markergens anhand des Stammes CS3 (aus 3.1.1.2) erläutert. Dabei sollte der *pop-out* des integrierten Plasmids pCS.ΔLIG4_{NdeI} durch die Aktivität der Cre-Recombinase vermittelt werden und es dadurch zu einer clonNAT-Sensitivität kommen (**Abb. 13**). Zu diesem Zweck wurde der Stamm CS3 mit dem Cre-Recombinase Expressions-Vektor pCS.opt.Cre transformiert. Dieses Plasmid trägt ein für *P. ciferrii* Codon-optimiertes *cre* Gen (opt.*cre*) aus dem Bakteriophagen P1 unter Kontrolle des mutmaßlich konstitutiven *PcPDA1*⁻⁶⁷⁷⁻¹ Promotor-Fragments und des *PcTEF1* Terminators und weist keine bekannten Sequenzen für eine autonome Replikation in Hefen auf. Auf die Konstruktion des Plasmids pCS.opt.Cre sei hier verwiesen an (SCHORSCH *et al.*, 2009). Nach Transformation mit ca. 16 µg des Vektors pCS.opt.Cre, wurden die Zellen etwa vier Stunden in YEPD Medium regeneriert und anschließend mit einer Dichte von 200 - 300 Zellen pro Platte auf YEPD ausplattiert. Nach zwei bis drei Tagen Wachstum bei 30° wurden die Zellen auf YEPD mit clonNAT replikaplattiert. Zellen, die nicht in der Lage waren in Gegenwart von clonNAT zu wachsen, wurden auf den Cre-Recombinase vermittelten *pop-out* des Plasmids pCS.ΔLIG4 via PCR untersucht. Die primer wurden dabei so gewählt, dass nur bei korrektem *pop-out* ein PCR Produkt möglich war. Insgesamt wurden etwa 2000 replikaplattierte Kolonien auf das Wachstum in Anwesenheit von clonNAT analysiert, wobei sich zehn davon als clonNAT-sensitiv erwiesen. PCR Reaktionen mit der isolierten DNA von jeweils allen zehn Klonen ergab in allen Fällen das korrekte *pop-out* PCR Produkt. Die zehn Transformanten waren somit markerfrei und enthielten zwei verkürzte *PcLIG4* Gene, die durch eine *loxP* Sequenz getrennt wurden (**Abb. 13**). Einer der zehn markerfreien Transformanten (CS.PCΔPro) wurde für weitere Arbeiten ausgewählt.

Das Cre-*loxP* System konnte somit erfolgreich und hocheffizient in *P. ciferrii* angewandt werden, wodurch bei Verwendung eines einzigen Selektions-Markers sukzessiv mehrfache genomische Integrationen in einem Stamm möglich sein sollten. Bei

nachfolgenden Integrations-Ereignissen (Deletionen / Promotor-Substitutionen) wurde (wenn nicht anders angegeben) daher stets das Markergen wie in diesem Abschnitt beschrieben entfernt. Dabei wurde für Transformationen zwischen 16 und 100 µg des Vektors pCS.opt.Cre verwendet.

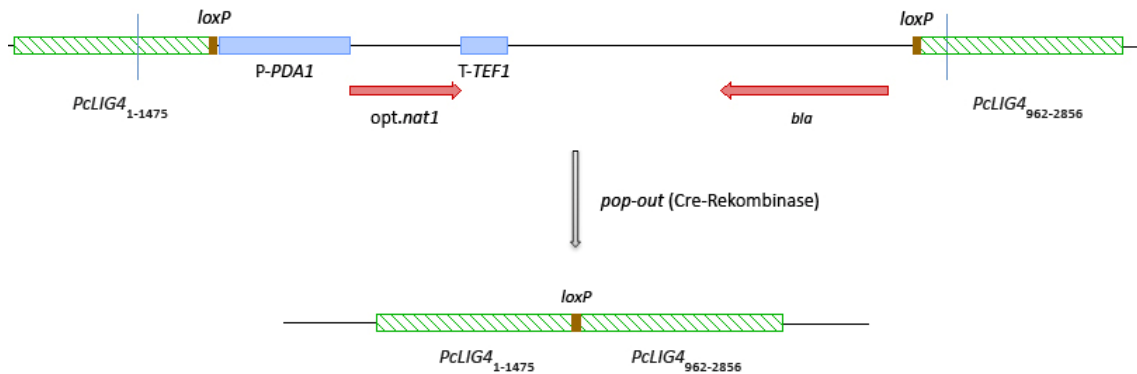


Abb. 13: Schematische Darstellung des Cre-Rekombinase vermittelten *pop-outs* im Stamm CS3. Durch die Rekombination der *loxP* Sequenzen entstanden zwei verkürzte *PcLIG4* Allele im Genom (getrennt durch eine *loxP* Sequenz). Mod. nach (SCHORSCH *et al.*, 2009).

Exkurs: Konstruktion einer Integrationskassette mit Auto-Markerentfernungsfunktion.

Um genomische Integrationen mit anschließender Markerentfernung zu vereinfachen, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht eine Integrationskassette zu konstruieren, bei der nebst clonNAT-Markergen [*opt.nat1*] zusätzlich das *opt.cre* Gen mit von *loxP* Sequenzen flankiert wird. Wenn genomisch integriert, sollte die Expression des *opt.cre* Gens induzierbar sein und die Sequenz zwischen den *loxP* Sequenzen durch die Aktivität der Cre-Rekombinase entfernt werden. Demgemäß wäre eine Integration mit anschließender Markerentfernung mit nur einer Transformation möglich. Um die Expression des *opt.cre* Gens induzieren zu können wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Ansätze gewählt. So wurde der bakterielle *tetO₇* Operator (GAR1 *et al.*, 1997) zwischen *opt.cre* ORF und *PcPDA1* Promotor kloniert sowie zusätzlich das *tetR* Gen unter Kontrolle des *PcTDH3* Promotors [**Abb. Ex. 1 a**]). In Abwesenheit von Tetrazyklin (oder Doxyzyklin) sollte der durch *tetR* codierte und konstitutiv produzierte Tet-Repressor an den *tetO₇* Operator binden und das *opt.cre* Gen reprimieren. Durch Behandlung der Zellen mit Tetrazyklin (Doxyzyklin) sollte daher die Expression des *opt.cre* Gens induziert und dadurch die Entfernung der gesamten integrierten Kassette gewährleistet werden.

Ein weiterer Ansatz war die Kontrolle der *opt.cre* Expression auf Translationsebene. So wurden drei sich wiederholende Tetrazyklin-bindende Aptamersequenzen (tc3) in die 5' UTR des *opt.cre* Gens kloniert [Abb. Ex. 1 b)], wodurch die Translation der *opt.cre* mRNA in Anwesenheit von Tetrazyklin unterbunden werden sollte [nach (KÖTTER *et al.*, 2009)]. Beide Konstrukte wurden jeweils mittels *in vivo* Rekombination in episomale und Centromer-Vektoren kloniert und führten zum Erhalt von *S. cerevisiae* Transformanten [auf Medium mit clonNAT und im Fall von Konstrukt b) mit bis zu 1 mM Tetrazyklin] mit mutmaßlich korrekt konstruiertem Plasmid. Die Re-Isolation der Plasmide aus *E. coli* führte allerdings entweder zum Erhalt von Plasmiden, deren *loxP* Sequenzen bereits rekombinierten, oder aber die scheinbar korrekten Plasmide trugen Mutationen in einer der *loxP* Sequenzen oder im *opt.cre* Gen. Die Konstruktion einer Integrationskassette mit Auto-Markerentfernungsfunktion schlug somit nach mehreren Versuchen fehl.

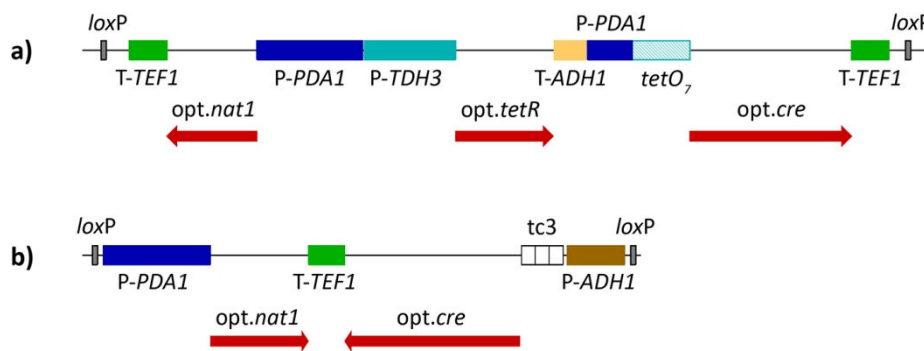


Abb. Ex. 1: Schematische Darstellung von Integrationskassetten mit Auto-Markerentfernungsfunktion, die in dieser Arbeit konstruiert werden sollten. **a)** die konstitutive Expression des *opt.tetR* Gens sollte mit einer strikten Reprimierung des *opt.cre* Gens einhergehen. Durch Supplementierung von Tetrazyklin (oder Doxyzyklin) sollte der Tet-Repressor inaktiviert und die *opt.cre* Expression somit induziert werden. **b)** Durch die Tetrazyklin-bindenden Aptamersequenzen (tc3) sollte in Anwesenheit von Tetrazyklin die Translation der *opt.cre* mRNA inhibiert werden. Die Gene *opt.nat1*, *opt.tetR* und *opt.cre* sind codon-optimiert für *P. ciferrii*. Die verwendeten Promotoren stammen aus *P. ciferrii* mit Ausnahme von T-ADH1 und P-ADH1 (*S. cerevisiae*)

3.1.1.4 Deletion von *PcLIG4*

Während dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass durch eine spontane homologe Rekombination der beiden verbliebenen *PcLIG4* Teilsequenzen im Stamm CS.PCΔPro das Wildtyp *PcLIG4* Gen wiederhergestellt wurde und dadurch die Genzerstörungseffizienz wieder zu der des Wildtyps revertierte (nicht gezeigt). Um dieses Problem zu verhindern

wurde die komplette disruptierte *PcLIG4* Sequenz im Stamm CS.PCΔPro durch ein klassisches *one-step gene replacement* nach (ROTHSTEIN, 1983) deletiert und der Marker anschließend wie in 3.1.1.3 beschrieben entfernt (**Abb. 14**). Zu diesem Zweck wurde der Stamm CS.PCΔPro mit einem PCR-generierten *PcLIG4* (*ends-out*) Deletions-Konstrukt transformiert, welches zwei *PcLIG4* flankierende Sequenzen von je etwa 0,5 kb Homologie besaß. Eine Integration sollte daher über eine *double cross over* Integration stattfinden und, wenn zielgerichtet, in einer Deletion des disruptierten *PcLIG4* Gens resultieren. Die Konstruktion und Amplifikation des *PcLIG4* Deletions-Konstrukts erfolgte wie in (SCHORSCH *et al.*, 2009) beschrieben. Der Stamm CS.PCΔPro wurde mit ca. 2 µg des *PcLIG4* Deletions-Konstrukts transformiert und Transformanten auf YEPD mit clonNAT selektiert. Insgesamt wurden zwei Transformanten erhalten und die korrekte Integration (sowie die Deletion) per PCR bestätigt. Die Genzerstörungseffizienz im Stamm CS.PCΔPro lag somit bei 100 %, was darauf hinwies, dass *PcLIG4* im Stamm CS.PCΔPro bereits inaktiviert und NHEJ nicht mehr möglich war. Die Transformationseffizienz sank in diesem Stamm allerdings sehr stark ab. Der Cre-Rekombinase vermittelte *pop-out* des *PcLIG4* Deletions-Konstrukts wurde in einem der Transformanten wie bereits beschrieben durchgeführt und mittels PCR verifiziert. In dem so konstruierten und markerfreien *PcLIG4* Deletionsstamm CS.PCΔPro2 (CS; Δ+2) wurde anschließend die Genzerstörungseffizienz ermittelt.

ERGEBNISSE

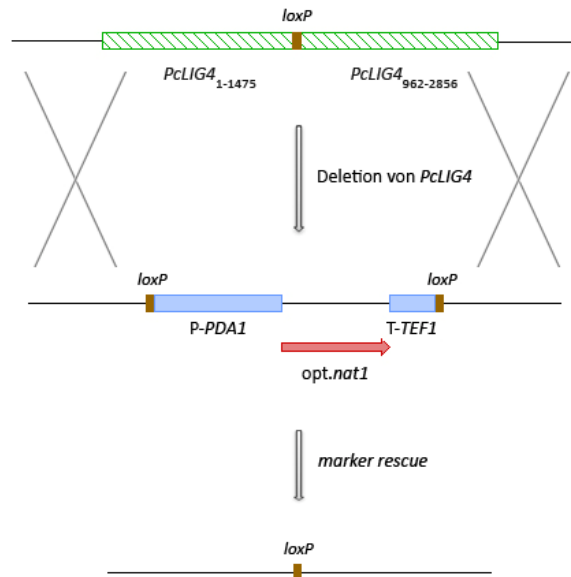


Abb. 14: Schematische Darstellung der *PcLIG4* Deletion im Stamm CS.PCΔPro mit anschließendem *marker rescue*. Transformation mit einem PCR generierten *PcLIG4* Deletions-Konstrukt und der anschließende Cre-Rekombinase vermittelte *pop-out* resultierte in einer *PcLIG4* Deletion, wodurch nur die *PcLIG4* Promotor- und Terminator-Region (getrennt durch eine *loxP* Sequenz) im Genom verblieben. Mod. nach (SCHORSCH *et al.*, 2009).

3.1.1.5 Ermittlung der Genzerstörungseffizienz im *P. ciferrii lig4Δ* Stamm

Um die Genzerstörungseffizienz nach Deletion der DNA Ligase IV in *P. ciferrii* zu analysieren wurde der Stamm CS (*lig4Δ*) und der *P. ciferrii* Wildtypstamm PCWT mit einem PCR-generierten *PcURA3* („ends-out“) Deletions-Konstrukt transformiert und die Genzerstörungseffizienzen über einen Wachstumstest analysiert. Durch Blockade des NHEJ-Reparaturweges im Stamm CS (aufgrund der *PcLIG4* Deletion), sollte das *PcURA3* Deletions-Konstrukt vornehmlich über HR zielgerichtet ins Genom integrieren. In diesem Fall wäre das *PcURA3* Gen deletiert und Wachstum in Abwesenheit von Uracil nicht möglich (UMEZU *et al.*, 1971).

Das *PcURA3* Deletions-Konstrukt wurde analog zum *PcLIG4* Deletionkonstrukt über *in vivo* Rekombination in den Vektor p426HXT7-6HIS kloniert (SCHORSCH *et al.*, 2009). Die per PCR amplifizierte *PcURA3* Deletionskassette wurde in die Stämme CS und PCWT transformiert und Transformanten auf YEPD mit clonNAT selektiert. Die Zellen wurden anschließend auf SCD Ura⁻ Medium replikaplattiert. Da die Inaktivierung des *URA3* Gens in Hefe zu einer Uracil-Auxotrophie führt (OHKUMA *et al.*, 1993; LIN CEREGHINO *et al.*, 2001; SUZUKI *et al.*, 2003), konnte eine korrekte Integration des *PcURA3* Deletions-Konstrukts anhand des

Wachstumsphänotyps (kein Wachstum) auf SCD Ura⁻ Medium detektiert werden. Insgesamt wurden etwa 500 Transformanten mit PCWT-Stammhintergrund analysiert, von denen vier Uracil-auxotroph waren. Eine korrekte Integration in diesen Transformanten wurde per PCR bestätigt. Etwa 420 Transformanten des Stammes CS wurden auf SCD Ura⁻ Medium replikaplattiert, wobei sich 365 Transformanten als Uracil-auxotroph herausstellten. Diese Ergebnisse implizieren eine Genzerstörungseffizienz von etwa 87 % im *P. ciferrii lig4Δ* Stamm CS, im Gegensatz zum Wildtyp (PCWT) mit nur etwa 1 % Genzerstörungseffizienz. Zu erwähnen ist, dass (wie bereits zuvor im Stamm CS.PCΔPro beobachtet) die Effizienz der Transformation (in Bezug auf den Erhalt von Transformanten) im *lig4Δ* Stamm um das etwa 100-fache abnahm.

Um zu verstehen, weshalb 13% der Transformanten Uracil-prototroph waren, wurden zehn der 55 clonNAT-resistenten (Uracil-prototrophen) Transformanten näher untersucht. Via PCR konnte bestätigt werden, dass alle zehn Transformanten noch den *lig4Δ::loxP* Genotyp besaßen und somit höchst wahrscheinlich NHEJ-defizient waren. Weiterhin wurde die Integration des *PcURA3* Deletions-Konstrukts näher untersucht. Hierzu wurden PCR Reaktionen mit genomischer DNA der zehn Transformanten durchgeführt. Dabei wurden Primer verwendet, die in den *PcURA3* Promotor- bzw. Terminator-Sequenzen der *PcURA3* Deletionskassette binden und ein 2,44 kb PCR Produkt ergeben sollten, gleich ob die Integration zielgerichtet oder ektopisch war. Gleichzeitig sollten beide Primer auch im genomischen *PcURA3* Wildtyp-Lokus binden, wodurch bei einem vorhandenen Wildtyp *PcURA3* Gen zusätzlich ein 1,7 kb PCR Produkt erwartet wurde. Falls die Integration nun zielgerichtet war, sollte daher ausschließlich die Amplifikation des 2,44 kb Produktes möglich sein. Bei einer ektopischen Integration sollten theoretisch beide Produkte (*PcURA3* Gen und -Deletionskassette) amplifiziert werden. Überraschenderweise konnte, ausgehend von den zehn Transformanten, nur das Wildtyp *PcURA3* Gen (1,7 kb) erhalten werden (**Abb. A 1**). Die Integration des *PcURA3* Deletions-Konstrukts in den Uracil-prototrophen Transformanten des *lig4Δ* Stammes war somit nicht zielgerichtet, konnte aber über PCR mit den gewählten Primern nicht nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurde die Inaktivierung des NHEJ-Reparaturweges durch Transformation des Stammes CS mit dem durch *PvuII* linearisierten Vektor pCS.p-nat1ΔIS (konstruiert durch

Religation von p-nat1_{NdeI}) getestet. Dieses Plasmid trägt das opt.*nat1* Markergen und, neben der *PcPDA1*-Promotor- und *PcTEF1*-Terminatorsequenz, keine bekannten homologen Sequenzen zum PCWT Genom. Transformationen mit bis zu 20 µg ergaben keine Transformanten, wohingegen mit dem gleichen Konstrukt im Wildtyp zahlreiche Transformanten erhalten wurden, was auf eine komplette Inaktivierung des NHEJ-Reparaturweges im Stamm CS hindeutete.

3.1.1.6 Test von heterologen autonom replizierenden Sequenzen in *P. ciferrii*

In Bezug auf autonom replizierende Sequenzen wie ARS-, CEN- oder 2µ-ähnliche Sequenzen ist in *P. ciferrii* bislang nichts bekannt. Ein Plasmid-basiertes Expressions-System würde molekularbiologische und genetische Arbeiten in *P. ciferrii* stark vereinfachen. Es wurden daher verschiedene autonom replizierende Sequenzen aus anderen Hefen in *P. ciferrii* getestet.

Die autonome Replikations-Sequenz aus *Debaryomyces (Schwanninomyces) occidentalis* (*DoARS1*) konnte bereits erfolgreich zur Plasmid-basierten autonomen Replikation in *D. occidentalis*, *S. cerevisiae* und *S. stipitis* verwendet werden (DOHMEN *et al.*, 1989; PIONTEK *et al.*, 1998). Um die *DoARS1*-Sequenz in *P. ciferrii* zu testen wurde ein Vektor konstruiert, der neben der *DoARS1*-Sequenz das opt.*nat1* Markergen trägt (pCS.nat.DoARS; s. **Abb. A 2**). Dazu wurde ausgehend vom Plasmid pJH-S-1 die *DoARS1*-Sequenz mittels PCR amplifiziert, mit *Bam*HI geschnitten und in den mit *Bam*HI linearisierten Vektor pCS.p-nat1ΔIS.II (zirkularisiertes PCR-Amplifikat ausgehend von p-nat1 mit Primern p-nat1.fw.BamHI und p-nat1.rv.BamHI) ligiert. Nach Transformation des so konstruierten Plasmids pCS.nat.DoARS in den *P. ciferrii* Stamm CS.U' konnten keine Transformanten auf YEPD mit clonNAT erhalten werden. Dabei wurden zwischen 100 ng und 5 µg Plasmid transformiert und die Zellen null, zwei oder vier Stunden im Anschluss an die Transformation in YEPD regeneriert. Parallel wurde *S. cerevisiae* (K26) als Positivkontrolle transformiert, wobei stets Transformanten erhalten wurden.

Des Weiteren wurden die ARS-Sequenzen aus *C. jadinii* [*CjARS1* / *CjARS2*; Plasmid pCS.CuARS1 / pCS.CuARS2 (s. **Abb. A 3**)] und *S. stipitis* (*SsARS2*; Plasmid pJM6) durch Transformation der jeweiligen Plasmide in den Stamm CS.U' getestet. Im Falle von pCS.CuARS1 und pCS.CuARS2 konnten unter den oben beschriebenen Bedingungen keine

Transformanten erhalten werden. *C. jadinii* jedoch ließ sich erfolgreich mit beiden Plasmiden transformieren (nach vier Stunden Regeneration in YEPD). Im Anschluss an die Transformation von CS.U' und *S. cerevisiae* (K26) mit pJM6 wurden die Zellen auf SCD Ura⁻ Medium ausplattiert. Dies führte allerdings weder beim Stamm CS.U' noch beim Stamm K26 nicht zum Erhalt von Transformanten. Die Transformation von CS.U' mit einem *S. cerevisiae* 2 μ -Plasmid (pCS.2micron.nat) scheiterte ebenfalls.

Anhand der Ergebnisse geht hervor, dass keine der getesteten heterologen Sequenzen zu einer autonomen Replikation der verwendeten Plasmide in *P. ciferrii* führte.

Zusammenfassung:

Durch Anwendung einer einfachen und hoch-effizienten Transformationsmethode konnte im *P. ciferrii* Wildtyp Stamm (PCWT) das für NHEJ essentielle *PcLIG4* Gen erfolgreich isoliert und deletiert werden, wodurch die Genzerstörungseffizienz von etwa 1 % auf 87 % erhöht werden konnte. Zusätzlich konnte das Cre-*loxP* System erfolgreich in *P. ciferrii* angewandt werden, was eine wichtige Voraussetzung für sukzessive genomische Modifikationen ist. Diese Errungenschaften sollten es im Folgenden ermöglichen, gezielt Gene zu zerstören oder deren Regulation auf Expressionsebene mittels Promotor-Substitution zu verändern, mit dem Ziel der rationalen Stammentwicklung von *P. ciferrii* hinsichtlich einer optimierten Produktion von Sphingoidbasen.

3.2 Optimierung der TAPS-Produktion

3.2.1 Metabolic engineering des L-Serin Metabolismus in *P. ciferrii*

Der initiale Schritt der *de novo* Sphingoidbasen-Biosynthese ist die von der Serin-Palmitoyl-Transferase (SPT) katalysierte Kondensation von L-Serin und Palmitoyl-CoA zu 3-Ketosphinganin (3-KSA). Dieser Schritt gilt in *P. ciferrii* als limitierend in der Produktion von TAPS (BAE *et al.*, 2003). Ferner konnte in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass eine erhöhte Aufnahme von extrazellulärem L-Serin Voraussetzung für eine gesteigerte LCB Produktion unter Hitzestress war wobei die endogene Palmitoyl-CoA-Versorgung in diesem Fall ausreichend war (COWART & HANNUN, 2007). Die Verfügbarkeit von L-Serin ist somit wahrscheinlich ein limitierender Faktor bei der Kondensation mit Palmitoyl-CoA in Hefen.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher den Katabolismus der Aminosäure L-Serin in *P. ciferrii* zu verringern um so die Verfügbarkeit an L-Serin für die SPT zu erhöhen. Falls L-Serin limitierend in der *de novo* Sphingolipid-Biosynthese von *P. ciferrii* ist, wäre durch eine erhöhte L-Serin-Verfügbarkeit der SPT vermutlich eine verbesserte TAPS-Produktion möglich. Zusätzlich wurde mit demselben Ziel versucht die *de novo* Biosynthese von L-Serin in *P. ciferrii* zu steigern.

3.2.1.1 Konstruktion von *P. ciferrii* Stämmen mit reduziertem L-Serin-Katabolismus

In Hefen kann L-Serin neben der Kondensation mit Palmitoyl-CoA auf weiteren Wegen verstoffwechselt werden (s. 1.4). **Tab. 1** gibt eine kurze Übersicht über Enzyme aus Hefen (am Beispiel von *S. cerevisiae*), die am Katabolismus von L-Serin beteiligt sind, mit dem jeweiligen putativen Homolog aus *P. ciferrii* (SCHORSCH *et al.*, nicht publiziert). Ein Ziel dieser Arbeit war die Deletion dieser Gene, wodurch eine erhöhte L-Serin-Verfügbarkeit der SPT und somit eine optimierte TAPS-Produktion erwartet wurde.

In *S. cerevisiae* ist L-Serin unter fermentativen Bedingungen die Hauptquelle für die Biosynthese von L-Glycin und dem C₁-Donor 5,10-Methylen-Tetra-Hydrofolat (5,10-mTHF) (SCHIRCH, 1982). L-Serin wird dabei durch die Serin-Hydroxy-Methyltransferasen (SHMTs) Shm1 und Shm2 zu L-Glycin und 5,10-mTHF umgesetzt. 5,10-mTHF und dessen oxidierte /

reduzierte Derivate werden für die Synthese von z.B. Purinen, Aminosäuren, Thymidylat (dTMP) oder Vitaminen benötigt [Review: (CHRISTENSEN & MACKENZIE, 2006)].

Shm1 ist in *S. cerevisiae* die mitochondriale Isoform, wohingegen **Shm2** die Hauptisoform darstellt, die im Cytosol lokalisiert ist (MCNEIL *et al.*, 1994; KASTANOS *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 2005). In *C. glutamicum* war eine reduzierte SHMT-Aktivität essentiell für eine optimierte Produktion von L-Serin (die Deletion des korrespondierenden Gens *glyA* ist wahrscheinlich lethal in *C. glutamicum*) (SIMIC *et al.*, 2002; PETERS-WENDISCH *et al.*, 2005). Ist L-Serin in der Zelle im Überschuss vorhanden, kann dieses zu L-Pyruvat umgesetzt werden, was in *S. cerevisiae* von der mitochondrialen L-Serin- (L-Threonin) induzierten L-Serin (L-Threonin) Deaminase **Cha1** katalysiert wird (RAMOS & WIAME, 1982; PETERSEN *et al.*, 1988). Die Deletion des *CHA1*-Homologs in *C. glutamicum* (*sdaA*) war ebenfalls ein wichtiger Schritt für eine gesteigerte L-Serin-Produktion.

Eine Analyse der beiden putativen *in silico* ermittelten SHMT-Isoenzyme aus *P. ciferrii* (PcShm1 und PcShm2) ergab in beiden Fällen keine vorhersagbare mitochondriale Lokalisation. Für das putative PcCha1 konnte ebenfalls durch *in silico* Analysen keine Lokalisation in den Mitochondrien vorhergesagt werden. Es konnte jedoch in allen drei putativen Proteinen (PcShm1, PcShm2 und PcCha1) eine Pyridoxyl-Phosphat-Bindestelle *in silico* identifiziert werden, wie sie auch in den Homologen aus *S. cerevisiae* gefunden wurden.

Produkt	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. ciferrii</i>	Identität / Homologie / AS
L-Glycin + 5,10-mTHF	Shm1	PcShm1	71 % / 83 % / 448
L-Glycin + 5,10-mTHF	Shm2	PcShm2	82 % / 92 % / 469
L-Pyruvat	Cha1	PcCha1	45 % / 65 % / 342
L-Cystathion	Cys4	PcCys4	63 % / 79 % / 494
L-Tryptophan	Trp5	PcTrp5	77 % / 88 % / 664
Phosphatidyl-L-Serin	Cho1	PcCho1	67 % / 80 % / 293

Tab. 1: Gezeigt sind mögliche Produkte der enzymatisch katalysierten Reaktionen mit L-Serin als Edukt in *S. cerevisiae*. Nebenprodukte sowie weitere Edukte der Umwandlungsreaktionen sind nicht gezeigt. L-Serin kann zudem im Methionin-*salvage pathway* durch Bat1, Bat2, Aro8 oder Aro9 zu Methionin umgewandelt werden oder in die Proteinbiosynthese einbezogen werden (nicht gezeigt). Die homologen putativen Proteine aus *P. ciferrii* sind mit jeweiliger Identität / Homologie zur Aminosäuresequenz der korrespondierenden Proteine aus *S. cerevisiae* gezeigt. (AS: Aminosäuren)

Ausgehend vom *P. ciferrii* Stamm CS (*lig4Δ*; s. 3.1.1.4) wurden zunächst die Gene *PcSHM1*, *PcSHM2* und *PcCHA1* in allen möglichen Kombinationen deletiert und die TAPS-Produktion in Fermentationen mittels RP-HPLC analysiert. Wie in **Abb. 15** zu erkennen ist, resultierte die Deletion von *PcSHM1* allein in keiner erhöhten Produktion von TAPS (CS.S1), wohingegen die Deletion von *PcSHM2* zu einem Anstieg der TAPS-Produktion um etwa 24 % auf $26 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ führte (CS.S2). Überraschenderweise führte die Doppeldeletion von *PcSHM1* und *PcSHM2* zu einem signifikanten Anstieg der TAPS-Produktion auf etwa $42 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ (CS.SS), was die Vermutung nahelegt, dass die Gene *PcSHM1* und *PcSHM2* für SHMT-Isoenzyme in *P. ciferrii* codieren und L-Serin möglicherweise limitierend in der Biosynthese von LCBs bzw. TAPS ist.

Die Deletion von *PcCHA1* alleine (CS.C) oder in Kombination mit *PcSHM1* oder *PcSHM2* (CS.CS1 / CS.CS2) zeigte keine signifikanten Veränderungen der TAPS-Produktion. Die kombinierte Deletion von *PcCHA1*, *PcSHM1* und *PcSHM2* allerdings führte zu einer signifikant erhöhten TAPS-Produktion auf etwa $65 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ (CS.CSS), was im Vergleich zum Stamm CS [mit $21 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$] eine etwa dreifache Steigerung darstellte und weiterhin vermuten lässt, dass es sich bei *PcCHA1* um das gesuchte L-Serin-Deaminase-Gen handelte und durch einen reduzierten L-Serin-Katabolismus eine erhöhte TAPS-Produktion in *P. ciferrii* möglich ist. Neben der Produktion von TAPS konnte im Stamm CS.CSS zusätzlich eine Produktion von signifikanten Mengen an Tri-Acetyl-Sphingarin [TriASa; $2,5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$] beobachtet werden, was möglicherweise einer Limitierung in der von PcSyr2 katalysierten Konversion von Sphingarin (SA) zu Phytosphingosin zugrunde (PHS) lag.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die kombinierte Deletion von *PcSHM1*, *PcSHM2* und *PcCHA1* (und somit ein vermutlich reduzierter L-Serin-Katabolismus) ein wichtiger Schritt für eine optimierte TAPS-Produktion in *P. ciferrii* ist.

ERGEBNISSE

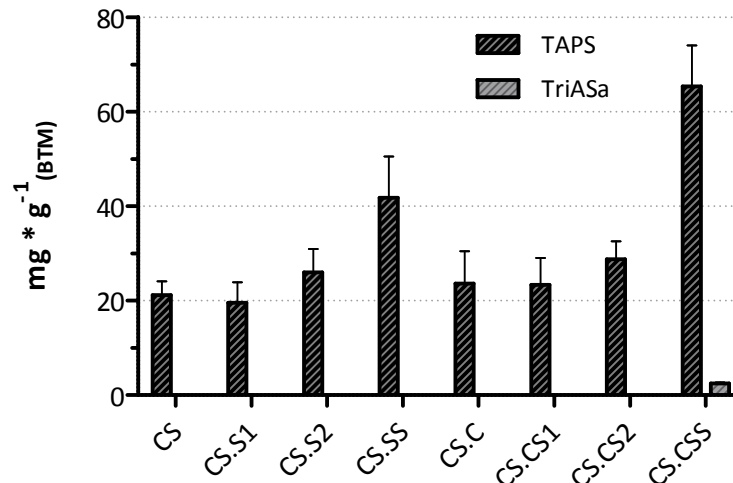


Abb. 15: Vergleich von *P. ciferrii* Deletionsmutanten in Bezug auf die TAPS-Produktion. Die Stämme weisen Deletionen von putativen Genen auf, die wahrscheinlich am L-Serin-Metabolismus /-Katabolismus beteiligt sind. Proben für RP-HPLC-Analysen wurden während der späten exponentiellen und frühen stationären Wachstumsphase genommen. TriASa-Titer < 2 mg * g_(BTM)⁻¹ sind nicht gezeigt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwertes (n ≥ 3).

Die Doppeldeletion der Gene *PcSHM1* und *PcSHM2* führte in beiden Stämmen (CS.SS / CS.CSS) zu einer leicht reduzierten Wachstumsrate und Biomasse-Produktion in TAPS-Medium [in Vollmedium (YEED) wurde dies nicht beobachtet; nicht gezeigt]. Möglicherweise war die Biosynthese von L-Glycin und / oder 5,10-mTHF limitierend für das Wachstum der SHMT-defizienten Stämme. Eine Supplementierung von TAPS-Medium mit L-Glycin führte nicht zur Wiederherstellung des ursprünglichen Wachstumsverhaltens (nicht gezeigt). Um zu testen, ob die Synthese von 5,10-mTHF limitierend war, wurde das Wachstum des Stammes CS.CSS in TAPS-Medium mit Natrium-Formiat (NaFo) in Konzentrationen von 0,05 - 10 mM untersucht. Formiat kann von Hefen leicht aufgenommen werden und im Cytosol (und in den Mitochondrien) von Ade3 zu 5,10-mTHF umgesetzt werden (PASTERNAK *et al.*, 1992). Ein entsprechendes putatives Ade3-Homolog konnte im Genom von *P. ciferrii* identifiziert werden (nicht gezeigt). Steigende NaFo-Konzentrationen führten zur graduellen Wiederherstellung von Wachstumsrate und Biomasse-Ertrag, wobei mit 10 mM NaFo das Wachstumsverhalten mit dem des Ausgangsstammes (CS) vergleichbar war (nicht gezeigt). Wachstumsverhalten und TAPS-Produktion des Stammes CS blieb in Anwesenheit von den getesteten NaFo-Konzentrationen unverändert. Interessanterweise kam es im Stamm CS.CSS mit

zunehmenden NaFo-Konzentrationen gleichzeitig zu einem graduellen Abfall der TAPS-Produktion auf bis etwa $22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ (**Abb. 16**). Die Ergebnisse legen nahe, dass die Limitierung von 5,10-mTHF und / oder die reduzierte Wachstumsrate zur gesteigerten TAPS-Produktion in den SHMT-defizienten Stämmen beigetragen haben. Mit einer Konzentration von 0,1 mM NaFo jedoch konnte sowohl die absolute ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) als auch relative TAPS-Produktion [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$] wiederhergestellt werden wohingegen die Dauer von Fermentationen in TAPS-Medium mit 0,1 mM NaFo (TAPS⁺-Medium) um 25 % verkürzt werden konnte. Die Verwendung von TAPS⁺-Medium erschien daher für Fermentationen mit *shm1Δ shm2Δ* Stämmen als vorteilhaft.

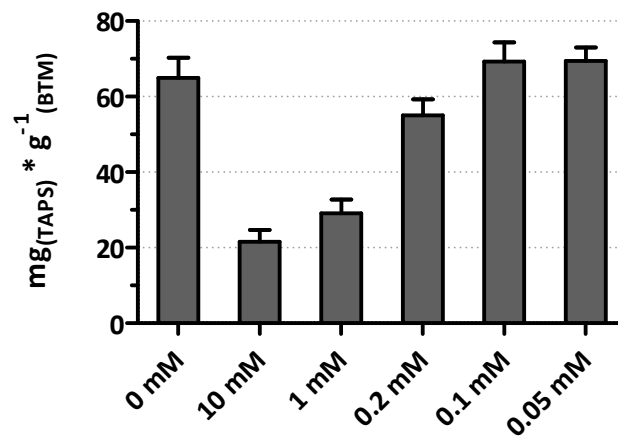


Abb. 16: Gezeigt ist der Effekt verschiedener Konzentrationen an Natrium-Formiat (in TAPS-Medium) und deren Effekt auf die TAPS-Produktion des Stammes CS.CSS. Steigende NaFo-Konzentrationen führten zur graduellen Wiederherstellung von Wachstumsrate und Biomasse-Ertrag (nicht gezeigt). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwertes (n = 4).

Analyse von cytosolischem L-Serin und L-Glycin in den Stämmen CS.SS und CS.CSS:

Um die gesteigerte TAPS-Produktion in den Stämmen CS.SS und CS.CSS näher zu charakterisieren, wurden Metabolit-Analysen mit diesen beiden Stämmen (und dem Ausgangsstamm CS) von der Firma „Metabolomic Discoveries GmbH“ durchgeführt. Die Konzentrationen der Metabolite L-Serin und L-Glycin wurden bestimmt und mit denen des Stammes CS verglichen. Die Bestimmung von absoluten Metabolit-Mengen war dabei leider nicht möglich. Wie in **Tab. 2** zu erkennen ist führte die Doppeldeletion der Gene *PcSHM1* und *PcSHM2* (Stamm CS.SS / CS.CSS) zu einer starken Reduktion an

metabolischem L-Glycin, was weiterhin darauf hindeutete, dass *PcSHM1* und *PcSHM2* für SHMT-Isoenzyme in *P. ciferrii* codieren. In Bezug auf die metabolischen L-Serin-Mengen konnte kein Unterschied (Stamm CS.SS) bzw. ein leichter Anstieg von etwa 15% (Stamm CS.CSS) im Vergleich zum Ausgangsstamm beobachtet werden. Die gesteigerten TAPS-Mengen (s. oben) und relativ konstanten metabolischen L-Serin-Mengen implizieren allerdings einen erniedrigten L-Serin-Katabolismus in beiden Stämmen, der durch die Deletionen der Gene *PcSHM1*, *PcSHM2* und *PcCHA1* bedingt war.

Stamm	L-Serin	L-Glycin
CS	1,00 (± 0,04)	1,00 (± 0,05)
CS.SS	0,98 (± 0,04)	0,18 (± 0,06)
CS.CSS	1,15 (± 0,05)	0,14 (± 0,04)

Tab. 2: Relative Metabolit-Konzentrationen von L-Serin und L-Glycin der Stämme CS.SS (*shm1Δ shm2Δ*) und CS.CSS (*cha1Δ shm1Δ shm2Δ*) im Vergleich zum Stamm CS. Die grauen Werte in Klammern repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (n = 6). Die Analysen wurden durchgeführt von Metabolomic Discoveries GmbH (Potsdam-Golm).

Die Deletionen von *PcCYS4*, *PcTRP5* und *PcCHO1* wurden jeweils im Stamm CS.CSS durchgeführt. Die Inaktivierung von *PcCYS4* resultierte in einem etwa 17 %igem Anstieg der TAPS-Produktion [auf etwa 25 mg * g⁻¹_(BTM)], wobei der maximale TAPS-Titer (mg * L⁻¹) im Vergleich zum Stamm CS.CSS unverändert blieb (Stamm CSS.CYS4; nicht gezeigt). Dieser Stamm war offenbar prototroph für L-Cystein, wies aber eine leicht reduzierte Wachstumsrate auf. Eine Deletion von *CYS4* führt in *S. cerevisiae* zur Cystein-Auxotrophie (Ono *et al.*, 1988). Der *trp5Δ* Stamm CSS.TRP5 war vermutlich auxotroph für L-Tryptophan und nicht in der Lage in TAPS-Medium zu wachsen, selbst wenn L-Tryptophan (10 mM) supplementiert wurde. Eine Deletion von *TRP5* in *S. cerevisiae* resultiert ebenfalls in einer L-Tryptophan-Auxotrophie (ZALKIN & YANOFSKY, 1982). Die Deletion von *PcCHO1* führte zu einer leicht verringerten TAPS-Produktion bei gleichzeitig leichtem Wachstumsnachteil (Stamm CSS.CHO1; nicht gezeigt).

3.2.1.2 Engineering der *de novo* Biosynthese von L-Serin

Die *de novo* Biosynthese von L-Serin ist in Hefen sowie in vielen anderen Organismen stark konserviert und wird in Anwesenheit von Glukose in drei Schritten aus dem Glykolyse-Intermediat 3-PG synthetisiert. 3-PG ist das physiologische Substrat der 3-Phospho-Glycerat Dehydrogenase (PGDH), um das die PGDH mit dem Glykolyse-Enzym **Gpm1** (3-Phospho-Glycerat Mutase) konkurriert. Ein Ansatz die L-Serin Biosynthese anzutreiben war daher die Aktivität von Gpm1 zu verringern. Dadurch sollte der PGDH mehr Substrat für die Synthese von 3-P-HP zur Verfügung stehen und der metabolische Fluss zu L-Serin verstärkt werden. Ein putatives PcGpm1 konnte identifiziert werden und wies 76 % Identität (87 % Homologie) zu ScGpm1 auf. Die Herabsetzung der Gpm1-Aktivität sollte auf Ebene der Transkription bzw. durch Promotor-Substitution im Stamm CS.CSS erfolgen. Dazu wurde die endogene putative *PcGPM1*⁻²⁸⁹⁻¹ Promotor-Sequenz durch das putative *PcACT1*⁻⁴⁵¹⁻¹ Promotor-Fragment ausgetauscht. Die relativen *PcGPM1*-Transkriptmengen dieses Stammes (CSS.GPM1dr) und des Ausgangsstammes wurden mittels qRT-PCR bestimmt und die spezifischen Enzymaktivitäten von Gpm1 ermittelt. Es wurde davon ausgegangen, dass die Expression von *PcACT1* schwächer als die des Glykolysegens *PcGPM1* ist und eine Promotor-Substitution deshalb zu einer reduzierten Expression von *PcGPM1* und folglich zu einer geringeren Phosphoglycerat-Mutase-Aktivität im Stamm CSS.GPM1dr führen sollte. Wie in **Abb. 17** zu erkennen ist verringerte sich die Expression von *PcGPM1* im Stamm CSS.GPM1dr um den Faktor 4,5 ($\pm 0,29$). Gleichzeitig wurde eine etwa neun-fache Abnahme der spezifischen Enzymaktivität von PcGpm1 detektiert, wobei PcGpm1 im Stamm CS.CSS eine spezifische Aktivität von 1,41 ($\pm 0,1$) U * mg⁻¹_(Protein) und im Stamm CSS.GPM1dr eine von 0,15 ($\pm 0,02$) U * mg⁻¹_(Protein) aufwies. In Bezug auf die TAPS-Produktion konnten jedoch keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden (nicht gezeigt). Interessanterweise zeigte der Stamm CSS.GPM1dr zudem keine erkennbaren Veränderungen im Wachstumsverhalten in Glukose-haltigem Medium. Eine verringerte PcGpm1-Aktivität brachte demnach vermutlich keinen verstärkten metabolischen Fluss des *de novo* L-Serin Biosyntheseweges mit sich.

ERGEBNISSE

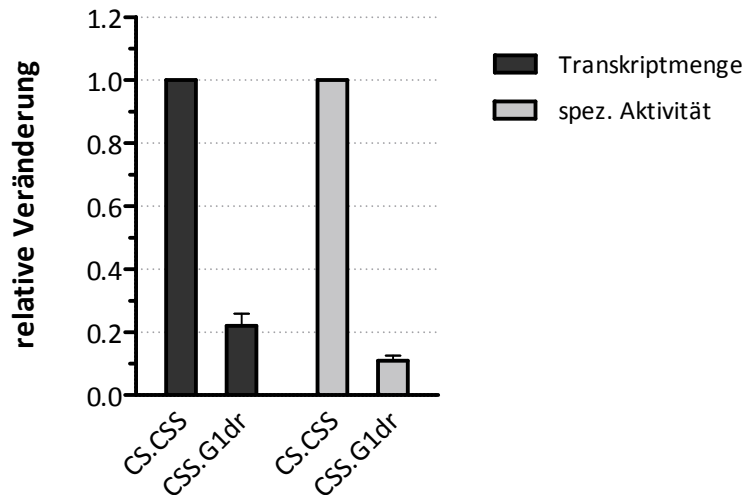


Abb. 17: Vergleich der relativen *PcGPM1*-Transkriptmenge und spezifischen *PcGpm1*-Aktivität im Stamm CSS.GPM1dr und CS.CSS. Die Werte geben den Faktor der Veränderung relativ zum Stamm CS.CSS (= 1; rote gestrichelte Linie) an. Im Stamm CSS.GPM1dr wurde der *PcGPM1*⁻²⁸⁹⁻¹ Promotor gegen den *PcACT1*⁻⁴⁵¹⁻¹ Promotor ausgetauscht. Für die Analysen wurden die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwertes (n ≥ 3).

Der erste Schritt, die reversible und NAD-abhängige Oxidation von 3-PG zu 3-Phospho-Hydroxypyruvat (3-P-HP), wird in Hefen von der PGDH **Ser3** katalysiert. Mittels Überexpression von *PcSER3* sollte die PGDH-Gesamtaktivität in *P. ciferrii* erhöht und somit der metabolische Fluss von 3-PG zu L-Serin verstärkt werden. In *C. glutamicum* führte eine Überexpression des PGDH-Gens *serA* zu einer erhöhten spezifischen PGDH-Aktivität und somit zu einer gesteigerten Produktion von L-Serin (PETERS-WENDISCH *et al.*, 2002; PETERS-WENDISCH *et al.*, 2005).

Im Genom von *P. ciferrii* konnte ein putatives *PcSer3* bestehend aus 470 AS identifiziert werden. Es zeigte 77% Identität (88% Homologie) zu *ScSer3* und 76% Identität (89% Homologie) zu *ScSer33*. Ein paraloges Gen wie in *S. cerevisiae* (*SER33*) konnte mittels bioinformatischen Analysen nicht im Genom von *P. ciferrii* gefunden werden. Für die Überexpression von *PcSER3* in *P. ciferrii* wurde im Genom des Stammes CS.CSS die endogene *PcSER3*⁻¹³⁸⁻¹ Promotor-Sequenz durch das *PcTDH3*⁻⁴²⁰⁻¹ Promotor-Fragment ausgetauscht. *TDH3* Promotor-Fragmente wurden in *S. cerevisiae* und *P. ciferrii* bereits erfolgreich für Überexpressions-Studien verwendet (LI *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 1996; BAE *et al.*, 2003). Um zu testen, ob der Austausch der Promotor-Sequenz zu einer erhöhten Expression von *PcSER3* im Stamm CSS.SER3oe führte wurden dessen mRNA Mengen

mittels quantitativer *real time* PCR (qRT-PCR) erfasst und mit denen des Stammes CS.CSS verglichen. Im Stamm CSS.SER3oe konnte eine erhöhte Expression von *PcSER3* um den Faktor 5,5 ($\pm 0,2$) festgestellt werden. Die Überexpression von *PcSER3* führte allerdings zu keiner Veränderung der TAPS Produktion. Der Promotor-Austausch wurde ebenfalls im Stamm CS (*lig4* Δ) durchgeführt und hatte dort ebenfalls keinen Effekt auf die TAPS Produktion (nicht gezeigt).

Eine *in silico* Analyse der *PcSer3* Sequenz führte zum Auffinden einer putativen C-terminalen ACT Domäne (L₃₈₈ - Y₄₇₀), die für eine allosterische *feed back* Inhibierung der PGDH durch L-Serin zumindest in *C. glutamicum* (PETERS-WENDISCH *et al.*, 2002), *E. coli* (SUGIMOTO & PIZER, 1968; GRANT *et al.*, 1996), sowie vermutlich in *S. cerevisiae* (ULANE & OGUR, 1972) verantwortlich ist. In *C. glutamicum* konnte durch Deletion der ACT-Domäne eine PGDH-Mutante konstruiert werden, die insensitiv gegenüber einer L-Serin-Inhibierung ist (PETERS-WENDISCH *et al.*, 2002). Für eine enthemmte und optimierte *de novo* L-Serin Biosynthese wurde daher die Deletion dieser Sequenz im Stamm CS.CSS angestrebt. Zu diesem Zweck wurde *PcSER3*¹¹⁶²⁻¹⁴¹⁰ (codiert für die putative ACT Domäne) deletiert, indem die *PcSER3* Sequenz von bp 1162 bis bp 1413 durch ein Stopp-Codon (TAA), gefolgt von einer *loxP*-flankierten *clonNAT*-Markerkassette, ersetzt wurde. In Bezug auf die TAPS-Produktion des daraus resultierenden Stammes (CSS.SER3 Δ 83) konnte im Vergleich zum Stamm CS.CSS keine Veränderung in der relativen TAPS Produktion [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$] festgestellt werden (nicht gezeigt). Auffällig war jedoch, dass dieser Stamm in TAPS Medium (verglichen zum Ausgangsstamm) eine stark reduzierte Wachstumsrate aufwies (nicht gezeigt). In Vollmedium (YEPD) wurde dieser Phänotyp nicht beobachtet. Die Deletion des gesamten *PcSER3* ORF im Stamm CS.CSS führte zur L-Serin-Auxotrophie, so dass dieser Stamm (CSS.SER3) nicht in synthetischem (TAPS-) Medium wuchs. Diese Ergebnisse deuteten zwar auf ein funktionelles PGDH-Mutein (*PcSer3* ^{Δ C83}) im Stamm CSS.SER3 Δ 83 hin, jedoch war dieses offenbar nicht mehr voll aktiv. Eine Supplementierung von TAPS-Medium mit L-Serin (1, 5 und 10 mM) führte nicht zur Wiederherstellung des Wachstumsverhaltens beider Stämme (CSS.SER3 & CSS.SER3 Δ 83). Um zu testen, ob die TAPS Produktion in den Stämmen CSS.SER3oe und CSS.SER3 Δ 83 trotz mutmaßlich erhöhter oder erniedrigter PGDH-Aktivitäten unverändert blieb, sollten die spezifischen PGDH-Aktivitäten in den jeweiligen Stämmen über *in vitro* Enzym-

Analysen bestimmt werden. In anderen Arbeiten wurde die spezifische PGDH-Aktivität häufig durch Messen der Rückreaktion (3-P-HP-Reduktion) bestimmt (JAEKEN *et al.*, 1996; ALBERS *et al.*, 2003; TABATABAIE *et al.*, 2009), da die Hinreaktion (3-PG-Oxidation) mit einer Gleichgewichtskonstante von etwa $1 \cdot 10^{-12}$ beschrieben wird und dadurch ungünstig zu messen sei (SALLACH, 1966). Da das Substrat für die Rückreaktion (3-P-HP) kommerziell nicht verfügbar war, wurde in dieser Arbeit versucht die PGDH-Aktivität anhand der Hinreaktion enzymatisch zu messen. Unter den gewählten Bedingungen (s. 2.9.7) konnten leider keine aussagekräftigen PGDH-Aktivitäten bestimmt werden. Inwiefern und ob die spezifischen PGDH-Aktivitäten in den Stämmen CSS.SER3oe und CSS.SER3Δ83 verändert waren bleibt somit ungeklärt.

Um die *de novo* L-Serin-Biosynthese zu optimieren, wurde in dieser Arbeit eine Strategie entwickelt, in der mittels *evolutionary engineering* der metabolische Fluss hin zu L-Serin verbessert werden sollte. Dies sollte durch Umleiten des glykolytischen Flusses über den *de novo* L-Serin Biosyntheseweg und anschließender Selektion auf verbessertes Wachstum auf Glukose realisiert werden. So wurde im Stamm CS.SS (*lig4Δ shm1Δ shm2Δ*) zunächst das endogene *PcCHA1*⁻¹¹⁵⁻¹ Promotor-Fragment durch das *PcPGI1*⁻³⁹⁶⁻¹ Promotor-Fragment ausgetauscht. Die Expression von *CHA1* wird in *S. cerevisiae* durch L-Serin induziert (BORNAES *et al.*, 1993) (ob dies in *P. ciferrii* auch der Fall ist, ist nicht bekannt). Erwünscht war jedoch eine konstitutive Expression von *PcCHA1*, um eine mögliche Limitierung in der Umsetzung von L-Serin zu L-Pyruvat auf Expressions-Ebene zu umgehen. *PGI1* (Phospho-Glukose-Isomerase) ist ein Glykolyse-Gen und wird in Hefen vermutlich konstitutiv exprimiert (GREEN *et al.*, 1988), weshalb dieses Promotor-Fragment für die Promotor-Substitution als geeignet erschien. Im resultierenden *PcPGI1p:PcCHA1* Stamm CS.SS.Cs wurde anschließend *PcGPM1* deletiert. Aufgrund der *gpm1* Deletion sollte der Glykolyse-Stoffwechselweg an dieser Stelle unterbrochen sein und Wachstum auf Glukose nur möglich sein, wenn 3-PG über den L-Serin-Biosyntheseweg zu L-Pyruvat umgesetzt wird (**Abb. 18**). Nach Transformation mit dem *PcGPM1*-Deletions-Konstrukt konnten positive Transformanten erhalten werden, die erwartungsgemäß sehr schlecht auf bzw. in Vollmedium (YEPD) wuchsen (Wachstum in TAPS-Medium war nicht möglich). Eine der Transformanten [CS.SS.Cs.G1 (*lig4Δ shm1Δ shm2Δ PcPGI1p:PcCHA1 gpm1Δ*)]

wurde für die Selektion auf verbessertes Wachstum mittels *evolutionary engineering* ausgewählt. Dazu wurde der Stamm über einen Zeitraum von ca. sechs Wochen in YEPD-Medium kultiviert, indem 1 - 2 µl einer stationär gewordenen Kultur sequentiell zur Inokulation von frischem Medium verwendet wurden. Das Wachstum konnte so (nach etwa 50 Generationen) um ein vielfaches verbessert werden (nicht gezeigt). Wachstum in TAPS-Medium war jedoch weiterhin nicht möglich. *Evolutionary engineering* dieses evolvierten Stammes (CS.SS.Cs.G1e) in TAPS-Medium war aus zeitlichen Gründen leider nicht mehr möglich. Die Ursache für das verbesserte Wachstum des Stammes CS.SS.Cs.G1e in YEPD-Medium ist nicht bekannt.

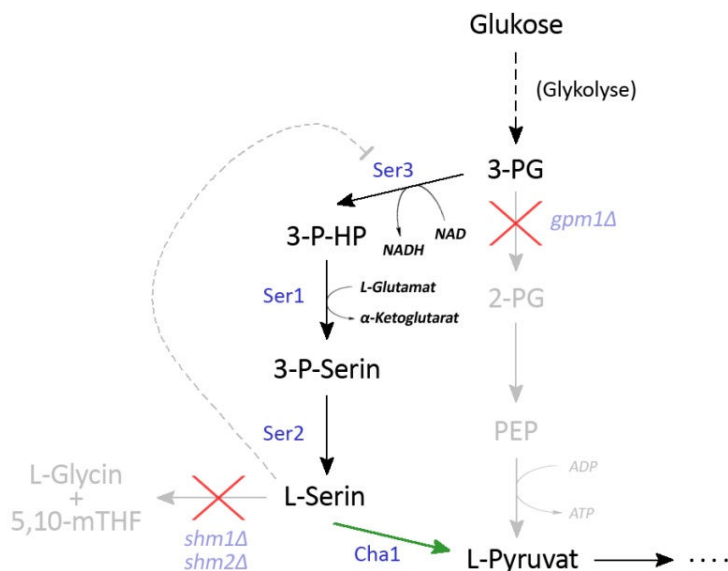


Abb. 18: Gezeigt ist die durch rationale Stammentwicklung erhoffte Pyruvat-Biosynthese in *P. ciferrii*. Durch Blockade der Glykolyse (*gpm1Δ*), sollte der metabolische Fluss der Glykolyse über den *de novo* L-Serin Biosyntheseweg umgeleitet werden, um eine L-Pyruvat-Synthese bzw. Wachstum zu ermöglichen. Durch *evolutionary engineering* sollte anschließend der L-Serin-Biosyntheseweg optimiert werden. Details s. Text. 2-PG: 3-Phosphoglycerat; 3-P-HP: 3-Phospho-Hydroxypyruvat; 3-P-Serin: 3-Phospho-L-Serin; 3-PG: 3-Phosphoglycerat; PEP: Phosphoenol-Pyruvat.

Die Biosynthese von L-Serin findet im Cytosol statt, wohingegen die Sphingolipid-Biosynthese im ER bzw. in der ER-Membran beginnt. Möglicherweise stellt diese Kompartimentierung eine Limitierung in der L-Serin-Versorgung der *de novo* LCB-Synthese dar. In Hefen existiert ein Protein (**Tms1**) welches wahrscheinlich die Versorgung der SPT mit cytosolischem L-Serin verbessert (INUZUKA *et al.*, 2005).

So weist ein *S. cerevisiae tms1Δ* Stamm (verglichen zum Wildtyp) nur etwa 50 % der SPT-Aktivität auf und eine Überexpression des humanen Tms1-Homologs Serinc1 in COS Zellen führte zu einer gesteigerten *de novo* Sphingolipid-Biosynthese (INUZUKA *et al.*, 2005). Ein putatives *TMS1* Homolog konnte in dieser Arbeit im Genom von *P. ciferrii* identifiziert werden. Dessen abgeleitete Aminosäure-Sequenz (469 AS) weist 54 % Identität (73 % Homologie) zu Tms1 aus *S. cerevisiae* auf und besitzt 10 putative Transmembran-Domänen. Um zu testen, ob es sich dabei um das funktionelle Homolog zu ScTms1 handelte, wurde die Überexpression von *PcTMS1* im Stamm CS.CSS angestrebt. Dabei war das Ziel die L-Serin-Verfügbarkeit der SPT und somit die SPT-Aktivität zu erhöhen, was sich theoretisch in einer gesteigerten TAPS-Produktion widerspiegeln könnte. Zu diesem Zweck wurde das endogene *PcTMS1*⁻¹⁸⁵⁻¹ Promotor-Fragment im Stamm CS.CSS durch das *PcTDH3*⁻⁴²⁰⁻¹ Promotor-Fragment ausgetauscht. Im daraus resultierenden Stamm CSS.TMS1oe konnte mittels qRT-PCR eine erhöhte Expression von *PcTMS1* um den Faktor 12 ($\pm 1,2$) nachgewiesen werden. In Bezug auf die TAPS-Produktion wurde jedoch keine Veränderung im Vergleich zum Ausgangs-Stamm CS.CSS festgestellt (nicht gezeigt). Eine Deletion von *PcTMS1* im Stamm CS.CSS hatte ebenfalls keinen Effekt in Bezug auf die TAPS-Produktion (Stamm CSS.TMS1; nicht gezeigt). Die Funktion von *PcTMS1* bleibt somit unklar.

3.2.2 Optimierung der *de novo* LCB-Biosynthese

Der erste Schritt der *de novo* LCB-Biosynthese ist die Kondensation von L-Serin und Palmitoyl-CoA (vgl. **Abb. 26**). Diese Reaktion wird von der Serin-Palmitoyl-Transferase (SPT) katalysiert, die aus den Untereinheiten **Lcb1** und **Lcb2** sowie dem akzessorischen Protein Tsc3 zusammengesetzt ist. Eine Überexpression von *PcLCB2* führte bereits zu einer erhöhten Produktion von TAPS in *P. ciferrii*, wodurch gezeigt werden konnte, dass dieser erste Schritt limitierend in der TAPS-Produktion ist (BAE *et al.*, 2003). Für *S. cerevisiae* z.B. ist beschrieben, dass eine Co-Überexpression von *LCB1* und *LCB2* notwendig für eine erhöhte SPT-Aktivität ist (NAGIEC *et al.*, 1994). Um die TAPS-Produktion im bereits optimierten Stamm CS.CSS weiter zu verbessern, wurde die Co-Überexpression von *PcLCB2* und *PcLCB1* angestrebt. Ein putatives *PcLCB1* konnte *in silico* bereits ermittelt werden (BÖRGEL, 2007) und dessen abgeleitete AS-Sequenz (mit 570 AS) wies 43 %

Identität (60 % Homologie) zu Lcb1 aus *S. cerevisiae* auf. Für die Überexpression von *PcLCB1* wurde der *PcLCB1*⁻¹⁸⁶⁻¹ Promotor-Bereich durch das *PcENO1*⁻⁵⁸⁴⁻¹ Promotor-Fragment ersetzt. Die anschließende Quantifizierung der mRNA dieses Stammes (CSS.L1) mittels qRT-PCR ergab eine erhöhte Expression von *PcLCB1* um den Faktor 5,5 (± 0,6). In Bezug auf die TAPS-Produktion konnte im Stamm CSS.L1 eine Verbesserung um etwa 14 % auf 77 mg * g⁻¹_(BTM) beobachtet werden (**Abb. 19**). In Anbetracht dieser Ergebnisse lässt sich daher annehmen, dass *PcLCB1* (neben *PcLCB2*) höchst wahrscheinlich für eine Untereinheit der SPT in *P. ciferrii* codiert.

In der Arbeit von Bae *et al.* wurde *PcLCB2* (unter Kontrolle des *PcTDH3* Promotors) durch multiple Integrationen im Genom etwa 50fach überexprimiert und führte zu einer Verdopplung der TAPS-Produktion im Wildtyp (BAE *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde *PcLCB2* durch Promotor-Substitution versucht überzuexprimieren. Dazu wurde die *PcLCB2*⁻¹¹³⁻¹ Promotor-Region durch das *PcTDH3*⁻⁴²⁰⁻¹ Promotor-Fragment im Stamm CS.CSS ausgetauscht. Dies resultierte in einem Stamm (CSS.L2), der laut qRT-PCR *PcLCB2* etwa um den Faktor 11 (± 1,5) überexprimierte, was mit einer ca. 26 %igen Erhöhung der TAPS-Produktion auf etwa 83 mg * g⁻¹_(BTM) einherging (**Abb. 19**). Um zu testen, ob eine Co-Überexpression von *PcLCB1* und *PcLCB2* die TAPS-Produktion weiter verbessern konnte, wurde *PcLCB2* im Stamm CSS.L1 überexprimiert. Als Resultat produzierte dieser Stamm (CSS.L1.L2) mit rund 102 mg_(TAPS) * g⁻¹_(BTM) etwa 37 % mehr TAPS als der Ausgangsstamm CSS.L1 bzw. etwa 57 % mehr als der Stamm CS.CSS. Zusätzlich konnte ein signifikanter Anstieg der TriASa-Produktion im Stamm CSS.L1.L2 auf etwa 8 mg * g⁻¹_(BTM) beobachtet werden. Die Co-Überexpression von *PcLCB1* und *PcLCB2* ist somit ein wichtiger Schritt in der rationalen Stammentwicklung von *P. ciferrii* in Bezug auf eine optimierte Sphingoidbasen- bzw. TAPS-Produktion.

Neben den SPT-Untereinheiten Lcb1 und Lcb2 existiert in Hefen ein weiteres, SPT-assoziiertes Protein (**Tsc3**). Tsc3 ist ein kleines hydrophobes akzessorisches Protein, welches in *S. cerevisiae* für eine optimale SPT-Aktivität notwendig und essentiell während Hitze-Stress ist (GABLE *et al.*, 2000). Ein putatives PcTsc3 konnte im Genom von *P. ciferrii* identifiziert werden. Es besteht aus 105 AS und besitzt 41 % Identität (62 % Homologie) zu ScTsc3. Möglicherweise ist das Homolog (*PcTSC3*) in *P. ciferrii* ebenfalls für eine optimale

SPT-Aktivität notwendig und dessen Funktion evtl. limitierend in einem für die TAPS-Produktion optimierten Stamm.

Eine Überexpression von *PcTSC3* (*PcTSC3*⁻³⁷⁰⁻¹::*PcTDH3*⁻⁴²⁰⁻¹) im Stamm CS.CSS um den Faktor 14 ($\pm 1,4$) führte zu keiner erkennbaren Veränderung in der TAPS-Produktion (Stamm CSS.T3oe; nicht gezeigt), wie es sich auch bei Co-Überexpression mit *PcLCB1* oder *PcLCB2* verhielt (Stamm CSS.L1.T3oe und CSS.L2.T3oe; nicht gezeigt). Die Überexpression im Ausgangsstamm CS war ebenfalls ohne Effekt (Stamm CS.T3oe, nicht gezeigt). Überraschenderweise führte die Überexpression von *PcTSC3* im Stamm CSS.L1.L2 zu einem drastischen Abfall der TAPS-Produktion und zu einem starken Wachstums-Defizit in TAPS- und YEPD-Medium (Stamm CSS.L1.L2.T3oe; nicht gezeigt). Eine Überexpression von *PcTSC3* stellte sich demnach in Bezug auf die TAPS-Produktion nicht als förderlich heraus und dessen Rolle im Sphingolipid-Metabolismus von *P. ciferrii* bleibt weiterhin unklar.

In *S. cerevisiae* konnten kürzlich die Proteine **Orm1** und **Orm2** als Mediatoren der Sphingolipid-Homöostase [und Protein-Qualitätskontrolle im ER (*unfolded protein response*: UPR)] charakterisiert werden (BRESLOW *et al.*, 2010; HAN *et al.*, 2010). Orm1 und Orm2 bilden dabei einen Komplex, der mit der SPT interagiert. Liegt der Orm-Komplex unphosphoryliert vor, wirkt dieser hemmend auf die Aktivität der SPT und somit auf die LCB-Synthese. Im phosphorylierten Zustand ist der Orm-Komplex inaktiv und die SPT enthemmt. Die Phosphorylierung des Orm-Komplexes kann demnach als eine homöostatische Antwort auf niedrige intrazelluläre LCB-Level betrachtet werden. Eine Doppeldeletion von *ORM1* und *ORM2* führt in *S. cerevisiae* u.a. zu einer dysregulierten Sphingolipid-Biosynthese, die sich in einer Akkumulation von LCBs widerspiegelt (BRESLOW *et al.*, 2010; HAN *et al.*, 2010).

Eine TBLASTN-Suche mit ScOrm1 und ScOrm2 im Genom von *P. ciferrii* ergab nur ein putatives Orm-Protein (PcOrm12), bestehend aus 191 Aminosäuren mit 66 % Identität (82 % Homologie) zu ScOrm1 und 59 % Identität (77 % Homologie) zu ScOrm2. Zusätzlich konnten zwei vorhergesagte Transmembran-Domänen in PcOrm12 gefunden werden. Um zu testen, ob eine Deletion von *PcORM12* im Stamm CS.CSS zu einem weiteren Anstieg der TAPS-Produktion führt, wurde eine Gen-Deletionskassette für *PcORM12* konstruiert und in den Stamm CS.CSS transformiert. Der daraus resultierende Stamm CSS.O zeigte in

TAPS-Medium mit knapp $105 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ eine ca. 60 %ige Verbesserung der TAPS-Produktion (**Abb. 19**). Gleichzeitig kam es zu einem signifikanten Anstieg der TriASa-Produktion von 2,5 auf $5,6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$. Vermutlich handelt es sich bei PcOrm12 um das funktionelle Homolog zu den Orm-Proteinen aus *S. cerevisiae*.

Neben den Orm-Proteinen wurde die Phosphatidyl-Inositol-4-P Phosphatase **Sac1** als Modulator der SPT-Aktivität in *S. cerevisiae* postuliert. Eine *sac1* Deletion führt zur Akkumulation von Sphingoidbasen und ist in Kombination mit einer *orm1 orm2* Deletion synthetisch letal (BRESLOW *et al.*, 2010). Die Deletion von *PcSAC1* [PcSac1: 54 % Identität (71 % Homologie) zu ScSac1] im Stamm CS.CSS führte zu einem Stamm (CSS.SAC1), der nur sehr schlecht in TAPS-Medium wuchs und dabei nach fünf Tagen Wachstum maximal eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von etwa 4 erreichte. Die TAPS-Produktion sank dabei stark auf etwa $15 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ ab.

Der zweite Schritt in der *de novo* Sphingoidbasen-Synthese ist die Reduktion von 3-KSA zu SA. Dieser Schritt wird von der 3-KSA-Reduktase **Tsc10** katalysiert. In *S. cerevisiae* konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine Überexpression von *TSC10* in einem erhöhten Ceramid-Anteil in der Lipid-Fraktion resultierte, was vermutlich durch eine erhöhte Tsc10-Aktivität bedingt war (KIM *et al.*, 2010). Ein putatives PcTsc10 wurde bereits bioinformatisch näher analysiert und charakterisiert (BÖRGEL, 2007). Es weist 40 % Identität (56 % Homologie) zu ScTsc10 auf, besitzt zwei putative Transmembrandomänen und gehört, wie auch ScTsc10, zur Familie der "kurzkettigen Dehydrogenasen / Reduktasen". Nach Promotor-Substitution von *PcTSC10*⁻²⁴⁷⁻¹ durch das *PcTDH3*⁻⁴²⁰⁻¹ Promotor-Fragment im Stamm CS.CSS, wurde mittels qRT-PCR eine etwa 19fach ($\pm 2,4$) erhöhte Transkriptmenge von *PcTSC10* ermittelt. Die TAPS-Produktion änderte sich in diesem Stamm (CSS.TSC10oe) verglichen zum Ausgangsstamm jedoch nicht (nicht gezeigt). Vermutlich ist die von PcTsc10 katalysierte Reaktion nicht limitierend in der *de novo* LCB-Biosynthese von *P. ciferrii*.

In Hefen sind die Kinasen **Lcb4** und Lcb5 für die Phosphorylierung der Sphingoidbasen PHS und SA zu PHS-1-Phosphat (PHS-1P) und SA-1-Phosphat (SA-1P) verantwortlich, wobei Lcb4 in *S. cerevisiae* für mindestens 95 % der Gesamtaktivität verantwortlich ist (NAGIEC *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung dient u.a. als Signal zum irreversiblen Abbau der LCBs zu Ethanolamin-Phosphat und einem langkettigen Aldehyd, was von der Lyase Dpl1 katalysiert wird (SABA *et al.*, 1997). Eine Deletion von *LCB4* führt in *S. cerevisiae* zur intrazellulären Akkumulation von LCBs (ZHANG *et al.*, 2001), was darauf hindeutet, dass die Phosphorylierung von LCBs eine Rolle bei der Regulation von intrazellulären LCB-Level in Hefe spielt (FERGUSON-YANKEY *et al.*, 2002). Eine TBLASTN-Analyse des *P. ciferrii* Genoms mit ScLcb4 und ScLcb5 als Matrize ergab in beiden Fällen nur einen signifikanten Treffer. Es handelte sich dabei um ein aus 509 AS bestehendes putatives Protein (PcLcb4), welches 52 % Identität (68 % Homologie) zu ScLcb4 und 51 % Identität (67 % Homologie) zu ScLcb5 aufwies. Die Deletion des korrespondierenden Gens *PcLCB4* im Stamm CS.CSS führte zu einem beachtlichen Anstieg der TAPS-Produktion von etwa 65 auf 116 mg * g⁻¹_(BTM). Zusätzlich kam es zu einem etwa drei-fachen Anstieg der TriASa-Produktion auf 8 mg * g⁻¹_(BTM) (**Abb. 19**). Um die Funktion von *PcLCB4* näher zu charakterisieren wurde *PcLCB4* im Stamm CS deletiert und die intrazellulären (C₁₈)LCB-P-Mengen des Zell-Homogenats mittels LC-MS/MS bestimmt (freundlicherweise durchgeführt von Gerhard Liebisch, Universität Regensburg). Es stellte sich heraus, dass im *lcb4Δ* Stamm (CS.L4) kein PHS-1P detektiert werden konnte, wohingegen im Ausgangsstamm CS etwa 48 pmol * mg⁻¹_(Protein) gemessen wurden. Zudem kam es im Stamm CS.L4 zu einer Abnahme der intrazellulären (SA1-P) Level von etwa 117 auf ca. 41 pmol * mg⁻¹_(Protein). In Bezug auf die TAPS-Produktion wies der Stamm CS.L4 im Vergleich zum Ausgangsstamm CS eine etwa 2,5fache Erhöhung auf (nicht gezeigt).

Anhand dieser Ergebnisse konnte somit gezeigt werden, dass *PcLCB4* für eine LCB-Kinase in *P. ciferrii* codiert, die PHS (und vermutlich SA) als Substrat erkennt. Zusätzlich führte die Deletion von *PcLCB4* zu einem enormen Anstieg der TAPS-Produktion, wodurch *PcLCB4* eine zentrale Rolle in der TAPS-Produktion von *P. ciferrii* zukommt.

LCB-Ps können in Hefe von der ER-membranständigen LCB-Phosphat-Lyase **Dpl1** zu Ethanolamin-Phosphat und einem langkettigen Aldehyd gespalten werden (SABA *et al.*, 1997). Im Genom von *P. ciferrii* konnte ein homologes putatives Protein (PcDpl1) bestehend aus 504 AS mit 62 % Identität (77 % Homologie) zu ScDpl1 identifiziert werden. In einem *S. cerevisiae dpl1Δ* Stamm akkumuliert PHS-1P und führt zur Wachstumsinhibierung (KIM *et al.*, 2000). Um das homologe Gen aus *P. ciferrii* (*PcDPL1*) näher zu charakterisieren wurde dieses im Stamm CS deletiert, was zu einem etwa 30 %igen Anstieg der TAPS-Produktion führte (Stamm CS.DPL1; nicht gezeigt). Die Quantifizierung der (C₁₈)LCB-Ps im Stamm CS.DPL1 ergab mit 348 (177) pmol * mg⁻¹_(Protein) etwa 7,3 (1,5) fach erhöhte PHS-1P (SA-1P) Mengen im Vergleich zum Stamm CS. Demnach lässt sich vermuten, dass es sich bei *PcDPL1* höchst wahrscheinlich um ein Gen handelt was für eine LCB-Phosphat Lyase in *P. ciferrii* codiert. Eine Deletion von *PcDPL1* im Stamm CS.CSS wurde nicht durchgeführt.

Eine weitere Möglichkeit des LCB-Phosphat Metabolismus besteht in dessen Dephosphorylierung, wodurch LCBs theoretisch wieder für die Synthese von Sphingolipiden zur Verfügung stehen. Die Dephosphorylierung wird in *S. cerevisiae* von den ER-membranständigen Proteinen **Lcb3** und Ysr3 katalysiert (MAO *et al.*, 1997; QIE *et al.*, 1997). Ein *S. cerevisiae lcb3Δ* Stamm akkumuliert analog zu einem *dpl1Δ* Stamm LCB-Ps (ZHANG *et al.*, 2001). Das in dieser Arbeit identifizierte putative PcLcb3 wies 541 AS auf und zeigte 41 % Identität (59 % Homologie) zu ScLcb3 und 35 % Identität (50 % Homologie) zu ScYsr3. Eine weitere putative LCB-Phosphatase konnte nicht im Genom von *P. ciferrii* gefunden werden. Eine Deletion von *PcLCB3* im Stamm CS hatte weder einen erkennbaren Effekt auf die TAPS-Produktion, noch auf die Level intrazellulärer (C₁₈)LCB-Ps (Stamm CS.LCB3; nicht gezeigt). Eine kombinierte Deletion von *LCB3* und *DPL1* wird in *S. cerevisiae* als letal beschrieben (ZHANG *et al.*, 2001) und konnte auch in der vorliegenden Arbeit nach mehrmaligen Transformationen des Stammes CS.LCB3 mit dem *PcDPL1*-Deletions-Konstrukt nicht realisiert werden. Die Ergebnisse legen daher die Vermutung nahe, dass es sich bei *PcLCB3* um ein für eine LCB-Phosphatase codierendes Gen handelt und eine *lcb3 dpl1* Doppeldeletion in *P. ciferrii* (wie in *S. cerevisiae*) letal ist. Weshalb dessen Deletion nicht mit einem Anstieg der intrazellulären (C₁₈)LCB-Ps einherging ist allerdings unklar.

Sphingoidbasen werden zusammen mit VLCFAs für die Synthese von Ceramiden (N-Acylierung;) benötigt. Dazu bedarf es der Fettsäure-Elongation von z.B. Palmitoyl-CoA (C_{16}) zu Acyl-CoA mit (i.d.R.) 26 C-Atomen (= VLCFA). In *S. cerevisiae* sind v.a. **Sur4** und **Fen1** an dieser Elongation beteiligt [für nähere Informationen: (DICKSON, 2008)]. Ein *sur4Δ* oder *fen1Δ* Stamm ist kaum in der Lage Sphingoidbasen in Ceramide einzubauen, da er in der VLCFA-Synthese stark eingeschränkt ist (eine Doppeldeletion wird in *S. cerevisiae* als letal beschrieben). Als Folge akkumuliert ein *sur4Δ* bzw. *fen1Δ* Stamm Sphingoidbasen und weist verringerte Ceramid-Level auf (REVARDEL *et al.*, 1995; BRESLOW *et al.*, 2010).

Für beide Elongasen konnten putative Homologe in *P. ciferrii* gefunden werden: PcSur4 [355 AS; 56 % Identität (75 % Homologie) zu ScSur4] und PcFen1 [336 AS; 64 % Identität (78 % Homologie) zu ScFen1]. Die Deletion der jeweiligen korrespondierenden Gene *PcSUR4* oder *PcFEN1* im Stamm CS.CSS führte im Fall von *PcSUR4* (Stamm CSS.SUR4) zu einem Anstieg der TAPS-Produktion von 65 auf etwa $80 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$, wohingegen die Deletion von *PcFEN1* (Stamm CSS.FEN1) in einem Anstieg auf etwa $86 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ resultierte (**Abb. 19**). In beiden Stämmen, CSS.SUR4 und CSS.FEN1, wurde zudem eine erhöhte TriASa-Produktion von 7 - 8 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ sowie eine leicht reduzierte Wachstumsrate festgestellt (nicht gezeigt). Es lässt sich daher annehmen, dass beide Gene (*PcSUR4* & *PcFEN1*) für Fettsäure-Elongasen in *P. ciferrii* codieren, deren Inaktivierung zu einer signifikanten Akkumulation von LCBs führt (die sich in erhöhten TAPS-Mengen widerspiegelte). In Bezug auf intrazelluläre Ceramid-Level wurden keine Analysen durchgeführt.

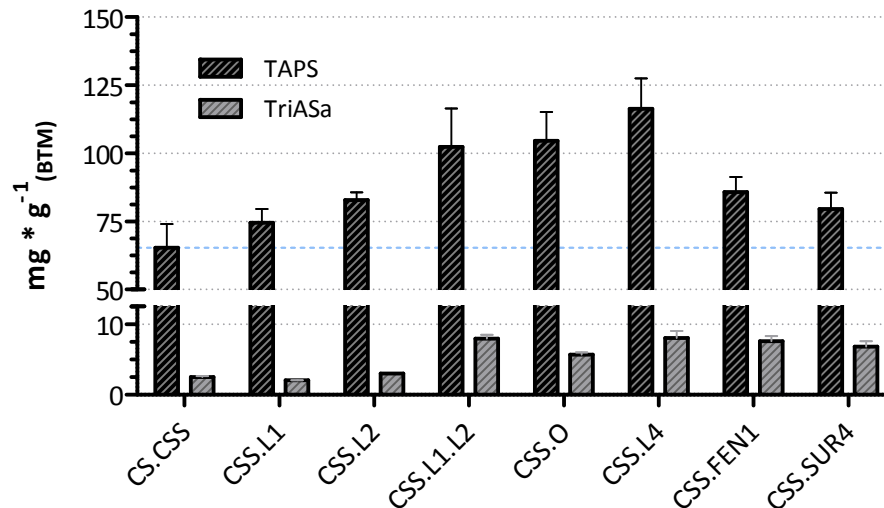


Abb. 19: Effekt von Überexpressionen bzw. Deletionen ausgewählter Genen des Sphingolipid-Stoffwechsels in *P. ciferrii* in Bezug auf die TAPS- und TriASa-Produktion. Details s. Text. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwertes ($n \geq 3$).

3.2.3 Konstruktion und Charakterisierung eines Hochleistungs-TAPS-Produzenten

In den vorherigen Experimenten konnten Gene identifiziert werden, deren jeweilige Deletion bzw. Überexpression eine gesteigerte TAPS-Produktion zur Folge hatte. Dabei handelte es sich um die Deletion von Genen des L-Serin-Katabolismus (*PcSHM1*, *PcSHM2* & *PcCHA1*), die Überexpression der SPT-Gene *PcLCB1* und *PcLCB2*, sowie die Deletion von *PcORM12*, *PcLCB4*, *PcSUR4*, *PcFEN1* und *PcDPL1*. Für eine industrielle TAPS-Produktion wäre ein Stamm von Vorteil, in dem möglichst viele dieser genetischen Konstrukte vereint sind. Die Konstruktion eines solchen Stammes war daher ein Ziel dieser Arbeit.

Die sukzessive Deletion von *PcSHM1*, *PcSHM2* und *PcCHA1* im Stamm CS führte zu einer Verbesserung der TAPS-Produktion von 21 auf 65 mg * g⁻¹_(BTM) (3.2.1.1; Stamm CS.CSS). Die Deletion von *PcLCB4* in diesem Stamm resultierte in einem weiteren signifikanten Anstieg auf 116 mg_(TAPS) * g⁻¹_(BTM) (3.2.2; Stamm CSS.L4).

Ausgehend vom Stamm CSS.L4 wurde im Folgenden *PcORM12* deletiert, wodurch ein Stamm konstruiert wurde (CSS.L4.O), der 172 mg_(TAPS) * g⁻¹_(BTM) produzierte (**Abb. 20**). Zugleich wurden etwa 30 % erhöhte TriASa-Mengen von 10,5 mg * g⁻¹_(BTM) in diesem Stamm detektiert. Die weitere Überexpression von *PcLCB2* führte zu einer leichten Verbesserung der TAPS-Produktion auf 182 mg * g⁻¹_(BTM), wohingegen es in Bezug auf die

TriASa-Produktion zu einem etwa 54 %igem Anstieg auf $16,2 \text{ mg} * \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ kam (**Abb. 20**; Stamm CSS.L4.O.L2). Die Überexpression von *PcLCB1* im Stamm CSS.L4.O.L2 hatte mit etwa $177 \text{ mg}_{(\text{TAPS})} * \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ keinen signifikanten Effekt bezüglich der TAPS-Produktion (**Abb. 20**; Stamm CSS.L4.O.L2.L1). Stattdessen produzierte der Stamm CSS.L4.O.L2.L1 bis zu $45 \text{ mg} * \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ an TriASa, was darauf hindeutete, dass die C4-Hydroxylase-Aktivität von PcSyr2 möglicherweise limitierend in der Umwandlung von SA zu PHS war. Für einen industriellen Einsatz wäre ein Stamm wünschenswert, der TAPS in möglichst reiner Form produziert, weshalb die Nebenproduktion von TriASa möglichst minimal sein sollte. Aus diesem Grund wurde erhofft, dass durch Überexpression von *PcSYR2* die TriASa-Produktion im Stamm CSS.L4.O.L2.L1 reduziert wird, was gleichzeitig zu einer erhöhten TAPS-Produktion führen sollte. Zu diesem Zweck wurde der *PcSYR2*⁻¹⁷⁷⁻¹ Promotor-Bereich durch das bereits erfolgreich verwendete *PcTDH3*⁻⁴²⁰⁻¹ Promotor-Fragment im Stamm CSS.L4.O.L2.L1 ersetzt. Der daraus resultierende Stamm CSS.L4.O.L2.L1.S2 produzierte mit $12 \text{ mg} * \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ nur noch rund 26 % an TriASa verglichen zum Ausgangsstamm CSS.L4.O.L2.L1, was impliziert, dass *PcSYR2* überexprimiert wurde und die Aktivität von PcSyr2 limitierend in der TAPS-Produktion war. Erwartungsgemäß kam es im Stamm CSS.L4.O.L2.L1.S2 zu einer weiter optimierten TAPS-Produktion von $199 \text{ mg} * \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ (**Abb. 20**).

Die Deletion von *PcFEN1* im Stamm CSS.L4.O.L2.L1.S2 führte zu einer verschlechterten TAPS-Produktion von etwa $140 \text{ mg} * \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ und ging mit einer verringerten Wachstumsrate einher (Stamm CSS.L4.O.L2.L1.S2.F1; nicht gezeigt). Ein Deletion von *PcSUR4* oder *PcDPL1* im Stamm CSS.L4.LO.L2.L1.S2 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

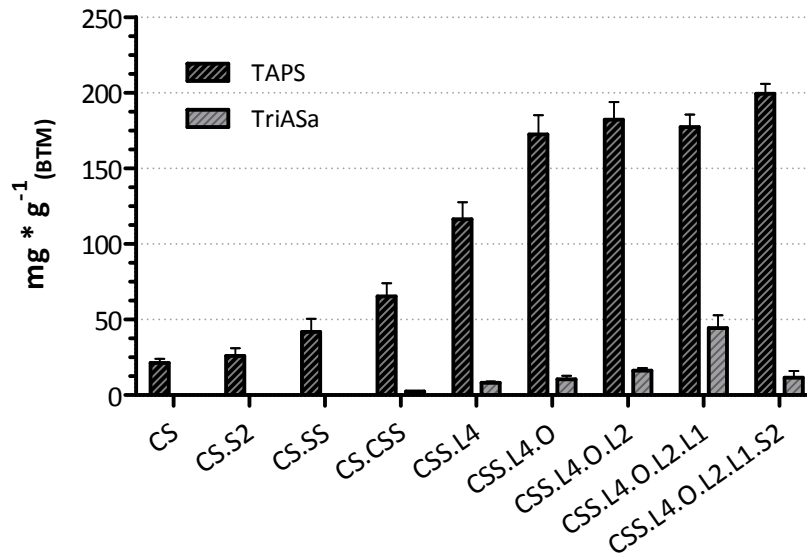


Abb. 20: TAPS-Produktion von *P. ciferrii* Stämmen, die in dieser Arbeit durch rationale Stammentwicklung sukzessive für eine optimierte TAPS-Produktion konstruiert wurden. Ausgehend vom *lig4Δ* Stamm CS wurden acht genetische Modifikationen nacheinander übertragen (für Details s. Text). Die Stämme sind in chronologischer Reihenfolge in Bezug auf deren Konstruktion dargestellt (von links nach rechts). TriASa-Titer < 2 mg * g_(BTM)⁻¹ sind nicht gezeigt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwertes (n ≥ 3).

Charakterisierung des Hochleistungs-TAPS-Produzenten CSS.L4.O.L2.L1.S2:

Da im finalen TAPS-Produktions-Stamm CSS.L4.O.L2.L1.S2 im Vergleich zum Ausgangs-Stamm CS (und CS.CSS) eine etwas verringerte Wachstumsrate erkennbar war (nicht gezeigt), wurden Fermentationen mit den Stämmen CS und CSS.L4.O.L2.L1.S2 durchgeführt und deren maximale spezifische Produktbildungsrate (q_{pmax}) ermittelt. Als Medium wurde hierfür TAPS⁺-Medium verwendet, da die Zugabe von 0,1 mM Natrium-Formiat keinen Einfluss auf die relativen TAPS-Produktionen [mg * g⁻¹_(BTM)] von beiden Stämmen hatte, die Fermentationszeit vom Stamm CSS.L4.O.L2.L1.S2 jedoch in TAPS⁺-Medium (wie bereits für den Stamm CS.CSS gezeigt) signifikant verkürzt werden konnte (nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Fermentationen sind in **Abb. 21** dargestellt. Der Stamm CSS.L4.O.L2.L1.S2 wies mit $0,16 (\pm 0,1) * h^{-1}$ eine etwa zweifach verringerte maximale Wachstumsrate (μ_{max}) im Vergleich zum Stamm CS mit $0,29 (\pm 0,2) * h^{-1}$ auf. In beiden Stämmen wurde q_{pmax} während der exponentiellen Wachstumsphase erreicht, in der der Stamm CS maximal $1,58 (\pm 0,18) mg_{(TAPS)} * OD_{600nm}^{-1} * h^{-1}$ produzierte und dabei einen TAPS-Titer von $284 mg * L^{-1}$ erreichte. Der Stamm CSS.L4.O.L2.L1.S2 hingegen wies mit

8,42 (\pm 0,74) $\text{mg}_{(\text{TAPS})} * \text{OD}_{600\text{nm}}^{-1} * \text{h}^{-1}$ eine mehr als fünffach verbesserte q_{Pmax} auf und produzierte bis zu $2 \text{ g}_{(\text{TAPS})} * \text{L}^{-1}$, was in Bezug auf den TAPS-Titer eine Optimierung um etwa den Faktor sieben darstellte.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die TAPS-Produktion in *P. ciferrii* durch rationale Stammentwicklung in hohem Maße optimiert werden konnte. Dies führte zu einem Stamm (CSS.L4.O.L2.L1.S2), der für die biotechnologische TAPS-Produktion im industriellen Maßstab eingesetzt werden könnte.

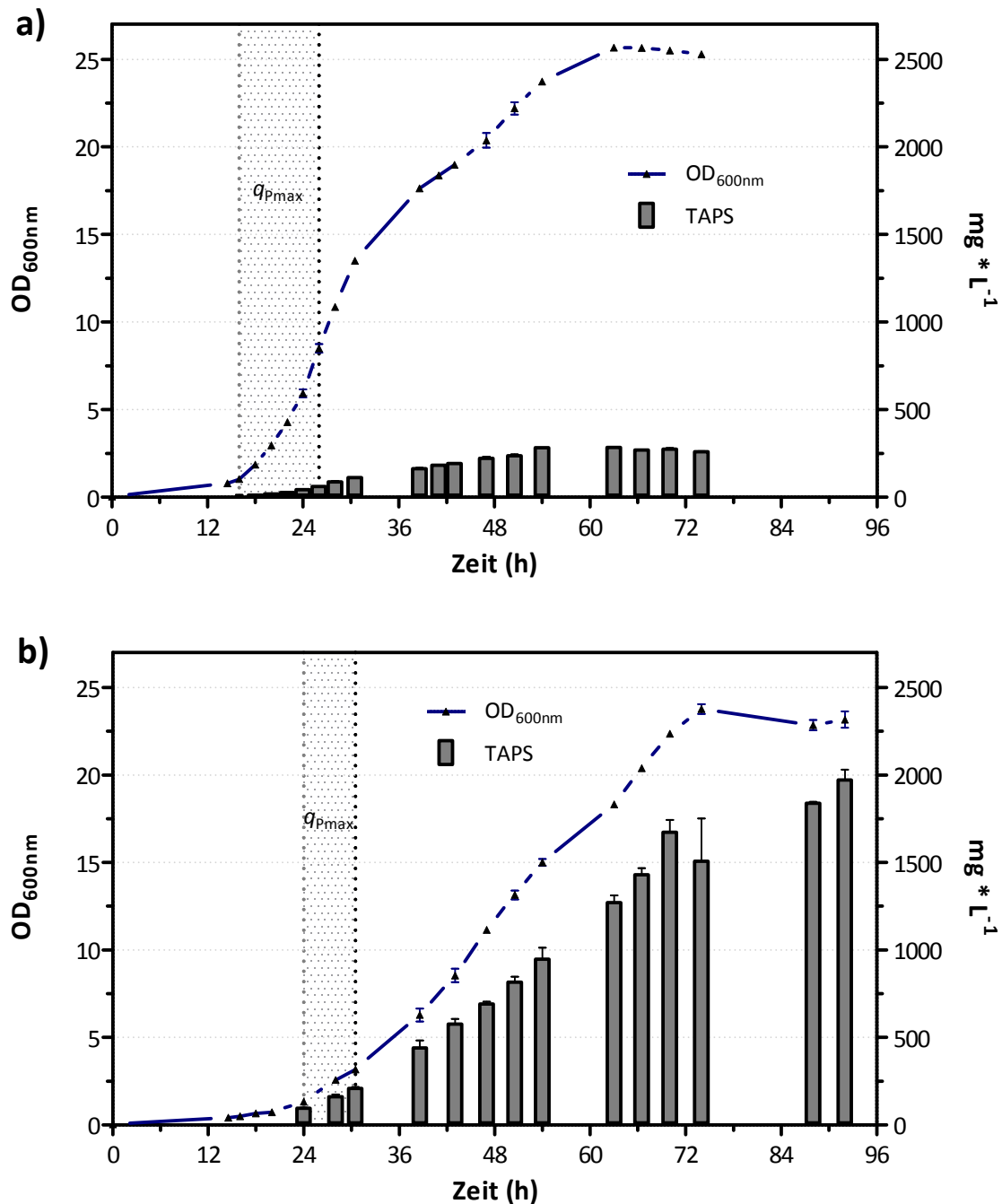


Abb. 21: Wachstumsverhalten und TAPS-Bildungskinetiken der Stämme CS **(a)** und CSS.L4.O.L2.L1.S2 **(b)** in TAPS⁺-Medium bei 30° C. Die grau unterlegten Bereiche illustrieren die Phase, in der die spezifischen Produktbildungsraten maximal waren (q_{Pmax}). Fehlerbalken repräsentieren den Bereich der Schwankung um den Mittelwert ($n = 2$). **a)** Der Stamm CS produzierte maximal $1,58 (\pm 0,18) \text{ mg}_{(TAPS)} * \text{OD}_{600\text{nm}}^{-1} * \text{h}^{-1}$ und erreichte einen TAPS-Titer von $284 \text{ mg} * \text{L}^{-1}$. Die maximale TriASa-Produktion betrug etwa $12 \text{ mg} * \text{L}^{-1}$ (nicht gezeigt). **b)** Der Stamm CSS.L4.O.L2.L1.S2 produzierte maximal $8,42 (\pm 0,74) \text{ mg}_{(TAPS)} * \text{OD}_{600\text{nm}}^{-1} * \text{h}^{-1}$ und erreichte einen TAPS-Titer von bis zu $2 \text{ g} * \text{L}^{-1}$. Die TAPS-Produktion schien nach 72 h abzufallen, was jedoch wahrscheinlich durch eine Kristallisation von TAPS-Molekülen an der Schüttelkolben-Innenwand bedingt war und eine Resuspendierung bei der Probenahme erschwerte. Die maximale TriASa-Produktion betrug etwa $65 \text{ mg} * \text{L}^{-1}$ (nicht gezeigt).

3.3 Optimierung der TriASa-Produktion

Sphinganin (SA) ist in der Sphingoidbasen-Biosynthese der direkte Vorläufer von PHS (s. 1.2.1) und liegt in *P. ciferrii* hauptsächlich als Tri-Acetyl-SA (TriASa) vor, wobei TriASa im *P. ciferrii* Wildtyp nur etwa 1 - 5 % der acetylierten Sphingoidbasen ausmacht. Die Umwandlung von SA in PHS erfolgt durch die PcSyr2-vermittelte Hydroxylierung von SA am C4-Atom (vgl. **Abb. 26**). In *P. ciferrii* konnte bereits gezeigt werden, dass in einem *syr2Δ* Stamm anstelle von PHS erhöhte Mengen an SA gebildet wurden (BAE *et al.*, 2004). Ausgehend von einem für die LCB- bzw. TAPS-Produktion optimierten Stamm sollte daher in dieser Arbeit durch Deletion von *PcSYR2* die PHS-Synthese unterbunden werden und zu einer optimierten SA- bzw. TriASa-Produktion führen.

PcSYR2 wurde zunächst im Stamm CS deletiert und resultierte in einem Stamm (CS.SYR2), der etwa $48 \text{ mg}_{(\text{TriASa})} * \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ produzierte. In der Fermentationsbrühe dieses Stammes waren keine messbaren Mengen an TAPS detektierbar. Zu erwähnen ist, dass der Stamm CS.SYR2 im Vergleich zum Stamm CS rund ein Drittel weniger Biotrockenmasse (BTM) bildete. Die Deletion von *PcLCB4* im Stamm CS.SYR2 führte mit etwa $43 \text{ mg}_{(\text{TriASa})} * \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ wider Erwarten nicht zu einer erhöhten TriASa-Produktion (Stamm CS.SYR2.L4). Eine Analyse der (C₁₈)LCB-Ps ergab, dass im Stamm CS.SYR2.L4 mit etwa $40 \text{ pmol} * \text{mg}^{-1}_{(\text{Protein})}$ ca. 17-mal weniger SA-1P nachweisbar war als im Ausgangsstamm (freundlicherweise durchgeführt von Gerhard Liebisch, Universität Regensburg). Die Deletion von *PcSYR2* wurde weiterhin im Stamm CS.CSS durchgeführt. Der daraus resultierende Stamm CSS.SYR2 produzierte rund $92 \text{ mg}_{(\text{TriASa})} * \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ und bildete im Vergleich zum Stamm CS nur noch etwa 50 % an BTM. Eine Deletion von *PcLCB4* im Stamm CSS.SYR2 brachte auch hier mit etwa $92 \text{ mg}_{(\text{TriASa})} * \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ keine Verbesserung der TriASa-Produktion mit sich (Stamm CSS.SYR2.L4).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde *PcSYR2* in einem in dieser Arbeit konstruierten und für die LCB-Biosynthese optimierten Stamm mit intakten *PcLCB4* Gen (CSS.L1.L2.O) deletiert. Der Stamm CSS.L1.L2.O wurde ausgehend vom Stamm CS.CSS (s. 3.2.1.1) konstruiert, indem zunächst der *PcLCB1*⁻¹⁸⁶⁻¹ Promotor-Bereich durch das *PcENO1*⁻⁵⁸⁴⁻¹ Promotor-Fragment ersetzt (Stamm CSS.L1) und anschließend die *PcLCB2*⁻¹¹³⁻¹ Promotor-Region durch das *PcTDH3*⁻⁴²⁰⁻¹ Promotor-Fragment ausgetauscht wurde (Stamm CSS.L1.L2). Schließlich wurde *PcORM12* im Stamm CSS.L1.L2 deletiert und resultierte im Stamm

CSS.L1.L2.O. Dieser Stamm produzierte etwa $93 \text{ mg}_{(\text{TAPS})} * \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ und bis zu $30 \text{ mg}_{(\text{TriASa})} * \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$. Nach Transformation des Stammes CSS.L1.L2.O mit dem *PcSYR2*-Deletions-Konstrukt konnten drei Transformanten erhalten werden, die alle sehr schlecht in TAPS- (und TAPS⁺-) Medium wuchsen bzw. nach 4 Tagen Kultivierung nur etwa eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 1 - 2 erreichten und dabei maximal $35 \text{ mg}_{(\text{TriASa})} * \text{L}^{-1}$ produzierten (Stämme CSS.L1.L2.O.SYR2 1-3). Der Ausgangsstamm CSS.L1.L2.O hingegen erreichte in Fermentationen eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von etwa 23.

Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass eine erhöhte SA-Produktion (bedingt durch eine *PcSYR2*-Deletion) hemmend auf das Wachstum von *P. ciferrii* wirkt. Weitere Ansätze einer rationalen Stammentwicklung in Bezug auf eine optimierte TriASa-Produktion erschienen daher als kaum realisierbar und wurden nicht weiter verfolgt.

3.4 Optimierung der TriASo-Produktion

Die industrielle Synthese der Sphingoidbase Sphingosin über fermentative Prozesse mit *P. ciferrii* ist aktuell aufgrund einer niedrigen Produktions-Effizienz und hoher Nebenprodukt-Bildung (TriASa) enorm kosten-intensiv und aufwändig im Vergleich zur Synthese von PHS. Sphingosin (SPH) wird daher *in vitro* bzw. chemisch aus der Sphingoidbase PHS gewonnen. Ein optimierter biotechnologischer Herstellungs-Prozess von SPH bzw. Tri-Acetyl-SPH (TriASo) ist von großem Interesse. Dabei sollte SPH in möglichst reiner Form (ohne Nebenprodukte) gebildet werden können. Durch *metabolic engineering* konnten zwar schon *P. ciferrii* Stämme konstruiert werden die hohe Mengen an TriASo produzieren (BÖRGEL, 2007; BÖRGEL *et al.*, nicht publiziert), jedoch existiert bislang noch kein Stamm, mit dem eine biotechnologische Produktion von SPH (bzw. TriASo) wirtschaftlich rentabel wäre. Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Optimierung der TriASo-Produktion in *P. ciferrii*.

3.4.1 Konstruktion eines Sphingosin-produzierenden *P. ciferrii* Stammes

Der *P. ciferrii* Wildtyp Stamm PCWT ist nicht in der Lage signifikante Mengen an SPH bzw. TriASo zu produzieren. Das genetische Repertoire für die Synthese von SPH besitzt *P. ciferrii* allerdings und konnte bereits weitestgehend charakterisiert werden (BÖRGEL, 2007;

BÖRGEL *et al.*, nicht publiziert). Es handelt sich dabei um folgende Gene, die für die Synthese von SPH aus SA nötig sind: *PcLAG1* bzw. *PcLAF1* [Ceramidsynthasen (inklusive *PcLIP1*)], *PcDES1* (Dihydroceramid $\Delta 4$ -Desaturase) und *PcYXC1* (Ceramidase) (s. 1.3.1). Es stellte sich jedoch heraus, dass deren Aktivitäten offenbar zu gering für eine effiziente TriASo-Produktion waren und dass die kombinierte Überexpression von *oCvLAG1* (für *P. ciferrii* codon-optimiertes Ceramidsynthase Gen aus dem *Coccolithovirus* EhV-86), *PcDES1* sowie von *omCer1* (für *P. ciferrii* codon-optimiertes Ceramidase Gen aus *Mus musculus*) ein besseres Resultat hinsichtlich einer effektiven TriASo-Produktion lieferte (BÖRGEL, 2007). Ein Plasmid mit diesen drei Genen (jeweils unter Kontrolle des *PcTDH3* Promotors) lag zu Beginn der Arbeit vor (p-So-22; s. **Abb. A 4**; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von EVONIK Degussa GmbH). Das Plasmid p-So-22 trägt weiterhin das *PcURA3* Gen als Auxotrophie-Marker und zwei Fragmente des *PcSYR2* Gens, wodurch nach Linearisierung mit *XbaI* (p-So-22_{*XbaI*}) eine *pop-in* Integration über homologe Rekombination in den *PcSYR2* Locus ermöglicht werden sollte. Um einen TriASo-produzierenden Stamm in dieser Arbeit zu erzeugen, wurde p-So-22_{*XbaI*} in den Stamm WT 2.1 (*ura3 Δ syr2 Δ*) transformiert. Dieser Stamm besitzt das *PcLIG4* Wildtyp Allel, wodurch die Integration von p-So-22_{*XbaI*} höchst wahrscheinlich ektopisch stattfinden sollte. Es wurden 30 uracil-prototrophe Transformanten erhalten und mittels RP-HPLC auf TriASo- bzw. TriASa-Produktion untersucht. Von den 30 Transformanten produzierten 20 zusätzlich zu TriASa signifikante Mengen an TriASo (nicht gezeigt). Einer der TriASo-produzierenden Klone (CS-So-125) wurde für weitere Arbeiten ausgewählt. Um die Produktion von TriASo rational auf genetischer Ebene zu optimieren, war es erforderlich in diesem Stamm das *PcLIG4* Gen zu deletieren. Die Deletion von *PcLIG4* wurde analog zum Stamm PCWT durchgeführt (s. 3.1.1.2 - 3.1.1.4), wobei ein Transformant mit *lig4 Δ ::loxP* Genotyp erhalten wurde. Dieser Stamm (125 Δ +) produzierte $15,7 (\pm 3,3) \text{ mg}_{(\text{TriASo})} * \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ und $9,4 (\pm 2,7) \text{ mg}_{(\text{TriASa})} * \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ und diente als Ausgangsstamm für die folgenden *proof of principle* Experimente.

3.4.1.1 Optimierung der TriASo-Produktion im Stamm 125Δ+

Wie bereits erwähnt wird im Zuge der SPH-Biosynthese dieses ausgehend von SA in drei Schritten synthetisiert (s. 1.3.1). Die dabei entstehenden Intermediate Dihydroceramid und Ceramid sind möglicherweise limitierend in der SPH-Biosynthese. Daher wurde im Folgenden u.a. versucht den Stoffwechsel dieser Sphingolipide zu minimieren, wodurch der metabolische Fluss hin zu SPH verstärkt werden sollte. Des Weiteren wurde versucht Gene zu identifizieren, die am Sphingolipid-Metabolismus von *P. ciferrii* beteiligt sind und deren jeweilige Deletion oder Überexpression einen positiven Effekt auf die TriASo-Produktion haben könnte. Zunächst wurden genetische Modifikationen zu Testzwecken im Stamm 125Δ+ durchgeführt, die anschließend auf einen Stamm übertragen werden sollten, der einen bereits optimierten LCB-Biosyntheseweg aufweist (s. 3.2.3).

Im Laufe dieser Arbeit stellte sich heraus, dass im Stamm 125Δ+, neben etwa 150 mg_(TriASo) * L⁻¹ und 107 mg_(TriASa) * L⁻¹, signifikante Mengen an Tri-Acetyl-Sphingadienin (TriASd) von schätzungsweise 12 mg * L⁻¹ nachweisbar waren (BÖRGEL *et al.*, nicht publiziert). Diese Nebenprodukt-Bildung ist während industriellen TriASo-Produktionen unerwünscht. Ein putatives *PcSLD1*, was vermutlich für die Δ⁸-Desaturierung von Ceramid-gebundenem SPH zu Sphingadienin verantwortlich ist, wurde bereits 2007 identifiziert (BÖRGEL, 2007). Das daraus abgeleitete **PcSld1** besitzt mit 597 AS 57 % Identität (71 % Homologie) zu der kürzlich charakterisierten Δ⁸-Desaturase aus *C. albicans* (OURA & KAJIWARA, 2008). Durch Deletion von *PcSLD1* im Stamm 125Δ+ sollte dessen TriASd-Produktion unterbunden werden und möglicherweise zu einer erhöhten TriASo-Produktion führen. Die Deletion von *PcSLD1* führte jedoch zu keiner signifikanten Veränderungen der TriASo- und TriASa-Produktion (Stamm 125Δ+ +ΔD8D; nicht gezeigt). In diesem Stamm war allerdings kein TriASd mehr detektierbar, was klar auf eine *PcSLD1*-abhängige Sphingolipid Δ⁸-Desaturase-Aktivität in *P. ciferrii* hindeutete. Die Inaktivierung von *PcSLD1* ist somit ein wichtiger Schritt für eine TriASo-Produktion mit reduzierter Nebenprodukt-Bildung in *P. ciferrii* (BÖRGEL *et al.*, nicht publiziert).

Ceramide können in Hefen am Fettsäurerest α -hydroxyliert werden, eine Reaktion die von der Sphingolipid Alpha-Hydroxylase **Scs7** unter aeroben Bedingungen katalysiert wird (HAAK *et al.*, 1997; DUNN *et al.*, 1998). Möglicherweise werden α -hydroxylierte Ceramide in *P. ciferrii* schlechter von PcDes1 und / oder omCer1 als Substrat erkannt, wodurch letztlich weniger SPH zur Synthese von TriASo zur Verfügung stünde, was einer Limitierung in der TriASo-Produktion gleich käme. Der Effekt einer SCS7-Deletion sollte diesbezüglich im Stamm 125 Δ + untersucht werden.

In *P. ciferrii* konnte das korrespondierende Gen *PcSCS7* isoliert werden, dessen abgeleitete AS-Sequenz mit 378 AS 62 % Identität (76 % Homologie) zu Scs7 aus *S. cerevisiae* zeigte. Um den Effekt einer Deletion von *PcSCS7* zu untersuchen, wurde dieses im Stamm 125 Δ + deletiert und die TriASa- bzw. TriASo-Produktion mittels RP-HPLC analysiert. Wie in **Abb. 22** zu erkennen ist, waren im Stamm 125 Δ +SCS7 keine signifikanten Veränderungen der TriASo-Produktion erkennbar. Im Vergleich zum Ausgangstamm waren jedoch mehr als vierfach verringerte TriASa-Mengen nachweisbar, womit gezeigt werden konnte, dass durch Deletion von *PcSCS7* Das Verhältnis von TriASo zu TriASa stark erhöht werden konnte. Welche Rolle *PcSCS7* dabei spielt ist unklar. Allerdings ist der Effekt eines *scs7 Δ* Genotyps für einen *P. ciferrii* Stamm, der in industriellem Maßstab für die Produktion von TriASo eingesetzt werden soll, von enormem Vorteil, da eine Nebenproduktion von TriASa (wie bereits erwähnt) unerwünscht ist.

Von der alkalischen Ceramidase der Maus (hier: omCer1) ist bekannt, dass diese exklusiv SPH-basierte Ceramide hydrolysiert (MAO *et al.*, 2003). Über die Substrat-Spezifität der Ceramidase von *P. ciferrii* (**PcYxc1**) ist nichts bekannt. Möglicherweise hydrolysiert PcYxc1 neben Ceramid auch Dihydroceramid, was für eine TriASo-Produktion kontraproduktiv wäre. Die Deletion von *PcYXC1* war daher ein Ansatz dieses potentielle Problem zu umgehen. Interessanterweise konnten zwei identische Allele von *PcYXC1* im Genom von *P. ciferrii* identifiziert werden. Deren abgeleitete 284 AS lange Sequenz wies 48% Identität (69 % Homologie) zu ScYdc1 und 47 % Homologie (65 % Homologie) zu ScYpc1 auf. Zunächst wurde ein *PcYXC1* Allel im Stamm 125 Δ + deletiert und resultierte im Stamm 125 Δ +YXC1. Dieser Stamm zeigte mit etwa $14 \text{ mg}_{(\text{TriASo})} \cdot \text{L}^{-1}$ und $8 \text{ mg}_{(\text{TriASa})} \cdot \text{L}^{-1}$ eine leicht

verschlechterte Produktion von TriASo und TriASa (**Abb. 22**). Die Deletion des zweiten *PcYXC1* Allels führte mit rund $12 \text{ mg}_{(\text{TriASo})} * \text{L}^{-1}$ und $4 \text{ mg}_{(\text{TriASa})} * \text{L}^{-1}$ zu einem weiteren Rückgang der TriASo- und TriASa-Produktion (Stamm 125Δ+YXC1.2). Die Inaktivierung der *PcYXC1* Allele erwies sich somit in Bezug auf die TriASo-Produktion als kontraproduktiv.

Eine Deletion von *SCH9* führt in *S. cerevisiae* zur Akkumulation von Sphingoidbasen (DE SNIJDER *et al.*, 2010). Die Protein-Kinase **Sch9** gehört zur AGC-Kinase-Familie und dessen Aktivität kann in Abhängigkeit von Sphingoidbasen (*in vitro*) moduliert werden (LIU *et al.*, 2005; URBAN *et al.*, 2007). Sch9 selbst ist an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt, wie Osmo- und Hitze-Stress, Zell-Alterung, oder *nutrient sensing* (CRAUWELS *et al.*, 1997; FABRIZIO *et al.*, 2001; KAEBERLEIN, 2010). Die genauen Funktionen von Sch9 dabei sind jedoch nicht bekannt. Die Suche nach einem Homolog in *P. ciferrii* ergab ein putatives Gen (*PcSCH9*) mit einer abgeleiteten Sequenz von 755 AS, welche 56 % Identität (70 % Homologie) zu ScSch9 aufwies. Die Deletion von *PcSCH9* wurde im Stamm 125Δ+ durchgeführt. Wie in **Abb. 22** ersichtlich, führte dies zu einem Stamm (125Δ+SCH9), der mit etwa $19 \text{ mg} * \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ eine fast 20 %ige Verbesserung der TriASo-Produktion zeigte. Gleichzeitig kam es zu einem Anstieg der TriASa-Produktion von 9,4 auf etwa $14 \text{ mg} * \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$. Offenbar ist *PcSCH9* am Sphingolipid-Metabolismus von *P. ciferrii* beteiligt, wobei eine regulatorische Funktion der putativen Kinase PcSch9 denkbar wäre.

P. ciferrii ist wie viele andere Hefen auch (jedoch im Gegensatz zu *S. cerevisiae*) in der Lage Glukosyl-Ceramide zu synthetisieren (KAUFMAN *et al.*, 1971). Das korrespondierende putative Gen (*PcGCS1*), welches für eine Glukosyl-Ceramid-Transferase codiert und wahrscheinlich für die Synthese von Glukosyl-Ceramid aus Ceramid verantwortlich ist, konnte bereits *in silico* identifiziert werden (BÖRGEL, 2007). **PcGcs1** besitzt 52 % Identität (66 % Homologie) zur Glukosyl-Ceramid-Transferase aus *Pichia pastoris*. Die Deletion von *PcGCS1* wurde im Stamm 125Δ+ durchgeführt, hatte jedoch keinen erkennbaren Effekt auf TriASo- und TriASa-Produktion (Stamm 125Δ+GCS1; nicht gezeigt).

In *S. cerevisiae* werden Ceramide von der IPC Synthase **Aur1** zu IPCs umgewandelt. IPCs sind relativ komplexe Sphingolipide und essentiell für *S. cerevisiae* (CERANTOLA *et al.*,

2009). Möglicherweise sind IPCs in *P. ciferrii* nicht essentiell, weshalb eine Deletion des korrespondierenden Homologs zu einer höheren Verfügbarkeit an Ceramiden und somit zu einer gesteigerten TriASo-Produktion führen könnte. Ein putatives 444 AS langes PcAur1 mit 50 % Identität (65 % Homologie) zu ScAur1 konnte identifiziert werden. Nach mehrmaliger Transformation des Stammes 125Δ+ mit dem *PcAUR1*-Deletions-Konstrukt konnten keine Transformanten erhalten werden, was darauf hindeutete, dass *PcAUR1* für eine essentielle IPC Synthase in *P. ciferrii* codiert.

Da Dihydroceramid oder (und) Ceramid als Substrat(e) limitierend in der SPH-Biosynthese von *P. ciferrii* sein könnte(n), wurde versucht dessen (deren) Synthese über den *salvage pathway* zu erhöhen. In diesem denkbaren Weg werden Ceramide aus komplexeren Sphingolipiden durch Hydrolyse freigesetzt. In *S. cerevisiae* wird dieser Schritt von der mitochondrialen Inositol Phosphosphingolipid Phospholipase C **Isc1** katalysiert (SAWAI *et al.*, 2000). ScIsc1 ist dabei in der Lage SPH-haltige Ceramide wie Sphingomyelin (die in *S. cerevisiae* nicht vorkommen) als Substrat zu erkennen (SAWAI *et al.*, 2000). Ein putatives homologes Gen zu *ISC1* aus *S. cerevisiae* konnte im Genom von *P. ciferrii* identifiziert werden (*PcISC1*). Das putative PcIsc1 wies mit 438 AS 58 % Identität (72 % Homologie) zu ScIsc1 auf. Eine *in silico* Analyse ergab keine vorhersagbare mitochondriale Lokalisation von PcIsc1. Angestrebt wurde zunächst die Überexpression von *PcISC1* im Stamm 125Δ+. Dazu wurde der endogene *PcISC1*⁻¹⁴⁰⁻¹ Promotor-Bereich durch das *PcTDH3*⁻⁴²⁰⁻¹ Promotor-Fragment ersetzt. Der daraus resultierende Stamm 125Δ+ISC1oe zeigte keine erkennbaren Veränderungen der TriASo- und TriASa-Produktion (nicht gezeigt). Eine Quantifizierung der *PcISC1* mRNA mittels qRT-PCR wurde aus Zeitgründen nicht durchgeführt, weshalb unklar ist, ob es zu einer erhöhten Expression von *PcISC1* im Stamm 125Δ+ISC1oe kam. Des Weiteren ist nicht bekannt, ob im Stamm 125Δ+ISC1oe (wie erwartet) erhöhte Ceramid-Mengen vorlagen. Eine Deletion von *PcISC1* im Stamm 125Δ+ hatte ebenfalls keinen Effekt in Bezug auf die TriASo- bzw. TriASa-Produktion (Stamm 125Δ+ISC1; nicht gezeigt). Ob es sich bei PcIsc1 um das funktionelle Homolog zu ScIsc1 handelt bleibt somit offen.

ERGEBNISSE

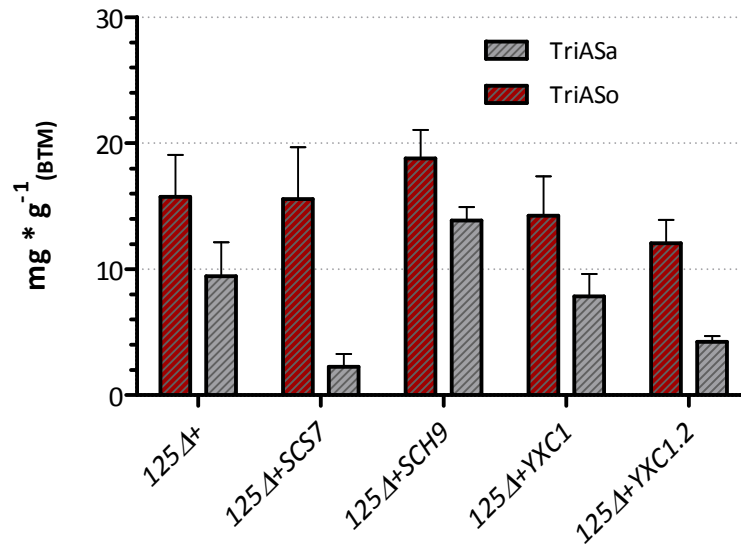


Abb. 22: TriASo- und TriASa-Produktion von in dieser Arbeit konstruierten *P. ciferrii* Stämmen mit optimierter TriASo-Produktion. Die Probennahme erfolgte während der frühen stationären Wachstumsphase der jeweiligen Stämme. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwertes ($n \geq 3$).

Zusammenfassend konnten drei Gene (*PcSLD1*, *PcSCS7* & *PcSCH9*) identifiziert werden, deren jeweilige Deletion einen positiven Effekt auf die TriASo-Produktion hatte. Die Deletion dieser Gene wurde daher in einen Stamm mit optimiertem LCB- bzw. TriASo-Biosyntheseweg angestrebt. Dazu wurde ausgehend vom Stamm CSS.L4.O.L1.L2 (s. 3.2.3) und CSS.L1.L2.O (s. 3.3) zunächst *PcURA3* deletiert. Die so erhaltenen Uracil-auxotrophen Stämme CSS.L4.O.L1.L2.U und CSS.L1.L2.O.U sollten anschließend jeweils mit einer *omCer1*-, *PcDES1*- und *oCvLAG1*-tragenden Expressionskassette (mit *PcURA3*-Marker) transformiert werden, die bei gerichteter Integration *PcSYR2* deletieren sollte. Dadurch sollte aus den optimierten TAPS-Produktionsstämmen Stämme mit optimierter TriASo-Produktion generiert werden. Zunächst wurde jedoch ein geeignetes Plasmid für diesen Zweck konstruiert.

3.4.2 Konstruktion eines alternativen Plasmids zur TriASo-Produktion

Das für diese Arbeit von EVONIK Degussa GmbH bereitgestellte Plasmid p-So-22 trägt die Gene *oCvLAG1*, *omCer1* und *PcDES1*, jeweils unter Kontrolle des *PcTDH3*-Promotors und des *PcENO1*-Terminators (vgl. **Abb. A 4**). Die repetitiven Promotor- und Terminator-Elemente sind dabei als direkte Wiederholungen (*direct repeats*) angeordnet. Dadurch ist eine genomische Instabilität des integrierten Plasmids denkbar, da durch homologe Rekombination der repetitiven DNA-Elemente untereinander, dies zum Verlust der Sequenz (bzw. eines oder mehrerer Gene) zwischen jenen DNA-Elementen führen würde. Aus diesem Grund wurde angestrebt ein Plasmid zu konstruieren bei dem ein Verlust der drei oben genannten Gene (über homologe Rekombination) nicht möglich sein sollte. Ein weiterer möglicher Nachteil des Plasmids p-So-22_{XbaI} besteht darin, dass es sich um ein *pop-in* Konstrukt handelt. Über *pop-in* integrierte Konstrukte gelten als genomisch instabil, da ohne Selektion auf das integrierte Plasmid ein *pop-out* und somit ein Verlust des Plasmids durch homologe Rekombination denkbar ist. Des Weiteren kann es nach Transformationen mit *pop-in* Plasmiden zu genomischen *tandem repeats* des integrierten Plasmids kommen, die ebenfalls als instabil anzusehen sind (ROTHSTEIN, 1991). Daher sollte die Expressionskassette so konstruiert werden, dass eine Integration über ein doppeltes *cross over* erfolgen sollte, wodurch im Genom höchst wahrscheinlich eine Kopie der Expressionskassette vorläge. Dessen genomische Stabilität sollte nach Transformation in den Stamm CS.U (*lig4Δ ura3Δ::opt.nat1*) analysiert werden. Da die kombinierte Überexpression der Gene *omCer1*, *PcDES1* und *oCvLAG1* Voraussetzung für eine effiziente TriASo-Produktion in *P. ciferrii* ist (BÖRGEL, 2007), sollte diese als Indikator für die genomische Stabilität der Expressionskassette fungieren. So war angedacht die TriASo- (und TriASa-) Produktion von erhaltenen Transformanten während einer 60 tägigen Dauerkulturführung zu analysieren.

Für die Konstruktion des Expressionskassetten-tragenden Plasmids wurden die Gene *omCer1*, *PcDES1* und *oCvLAG1* ausgehend vom Plasmid p-So-22, sowie die Promotor- und Terminator-Fragmente aus genomischer DNA mittels PCR amplifiziert. Über *in vivo* Rekombination wurden die Gene dabei unter Kontrolle der in **Abb. 23** dargestellten Promotor- und Terminator-Fragmente in den mit *SacI* und *NgoMIV* linearisierten Vektor p426HXT7-6HIS kloniert. Die *PcTDH3* Promotor- und *PcENO1* Terminator- Fragmente

wurden dabei in gegenläufiger Orientierung angeordnet, wodurch es bei einer homologen Rekombination (nach genomischer Integration) zu einer Inversion und nicht zum Verlust von DNA käme. Zusätzlich wurden an die Enden der Expressionskassette jeweils etwa 500 bps des *PcSYR2* Promotor- bzw. Terminator-Bereichs angefügt, was die gewünschte Integration der Expressionskassette in den *PcSYR2* Lokus (über ein doppeltes *cross over*) ermöglichen sollte. Analog zu dem so konstruierten Plasmid pCS.426.So.V wurde als Kontrolle für den Stabilitätstest ein Plasmid über *in vivo* Rekombination konstruiert (p-So-22.II; s. **Abb. 23**), welches die Expressionskassette von p-So-22 trägt. Im Gegensatz zu der von p-So-22 wurde die Expressionskassette in p-So-22.II von etwa 500 bps des *PcSYR2* Promotor- bzw. Terminator-Bereichs flankiert und sollte daher ebenfalls nach Transformation durch doppeltes *cross over* integrieren, *PcSYR2* deletieren und als einfache Kopie im Genom vorliegen.

Die so konstruierten Plasmide pCS.426.So.V und p-So-22.II wurden jeweils nach Linearisierung mit *XbaI* in den in dieser Arbeit generierten *P. ciferrii* Stamm CS.U transformiert. Ausgehend von pCS.426.So.V_{*XbaI*} wurden zwei Transformanten (CS.So.V.1 und CS.So.V.2) mit korrekt integrierter Expressionskassette (und daher deletiertem *PcSYR2* Gen) erhalten. Nach Transformation des Stammes CS.U mit p-So-22.II_{*XbaI*} wurden ebenfalls zwei positive Transformanten erhalten (CS.So.II.1 und CS.So.II.2). Mit diesen vier Transformanten wurden die Stabilitätstests bzw. Dauerkulturführungen in TAPS-Medium über einen Zeitraum von 60 Tagen durchgeführt. Dabei wurden die Stämme sequentiell (alle zwei bzw. drei Tage) in frisches Medium überführt (bzw. etwa 1 : 10.000 verdünnt). Parallel wurden Proben für BTM- (bzw. OD_{600nm}-) Bestimmungen und RP-HPLC-Analysen genommen. Die Ergebnisse der Dauerkulturführungen sind in **Abb. 24** dargestellt. In Bezug auf die TriASo-Produktion verhielten sich alle Stämme in etwa gleich und zeigten weder Verbesserungen noch Verschlechterungen im getesteten Zeitraum. Je nach Wachstumsphase produzierten die Stämme zwischen ca. 10 (spätes exponentielles Wachstum) und ca. 30 (frühe stationäre Phase) mg_(TriASo) * g⁻¹_(BTM). Es konnten demnach keine Rückschlüsse auf unterschiedliche genomische Stabilitäten der Expressionskassetten gezogen werden. Alle vier Stämme schienen die Gene *omCer1*, *PcDES1* und *oCvLAG1* stabil zu exprimieren.

In Bezug auf die TriASa-Produktion lässt sich erkennen, dass diese sich in den Stämmen CS.So.II.1 und CS.So.II.2 (tragen jeweils die p-So-22.II Expressionskassette) kontinuierlich von über 20 auf unter $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ verschlechterte, wodurch sich das Verhältnis von TriASo zu TriASa allmählich verbesserte und nach ca. 40 Tagen mehr TriASo als TriASa produziert wurde. Die Stämme mit den Expressionskassetten des Plasmids pCS.426.So.V hingegen (CS.So.V.1 und CS.So.V.2) wiesen von Beginn an niedrigere TriASa- als TriASo-Werte auf, die im Stamm CS.So.V.1 nie höher als $4 \text{ mg}_{(\text{TriASa})} \cdot \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ waren und im Stamm CS.So.V.2 von Anfangs rund $15 \text{ mg}_{(\text{TriASa})} \cdot \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ innerhalb der ersten 20 Tage auf knapp unter $10 \text{ mg}_{(\text{TriASa})} \cdot \text{g}^{-1}_{(\text{BTM})}$ abfielen.

Wie bereits erwähnt lassen sich keine Rückschlüsse in Bezug auf Unterschiede in der genomischen Stabilität der jeweiligen Expressionskassetten ziehen. Die Ergebnisse zeigen allerdings, dass die Verwendung von pCS.426.So.V_{XbaI} gegenüber p-So-22.II_{XbaI} von Vorteil ist, da damit Stämme konstruiert werden konnten (CS.So.V.1 und CS.So.V.2), die bessere TriASo : TriASa Verhältnisse aufwiesen. Für die Konstruktion eines optimierten TriASo-Produzenten wurde daher im Folgenden für Transformationen pCS.426.So.V_{XbaI} verwendet.

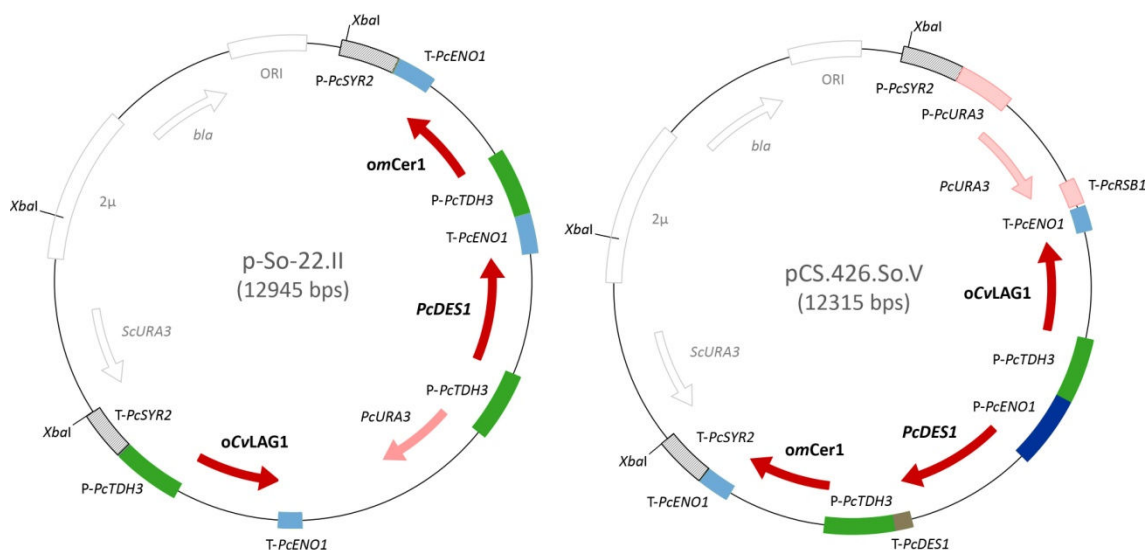


Abb. 23: Vergleich der Plasmide p-So-22.II und pCS.426.So.V. Durch die Wahl und Orientierung der Promotor- ($PcTDH3^{-420-1}$ / $PcENO1^{-584-1}$) und Terminator-Fragmente ($PcDES1$ / $PcENO1$) sollte ein möglicher Verlust der Gene *omCer1*, *PcDES1* und / oder *oCvLAG1* (über homologe Rekombination) verhindert werden. Ausgangsvektor für beide Plasmide war p426HXT7-6HIS. T-: Terminator; P-: Promotor.

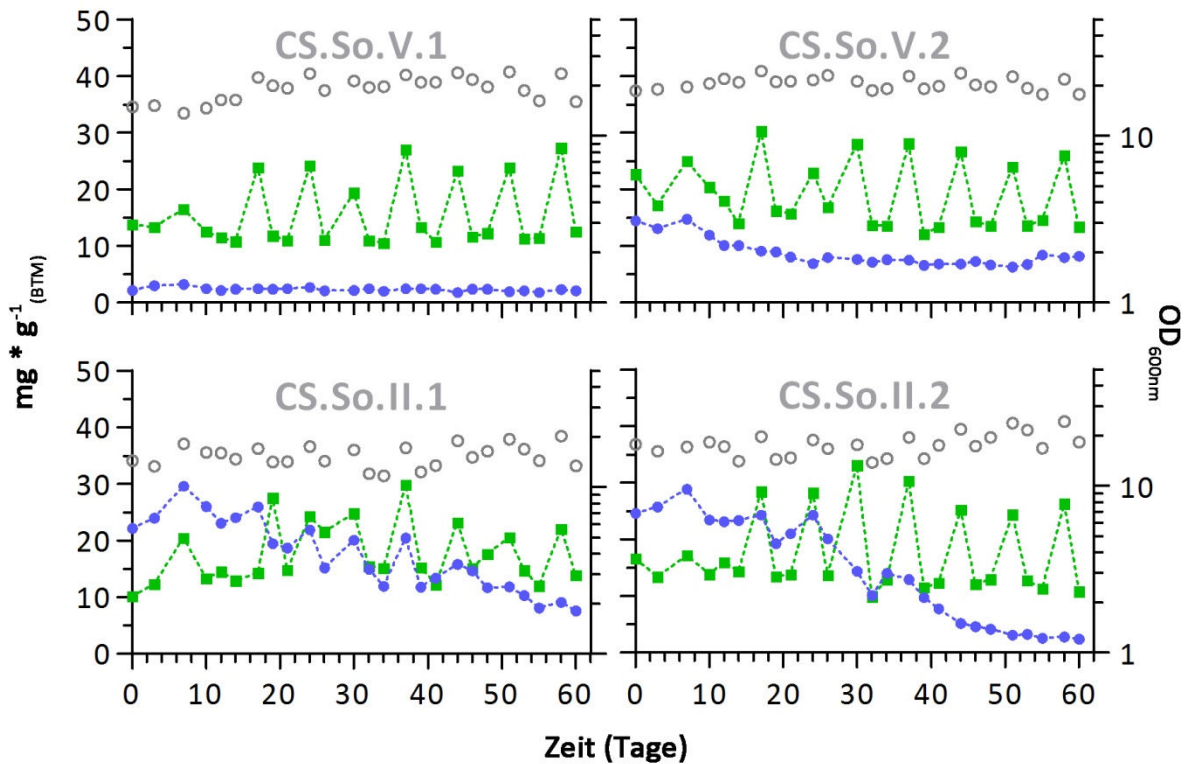


Abb. 24: Dauerkulturführungen von Stämmen mit integriertem $p\text{-So-22.II}_{Xbal}$ (Stämme CS.So.II.1 & CS.So.II.2) bzw. $p\text{CS.426.So.V}_{Xbal}$ (Stämme CS.So.V.1 & CS.So.V.2) in TAPS-Medium. Gezeigt sind die TriASo- (■) und TriASa- (●) Produktionen sowie die OD_{600nm} (○).

3.4.2.1 Transformation eines für die LCB-Biosynthese optimierten Stammes mit $p\text{CS.426.So.V}_{Xbal}$

Um aus einem in dieser Arbeit konstruierten Stamm mit optimierter LCB-Biosynthese einen für industrielle Einsätze kompatiblen Stamm für die Produktion von TriASo zu erzeugen, sollten die TAPS-Produktions-Stämme CSS.L4.O.L1.L2.U und CSS.L1.L2.O.U (s. 3.4.1.1) nach Transformation mit $p\text{CS.426.So.V}_{Xbal}$ hohe Mengen an TriASo (und vermutlich auch TriASa) produzieren. Ferner sollte die Deletion der Gene *PcSLD1*, *PcSCS7* und *PcSCH9* anschließend zu einer weiteren Verbesserung der TriASo-Produktion beitragen.

Die Stämme CSS.L1.L2.O.U und CSS.L4.O.L2.L1.U wurden jeweils mit bis zu 200 μg an $p\text{CS.426.So.V}_{Xbal}$ transformiert, was allerdings nach mehreren Versuchen nicht zum Erhalt von Transformanten auf SCD Ura⁻ Medium führte. Dies lässt vermuten, dass stark erhöhte

Sphingosin- oder TriASo-Mengen (wie vermutlich auch Sphinganin / TriASa) toxisch für *P. ciferrii* sind und eine Optimierung der TriASo-Produktion somit enorm erschwert wird.

3.4.3 Suche nach Wachstumsvorteilen eines TriASo-Produzenten mittels *Phenotype MicroArray*[™] Analyse

Bei einem *Phenotype MicroArray*[™] der Firma Biolog wird der Metabolismus von zwei ausgewählten Stämmen unter bestimmten Wachstumsbedingungen verglichen (BOCHNER, 2009). Biolog bietet hierzu Vergleiche mit über 2000 Wachstumsbedingungen an. Darunter sind etwa 800 Tests mit diversen C-, N-, S- oder P-Quellen als variablen Medienbestandteilen. Etwa 100 Tests variieren in diversen osmotisch aktiven Substanzen. Weitere 100 Tests werden bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt und etwa 1000 Tests beinhalten die Supplementierung mit chemischen Substanzen, die in verschiedene biologische Stoffwechselwege intervenieren. Alle Tests werden dabei zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein *P. ciferrii* Stamm, der in der Lage ist signifikante Mengen an TriASo zu bilden (aufgrund der Überexpression der Gene *omCer1*, *PcDES1* und *oCvLAG1*), mit einem Stamm verglichen werden, der dazu nicht in der Lage ist bzw. signifikante Mengen an TriASa produziert. Falls eine Substanz oder Bedingung den Metabolismus des TriASo-Produzenten stimuliert, kann man auf einen damit einhergehenden Wachstumsvorteil rückschließen, der durch die Produktion signifikanter Mengen TriASo begründbar wäre. Der Wachstumsvorteil des TriASo-Produzenten sollte anschließend genutzt werden, um durch *evolutionary engineering* dessen TriASo-Produktion weiter zu optimieren. Die TriASo-Produktivität wäre in diesem Szenario limitierend für das Wachstum. Beim *evolutionary engineering* würde durch Dauerkulturführung unter Wachstums-limitierenden Bedingungen auf Mutationen selektiert, die diese Limitierung aufheben oder umgehen bzw. eine TriASo-Produktion begünstigen.

Für die *Phenotype MicroArray*[™] Analyse wurden die Stämme WT 2.1 und CS-So-125 verwendet. Der Stamm CS-So-125 unterschied sich vom Stamm WT 2.1 durch Tragen des ektopisch integrierten Plasmids p-So-22 (s. **Abb. A 4**). Da der Integrationsort des Plasmides im Stamm CS-So-125 nicht bekannt war, könnte ein ermittelter Phänotyp durch

die Folgen der Integration im Genom und nicht durch die Expression der auf dem Plasmid befindlichen Gene begründet sein. Zudem war der Stamm WT 2.1 im Gegensatz zum Stamm CS-So-125 Uracil-auxotroph, wodurch ebenfalls falsch-positive Phänotypen erkannt werden konnten. Im Folgenden wurde daher der Stamm WT 2.1 mit dem *PcURA3* Gen (inkl. 461 bps Promotor- und 437 bps Terminator-Sequenz) transformiert und so ein Uracil-prototropher Stamm (WT 2.1.U) konstruiert. Da es als äußerst unwahrscheinlich zu erachten ist, dass der Integrationsort des transformierten *PcURA3* Konstrukts im Stamm WT 2.1.U dem des Plasmids p-So-22 im Stamm CS-So-125 entsprach, war der Stamm WT 2.1.U eine geeignete Kontrolle für Reproduktionsexperimente unter Wachstumsbedingungen mit mutmaßlichem Wachstumsphänotyp.

Insgesamt wurden vier Substanzen mit reproduzierbarem Phänotyp von Biolog ermittelt: N-Acetyl-L-Cystein ($100 \mu\text{M}$), Guanidin-Hydrochlorid ($2 \text{ mg} * \text{ml}^{-1}$), Kalium-Iodid ($15 \text{ mg} * \text{ml}^{-1}$) und Magnesium-Chlorid (30 und $50 \text{ mg} * \text{ml}^{-1}$). Mit jeweils diesen vier Substanzen wurden Wachstumstests in synthetischem Minimalmedium mit 2 % Glukose und 1 mM Uracil (SMD Ura⁺) mit den Stämmen WT 2.1, CS-So-125 und WT 2.1.U durchgeführt. Die verwendete Medienkomposition von Biolog ist geheim, jedoch sei SMD Ura⁺-Medium für Reproduktionsanalysen geeignet (persönliche Mitteilung, Michael Ziman, Biolog, Inc.). In Bezug auf N-Acetyl-L-Cystein konnte ein starker Wachstumsvorteil vom Stamm CS-So-125 gegenüber WT 2.1 festgestellt werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass dieser Phänotyp wahrscheinlich durch die Uracil-Prototrophie des Stammes CS-So-125 bedingt war, da gegenüber dem Stamm WT 2.1.U dieser Wachstumsvorteil nicht zu erkennen war (nicht gezeigt). Mit den restlichen drei Substanzen konnten keine signifikanten Veränderungen des Wachstumsverhaltens unter den drei Stämmen festgestellt werden (nicht gezeigt). Es konnten somit keine Wachstumsbedingungen für ein *evolutionary engineering* gefunden werden.

3.5 Suche nach putativen Transportern von acetylierten LCBs in *P. ciferrii*

Über die Art des Exports der acetylierten Sphingoidbasen ist bislang nichts bekannt. Bekannt ist jedoch, dass die Sphingoidbasen vor der Sekretion ins extrazelluläre Medium N- und O-acetyliert werden (BARENHOLZ & GATT, 1969), was wahrscheinlich eine Voraussetzung für die Sekretion ist. Vermutlich wird der Export der acetylierten Sphingoidbasen über membranständige Transportproteine vermittelt. In *S. cerevisiae* gibt es fünf Lipid-Translokator- bzw. -Export-Proteine, die zur Rta1-Superfamilie gehören (MANENTE & GHISLAIN, 2009). Zu dieser Superfamilie gehört beispielsweise auch Rsb1, ein Membranprotein, das am Export von Sphingoidbasen beteiligt ist (KIYAMA & IGARASHI, 2002). In *P. ciferrii* konnten in dieser Arbeit fünf Rta1-ähnliche putative Proteine *in silico* identifiziert werden (s. **Tab. 3**), deren korrespondierende Gene jeweils im Stamm 125Δ+ deletiert wurden. Für *PcRTA2* konnte kein Deletions-Konstrukt erstellt werden. Stattdessen wurde *PcRTA2* disruptiert. Da *PcRTA4* und *PcRTA44* auf Genom-Ebene direkt nebeneinander liegen, wurden beide auf einmal deletiert. Von *PcRTM1* existieren zwei Allele im Genom von *P. ciferrii*, die beide nacheinander deletiert wurden. Falls nun eines dieser Gene am Export von acetylierten Sphingoidbasen beteiligt sein sollte, wären im korrespondierenden Deletions- (Disruptions-) Stamm erwartungsgemäß keine bzw. reduzierte Mengen an TriASo- und / oder TriASa im Überstand der Fermentationsbrühe detektierbar. Alle Deletions-Stämme, sowie der *PcRTA2*-Disruptions-Stamm, zeigten mit etwa $3 - 4 \text{ mg}_{(\text{TriASo})} * \text{mg}^{-1}_{(\text{BTM})}$ und ca. $3 \text{ mg}_{(\text{TriASa})} * \text{mg}^{-1}_{(\text{BTM})}$ im Überstand keine signifikanten Veränderungen zum Ausgangsstamm 125Δ+ (s. **Abb. A 5**). In Bezug auf die Gesamt-TriASo- und -TriASa-Mengen waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede erkennbar.

Sofern der Export von TriASo bzw. TriASa über nur einen membranständigen Transporter erfolgt, lässt sich anhand der Ergebnisse rückschließen, dass keines der hier identifizierten putativen Gene am Export von TriASo und TriASa beteiligt ist. Somit bleibt weiterhin offen wie acetylierte LCBs von *P. ciferrii* ins extrazelluläre Medium gelangen.

<i>P. ciferrii</i>	TMHs	<i>S. cerevisiae</i> / Identität / Homologie / AS
PcRta1	7	Rtm1 / 34 % / 53 % / 345
PcRta2	5	Pug1 / 35 % / 58 % / 257
PcRta4	6	Rsb1 / 44 % / 63 % / 445
PcRta44	7	Rsb1 / 40 % / 57 % / 480
PcRtm1	7	Rtm1 / 34 % / 50 % / 293

Tab. 3: Putative Sphingolipid-Transporter in *P. ciferrii*, sowie deren nächsten homologen Proteine aus *S. cerevisiae*. AS: Aminosäuren; TMHs: Anzahl der putativen Transmembran-Helices der Proteine aus *P. ciferrii*.

3.6 Suche nach potentiellen LCB-Acetyl-Transferase-Genen

Wie bereits erwähnt besitzt *P. ciferrii* die einzigartige Eigenschaft LCBs an der Aminogruppe und den Hydroxylgruppen zu acetylieren. Die Acetyl-CoA-abhängige Acetylierung der Sphingoidbasen konnte erstmals 1969 anhand von Mikrosomen-Präparationen von *P. ciferrii* demonstriert werden (BARENHOLZ & GATT, 1969). Die korrespondierende(n) LCB- Acetyl-Transferase(n) konnte(n) bislang jedoch nicht identifiziert werden, was ein Ziel der vorliegenden Arbeit war. Zu diesem Zweck wurde, in Zusammenarbeit mit Karina Brinkrolf (CeBiTec, Universität Bielefeld), das Genom von *P. ciferrii* nach putativen Acetyl-Transferase-Genen unter Berücksichtigung der automatisch annotierten EC-Nummern 2.3.x.x (\triangleq Acyl-Transferasen) durchsucht. Verwendet wurde dazu das Genom-Annotations-System GenDB v2.4 (MEYER *et al.*, 2003). Insgesamt konnten 79 Kandidaten mit putativer Acetyl- bzw. Acyl-Transferase-Aktivität bestimmt werden (nicht gezeigt). Da zu Beginn der Arbeit davon ausgegangen wurde, dass es sich bei der bzw. den gesuchten Transferasen vermutlich um im ER lokalisierte und membranständige Proteine handelt, wurde die Auswahl auf Kandidaten mit mindestens einer vorhergesagten Transmembran-Domäne eingeschränkt. So wurden 20 putative Acetyl-Transferasen mit wenigstens einer Transmembran-Domäne identifiziert und für die weiteren Arbeiten herangezogen (s. **Tab. A 7**). Um zu überprüfen, ob die korrespondierenden Gene für LCB-Acetyl-Transferasen codieren, sollten diese im Stamm CS disruptiert bzw. deletiert und anschließend die Produktion acetylierter LCBs via RP-

HPLC überprüft werden. Auf die Konstruktion der Gen-Disruptions- und -Deletionskassetten sei hier verwiesen an 2.7.3.

Insgesamt konnten jeweils 18 der 20 Kandidaten-Gene im Stamm CS inaktiviert werden. Bei *Pc_5428* stellte sich heraus, dass zwei genomische Allele vorhanden waren, die beide deletiert wurden. Alle 18 Disruptions- bzw. -Deletions-Mutanten produzierten nach wie vor TAPS (die Kultivierung erfolgte in TAPS-Medium mit $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ clonNAT; nicht gezeigt). Für *Pc_3959* konnte keine Deletionskassette und kein Disruptions-Plasmid konstruiert werden und der Versuch *Pc_3915* zu deletieren scheiterte am Erhalt von Transformanten (auf YEPD-Medium). Die Deletion des zu *Pc_3915* homologen Gens in *S. cerevisiae* (*GWT1*: Inositol-Acyl-Transferase) wird als letal beschrieben (UMEMURA *et al.*, 2003), weshalb anzunehmen ist, dass die Deletion von *Pc_3915* in *P. ciferrii* ebenfalls letal ist.

3.6.1 Identifizierung zweier putativer LCB-Acetyl-Transferasen

Während dieser Arbeit wurde von EVONIK Degussa GmbH eine vergleichende Proteom-Analyse zwischen zwei *P. ciferrii* Stämmen in Auftrag gegeben. Diese beiden Stämme unterschieden sich dahingehend, dass der eine Stamm (aufgrund unbekannter Mutationen) keine acetylierten Sphingoidbasen bzw. kein TAPS produzierte, wohingegen der Referenzstamm (PCWT) dazu in der Lage war. In der Analyse stellte sich heraus, dass in dem „Nicht-Produzenten“ zwei der 79 *in silico* identifizierten putativen LCB-Acetyl-Transferasen (s. 3.6; *Pc_6217* und *Pc_8053*) auf Protein-Ebene nicht nachweisbar waren. Diese Gene waren somit ebenfalls vielversprechende Kandidaten für die gesuchten LCB-Acetyl-Transferasen in *P. ciferrii* und sollten im Stamm CS deletiert werden. Die abgeleitete Aminosäure-Sequenz von *Pc_6217* besitzt 29 % Identität (49 % Homologie) zu **Sli1** aus *S. cerevisiae*, einer wahrscheinlich im ER befindlichen N-Acetyl-Transferase, die das Sphingoidbasen-Analog Myriocin (**Abb. A 6**) N-acetylieren kann. Myriocin ist ein potenter Inhibitor der SPT, dessen inhibierende Wirkung durch Sli1 (bzw. N-Acetylierung) stark verringert wird (MOMOI *et al.*, 2004). Die abgeleitete Aminosäure-Sequenz von *Pc_8053* besitzt 26 % Identität (48 % Homologie) zur vermutlich im ER lokalisierten Alkohol-Acetyl-Transferase **Atf2** aus *S. cerevisiae*. Atf2 weist ein großes Substrat-Spektrum auf und acetyliert Alkohole (wie Ethanol, Isoamylalkohol, Propanol,

Isobutanol, etc.) und den Steroidhormon-Vorläufer Pregnenolon (VERSTREPEN *et al.*, 2003; TIWARI *et al.*, 2007). Beide putativen Enzyme schienen daher vielversprechende Kandidaten für die gesuchten LCB-Acetyl-Transferasen in *P. ciferrii* zu sein.

Die Deletion von *Pc_6217* (*PcATF2*) resultierte in einem Stamm (*CS.atf2*), bei dem kein TAPS in den Fermentationsproben mittels RP-HPLC detektierbar war. Stattdessen war eine hydrophobere Substanz bei ca. 3,94 min Retentionszeit messbar [**Abb. A 7 a**]. Eine nähere Analyse mittels LC-MS/MS ergab, dass es sich dabei höchst wahrscheinlich um dreifach acetyliertes PHS (TriAPS) mit acetylierter Aminogruppe und demnach einer freien Hydroxylgruppe handelte (persönliche Mitteilung Frank ter Veld, Ruhr-Universität Bochum). Analog zu *PcATF2* wurde *Pc_8053* (*PcSLI1*) im Stamm CS deletiert und der daraus resultierende Stamm *CS.sli1* auf die Produktion von acetylierten Sphingoidbasen hin untersucht. Wie in **Abb. A 7 b**) zu erkennen ist produzierte dieser Stamm weder TAPS noch andere messbare Acetyl-Derivate von PHS, wie es sich auch in einer LC-MS/MS-Analyse zeigte.

Für eine nähere Charakterisierung von *PcATF2* und *PcSLI1* wurde die heterologe Überexpression von beiden Genen in *S. cerevisiae* angestrebt. Zu diesem Zweck wurde *PcATF2* und *PcSLI1* jeweils in den 2 μ -Vektor p426HXT7-6HIS kloniert. Die daraus resultierenden Vektoren pCS.426.ATF2 und pCS.426.SLI1 trugen *PcATF2* bzw. *PcSLI1* unter Kontrolle des verkürzten *HXT7*³⁹²⁻¹ Promotor-Fragments und des *CYC1*-Terminators und sollten daher in *S. cerevisiae* konstitutiv überexprimiert werden. Nach Transformation des *S. cerevisiae* Stammes K26 mit dem Plasmid pCS.426.ATF2 bzw. pCS.426.SLI1 wurden Fermentationen von jeweils zwei Transformanten in TAPS-Medium durchgeführt. Die anschließende Analyse mittels RP-HPLC ergab allerdings keine nachweisbaren Mengen an acetylierten Sphingoidbasen bei allen vier Transformanten. Per LC-MS/MS-Analyse konnten jedoch bei den pCS.426.SLI1-tragenden Transformanten etwa 1,5 mg_(TriAPS) * L⁻¹ nachgewiesen werden, wohingegen die pCS.426.ATF2-tragenden Transformanten, sowie der Kontrollstamm (K26 transformiert mit p426HXT7-6HIS) keine signifikanten Mengen an acetylierten Sphingoidbasen produzierten (nicht gezeigt).

Vermutlich handelt es sich bei *PcSli1* um eine LCB-Acetyl-Transferase, die PHS zu TriAPS acetylieren kann. Die Rolle von *PcAtf2* bleibt unklar. Möglicherweise acetyliert *PcAtf2* TriAPS zu TAPS.

Um das Substratspektrum der beiden putativen Acetyl-Transferasen näher zu untersuchen, wurden die Gene *PcATF2* und *PcSLI1* jeweils im Stamm 125Δ+ deletiert. Zur Erinnerung: der Stamm 125Δ+ synthetisiert kein PHS (TAPS) mehr und produziert signifikante Mengen an TriASo und TriASa. Sowohl die Deletion von *PcATF2* (Stamm 125Δ+*atf2*) als auch von *PcSLI1* (Stamm 125Δ+*sli1*) führte dazu, dass keine detektierbaren Mengen an TriASa in den jeweiligen Fermentationsbrühen mittel RP-HPLC nachweisbar waren (s. **Abb. 25**). Weiterhin produzierten beide Stämme mit etwa 5 mg * mg⁻¹_(BTM) stark reduzierte Mengen an TriASo. Dabei ist zu erwähnen, dass diese lediglich in der späten exponentiellen Wachstumsphase beider Stämme nachweisbar waren. In Fermentationsproben der frühen stationären Wachstumsphase war bei 125Δ+*atf2* und 125Δ+*sli1* TriASo kaum detektierbar (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zeigen, dass wahrscheinlich beide Enzyme, PcSli1 und PcAtf2, für die Synthese von TriASa aus SA benötigt werden, wobei deren genaue Rolle dabei unbekannt bleibt. In Bezug auf die Acetylierung von SPH ist eine überlappende Substratspezifität von beiden Acetyl-Transferasen denkbar, so dass sowohl PcAtf2 als auch PcSli1 in der Lage ist SPH zu TriASo zu acetylieren. Weshalb es zu einer Abnahme an TriASo in der frühen stationären Wachstumsphase kam ist unklar.

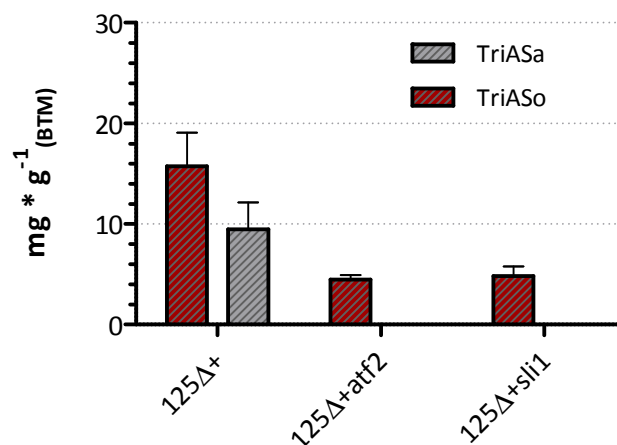


Abb. 25: Analyse von Fermentationsproben der Stämme 125Δ+, 125Δ+*atf2* und 125Δ+*sli1* mittels RP-HPLC. Von den Stämmen 125Δ+*atf2* und 125Δ+*sli1* sind nur die Analysen von Fermentationsproben der späten exponentiellen Phase gezeigt. Die Stämme 125Δ+*atf2* und 125Δ+*sli1* produzierten aufgrund der Deletion von *PcATF2* bzw. *PcSLI1* keine messbaren Mengen an TriASa und reduzierte Mengen an TriASo. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwertes (n ≥ 3).

4. DISKUSSION

4.1 Optimierung der genetischen Handhabbarkeit von *P. ciferrii*

In dieser Arbeit konnte durch Anwenden einer einfach durchzuführenden Transformations-Methode (SCHORSCH *et al.*, 2009) eine Transformationseffizienz von rund 300 - 350 Transformanden * $\mu\text{g}^{-1}_{(\text{DNA})}$ * kb^{-1} in *P. ciferrii* erzielt werden (der Begriff Transformation bezeichnet in diesem Zusammenhang das Ereignis der Aufnahme von DNA sowie die anschließende stabile genomische Integration). Zwar wurde in der Arbeit von (BAE *et al.*, 2003) eine Effizienz von etwa 1350 Transformanden * $\mu\text{g}^{-1}_{(\text{DNA})}$ beschrieben, jedoch ließ sich das (nach diesem Protokoll) in der vorliegenden Arbeit nicht annähernd erreichen. So ergab die hier etablierte Transformations-Methode eine um den Faktor 15 - 18 höhere Effizienz (nicht gezeigt). Zu erwähnen ist, dass bei Transformationen mit dem *opt.cre* Expressions-Plasmid pCS.opt.Cre (wurde im Zuge der Entfernung von clonNAT-Markerkassetten verwendet), dieses wahrscheinlich von mindestens einer aus 200 Zellen aufgenommen wurde, was sich anhand der relativen Häufigkeit an markerfreien Transformanten schlussfolgern lässt (s. 3.1.1.3). Daher lässt sich annehmen, dass die hier angewandte Transformationsmethode (in Bezug auf die Aufnahme von DNA) hoch-effizient war und lediglich das Ereignis einer stabilen Integration als sehr unwahrscheinlich in *P. ciferrii* anzusehen ist.

Durch Inaktivierung des *PcLIG4* Gens erhöhte sich die Genzerstörungseffizienz im *P. ciferrii* Stamm CS von 1 % auf 87 % (s. 3.1.1.5). Es kam demnach zu keiner vollständig gerichteten DNA-Integration über HR mit dem verwendeten *PcURA3*-Deletionskonstrukt. In *Neurospora crassa* z.B. führte die Inaktivierung der DNA Ligase IV zu einer Genzerstörungseffizienz von 100 % (ISHIBASHI *et al.*, 2006). Das Ergebnis des Transformationsversuches mit dem linearisierten Plasmid pCS.p-nat1 Δ IS_{PvuII} legt allerdings nahe, dass der NHEJ-Reparaturweg im Stamm CS komplett blockiert war (s. 3.1.1.5). Möglicherweise kam es bei den falsch-positiven 13 % der Transformanden zu einer NHEJ-unabhängigen Integration, die vermutlich sequenz-abhängig waren. Es ist dann

anzunehmen, dass diese durch Mechanismen wie *microhomology-mediated end joining* (MMEJ) oder *single-strand annealing* (SSA) vermittelt wurden. Beim MMEJ reichen wenige Basenpaare an Homologie für eine Integration aus, die wahrscheinlich unabhängig von der DNA Ligase IV stattfindet (SCHIELSTL *et al.*, 1993; KRAMER *et al.*, 1994; BOULTON & JACKSON, 1996b; MA *et al.*, 2003; LIANG *et al.*, 2008). SSA ist ebenfalls sequenzabhängig und beschränkt sich auf DNA-Doppelstrangbrüche, die zwischen sog. *direct repeats* auftreten [Review: (SYMINGTON, 2002)]. Die Tatsache, dass die *PcURA3*-Deletionskonstrukte in den falsch-positiven Transformanden per PCR nicht nachweisbar waren, legt die Vermutung nahe, dass die Enden der Konstrukte vor (oder während) der Integration durch Exonukleasen abgebaut wurden und somit kein Nachweis per PCR möglich war. Die Integrationsorte im Genom würden sich theoretisch mittels *genome walking* identifizieren lassen, was allerdings nicht Gegenstand dieser Arbeit war.

In *S. cerevisiae* wurde nach Inaktivierung des *LIG4* Gens eine gesteigerte HR-Frequenz beobachtet (ZHANG *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit wies der *P. ciferrii lig4Δ* Stamm CS eine Transformations-Effizienz auf, die etwa 100fach niedriger war als die des Wildtyps. Dies wurde in ähnlichem Ausmaß z.B. auch in einem NHEJ-defizienten *N. crassa* Stamm beobachtet (ISHIBASHI *et al.*, 2006). Die NHEJ-Inaktivierung führte demnach vermutlich nicht zu einer Erhöhung der HR-Effizienz, was implizieren würde, dass beide DSB-Reparaturwege (NHEJ und HR) in *P. ciferrii* co-existieren ohne miteinander zu konkurrieren.

Durch die Transformation mit dem linearisierten Disruptions-Plasmid pCS.ΔLIG4 konnte im Stamm PCWT eine Genzerstörungseffizienz von 4 - 5 % festgestellt werden, wohingegen mit dem *PcURA3*-Deletionskonstrukt nur eine von 1 % erreicht wurde. Der Unterschied in der Genzerstörungs-Effizienz ist wahrscheinlich durch die Art der verwendeten Konstrukte (*ends-in* vs. *ends-out*) bzw. durch die Orientierung der homologen Sequenzen während der Integration bzw. Rekombination bedingt. So resultiert eine Integration von *ends-in* Disruptions-Plasmiden (pCS.ΔLIG4) in einer einfachen *cross-over* Integration, die gegenüber einer doppelten *cross-over* Integration mit *ends-out* Konstrukten (*PcURA3*-Deletionskonstrukt) als effizienter beschrieben wird (HASTINGS *et al.*, 1993).

In anderen Hefen wurde durch Inaktivierung der Ku-Homologen (Ku70 / Ku80) der NHEJ-Reparaturweg blockiert und resultierte ebenfalls in einer gesteigerten Genzerstörungseffizienz (KOOISTRA *et al.*, 2004; NINOMIYA *et al.*, 2004; UENO *et al.*, 2007; MAASSEN *et al.*, 2008). Mittels degenerierter Primer war es zu Beginn dieser Arbeit nicht möglich die homologen Gene aus *P. ciferrii* zu isolieren. Im späteren Verlauf der Arbeit ließen sich jedoch *in silico* zwei putative Ku-Gene identifizieren (nicht gezeigt). Ku-Proteine sind neben dem NHEJ-Reparaturweg an der Telomer-Längen-Homöostase beteiligt (BOULTON & JACKSON, 1996a; STELLWAGEN *et al.*, 2003), wohingegen von der DNA Ligase IV keine pleiotropen Funktionen bekannt sind (DALEY *et al.*, 2005). Die Wahl der *PcLIG4*-Inaktivierung erschien daher ohnehin als vorteilhafter. Da während dieser Arbeit eine spontane Rekombination der verkürzten *PcLIG4* Allele im Stamm CS.PCΔPro beobachtet wurde, lässt sich (aufgrund der geringen erwarteten Wahrscheinlichkeit dieses Ereignisses) ein Wachstumsvorteil mit intaktem *PcLIG4* vermuten. Dieser Beobachtung zu Grunde liegend wurde das Wachstumsverhalten der Stämme CS und PCWT analysiert und festgestellt, dass der Stamm CS (unabhängig vom Medium) eine etwa 10 % niedrigere finale OD_{600nm} erreichte als der Ausgangsstamm PCWT (nicht gezeigt). Dieser Effekt wurde auch in einem anderen *lig4Δ* Stamm (125Δ+) beobachtet (nicht gezeigt). Eine Komplementation mit dem *PcLIG4* Gen im Stamm CS führte zwar zur Reaktivierung des NHEJ-Reparaturweges, das Wachstumsverhalten blieb jedoch überraschenderweise unverändert (nicht gezeigt). Demnach sind pleiotrope Effekte einer *PcLIG4*-Deletion möglich. Denkbar ist allerdings auch ein Effekt, der durch die im Genom vorhandene *loxP*-Sequenz (am *PcLIG4*-Lokus) bedingt sein könnte.

Test heterologer Plasmid-Systeme in *P. ciferrii*:

Die Tatsache, dass die in dieser Arbeit getesteten heterologen ARS-Sequenzen (*DoARS1*, *SsARS2*, *CjARS1*, *CjARS2*, *Sc2μ*) nicht zu einer autonomen Replikation im Stamm CS geführt haben, lässt den Schluss zu, dass diese nicht kompatibel mit *P. ciferrii* sind. Das 2μ Plasmid-System ist abhängig von Elementen *in cis* (AHN *et al.*, 1997) und beschränkt sich in der Natur (soweit bekannt) auf *Saccharomyces* Stämme, weshalb es als unwahrscheinlich erschien, dass das Plasmid pCS.2micron.nat in *P. ciferrii* repliziert. Mit dem Plasmid pJM6 (trägt *SsARS2*) konnten keine Transformanten bei der Positivkontrolle (*S. cerevisiae*

Stamm K26) erhalten werden, was im Widerspruch zu den Daten aus (YANG *et al.*, 1994) steht, wo *S. cerevisiae* mit pJM6 transformiert werden konnte.

ARSs sind Elemente *in cis*, die normalerweise für Initiierung der chromosomalen DNA-Replikation in Hefen benötigt werden (NEWLON, 1996; THEIS *et al.*, 1999). Das Auffinden von ARSs ist im Allgemeinen nicht einfach, da diese stark in der Sequenz sowie in der Komposition der funktionellen Elemente variieren (THEIS *et al.*, 1999). ARSs sind i.d.R. ca. 100 - 200 bps lang, sehr AT-reich und beinhalten eine relativ stark konservierte, etwa 11 bps lange (ebenfalls AT-reiche) ARS Konsensus-Sequenz (ACS), die essentiell für die Funktion der ARS ist (BROACH *et al.*, 1983; NEWLON & THEIS, 1993; YANG *et al.*, 1994; NEWLON & THEIS, 2002; IKUSHIMA *et al.*, 2009). Zwar gibt es die Möglichkeit ARSs vorherzusagen, jedoch beschränkt sich dies auf jene der Hefe *S. cerevisiae* (BREIER *et al.*, 2004). *In silico* konnten im Genom von *P. ciferrii* weit über tausend potentielle ACSs gefunden werden (nicht gezeigt), die allerdings nicht weiter untersucht wurden. Der ohnehin sehr hohe AT-Gehalt des *P. ciferrii* Genoms (etwa 70 %, nicht publiziert) erschwerte dabei die Suche nach potentiellen Kandidaten. Die Konstruktion einer *P. ciferrii* Genbank und die anschließende Transformation in *P. ciferrii* wäre eine denkbare Möglichkeit, um autonom replizierende Sequenzen zu isolieren [wie z.B. in (IKUSHIMA *et al.*, 2009) beschrieben], sowie ein *screening* von autonom replizierenden Sequenzen (ARSs) anderer verwandter Hefen, wie *P. guilliermondii* oder *K. lactis* (BORETSKY *et al.*, 1999; IRENE *et al.*, 2004).

Exkurs: Konstruktion einer Integrationskassette mit Auto-Markerentfernungsfunktion.

In dieser Arbeit wurden prinzipiell zwei Ansätze gewählt, eine integrative Kassette mit Auto-Markerentfernungsfunktion zu konstruieren (vgl. Abb. Ex. 1). Die für die *in vivo* Rekombination benötigten PCR-Fragmente wurden alle in hoch-reiner Form erhalten (wie sich mittels Gel-Elektrophorese herausstellte; nicht gezeigt) und der Erhalt von Transformanten auf Medium mit clonNAT deutete zunächst klar darauf hin, dass die *in vivo* Konstruktion erfolgreich ablief. PCR-Analysen mit der DNA von erhaltenen Hefe-Transformanten bestätigten stets ein Gemisch an scheinbar korrekt konstruierten Plasmiden und jenen, bei denen es bereits zur homologen Rekombination der *loxP* Sequenzen gekommen war (nicht gezeigt). Die aus *E. coli* re-isolierten Plasmide zeigten alle entweder ein Restriktionskartierungs-Muster, wie man es bei Plasmiden erwarten

würde, deren *loxP* Sequenzen bereits rekombinierten, oder es wurden sog. *loss of function* Mutationen in einer der beiden *loxP* Sequenzen (oder im *opt.cre* Gen) gefunden. 2 μ -basierte Plasmide liegen in hohen Kopienzahlen in einer Hefezelle vor (ROMANOS *et al.*, 1992). Der Versuch, durch höhere Konzentrationen an clonNAT (bis 800 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), die 2 μ -basierten Plasmide mit funktionellem *opt.nat1* anzureichern, führte (nach re-Isolation aus *E. coli*) allerdings ebenfalls nicht zum Erhalt von korrekten Plasmiden (nicht gezeigt). Es war unklar, ob die Rekombination der *loxP*-Sequenzen vornehmlich in Hefe, oder in *E. coli* stattfand. Theoretisch sollte In *E. coli* das *opt.cre* Gen nicht exprimiert werden, da sich stromaufwärts dieses Gens kein (bekannter) bakterieller Promotor befindet. Eine Cre-vermittelte Rekombination der *loxP*-Sequenzen in *E. coli* wurde daher als eher unwahrscheinlich erachtet.

Die Versuche der Konstruktionen mittels Centromer- (*ARS/CEN*-) Vektoren legen jedoch den Verdacht nahe, dass die Plasmide in *E. coli* nicht stabil waren. *ARS/CEN*-Vektoren liegen normalerweise mit einer Kopienzahl von 1 - 2 pro Zelle vor (CLARKE & CARBON, 1980; ROMANOS *et al.*, 1992), weshalb man unter (in dieser Arbeit) jeweils knapp 20 re-isolierten Plasmiden aus *E. coli* mindestens ein korrektes erwarten würde. Re-isoliert wurde allerdings kein einziges korrektes Plasmid. Vermutlich kam es daher in *E. coli* wider erwarten zur Expression des *opt.cre* Gens. Die Verwendung eines Tetrazyklin-resistenten *E. coli* Stammes, sowie die Supplementierung eines solchen Stammes mit Tetrazyklin (zur Inhibierung der *opt.cre* mRNA-Translation in *E. coli*) wurde aus zeitgründen nicht mehr durchgeführt. Möglicherweise aber wären auch andere Hefe-Promotoren zur Expression des *opt.cre* Gens vorteilhafter (da diese möglicherweise zur Expression des *opt.cre* Gens in *E. coli* beigetragen haben), oder die Klonierung von prokaryotischen Terminations-Elementen vor dessen ORF. Es ist somit anzunehmen, dass die Konstruktion der gewünschten Kassetten nach den in dieser Arbeit verfolgten Strategien nicht möglich war. Ein weiterer Ansatz war, die Integrationskassetten *in vitro* über *cross over* PCR zu konstruieren. Da sich jedoch die erhaltenen PCR-Produkte über *cross over* PCR nicht fusionieren ließen, war auch dieser Versuch ohne Erfolg (nicht gezeigt).

4.2 Optimierung der TAPS-Produktion durch *genetic engineering* des L-Serin-Metabolismus

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Deletion der Gene *PcSHM1*, *PcSHM2* und *PcCHA1* zu einem signifikanten Anstieg der relativen (und absoluten; nicht gezeigt) TAPS-Produktion führte (vgl. Abb. 15). Dies war ein erster Hinweis darauf, dass diese Gene am L-Serin-Katabolismus in *P. ciferrii* beteiligt sind und dass L-Serin limitierend in der Sphingoidbasen-Biosynthese sein könnte. Aufgrund der (laut Metabolit-Analyse) stark verringerten metabolischen L-Glycin-Mengen in den Stämmen CS.SS und CS.CSS (vgl. Tab. 2) kann man davon ausgehen, dass *PcSHM1* und *PcSHM2* für SHMT-Isoformen codieren. *PcCHA1* wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher charakterisiert. Ein Enzymtest (mit L-Serin) analog zu der in (ITO *et al.*, 2007) beschriebenen D-Serin-Messung wäre für eine nähere Charakterisierung von *PcCHA1* denkbar. Aufgrund der hohen Homologie zu *ScCHA1* und der gesteigerten TAPS-Produktion im Stamm CS.CSS (verglichen zum Stamm CS.SS) lässt sich jedoch annehmen, dass *PcCHA1* für eine L-Serin Deaminase codiert.

Die gesteigerten TAPS-Mengen in den Stämmen CS.SS und CS.CSS sowie die (laut Metabolit-Analyse) relativ konstanten metabolischen L-Serin-Mengen implizieren einen erniedrigten L-Serin-Katabolismus in diesen Stämmen. Somit lässt sich sagen, dass die Gene *PcSHM1*, *PcSHM2* und *PcCHA1* am L-Serin-Katabolismus in *P. ciferrii* beteiligt sind und dass durch deren kombinierte Deletion mehr L-Serin in die Sphingoidbasen-Biosynthese einfluss, wodurch die TAPS-Produktion in TAPS-Medium stark verbessert werden konnte.

L-Serin gilt unter fermentativen Bedingungen als Hauptquelle für 5,10-mTHF (SCHIRCH, 1982; ALBERS *et al.*, 2003). Der Versuch den durch die Deletion der Gene *PcSHM1* und *PcSHM2* bedingten Wachstumsnachteil in TAPS-Medium mit NaFo (0,05 - 10 mM) zu komplementieren war erfolgreich und zeigte, dass 5,10-mTHF wahrscheinlich limitierend für das Wachstum der SHMT-defizienten Stämme in TAPS-Medium war. Da die Stämme CS.SS und CS.CSS offenbar nicht L-Glycin-auxotroph waren, lässt sich postulieren, dass L-Glycin in *P. ciferrii* alternativ [wie in *S. cerevisiae* beschrieben (MONSCHAU *et al.*, 1997)] aus L-Threonin von der L-Threonin Aldolase Gly1 synthetisiert werden kann (ein putatives

PcGly1 wurde gefunden; nicht gezeigt). Die mit der NaFo-Supplementierung einhergehende graduelle Verschlechterung der TAPS-Produktion [mit 10 mM NaFo vergleichbar zum Stamm CS (und CS.C)] zeigte gleichzeitig, dass die 5,10-mTHF-Limitierung und / oder die reduzierte Wachstumsrate zur gesteigerten TAPS-Produktion beigetragen haben (s. 3.2.1.1). Die Rolle von 5,10-mTHF dabei ist unklar, spekulieren lässt sich eine Rolle bei der Kopplung von Zellwachstum und Sphingolipid-Anabolismus. Die Verwendung von TAPS-Medium mit 0,1 mM NaFo (TAPS⁺-Medium) erwies sich allerdings bei Fermentationen mit SHMT-defizienten Stämmen als vorteilhaft und trug ebenfalls zur Optimierung der TAPS-Produktion in *P. ciferrii* bei.

Ob es sich bei den putativen Genen *PcTRP5*, *PcCYS4* und *PcCHO1* um die jeweiligen Homologen aus *S. cerevisiae* handelt ist unklar. Ein positiver Effekt in Bezug auf die TAPS-Produktion (nach der jeweiligen Deletion im Stamm CS.CSS) konnte nicht festgestellt werden. Nach Deletion von *PcTRP5* war der korrespondierende Stamm CSS.TRP5 nicht in der Lage in TAPS-Medium zu wachsen, selbst wenn Tryptophan supplementiert wurde. Dieser Effekt lässt sich wahrscheinlich durch die hohen Ammonium-Konzentrationen im TAPS-Medium erklären. Ein hoher Ammonium-Gehalt führt in Hefen zur Inhibierung der Aminosäuren-Aufnahme (ROON *et al.*, 1975; TER SCHURE *et al.*, 2000). Eine Deletion von *TRP5* führt in *S. cerevisiae* ebenfalls zu einer Tryptophan-Auxotrophie (ZALKIN & YANOFSKY, 1982). Selbst wenn sich eine Tryptophan-Auxotrophie durch Gabe von Tryptophan aufheben ließe, wäre dies für die Übertragung auf einen industriell nutzbaren Stamm aus Kostengründen wahrscheinlich nicht wünschenswert.

Die Deletion von *PcCYS4* führte nicht zu einer wie in *S. cerevisiae* beschriebenen (ONO *et al.*, 1988) Cystein-Auxotrophie, was einen alternativen L-Cystein-Biosyntheseweg über L-Cystathionin in *P. ciferrii* impliziert, der im Stamm CSS.CYS4 vermutlich wachstums-limitierend war. Der Stamm CSS.CSY4 wies zwar einen leichten Anstieg der relativen TAPS-Produktion auf, jedoch ging dies mit einer Verschlechterung des Wachstumsverhaltens und einem unveränderten maximalen TAPS-Titer einher. Eine *PcCYS4*-Deletion war somit nicht vorteilhaft und wurde im weiteren Verlauf der Arbeit nicht zur Konstruktion eines Hochleistungs-TAPS-Produzenten herangezogen. Ob *PcCHO1* für eine PtdSer-Synthase codiert ist unklar, da eine Inaktivierung dieses Gens in Hefen zur

Auxotrophie von Cholin bzw. Ethanolamin führt (ATKINSON *et al.*, 1980), was in dieser Arbeit nicht beobachtet wurde. Cholin bzw. Ethanolamin können dann alternativ zur Synthese von Phosphatidyl-Cholin (und Phosphatidyl-Ethanolamin) herangezogen werden (VANCE & STEENBERGEN, 2005). Die Aktivität von Cho1 wird durch LCBs gehemmt (YAMASHITA & NIKAWA, 1997). Wie es sich dabei in *P. ciferrii* verhält ist nicht bekannt.

Interessanterweise führte die Aktivitäts-Herabsetzung der Phosphoglycerat-Mutase PcGpm1 im Stamm CSS.GPM1dr entgegen der Erwartung weder zu einer verbesserten TAPS-Produktion, noch zu einem erkennbaren Wachstumsnachteil (s. 3.2.1.2). Der glykolytische Fluss war demnach womöglich nicht stark genug reduziert, um einen erhöhten Fluss von 3-PG in die L-Serin-Biosynthese zu erlauben. Die Überexpression von *PcSER3* hatte diesbezüglich vermutlich ebenfalls keinen Effekt und brachte keine Veränderungen der TAPS-Produktion mit sich. Dabei ist unklar, ob es zu einer Überproduktion bzw. Steigerung der Aktivität von PcSer3 kam.

Die *de novo* L-Serin-Biosynthese gilt in Organismen wie *E. coli* (SUGIMOTO & PIZER, 1968; GRANT *et al.*, 1996), *C. glutamicum* (PETERS-WENDISCH *et al.*, 2002) und wahrscheinlich auch *S. cerevisiae* (ULANE & OGUR, 1972) als strikt autoreguliert. L-Serin wirkt dabei als allosterischer Inhibitor der PGDH, was bei hohen L-Serin-Mengen zu einer Endprodukt-Inhibierung des L-Serin-Biosyntheseweges führt. Möglicherweise ist dies in *P. ciferrii* ebenso der Fall. Dadurch wäre z.B. eine an die LCB-Biosynthese angepasste L-Serin-Produktion möglich, was erklären könnte weshalb keine merklichen Unterschiede an cytosolischem L-Serin in den Stämmen CS.SS und CS.CSS detektierbar waren (eine Analyse des metabolischen Flusses würde hier ein ergänzendes Experiment darstellen). In *S. cerevisiae* z.B. konnte gezeigt werden, dass durch eine erhöhte L-Serin-Aufnahme (unter Hitzestress-Bedingungen) die *de novo* LCB-Biosynthese angetrieben werden konnte (COWART & HANNUN, 2007). Gleichzeitig wurde demonstriert, dass dies ausschließlich durch die Aufnahme von exogen vorhandenem L-Serin bedingt war, da eine intrazelluläre Überproduktion aufgrund der *feed back* Inhibierung von L-Serin wahrscheinlich nicht möglich ist. Eine Erhöhung des intrazellulären L-Serin-Levels durch Überexpression von *PcSER3* oder Herabsetzung der PcGpm1-Aktivität (s. oben) wäre demnach wahrscheinlich nicht möglich.

Im Verlauf der Arbeit konnte *in silico* eine putative ACT-Domäne in PcSer3 gefunden werden, die in anderen PGDHs für die *feed back* Inhibierung durch L-Serin verantwortlich ist (CHIPMAN & SHAANAN, 2001; GRANT, 2006). Ein Versuch die mutmaßliche Regulation der *P. ciferrii* PGDH durch L-Serin zu umgehen war die Deletion der für die Regulation verantwortlichen putativen ACT-Domäne in PcSer3. In *C. glutamicum* war die Konstruktion eines L-Serin-insensitiven PGDH-Muteins ein wichtiger Schritt für eine L-Serin-Überproduktion (PETERS-WENDISCH *et al.*, 2002; PETERS-WENDISCH *et al.*, 2005) und von der PGDH aus *E. coli* konnte ebenfalls durch Entfernung der ACT-Domäne eine L-Serin-insensitive PGDH konstruiert werden (BELL *et al.*, 2002). Von der in dieser Arbeit verkürzten PGDH (PcSer3^{Δ83}) ließ sich leider keine spezifische Aktivität bestimmen. Die Ergebnisse der Fermentationen mit dem Stamm CSS.SER3Δ83 (s. 3.2.1.2) legen allerdings den Verdacht nahe, dass PcSer3^{Δ83} aktiv (wenn auch mit einer reduzierten Aktivität) und daher möglicherweise L-Serin-insensitiv war. Der Wachstums-Phänotyp ließ sich durch Supplementierung mit L-Serin (1, 5 und 10 mM) nicht komplementieren, was wahrscheinlich auf die bereits diskutierten hohen Ammonium-Konzentrationen in TAPS-Medium zurückzuführen ist. Da die PGDH-Aktivität höchstwahrscheinlich limitierend für das Wachstum (und evtl. für die TAPS-Produktion) dieses Stammes war, wäre die Selektion auf besseres Wachstum in synthetischem Medium mittels *evolutionary engineering* ein vielversprechendes Experiment diese Limitierung zu umgehen. Alternativ könnte man analog zur Arbeit von (PETERS-WENDISCH *et al.*, 2002) mehrere verkürzte PGDH-Varianten konstruieren und testen, sowie das dort konstruierte *serAΔ197* heterolog in *P. ciferrii* exprimieren. Eine dem vorangehende Codon-Optimierung wäre wahrscheinlich sinnvoll (BÖRGEL, 2007; BÖRGEL *et al.*, nicht publiziert).

In dieser Arbeit wurde eine Strategie entwickelt, in der der metabolische Fluss des *de novo* L-Serin-Biosyntheseweges durch *evolutionary engineering* verstärkt werden sollte. Dies sollte durch Blockierung bzw. Umlenken des glykolytischen Flusses in den L-Serin-Stoffwechsel realisiert werden (vgl. Abb. 18). Der zu diesem Zweck konstruierte Stamm CS.SS.Cs.G1 (*lig4Δ shm1Δ shm2Δ PcPGL1p:PcCHA1 gpm1Δ*) wuchs erwartungsgemäß sehr schlecht in den getesteten Medien, was klar darauf hindeutete, dass die Synthese von L-Pyruvat (und vermutlich von L-Serin) limitierend für das Wachstum war. Durch

evolutionary engineering wurde erhofft, aufgrund des Selektionsdruckes für besseres Wachstum, Mutationen zu evozieren, die beispielsweise die Aktivitäten von PcSer1, PcSer2 und / oder PcSer3 erhöhen. Gegenüber einer rationalen Stammentwicklung birgt der Ansatz des *evolutionary engineering* viele Vorteile [Review: (SAUER, 2001)] und kann leicht zur Überbrückung von sog. *bottlenecks* führen, die bis dato unbekannt bzw. unergründet sind. Möglicherweise z.B. werden die Gene des L-Serin-Stoffwechsels in *P. ciferrii* durch Ammonium herunter reguliert, wie es für *S. cerevisiae* diskutiert wird (MELCHER & ENTIAN, 1992; ALBERS *et al.*, 2003). Mittels *evolutionary engineering* könnte solch ein potentiell Problem leicht behoben werden. Andererseits könnten während einer Evolvierung Limitierungen außerhalb des L-Serin-Metabolismus aufgehoben werden, die dann zu einem besseren Wachstum beitragen könnten (diese Art von Mutationen sind i.d.R. nicht wünschenswert bzw. zielführend).

Der Stamm CS.SS.Cs.G1 wurde zunächst in YEPD evolviert, wodurch der daraus resultierende Stamm (CS.SS.Cs.G1e) um ein Vielfaches besser wuchs als der Ausgangsstamm. Überraschenderweise war dieser Stamm nach wie vor nicht in der Lage in synthetischem Medium (TAPS-Medium) zu wachsen. Möglicherweise ist in *P. ciferrii* die Verwertung von in YEP enthaltenen Nährstoffen (wie z.B. Aminosäuren) durch Glukose reprimiert. Im Laufe der Evolvierung könnte es zu Mutationen gekommen sein, die diese Glukose-vermittelte Repression (durch z.B. Glukose-6-Phosphat) abgeschwächt oder aufgehoben haben. Eine Evolvierung in synthetischem Minimal- oder TAPS-Medium wäre vermutlich vielversprechend, wurde jedoch aus Zeitgründen nicht angehängt.

Nach dem *evolutionary engineering* des L-Serin-Biosyntheseweges im Stamm CS.SS.Cs.G1 wäre die Deletion von *PcCHA1*, sowie wahrscheinlich das Wiederherstellen des *PcGPM1* Wildtyp Allels angebracht und sollte theoretisch zu einem Stamm mit erhöhten intrazellulären L-Serin-Mengen führen. Interessant wäre dann zu wissen, in wie fern sich dies auf die LCB- bzw. TAPS-Produktion auswirkt und welche Mutationen zur optimierten bzw. dysregulierten L-Serin-Biosynthese beigetragen haben.

Der Versuch mittels Überexpression von *PcTMS1* die L-Serin-Versorgung der SPT zu verbessern scheiterte offenbar, da kein Effekt in Bezug auf die TAPS-Produktion erkennbar war. Selbst nach Deletion von *PcTMS1* war diesbezüglich keine Veränderung

detektierbar. Eine Deletion von *TMS1* führt in *S. cerevisiae* zu einer 50% reduzierten SPT-Aktivität (INUZUKA *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit war dies, anhand der TAPS-Produktion, nicht erkennbar, weshalb eine Aktivitätsbestimmung der SPT vermutlich keine reduzierte Aktivität im *tms1Δ* Stamm CSS.TMS1 ergeben hätte. Neben der Funktion von *PcTMS1* ist auch ungeklärt, ob *PcTms1* mit z.B. *PcSer3* interagiert, wie es in *S. cerevisiae* der Fall ist (ITO *et al.*, 2001). Möglicherweise aber war im Stamm CS.CSS die L-Serin-Versorgung nicht limitierend (bzw. die TAPS-Produktion nicht hoch genug), weshalb eine Überexpression (oder auch Deletion) von *PcTMS1* in einem Stamm mit stärker optimiertem LCB-Biosyntheseweg (z. B. Stamm CSS.L4.O.L2.L1.S2) mehr Aufschluss über die Funktion von *PcTMS1* geben könnte.

4.3 Optimierung der *de novo* LCB-Biosynthese

Der erste Schritt der Sphingolipid-Biosynthese, die Kondensation von L-Serin und Palmitoyl-CoA, gilt in Eukaryonten als limitierend (SMITH & MERRILL, 1995; PERRY, 2002; COWART & HANNUN, 2007). So führte bereits die Überexpression von *PcLCB2* in einer anderen Arbeit zu einer erhöhten TAPS-Produktion in *P. ciferrii* (BAE *et al.*, 2003). Dort wurde, durch multiple Integration eines *TDH3p:LCB2* Konstrukts, eine etwa 50fache *PcLCB2*-Transkriptmenge nachgewiesen, was zu einer Verdopplung der TAPS-Produktion führte. In der vorliegenden Arbeit führten etwa 11fach erhöhte Transkriptmengen zu einem 26 %igen Anstieg der TAPS-Produktion. Eine stärkere Überexpression von *PcLCB2* wäre demnach ein vermutlich vielversprechender Ansatz, die LCB-Produktion weiter zu optimieren. In *S. cerevisiae* bedarf es der Co-Überexpression von *LCB1* und *LCB2*, um die SPT-Aktivität erhöhen zu können (NAGIEC *et al.*, 1994), wohingegen in Säugerzellen die SPT-Aktivität durch Überexpression von *LCB2* alleine (und nicht von *LCB1* alleine) angetrieben werden kann (WEISS & STOFFEL, 1997; FARRELL *et al.*, 1998). Weshalb es in *P. ciferrii* nach alleiniger *PcLCB2*- bzw. *PcLCB1*- Überexpression zu einem scheinbaren Anstieg der SPT-Aktivität kam ist unbekannt. Da es sich bei der SPT höchst-wahrscheinlich um ein Heterodimer (bestehend aus *PcLcb1* und *PcLcb2*) handelt, könnte ein zum Teil kompensierender Anstieg der *PcLCB1* (*PcLCB2*) mRNA [bedingt durch die Überexpression von *PcLCB2* (*PcLCB1*)] die scheinbare Aktivitätssteigerung der SPT erklären. Vermutlich

könnten aber auch höhere Mengen einer SPT-Untereinheit die jeweils andere Untereinheit stabilisieren [wie in (YASUDA *et al.*, 2003) oder (HANADA, 2003) diskutiert]. Die Aktivität der SPT wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet, wäre jedoch z.B. wie in (RUTTI *et al.*, 2009) beschrieben (ohne die Isolation von Mikrosomen) durchführbar. Die gemeinsame Überexpression von *PcLCB1* und *PcLCB2* führte zu einer weiteren Verbesserung der TAPS-Produktion und impliziert eine erhöhte Aktivität der SPT in jenem Stamm. Dies spiegelt die Notwendigkeit der Co-Überexpression von *PcLCB1* und *PcLCB2* für eine optimierte LCB-Produktion in *P. ciferrii* wieder.

Die Funktion des putativen akzessorischen Proteins PcTsc3 bleibt unbekannt. Vermutlich kam es im Stamm CSS.L1.L2.T3oe (s. 3.2.2) zu einer Überproduktion von PcLcb1, PcLcb2 und PcTsc3 und führte möglicherweise zur Aktivierung der *unfolded protein response* (UPR) Signal-Transduktions-Kaskade (COX & WALTER, 1996; COX *et al.*, 1997), die den beobachteten Wachstumsphänotyp verursacht haben könnte. Eine Deletion von *TSC3* in *S. cerevisiae* führt zu einer starken Reduktion der SPT-Aktivität auf etwa 1 % (GABLE *et al.*, 2000). Sowohl die Deletion als auch die Überexpression von *PcTSC3* hatte keinen Effekt auf die TAPS-Produktion, weshalb die Rolle des putativen Gens in *P. ciferrii* unklar bleibt.

Hinweise für eine durch LCBs regulierte SPT-Aktivität existieren bereits seit Anfang der 90er Jahre (MANDON *et al.*, 1991). Erst vor kurzem wurden die Orm-Proteine Orm1 und Orm2 als Mediatoren der Sphingolipid-Homöostase in *S. cerevisiae* charakterisiert, die wahrscheinlich als Reaktion auf intrazelluläre LCB-Level die SPT-Aktivität modulieren können. Der genaue Mechanismus dabei ist bis dato nicht aufgeklärt. Die Inaktivierung des Orm-Komplexes resultiert in einer dysregulierten LCB-Biosynthese, mit dem Resultat, dass LCBs akkumulieren (BRESLOW *et al.*, 2010; HAN *et al.*, 2010). Wie zu erwarten, kam es nach der Deletion des korrespondierenden *PcORM12* Gens zu einem signifikanten Anstieg der TAPS-Produktion. Im *S. cerevisiae orm1Δ orm2Δ* Stamm wurde ein merklicher Wachstumsnachteil registriert, der wahrscheinlich durch einen erhöhten Sphingolipid-Metabolismus begründet war (und nicht durch eine UPR), da die künstliche Herabsetzung der SPT-Aktivität durch Myriocin den Wachstumsphänotyp supprimierte (BRESLOW *et al.*, 2010; HAN *et al.*, 2010). Allerdings gibt es Hinweise, dass ein dysregulierter Sphingolipid-Metabolismus ER-Stress auslösen kann (PINEAU *et al.*, 2009; MULLEN *et al.*, 2011). Ein

merklicher Wachstumsnachteil konnte in *P. ciferrii* nach Deletion von *PcORM12* nicht beobachtet werden, was in Bezug auf die Übertragung der Deletion auf einen Hochleistungs-TAPS-Produzenten von enormem Vorteil wäre. Über eine mögliche Rolle von *PcORM12* bei der UPR in *P. ciferrii* ist nichts bekannt. Die normalerweise durch Inaktivierung des Orm-Komplexes bedingte UPR wäre mittels *UPRE-lacZ* Reporter-Test nach (HAN *et al.*, 2010) nachweisbar. Ob das isolierte PcOrm12 wie in *S. cerevisiae* als Dimer vorliegt, oder als Monomer, kann nur spekuliert werden. Möglicherweise existiert ein weiteres *ORM* Gen im Genom von *P. ciferrii*, welches ein Intron trägt und deshalb nicht durch das automatische Annotations-System GenDB v2.4 aufgefunden werden konnte. In diesem Fall wäre das Auffinden ein wichtiger Schritt, um beide *ORM*-Gene deletieren zu können, da eine *ORM*-Doppeldelation den größten Effekt in Bezug auf eine LCB-Akkumulation hat (HAN *et al.*, 2010).

Neben der SPT, den Orm-Proteinen und Tsc3, wird Sac1 als weitere Komponente des sog. 'SPOTS-Komplex' in Hefen beschrieben, dessen Deletion zur intrazellulären Akkumulation von LCBs führt (HAN *et al.*, 2010). Sac1 gilt (wie der Orm-Komplex auch) als Modulator der SPT-Aktivität, wobei unbekannt ist auf welche Art und Weise dies geschieht. Vorstellbar dabei wäre eine regulatorische Funktion von Phosphatidyl-Inositol (PI) bzw. PI-4-Phosphat PI, dem Edukt bzw. Substrat von Sac1. In einem *S. cerevisiae sac1Δ* Stamm ist zudem die UPR konstitutiv aktiviert und die Wachstumsrate stark verringert (CLEVES *et al.*, 1989; KOCHENDORFER *et al.*, 1999). Der in dieser Arbeit konstruierte *P. ciferrii sac1Δ* Stamm wuchs nur sehr schlecht in TAPS-Medium und zeichnete sich durch eine stark verminderte TAPS-Produktion aus. Dabei könnte eine Limitierung der PI-Bereitstellung Ursache für den starken Wachstumsphänotyp im Stamm CSS.SAC1 gewesen sein. Möglicherweise ist das durch PcSac1 zu Verfügung gestellte PI die Hauptquelle für die von PcAur1 katalysierte IPC-Synthese. Dies würde voraussetzen, dass IPCs [wie für *S. cerevisiae* (CERANTOLA *et al.*, 2009)] essentiell für *P. ciferrii* sind. Weshalb es nach der Deletion von *PcSAC1* nicht zu einer gesteigerten TAPS-Produktion kam ist unklar, wobei dies womöglich ein TAPS-Medium-spezifischer Effekt war. Möglicherweise aber handelt es sich bei *PcSAC1* nicht um das funktionelle Homolog zu *ScSAC1*.

3-KSA, das Substrat von Tsc10, gilt als extrem kurzlebiger Metabolit, welches in Hefen rasch zu Sphinganin umgewandelt wird (BEELER *et al.*, 1998). Durch Überexpression von *TSC10* in *S. cerevisiae* konnte zwar der Ceramid-Anteil der Lipid-Fraktion erhöht werden, allerdings fehlt der Beweis für eine gesteigerte LCB-Produktion bzw. Aktivität von Tsc10 (KIM *et al.*, 2010). Die Überexpression von *PcTSC10* hatte keinen Effekt in Bezug auf die TAPS-Produktion, was die Vermutung nahe legt, dass die von PcTsc10 katalysierte Reaktion (im Stamm CSS.TSC10oe) nicht limitierend in der *de novo* LCB-Synthese war. Eine Überexpression von PcTSC10 in einem Hochleistungs-TAPS-Produzenten wäre eventuell interessant, da dort die 3-KSA-Reduktion limitierend für die TAPS-Produktion sein könnte.

Die Deletion von *PcLCB4* erwies sich (zumindest im Stammhintergrund CS.CSS) als am effektivsten in Bezug auf die TAPS-Produktion (vgl. Abb. 19). Die Analyse der LCB-Ps im Stamm CS.L4 deutet klar auf eine LCB-Kinase-Aktivität von PcLcb4 hin, wobei unklar ist, wodurch genau die TAPS-Produktion in diesem Maße anstieg. PHS-1P ist als Signalmolekül in Hefen bekannt (HANNUN & OBEID, 2008; COWART *et al.*, 2010), weshalb eine regulatorische Funktion von LCB-Ps (oder auch PcLcb4) bei der LCB-Homöostase bzw. TAPS-Produktion denkbar wäre. Darüber hinaus dient die Phosphorylierung von LCBs u.a. als Signal für deren Abbau [katalysiert von Dpl1 (SABA *et al.*, 1997)]. Eine Blockade im Abbau der LCBs könnte daher zur intrazellulären Akkumulation von PHS und somit zu einer erhöhten TAPS-Produktion geführt haben. Eine regulatorische Funktion von PHS-1P ist jedoch als unwahrscheinlich anzusehen, da die Deletion von *PcDPL1* und die damit einhergehende Akkumulation von PHS-1P zu einem Anstieg (und nicht zu einem Abfall) der TAPS-Produktion führte (s. 3.2.2). Nebenbei bemerkt resultierte die Akkumulation von PHS-1P nicht, wie in *S. cerevisiae* beobachtet (KIM *et al.*, 2000), in einer erkennbaren Wachstumsinhibierung.

Nach der Deletion des putativen LCB-P-Phosphatase Gens *PcLCB3* konnten weder in Bezug auf die TAPS-Produktion, noch auf die Mengen intrazellulärer LCB-Ps Auffälligkeiten bzw. signifikante Veränderungen beobachtet werden. Erwarten könnte man analog zu einer *DPL1*-Inaktivierung eine Akkumulation von LCB-Ps, wie in *S. cerevisiae* beschrieben (ZHANG *et al.*, 2001). Zu beachten ist allerdings, dass bei der (von Gerhard Liebisch

durchgeführten) LCB-P-Analyse nur LCB-Ps mit 18 C-Atomen quantifiziert wurden. Möglicherweise erkennt Pclcb3 ausschließlich C₁₆- oder C₂₀-LCB-Ps. In *S. cerevisiae* existieren Hinweise für verschiedene Substrat-Spezifitäten von Dpl1 und Lcb3 in Bezug auf die C-Kettenlänge (ZHANG *et al.*, 2001). Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit keine Doppeldeletion von *PcDPL1* und *PcLCB3* realisiert werden konnte [gilt in Hefen als letal (ZHANG *et al.*, 2001)], unterstützt jedoch die Annahme, dass es sich bei *PcLCB3* um ein LCB-P-Phosphatase codierendes Gen handelt.

In einem *lcb3Δ dpl1Δ lcb4Δ S. cerevisiae* Stamm konnten gegenüber einem *lcb4Δ* Stamm erhöhte LCB-Mengen gemessen werden (ZHANG *et al.*, 2001). Dieser Ansatz wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht verfolgt, könnte allerdings vielversprechend in Bezug auf eine optimierte LCB-Produktion in *P. ciferrii* sein.

Eine Inaktivierung der Fettsäure-Elongasen Sur4 oder Fen1 führt in *S. cerevisiae* zur Akkumulation von LCBs und gleichzeitig zur Herabsetzung der Ceramid-Level (REVARDEL *et al.*, 1995; BRESLOW *et al.*, 2010). Die erhöhten TAPS-Mengen in den *P. ciferrii sur4Δ* bzw. *fen1Δ* Stämmen sprechen für Fettsäure-Elongase Aktivitäten der korrespondierenden Proteine (vgl. Abb. 19). Da in den Stämmen CSS.SUR4 und CSS.FEN1 leicht reduzierte Wachstumsraten beobachtet wurden, kann man annehmen, dass in diesen Stämmen die Fettsäure-Elongation (und daher vermutlich die Sphingolipid-Biosynthese) limitierend für deren Wachstum war. Eine Analyse der Ceramide für eine genauere Charakterisierung von PcSur4 und PcFen1 wurde nicht durchgeführt. Mittels der für *P. ciferrii* bereits etablierten ESI-MS/MS Analytik wäre dies jedoch möglich (BÖRGEL, 2007; BÖRGEL *et al.*, nicht publiziert).

4.3.1 Der Hochleistungs-TAPS-Produzent CSS.L4.O.L2.L1.S2

Der im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Hochleistungs-TAPS-Produzent CSS.L4.O.L2.L1.S2 produzierte mit knapp 2 g * L⁻¹ die höchsten bis dato gemessenen Mengen an TAPS und ist aufgrund der mehr als fünffach optimierten q_{Pmax} möglicherweise für eine biotechnologische TAPS-Produktion im industriellen Maßstab geeignet (vgl. 3.2.3). Die gemessenen TAPS-Mengen liegen dabei wahrscheinlich unter den tatsächlich produzierten, da gegen Ende der Fermentation TAPS-Moleküle an der

Schüttelkolben-Innenwand kristallisierten, welche sich im Zuge der Probennahmen nicht komplett resuspendieren ließen.

Während der Fermentation ließ sich eine an das Wachstum gekoppelte LCB- bzw. TAPS-Produktion beobachten. Dies war zu erwarten, da Sphingolipide für den Aufbau der Zellmembran benötigt werden. Dort machen sie in Hefe etwa 7 % der Membranmasse bzw. 30 % der Phospholipide aus (PATTON & LESTER, 1991). Möglicherweise kam es im Stamm CSS.L4.O.L2.L1.S2 neben der erhöhten LCB-Produktion zu einem erhöhten Fluss in der Sphingolipid-Biosynthese, welcher (neben der 5,10-mTHF-Limitierung) eventuell Ursache für das verschlechterte Wachstum gewesen sein könnte. Ein erhöhter Sphingolipid-Metabolismus führt in der Bäckerhefe zu einer reduzierten Wachstumsrate (BRESLOW *et al.*, 2010). Eine Möglichkeit dieses potentielle Problem zu umgehen könnte die Deletion der Ceramidsynthasegene *PcLAG1* oder *PcLAF1* sein. Durch die Deletion eines der beiden Gene würde vermutlich die Ceramidsynthese in *P. ciferrii* herabgesetzt und eventuell in einem verbesserten Wachstumsverhalten resultieren. Die kombinierte Deletion beider Gene wird als letal (JIANG *et al.*, 1998) bzw. stark wachstumshemmend (BARZ & WALTER, 1999) beschrieben, was darauf hindeutet, dass der Sphingolipid-Metabolismus für ein optimiertes Wachstum eine definierte Flussrate aufweisen muss. Eine weitere Möglichkeit die Ceramidsynthese zu verringern wäre die Deletion des putativen *PcCKA2* (codiert vermutlich für eine Untereinheit der Casein-Kinase 2), was in *S. cerevisiae* zu einer 70 - 75 %igen Reduktion der Ceramidsynthase-Aktivität führt (KOBAYASHI & NAGIEC, 2003). Eine mögliche Regulation von Wachstum und Sphingolipid-Metabolismus besteht ferner in der von TORC2 vermittelten Aktivität. TORC2 stimuliert wahrscheinlich die Ceramidsynthese während des Wachstums in Hefen durch Aktivierung der AGC-Kinase Ypk2 (ARONOVA *et al.*, 2008). Das beeinträchtigte Wachstum des Stammes CSS.L4.O.L2.L1.S2 könnte, neben den genannten möglichen Ursachen, auch durch die Überexpression der Gene *PcLCB1*, *PcLCB2* und *PcSYR2* und die damit einhergehende Protein-Überproduktion bedingt sein. Außerdem ist die LCB- bzw. Sphingolipid-Biosynthese ein anaboler und somit Energie-verbrauchender Prozess, so dass z.B. die ATP-Bereitstellung, und / oder die L-Pyruvat-Synthese limitierend für das Wachstum gewesen sein könnte(n). Um das Wachstum des Stammes CSS.L4.O.L2.L1.S2 zu verbessern wäre ein *evolutionary engineering* womöglich sinnvoll (wobei dabei allerdings auch die Gefahr

bestünde auf Mutationen zu selektieren, die eine verringerte LCB-Produktion verursachen). Vorab könnte man durch ein *Phenotype MicroArray*TM nach Wachstumsbedingungen suchen, die eine TAPS-Produktion begünstigen. Eine Möglichkeit die TAPS-Produktion weiter zu optimieren wäre die zusätzliche Deletion von *PcDPL1* und *PcLCB3* (s. oben).

In wie fern die Acetylierung von PHS zu TAPS limitierend war ist unklar. Eine genauere Analyse der LCBs und deren Acetyl-Derivate mittels LC-MS/MS (TER VELD *et al.*, 2011) wäre dabei wahrscheinlich aufschlussreich. Da über den Transport bzw. Export der acetylierten LCBs bis dato nichts bekannt ist, könnte dieser ebenfalls limitierend für die TAPS-Produktion (oder auch das Wachstum) gewesen sein.

Durch die Promotor-Substitution von *PcSYR2* im Stamm CSS.L4.O.L2.L1 konnte gezeigt werden, dass dort die Umwandlung von SA in PHS wahrscheinlich limitierend war und impliziert gleichzeitig eine Überexpression von *PcSYR2* im Stamm CSS.L4.O.L2.L1.S2.

4.4 Engineering der Palmitoyl-CoA-Biosynthese

In mehreren Studien konnte ein Konzentrations-Optimum der SPT an Palmitoyl-CoA festgestellt werden (etwa 0,05 - 0,2 mM), so dass bei zu hohen Palmitoyl-CoA-Konzentrationen die Aktivität der SPT inhibiert wurde (BRAUN *et al.*, 1970; GABLE *et al.*, 2000; MONAGHAN *et al.*, 2002). Nichts desto trotz wurde in dieser Arbeit versucht die intrazellulären Palmitoyl-CoA-Mengen durch Optimierung der Malonyl-CoA-Bereitstellung zu erhöhen. Dies wurde durch Promotor-Substitution des putativen *PcACC1* (*PcACC1*⁻⁸⁰⁻¹) durch das *PcTDH3*⁻⁴²⁰⁻¹ Promotor-Fragment versucht zu bewerkstelligen (nicht gezeigt). In *S. cerevisiae* und *Streptomyces coelicolor* konnte durch Überproduktion der Acetyl-CoA-Carboxylase *Acc1* der intrazelluläre Malonyl-CoA-Pool erhöht werden (RYU *et al.*, 2006; WATTANACHAISAREEKUL *et al.*, 2008). Nach drei unabhängigen Transformationen mit dem *PcACC1* Überexpressions-Konstrukt konnten jeweils nur sehr schwach wachsende Kolonien erhalten werden, die nicht in TAPS-Medium wuchsen (nicht gezeigt). Der Grund hierfür ist unklar. Falls es zu einer Überexpression kam, könnte eine Akkumulation von *PcAcc1* zu jenem Wachstumsphänotyp geführt haben. Weitere Ansätze, die Palmitoyl-CoA-Versorgung der SPT zu optimieren wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht

durchgeführt. In *S. cerevisiae* z.B. konnte demonstriert werden, dass die endogene Palmitoyl-CoA-Versorgung für eine gesteigerte LCB-Produktion (unter Hitzestress) ausreichend war (COWART & HANNUN, 2007). Die stetig (in Bezug auf die TAPS-Produktion) optimierten Stämme, die in der vorliegenden Arbeit konstruiert wurden, sprechen ebenfalls für eine Palmitoyl-CoA-Versorgung in *P. ciferrii*, die im Rahmen der erreichten TAPS-Produktionen wahrscheinlich nicht limitierend war.

4.5 Optimierung der TriASa-Produktion

Durch die Deletion von *PcSYR2* im Stamm CS konnte eine deutlich reduzierte finale OD_{600nm} beobachtet werden, was auf einen reduzierten BTM-Ertrag schließen lässt. Die BTM wurde hier zwar nicht direkt bestimmt, da aber mittels Lichtmikroskop keine morphologischen Veränderungen im Stamm CS.SYR2 erkennbar waren, wurde die Regressions-Gleichung (aus 2.9.1) zur Berechnung der BTM anhand der OD_{600nm} herangezogen. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass eine Blockierung der PHS-Synthese und die damit einhergehende Erhöhung der SA- bzw. TriASa-Produktion inhibierend auf das Wachstum von *P. ciferrii* wirken könnte.

Im Ausgangsstamm CS wurden etwa $21 \text{ mg}_{(TAPS)} \cdot \text{g}^{-1}_{(BMT)}$ detektiert, wobei nach Deletion von *PcSYR2* etwa $48 \text{ mg}_{(TriASa)} \cdot \text{g}^{-1}_{(BMT)}$ erhalten wurden (entsprach etwa 50 % Zuwachs an absoluten acetylierten LCB-Äquivalenten). Dieser scheinbare Anstieg der LCB-Produktion wurde in ähnlichem Maße auch in *S. cerevisiae* beobachtet, wo ein *syr2Δ* Stamm etwa um den Faktor 1,9 mehr LCB-Äquivalente produzierte als der Wildtyp (BAE *et al.*, 2004). Die Ursache für dieses Phänomen ist nicht bekannt. Die Ceramid-Synthasen aus *P. ciferrii* nutzen bevorzugt Phytosphingosin gegenüber Sphinganin (BÖRGEL, 2007). Sphinganin könnte demnach akkumulieren, wodurch mehr Sphinganin für die Bildung von TriASa zur Verfügung stünde. In *S. cerevisiae* allerdings führte die Deletion von *PcSYR2* auch zu einem erhöhten Ceramid-Anteil in der Lipid-Fraktion (KIM *et al.*, 2010). In wie fern dies im Stamm CS.SYR2 der Fall war ist nicht geklärt.

Die Deletion von *PcSYR2* im Stamm CS.CSS führte zu einer weiteren Reduktion der BTM-Produktion (s. 3.3). Es ist anzunehmen, dass dies der weiter verbesserten SA- bzw. TriASa-Produktion zugrunde lag. Die Deletion von *PcSYR2* im für die LCB-Produktion optimierten

Stamm CSS.L1.L2.O führte zu einer weiteren sehr starken Verschlechterung des Wachstums. Die Ergebnisse lassen daher den Schluss zu, dass SA in Abwesenheit von PHS wachstumshemmend auf *P. ciferrii* wirkt. Die Tatsache, dass *P. ciferrii syr2Δ* Stämme existieren, die sehr hohe Mengen TriASa produzieren und gleichzeitig keine merklichen Einschränkungen im Wachstum aufweisen (nicht publiziert), impliziert, dass die mutmaßliche hemmende Wirkung von SA theoretisch umgangen werden kann. *Evolutionary engineering* wäre auch hier ein möglicher Ansatz das Wachstum (sowie die TriASa-Produktion) zu optimieren.

Im *syr2Δ lcb4Δ* Stamm CS.SYR2.L4 wurden zwar stark reduzierte Mengen an SA-1P detektiert, die noch vorhandenen SA-1P Mengen sprechen allerdings für die Existenz einer weiteren LCB-Kinase, die spezifisch für SA (und evtl. SPH) ist. Eine solche ließ sich jedoch in dieser Arbeit nicht identifizieren. Weshalb die *PcLCB4*-Deletion nicht zu einer verbesserten TriASa-Produktion führte ist unklar, wenn man annimmt, dass die erhöhte LCB-Produktion durch eine Blockade in deren Abbau bedingt ist (s. oben). Eine regulatorische Funktion der residual vorhandenen SA-1P Mengen im Sphingolipid-Metabolismus lässt sich daher nicht ausschließen.

4.6 Optimierung der TriASo-Produktion

Vor und während dieser Arbeit konnten bereits *P. ciferrii* Stämme mit optimierter TriASo-Produktion konstruiert werden (BÖRGEL, 2007; BÖRGEL *et al.*, nicht publiziert). Durch Transformation des Stammes WT 2.1 mit dem oCvLAG1-, *PcDES1*- und *omCer1*-Expressions-Plasmid p-So-22_{xbaI} wurde in dieser Arbeit ebenfalls ein Stamm konstruiert (CS-So-125), der signifikante Mengen an TriASo produzierte. Der Integrationsort des Plasmids ist dabei nicht bekannt, könnte jedoch theoretisch mittels *genome walking* identifiziert werden (sofern das Plasmid als einfache Kopie im Genom vorliegt). Die Stabilität des Stammes CS-So-125 hinsichtlich der TriASo-Produktion wurde mittels *colony-purification* nach (BÖRGEL *et al.*, nicht publiziert) verifiziert (freundlicherweise durchgeführt von Heiko Andrea, EVONIK Degussa GmbH; nicht gezeigt). Durch den anschließenden KO des *PcLIG4* Gens wurde auch hier (wie im Stamm CS) eine leichte

Reduktion der finalen End-OD_{600nm} beobachtet (nicht gezeigt), was pleiotrope Effekte einer *PcLIG4*-Deletion in Bezug auf das Wachstum in *P. ciferrii* nahelegt (s. oben).

Da der Stamm 125Δ+ weiterhin signifikante Mengen an TriASa produzierte, kann man davon ausgehen, dass mindestens einer der drei Schritte im Biosyntheseweg von SPH limitierend war. Bisher konnte allerdings nach Überexpression von verschiedenen Ceramidsynthase-, Dihydroceramid Δ4-Desaturase- und Ceramidase-Genen (in verschiedenen Kombinationen), keine Kombination gefunden werden, die zu einem besseren TriASo / TriASa-Verhältnis führte als jene, die im Plasmid p-So-22 codiert ist (BÖRGEL, 2007; BÖRGEL *et al.*, nicht publiziert). Versuche, weitere heterologe Gene überzuexprimieren, wurden in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

Der Stamm 125Δ+ produzierte mit etwa 12 mg * L⁻¹ nicht unerhebliche Mengen an TriASd (BÖRGEL *et al.*, nicht publiziert). Durch die Deletion von *PcSLD1* wurde dies unterbunden, führte jedoch nicht wie erhofft zu einer verbesserten TriASo-Produktion (da theoretisch Ceramid akkumulieren sollte). Ob dies an einer Limitierung der Ceramidase-Aktivität liegt kann nur spekuliert werden. Für die Übertragung auf einen industriell nutzbaren TriASo-Produzenten wäre die Inaktivierung des *PcSLD1* Gens dennoch von enormem Vorteil. Ein Phänotyp, wie z.B. in *C. albicans*, konnte nach Inaktivierung des Sphingolipid Δ⁸-Desaturase-Gens nicht beobachtet werden (OURA & KAJIWARA, 2008).

Die Deletion des putativen Sphingolipid Alpha-Hydroxylase-Gens *PcSCS7* resultierte in einem starken Abfall der TriASa-Produktion bei gleichbleibender TriASo-Produktion. Aufgrund der mutmaßlich fehlenden α-Hydroxylierung der Fettsäure im Dihydroceramid konnte das entsprechende Dihydroceramid möglicherweise besser von PcDes1 zu Ceramid umgesetzt werden. Um dies zu bestätigen könnte man die Ceramide mittels ESI-MS/MS näher untersuchen und die Aktivität von PcDes1 mit hydroxylierten und nicht-hydroxylierten Substraten wie in (SCHULZE *et al.*, 2000) beschrieben analysieren. Dieser Theorie folgend könnte es dadurch zu einer effizienteren Acylierung von Sphinganin (Ceramid-Synthese) gekommen sein, wobei dann die Ceramidase-Aktivität limitierend gewesen sein könnte. Zudem könnte omCer1 eine Präferenz für hydroxyliertes Ceramid gegenüber Ceramid besitzen. In wie fern es im Stamm 125Δ+SCS7 zur Akkumulation von

Ceramid kam wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Einen hemmenden Effekt von hydroxyliertem Dihydroceramid auf die oCvLag1 vermittelte Dihydroceramid-Synthese (z.B. im Stamm 125Δ+) ist als unwahrscheinlich anzusehen, da der Sphingolipid-Metabolismus des Coccolithovirus EhV-86 vermutlich darauf ausgelegt ist, den des Wirts [*Emiliana huxleyi* („Kalkalge“)] zu stören (WILSON *et al.*, 2005; PAGARETE *et al.*, 2009), weshalb eine Regulation durch andere Sphingolipide kontraproduktiv wäre.

Nichtsdestotrotz ist die durch die Deletion von *PcSCS7* bedingte Reduktion der TriASa-Nebenprodukt-Bildung ein wichtiger Vorteil, um TriASo biotechnologisch kosten-effizient herstellen zu können.

Die Inaktivierung der beiden endogenen Ceramidase-codierenden *PcYXC1*-Allele führte zu einer merklichen Herabsetzung der Produktion von sowohl TriASo als auch TriASa. Dies zeigt, dass die Aktivität von omCer1 alleine limitierend für eine effiziente TriASo-Produktion ist und die Co-Expression von *PcYXC1* diese Limitierung aufhebt oder zumindest herabsetzt. Gleichzeitig war in den Fermentationsproben des Stammes 125Δ+YXC1.2 ein erhöhtes TriASo : TriASa Verhältnis zu erkennen. Die Ceramidase omCer1 hydrolysiert ausschließlich SPH-basierte Ceramide (MAO *et al.*, 2003). Falls PcYxc1 auch Dihydroceramide hydrolysiert, würde man nach dessen Inaktivierung ein verbessertes TriASo : TriASa Verhältnis erwarten, da weniger SA über diesen *salvage pathway* freigesetzt würde. Nähere Untersuchungen diesbezüglich wurden bislang jedoch nicht durchgeführt.

Weshalb die Deletion von *PcSCH9* mit einer Verbesserung der TriASo- und TriASa-Produktion einherging ist unklar. Vermuten könnte man eine Steigerung der LCB-Biosynthese, wobei PcSch9 eine regulatorische Funktion als Kinase im Sphingolipid-Metabolismus haben könnte. Da eine Deletion von *PcSCH9* im Stamm CS keinen Effekt in Bezug auf die TAPS-Produktion hatte, ist eine gesteigerte LCB-Biosynthese als Ursache eher unwahrscheinlich. Vielmehr könnten die gesteigerten Mengen an TriASa und TriASo einer erhöhten Freisetzung von LCBs aus SA- und SPH-haltigen Sphingolipiden (*salvage pathway*) zugrunde liegen. In Zusammenhang mit dem Sphingolipid-Metabolismus ist von der AGC-Kinase Sch9 bekannt, dass diese in Abhängigkeit von LCBs phosphoryliert wird

(LIU *et al.*, 2005). Ferner gibt es Hinweise in *S. cerevisiae* auf eine Sch9-abhängige Regulation des Sphingolipid-Metabolismus (DE SNIJDER *et al.*, 2010).

Cerebroside [bzw. (Mono-)Glykosyl-Ceramide] kommen in nahezu allen bekannten Hefen vor. Ihnen liegt ein stark konserviertes Sphingoidbasen-Gerüst [i.d.R. 9-Methyl-(4,8-)Sphingadienin] zugrunde (BARRETO-BERGTER *et al.*, 2004). 9-Methyl-(4,8-)Sphingadienin wiederum wird aus Sphingosin synthetisiert. Da die Deletion des putativen Ceramid-Glykosyl-Transferase-Gens *PcGCS1* keinen Effekt auf die TriASo-Produktion hatte, kann man davon ausgehen, dass Cerebroside (im Stamm 125Δ+) vermutlich keine nennenswerten Anteile der Sphingolipid-Fraktion ausmachen und zudem nicht essentiell für *P. ciferrii* sind.

Die Deletion von *PcAUR1* war in dieser Arbeit (im Stamm 125Δ+) nicht möglich, weshalb anzunehmen ist, dass es sich, wie in *S. cerevisiae* (HEIDLER & RADDING, 1995), um ein essentielles Gen handelt. Eine Möglichkeit die Aktivität der IPC-Synthase *PcAur1* herabzusetzen (um so weniger LCBs in die Sphingolipid-Biosynthese einzuschleusen), wäre die Supplementierung mit Aureobasidin A in verschiedenen nicht-letalen Konzentrationen. Aureobasidin A ist ein Inhibitor der IPC-Synthase und führt normalerweise zum Absterben der Zellen (ENDO *et al.*, 1997; NAGIEC *et al.*, 1997).

Der Ansatz die Ceramid-Bildung über den *salvage pathway* (aus komplexeren Sphingolipiden) zu optimieren schlug vermutlich fehl, da die Überexpression von *PcISC1* keinen Effekt auf die TriASo- und TriASa-Produktion hatte (wobei unklar ist, ob *PcISC1* wirklich überexprimiert wurde). Interessant zu wissen wäre, ob es im Stamm 125Δ+ISC1oe zu einem Anstieg der Intermediate des Sphingosin-Biosyntheseweges (Ceramide) kam, was z.B. über ESI-MS/MS Analysen verifiziert werden könnte. In *S. cerevisiae* führt eine Deletion von *ISC1* zu einem Anstieg an komplexen Sphingolipiden (IPCs), wohingegen eine erhöhte Aktivität von *Isc1* in einer Herabsetzung der IPC-Produktion resultiert (TABUCHI *et al.*, 2006). Weiterhin ist bekannt, dass ein durch Hitzestress bedingter Anstieg an Ceramiden (Dihydroceramiden) auf die Aktivität von *Isc1* zurückzuführen ist (COWART *et al.*, 2006). Da *Pcisc1* vermutlich nur für den

mitochondrialen Sphingolipid-Metabolismus wichtig ist (KITAGAKI *et al.*, 2007; KITAGAKI *et al.*, 2009), wäre eine artifizielle Ko-Translokation von Pclsc1 ins ER ein denkbarer Ansatz, die Ceramid-Biosynthese über den *salvage pathway* zu erhöhen.

4.6.1 Das Plasmid pCS.426.So.V

Die Vorteile des in dieser Arbeit konstruierten Plasmids pCS.426.So.V_{XbaI} gegenüber dem Plasmid p-So-22_{XbaI} (p-So-22.II_{XbaI}) wurden bereits an anderer Stelle verdeutlicht (3.4.2). Bei allen getesteten Transformanten (CS.So.V.1, CS.So.V.2, CS.So.II.1 und CS.So.II.2) kann, aufgrund der Integration über doppeltes *cross over*, davon ausgegangen werden, dass die jeweiligen integrierten Plasmide als einfache Kopie im Genom vorlagen. Da sich in Bezug auf die TriASo-Produktionen kein signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen erkennen ließ und diese über den getesteten Zeitraum relativ stabil TriASo produzierten, waren vermutlich auch die Expressionskassetten genomisch stabil. Der Verlust nur eines dieser Gene würde höchst-wahrscheinlich in einer merklichen Abnahme der TriASo-Produktion resultieren (BÖRGEL, 2007; BÖRGEL *et al.*, nicht publiziert). Die Ergebnisse implizieren zudem, dass SPH bzw. TriASo keinen wachstumshemmenden Effekt hat und eine optimierte TriASo-Produktion (in diesen Maßen) keine Wachstumsnachteile birgt (die durch homologe Rekombination der Promotor-Elemente leicht hätten umgangen werden können).

Die Transformanten mit integriertem pCS.426.So.V_{XbaI} wiesen anfangs deutlich geringere TriASa-Produktionen auf, als jene mit integriertem p-So-22.II_{XbaI}. Der Grund hierfür ist nicht bekannt, zeigt aber, dass im Rahmen der Konstruktion eines TriASo-Produzenten das Plasmid pCS.426.So.V_{XbaI} wahrscheinlich von Vorteil ist (aufgrund der geringen Nebenprodukt-bildung). Nach mehrtägiger Kulturführung war ein gradueller Abfall der TriASa-Produktion bei den Stämmen CS.So.II.1 und CSS.So.II.2 erkennbar. Die Ursache für diese Adaptation (vermutlich bedingt durch die mutmaßlich wachstumshemmende Wirkung von SA / TriASa) ist nicht bekannt. Eine Möglichkeit wäre eine optimierte Ceramid-Synthese, wodurch weniger SA für die Acetylierung zu TriASa zur Verfügung stünde. Da keine erhöhte TriASo-Produktion erreicht wurde, würde dies gleichzeitig bedeuten, dass eine Limitierung in der Sphingosin-Biosynthese vorhanden gewesen sein

könnte (inwiefern die SPH-Acetylierung oder der -Export limitierend für die TriASo-Produktion war ist unbekannt).

Im Gegensatz zur Produktion von TriASa, unterlag die Produktion von TriASo relativ starken Schwankungen. So wurden während der frühen stationären Wachstumsphase merklich höhere TriASo-Produktionen beobachtet, als während der späten exponentiellen Wachstumsphase. Da die korrespondierenden Gene für die TriASo-Produktion jeweils unter der Kontrolle des *PcTDH3*- bzw. *PcENO1*-Promotors lagen, ist eine Regulation durch Expression als Ursache hierfür vermutlich unwahrscheinlich (gerade in Bezug auf *PcTDH3p*). Mittels qRT-PCR wäre dies jedoch zu verifizieren. Da in der stationären Wachstumsphase kein Wachstum und dementsprechend wahrscheinlich eine stark verringerte Membran-Biogenese stattfand, stand vermutlich mehr Sphingosin für die Acetylierung zu TriASo in dieser Wachstumsphase zur Verfügung (aufgrund eines reduzierten Ceramid- / Sphingolipid-Anabolismus). Dies würde, zumindest in der späten exponentiellen Wachstumsphase, auf eine Limitierung in der drei-Schritt-Biosynthese von Sphingosin hindeuten.

Konstruktion eines Hochleistungs-TriASo-Produzenten:

Für die Konstruktion eines TriASo-Hochleistungsproduzenten wurde die Transformation des Stammes CSS.L4.O.L2.L1.U mit dem Plasmid pCS.426.So.V_{XbaI} angestrebt. Diese schlug allerdings nach mehrmaligen Versuchen fehl, was darauf hindeutet, dass eine stark optimierte SPH- bzw. TriASo-Produktion toxisch für *P. ciferrii* sein könnte. In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass SPH-1-P toxisch ist, was durch Deletion von *LCB4* umgangen werden konnte (TANI *et al.*, 2006). Weiterhin wurde der Stamm CSS.L1.L2.O.U (besitzt intaktes *PcLCB4*-Gen) in der vorliegenden Arbeit ebenfalls mit pCS.426.So.V_{XbaI} transformiert, was auch nicht zum Erhalt von Transformanten führte (zur Information: Die Deletion von *PcLCB4* im Stamm 125Δ+ führte zu einem etwa zweifachen Anstieg der TriASo- und TriASa-Produktion; nicht gezeigt). Die Ursache für die mutmaßlich toxische Wirkung von SPH ist unklar, könnte jedoch z.B. durch eine gestörte *lipid raft*-Ausbildung begründet sein, wie sie mit SPH-haltigen Sphingolipiden in *S. cerevisiae* beobachtet wurde (TANI *et al.*, 2006).

Ein möglicher Ansatz, einen Stamm mit optimierter TriASo-Produktion zu konstruieren, wäre die Transformation von Vorgängerstämmen mit weniger optimierter LCB-Biosynthese, wie CS.CSS, CSS.L1, CSS.L1.L2, CSS.O, etc. (nach Inaktivierung des *PcURA3*-Gens) und die anschließende Deletion von *PcSCS7*, *PcSLD1* und / oder *PcSCH9*. Da unbekannt ist, welche der Gene im Stamm CSS.L4.O.L2.L1.U deletiert bzw. überexprimiert werden müssen, um eine nicht-letale TriASo-Produktion zu erlauben, wäre eine Expressions dieser Gene über regulierbare Promotoren denkbar. So könnte man leicht verschiedene Kombinationen an Deletionen und Überexpressionen testen, um eine optimale TriASo-Produktion zu erzielen. Für *P. ciferrii* sind bislang allerdings noch keine regulierbaren Promotoren bekannt.

4.6.2 Phenotype MicroArray™

Mittels Phenotype MicroArray™ Analyse sollten, wie bereits erläutert, Bedingungen gefunden werden, unter denen ein TriASo-Produzent gegenüber einem TriASa-Produzenten Wachstumsvorteile hat. Unter den rund 2000 von Biolog getesteten Wachstumsbedingungen wurde in den in dieser Arbeit durchgeführten Reproduktions-Experimenten nur eine Bedingung (100 µM N-Acetyl-L-Cystein) identifiziert, die das Wachstum des Stammes CS-So-125 (und nicht das des Stammes WT 2.1) verbesserte. Zwischen den Stämmen CS-So-125 und WT 2.1.U konnte dieser Unterschied im Wachstum allerdings nicht festgestellt werden, der somit auf das vorhandene *PcURA3*-Gen in diesen Stämmen zurückzuführen ist. In wie fern eine Orotidin-5-Phosphat-Decarboxylase (*PcUra3*) am Metabolismus von N-Acetyl-L-Cystein beteiligt ist und in welchem Zusammenhang dies mit besserem Wachstum stand ist ungeklärt. Mit den anderen Substanzen, die laut Biolog einen Phänotyp verursachten, konnten keine Veränderungen im Wachstum der getesteten Stämme beobachtet werden. Prinzipiell ist fraglich, ob der Stamm CS-So-125 genügend hohe Mengen an TriASo in den von Biolog verwendeten Medien produzierte, um einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Referenzstamm haben zu können. Die LCB-Produktion von *P. ciferrii* ist in SMD-Medium signifikant geringer als in TAPS-Medium (nicht gezeigt).

Da keine der getesteten Wachstumsbedingungen einen Wachstums-Phänotyp mit sich brachte, blieb das geplante *evolutionary engineering* (hinsichtlich einer optimierten TriASo-Produktion) mit dem Stamm CS-So-125 aus.

4.7 Transport acetylierter LCBs in *P. ciferrii*

In wie fern der Transport acetylierter LCBs in den in dieser Arbeit konstruierten Stämmen limitierend für die Produktion von TAPS, TriASa oder TriASo war ist unklar. Limitierungen diesbezüglich könnten (zumindest in den Stämmen mit stark optimierter TAPS-Produktion) bereits aufgetreten sein. Möglicherweise trug eine Limitierung im Export von TriASa und / oder TriASo zu den beobachteten Wachstums-Phänotypen bei (z.B. im Stamm CSS.L4.O.L2.L1.S2). Über den Export der acetylierten LCBs in *P. ciferrii* ist bislang nichts bekannt. Denkbare Mechanismen für den Export sind Exozytose oder die Sekretion über membranständige Transporter. Um letzteres näher zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit putative Gene deletiert (*PcRTA1*, *PcRTA2*, *PcRTA4*, *PcRTA44* und *PcRTM1*), die für mutmaßliche LCB-Transporter in *P. ciferrii* codieren könnten. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein LCB-spezifischer Transporter auch acetylierte LCBs transportiert ist vermutlich gering (aufgrund der sterischen Unterschiede von acetylierten und nicht-acetylierten LCBs). Man kann jedoch annehmen, dass sich in *P. ciferrii* ein solcher Transporter ortholog aus einem spezifischen LCB-Transporter entwickelt hat und daher eine signifikante Homologie zu LCB-Transportern aus anderen Hefen haben könnte. Die sog. Rta1-Superfamilie, zu der auch der vermeintliche LCB-Transporter Rsb1 zählt (KIHARA & IGARASHI, 2002), umfasst in Hefe fünf Mitglieder (MANENTE & GHISLAIN, 2009). In *P. ciferrii* konnten ebenfalls fünf potentielle Mitglieder der Rta1-Superfamilie identifiziert und inaktiviert werden. Die jeweilige Inaktivierung im Stamm 125Δ+ ergab jedoch weiterhin unveränderte Mengen an TriASo und TriASa in den Überständen der Fermentations-Proben (s. 3.5), weshalb sich annehmen lässt, dass keines der inaktivierten Gene am Export von acetylierten LCBs beteiligt war (sofern der Export nur über ein Protein vermittelt wird). Möglicherweise verläuft der Export über mehrere der hier getesteten Proteine, weshalb sich kein Phänotyp nach den jeweiligen Einzeldelationen auffinden ließ.

Die putativen Transporter-Gene wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht in einem TAPS-Produzenten inaktiviert. Daher ist unklar, ob diese am Export von TAPS beteiligt sind. Anhand der hohen Strukturähnlichkeiten der LCBs kann man jedoch annehmen, dass ein Transporter alle acetylierten LCBs (wenn auch mit unterschiedlichen Affinitäten) exportieren kann, weshalb die Inaktivierungen im Stamm 125Δ+ als ausreichend erschienen. Rsb1 beispielsweise gilt als LCB-spezifischer Transporter und ist am Transport aller LCBs (PHS, SA und SPH) beteiligt (KIHARA & IGARASHI, 2002) [In einer anderen Studie wurde Rsb1 übrigens als G-Protein-gekoppelter Rezeptor postuliert, der an der Endozytose von Membranproteinen beteiligt ist (JOHNSON *et al.*, 2010) (möglicherweise auch von LCB-Transportern)]. Der Export der acetylierten LCBs könnte weiterhin über Transporter der ABC-Familie erfolgen, die in Hefe mehr als ein Dutzend Mitglieder umfasst (JUNGWIRTH & KUHLER, 2006). Für *S. cerevisiae* existieren Hinweise, dass LCBs als Substrat des ABC-Transporters Pdr5 erkannt werden können (KEAN *et al.*, 1997; KIHARA & IGARASHI, 2004). Ferner sind in höheren Eukaryonten ABC-Transporter identifiziert worden, die an der Translokation von Lipiden (z.B. LCBs, Sphingolipide und LCB-Ps) beteiligt sind (AYE *et al.*, 2009; KAWAHARA *et al.*, 2009; NAGAO *et al.*, 2010; TAKABE *et al.*, 2010).

Im Rahmen einer optimierten Produktion acetylierter LCBs wäre die Aufklärung des Export-Mechanismus' in *P. ciferrii* wahrscheinlich ein wichtiger Schritt für weitere *metabolic engineering*-Ansätze.

4.8 Acetylierung von LCBs

Die Acetylierung von Sphingoidbasen ist, soweit bekannt, einzigartig für *P. ciferrii*. In wie weit die Acetylierung eine Limitierung der Sphingoidbasen-Produktion darstellt ist bislang nicht geklärt. Da keine nicht-acetylierten LCBs ins extrazelluläre Medium von *P. ciferrii* sekretiert werden, ist die Acetylierung vermutlich eine Voraussetzung für deren Sekretion (BARENHOLZ *et al.*, 1971). Welchen Nutzen *P. ciferrii* von der Sekretion großer Mengen acetylierter LCBs (bzw. TAPS) hat ist unklar. Eine anti-mikrobielle Wirkung von TAPS wäre dabei denkbar.

In einer Studie von 1971 wurde eine an die LCB-Acetyl-Transferase-Aktivität gekoppelte LCB-Produktion beobachtet (BARENHOLZ *et al.*, 1971). Dort wurde eine *feed back*-

inhibierende Wirkung von LCBs auf deren eigene Synthese diskutiert, wobei die Acetylierung diese inhibierende Wirkung aufhebe. Falls LCBs eine *feed back*-inhibierende Wirkung auf die Aktivität der SPT in *P. ciferrii* haben, wäre eine Optimierung der Acetylierung wahrscheinlich von großem Vorteil. In den Fermentationsproben des Stammes CSS.L4.O.L2.L1.S2 z.B. wurden neben den stark erhöhten Mengen an TAPS, im Vergleich zum Ausgangsstamm CS [mit rund $44 \text{ mg}_{(\text{TriAPS})} * \text{g}^{-1}_{(\text{TAPS})}$], signifikant höhere TriAPS-Mengen detektiert [etwa $200 \text{ mg}_{(\text{TriAPS})} * \text{g}^{-1}_{(\text{TAPS})}$], wie sich mittels LC-MS/MS herausstellte. Eine Limitierung der LCB-Acetylierung in Stämmen mit stark erhöhter TAPS-Produktion ist somit naheliegend.

Da zu Beginn dieser Arbeit davon ausgegangen wurde, dass die LCB-Acetyl-Transferase-Aktivität im ER lokalisiert ist und vermutlich mit der ER-Membran assoziiert ist, wurden *in silico* putative Proteine mit wenigstens einer vorhergesagten Transmembran-Domäne ausgewählt, um deren korrespondierenden Gene zu deletieren / disruptieren. In den Fermentationsproben der jeweiligen Stämme konnte nach wie vor TAPS detektiert werden. Falls LCBs von nur einem dieser Enzyme acetyliert würden, ließe dies den Schluss zu, dass keine der hier deletierten Gene für eine LCB-Acetyl-Transferase codiert. Wie viele Enzyme an den LCB-Acetylierungen beteiligt sind war bisher allerdings nicht bekannt.

In einer vergleichenden Proteom-Analyse zwischen dem *P. ciferrii* Wildtyp-Stamm PCWT und einem *P. ciferrii* Stamm, der kein TAPS produziert (nicht gezeigt), konnten zwei putative Acetyl-Transferasen identifiziert werden (PcAtf2 und PcSli1), die in dem „Nicht-Produzenten“ nicht nachweisbar waren (EVONIK Degussa GmbH; Daten nicht gezeigt). Die Deletion von *PcATF2* im Stamm CS führte dazu, dass ausschließlich TriAPS anstelle von TAPS produziert wurde, was den Verdacht nahe legt, dass *PcATF2* für eine Acetyl-Transferase codieren könnte, die TriAPS zu TAPS acetyliert. Da die Aminogruppe des gemessenen TriAPS' acetyliert war, muss demnach eine freie Hydroxylgruppe vorhanden gewesen sein, die vermutlich von PcAtf2 acetyliert würde. Die heterologe Expression von *PcATF2* in *S. cerevisiae* ergab keine nachweisbaren Acetyl-Derivate von Sphingoidbasen in den Fermentationsproben, wobei unklar ist, ob *PcATF2* exprimiert wurde. Möglicherweise wäre für diesen Zweck ein für *S. cerevisiae* codon-optimiertes *PcATF2* notwendig. Im Stamm CS.*sli1* (*sli1Δ*) waren keine acetylierten Derivate von PHS detektierbar. Die heterologe Expression von *PcSLI1* in *S. cerevisiae* resultierte in nachweisbaren Mengen an

TriAPS, bei dem ebenfalls die Aminogruppe acetyliert war (persönliche Mitteilung Frank ter Veld, Ruhr-Universität Bochum). Dies zeigt, dass es sich bei PcSli1 wahrscheinlich um eine LCB-Acetyl-Transferase handelt, die sowohl Amino- als auch Hydroxyl-Gruppen von PHS acetylieren kann. In Anbetracht dieser Ergebnisse lässt sich spekulieren, dass PcSli1 für die Synthese von TriAPS aus PHS verantwortlich ist, welches von PcAtf2 erkannt wird und zu TAPS acetyliert wird (könnte durch heterologe Co-Überexpression von *PcATF2* und *PcSLI1* in *S. cerevisiae* näher verifiziert werden). Vorstellbar wäre dabei die Acetylierung der durch PcSyr2 angefügten Hydroxylgruppe im TriAPS (\triangleq Phytosphingosin-C₄-O-Acetyl-Transferase-Aktivität).

In Bezug auf die Acetylierung von Sphingalin und Sphingosin ergab sich ein weniger klares Bild nach der Deletion von *PcATF2* bzw. *PcSLI1* (im Stamm 125 Δ +). Die Deletion von *PcATF2* bzw. *PcSLI1* führte in beiden Fällen zu keinen messbaren Mengen an TriASa. Bei der Deletion von *PcSLI1* wurde dieser Phänotyp erwartet, wohingegen bei der Deletion von *PcATF2* eine unveränderte TriASa-Produktion (aufgrund der Aktivität von PcSli1) erwartet wurde. Dies lässt darauf schließen, dass beide Enzyme notwendig für die Produktion von TriASa sind, wobei deren genaue Funktionen dabei näher untersucht werden müssten.

In Anbetracht der Ergebnisse kann man weiterhin annehmen, dass beide Enzyme in der Lage sind TriASo aus SPH zu synthetisieren, da die jeweiligen Deletionen zu einem starken Abfall der TriASo-Produktion führten (vgl. Abb. 25). Dabei ist eine überlappende Substratspezifität von beiden Acetyl-Transferasen denkbar. In den Stämmen 125 Δ +*atf2* und 125 Δ +*sli1* war vermutlich die Acetylierung von SPH limitierend für die TriASo-Produktion. Für eine effiziente TriASo-Produktion wäre daher ein Stamm mit intaktem *PcAFT2*- und *PcSLI1*-Gen nötig. Welchen Effekt die Überexpression von *PcATF2* und / oder *PcSLI1* auf die TriASo-Produktion hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, wäre jedoch vermutlich ein vielversprechender Ansatz die TriASo-Produktion zu verbessern. Ob noch weitere Enzyme in der Lage sind SPH zu acetylieren ist nicht klar. Eine Doppeldeletion von *PcATF2* und *PcSLI1* im Stamm 125 Δ + könnte hier mehr Aufschluss darüber geben. Weshalb in den Fermentationsproben der frühen stationären Wachstumsphase beider Stämme kein TriASo mehr nachweisbar war ist unbekannt, spricht jedoch für einen Stamm-spezifischen Abbau (bedingt durch den *af2 Δ* bzw. *sli1 Δ*

Genotyp). Möglicherweise kam es zu einer Deacetylierung von TriASo. Diese könnte durch eine funktionell homologe Lipase zu Say1 aus *S. cerevisiae* katalysiert worden sein. Say1 deacetyliert von Atf2 acetylierte Sterole (JACQUIER & SCHNEITER, 2010). Welcher Zusammenhang zwischen dem *af2Δ* bzw. *sli1Δ* Genotyp und dem Abbau von TriASo besteht ist allerdings unklar.

Abschließend lässt sich anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse und identifizierten Gene ein klareres Bild des Sphingoidbasen-Metabolismus in der Hefe *P. ciferrii* postulieren (s. **Abb. 26** und **Abb. 27**).

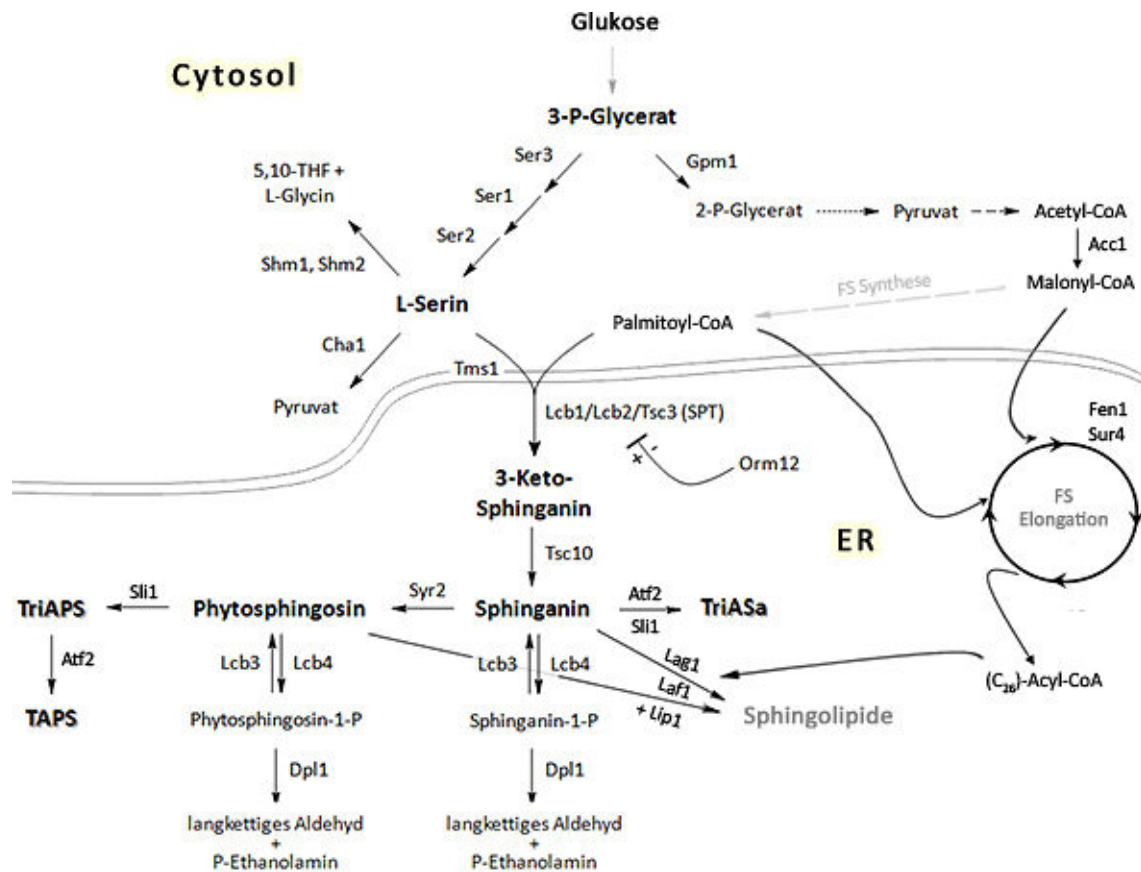


Abb. 26: Schematische Darstellung des postulierten LCB-Metabolismus in *P. ciferrii* in Bezug auf Sphingarin und Phytosphingosin (stark vereinfacht; ohne *salvage pathway*). Die Kondensation von L-Serin und Palmitoyl-CoA ist der initiale Schritt des *de novo* LCB-Biosyntheseweges. Dieser, wie auch die weiteren Schritte, finden im ER statt (z.T. in der ER-Membran; nicht gezeigt). Acetyliertes Phytosphingosin (TAPS) stellt die Hauptform acetylierter LCBs im Wildtyp dar (TriASa macht dort maximal 5 % aus). Nach der Acetylierung der LCBs zu TAPS bzw. TriASa werden diese auf bislang unbekanntem Wege aus der Zelle geschleust (nicht gezeigt). Die N-Acylierung der LCBs wird von den Ceramidsynthasen Lag1 und Laf1 (inkl. Lip1-Untereinheit) katalysiert. ER: endoplasmatische Retikulum; FS: Fettsäure; SPT: Serin-Palmitoyl-Transferase; TAPS: Tetra-Acetyl-Phytosphingosin; TriAPS: Tri-Acetyl-Phytosphingosin; TriASa: Tri-Acetyl-Sphingarin.

DISKUSSION

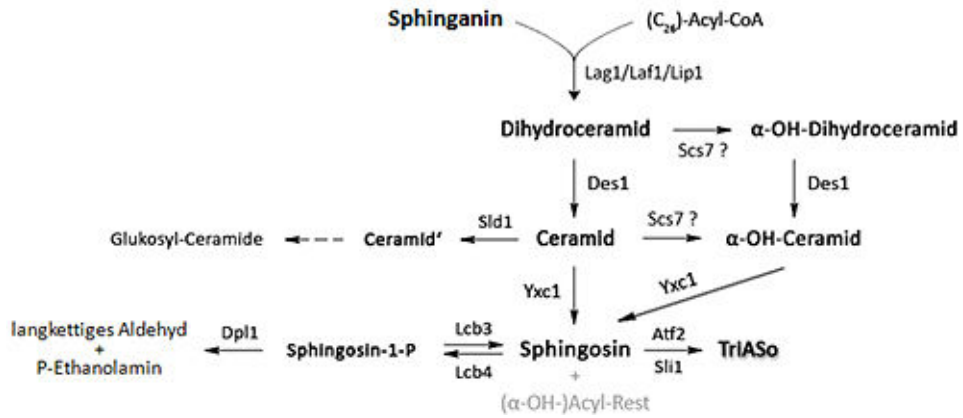


Abb. 27: Schematische Darstellung des postulierten LCB-Metabolismus in *P. ciferrii* in Bezug auf Sphingosin (stark vereinfacht; ohne *salvage pathway*). Sphingosin wird in drei Schritten aus Sphinganine und einer aktivierten Fettsäure (Acyl-CoA) synthetisiert. Nach Actylierung zu TriASo wird dieses sekretiert (nicht gezeigt) Ceramid': Sphingadienin-haltiges Ceramid.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die nicht-konventionelle Hefe *P. ciferrii* produziert große Mengen der tetra-acetylierten Sphingoidbase Phytosphingosin (TAPS). Sphingoidbasen sind essentielle Komponenten des *stratum corneums*, der multilamellaren Barriere der menschlichen Haut, und daher in der Kosmetik-Industrie von großem Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die biotechnologische Produktion der Sphingoidbasen Phytosphingosin, Sphinganin und Sphingosin auf molekularbiologischer Ebene in *P. ciferrii* charakterisiert und optimiert werden.

Die Hefe *P. ciferrii* konnte durch Etablierung einer einfachen und hoch-effizienten Transformations-Methode auf genetischer Ebene leicht zugänglich gemacht werden. Durch Inaktivierung des für NHEJ essentiellen *PcLIG4* Gens konnte die Effizienz zielgerichteter genomischer Integrationen von transformierten DNA-Konstrukten von 1 % auf 87 % erhöht werden. Die Etablierung des Cre-*loxP* Systems erlaubte das mehrfache Verwenden eines Selektions-Markers wodurch sukzessiv mehrere genomische Integrationen in einem Stamm ermöglicht wurden. Durch diese Errungenschaften konnte das Ziel „Optimierung der Sphingoidbasen-Produktion der nicht-konventionellen Hefe *P. ciferrii*“ im Folgenden erfolgreich verfolgt werden.

Der initiale Schritt der Sphingoidbasen-Biosynthese ist die von der Serin-Palmitoyl-Transferase katalysierte Kondensation von L-Serin und Palmitoyl-CoA. Durch die Deletion von Genen, die am L-Serin-Katabolismus von *P. ciferrii* beteiligt sind (*PcSHM1*, *PcSHM2* und *PcCHA1*), konnte die *de novo* Sphingoidbasen-Biosynthese optimiert werden und führte in einem *lig4Δ* Stamm zu einer etwa dreifachen Erhöhung der TAPS-Produktion. Weitere Ansätze den (vermutlich durch L-Serin *feed back* regulierten) L-Serin-Biosyntheseweg bzw. die *in vivo* L-Serin-Verfügbarkeit zu optimieren, führten nicht zu einer gesteigerten TAPS-Produktion. Durch weitere Deletion und Überexpression von Genen des Sphingolipid-Stoffwechsels konnte die TAPS-Produktion jedoch um ein Vielfaches verbessert werden. So konnte ein Stamm konstruiert werden, der die Gene

PcLCB1, *PcLCB2* und *PcSYR2* überexprimiert und Deletionen der Gene *PcSHM1*, *PcSHM2*, *PcCHA1*, *PcLCB4* und *PcORM12* trägt. Dieser Stamm (CSS.L4.O.L2.L1.S2) wies eine mehr als fünffach erhöhte maximale spezifische TAPS-Produktbildungsrate (q_{Pmax}) auf und produzierte mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ rund siebenmal mehr TAPS als der *lig4Δ* Ausgangsstamm, weshalb ein Einsatz dieses Stammes für die industrielle TAPS-Produktion denkbar wäre.

Ausgehend von einem für die TAPS- (und somit Sphingoidbasen-) Produktion optimierten Stamm sollten Stämme mit optimierter TriASa- oder TriASo-Produktion für industrielle Zwecke generiert werden. Es stellte sich allerdings heraus, dass erhöhte Mengen dieser Sphingoidbasen wahrscheinlich wachstumshemmend für *P. ciferrii* sind, weshalb eine weitere Produktions-Optimierung nicht ohne Weiteres möglich ist. In einem Laborstamm gelang es jedoch, durch Konstruktion und anschließende Transformation eines optimierten integrativen Plasmids (trägt die Gene, die für die Produktion von Sphingosin bzw. TriASo nötig sind) eine TriASo-Produktion von bis zu $30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{(BTM)}$ zu erzielen, wobei gleichzeitig die Bildung des Nebenprodukts TriASa auf weniger als $4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{(BTM)}$ reduziert wurde. Weiterhin konnte durch Deletion von *PcSCS7* in einem TriASo-Produktionsstamm die TriASa-Produktion mehr als vierfach reduziert werden. Die Bildung eines weiteren von *P. ciferrii* gebildeten Nebenproduktes [Tri-Acetyl-Sphingadienin (TriASd)] konnte durch Deletion des *PcSLD1* Gens unterbunden werden. Nach Inaktivierung von *PcSCH9* konnte eine fast 20 %ige Verbesserung der TriASo-Produktion erreicht werden.

Es konnten zwei putative Acetyl-Transferasen identifiziert werden (*PcAft2* und *PcSli1*), die an der Acetylierung von Phytosphingosin (zu TAPS), Sphinganin (zu TriASa) und Sphingosin (zu TriASo) beteiligt sind. Die Aufklärung und Optimierung dieser von *PcAft2* und *PcSli1* katalysierten Schritte sind vielversprechende Ansatzpunkte die Sphingoidbasen-Produktion in *P. ciferrii* weiter zu optimieren.

6. ANHANG

Abbildungen

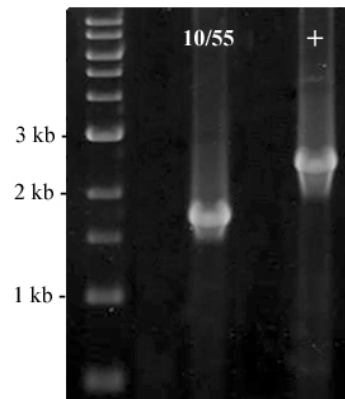


Abb. A 1: Gel-elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten, ausgehend von DNA der mit *PcURA3*-Deletions-Konstrukt transformierten Uracil-prototrophen Stämme (*lig4Δ*). Spur 10/55 repräsentiert einen von zehn analysierten prototrophen Transformanten. Als Positivkontrolle (+) wurde DNA eines Uracil-auxotrophen Stammes verwendet. Aus (SCHORSCH *et al.*, 2009).

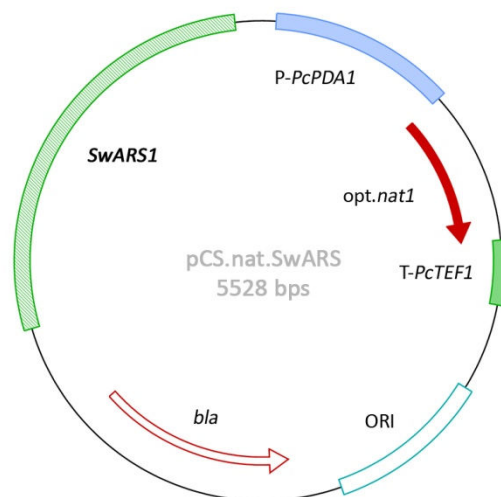


Abb. A 2: Das Plasmid pCS.nat.DoARS konnte in *C. jadinii* autonom replizieren, jedoch nicht in *P. ciferrii*.

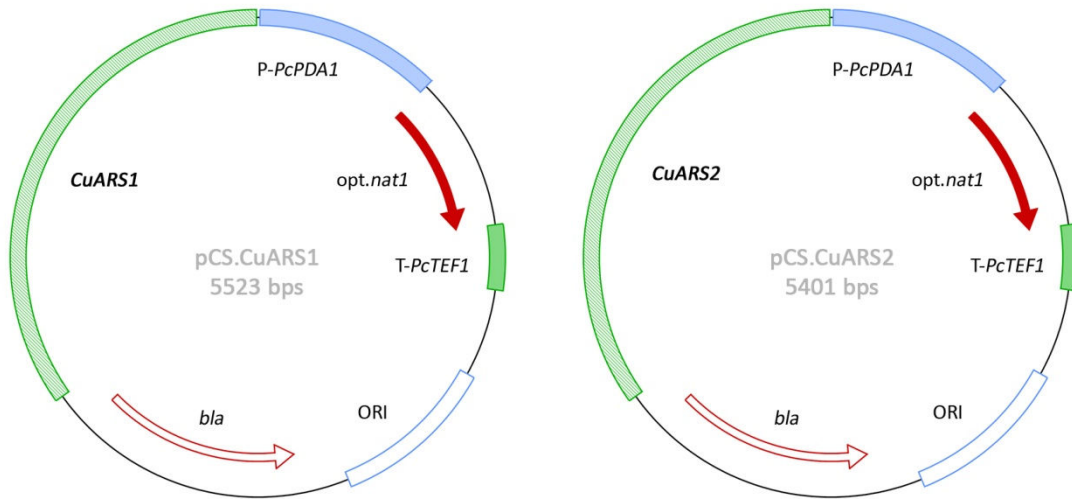


Abb. A 3: Die Plasmide pCS.CuARS1 und pCS.CuARS2 wurden konstruiert, indem *CuARS1* und *CuARS2* jeweils mittels PCR aus genomischer *C. jadinii* DNA amplifiziert und nach Restriktions-Verdau mit *AatII* und *PstI* in den Vektor p-nat1_{AatII/PstI} ligiert wurden.

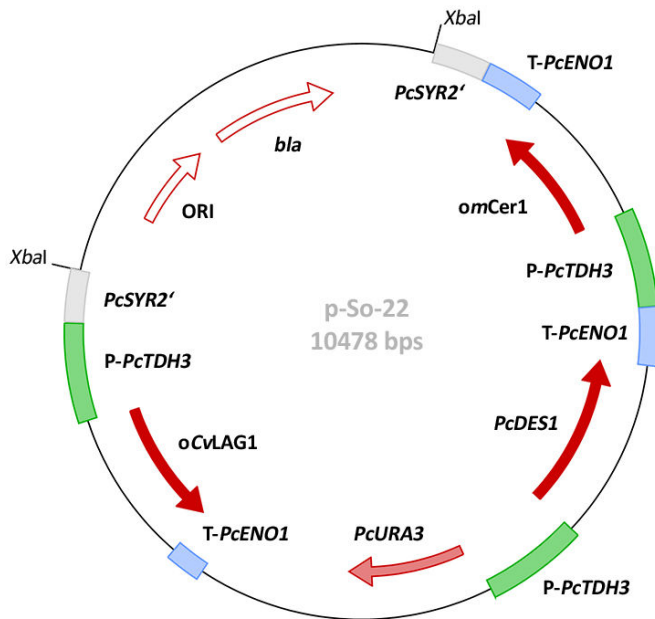


Abb. A 4: Plasmidkarte des *pop-in* Plasmids p-So-22. Dieses Plasmid diente im Zuge der Konstruktion eines TriASo-produzierenden Stammes als Expressionsvektor von *omCer1*, *PcDES1* und *oCvLAG1*.

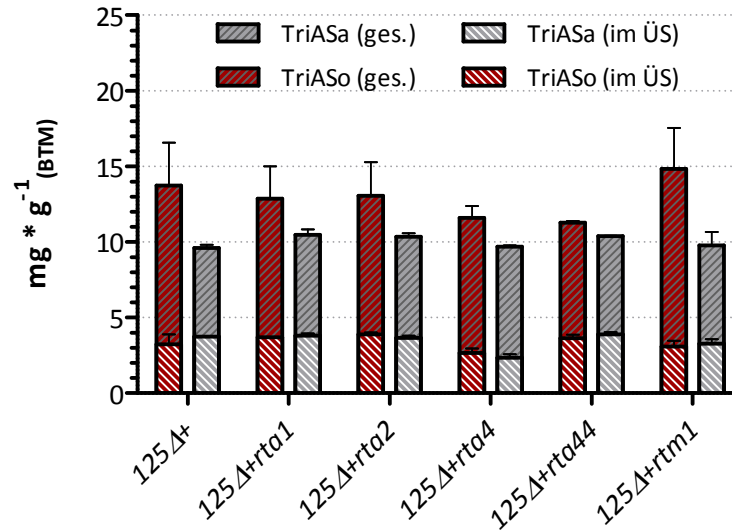


Abb. A 5: TriASo- und TriASa-Produktion von in dieser Arbeit konstruierten *P. ciferrii* Stämmen mit Deletionen von putativen *RTA2*-ähnlichen Genen. Die Probennahme erfolgte während der frühen stationären Wachstumsphase der jeweiligen Stämme. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwertes (n = 3). Ges.: gesamt; ÜS: Überstand.

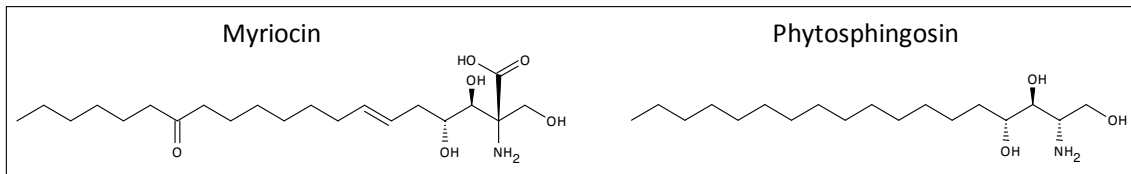


Abb. A 6: Struktur-Vergleich von Myriocin und Phytosphingosin. Myriocin ist ein Sphingoidbasen-Analogen und potenter Inhibitor der SPT. Myriocin wird in *S. cerevisiae* von Sli1 N-acetyliert, wodurch dessen inhibierende Wirkung stark reduziert wird.

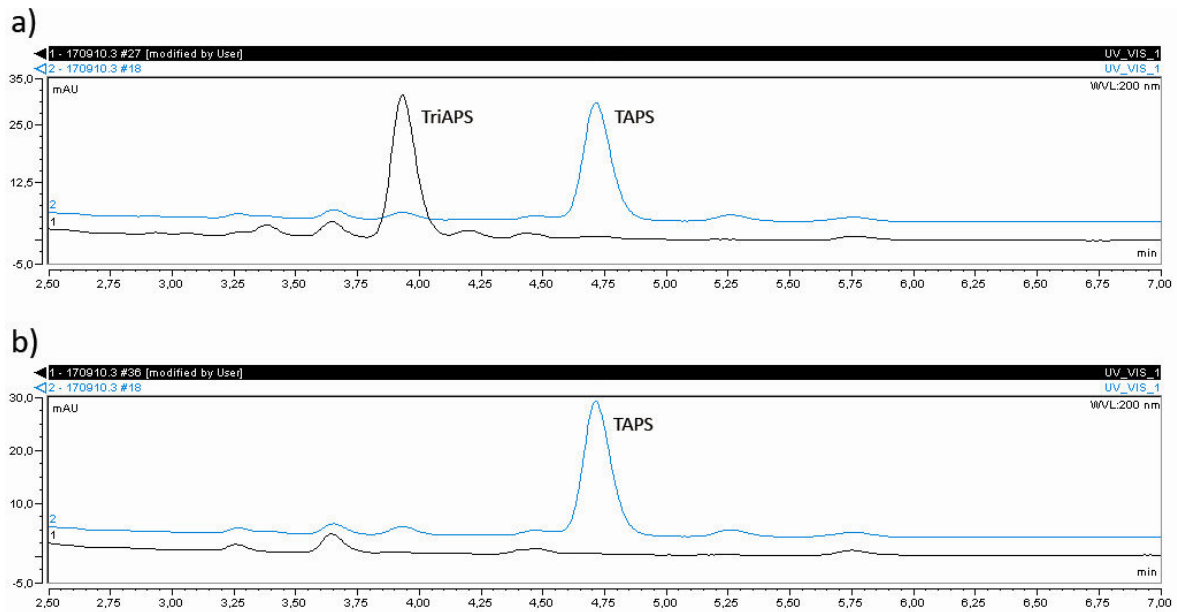


Abb. A 7: RP-HPLC-Chromatogramme von Fermentationsproben der Stämme *CS.atf2* (a) und *CS.sli1* (b) (schwarz) im Vergleich zu Stamm *CS* (blau). **a)** Der Stamm *CS.atf2Δ* produzierte keine messbaren Mengen an TAPS. Stattdessen waren signifikante Mengen an TriAPS nachweisbar (nicht quantifizierbar). **b)** Der Stamm *CS.sli1Δ* produzierte keine detektierbaren Acetyl-Derivate von Phytosphingosin. TAPS: Tetra-Acetyl-Phytosphingosin; TriAPS: Tri-Acetyl-Phytosphingosin.

Tabellen

Tab. A 1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Hefe Stämme.

<i>S. cerevisiae</i>	Genotyp	Quelle/Referenz
K26 (CEN.PK113-13D)	<i>MATα ura3-52 MAL2-8c SUC2</i>	EUROSCARF (Frankfurt, Germany)
andere Hefen		
<i>Cyberlindnera (Pichia) jadinii</i> (<i>Candida utilis</i>)	s. DSM Nr.: 2361	DSMZ
<i>P. ciferrii</i>		
125Δ+	s. CS-So-125; <i>lig4Δ</i>	diese Arbeit
125Δ+ +ΔD8D	s. 125Δ+; <i>SLD1::opt.nat1</i>	diese Arbeit
125Δ+ <i>atf2</i>	s. 125Δ+; <i>atf2Δ</i>	diese Arbeit
125Δ+GCS1	s. 125Δ+; <i>gcs1Δ</i>	diese Arbeit
125Δ+ISC1	s. 125Δ+; <i>isc1Δ</i>	diese Arbeit
125Δ+ISC1oe	s. 125Δ+; <i>TDH3p:ISC1</i>	diese Arbeit
125Δ+ <i>rta1</i>	s. 125Δ+; <i>rta1Δ</i>	diese Arbeit
125Δ+ <i>rta2</i>	s. 125Δ+; <i>rta2Δd</i>	diese Arbeit
125Δ+ <i>rta4</i>	s. 125Δ+; <i>rta4Δ</i>	diese Arbeit

ANHANG

125Δ+rta44	s. 125Δ+; rta44Δ	diese Arbeit
125Δ+rtm1	s. 125Δ+; rtm1Δ	diese Arbeit
125Δ+SCH9	s. 125Δ+; sch9Δ	diese Arbeit
125Δ+SCS7	s. 125Δ+; scs7Δ	diese Arbeit
125Δ+sli1	s. 125Δ+; sli1Δ	diese Arbeit
125Δ+YXC1	s. 125Δ+; yxc1Δ/YXC1	diese Arbeit
125Δ+YXC1.2	s. 125Δ+; yxc1Δ/yxc1Δ	diese Arbeit
CS.AcTr02	lig4Δ Pc_7424Δd	diese Arbeit
CS.AcTr03	lig4Δ Pc_745Δd	diese Arbeit
CS.AcTr05	lig4Δ Pc_6875Δ	diese Arbeit
CS.AcTr06.1	lig4Δ Pc_5428Δ/Pc_5428	diese Arbeit
CS.AcTr06.2	lig4Δ Pc_5428Δ/Pc_5428Δ	diese Arbeit
CS.AcTr07	lig4Δ Pc_7779Δd	diese Arbeit
CS.AcTr08	lig4Δ Pc_2136Δd	diese Arbeit
CS.AcTr09	lig4Δ Pc_770Δd	diese Arbeit
CS.AcTr10	lig4Δ Pc_6325Δd	diese Arbeit
CS.AcTr11	lig4Δ Pc_5119Δd	diese Arbeit
CS.AcTr12	lig4Δ Pc_584Δd	diese Arbeit
CS.AcTr13	lig4Δ Pc_616Δd	diese Arbeit
CS.AcTr14	lig4Δ Pc_7050Δd	diese Arbeit
CS.AcTr15	lig4Δ Pc_1331Δd	diese Arbeit
CS.AcTr16	lig4Δ Pc_3463Δd	diese Arbeit
CS.AcTr17	lig4Δ Pc_1479Δ	diese Arbeit
CS.AcTr18	lig4Δ Pc_7175Δd	diese Arbeit
CS.AcTr19	lig4Δ Pc_1301Δd	diese Arbeit
CS.AcTr20	lig4Δ Pc_7333Δd	diese Arbeit
CS.atf2	lig4Δ atf2Δ	diese Arbeit
CS.C	lig4Δ cha1Δ	diese Arbeit
CS.CS1	lig4Δ cha1Δ shm1Δ	diese Arbeit
CS.CS2	lig4Δ cha1Δ shm2Δ	diese Arbeit
CS.CSS	lig4Δ cha1Δ shm1Δ shm2Δ	diese Arbeit
CS.DPL1	lig4Δ dpl1Δ	diese Arbeit
CS.L4	lig4Δ lcb4Δ	diese Arbeit
CS.LCB3	lig4Δ lcb3Δ	diese Arbeit
CS.PCΔPro	LIG4 ¹⁻¹⁴⁷⁵ :loxP:LIG4 ⁶⁹²⁻²⁸⁵⁶	diese Arbeit
CS.PCΔPro + ΔLIG4	LIG4p:opt.nat1:LIG4t	diese Arbeit
CS.PCΔPro2 (CS; Δ+2)	lig4Δ	diese Arbeit
CS.S1	lig4Δ shm1Δ	diese Arbeit

ANHANG

CS.S2	<i>lig4Δ shm2Δ</i>	diese Arbeit
CS.sli1	<i>lig4Δ sli1Δ</i>	diese Arbeit
CS.So.II.1	<i>lig4Δ ura3Δ SYR2::p-So.22.II_{xba1}</i>	diese Arbeit
CS.So.II.2	<i>lig4Δ ura3Δ SYR2:: p-So.22.II_{xba1}</i>	diese Arbeit
CS.So.V.1	<i>lig4Δ ura3Δ SYR2::pCS.426.So.V_{xba1}</i>	diese Arbeit
CS.So.V.2	<i>lig4Δ ura3Δ SYR2::pCS.426.So.V_{xba1}</i>	diese Arbeit
CS.SS	<i>lig4Δ shm1Δ shm2Δ</i>	diese Arbeit
CS.SS.Cs.G1	<i>lig4Δ shm1Δ shm2Δ PcPGI1p:PcCHA1 gpm1Δ</i>	diese Arbeit
CS.SS.Cs.G1e	s. CS.SS.Cs.G1; evolviert in YEPD	diese Arbeit
CS.SYR2	<i>lig4Δ syr2Δ</i>	diese Arbeit
CS.SYR2.L4	<i>lig4Δ syr2Δ lcb4Δ</i>	diese Arbeit
CS.T3oe	<i>lig4Δ TDH3p:TSC3</i>	diese Arbeit
CS.U	<i>lig4Δ URA3::opt.nat1</i>	diese Arbeit
CS.U'	<i>lig4Δ ura3Δ</i>	diese Arbeit
CS3	<i>LIG4¹⁻¹⁴⁷⁵:pCS.ΔLIG4:LIG4⁶⁹²⁻²⁸⁵⁶</i>	diese Arbeit
CSS.ATF2oe	s. CS.CSS; <i>TDH3p:ATF2</i>	diese Arbeit
CSS.CHO1	s. CS.CSS; <i>cho1Δ</i>	diese Arbeit
CSS.CYS4	s. CS.CSS; <i>cys4Δ</i>	diese Arbeit
CSS.DPL1	s. CS.CSS; <i>dpl1Δ</i>	diese Arbeit
CSS.FEN1	s. CS.CSS; <i>fen1Δ</i>	diese Arbeit
CSS.GPM1dr	s. CS.CSS; <i>ACT1p:GPM1</i>	diese Arbeit
CSS.L1	s. CS.CSS; <i>ENO1p:LCB1</i>	diese Arbeit
CSS.L1.L2	s. CS.CSS; <i>ENO1p:LCB1 TDH3p:LCB2</i>	diese Arbeit
CSS.L1.L2.O	s. CS.CSS; <i>ENO1p:LCB1 TDH3p:LCB2 orm12Δ</i>	diese Arbeit
CSS.L1.L2.O.SYR2 1	s. CS.CSS; <i>ENO1p:LCB1 TDH3p:LCB2 orm12Δ syr2Δ</i>	diese Arbeit
CSS.L1.L2.O.SYR2 2	s. CS.CSS; <i>ENO1p:LCB1 TDH3p:LCB2 orm12Δ syr2Δ</i>	diese Arbeit
CSS.L1.L2.O.SYR2 3	s. CS.CSS; <i>ENO1p:LCB1 TDH3p:LCB2 orm12Δ syr2Δ</i>	diese Arbeit
CSS.L1.L2.O.U	s. CS.CSS; <i>ENO1p:LCB1 TDH3p:LCB2 orm12Δ ura3Δ</i>	diese Arbeit
CSS.L1.L2.T3oe	s. CS.CSS; <i>ENO1p:LCB1 TDH3p:LCB2 TDH3p:TSC3</i>	diese Arbeit
CSS.L1.T3oe	s. CS.CSS; <i>ENO1p:LCB1 TDH3p:TSC3</i>	diese Arbeit
CSS.L2	s. CS.CSS; <i>TDH3p:LCB2</i>	diese Arbeit
CSS.L2.T3oe	s. CS.CSS; <i>TDH3p:LCB2 TDH3p:TSC3</i>	diese Arbeit
CSS.L4	s. CS.CSS; <i>lcb4Δ</i>	diese Arbeit
CSS.L4.O	s. CS.CSS; <i>lcb4Δ orm12Δ</i>	diese Arbeit
CSS.L4.O.L1.L2.U	s. CS.CSS; <i>lcb4Δ orm12Δ TDH3p:LCB2</i>	diese Arbeit

ANHANG

	<i>ENO1p:LCB1 ura3</i>	
CSS.L4.O.L1.L2.U	s. CS.CSS; <i>lcb4Δ orm12Δ TDH3p:LCB2</i> <i>ENO1p:LCB1 ura3Δ</i>	diese Arbeit
CSS.L4.O.L2	s. CS.CSS; <i>lcb4Δ orm12Δ TDH3p:LCB2</i>	diese Arbeit
CSS.L4.O.L2.L1	s. CS.CSS; <i>lcb4Δ orm12Δ TDH3p:LCB2</i> <i>ENO1p:LCB1</i>	diese Arbeit
CSS.L4.O.L2.L1.S2	s. CS.CSS; <i>lcb4Δ orm12Δ TDH3p:LCB2</i> <i>ENO1p:LCB1 TDH3p::SYR2</i>	diese Arbeit
CSS.L4.O.L2.L1.S2.F1	s. CS.CSS; <i>lcb4Δ orm12Δ TDH3p:LCB2</i> <i>ENO1p:LCB1 TDH3p::SYR2 fen1Δ</i>	diese Arbeit
CSS.O	s. CS.CSS; <i>orm12Δ Δ</i>	diese Arbeit
CSS.SAC1	s. CS.CSS; <i>sac1Δ</i>	diese Arbeit
CSS.SER3	s. CS.CSS; <i>ser3 Δ</i>	diese Arbeit
CSS.SER3Δ83	s. CS.CSS; <i>SER3^{Δ1162-1410}</i>	diese Arbeit
CSS.SER3oe	s. CS.CSS; <i>TDH3p:SER3</i>	diese Arbeit
CSS.SLI1oe	s. CS.CSS; <i>TDH3p:SLI1</i>	diese Arbeit
CSS.SUR4	s. CS.CSS; <i>sur4Δ</i>	diese Arbeit
CSS.SYR2	s. CS.CSS; <i>syr2Δ</i>	diese Arbeit
CSS.SYR2.L4	s. CS.CSS; <i>syr2Δ lcb4Δ</i>	diese Arbeit
CSS.T3oe	s. CS.CSS; <i>TDH3p:TSC3</i>	diese Arbeit
CSS.TMS1	s. CS.CSS; <i>tms1 Δ</i>	diese Arbeit
CSS.TMS1oe	s. CS.CSS; <i>TDH3p:TMS1</i>	diese Arbeit
CSS.TRP5	s. CS.CSS; <i>trp5Δ Δ</i>	diese Arbeit
CSS.TSC10oe	s. CS.CSS; <i>TDH3p:TSC10</i>	diese Arbeit
CS-So-125	s. WT 2.1; + p-So-22 _{XbaI}	diese Arbeit
F-60-10A NRRL 1031 (PCWT)	<i>P. ciferrii</i> Wildtyp	Fa. Cosmoferm
<i>P. ciferrii</i> WT popout 2-1 (WT 2.1)	F-60-10A NRRL 1031 <i>ura3Δ syr2Δ</i>	Fa. Cosmoferm
WT 2.1.U	s. WT 2.1; <i>ura3Δ</i>	diese Arbeit

Tab. A 2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide. Plasmide für die Disruption von putativen LCB-Acetyl-Transferase-Genen sind Tab. A 6 aufgelistet. Alle Plasmide besitzen (wenn nicht anders angegeben)

ANHANG

einen Replikationsursprung für *E. coli* (ORI) sowie das *bla* Gen zur Selektion auf eine Ampizillin-Resistenz in *E. coli*.

Plasmid	Beschreibung	Quelle / Referenz
p425HXT7-6HIS	2 μ -Expressionsplasmid zur Überexpression von Genen und zur Herstellung eines His ₆ -Epitop; <i>ScLEU2</i> -Selektionsmarkergen, verkürzter <i>SchXT7</i> ³⁹²⁻¹ -Promotor und <i>ScCYC1</i> -Terminator.	(BECKER & BOLES, 2003)
p426HXT7-6HIS	2 μ -Expressionsplasmid zur Überexpression von Genen und zur Herstellung eines His ₆ -Epitop; <i>ScURA3</i> -Selektionsmarkergen, verkürzter <i>SchXT7</i> ³⁹²⁻¹ -Promotor und <i>ScCYC1</i> -Terminator. Shuttle-Vektor für Deletions- / Überexpressions-Kassetten	(HAMACHER <i>et al.</i> , 2002)
pCS.ΔLIG4	<i>pop-in</i> Plasmid für Disruption des <i>PcLIG4</i> Gens	(SCHORSCH <i>et al.</i> , 2009)
pCS.2micron.nat	2 μ -Plasmid mit clonNAT-Markerkassette. Konstruktion: Ligation von PCR-Produkt _{NotI} (Amplifikat von p426HXT7-6HIS mit Primern 2 μ .NotI.fw und 2 μ .NotI.rv) in p-nat1 _{NotI}	diese Arbeit
pCS.425.LP-lacZ	s. p425HXT7-6HIS; <i>SchXT7</i> ³⁹²⁻¹ -Promotor und <i>ScCYC1</i> -Terminator ersetzt durch von <i>loxP</i> Sequenzen flankiertes <i>lacZ</i> Fragment.	diese Arbeit
pCS.426. ΔLIG4	p426HXT7-6HIS basierter Vektor mit Deletions-Kassette für <i>PcLIG4</i> .	diese Arbeit
pCS.426.ATF2	p426HXT7-6HIS basierter Vektor zur heterologen Überexpression von <i>PcATF2</i> in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pCS.426.deSER3	p426HXT7-6HIS basierter Vektor mit <i>PcSER3</i> ¹¹⁶²⁻¹⁴¹⁰ -Deletionskassette.	diese Arbeit
pCS.426.LIG4s	p426HXT7-6HIS basierter Vektor mit integrativer Kassette zur Substitution des <i>PcLIG4</i> Wildtyp Allels	diese Arbeit
pCS.426.SLI1	p426HXT7-6HIS basierter Vektor zur heterologen Überexpression von <i>PcSLI1</i> in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pCS.525nat.LP	s. pCS.425.LP-lacZ; <i>ScLEU2</i> ersetzt durch clonNAT-Markerkassette	diese Arbeit
pCS.CuARS1	Plasmid mit clonNAT-Markerkassette und <i>ARS1</i> aus <i>C. jadinii</i>	diese Arbeit
pCS.CuARS2	Plasmid mit clonNAT-Markerkassette und <i>ARS2</i> aus <i>C. jadinii</i>	diese Arbeit
pCS.LoxP.nat1	s. p-nat1, jedoch mit <i>loxP</i> Sequenz am 5'-Ende des <i>PDA1</i> -Promotors und am 3'-Ende des <i>TEF1</i> -Terminators. Beide <i>loxP</i> Sequenzen sind als <i>direct repeats</i> orientiert. Konstruktion: Ligation von PCR-Produkt _{pstI/SacI} (Amplifikat von p-nat1 mit Primern LoxP-pPDA1.fw und LoxP-tTEF.rv) in p-nat1 _{pstI/SacI}	diese Arbeit
pCS.opt.Cre	Expressionsplasmid des <i>opt.cre</i> Gens im Zuge von	(SCHORSCH <i>et al.</i> ,

ANHANG

	genomischen clonNAT-Marker Entfernungen.	2009)
pCS.p-nat1ΔIS	trägt clonNAT-Markerkassette	diese Arbeit
pCS.p-nat1ΔIS.II	trägt clonNAT-Markerkassette	diese Arbeit
pCS.POI.ΔRTA2	pCS.525nat.LP basiertes Disruptions-Plasmid für <i>PcRTA2</i> . Linearisierung mit <i>NdeI</i> (für / vor Transformation)	diese Arbeit
pJH-S-1	Plasmid mit <i>DoARS1</i> -Sequenz und <i>S. stipitis HIS3</i> -Marker	(HAGEDORN, 1990)
pJM6	trägt ca. 1.800 bps der ARS-Sequenz und <i>URA3</i> aus <i>S. stipitis</i>	(YANG <i>et al.</i> , 1994)
p-nat1	trägt opt. <i>nat1</i> unter Kontrolle des <i>PcPDA1</i> -Promotors und <i>PcTEF1</i> -Terminators (clonNAT-Markerkassette) + Sequenz des intergenischen Bereichs zwischen der 5S und der 26S rDNA von <i>P. ciferrii</i>	EVONIK Degussa GmbH
pUG6	<i>loxP-kanMX-loxP</i> Kasette tragender Vektor mit Ampicillin-Resistenzgen (<i>bla</i>)	(GÜLDENER <i>et al.</i> , 1996)
pUG6lacZ	<i>lacZ</i> tragendes pUG6-Derivat	(BOLES <i>et al.</i> , 1998)

Tab. A 3: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete synthetische Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung / Verwendung
2μ.NotI.fw	TCAGCGGCCGACGACGAAAGGGCCTCG TGATAC	Konstruktion von pCS.2micron.nat
2μ.NotI.rv	TAAGCGGCCGCTGCCACCTGAACGAAG CATCTG	Konstruktion von pCS.2micron.nat
425-PDA1.fw	TGTGGTGCCCTCCTTGTCATATTA TGTTAAAGTGCAATTCTGTGCTCTAAATT TGCCCGTTTCGC	Konstruktion von pCS.525nat.LP
425-TEF.rv	ATTTACACCGCATATCGACGGTCGAGG AGAACTTCTAGTATATCACACTGGATGG CGGCGTTAGTATCG	Konstruktion von pCS.525nat.LP
426L.fw	GCTTCCGGCTCCTATGTTG	Amplifikation von Gen-Deletions- / Überexpressions-Kassetten
426R.rv	ACCCTATGCGGTGTGAAATAC	Amplifikation von Gen-Deletions- / Überexpressions-Kassetten
Amp.URA3.fw	ATAGATTTGAGCTTTGTAGTTCTG	Integrationsanalyse von <i>PcURA3</i> - Deletionskonstrukt
Amp.URA3.rv	CTCTTATACCTGCGGTACTAGCAC	Integrationsanalyse von <i>PcURA3</i> - Deletionskonstrukt
ATF2-CYC.rv	GAGGGCGTGAATGTAAGCGTGACATAA CTAATTCATCGGGCCCAATTATCC	Konstruktion von pCS.426.ATF2
ATF2-HXT7.fw	AAAACAAAAAGTTTTTTAATTTAATCA AAAAGTGAATATATTTTTCAAGGGCCC	Konstruktion von pCS.426.ATF2

ANHANG

coli_ori.rv	AGCTTGGAGCGAACGACCTACAC	Nachweis für Integration von <i>pop-in</i> Plasmiden im Zuge der Disruption von putativen LCB-Acetyl-Transferase-Genen
CuARS1.fw	CTGACGACGTCGATCATGTTTCGTACAA AACACCG	Konstruktion von pCS.CuARS1
CuARS1.rv	ACGCTGCAGGATCTTATCTCAATTCGCG GAAG	Konstruktion von pCS.CuARS1
CuARS2.fw	CTGACGACGTCAAGCTTATAGAATTTGA AGATATAAAAAC	Konstruktion von pCS.CuARS2
CuARS2.rv	ACGCTGCAGGATATCTCAACAACCTAAA GTGAC	Konstruktion von pCS.CuARS2
CYC	CGTGAATGTAAGCGTGACATAAC	Abwärtsprimer zur Amplifikation von Gen-Deletions-Kassetten
D4.2	AATTTCAAATGTGGCGATATACAGC	Isolation der <i>upstream</i> Region von <i>PcLIG4</i>
D4part.LoxP.fw	GCCACCTGGTATAACTTCGTATAATGTA TGCTATACGAAGTTATAAACTATAAACT ATTGGAGTAGAAGAG	Konstruktion von pCS.ΔLIG4
D4part.LoxP.rv	TCACTGCAGATAACTTCGTATAGCATA ATTATACGAAGTTATATTTTAACCCATTG ATCAGTTCTTTTATC	Konstruktion von pCS.ΔLIG4
deS3.pop-in.fw	AGCTGAAGCTTTAGGTATGAATG	Deletionsnachweis von <i>PcSER3</i> ACT-Domänen-Sequenz
deS3.pop-in.rv2	ACAAACGGAATATAGACAATTACC	Deletionsnachweis von <i>PcSER3</i> ACT-Domänen-Sequenz
deS3-LPNTL.rv2	TTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAA GCGCCATTATGCAACTTCTGGGAAATTA ACTG	Konstruktion von pCS.426.deSER3
deSER3-426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTCCGGCTCCTAT GTTGAACTTATTATCAGCTCCACAGTTTG	Konstruktion von pCS.426.deSER3
deSER3-426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGA AATACTTAGCAAGGGCCAAATATGAAA G	Konstruktion von pCS.426.deSER3
deSER3-LPNTL.fw	GCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA ATTTACAACAACAACATACATGCAATT C	Konstruktion von pCS.426.deSER3
DES-P-ENO.fw	CATATACACATTACACAATGGCTACAAT TACACATAG	Konstruktion von pCS.426.So.V
GSP1	GAGCAAGTACTGAAGATGATATTAAC	Isolation der <i>downstream</i> Region von <i>PcLIG4</i> (via <i>genome walking</i>)
GSP2	CAGTGGAAAAAGGATCTGAAGGTGTTG	Isolation der <i>downstream</i> Region von <i>PcLIG4</i> (via <i>genome walking</i>)
HXT7	GCCAATACTTCACAATGTTCTGAATC	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von

ANHANG

		Gen-Deletions-Kassetten
Ku70fw1	GAWGGTATHKTDTTYTKDRTHGAA	degenerierter Primer zur Isolation von <i>PcKU70</i>
Ku70fw2	CMWTRRTTNGAAATHTR	degenerierter Primer zur Isolation von <i>PcKU70</i>
Ku70rv1	WGGMBMATCATTWKYWGTRAA	degenerierter Primer zur Isolation von <i>PcKU70</i>
Ku70rv2	YAADRCACAYAWWTKDAYTTC	degenerierter Primer zur Isolation von <i>PcKU70</i>
Ku80fw1	SAATTRMGWTTNGGTGCW	degenerierter Primer zur Isolation von <i>PcKU80</i>
Ku80fw2	GTYGAAGKYTWYCCWGCWACW	degenerierter Primer zur Isolation von <i>PcKU80</i>
Ku80rv1	RAAACCHMDATCNAWACCWGG	degenerierter Primer zur Isolation von <i>PcKU80</i>
Ku80rv2	YAADRCACAYAWWTKDAYTTC	degenerierter Primer zur Isolation von <i>PcKU80</i>
L4.opt.fw	GAAGAAAARATGGATGGWGAWMGW	Degenerierter Vorwärtsprimer zur Amplifikation einer Teilsequenz des <i>LIG4</i> -Gens aus <i>P. ciferrii</i> .
L4.pop.fw2	TGTCTTGGATGGTGAAATGATAAC	Nachweis von pCS.Δ <i>LIG4 pop-out</i>
L4.pop-out.rv	CAAATTTCAAATGTGGCGATATAC	Nachweis von pCS.Δ <i>LIG4 pop-out</i>
L4.rv1	RAAWTBYTCYARRTAYTCWGGYTT	Degenerierter Abwärtsprimer zur Amplifikation einer Teilsequenz des <i>LIG4</i> -Gens aus <i>P. ciferrii</i> .
LIG4.pop-in.fw2	GCATCCTGATGCTCAACAATAC	Integrationsnachweis für pCS.Δ <i>LIG4_{Ndel}</i>
LIG4s-426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTAT GTTGCGATCGAAACCGTGGTGGAGATA AAC	Konstruktion von pCS.426.LIG4s
LIG4s-426R.rv	TTGCCAGTATTCTTAACCCAACACTGCACA GAACGATCGATCAGGCGATATAAAGAT TTAGGAC	Konstruktion von pCS.426.LIG4s
LIG4s-LPNTL.fw	TGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATT AATTTCTCAGGCCGTGATATAAACC	Konstruktion von pCS.426.LIG4s
LIG4s-LPNTL.rv	TTATCTGCAGTTACCCAGTGGTACGAA GCGCCAACAGTTGGCTCGTCGTTTG	Konstruktion von pCS.426.LIG4s
LoxP-pPDA1.fw	CGGCTGCAGATAACTTCGTATAATGTAT GCTATACGAAGTTATTGTGCTCTAAATTT GCCCGGTTTCGC	Konstruktion von pCS.LoxP.nat1
LoxP-tTEF.rv	GCGAGCTCATAACTTCGTATAGCATACA TTATACGAAGTTATTCGACACTGGATGG CGGCG	Konstruktion von pCS.LoxP.nat1

ANHANG

LP-lacZ.fw2	GGAAGCGGAAGAGCATAACTTCGTATA ATGTATGCTATACGAAGTTATTGGTGCA GCGCGATCGTAATCACCC	Konstruktion von pCS.425.LP-lacZ
LP-lacZ.rv	GCCCACTACGTGATAACTTCGTATAGCA TACATTATACGAAGTTATGCGGCTGATG TTGAACTGGAAGTCG	Konstruktion von pCS.425.LP-lacZ
oCvL1.P-TDH3.fw	GAAGTACCACAATACATTGTTAATTAAT TATTTGTTTGTGGTTG	Konstruktion von pCS.426.So.V
oCvL1.P-TDH3.rv	CAAATAATTAATTAACAATGTATTGTGG TACTTCAGGTTTAAG	Konstruktion von pCS.426.So.V
omCER.seq.fw2	TAGCTTCAGGTTATTCAGTTTG	Integrationsnachweis für p-So-22.II _{XbaI}
p22.fw	GAGAGCTCCGTACGTTATAAC	Konstruktion von p-So-22.II
p22.fw2	GGGTTATTTCTTTCAGTTTCTC	Konstruktion von p-So-22.II
p22.fw3	AGCTCACCTTCTCCATTG	Konstruktion von p-So-22.II / pCS.426.So.V
p22.fw4	TGGATTACCAGCAATAACTTTAG	Konstruktion von p-So-22.II / pCS.426.So.V
p22.rv	ATGATTCATGGACTATGGTTATTG	Konstruktion von p-So-22.II
p22.rv2	ATTGAATAAACGCTTTGCCAATG	Konstruktion von p-So-22.II / pCS.426.So.V; Integrationsnachweis von pCS.426.So.V _{XbaI}
p22.rv3	GTGGGCTGGTAGAATTATTAATG	Konstruktion von p-So-22.II / pCS.426.So.V
p22.rv4	TGGATACCTTAGACTAGTTTACCC	Konstruktion von p-So-22.II
PDA1.pop-in.rv4	CGGGCAAATTTAGAGCAC	Integrationsnachweis von Gen-Deletions- / -Disruptions-Kassetten mit clonNAT- Marker (bindet im <i>PcPDA1</i> -Promotor)
P-ENO-DES.rv	GTGTAATTGTAGCCATTGTGTAATGTGT ATATGTTTTATCG	Konstruktion von pCS.426.So.V
p-nat1.fw.BamHI	TCGGGATCCGTGATTAGCATATGGACAT ATTG	Konstruktion von pCS.p-nat1ΔIS.II
p-nat1.rv.BamHI	TCGGGATCCATGGTGCACTCTCAGTACA ATC	Konstruktion von pCS.p-nat1ΔIS.II
pSoll.fw	ATAGATTTGAGCTTTGTAGTTCTG	Konstruktion von pCS.426.So.V
pSoll.rv	TAATTAATGAAACTTTGGCATGTC	Konstruktion von pCS.426.So.V
pTDH3.pENO.fw2	CTTTATTGTGTTATGAGTCAGATCAAAC CACATCATGAG	Konstruktion von pCS.426.So.V
pTDH3.pENO.rv2	TGATGTGGTTTGATCTGACTCATAACAC AATAAAGCATCTG	Konstruktion von pCS.426.So.V
pTDH3.tDES1.fw	GACATGTAAGTGTGTCGGTGGTACCTA CATACAATTGAC	Konstruktion von pCS.426.So.V
RTA2.POI.fw	GAAGTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCC	Konstruktion von pCS.POI.ΔRTA2

ANHANG

	ATAATTCATTATCTTAGGTGTTGCTTGT G	
RTA2.POI.rv	CGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATT ATTTGTTTATTATCTTGAGCACCAGTTAG	Konstruktion von pCS.POI.ΔRTA2
RTA2.veri.fw	ACGTTCAAATGCAGATTTAGAAAG	Nachweis der Integration von pCS.POI.ΔRTA2 _{NdeI}
RTA2.veri.rv	AAGATTTGAACAGCTAATCC	Überprüfung der Disruption von <i>PcRTA2</i>
RT-ACT1.fw2	TTGGTAGACCAAGACATCAAGGTATC	qRT-PCR Primer für <i>PcACT1</i>
RT-ACT1.rv2	GTTCTTCTGGAGCAACACGTAATTC	qRT-PCR Primer für <i>PcACT1</i>
RT-GPM1.fw2	TACGTACGGTCAATCCGAATG	qRT-PCR Primer für <i>PcGPM1</i>
RT-GPM1.rv2	GTATGAGTAACCAGCATGTTCTAAGG	qRT-PCR Primer für <i>PcGPM1</i>
RT-LCB1.fw3	TTGGATGCCGGAACCTTTAG	qRT-PCR Primer für <i>PcLCB1</i>
RT-LCB1.rv3	GGACCACAAGCACCAACAC	qRT-PCR Primer für <i>PcLCB1</i>
RT-LCB2.fw2	CAACTTGTGGTGTCCAGGTAG	qRT-PCR Primer für <i>PcLCB2</i>
RT-LCB2.rv2	TTGGACCACCAGAACCAACAC	qRT-PCR Primer für <i>PcLCB2</i>
RT-SER3.fw2	ATTATCAGCTCCACAGTTTG	qRT-PCR Primer für <i>PcSER3</i>
RT-SER3.rv2	GTTAATTCTGAAGCCCAAGAG	qRT-PCR Primer für <i>PcSER3</i>
RT-TDH3.fw2	GTTTCGGTCGTATTGGTCGTTTAG	qRT-PCR Primer für <i>PcTDH3</i>
RT-TDH3.rv2	GGGATATTAAGTGGATCACGTTCTTG	qRT-PCR Primer für <i>PcTDH3</i>
RT-TMS1.fw2	GAACCTGGATTGCCAGTTGTTG	qRT-PCR Primer für <i>PcTMS1</i>
RT-TMS1.rv2	ACAGCAACTAGACCACAATCTTCAG	qRT-PCR Primer für <i>PcTMS1</i>
RT-TSC10.fw59	TCATTTCTGGTGGTTCTCAAG	qRT-PCR Primer für <i>PcTSC10</i>
RT-TSC10.rv59	AACCAGCACAACAAACAAC	qRT-PCR Primer für <i>PcTSC10</i>
RT-TSC3.fw	ATATTCATCTGCCATACTATTTG	qRT-PCR Primer für <i>PcTSC3</i>
RT-TSC3.rv	TATTTACCAGCACCGATAC	qRT-PCR Primer für <i>PcTSC3</i>
SLI1.CYC.rv	GGGAGGGCGTGAATGTAAGCGTGACAT AACTAATTTTATTATAATACCCATTGAT TGC	Konstruktion von pCS.426.SLI1
SLI1.HXT7.fw	AAAACAAAAAGTTTTTTAATTTAATCA AAAAATGGTGGCTGGACCAAAC	Konstruktion von pCS.426.SLI1
DoARS.fw	GGATCGGATCCCAATTAATCTTC	Konstruktion von pCS.nat.DoARS
DoARS.rv	TCAGGATCCGATTTGTCAATGTCTAATA TTG	Konstruktion von pCS.nat.DoARS
SYR2.pop-in.fwn	CTGCTGTACAAGCTGAACAAACTG	Integrationsnachweis für p-So-22.II _{XbaI} / pCS.426.So.V _{XbaI}
SYR-22.fw	AGGTACCACTGGGTAACTAGTCTAAG GTATCCAGTCATTATACCCAACATTATTA ATC	Konstruktion von p-So-22.II
SYR-22.rv	ACATTGCCCAACCGTTATAACGTACGGA GCTCTCCTGTGTACTAAACGTGATAAAT CC	Konstruktion von p-So-22.II

ANHANG

SYR-426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTAT GTTGAAGTGAAATAGACGTCATGAG	Konstruktion von p-So-22.II / pCS.426.So.V
SYR-426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGA AATACTCTAGAACTTCAGATCTACGAGC TTTAGAC	Konstruktion von p-So-22.II / pCS.426.So.V
SYR-Soll.fw	TATGTTTAATGACATGCCAAAGTTTCATT AATTAGTCATTATACCCAACATTATTAAT C	Konstruktion von pCS.426.So.V
SYR-Soll.rv	CCTAATTGATCAGAACTACAAAGCTCAA ATCTATCTGTGTACTAAACGTGATAAAT CC	Konstruktion von pCS.426.So.V
tDES1.pTDH3.rv	TTGTATGTAGGTACCACCGACGACAGTT ACATGTCAG	Konstruktion von pCS.426.So.V
T-ENO.T-RSB1.fw	ATCTCCATTAACCGAGATGACTAAGC ATTGGAATTGAG	Konstruktion von pCS.426.So.V
T-RSB1.T-ENO.rv	TTCCAATGCTTAGTCATCTCGGTTTTAAT GGAGATGTCAAAG	Konstruktion von pCS.426.So.V
T-RSB1.URA3.fw	AACTGGTCAAATATAGATTGGTATGAAT TAAACGTCCTG	Konstruktion von pCS.426.So.V
URA3.T-RSB1.rv	ACGTTTAATTCATACCAATCTATATTTGA CCAGTTCTTTTC	Konstruktion von pCS.426.So.V
YOR006.fw	GAAMGWTRTRCCWTAYTRGTYGC	Isolation der <i>upstream</i> Region von <i>PcLIG4</i>

Tab. A 4: Gezeigt sind die Primer für die Konstruktion von Gen-Deletionskassetten, sowie die Plasmide, die die Gen-Deletionskassetten trugen. Die Primer sind dabei in folgender Reihenfolge (von oben nach unten) angegeben: P1, P2, P3, P4 (s. Abb. M 1), Gen-spezifischer Primer für Integrationsnachweis, Gen-interner Primer zur Überprüfung der Deletion.

Gen / (GDB-ID)	Primernamen	Sequenz (5' -> 3')	Plasmid
Pc_1479	HXC7-17.fw	TCAAAAAGTTAACATGCATCACCATCACCATC ACAAACAAACATTATGTGCACCCAACC	pCS.426.ΔACT17
	17.LPNTL.rv	GTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACCATTGT GTATAGCGTTCCATTATC	
	17.LPNTL.fw	GTTATGAGCTCGAATTCATCGATGTCTCATGG GTCCACTAGTAATATC	
	17-CYC.rv	CATAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGT ATCATGAATTTGAAGAAGATTCTAAAC	
	17.pop-in.fw	AAGGACCAACTCCAAATCTTTTCAG	
	17.veri.rv	ATACCACCAATAACCAGAGATAAC	
Pc_5428 (1. Allel)	6.1-HXT7.fw	CAAAAAGTTAACATGCATCACCATCACCATCA CAAGCTTCACCTTCAGTCATTATTC	pCS.426.ΔACT6.1

ANHANG

	6.1-LPNTL.rv	GTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGC GCCATGAAATCTTATGGCAAATATTGG	
	6.1-LPNTL.fw	CTGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAT TTCTGGTGTGGTCTAGTTTATTG	
	6.1-CYC.rv	TAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTAT CGAATTGGATCTAATTGGTGAATG	
	6.pop-in.fw2	CCGACTGCAAAGATCCTCTAC	
	6.veri.rv	GGTTTCCAAACTTGACATTTATC	
Pc_5428 (2. Allel)	6.2-HXT7.fw	CAAAAAGTTAACATGCATCACCATCACCATCA CAGTTATACAAATCACAAGGCTTATAC	pCS.426.ΔACT6.2
	6.2-LPNTL.rv	AAGTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAA GCGCCACTGGTGGTGTGGATCAATTTGATC	
	6.2-LPNTL.fw	TGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATT TCCAAGTGCAAAGATTTAGGTAATG	
	6.2-CYC.rv	TAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTAT CACCCGCAATTTTTGATTTAAG	
	6.pop-in.fw2	CCGACTGCAAAGATCCTCTAC	
	6.veri.rv	GGTTTCCAAACTTGACATTTATC	
Pc_6875	5-HXT7.fw2	TCAAAAAGTTAACATGCATCACCATCACCATC ACAATATAATACATTGCTAACCATATTG	pCS.426.ΔAcTr5
	5-LPNTL.rv2	CTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGCCAC AAGACAATAACATTCATGATCAAG	
	5-LPNTL.fw2	GGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTCTTG ACTTATGCCACAATTATAAG	
	5-CYC.rv2	CATAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGT ATCAAATATCATCATTTGGTAAATATTC	
	5.pop-in.fw	ATGTTTCATAAGATCAAGAACCC	
	5.veri.rv	AAACCAAGTAACCACAATATC	
PcATF2	ATF2.426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTG ATCGGTATATTCGGATTTATATGC	pCS.426.ΔATF2
	ATF2.LPNTL.rv	TATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGC CAGTCATGTAGTATTAATGGTGATTTG	
	ATF2-LPNTL.fw	GCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTT CACATCACCAGAATCTATTGGAATTG	
	ATF2-426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATA CAGATTACCAGCTTAATGAAGTTACC	
	ATF2.pop-in.fw	ACCCACAATTCATGTAAGAATC	
	ATF2.veri.rv	GGTCTTAAATCCCAAACCAAATC	
PcAUR1	HXT-AUR1.fw	TTTTAATTTAATCAAAAAGTTAACATGCATCA CCATCACCATCACACAACCTGTGCCTTCAGA GACATTGG	pCS.426.ΔAUR1
	AUR1.rv	TATACGAAGTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGT	

ANHANG

		ACAGCACCCACCATTTCATTTCAC	
	AUR1.fw	TATACGAAGTTATGAGCTCGAATTCATCGATG AATAAAGCGATTCCGCTGTGTATTG	
	AUR1-CYC.rv	TGAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACATGA CTCGAGGTCGACGGTATCCACTCATTATAGCA GCAGCAATAGG	
	AUR1.pop-in.fw	TCACTTGAACCACGTTTAGGCTATG	
	AUR1.pop-in.rv	CAGTAGTACCACAAACAGTACAAAG	
PcCHA1	C1	CAAAAAGTTAACATGCATCACCATCACCATCA CAATCTAAGAGGTAAAGTTCAACATTC	pCS.426.ΔCHA1
	C2	GTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGC GCCATTGGTTTGCCGTGTGGATTG	
	C3	CTGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAT TTCGGAGTTCAACAACCGTTCAAG	
	C4	TAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTAT CATGAAGTTGATGCTGCTTTGG	
	CHA1.pop-in.fw	ATTTAGAAGCTAGAGGTTCCAGAAAG	
	CHA1.veri.rv	TAGAAGAATGACCATGCCATATAG	
PcCHO1	CHO1.426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTG GGCGCTATGACTAAGAATTGC	pCS.426.ΔCHO1
	CHO1.LPNTL.rv	TTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGC CATAATGGAGCGGCTTCTTCAG	
	CHO1.LPNTL.fw	TGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATT TCCATGGTTCTGCATTAATTTCTAAATC	
	CHO1.426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATA CGAAAGTTGGACTCAAGAAACATTATC	
	CHO1.pop-in.fw	GGCTAACACAAACCAATGTAAATC	
	CHO1.veri.rv	GTTGAACCGGCACTTTCTG	
PcCYS4	CYS4.426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTG TGATTGATATCGAGTCTTGTGATTG	pCS.426.ΔCYS4
	CYS4.LPNTL.rv	TTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGC CAGTGCAGTTACACGGCAAAG	
	CYS4.LPNTL.fw	TGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATT TCCAAGTGCTGTTGTTACTGATAAAG	
	CYS4.426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATA CTCAAATACAGCAGGTCATACTAAG	
	CYS4.pop-in.fw	GTTTCGTGTATATGTTGATGATTCC	
	CYS4.veri.rv	TTTAACACTACCACCAGCATTG	
PcDPL1	HXT7-DPL1.fw	TTTTAATTTAATCAAAAAGTTAACATGCATCA CCATCACCATCACACCTTCCGTGAGATTTCCCT TGTTTAC	pCS.426.ΔDPL1
	DPL1.rv	TATACGAAGTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGT	

ANHANG

		ATAACCCATAACCCAGTGATGTTAACC	
	DPL1.fw	TGCTATACGAAGTTATGAGCTCGAATTCATCG ATGACCACTGGTGTGTTGATCGTTTAG	
	CYC-DPL1.rv	TGAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACATGA CTCGAGGTCGACGGTATCCGACGGTAATGAG GATGTAAATGAG	
	DPL1.pop-in.fw	AAACAAGAGCAGCATGCAACTTGAG	
	DPL1.veri.rv	AGTGACACCAGGAACTCTAAAG	
PcFEN1	SUR42.426.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTG CTAATCAACCTCATTCTCATTCT	pCS.426.ΔFEN1
	SUR42.LPNTL.rv	TATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGC CAAACATTCAAGATCGATGAAGTTAC	
	SUR42.LPNTL.fw	GCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTT CTGGTTGTGCTATCTTGTTCATC	
	SUR42.426.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATA CCGGTATTGATCAGCCGTATTG	
	SUR4(2).pop-in.fw	AGACAATGAACATAATACCTAGATC	
	SUR4(2).veri.rv	CTGTAATCAATGTGGCAAATTC	
PcGCS1	CGS1.426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTG ACCAGTTTAAAGCGAGCTATAGTC	pCS.426.ΔGCS1
	CGS1.LPNTL.rv	TTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGC CAAACCGCCACCAAATGAAAC	
	CGS1.LPNTL.fw	TGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATT TCAGGACTGATTTATGTGCAGAAGAG	
	CGS1.426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATA CTCTAGATTCTAACCAGCTGTGAAC	
	CGS1.pop-in.fw	CCATGAAGTTAATGCTGAACTTG	
	CGS1.veri.rv	GTGACACCTTCCAGTATATCATC	
PcGPM1	dPGM1.426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTG CTCAAGTTCACCATGTTGAATAC	pCS.426.ΔGPM1
	dGPM1.LPNTL.rv	TATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGC CACATCAACCCAACCAGTGAATAAG	
	dGPM1.LPNTL.fw	TGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATT TCGCTGCTGTTGCTAACCAAG	
	dGPM1.426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATA CGTACTTCAAATGGTACAGCTGATG	
	GPM1.pop-in.fw	TTTTCCAAATTCTCCAAAGAGATAC	
	GPM1.pop-in.rv	CATGAGCAGCAATGATAACAG	
PcISC1	ISC1-HXT7.fw	CAAAAAGTTAACATGCATCACCATCACCATCA CACAGCAAGAGATTGTAACTCTTTACC	pCS.426.ΔISC1
	ISC1.rv	CGAAGTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACAA CTTAACCAGGTGGAAATCCAATC	

ANHANG

	ISC1.fw	TATACGAAGTTATGAGCTCGAATTCATCGATG TAAATTAGTGATTGGCCGCGCTAAC	
	ISC1-CYC.rv	TAAC TAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTAT CTATGGCTTGGGATTCTCGGGCTTTG	
	ISC1.pop-in.fw	ATAACCTTGTTTACCTCCTCAATC	
	ISC1.veri.fw	TTACAGGTCCTGGATTAGCTATAC	
PcLCB3	LCB3-426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTG CCACACTTAATTTAGTTCATCTC	pCS.426.ΔLCB3
	LCB3-LPNTL.rv	TATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGC CACAGTATCATTGAGTCTGGGAAAG	
	LCB3-LPNTL.fw	TGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATT TCTGTTTACATGTGGTGCATTCAAG	
	LCB3-426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATA CTTCATAGGACCGAAATCTTATCAG	
	LCB3.pop-in.fw	TCTTTCAGATAATGCAATCCATTC	
	LCB3.veri.rv	GTTGGATAATTACCGGAATCTG	
PcLCB4	HXT7-LCB4.fw	TTTTAATTTTAATCAAAAAGTTAACATGCATCA CCATCACCATCACACTCACAGAGTCAACTCCT GTATATTC	pCS.426.ΔLCB4
	LCB4.HXT7.rv	TGAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACATGA CTCGAGGTCGACGGTATCTCTGGCGGTATTG AACTTTGTGGAG	
	LCB4.rv	GTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTAAAGTGTA TGGATGGGTTGAAGTATGTCTTTATATC	
	LCB4.fw	ACGAAGTTATGAGCTCGAATTCATCGATGCTA CCC GG T G C T G C A A A G A C T T T A C T A A G	
	LCB4.pop-in.fw	GTGAATGGTTAATAGTGCGCTATG	
	LCB4.veri.rv	CTAACAAATACCACTTCGACATCAG	
PcLIG4	s. (SCHORSCH <i>et al.</i> , 2009)		
PcLYS2	LYS2.fw1	TTTTAATTTTAATCAAAAAGTTAACATGCATCA CCATCACCATCACAACCAGCGGATAGACTATT GAACAC	pCS.426.ΔLYS2
	LYS2.rv	ACGAAGTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACC TAACTACTCAATATTTGAGCCCAATG	
	LYS2.fw2	AGTTATGAGCTCGAATTCATCGATGTAGGGC GTTGATGCGTCAGCTGGTAGAGGTATTG	
	PcLYS2-CYC.rv	GAGCGGATGTGGGGGGAGGGCGTGAATGTA AGCGTGACATAACTAATTATTACAAGATAAGA AGGCAAATATG	
	LYS2.pop-in.fw	CTTTGTTTAAATCTGTATATG	
	LYS2.veri.rv	TGCAAAGACTGAAAGACCAATG	
PcORM12	ORM-426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTG	pCS.426.ΔORM12

ANHANG

		AACTATGTCAATATCGATCGTATG	
	ORM-LPNTL.rv	TATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGC CAAACAGAAATTGGTTCATGTGTTG	
	ORM-LPNTL.fw2	GCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTT CTGGTGTACCAATTTGGTTATTTT	
	ORM-426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATA CACAAGTACAACAACAACAGATTTAG	
	ORM1.pop-in.fw	TACCCACCTTTGACATAATCAG	
	ORM.veri.rv	ATTCAAATGGCGTACCTTTAAC	
PcRTA1	HXT7-RTA1.fw	AAAGTTAACATGCATCACCATCACCATCACAT ACTGAATGTGGCACTGTTTACTG	
	RTA1-LPNTL.rv	GTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCC CACCTGGAATTGAAGGATTATAG	pCS.426.ΔRTA1
	RTA1-LPNTL.fw	GTTATGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGC ATGGCAAGATCAAGATTCTTTAG	
	RTA1-CYC.rv	ACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCA AGGTCAATTCAGTAATACAAGAG	
	RTA1.pop-in.fw	TGAATGAAAGAATCTGACGAATCC	
	RTA1.veri.rv	CATTGAGGACTGTTGAATTATATG	
PcRTA4 + PcRTA44	HXT7-RSB1.fw	TTTTAATTTTAATCAAAAAGTTAACATGCATCA CCATCACCATCACACTGTCCTTTAATGTCGGC GCTTATG	
	RSB1.rv	AAGTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTATTAGG TAGCTGTTGCTATAATTTT	pCS.426.ΔRTA4
	RSB1.fw	GAAGTTATGAGCTCGAATTCATCGATGGAGA TATTAGACAAGCTAGTGAAAG	
	CYC-RSB1.rv	TGAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACATGA CTCGAGGTCGACGGTATCCATCAACAAGATC ATCCTCATGAAC	
	RSB1.pop-in.fw	AGATCTTTAACCGCTGGTGATATTG	
	RTA4r.veri.rv	TGTTGAAGAATCACCAGGATTTG	
PcRTM1 (1. Allel)	HXT7-RSB1o.fw	AAAGTTAACATGCATCACCATCACCATCACAG TTTCTACAATACACCATGTCTTC	
	RSB1o-LPNTL.rv	GTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGC GCCATATTGCACTATAATGATCTG	pCS.426.ΔRSB1
	RSB1o-LPNTL.fw	GTTATGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGA CTGATCGTGTCACTAGAAAATGTC	
	RSB1o-CYC.rv	ACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCA TTGGCACCTGAGATGAAGTAGAC	
	oRSB1.pop-in.fw	TGTGAACATGTCAGATGTTGATAG	
	oRSB1.veri.rv	CGATTTGTATCAGGATAATTC	
PcRTM1	HXT7-oRSB1.2.fw	AAAGTTAACATGCATCACCATCACCATCACAA	pCS.426.ΔRSB1.2

ANHANG

(2. Allel)		ATTCTCAGGGAACCCAGCAGGAG	
	oRSB1.2-LPNTL.rv	TCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGCCA GGCAATTTGTAAACCCAAAGAAAC	
	oRSB1.2-LPNTL.fw	CGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTCC ACAATGTACGTTGTTTCAATAATG	
	CYC-oRSB1.2.rv	ACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCG TACCTGAGGTATAGCGAGCTTTG	
	oRSB1.pop-in.fw	TGTGAACATGTCAGATGTTGATAG	
	oRSB1.veri.rv	CGATTTGTATCAGGATAATTC	
PcSAC1	SAC1.426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTG CCTCGGTACTIONCGCATTGTC	pCS.426.ΔSAC1
	SAC1.LPNTL.rv	TATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGC CATGACGGATCTGACCAACTTC	
	SAC1.LPNTL.fw	GCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTT CATTCACTCAACTGCTGTTAAGAAAG	
	SAC1.426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATA CGTGAAGCTTTAATGAGAGCTAGTG	
	SAC1.pop-in.fw	TTCCGAGGTGGTCCAATTC	
	SAC1.veri.rv	TCACTGGCAACGTAATAATTC	
PcSCH9	SCH9-426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTG GGTTGTTGGTAGGAGTGAATC	pCS.426.ΔSCH9
	SCH9-LPNTL.rv	TTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGC CAGAATCCACCAAAGCCAAATAATG	
	SCH9-LPNTL.fw	TGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATT TCCCACATTTACCTCCAACAGAAG	
	SCH9-426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATA CACAATTAGTGGTGGAAAATCATAG	
	SCH9.pop-in.fw	AAATTTGCCTTTGAACTGATAGC	
	SCH9.veri.rv	CCCGATGAAGACATTGATTGAG	
PcSCS7	SCS7.426.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTG TCGGACCATTTGGAAAGTGAG	pCS.426.ΔSCS7
	SCS7.LPNTL.rv	TTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGC CAAACACCCGCGTTATACGATG	
	SCS7.LPNTL.fw	TGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATT TCTGGCATTGGGATAAAGTATTTGG	
	SCS7.426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATA CTGGAAACCAATTCAATTACCAAATG	
	SCS7.pop-in.fw	TCCAGCATTCACTCTCGTTAC	
	SCS7.veri.rv	GTTATAAAGGGAAACCCAAACATC	
PcSER3	dS3.426L	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTG AAGTTGAAATGTTGTGCTATACG	pCS.426.ΔSER3

ANHANG

	dS3.LPNTL.rv	TATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGC CATTGACTCAAGCCCATTAATTTTC	
	dS3.LPNTL.fw	TCGAATTCATCGATGATATCAGATCCACTAGT GCAACAACAACATACATGCAATTC	
	dS3.426R	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATA CTAAATTAGCAAGGGCCAAATATG	
	dSER3.pop-in.fw	GGTCCGAAATGAGTAAAGTTG	
	SER3.verip.rv	GAGAAGTTGACACAGCATTTG	
PcSHM1	SH11	CAAAAAGTTAACATGCATCACCATCACCATCA CACTAACCCAACTAGGCTCATTAAC	pCS.426.ΔSHM1
	SH12	GTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGC GCCATCAGCCATTTCTGGATCAATTTTC	
	SH13	TGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATT TCATCCAGTTCAGGTGAATTATAAG	
	SH14	TAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTAT CCCATACTATGCTTGGCATCTTAAAC	
	SHMT1.pop-in.fw	TTGATAGGGCAAATTCTCCAAC	
	SHMT1.veri.rv	TTCACCTGGATAACCTTCTG	
PcSHM2	SH21	CAAAAAGTTAACATGCATCACCATCACCATCA CATGTCCTTGCAGGTGGTATTC	pCS.426.ΔSHM2
	SH22	TTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGC CAGGTAAAGCGTATGGCATGTTG	
	SH23	CTGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAT TTCGCTGGTGAATTCCATTATCTG	
	SH24	TAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTAT CCATAACCATCTAAAGCATTATAGTC	
	SHMT2.pop-in.fw	AAGTTTCAGCAAATGGTTTGAC	
	SHMT2.veri.rv	TATCTTGCACCTGGATAACC	
PcSLD1	D8D.HXT7.fw	AAAAAGTTAACATGCATCACCATCACCATCAC AAGAGGAAGAGACAGGACGTTAAGAG	pCS.426.ΔD8D
	D8D.rv	ATACGAAGTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTA TGGACATTTGAACTCTTTCCTAACC	
	D8D.fw	TATACGAAGTTATGAGCTCGAATTCATCGATG TGAAAGGGAACTGAAAGACTAGAAG	
	D8D.CYC.rv	ATAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTA TCAAGTGTTTAAAGAGGCTCCATGTTG	
	D8D.pop-in.fw	CCCTTTCTACAGAGAATTGGTTATC	
	D8D.veri.rv	TGAGATATGACCTGCATCATGTG	
PcSLI1	SLI1-426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTG CATGTACTCCCGTAAACTACCTG	pCS.426.ΔSLI1
	SLI1-LPNTL.rv	TATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGC CACCAAGCTTTCAAAGTGGTCTTC	

ANHANG

	SLI1-LPNTL.fw	GCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTT CGAAATGCAATCAATGGGTATTATG	
	SLI1-426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATA CATGTAAGTTCATGTCTTGCTATTC	
	SLI1.pop-in.fw	TTCTCCTTCTCCAGCTAGTC	
	SLI1.veri.rv	CAGACCAACCATTTATCTCTTC	
PcSUR4	SUR41.426.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTG GGTTCTCAAGGTTCAACAATTC	pCS.426.ΔSUR4
	SUR41.LPNTL.rv	TATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGC CACTGAAGGGATTTGGAAATCTAAAG	
	SUR41.LPNTL.fw	GCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTT CTGCACCAAATGGTAGAAGAAG	
	SUR41.426.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATA CACAGATATTGAAGGCGAAGAAG	
	SUR4(1).pop-in.fw	AGCTCCAGAACCCTTAAAGTC	
	SUR4(1).veri.rv	AATGGCAACTGGTGTGAATG	
PcSYR2	SYR2-HXT7.fw2	TTTTAATTTTAATCAAAAAGTTAACATGCATCA CCATCACCATCACACAATCGTAGAATCGCATT CATGTTCC	pCS.426.ΔSYR2
	SYR2.rv2	AGTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACATAAC ACTCAACGGACCTTGTGATG	
	SYR2.fw2	GAAGTTATGAGCTCGAATTCATCGATGGTCAT TATACCCAACATTATTAATC	
	SYR2-CYC.rv2	GAGCGGATGTGGGGGGAGGGCGTGAATGTA AGCGTGACATAACTAATTAACCTCAGATCTAC GAGCTTTAGAC	
	SYR2.pop-in.fwn	CTGCTGTACAAGCTGAACAAACTG	
	SYR2.wt-veri.fw	GATTAATGGCATAACCGATAAC	
PcTMS1	dTMS1.426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTG GAAATTCGAAACCAGCTATAAAC	pCS.426.ΔTMS1
	dTMS1.LPNTL.rv	TTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGC CAATTTGGAAAGGTAGTGATACTATTG	
	dTMS1.LPNTL.fw	TGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATT TCCTCCAGTATTAATGCCAGAAAG	
	dTMS1.426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATA CGAAAACCGTGAGTATCTTAAGTC	
	TMS1.pop-in.fw	CCGAGCTTATAGAGCTAAGTACTG	
	TMS1.pop-in.rv	CTTATTCATTGAGCATCCATCATTAC	
PcTRP5	TRP5.426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTG CTCAGATCCCATTCTTATTCAG	pCS.426.ΔTRP5
	TRP5.LPNTL.rv	TATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGC CACCTTTCATTATTGGGACGGTATC	

ANHANG

	TRP5.LPNTL.fw	GCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTT CATGTTTCAGGTAGAGGTGATAAAG	
	TRP5.426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATA CTTAACACCACAAATTGCACAAAG	
	TRP5.pop-in.fw	TAGAAGGATCATGGGCAATGAG	
	TRP5.veri.rv	CACCCAATTTCGATGACATCAAC	
PcURA3	s. (SCHORSCH <i>et al.</i> , 2009)		
PcYXC1 (1. Allel)	YXC-HXT7.fw	TTTTAATTTTAATCAAAAAGTTAACATGCATCA CCATCACCATCACACAGTGTATGGGAATATAC TTAAAC	pCS.426.ΔYXC1.1
	YXC-LPNTL.rv	CGAAGTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACTG ATGGTAAACTGATTATCCTATTG	
	YXC-LPNTL.fw	CGAAGTTATGAGCTCGAATTCATCGATGAATA CGTTCCTGGGAGTCAATTTAC	
	YXC-CYC.rv	TGAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACATGA CTCGAGGTCGACGGTATCCATGTCTTACTAA TGCCTTCATAC	
	YXC.pop-in.fw	CTGCTTATGTCAGGGATTATGTAAC	
	veri.YXC1.rv	AAACATGCCACCAAGCATGTAATTC	
	PcYXC1 (2. Allel)	HXT7-2YXC1.fw	
2YXC-LPNTL.rv		AAGTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACACCA ACTTCCCACACCAAC	
2YXC-LPNTL.fw		AGTTATGAGCTCGAATTCATCGATGCCTTATG GTTTCCTATTAGAATTAC	
2YXC1-CYC.rv		CATAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGT ATCATCAAATAATCATGCCATTTGAAC	
YXC.pop-in.fw		CTGCTTATGTCAGGGATTATGTAAC	
veri.YXC1.rv2		ACTCCACATTGGGATACAAG	

Tab. A 5: Die folgende Tabelle zeigt die verwendeten Primer P5 - P10 (vgl. Tab. M 4 und Abb. M 2) für die Konstruktion von integrativen Kassetten für Promotor-Susbtitionen, sowie Primer für den Integrationsnachweis. Die Primer sind dabei in folgender Reihenfolge (von oben nach unten) angegeben: P5, P6, P7, P8, P9, P10, Promotor-spezifischer Primer für Integrationsnachweis, Gen-spezifischer Primer für Integrationsnachweis (und ggf. Primer zur Überprüfung der Deletion des nativen Promotor-Bereichs). Des Weiteren sind die Plasmide gezeigt, die die integrativen Kassetten trugen.

Gen	Primername	Sequenz (5' -> 3')	Plasmid
-----	------------	--------------------	---------

ANHANG

PcACC1	pACC1.426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTGAG CGGTTAGATCAATTCATTTTC	pCS.426.ACC1oe
	pACC1.LPNTL.rv	TATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGCCAA TTCTTTGTTAATGTGGGATTAAG	
	P-ENO.LPNTL.fw	GCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTCCA GATCAAACCACATCATGAG	
	P-ENO.rv	TGTGTAATGTGTATATGTTTTATCGAATTG	
	ACC1.LPNTL.fw	ACTCAATTCGATAAAAACATATACACATTACACAAT GAGTGAAGAAAATTTGAGTGAAG	
	ACC1.426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATACCC TGGAGGACCAATGAATAAG	
	P-ENO.veri.fw	GTCTAACGGTGGGAAATTG	
	ACC1.pop.veri.rv	ATGGAACATCAGCATGTTGAG	
PcATF2	ATF2.426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTGAT CGGTATATTCGGATTTATATGC	pCS.426.ATF2oe
	ATF2.LPNTL.rv	TATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGCCAG TCATGTAGTATTAATGGTGATTTG	
	TDH3-LPNTL.fw	GTTATGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGGGA CCGTTAATTACCAACAATCTC	
	P-TDH3.rv	TGTTAATTAATTTTGTGGTTGTTG	
	ATF2.P-TDH3.fw	AAAACAAACAAACAAACAAATAATTAATTAACAG TGAATATATTTTTTCAAGGGCCC	
	ATF2.426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATACG GTCTTAAATCCCAAACCAAATC	
	P-TDH3.pop.fw	AACTGACGTTTCAAGAACATC	
	ATF2.pop-in.rv	GAACACGATATCATCATCATCAC	
PcCHA1	CHA1s.426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTGCA GCTGATCTAAGAGGTAAAGTTCAACATTC	pCS.426.CHA1s
	CHA1s.LPNTL.rv	GCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTCTT GCCGTGTGGATTGTTAAG	
	P-PGI1.LPNTL.fw	TTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGCCA GGGAACTGACTTCCAACAATC	
	P-PGI1.CHA1.rv	CTTTTGTGATTGTCATTGTTAATTGATATATTAGA GCAATTGAG	
	CHA1.PGI1.fw	CTAATATATCAATTAACAATGACAATCACAAAAG ATCATAAAG	
	CHA1s.426R.rv	TTGCCAGTATTCTTAACCCAACTGCACAGAACCA GCTGATGAAGTTGATGCTGCTTTG	
	P-PGI1.fw	TTTCTGACTAAGCGCCCAAC	
	CHA1.veri.rv	GCCACCAATGAAGAGATTTAAAG	
	CHA1.pop-in.fw	ATTTAGAAGCTAGAGGTTCCAGAAAAG (Verifikation der <i>PcCHA1</i> Promotor-Deletion)	

ANHANG

PcGPM1	GPM1.426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTGAC ATTCGACTATTATCTGGTAATTC	pCS.426.GPM1dr
	GPM1.LPNTL.rv	TATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGCCAG AATCGCGAACGTCAATATAAG	
	P-ACT1.LPNTL.fw	GCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGATTAATTTCCA ACATTCTCAAAGGAGTTGATTC	
	P-ACT1.GPM1.rv	TTGACCGTGACGTAAAAGAATTAATTTTGGCATA CCAGAACC GTTATCAATAACTAAC	
	GPM1.P-ACT1.fw	GTTAGTTATTGATAACGGTTCTGGTATGCCAAAA TTAATTCTTTTACGTC	
	GPM1.426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATACA GCTGGATCAATTAAGCATAAC	
	P-ACT1.veri.fw	GAAGAAATTGCAGCTGTAAGTG	
	GPM1.pop-in.rv	CATGAGCAGCAATGATAACAG	
PcISC1	ISC1ü.426L	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTGTTCT TTGCCTTCTTTCATTAACCTTG	pCS.426.ISC1oe
	ISC1ü.LPNTL.rv	TTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGCCA AAAGTTACCCGCCAAACGC	
	TDH3-LPNTL.fw	GTTATGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGGGA CCGTTAATTACCAACAATCTC	
	P-TDH3.rv	TGTTAATTAATTATTTGTTTGTTTG	
	ISC1ü.P-TDH3.fw	AAAACAAACAAACAAACAAATAATTAATTAACAA TGGTCATGTCAGAGTCAGAATC	
	ISC1oe.426R	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATACC ATGTATAAGCAGCATCACCTTC	
	P-TDH3.pop.fw	AACTGACGTTTCAAGAACATC	
	ISC1.veri.rv	TCTAAAGCTCTTATTTTACAGATCTTC	
PcLCB1	LCB1.426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTGGG ACTGCTACACTCCAAATATG	pCS.426.LCB1oe
	LCB1.LPNTL.rv	TTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGCCA TAATAGAAGAAACACGTCAAATACC	
	P-ENO.LPNTL.fw	GCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGATTAATTTCCA GATCAAACCACATCATGAG	
	LCB1.P-ENO.rv	GTAGCAGTGACGTTTATTGTGTAATGTGTATATG TTTTATC	
	P-ENO.LCB1.fw	CATATACACATTACACAATGAACGTCCTACTGCTACA AC	
	LCB1.426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATACA CAAGCACCAACACCATTAC	
	P-ENO.veri.rv	GTTGTGCGTGGCTTGAC	
	LCB1üe.veri.rv	ATAATACAGCACCACCACTTC	
PcLCB2	LCB2-426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTGGG	pCS.426.LCB2oe

ANHANG

		CCATGAGATGACTTTGTACG	
	LCB2-LPNTL.rv	TTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGCCA GTTCTTGTGTTGAATTCGCGTTTG	
	TDH3-LPNTL.fw	GTTATGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGGGA CCGTTAATTACCAACAATCTC	
	P-TDH3.rv	TGTTAATTAATTATTTGTTGTTTG	
	LCB2.P-TDH3.fw	ACAAACAAACAAACAAATAATTAATTAACAATGT CATTGGTAATACCTCAAATAG	
	LCB2-426R.rv	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATACA AAGCGGCTTGAGTACATGC	
	P-TDH3.pop.fw	AACTGACGTTTCAAGAACATC	
	LCB2üe.veri.rv	ATAAACTTGCATTTGTTGCATACC	
PcSER3	S31	CAAAAAGTTAACATGCATCACCATCACCATCACA ATGTTGTGCTATACGATATAGTTC	pCS.426.SER3oe
	S32	GTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGCC ATTGACTCAAGCCCATTAATTTTC	
	LPNTL.P-TDH3.fw	GCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGATTAATTTCTT GACCCATAGTAAACTAATAACTC	
	P-TDH3.rv	TGTTAATTAATTATTTGTTGTTTG	
	S33	CAAAAACAAACAAACAAACAAATAATTAATTAAC AATGGCTTCTCCACAACAATC	
	S34	TAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCC AGCAATAACTAATTCAGCAACAG	
	P-TDH3.pop.fw	AACTGACGTTTCAAGAACATC	
	SER3.pop-in.rv	ACTTCCAACATTTAGCACTAAC	
PcSLI1	SLI1-426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTGCA TGTACTCCCGTAAACTACCTG	pCS.426.SLI1oe
	SLI1üe.LPNTL.rv	TTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGCCA TTAAGAAGTTGTACCCAGAATTG	
	TDH3-LPNTL.fw	GTTATGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGGGA CCGTTAATTACCAACAATCTC	
	P-TDH3.rv	TGTTAATTAATTATTTGTTGTTTG	
	SLI1.TDH3.fw	AAAAACAAACAAACAAACAAATAATTAATTAACA ATGGTGGCTGGACCAAAC	
	SLI1üe.CYC.rv	TAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCG TGCAGTGTCCCATCATATAAG	
	P-TDH3.pop.fw	AACTGACGTTTCAAGAACATC	
	SLI1üe.veri.rv	CAACTGGGATATCACGATCATTC	
PcSYR2	SYR2oe.426L	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTGAA AGTGTAATAGACGTCATGAG	pCS.426.SYR2oe
	SYR2oe.LPNTL.rv	TTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGCCA	

ANHANG

		CTGTGTAACCGTGATAAATCC	
	TDH3-LPNTL.fw	GTTATGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGGGA CCGTTAATTACCAACAATCTC	
	P-TDH3.rv	TGTTAATTAATTATTTGTTTGTGTTG	
	SYR2oe.P- TDH3.fw	AAAACAAACAAACAAACAAATAATTAATTAACAA TGAGCTCTCATCAGTTTTTG	
	SYR2oe.426R	ATATCAGTTATTACCCTATGCGGTGTGAAATACA AGACGATGATGTCTTGAATG	
	P-TDH3.pop.fw	AACTGACGTTTCAAGAACATC	
	SYR2oe.veri.rv	AGTAACAATTGCAGCAATACC	
PcTMS1	HXT7-TMS1.fw	CAAAAAGTTAACATGCATCACCATCACCATCACA CCAAGTCATTATCCCAAAGAAC	
	TMS1-LPNTL.rv	ATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGCCATG TCGGATGACTAGTAAATAGTG	
	LPNTL.P-TDH3.fw	GCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTCTT GACCCATAGTAACTAATAACTC	pCS.426.TMS1oe
	P-TDH3.rv	TGTTAATTAATTATTTGTTTGTGTTG	
	LPNTL-TMS1.fw	AAAACAAACAAACAAACAAATAATTAATTAACAA TGGGTGCAATAGTACTACTAC	
	TMS1-CYC.rv	TAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCA GTTTCAGCCCATTTCATGAG	
	P-TDH3.pop.fw	AACTGACGTTTCAAGAACATC	
	TMS1.pop-in.rv	CTTATTCATTGAGCATCCATCATTAC	
PcTSC3	TSC3-HXT7.fw	CAAAAAGTTAACATGCATCACCATCACCATCACAT CCAGCGTTGATTCTGGATAATAC	
	TSC3-LPNTL.rv	GTTATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCTGC GCAATACCTTAACAAACATCC	
	TDH3-LPNTL.fw	GTTATGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGGGA CCGTTAATTACCAACAATCTC	
	TDH3-TSC3.rv	ACAAATGTTCCCGCCATTGTTAATTAATTATTTGT TTGTTG	pCS.426.TSC3oe
	TDH3-TSC3.fw	ACAAATAATTAATTAACAATGGCGGGAACATTTG TTTATGAA	
	TSC3-CYC.rv	TAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCT CCAATAATCCTGGTATTGTAAC	
	P-TDH3.pop.fw	AACTGACGTTTCAAGAACATC	
	TSC3üe.pop-in.rv	AAGGTAACAAAGCCTACAATAAC	
PcTSC10	P-TSC10.426L.fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTGCC ATTGAACGTGAACAATTCAG	
	P-TSC10.LNPTL.rv	TATCTGCAGGTTACCCAGTGGTACGAAGCGCCAT CCTGTTCTGTATTTCCCATAG	pCS.426.TSC10oe

ANHANG

TDH3-LPNTL.fw	GTTATGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGGGA CCGTTAATTACCAACAATCTC	
P-TDH3.TSC10.rv	CCTTTAGTAAACCACATTGTTAATTAATTATTTGTT TGTTTG	
TSC10.P-TDH3.fw	ACAAATAATTAATTAACAATGTGGTTTACTAAAG GTCATTTC	
TSC10.426.rv	TTGCCAGTATTCTTAACCCAAGTGCACAGAAGT AAGGTGCATATTGACCATAAC	
P-TDH3.pop.fw	AACTGACGTTTCAAGAACATC	
TSC10.pop-in.rv	TCAGCTAGGGCACGAAC	

Tab. A 6: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primer für die Konstruktion von *pop-in* Plasmiden für die Disruption von putativen Acetyl-Transferase- (AcTr-) Genen. Die Restriktions-Endonukleasen in Klammern, sind jene mit denen die Disruptions-Plasmide vor einer Transformation linearisiert wurden. Für jedes putatives AcTr-Gen sind vier Primer gelistet: mit den ersten beiden wurde ein PCR-Produkt erhalten, was im Zuge der Disruptions-Plasmid-Konstruktionen in den Vektor pCS.425.LP-lacZ_{EcoRV/EcoRI} kloniert wurde; Dritter Primer: Gen-spezifischen Primer A. Vierter Primer: Gen-spezifischen Primer B; GDB-ID: GenDB-Identifikations-Nr.

AcTr-Gen (GDB-ID)	Primernamen	Sequenz (5' -> 3')	Disruptions-Plasmid (Restriktions-Enzym)
Pc_584	12.fw	GAAGTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTT GGATCCACCAGGTATCAAGTTAAG	pCS.dACT12 (<i>HincII</i>)
	12.rv	CGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGC CATATGAATAATGTTCTCTAGTTC	
	12.pop-in.fw	AGACAAGGCTTGCTGGCTTAAAC	
	12.veri.rv	GAGTGGGTTTGACCATTATTG	
Pc_616	13.fw	GAAGTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTTG GTAATGTTAGAGTCGCTCCTTTG	pCS.dACT13 (<i>BstEII</i>)
	13.rv	CGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGG CACCACCAACAACAATTGCTAATG	
	13.pop-in.fw	CTGCCAAAGAACATACAGATCTC	
	13.veri.rv	TAGATTCAGGTCTTGCTAATAAGG	
Pc_745	3.fw	GAAGTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTA CTTTGGGTTGATTACTACAGG	pCS.dACT3 (<i>BamHI</i>)
	3.rv	CGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGA GGCCATGGTAAAGAACCCAAATC	
	3.pop-in.fw	CATTGTCCCTGGACTGCAAAGT	
	3.veri.rv	TCTCGTAACAACAGTTTCATTATC	
Pc_770	9.fw	GAAGTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTTG ATATTACTGGTCTCAAATGGTTC	pCS.dACT9 (<i>NcoI</i>)
	9.rv	CGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGT GGAACCTTTAGGTGTAATACCATC	

ANHANG

	9.pop-in.fw	TATGGGTCATTTAGCTATGAATC	
	9.veri.rv	ATAAGCTAAAGCCAATTGAGTAAC	
Pc_1301	19.fw	GAAGTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTA AGCTCCATTAGGTGCATATAAGG	pCS.dACT19 (<i>KpnI</i>)
	19.rv	CGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGT ATAGTCTGCCAACTATGTAATG	
	19.pop-in.fw	GGTGGTGGCGGTTATATTGTTTCC	
	19.veri.rv	CACGGACTAAACTTCAAATAAC	
Pc_1331	15.fw	GAAGTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTT TACCGATTAAAGCTGGTGTTTCC	pCS.dACT15 (<i>PmlI</i>)
	15.rv	CGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGC ATATGTAGTAGAGATTAATAATG	
	15.pop-in.fw	CCAGAAGGTGGTAGTCATGATAG	
	15.veri.rv	GGATGAGATTAAAGGTGGTAATG	
Pc_2136	8.fw	GAAGTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTA TTAAAGAATGGTGC GGATCCTAC	pCS.dACT8 (<i>PvuII</i>)
	8.rv	CGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGG TTAGCACCATTTGCAGCACGTTTG	
	8.pop-in.fw	TTGGGCTTGTCGTTATGGTCTGG	
	8.veri.rv	GTATTAGAATCACCACCGCTAAG	
Pc_3463	16.fw	GAAGTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTA GGGTTAATTGGATTACCCAGTTC	pCS.dACT16 (<i>StyI</i>)
	16.rv	CGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGA ATCTTCTTG CAGCTTGAACAACC	
	16.pop-in.fw	AGTATTTGGTGTGGTCAATTTAG	
	16.veri.rv	AACTTGTGCAGCATTATTAACCTC	
Pc_3915	1.fw	GAAGTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTT AGAGGTGGCATGCTCGTGATTAC	pCS.dACT1 (<i>NdeI</i>)
	1.rv	CGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGT TGAAGCAACGAAGTTTGGTAGTG	
	1.pop-in.fw	GATACCAGCAATCTCATTATGTG	
	1.veri.rv	CCATATGAGTAAGCCTGTAATTG	
Pc_5119	11.fw	GAAGTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTT TAGCCATCGTGACTTCACAATTC	pCS.dACT11 (<i>HpaI</i>)
	11.rv	CGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGG GCCATGAAAGATGTTGTTCTTCAC	
	11.pop-in.fw	GTCACGATATTGGGTATCGCAAAG	
	11.veri.rv	TGCACTCATATTTGTACCTTCTG	
Pc_6325	10.fw	GAAGTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTA AACAATCAACTCCACAACCTCATC	pCS.dACT10 (<i>BstEII</i>)
	10.rv	CGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGC	

ANHANG

		CCTAAGAGCATTAAACCAGTTC	
	10.pop-in.fw	TATCGCACAGTCCACAAATATAG	
	10.veri.rv	TGACCATTTAGCAACGTAATAAC	
Pc_7050	14.fw	GAAGTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTT GGTGTTAGTGTACAGTTATTG	pCS.dACT14 (NcoI)
	14.rv	CGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGT CCCAAATTAATACCAAACCAAG	
	14.pop-in.fw	TTTAGATCATTAGCTACCAAGAC	
	14.veri.rv	ATTGCCACTAAAGGTAATTGAAAC	
Pc_7175	18.fw	GAAGTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTA CTTTCTTAGCTGCTACTGTCTTG	pCS.dACT18 (AflII)
	18.rv	CGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGG GATAACTGGAATACCAGCTTGTG	
	18.pop-in.fw	ATGGGATTCTTGAAAGCTGTC	
	18.veri.rv	TCACAATTTCACTTTCAAATG	
Pc_7333	20.fw	GAAGTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTT TAAACAATACTGATGAATTAAC	pCS.dACT20 (NdeI)
	20.rv	CGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGC CCAATAAATCTAGGAGAATTAAC	
	20.pop-in.fw	ATGGCTGGTGAATTGTTCAAGTGG	
	20.veri.rv	AACTTGATTTGATTTGGGATCTG	
Pc_7424	2.fw	GAAGTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTA TCAGAATTAAGAATTGCCAGAGG	pCS.dACT2 (NdeI)
	2.rv	CGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGG TCCGTTATAATCTAATGGATGAG	
	2.pop-in.fw	TCCTAAAGGTTCTGAAGAATATG	
	2.veri.rv	AGCACCAAGCCAAACATAATCAC	
Pc_7779	7.fw	GAAGTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTA TCATTCTAAATCAACAGGAATTG	pCS.dACT7 (AclI)
	7.rv	CGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGC CAACCAATAACGGCAACATAAAC	
	7.pop-in.fw	ATGACGGACTGGAGACATGC	
	7.veri.rv	CGTCTCATATCATCAATGGAAGTC	

ANHANG

GenDB-ID	AS	annotierte Funktion	Dis. / Del.	put. TMHs	EC-Nummer	ER-Lokalisation	bestere BLAST-Treffer
Pc_584	641	Phospholipid:Diacyl-Glycerol-Acyl-transferase	Dis.	1	2.3.1.158	✓	60% (<i>S. cerevisiae</i>)
Pc_616	426	Diacylglycerol-O-Acyl-Transferase	Dis.	1	2.3.1.20	✗ (Lipidtröpfchen)	52% (<i>E. gossypii</i>)
Pc_745	331	Palmitoyl-Transferase	Dis.	2	2.3.1.-	?	48% (<i>D. hansenii</i>)
Pc_770	584	O-Acetyl-Transferase	Dis.	6	2.3.1.-	✓	50% (<i>S. cerevisiae</i>)
Pc_1301	625	γ-Glutamyl-Transpeptidase	Dis.	1	2.3.2.2	✗ (Vakuole)	50% (<i>S. cerevisiae</i>)
Pc_1331	685	Glycerol-3-Phosphate O-Acyl-Transferase	Dis.	4	2.3.1.42	✓	48% (<i>S. cerevisiae</i>)
Pc_1479	312	1-Acyl-Glycerol-3-Phosphate-O-Acyl-Transferase	Del.	1	2.3.1.51	✗ (Cytoplasma)	31% (<i>S. cerevisiae</i>)
Pc_2136	703	Palmitoyl-Transferase	Dis.	5	2.3.1.-	?	44% (<i>S. kluyveri</i>)
Pc_3463	680	Glycerol-3-Phosphate-O-Acyl-Transferase	Dis.	4	2.3.1.42	✓	54% (<i>S. cerevisiae</i>)
Pc_3915	495	Inositol-Acyl-Transferase	Dis.	10	2.3.-.-	✓	51% (<i>S. cerevisiae</i>)
Pc_3959*	173	Palmitoyl-Transferase	Dis.	2	2.3.1.-	✓	39% (<i>G. zeae</i>)
Pc_5119	408	Acyl-Transferase	Dis.	3	2.3.1.15	✗ (Lipidtröpfchen)	41% (<i>S. cerevisiae</i>)
Pc_5428**	355	Palmitoyl-Transferase	Del.	4	2.3.1.-	✗ (Vakuole)	39% (<i>S. cerevisiae</i>)
Pc_6325	528	Acetyl-CoA-Transporter	Dis.	10	2.3.1.-	?	38% (<i>S. pombe</i>)
Pc_6875	256	Palmitoyl-Transferase	Del.	3	2.3.1.-	✓	39% (<i>C. albicans</i>)
Pc_7050	571	Acyl-CoA:Sterol-Acyl-Transferase	Dis.	7	2.3.1.26	✓	49% (<i>S. cerevisiae</i>)
Pc_7175	290	1-Acyl-Glycerol-3-Phosphate-O-Acyl-Transferase	Dis.	1	2.3.1.51	✗ (Lipidtröpfchen)	48% (<i>S. cerevisiae</i>)
Pc_7333	364	Glutaminyl-Peptid-Cyklotransferase	Dis.	1	2.3.2.5	?	36% (<i>S. cerevisiae</i>)
Pc_7424	220	Acetyl-Transferase	Dis.	1	2.3.1.-	?	42% (<i>S. pombe</i>)
Pc_7779	265	Palmitoyl-Transferase	Dis.	4	2.3.1.-	?	34% (<i>S. cerevisiae</i>)

Tab. A 7: Aus GenDB extrahierte Gene mit putativer Acetyl-Transferase-Funktion und Transmembrandomäne. Die hypothetischen Proteinsequenzen wurden via BLAST-Analyse mit der SwissProt-Datenbank verglichen, wobei die jeweils besten Treffer angegeben sind (hypothetische Proteine, Proteine mit unbekannter Funktion etc. wurden dabei ausgeschlossen). Die ER-Lokalisation bezieht sich auf die Lokalisation der homologen Proteine aus *S. cerevisiae*. (AS: Aminosäuren; Dis.: Disruption; Del.: Deletion; ER: endoplasmatisches Retikulum; put. TMHs: putative Transmembrandomänen). * Für Pc_3959 konnte kein Disruptions- / Deletions-Konstrukt erstellt werden ** Von Pc_5428 existieren zwei Allele im Genom von *P. cijferrii*.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- ABURAI, K., S. YOSHINO, K. SAKAI, H. SAKAI, M. ABE, N. LOISEAU, . . . K. SAKAMOTO (2011). Physicochemical analysis of liposome membranes consisting of model lipids in the stratum corneum. *J Oleo Sci* **60**: 197-202.
- AHN, Y. T., X. L. WU, S. BISWAL, S. VELMURUGAN, F. C. VOLKERT & M. JAYARAM (1997). The 2microm-plasmid-encoded Rep1 and Rep2 proteins interact with each other and colocalize to the *Saccharomyces cerevisiae* nucleus. *J Bacteriol* **179**: 7497-7506.
- ALBERS, E., V. LAIZE, A. BLOMBERG, S. HOHMANN & L. GUSTAFSSON (2003). Ser3p (Yer081wp) and Ser33p (Yil074cp) are phosphoglycerate dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**: 10264-10272.
- APWEILER, R., T. K. ATTWOOD, A. BAIROCH, A. BATEMAN, E. BIRNEY, M. BISWAS, . . . E. M. ZDOBNOV (2001). The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Nucleic Acids Res* **29**: 37-40.
- ARONOVA, S., K. WEDAMAN, P. A. ARONOV, K. FONTES, K. RAMOS, B. D. HAMMOCK & T. POWERS (2008). Regulation of ceramide biosynthesis by TOR complex 2. *Cell Metab* **7**: 148-158.
- ATKINSON, K. D., B. JENSEN, A. I. KOLAT, E. M. STORM, S. A. HENRY & S. FOGEL (1980). Yeast mutants auxotrophic for choline or ethanolamine. *J Bacteriol* **141**: 558-564.
- AYE, I. L., A. T. SINGH & J. A. KEELAN (2009). Transport of lipids by ABC proteins: interactions and implications for cellular toxicity, viability and function. *Chem Biol Interact* **180**: 327-339.
- BAE, J. H., J. H. SOHN, C. S. PARK, J. S. RHEE & E. S. CHOI (2003). Integrative transformation system for the metabolic engineering of the sphingoid base-producing yeast *Pichia ciferrii*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 812-819.
- BAE, J. H., J. H. SOHN, C. S. PARK, J. S. RHEE & E. S. CHOI (2004). Cloning and functional characterization of the SUR2/SYR2 gene encoding sphinganine hydroxylase in *Pichia ciferrii*. *Yeast* **21**: 437-443.
- BAGNAT, M., S. KERANEN, A. SHEVCHENKO & K. SIMONS (2000). Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3254-3259.
- BAGNAT, M. & K. SIMONS (2002a). Cell surface polarization during yeast mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14183-14188.
- BAGNAT, M. & K. SIMONS (2002b). Lipid rafts in protein sorting and cell polarity in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem* **383**: 1475-1480.
- BAILEY, C. J. & P. D. TURNER (1983). Purification and properties of tryptophan synthase from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biochem J* **209**: 151-157.
- BARENHOLZ, Y., I. EDELMAN & S. GATT (1971). The metabolic basis for the accumulation of acetylated sphingosine bases in the yeast *Hansenula ciferrii*. *Biochim Biophys Acta* **248**: 458-465.
- BARENHOLZ, Y. & S. GATT (1969). Acetylation of sphingosine bases and long-chain amines by cell-free preparations of *Hansenula ciferrii*. *Biochem Biophys Res Commun* **35**: 676-680.
- BARENHOLZ, Y. & S. GATT (1972). Long chain base-acetyl coenzyme A acetyltransferase from the microsomes of *Hansenula ciferrii*. I. Isolation and properties. *J Biol Chem* **247**: 6827-6833.
- BARRETO-BERGTER, E., M. R. PINTO & M. L. RODRIGUES (2004). Structure and biological functions of fungal cerebrosides. *An Acad Bras Cienc* **76**: 67-84.
- BARZ, W. P. & P. WALTER (1999). Two endoplasmic reticulum (ER) membrane proteins that facilitate ER-to-Golgi transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol Biol Cell* **10**: 1043-1059.
- BECKER, J. & E. BOLES (2003). A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-Arabinose and produces ethanol. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4144-4150.

- BECKMANN, C., J. RATKE, P. SPERLING, E. HEINZ & W. BOLAND (2003). Stereochemistry of a bifunctional dihydroceramide delta 4-desaturase/hydroxylase from *Candida albicans*; a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Org Biomol Chem* **1**: 2448-2454.
- BEELER, T., D. BACIKOVA, K. GABLE, L. HOPKINS, C. JOHNSON, H. SLIFE & T. DUNN (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* TSC10/YBR265w gene encoding 3-ketosphinganine reductase is identified in a screen for temperature-sensitive suppressors of the Ca²⁺-sensitive csg2Delta mutant. *J Biol Chem* **273**: 30688-30694.
- BEELER, T. J., D. FU, J. RIVERA, E. MONAGHAN, K. GABLE & T. M. DUNN (1997). SUR1 (CSG1/BCL21), a gene necessary for growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of high Ca²⁺ concentrations at 37 degrees C, is required for mannosylation of inositolphosphorylceramide. *Mol Gen Genet* **255**: 570-579.
- BELL, J. K., P. J. PEASE, J. E. BELL, G. A. GRANT & L. J. BANASZAK (2002). De-regulation of D-3-phosphoglycerate dehydrogenase by domain removal. *Eur J Biochem* **269**: 4176-4184.
- BIBEL, D. J., R. ALY & H. R. SHINEFIELD (1992). Antimicrobial activity of sphingosines. *J Invest Dermatol* **98**: 269-273.
- BIRT, D. F., A. H. MERRILL, JR., T. BARNETT, B. ENKVETCHAKUL, P. M. POUR, D. C. LIOTTA, . . . J. SCHWARTZBAUER (1998). Inhibition of skin carcinomas but not papillomas by sphingosine, N-methylsphingosine, and N-acetylsphingosine. *Nutr Cancer* **31**: 119-126.
- BLACK, P. N. & C. C. DIRUSSO (2007). Yeast acyl-CoA synthetases at the crossroads of fatty acid metabolism and regulation. *Biochim Biophys Acta* **1771**: 286-298.
- BOCHNER, B. R. (2009). Global phenotypic characterization of bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 191-205.
- BOLES, E., P. DE JONG-GUBBELS & J. T. PRONK (1998). Identification and characterization of MAE1, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding mitochondrial malic enzyme. *J Bacteriol* **180**: 2875-2882.
- BORETSKY, Y., A. VORONOVSKY, O. LIUTA-TEHLIVETS, M. HASSLACHER, S. D. KOHLWEIN & G. M. SHAVLOVSKY (1999). Identification of an ARS element and development of a high efficiency transformation system for *Pichia guilliermondii*. *Curr Genet* **36**: 215-221.
- BÖRTEL, D. (2007). Untersuchungen zur Sphingolipid-Biosynthese in der Hefe *Pichia ciferrii*. *Goethe-Universität Frankfurt am Main; Dissertation*.
- BÖRTEL, D., M. VAN DEN BERG, T. HÜLLER, G. LIEBISCH, E. BOLES, C. SCHORSCH, . . . S. SCHAFFER (nicht publiziert). Metabolic engineering of the non-conventional yeast *Pichia ciferrii* for production of rare sphingoid bases.
- BORNAES, C., M. W. IGNJATOVIC, P. SCHJERLING, M. C. KIELLAND-BRANDT & S. HOLMBERG (1993). A regulatory element in the CHA1 promoter which confers inducibility by serine and threonine on *Saccharomyces cerevisiae* genes. *Mol Cell Biol* **13**: 7604-7611.
- BOSSON, R. & A. CONZELMANN (2007). Multiple functions of inositolphosphorylceramides in the formation and intracellular transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in yeast. *Biochem Soc Symp*: 199-209.
- BOUJAOUDE, L. C., C. BRADSHAW-WILDER, C. MAO, J. COHN, B. OGRETMEN, Y. A. HANNUN & L. M. OBEID (2001). Cystic fibrosis transmembrane regulator regulates uptake of sphingoid base phosphates and lysophosphatidic acid: modulation of cellular activity of sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* **276**: 35258-35264.
- BOULTON, S. J. & S. P. JACKSON (1996a). Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res* **24**: 4639-4648.
- BOULTON, S. J. & S. P. JACKSON (1996b). *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *EMBO J* **15**: 5093-5103.

- BRAUN, P. E., P. MORELL & N. S. RADIN (1970). Synthesis of C18- and C20-dihydrosphingosines, ketodihydrosphingosines, and ceramides by microsomal preparations from mouse brain. *J Biol Chem* **245**: 335-341.
- BRAUN, P. E. & E. E. SNELL (1967). The biosynthesis of dihydrosphingosine in cell-free preparations of *Hansenula ciferri*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**: 298-303.
- BREIER, A. M., S. CHATTERJI & N. R. COZZARELLI (2004). Prediction of *Saccharomyces cerevisiae* replication origins. *Genome Biol* **5**: R22.
- BRESLOW, D. K., S. R. COLLINS, B. BODENMILLER, R. AEBERSOLD, K. SIMONS, A. SHEVCHENKO, . . . J. S. WEISSMAN (2010). Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. *Nature* **463**: 1048-1053.
- BRESLOW, D. K. & J. S. WEISSMAN (2010). Membranes in balance: mechanisms of sphingolipid homeostasis. *Mol Cell* **40**: 267-279.
- BROACH, J. R., Y. Y. LI, J. FELDMAN, M. JAYARAM, J. ABRAHAM, K. A. NASMYTH & J. B. HICKS (1983). Localization and sequence analysis of yeast origins of DNA replication. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **47 Pt 2**: 1165-1173.
- BYRNE, K. P. & K. H. WOLFE (2005). The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res* **15**: 1456-1461.
- CARLOMUSTO, M., S. PILLAI & A. RAWLINGS (1996). Human keratinocytes in vitro can utilize exogenously applied sphingosine analogues for sphingolipid biosynthesis. *J Invest Dermatol* **106**: 871.
- CERANTOLA, V., I. GUILLAS, C. ROUBATY, C. VIONNET, D. ULDRY, J. KNUDSEN & A. CONZELMANN (2009). Aureobasidin A arrests growth of yeast cells through both ceramide intoxication and deprivation of essential inositolphosphorylceramides. *Mol Microbiol* **71**: 1523-1537.
- CHEN, X. J., X. WANG, B. A. KAUFMAN & R. A. BUTOW (2005). Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science* **307**: 714-717.
- CHIPMAN, D. M. & B. SHAANAN (2001). The ACT domain family. *Curr Opin Struct Biol* **11**: 694-700.
- CHRISTENSEN, K. E. & R. E. MACKENZIE (2006). Mitochondrial one-carbon metabolism is adapted to the specific needs of yeast, plants and mammals. *Bioessays* **28**: 595-605.
- CHUNG, N., G. JENKINS, Y. A. HANNUN, J. HEITMAN & L. M. OBEID (2000). Sphingolipids signal heat stress-induced ubiquitin-dependent proteolysis. *J Biol Chem* **275**: 17229-17232.
- CHUNG, N., C. MAO, J. HEITMAN, Y. A. HANNUN & L. M. OBEID (2001). Phytosphingosine as a specific inhibitor of growth and nutrient import in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**: 35614-35621.
- CLARKE, L. & J. CARBON (1980). Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature* **287**: 504-509.
- CLAROS, M. G. & P. VINCENS (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* **241**: 779-786.
- CLEVES, A. E., P. J. NOVICK & V. A. BANKAITIS (1989). Mutations in the SAC1 gene suppress defects in yeast Golgi and yeast actin function. *J Cell Biol* **109**: 2939-2950.
- CODERCH, L., O. LOPEZ, A. DE LA MAZA & J. L. PARRA (2003). Ceramides and skin function. *Am J Clin Dermatol* **4**: 107-129.
- COWART, L. A. & Y. A. HANNUN (2004) Baker's yeast: a rising foundation for eukaryotic sphingolipid-mediated cell signalling, pp. 383-401 in *Topics in Current Genetics*, edited by G. DAUM. Springer-Verlag, Berlin.
- COWART, L. A. & Y. A. HANNUN (2007). Selective substrate supply in the regulation of yeast de novo sphingolipid synthesis. *J Biol Chem* **282**: 12330-12340.
- COWART, L. A. & L. M. OBEID (2007). Yeast sphingolipids: recent developments in understanding biosynthesis, regulation, and function. *Biochim Biophys Acta* **1771**: 421-431.
- COWART, L. A., Y. OKAMOTO, X. LU & Y. A. HANNUN (2006). Distinct roles for de novo versus hydrolytic pathways of sphingolipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **393**: 733-740.

- COWART, L. A., M. SHOTWELL, M. L. WORLEY, A. J. RICHARDS, D. J. MONTEFUSCO, Y. A. HANNUN & X. LU (2010). Revealing a signaling role of phytosphingosine-1-phosphate in yeast. *Mol Syst Biol* **6**: 349.
- COX, J. S., R. E. CHAPMAN & P. WALTER (1997). The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* **8**: 1805-1814.
- COX, J. S. & P. WALTER (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* **87**: 391-404.
- CRAUWELS, M., M. C. DONATON, M. B. PERNAMBUCO, J. WINDERICKX, J. H. DE WINDE & J. M. THEVELEIN (1997). The Sch9 protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* controls cAPK activity and is required for nitrogen activation of the fermentable-growth-medium-induced (FGM) pathway. *Microbiology* **143** (Pt 8): 2627-2637.
- DALEY, J. M., P. L. PALMBOS, D. WU & T. E. WILSON (2005). Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet* **39**: 431-451.
- DAQUINAG, A., M. FADRI, S. Y. JUNG, J. QIN & J. KUNZ (2007). The yeast PH domain proteins Slm1 and Slm2 are targets of sphingolipid signaling during the response to heat stress. *Mol Cell Biol* **27**: 633-650.
- DAVIES, A., P. VERDEJO, C. FEINBERG & A. RAWLINGS (1996). Increased stratum corneum ceramide levels and improved barrier function following topical treatment with tetraacetylphytosphingosine. *J Invest Dermatol* **106**: 918.
- DE JAGER, M. W., G. S. GOORIS, M. PONEC & J. A. BOUWSTRA (2005). Lipid mixtures prepared with well-defined synthetic ceramides closely mimic the unique stratum corneum lipid phase behavior. *J Lipid Res* **46**: 2649-2656.
- DE SNIJDER, P., B. SMETS, R. GHILLEBERT, K. THEVISSSEN, J. IDKOWIAK-BALDYS, J. BIELAWSKI, . . . J. WINDERICKX (2010) Protein kinase Sch9 affects sphingolipid metabolism and sphingolipid-mediated signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. [Poster session presented]. *4th Conference on Physiology of Yeast and Filamentous Fungi (PYFF4)* (06/04/2010; Rotterdam, Netherlands)
- DENIC, V. & J. S. WEISSMAN (2007). A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. *Cell* **130**: 663-677.
- DICKSON, R. C. (1998). Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison to mammals. *Annu Rev Biochem* **67**: 27-48.
- DICKSON, R. C. (2008). Thematic review series: sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *J Lipid Res* **49**: 909-921.
- DICKSON, R. C. (2010). Roles for sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Exp Med Biol* **688**: 217-231.
- DICKSON, R. C. & R. L. LESTER (1999). Yeast sphingolipids. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 347-357.
- DICKSON, R. C. & R. L. LESTER (2002). Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1583**: 13-25.
- DICKSON, R. C., E. E. NAGIEC, M. SKRZYPEK, P. TILLMAN, G. B. WELLS & R. L. LESTER (1997a). Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*. *J Biol Chem* **272**: 30196-30200.
- DICKSON, R. C., E. E. NAGIEC, G. B. WELLS, M. M. NAGIEC & R. L. LESTER (1997b). Synthesis of mannose-(inositol-P)₂-ceramide, the major sphingolipid in *Saccharomyces cerevisiae*, requires the IPT1 (YDR072c) gene. *J Biol Chem* **272**: 29620-29625.
- DICKSON, R. C., C. SUMANASEKERA & R. L. LESTER (2006). Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Lipid Res* **45**: 447-465.
- DOHMEN, R. J., A. W. STRASSER, C. B. HONER & C. P. HOLLENBERG (1991). An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**: 691-692.

- DOHMEN, R. J., A. W. STRASSER, R. S. ZITOMER & C. P. HOLLENBERG (1989).** Regulated overproduction of alpha-amylase by transformation of the amylolytic yeast *Schwanniomyces occidentalis*. *Curr Genet* **15**: 319-325.
- DORE, A. S., N. FURNHAM, O. R. DAVIES, B. L. SIBANDA, D. Y. CHIRGADZE, S. P. JACKSON, . . . T. L. BLUNDELL (2006).** Structure of an Xrcc4-DNA ligase IV yeast ortholog complex reveals a novel BRCT interaction mode. *DNA Repair (Amst)* **5**: 362-368.
- DOWER, W. J., J. F. MILLER & C. W. RAGSDALE (1988).** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145.
- DUNN, T. M., D. HAAK, E. MONAGHAN & T. J. BEELER (1998).** Synthesis of monohydroxylated inositolphosphorylceramide (IPC-C) in *Saccharomyces cerevisiae* requires Scs7p, a protein with both a cytochrome b5-like domain and a hydroxylase/desaturase domain. *Yeast* **14**: 311-321.
- EJSING, C. S., J. L. SAMPAIO, V. SURENDRANATH, E. DUCHOSLAV, K. EKROOS, R. W. KLEMM, . . . A. SHEVCHENKO (2009).** Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 2136-2141.
- ENDO, M., K. TAKESAKO, I. KATO & H. YAMAGUCHI (1997).** Fungicidal action of aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic, against *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 672-676.
- FABRIZIO, P., F. POZZA, S. D. PLETCHER, C. M. GENDRON & V. D. LONGO (2001).** Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* **292**: 288-290.
- FAHY, E., S. SUBRAMANIAM, H. A. BROWN, C. K. GLASS, A. H. MERRILL, JR., R. C. MURPHY, . . . E. A. DENNIS (2005).** A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* **46**: 839-861.
- FARRELL, A. M., Y. UCHIDA, M. M. NAGIEC, I. R. HARRIS, R. C. DICKSON, P. M. ELIAS & W. M. HOLLERAN (1998).** UVB irradiation up-regulates serine palmitoyltransferase in cultured human keratinocytes. *J Lipid Res* **39**: 2031-2038.
- FERGUSON-YANKEY, S. R., M. S. SKRZYPEK, R. L. LESTER & R. C. DICKSON (2002).** Mutant analysis reveals complex regulation of sphingolipid long chain base phosphates and long chain bases during heat stress in yeast. *Yeast* **19**: 573-586.
- FUNATO, K., R. LOMBARDI, B. VALLEE & H. RIEZMAN (2003).** Lcb4p is a key regulator of ceramide synthesis from exogenous long chain sphingoid base in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**: 7325-7334.
- FUNATO, K. & H. RIEZMAN (2001).** Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to the Golgi apparatus in yeast. *J Cell Biol* **155**: 949-959.
- FUNATO, K., B. VALLEE & H. RIEZMAN (2002).** Biosynthesis and trafficking of sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **41**: 15105-15114.
- FUTERMAN, A. H. & Y. A. HANNUN (2004).** The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep* **5**: 777-782.
- FUTERMAN, A. H. & H. RIEZMAN (2005).** The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol* **15**: 312-318.
- GABLE, K., G. HAN, E. MONAGHAN, D. BACIKOVA, M. NATARAJAN, R. WILLIAMS & T. M. DUNN (2002).** Mutations in the yeast LCB1 and LCB2 genes, including those corresponding to the hereditary sensory neuropathy type I mutations, dominantly inactivate serine palmitoyltransferase. *J Biol Chem* **277**: 10194-10200.
- GABLE, K., H. SLIFE, D. BACIKOVA, E. MONAGHAN & T. M. DUNN (2000).** Tsc3p is an 80-amino acid protein associated with serine palmitoyltransferase and required for optimal enzyme activity. *J Biol Chem* **275**: 7597-7603.
- GARI, E., L. PIEDRAFITA, M. ALDEA & E. HERRERO (1997).** A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 837-848.
- GARTON, S., L. V. MICHAELSON, F. BEAUDOIN, M. H. BEALE & J. A. NAPIER (2003).** The dihydroceramide desaturase is not essential for cell viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett* **538**: 192-196.

- GAULT, C. R., L. M. OBEID & Y. A. HANNUN (2010).** An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol* **688**: 1-23.
- GELPERIN, D., L. HORTON, A. DECHANT, J. HENSOLD & S. K. LEMMON (2002).** Loss of ypk1 function causes rapamycin sensitivity, inhibition of translation initiation and synthetic lethality in 14-3-3-deficient yeast. *Genetics* **161**: 1453-1464.
- GIETZ, R. D. & R. H. SCHIESTL (2007).** High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* **2**: 31-34.
- GINZBURG, L., Y. KACHER & A. H. FUTERMAN (2004).** The pathogenesis of glycosphingolipid storage disorders. *Semin Cell Dev Biol* **15**: 417-431.
- GOTTLIEB, D., W. HEIDEMAN & J. D. SABA (1999).** The DPL1 gene is involved in mediating the response to nutrient deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol Res Commun* **1**: 66-71.
- GRANT, G. A. (2006).** The ACT domain: a small molecule binding domain and its role as a common regulatory element. *J Biol Chem* **281**: 33825-33829.
- GRANT, G. A., D. J. SCHULLER & L. J. BANASZAK (1996).** A model for the regulation of D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, a Vmax-type allosteric enzyme. *Protein Sci* **5**: 34-41.
- GRAWUNDER, U., M. WILM, X. WU, P. KULESZA, T. E. WILSON, M. MANN & M. R. LIEBER (1997).** Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* **388**: 492-495.
- GREEN, J. B., A. P. WRIGHT, W. Y. CHEUNG, W. E. LANCASHIRE & B. S. HARTLEY (1988).** The structure and regulation of phosphoglucose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **215**: 100-106.
- GREENE, M. L., T. KANESHIRO & J. H. LAW (1965).** Studies on the production of sphingolipid bases by the yeast, *Hansenula ciferri*. *Biochim Biophys Acta* **98**: 582-588.
- GRILLEY, M. M., S. D. STOCK, R. C. DICKSON, R. L. LESTER & J. Y. TAKEMOTO (1998).** Syringomycin action gene SYR2 is essential for sphingolipid 4-hydroxylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 11062-11068.
- GUILLAS, I., P. A. KIRCHMAN, R. CHUARD, M. PFEFFERLI, J. C. JIANG, S. M. JAZWINSKI & A. CONZELMANN (2001).** C26-CoA-dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* is operated by Lag1p and Lac1p. *EMBO J* **20**: 2655-2665.
- GÜLDENER, U., S. HECK, T. FIELDER, J. BEINHAEUER & J. H. HEGEMANN (1996).** A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**: 2519-2524.
- HAAK, D., K. GABLE, T. BEELER & T. DUNN (1997).** Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p. *J Biol Chem* **272**: 29704-29710.
- HAGEDORN, J. (1990).** Isolierung und Charakterisierung von Mutanten im Xylosestoffwechsel und Entwicklung eines Transformationssystems für die Hefe *Pichia stipitis*. *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; Dissertation*.
- HAMACHER, T., J. BECKER, M. GARDONYI, B. HAHN-HAGERDAL & E. BOLES (2002).** Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology* **148**: 2783-2788.
- HAN, G., K. GABLE, L. YAN, M. NATARAJAN, J. KRISHNAMURTHY, S. D. GUPTA, . . . T. M. DUNN (2004).** The topology of the Lcb1p subunit of yeast serine palmitoyltransferase. *J Biol Chem* **279**: 53707-53716.
- HAN, S., M. A. LONE, R. SCHNEITER & A. CHANG (2010).** Orm1 and Orm2 are conserved endoplasmic reticulum membrane proteins regulating lipid homeostasis and protein quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 5851-5856.
- HANADA, K. (2003).** Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1632**: 16-30.
- HANNICH, J. T., K. UMEBAYASHI & H. RIEZMAN (2011).** Distribution and functions of sterols and sphingolipids. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.

- HANNUN, Y. A. & L. M. OBEID (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 139-150.
- HARDING, C. R., A. WATKINSON, A. V. RAWLINGS & I. R. SCOTT (2000). Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. *Int J Cosmet Sci* **22**: 21-52.
- HASSLACHER, M., A. S. IVESSA, F. PALTAUF & S. D. KOHLWEIN (1993). Acetyl-CoA carboxylase from yeast is an essential enzyme and is regulated by factors that control phospholipid metabolism. *J Biol Chem* **268**: 10946-10952.
- HASTINGS, P. J., C. MCGILL, B. SHAFER & J. N. STRATHERN (1993). Ends-in vs. ends-out recombination in yeast. *Genetics* **135**: 973-980.
- HEARN, J. D., R. L. LESTER & R. C. DICKSON (2003). The uracil transporter Fur4p associates with lipid rafts. *J Biol Chem* **278**: 3679-3686.
- HECHTBERGER, P., E. ZINSER, R. SAF, K. HUMMEL, F. PALTAUF & G. DAUM (1994). Characterization, quantification and subcellular localization of inositol-containing sphingolipids of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **225**: 641-649.
- HEIDLER, S. A. & J. A. RADDING (1995). The AUR1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* encodes dominant resistance to the antifungal agent aureobasidin A (LY295337). *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 2765-2769.
- HERRMANN, G., T. LINDAHL & P. SCHAR (1998). *Saccharomyces cerevisiae* LIF1: a function involved in DNA double-strand break repair related to mammalian XRCC4. *EMBO J* **17**: 4188-4198.
- HIGUCHI, R., C. FOCKLER, G. DOLLINGER & R. WATSON (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**: 1026-1030.
- HINNEBUSCH, A. G. (1988). Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **52**: 248-273.
- HINNEBUSCH, A. G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* **59**: 407-450.
- HIRABAYASHI, Y., Y. IGARASHI & A. H. MERRILL (2006). *Sphingolipid biology*. Springer, Tokyo ; New York.
- HOLLERAN, W. M., Y. TAKAGI & Y. UCHIDA (2006). Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Lett* **580**: 5456-5466.
- HUH, W. K., J. V. FALVO, L. C. GERKE, A. S. CARROLL, R. W. HOWSON, J. S. WEISSMAN & E. K. O'SHEA (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**: 686-691.
- IKUSHIMA, S., T. MINATO & K. KONDO (2009). Identification and application of novel autonomously replicating sequences (ARs) for promoter-cloning and co-transformation in *Candida utilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 152-159.
- IKUSHIRO, H. & H. HAYASHI (2011). Mechanistic enzymology of serine palmitoyltransferase. *Biochim Biophys Acta*.
- IMOKAWA, G., S. AKASAKI, M. HATTORI & N. YOSHIZUKA (1986). Selective recovery of deranged water-holding properties by stratum corneum lipids. *J Invest Dermatol* **87**: 758-761.
- INUZUKA, M., M. HAYAKAWA & T. INGI (2005). Serinc, an activity-regulated protein family, incorporates serine into membrane lipid synthesis. *J Biol Chem* **280**: 35776-35783.
- IRENE, C., C. MACIARIELLO, F. CIOCI, G. CAMILLONI, C. S. NEWLON & L. FABIANI (2004). Identification of the sequences required for chromosomal replicator function in *Kluyveromyces lactis*. *Mol Microbiol* **51**: 1413-1423.
- ISHIBASHI, K., K. SUZUKI, Y. ANDO, C. TAKAKURA & H. INOUE (2006). Nonhomologous chromosomal integration of foreign DNA is completely dependent on MUS-53 (human Lig4 homolog) in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 14871-14876.
- ITO, T., T. CHIBA, R. OZAWA, M. YOSHIDA, M. HATTORI & Y. SAKAKI (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4569-4574.
- ITO, T., K. TAKAHASHI, T. NAKA, H. HEMMI & T. YOSHIMURA (2007). Enzymatic assay of D-serine using D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal Biochem* **371**: 167-172.

- IUPAC (1984).** IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Eur J Biochem* **138**: 9-37.
- IUPAC (1993).** IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Corrections to recommendations 1983. *Eur J Biochem* **213**: 2.
- IVESSA, A. S., R. SCHNEITER & S. D. KOHLWEIN (1997).** Yeast acetyl-CoA carboxylase is associated with the cytoplasmic surface of the endoplasmic reticulum. *Eur J Cell Biol* **74**: 399-406.
- IWAMORI, M., C. COSTELLO & H. W. MOSER (1979).** Analysis and quantitation of free ceramide containing nonhydroxy and 2-hydroxy fatty acids, and phytosphingosine by high-performance liquid chromatography. *J Lipid Res* **20**: 86-96.
- JACQUIER, N. & R. SCHNEITER (2010).** Mechanisms of sterol uptake and transport in yeast. *J Steroid Biochem Mol Biol*.
- JAOKEN, J., M. DETHEUX, L. VAN MALDERGEM, M. FOULON, H. CARCHON & E. VAN SCHAFTINGEN (1996).** 3-Phosphoglycerate dehydrogenase deficiency: an inborn error of serine biosynthesis. *Arch Dis Child* **74**: 542-545.
- JANUSOVA, B., J. ZBYTOVSKA, P. LORENC, H. VAVRYSOVA, K. PALAT, A. HRABALEK & K. VAVROVA (2011).** Effect of ceramide acyl chain length on skin permeability and thermotropic phase behavior of model stratum corneum lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1811**: 129-137.
- JENKINS, G. M. & Y. A. HANNUN (2001).** Role for de novo sphingoid base biosynthesis in the heat-induced transient cell cycle arrest of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**: 8574-8581.
- JIANG, J. C., P. A. KIRCHMAN, M. ZAGULSKI, J. HUNT & S. M. JAZWINSKI (1998).** Homologs of the yeast longevity gene LAG1 in *Caenorhabditis elegans* and human. *Genome Res* **8**: 1259-1272.
- JOHNSON, S. S., P. K. HANSON, R. MANOHARLAL, S. E. BRICE, L. A. COWART & W. S. MOYE-ROWLEY (2010).** Regulation of yeast nutrient permease endocytosis by ATP-binding cassette transporters and a seven-transmembrane protein, RSB1. *J Biol Chem* **285**: 35792-35802.
- JUNGWIRTH, H. & K. KUCHLER (2006).** Yeast ABC transporters-- a tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Lett* **580**: 1131-1138.
- KAEBERLEIN, M. (2010).** Lessons on longevity from budding yeast. *Nature* **464**: 513-519.
- KAGEYAMA-YAHARA, N. & H. RIEZMAN (2006).** Transmembrane topology of ceramide synthase in yeast. *Biochem J* **398**: 585-593.
- KARLSSON, A., B. SAMUELSSON & O. STEEN (1967).** Studies on sphingosines. 15. Degradation of phytosphingosine to hydroxyl fatty acid and ethanolamine by the yeast *Hansenula ciferrii*. *Acta Chem Scand* **21**: 2566-2567.
- KARLSSON, K. A. (1966).** Studies on sphingosines. II. The chemical structure of phytosphingosine of human origin and a note on the lipid composition of the yeast *Hansenula ciferrii*. *Acta Chem Scand* **20**: 2884-2885.
- KASTANOS, E. K., Y. Y. WOLDMAN & D. R. APPLING (1997).** Role of mitochondrial and cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase isozymes in de novo purine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **36**: 14956-14964.
- KAUFMAN, B., S. BASU & S. ROSEMAN (1971).** Isolation of glucosylceramides from yeast (*Hansenula ciferrii*). *J Biol Chem* **246**: 4266-4271.
- KAWAHARA, A., T. NISHI, Y. HISANO, H. FUKUI, A. YAMAGUCHI & N. MOCHIZUKI (2009).** The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science* **323**: 524-527.
- KEAN, L. S., A. M. GRANT, C. ANGELETTI, Y. MAHE, K. KUCHLER, R. S. FULLER & J. W. NICHOLS (1997).** Plasma membrane translocation of fluorescent-labeled phosphatidylethanolamine is controlled by transcription regulators, PDR1 and PDR3. *J Cell Biol* **138**: 255-270.
- KEARSEY, S. E. (1993).** Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* gene closely related to FAS3 (acetyl-CoA carboxylase). *DNA Seq* **4**: 69-70.

- KIHARA, A. & Y. IGARASHI (2002). Identification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene, RSB1, involved in sphingoid long-chain base release. *J Biol Chem* **277**: 30048-30054.
- KIHARA, A. & Y. IGARASHI (2004). Cross talk between sphingolipids and glycerophospholipids in the establishment of plasma membrane asymmetry. *Mol Biol Cell* **15**: 4949-4959.
- KIM, S., H. FYRST & J. SABA (2000). Accumulation of phosphorylated sphingoid long chain bases results in cell growth inhibition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **156**: 1519-1529.
- KIM, S. K., Y. H. NOH, J. R. KOO & H. S. YUN (2010). Effect of expression of genes in the sphingolipid synthesis pathway on the biosynthesis of ceramide in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Biotechnol* **20**: 356-362.
- KITAGAKI, H., L. A. COWART, N. MATMATI, D. MONTEFUSCO, J. GANDY, S. V. DE AVALOS, . . . Y. A. HANNUN (2009). ISC1-dependent metabolic adaptation reveals an indispensable role for mitochondria in induction of nuclear genes during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **284**: 10818-10830.
- KITAGAKI, H., L. A. COWART, N. MATMATI, S. VAENA DE AVALOS, S. A. NOVGORODOV, Y. H. ZEIDAN, . . . Y. A. HANNUN (2007). Isc1 regulates sphingolipid metabolism in yeast mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 2849-2861.
- KOBAYASHI, S. D. & M. M. NAGIEC (2003). Ceramide/long-chain base phosphate rheostat in *Saccharomyces cerevisiae*: regulation of ceramide synthesis by Elo3p and Cka2p. *Eukaryot Cell* **2**: 284-294.
- KOCHENDORFER, K. U., A. R. THEN, B. G. KEARNS, V. A. BANKAITIS & P. MAYINGER (1999). Sac1p plays a crucial role in microsomal ATP transport, which is distinct from its function in Golgi phospholipid metabolism. *EMBO J* **18**: 1506-1515.
- KOOISTRA, R., P. J. HOOYKAAS & H. Y. STEENSMa (2004). Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **21**: 781-792.
- KÖTTER, P., J. E. WEIGAND, B. MEYER, K. D. ENTIAN & B. SUESS (2009). A fast and efficient translational control system for conditional expression of yeast genes. *Nucleic Acids Res* **37**: e120.
- KRAAKMAN, L., K. LEMAIRE, P. MA, A. W. TEUNISSEN, M. C. DONATON, P. VAN DIJCK, . . . J. M. THEVELEIN (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol Microbiol* **32**: 1002-1012.
- KRAMER, K. M., J. A. BROCK, K. BLOOM, J. K. MOORE & J. E. HABER (1994). Two different types of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* are repaired by similar RAD52-independent, nonhomologous recombination events. *Mol Cell Biol* **14**: 1293-1301.
- KROGH, A., B. LARSSON, G. VON HEIJNE & E. L. SONNHAMMER (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**: 567-580.
- KURTZMAN, C. P. (1984). Synonymy of the yeast genera *Hansenula* and *Pichia* demonstrated through comparisons of deoxyribonucleic acid relatedness. *Antonie Van Leeuwenhoek* **50**: 209-217.
- LAHIRI, S., H. LEE, J. MESICEK, Z. FUKS, A. HAIMOVITZ-FRIEDMAN, R. N. KOLESNICK & A. H. FUTERMAN (2007). Kinetic characterization of mammalian ceramide synthases: determination of K(m) values towards sphinganine. *FEBS Lett* **581**: 5289-5294.
- LESTER, R. L. & R. C. DICKSON (1993). Sphingolipids with inositolphosphate-containing head groups. *Adv Lipid Res* **26**: 253-274.
- LEVINE, T. P., C. A. WIGGINS & S. MUNRO (2000). Inositol phosphorylceramide synthase is located in the Golgi apparatus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **11**: 2267-2281.
- LI, J., Z. ZHAO, J. ZHOU & S. YU (1996). A study of the three-dimensional organization of the human diaphragmatic lymphatic lacunae and lymphatic drainage units. *Ann Anat* **178**: 537-544.

- LIANG, L., L. DENG, S. C. NGUYEN, X. ZHAO, C. D. MAULION, C. SHAO & J. A. TISCHFIELD (2008). Human DNA ligases I and III, but not ligase IV, are required for microhomology-mediated end joining of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* **36**: 3297-3310.
- LIN CEREGHINO, G. P., J. LIN CEREGHINO, A. J. SUNGA, M. A. JOHNSON, M. LIM, M. A. GLEESON & J. M. CREGG (2001). New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. *Gene* **263**: 159-169.
- LISMAN, Q., T. POMORSKI, C. VOGELZANGS, D. URLI-STAM, W. DE COCQ VAN DELWIJNEN & J. C. HOLTHUIS (2004). Protein sorting in the late Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* does not require mannosylated sphingolipids. *J Biol Chem* **279**: 1020-1029.
- LIU, K., X. ZHANG, R. L. LESTER & R. C. DICKSON (2005). The sphingoid long chain base phytosphingosine activates AGC-type protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae* including Ypk1, Ypk2, and Sch9. *J Biol Chem* **280**: 22679-22687.
- LODDER, J. (1932). Über einige durch das "Centraalbureau voor Schimmelcultures" neuerworbene sporogene Hefearten. *Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II* **86**: 227-253.
- LOMAKIN, I. B., Y. XIONG & T. A. STEITZ (2007). The crystal structure of yeast fatty acid synthase, a cellular machine with eight active sites working together. *Cell* **129**: 319-332.
- MA, J. L., E. M. KIM, J. E. HABER & S. E. LEE (2003). Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences. *Mol Cell Biol* **23**: 8820-8828.
- MAASSEN, N., S. FREESE, B. SCHRUFF, V. PASSOTH & U. KLINNER (2008). Nonhomologous end joining and homologous recombination DNA repair pathways in integration mutagenesis in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *FEMS Yeast Res* **8**: 735-743.
- MAISTER, H. G., S. P. ROGOVIN, F. H. STODOLA & L. J. WICKERHAM (1962). Formation of Extracellular Sphingolipids by Microorganisms: IV. Pilot-Plant Production of Tetraacetylphytosphingosine by *Hansenula ciferrii*. *Appl Microbiol* **10**: 401-406.
- MAITRA, P. K. & Z. LOBO (1971). A kinetic study of glycolytic enzyme synthesis in yeast. *J Biol Chem* **246**: 475-488.
- MANDON, E. C., G. VAN ECHTEN, R. BIRK, R. R. SCHMIDT & K. SANDHOFF (1991). Sphingolipid biosynthesis in cultured neurons. Down-regulation of serine palmitoyltransferase by sphingoid bases. *Eur J Biochem* **198**: 667-674.
- MANENTE, M. & M. GHISLAIN (2009). The lipid-translocating exporter family and membrane phospholipid homeostasis in yeast. *FEMS Yeast Res* **9**: 673-687.
- MAO, C., J. D. SABA & L. M. OBEID (1999). The dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatases of *Saccharomyces cerevisiae* are important regulators of cell proliferation and heat stress responses. *Biochem J* **342 Pt 3**: 667-675.
- MAO, C., M. WADLEIGH, G. M. JENKINS, Y. A. HANNUN & L. M. OBEID (1997). Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatase. *J Biol Chem* **272**: 28690-28694.
- MAO, C., R. XU, A. BIELAWSKA & L. M. OBEID (2000a). Cloning of an alkaline ceramidase from *Saccharomyces cerevisiae*. An enzyme with reverse (CoA-independent) ceramide synthase activity. *J Biol Chem* **275**: 6876-6884.
- MAO, C., R. XU, A. BIELAWSKA, Z. M. SZULC & L. M. OBEID (2000b). Cloning and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* alkaline ceramidase with specificity for dihydroceramide. *J Biol Chem* **275**: 31369-31378.
- MAO, C., R. XU, Z. M. SZULC, J. BIELAWSKI, K. P. BECKER, A. BIELAWSKA, . . . L. M. OBEID (2003). Cloning and characterization of a mouse endoplasmic reticulum alkaline ceramidase: an enzyme that preferentially regulates metabolism of very long chain ceramides. *J Biol Chem* **278**: 31184-31191.
- MARKHAM, J. E., J. LI, E. B. CAHOON & J. G. JAWORSKI (2006). Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem* **281**: 22684-22694.

- MARTIN, C. E., C. S. OH & Y. JIANG (2007). Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1771**: 271-285.
- MASUKAWA, Y., H. NARITA, E. SHIMIZU, N. KONDO, Y. SUGAI, T. OBA, . . . K. KITA (2008). Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *J Lipid Res* **49**: 1466-1476.
- MCNAUGHT, A. D., A. WILKINSON & INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. (1997). *Compendium of chemical terminology : IUPAC recommendations*. Blackwell Science, Oxford.
- MCNEIL, J. B., A. L. BOGNAR & R. E. PEARLMAN (1996). In vivo analysis of folate coenzymes and their compartmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **142**: 371-381.
- MCNEIL, J. B., E. M. MCINTOSH, B. V. TAYLOR, F. R. ZHANG, S. TANG & A. L. BOGNAR (1994). Cloning and molecular characterization of three genes, including two genes encoding serine hydroxymethyltransferases, whose inactivation is required to render yeast auxotrophic for glycine. *J Biol Chem* **269**: 9155-9165.
- MELCHER, K. & K. D. ENTIAN (1992). Genetic analysis of serine biosynthesis and glucose repression in yeast. *Curr Genet* **21**: 295-300.
- MELCHER, K., M. ROSE, M. KUNZLER, G. H. BRAUS & K. D. ENTIAN (1995). Molecular analysis of the yeast SER1 gene encoding 3-phosphoserine aminotransferase: regulation by general control and serine repression. *Curr Genet* **27**: 501-508.
- MEYER, F., A. GOESMANN, A. C. MCHARDY, D. BARTELS, T. BEKEL, J. CLAUSEN, . . . A. PUHLER (2003). GenDB--an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res* **31**: 2187-2195.
- MILNE, G. T., S. JIN, K. B. SHANNON & D. T. WEAVER (1996). Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**: 4189-4198.
- MIZUTANI, Y., A. KIHARA & Y. IGARASHI (2004). Identification of the human sphingolipid C4-hydroxylase, hDES2, and its up-regulation during keratinocyte differentiation. *FEBS Lett* **563**: 93-97.
- MOMOI, M., D. TANOUE, Y. SUN, H. TAKEMATSU, Y. SUZUKI, M. SUZUKI, . . . Y. KOZUTSUMI (2004). SLI1 (YGR212W) is a major gene conferring resistance to the sphingolipid biosynthesis inhibitor ISP-1, and encodes an ISP-1 N-acetyltransferase in yeast. *Biochem J* **381**: 321-328.
- MONAGHAN, E., K. GABLE & T. DUNN (2002). Mutations in the Lcb2p subunit of serine palmitoyltransferase eliminate the requirement for the TSC3 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**: 659-670.
- MONSCHAU, N., K. P. STAHMANN, H. SAHM, J. B. MCNEIL & A. L. BOGNAR (1997). Identification of *Saccharomyces cerevisiae* GLY1 as a threonine aldolase: a key enzyme in glycine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* **150**: 55-60.
- MULLEN, T. D., S. SPASSIEVA, R. W. JENKINS, K. KITATANI, J. BIELAWSKI, Y. A. HANNUN & L. M. OBEID (2011). Selective knockdown of ceramide synthases reveals complex interregulation of sphingolipid metabolism. *J Lipid Res* **52**: 68-77.
- MURRAY, M. G. & W. F. THOMPSON (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**: 4321-4325.
- NAGAO, K., Y. KIMURA, M. MASTUO & K. UEDA (2010). Lipid outward translocation by ABC proteins. *FEBS Lett* **584**: 2717-2723.
- NAGIEC, M. M., J. A. BALTISBERGER, G. B. WELLS, R. L. LESTER & R. C. DICKSON (1994). The LCB2 gene of *Saccharomyces* and the related LCB1 gene encode subunits of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7899-7902.
- NAGIEC, M. M., E. E. NAGIEC, J. A. BALTISBERGER, G. B. WELLS, R. L. LESTER & R. C. DICKSON (1997). Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by the AUR1 gene. *J Biol Chem* **272**: 9809-9817.

- NAGIEC, M. M., M. SKRZYPEK, E. E. NAGIEC, R. L. LESTER & R. C. DICKSON (1998).** The LCB4 (YOR171c) and LCB5 (YLR260w) genes of *Saccharomyces* encode sphingoid long chain base kinases. *J Biol Chem* **273**: 19437-19442.
- NEWLON, C. S. (1996)** DNA replication in yeast, pp. 873-914 in *DNA Replication in Eukaryotic Cells*, edited by M. L. DEPAMPHILIS. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- NEWLON, C. S. & J. F. THEIS (1993).** The structure and function of yeast ARS elements. *Curr Opin Genet Dev* **3**: 752-758.
- NEWLON, C. S. & J. F. THEIS (2002).** DNA replication joins the revolution: whole-genome views of DNA replication in budding yeast. *Bioessays* **24**: 300-304.
- NICK McELHINNY, S. A., C. M. SNOWDEN, J. MCCARVILLE & D. A. RAMSDEN (2000).** Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol* **20**: 2996-3003.
- NIEDERBERGER, P., G. MIOZZARI & R. HUTTER (1981).** Biological role of the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **1**: 584-593.
- NINOMIYA, Y., K. SUZUKI, C. ISHII & H. INOUE (2004).** Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 12248-12253.
- NOVOTNY, J., A. HRABALEK & K. VAVROVA (2010).** Synthesis and structure-activity relationships of skin ceramides. *Curr Med Chem* **17**: 2301-2324.
- OH, C. S., D. A. TOKE, S. MANDALA & C. E. MARTIN (1997).** ELO2 and ELO3, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J Biol Chem* **272**: 17376-17384.
- OHKUMA, M., S. MURAOKA, C. W. HWANG, A. OHTA & M. TAKAGI (1993).** Cloning of the *C-URA3* gene and construction of a triple auxotroph (*his5*, *ade1*, *ura3*) as a useful host for the genetic engineering of *Candida maltosa*. *Curr Genet* **23**: 205-210.
- OKABE, K., R. W. KEENAN & G. SCHMIDT (1968).** Phytosphingosine groups as quantitatively significant components of the sphingolipids of the mucosa of the small intestines of some mammalian species. *Biochem Biophys Res Commun* **31**: 137-143.
- OLDENBURG, K. R., K. T. VO, S. MICHAELIS & C. PADDON (1997).** Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res* **25**: 451-452.
- ONO, B., K. KIJIMA, T. INOUE, S. MIYOSHI, A. MATSUDA & S. SHINODA (1994).** Purification and properties of *Saccharomyces cerevisiae* cystathionine beta-synthase. *Yeast* **10**: 333-339.
- ONO, B., Y. SHIRAHIGE, A. NANJOH, N. ANDOU, H. OHUE & Y. ISHINO-ARAO (1988).** Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mutation that confers cystathionine beta-synthase deficiency. *J Bacteriol* **170**: 5883-5889.
- ONO, B., K. TANAKA, K. NAITO, C. HEIKE, S. SHINODA, S. YAMAMOTO, . . . A. TOH-E (1992).** Cloning and characterization of the *CYS3* (*CYI1*) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **174**: 3339-3347.
- OPEKAROVA, M., K. MALINSKA, L. NOVAKOVA & W. TANNER (2005).** Differential effect of phosphatidylethanolamine depletion on raft proteins: further evidence for diversity of rafts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1711**: 87-95.
- OURA, T. & S. KAJIWARA (2008).** Disruption of the sphingolipid Delta8-desaturase gene causes a delay in morphological changes in *Candida albicans*. *Microbiology* **154**: 3795-3803.
- PAGARETE, A., M. J. ALLEN, W. H. WILSON, S. A. KIMMANCE & C. DE VARGAS (2009).** Host-virus shift of the sphingolipid pathway along an *Emiliania huxleyi* bloom: survival of the fattest. *Environ Microbiol* **11**: 2840-2848.
- PAQUES, F. & J. E. HABER (1999).** Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 349-404.
- PARAGH, G., P. SCHLING, P. UGOCSAI, A. E. KEL, G. LIEBISCH, S. HEIMERL, . . . G. SCHMITZ (2008).** Novel sphingolipid derivatives promote keratinocyte differentiation. *Exp Dermatol* **17**: 1004-1016.
- PASTERNAK, L. B., D. A. LAUDE, JR. & D. R. APPLING (1992).** ¹³C NMR detection of folate-mediated serine and glycine synthesis in vivo in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **31**: 8713-8719.

- PATTON, J. L. & R. L. LESTER (1991). The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. *J Bacteriol* **173**: 3101-3108.
- PAVICIC, T., U. WOLLENWEBER, M. FARWICK & H. C. KORTING (2007). Anti-microbial and -inflammatory activity and efficacy of phytosphingosine: an in vitro and in vivo study addressing acne vulgaris. *Int J Cosmet Sci* **29**: 181-190.
- PERRY, D. K. (2002). Serine palmitoyltransferase: role in apoptotic de novo ceramide synthesis and other stress responses. *Biochim Biophys Acta* **1585**: 146-152.
- PETERS-WENDISCH, P., R. NETZER, L. EGGELING & H. SAHM (2002). 3-Phosphoglycerate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: the C-terminal domain is not essential for activity but is required for inhibition by L-serine. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 437-441.
- PETERS-WENDISCH, P., M. STOLZ, H. ETTERICH, N. KENNERKNECHT, H. SAHM & L. EGGELING (2005). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-serine production. *Appl Environ Microbiol* **71**: 7139-7144.
- PETERSEN, J. G., M. C. KIELLAND-BRANDT, T. NILSSON-TILLGREN, C. BORNAES & S. HOLMBERG (1988). Molecular genetics of serine and threonine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **119**: 527-534.
- PEWZNER-JUNG, Y., S. BEN-DOR & A. H. FUTERMAN (2006). When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. *J Biol Chem* **281**: 25001-25005.
- PFAFFL, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- PINEAU, L., J. COLAS, S. DUPONT, L. BENEY, P. FLEURAT-LESSARD, J. M. BERJEAUD, . . . T. FERREIRA (2009). Lipid-induced ER stress: synergistic effects of sterols and saturated fatty acids. *Traffic* **10**: 673-690.
- PINTO, W. J., G. W. WELLS & R. L. LESTER (1992). Characterization of enzymatic synthesis of sphingolipid long-chain bases in *Saccharomyces cerevisiae*: mutant strains exhibiting long-chain-base auxotrophy are deficient in serine palmitoyltransferase activity. *J Bacteriol* **174**: 2575-2581.
- PIONTEK, M., J. HAGEDORN, C. P. HOLLENBERG, G. GELLISSEN & A. W. STRASSER (1998). Two novel gene expression systems based on the yeasts *Schwanniomyces occidentalis* and *Pichia stipitis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**: 331-338.
- PIPER, M. D., S. P. HONG, G. E. BALL & I. W. DAWES (2000). Regulation of the balance of one-carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 30987-30995.
- PIRKOV, I., J. NORBECK, L. GUSTAFSSON & E. ALBERS (2008). A complete inventory of all enzymes in the eukaryotic methionine salvage pathway. *FEBS J* **275**: 4111-4120.
- PITSON, S. M. (2011). Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling. *Trends Biochem Sci* **36**: 97-107.
- POMPON, D. & A. NICOLAS (1989). Protein engineering by cDNA recombination in yeasts: shuffling of mammalian cytochrome P-450 functions. *Gene* **83**: 15-24.
- PROKSCH, E., J. M. BRANDNER & J. M. JENSEN (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* **17**: 1063-1072.
- QIE, L., M. M. NAGIEC, J. A. BALTISBERGER, R. L. LESTER & R. C. DICKSON (1997). Identification of a *Saccharomyces* gene, LCB3, necessary for incorporation of exogenous long chain bases into sphingolipids. *J Biol Chem* **272**: 16110-16117.
- RAMOS, F. & J. M. WIAME (1982). Occurrence of a catabolic L-serine (L-threonine) deaminase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **123**: 571-576.
- REVARDEL, E., M. BONNEAU, P. DURRENS & M. AIGLE (1995). Characterization of a new gene family developing pleiotropic phenotypes upon mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1263**: 261-265.
- ROGERS, J., C. HARDING, A. MAYO, J. BANKS & A. RAWLINGS (1996). Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons. *Arch Dermatol Res* **288**: 765-770.

- ROMANOS, M. A., C. A. SCORER & J. J. CLARE (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**: 423-488.
- ROON, R. J., F. LARIMORE & J. S. LEVY (1975). Inhibition of amino acid transport by ammonium ion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **124**: 325-331.
- ROOSEN, J., K. ENGELEN, K. MARCHAL, J. MATHYS, G. GRIFFIOEN, E. CAMERONI, . . . J. WINDERICKX (2005). PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. *Mol Microbiol* **55**: 862-880.
- ROSENBLUM, I. Y. & H. J. SALLACH (1975). D-3-phosphoglycerate dehydrogenase from wheat germ-1. *Methods Enzymol* **41**: 285-289.
- ROTHSTEIN, R. (1991). Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol* **194**: 281-301.
- ROTHSTEIN, R. J. (1983). One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* **101**: 202-211.
- RUTTI, M. F., S. RICHARD, A. PENNO, A. VON ECKARDSTEIN & T. HORNEMANN (2009). An improved method to determine serine palmitoyltransferase activity. *J Lipid Res* **50**: 1237-1244.
- RYU, Y. G., M. J. BUTLER, K. F. CHATER & K. J. LEE (2006). Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 7132-7139.
- SABA, J. D., F. NARA, A. BIELAWSKA, S. GARRETT & Y. A. HANNUN (1997). The BST1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is the sphingosine-1-phosphate lyase. *J Biol Chem* **272**: 26087-26090.
- SALLACH, H. J. (1966). [44] d-3-phosphoglycerate dehydrogenase. *Methods Enzymol* **9**: 216-220.
- SAMBROOK, J., T. MANIATIS & E. F. FRITSCH (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SAN FILIPPO, J., P. SUNG & H. KLEIN (2008). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* **77**: 229-257.
- SAUER, B. (1987). Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**: 2087-2096.
- SAUER, U. (2001). Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **73**: 129-169.
- SAWAI, H., Y. OKAMOTO, C. LUBERTO, C. MAO, A. BIELAWSKA, N. DOMAE & Y. A. HANNUN (2000). Identification of ISC1 (YER019w) as inositol phosphosphingolipid phospholipase C in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 39793-39798.
- SCHERER, M., G. SCHMITZ & G. LIEBISCH (2009). High-throughput analysis of sphingosine 1-phosphate, sphinganine 1-phosphate, and lysophosphatidic acid in plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* **55**: 1218-1222.
- SCHIESTL, R. H., M. DOMINSKA & T. D. PETES (1993). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with nonhomologous DNA: illegitimate integration of transforming DNA into yeast chromosomes and in vivo ligation of transforming DNA to mitochondrial DNA sequences. *Mol Cell Biol* **13**: 2697-2705.
- SCHIESTL, R. H. & R. D. GIETZ (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* **16**: 339-346.
- SCHIRCH, L. (1982). Serine hydroxymethyltransferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **53**: 83-112.
- SCHNEITER, R. (1999). Brave little yeast, please guide us to thebes: sphingolipid function in *S. cerevisiae*. *Bioessays* **21**: 1004-1010.
- SCHNEITER, R., B. BRUGGER, R. SANDHOFF, G. ZELNIG, A. LEBER, M. LAMPL, . . . S. D. KOHLWEIN (1999). Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J Cell Biol* **146**: 741-754.
- SCHORLING, S., B. VALLEE, W. P. BARZ, H. RIEZMAN & D. OESTERHELT (2001). Lag1p and Lac1p are essential for the Acyl-CoA-dependent ceramide synthase reaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **12**: 3417-3427.

- SCHORSCH, C., T. KÖHLER, H. ANDREA & E. BOLES (nicht publiziert). High-level production of tetraacetyl phytosphingosine (TAPS) by combined genetic engineering of sphingoid base biosynthesis and L-serine availability in the non-conventional yeast *Pichia ciferrii*.
- SCHORSCH, C., T. KOHLER & E. BOLES (2009). Knockout of the DNA ligase IV homolog gene in the sphingoid base producing yeast *Pichia ciferrii* significantly increases gene targeting efficiency. *Curr Genet* **55**: 381-389.
- SCHULZE, H., C. MICHEL & G. VAN ECHTEN-DECKERT (2000). Dihydroceramide desaturase. *Methods Enzymol* **311**: 22-30.
- SCHURER, N. Y., G. PLEWIG & P. M. ELIAS (1991). Stratum corneum lipid function. *Dermatologica* **183**: 77-94.
- SIMIC, P., J. WILLUHN, H. SAHM & L. EGGELING (2002). Identification of glyA (encoding serine hydroxymethyltransferase) and its use together with the exporter ThrE to increase L-threonine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3321-3327.
- SINCLAIR, D. A. & I. W. DAWES (1995). Genetics of the synthesis of serine from glycine and the utilization of glycine as sole nitrogen source by *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **140**: 1213-1222.
- SINGH, A., T. PRASAD, K. KAPOOR, A. MANDAL, M. ROTH, R. WELTI & R. PRASAD (2010). Phospholipidome of *Candida*: each species of *Candida* has distinctive phospholipid molecular species. *OMICS* **14**: 665-677.
- SMITH, E. R. & A. H. MERRILL, JR. (1995). Differential roles of de novo sphingolipid biosynthesis and turnover in the "burst" of free sphingosine and sphinganine, and their 1-phosphates and N-acyl-derivatives, that occurs upon changing the medium of cells in culture. *J Biol Chem* **270**: 18749-18758.
- SMITH, S. W. & R. L. LESTER (1974). Inositol phosphorylceramide, a novel substance and the chief member of a major group of yeast sphingolipids containing a single inositol phosphate. *J Biol Chem* **249**: 3395-3405.
- STELLWAGEN, A. E., Z. W. HAIMBERGER, J. R. VEATCH & D. E. GOTTSCHLING (2003). Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev* **17**: 2384-2395.
- STODOLA, F. H. & L. J. WICKERHAM (1960). Formation of extracellular sphingolipides by microorganisms. II. Structural studies on tetraacetylphytosphingosine from the yeast *Hansenula ciferrii*. *J Biol Chem* **235**: 2584-2585.
- STOFFEL, W., G. STICHT & D. LEKIM (1968). Metabolism of sphingosine bases. VI. Synthesis and degradation of sphingosine bases in *Hansenula ciferrii*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **349**: 1149-1159.
- STOOPS, J. K., S. J. KOLODZIEJ, J. P. SCHROETER, J. P. BRETAUDIERE & S. J. WAKIL (1992). Structure-function relationships of the yeast fatty acid synthase: negative-stain, cryo-electron microscopy, and image analysis studies of the end views of the structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 6585-6589.
- SUGIMOTO, E. & L. I. PIZER (1968). The mechanism of end product inhibition of serine biosynthesis. I. Purification and kinetics of phosphoglycerate dehydrogenase. *J Biol Chem* **243**: 2081-2089.
- SUZUKI, C., N. YOSHIDA, E. OKANO, T. KAWASUMI & Y. KASHIWAGI (2003). Cloning and chromosomal mapping of *URA3* genes of *Pichia farinosa* and *P. sorbitophila* encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase. *Yeast* **20**: 905-912.
- SYMINGTON, L. S. (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 630-670, table of contents.
- TABATABAIE, L., T. J. DE KONING, A. J. GEBOERS, I. E. VAN DEN BERG, R. BERGER & L. W. KLOMP (2009). Novel mutations in 3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) are distributed throughout the protein and result in altered enzyme kinetics. *Hum Mutat* **30**: 749-756.

- TABUCHI, M., A. AUDHYA, A. B. PARSONS, C. BOONE & S. D. EMR (2006). The phosphatidylinositol 4,5-biphosphate and TORC2 binding proteins Slm1 and Slm2 function in sphingolipid regulation. *Mol Cell Biol* **26**: 5861-5875.
- TAKABE, K., R. H. KIM, J. C. ALLEGOOD, P. MITRA, S. RAMACHANDRAN, M. NAGAHASHI, . . . S. SPIEGEL (2010). Estradiol induces export of sphingosine 1-phosphate from breast cancer cells via ABCC1 and ABCG2. *J Biol Chem* **285**: 10477-10486.
- TANI, M., A. KIHARA & Y. IGARASHI (2006). Rescue of cell growth by sphingosine with disruption of lipid microdomain formation in *Saccharomyces cerevisiae* deficient in sphingolipid biosynthesis. *Biochem J* **394**: 237-242.
- TEHLIVETS, O., K. SCHEURINGER & S. D. KOHLWEIN (2007). Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1771**: 255-270.
- TER SCHURE, E. G., N. A. VAN RIEL & C. T. VERRIPS (2000). The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 67-83.
- TER VELD, F., D. WOLFF, T. KÖHLER & A. POETSCH (2011) Determination of sphingolipid biosynthesis metabolites in *Pichia ciferrii* yeast using liquid chromatography coupled tandem mass spectrometry. [Poster session presented]. *10th Yeast Lipid Conference (05/26/2011; Oulu, Finland)*
- TERNES, P., S. FRANKE, U. ZHRINGER, P. SPERLING & E. HEINZ (2002). Identification and characterization of a sphingolipid delta 4-desaturase family. *J Biol Chem* **277**: 25512-25518.
- THEIS, J. F., C. YANG, C. B. SCHAEFER & C. S. NEWLON (1999). DNA sequence and functional analysis of homologous ARS elements of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. carlsbergensis*. *Genetics* **152**: 943-952.
- THEVISSSEN, K., J. IDKOWIAK-BALDYS, Y. J. IM, J. TAKEMOTO, I. E. FRANCOIS, K. K. FERKET, . . . B. P. CAMMUE (2005). SKN1, a novel plant defensin-sensitivity gene in *Saccharomyces cerevisiae*, is implicated in sphingolipid biosynthesis. *FEBS Lett* **579**: 1973-1977.
- THOMAS, D. & Y. SURDIN-KERJAN (1997). Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 503-532.
- TIWARI, R., R. KOFFEL & R. SCHNEITER (2007). An acetylation/deacetylation cycle controls the export of sterols and steroids from *S. cerevisiae*. *EMBO J* **26**: 5109-5119.
- TOULMAY, A. & R. SCHNEITER (2007). Lipid-dependent surface transport of the proton pumping ATPase: a model to study plasma membrane biogenesis in yeast. *Biochimie* **89**: 249-254.
- UEMURA, S., A. KIHARA, J. INOKUCHI & Y. IGARASHI (2003). Csg1p and newly identified Csh1p function in mannosylinositol phosphorylceramide synthesis by interacting with Csg2p. *J Biol Chem* **278**: 45049-45055.
- UEMURA, S., A. KIHARA, S. IWAKI, J. INOKUCHI & Y. IGARASHI (2007). Regulation of the transport and protein levels of the inositol phosphorylceramide mannosyltransferases Csg1 and Csh1 by the Ca²⁺-binding protein Csg2. *J Biol Chem* **282**: 8613-8621.
- UENO, K., J. UNO, H. NAKAYAMA, K. SASAMOTO, Y. MIKAMI & H. CHIBANA (2007). Development of a highly efficient gene targeting system induced by transient repression of *YKU80* expression in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* **6**: 1239-1247.
- ULANE, R. & M. OGUR (1972). Genetic and physiological control of serine and glycine biosynthesis in *Saccharomyces*. *J Bacteriol* **109**: 34-43.
- UMEMURA, M., M. OKAMOTO, K. NAKAYAMA, K. SAGANE, K. TSUKAHARA, K. HATA & Y. JIGAMI (2003). GWT1 gene is required for inositol acylation of glycosylphosphatidylinositol anchors in yeast. *J Biol Chem* **278**: 23639-23647.
- UMEZU, K., T. AMAYA, A. YOSHIMOTO & K. TOMITA (1971). Purification and properties of orotidine-5'-phosphate pyrophosphorylase and orotidine-5'-phosphate decarboxylase from baker's yeast. *J Biochem* **70**: 249-262.
- URBAN, J., A. SOULARD, A. HUBER, S. LIPPMAN, D. MUKHOPADHYAY, O. DELOCHE, . . . R. LOEWITH (2007). Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **26**: 663-674.

- VALENCIA, M., M. BENTELE, M. B. VAZE, G. HERRMANN, E. KRAUS, S. E. LEE, . . . J. E. HABER (2001). NEJ1 controls non-homologous end joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **414**: 666-669.
- VALLEE, B. & H. RIEZMAN (2005). Lip1p: a novel subunit of acyl-CoA ceramide synthase. *EMBO J* **24**: 730-741.
- VANCE, J. E. & R. STEENBERGEN (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res* **44**: 207-234.
- VERSTREPEN, K. J., S. D. VAN LAERE, B. M. VANDERHAEGEN, G. DERDELINCKX, J. P. DUFOUR, I. S. PRETORIUS, . . . F. R. DELVAUX (2003). Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5228-5237.
- WANG, L., S. MUKHERJEE, O. NARAYAN & L. J. ZHAO (1996). Characterization of a leucine-zipper-like domain in Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1. *Gene* **178**: 7-13.
- WANG, Q. & A. CHANG (2002). Sphingoid base synthesis is required for oligomerization and cell surface stability of the yeast plasma membrane ATPase, Pma1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12853-12858.
- WATTANACHAISAREEKUL, S., A. E. LANTZ, M. L. NIELSEN & J. NIELSEN (2008). Production of the polyketide 6-MSA in yeast engineered for increased malonyl-CoA supply. *Metab Eng* **10**: 246-254.
- WEISS, B. & W. STOFFEL (1997). Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase--cloning, expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis. *Eur J Biochem* **249**: 239-247.
- WELLS, G. B. & R. L. LESTER (1983). The isolation and characterization of a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* that requires a long chain base for growth and for synthesis of phosphosphingolipids. *J Biol Chem* **258**: 10200-10203.
- WICKERHAM, L. J. & K. A. BURTON (1962). Phylogeny and biochemistry of the genus *Hansenula*. *Bacteriol Rev* **26**: 382-397.
- WICKERHAM, L. J. & F. H. STODOLA (1960). Formation of extracellular sphingolipides by microorganisms. I. Tetraacetylphyto-sphingosine from *Hansenula ciferri*. *J Bacteriol* **80**: 484-491.
- WILSON, T. E., U. GRAWUNDER & M. R. LIEBER (1997). Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. *Nature* **388**: 495-498.
- WILSON, W. H., D. C. SCHROEDER, M. J. ALLEN, M. T. HOLDEN, J. PARKHILL, B. G. BARRELL, . . . P. GHAZAL (2005). Complete genome sequence and lytic phase transcription profile of a Coccolithovirus. *Science* **309**: 1090-1092.
- WULLSCHLEGER, S., R. LOEWITH & M. N. HALL (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**: 471-484.
- YAMASHITA, S. & J. NIKAWA (1997). Phosphatidylserine synthase from yeast. *Biochim Biophys Acta* **1348**: 228-235.
- YANG, V. W., J. A. MARKS, B. P. DAVIS & T. W. JEFFRIES (1994). High-efficiency transformation of *Pichia stipitis* based on its URA3 gene and a homologous autonomous replication sequence, ARS2. *Appl Environ Microbiol* **60**: 4245-4254.
- YASUDA, S., M. NISHIJIMA & K. HANADA (2003). Localization, topology, and function of the LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase in mammalian cells. *J Biol Chem* **278**: 4176-4183.
- YETUKURI, L., K. EKROOS, A. VIDAL-PUIG & M. ORESIC (2008). Informatics and computational strategies for the study of lipids. *Mol Biosyst* **4**: 121-127.
- YILMAZ, E. & H. H. BORCHERT (2006). Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema--an in vivo study. *Int J Pharm* **307**: 232-238.
- ZALKIN, H. & C. YANOFSKY (1982). Yeast gene TRP5: structure, function, regulation. *J Biol Chem* **257**: 1491-1500.
- ZDOBNOV, E. M. & R. APWEILER (2001). InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* **17**: 847-848.

- ZHANG, X., M. S. SKRZYPEK, R. L. LESTER & R. C. DICKSON (2001).** Elevation of endogenous sphingolipid long-chain base phosphates kills *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Curr Genet* **40**: 221-233.
- ZHANG, Y., M. L. HEFFERIN, L. CHEN, E. Y. SHIM, H. M. TSENG, Y. KWON, . . . A. E. TOMKINSON (2007).** Role of Dnl4-Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 639-646.
- ZHENG, W., J. KOLLMEYER, H. SYMOLON, A. MOMIN, E. MUNTER, E. WANG, . . . A. H. MERRILL, JR. (2006).** Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim Biophys Acta* **1758**: 1864-1884.
- ZIMMERMANN, F. K. (1975).** Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **31**: 71-86.
- ZINSER, E., C. D. SPERKA-GOTTLIEB, E. V. FASCH, S. D. KOHLWEIN, F. PALTALUF & G. DAUM (1991).** Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **173**: 2026-2034.
- ZOU, Z., F. TONG, N. J. FAERGEMAN, C. BORSTING, P. N. BLACK & C. C. DIRUSSO (2003).** Vectorial acylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Fat1p and fatty acyl-CoA synthetase are interacting components of a fatty acid import complex. *J Biol Chem* **278**: 16414-16422.

DANKSAGUNG

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Eckhard Boles für das Anvertrauen dieses spannenden Projektes. Eine ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung, sowie anregende wissenschaftliche Diskussionen haben zum Gelingen dieser Arbeit einen großen Teil beigetragen. Vielen Dank!

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Beatrix Süß, dass sie freundlicherweise das Zweitgutachten übernommen hat.

Für die Förderung und Bereitstellung der finanziellen Mittel für dieses Projekt („FerDi“-Projekt, BMBF-Initiative „Bioindustrie 2021“) bedanke ich mich recht herzlich beim Bundesministerium für Bildung und Forschung (das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0315191 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor).

Ebenfalls gebührt der Evonik Degussa GmbH Dank für die finanzielle Unterstützung des Projektes und das Vertrauen in mich während meiner Doktorarbeit. Speziell möchte ich mich bei Dr. Tim Köhler und Dr. Steffen Schaffer für die sehr angenehmen und weiterführenden Gespräche, sowie die stete Diskussionsbereitschaft bedanken. Für die tatkräftigen Unterstützungen von Heiko Andrea bei zahlreichen Kultivierungen und HPLC-Analysen, sowie seine freundliche Art und Hilfsbereitschaft während meiner Forschungsaufenthalte im Science-to-Business Center Biotechnologie (Marl), möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Ein Dankeschön auch an Dr. Gerhard Liebisch (Universität Regensburg) und Dr. Frank ter Veld (Ruhr-Universität Bochum) für die Durchführung der LC-MS/MS Analysen, sowie an Frau Dr. Karina Brinkrolf (Universität Bielefeld) für den Zugang zur *P. ciferrii* Genom-Datenbank.

Bei all den Mitgliedern unseres Arbeitskreises möchte ich mich für eine gute Zusammenarbeit und ein angenehmes Arbeitsklima bedanken.

Zu guter Letzt gilt ein besonderer Dank meiner Familie, meiner Freundin sowie meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben und für mich da waren.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Christoph Schorsch

Frankfurt am Main, den

EIGENE PUBLIKATIONEN

SCHORSCH, C., T. KÖHLER, H. ANDREA & E. BOLES. High-level production of tetraacetyl phytosphingosine (TAPS) by combined genetic engineering of sphingoid base biosynthesis and L-serine availability in the non-conventional yeast *Pichia ciferrii*. **(eingereicht bei „Metabolic Engineering“)**

BÖRGEL, D., M. VAN DEN BERG, T. HÜLLER, G. LIEBISCH, E. BOLES, C. SCHORSCH, R. VAN DER POL, A. ARINK, I. BOOGERS, K. KOREVAAR, M. FARWICK, T. KÖHLER & S. SCHAFFER. Metabolic engineering of the non-conventional yeast *Pichia ciferrii* for production of rare sphingoid bases. **(eingereicht bei „Metabolic Engineering“)**

SCHORSCH, C., T. KÖHLER & E. BOLES (2009). Knockout of the DNA ligase IV homolog gene in the sphingoid base producing yeast *Pichia ciferrii* significantly increases gene targeting efficiency. *Curr Genet* **55**: 381-389.

Patente:

Inhalte der Publikation „ High-level production of tetraacetyl phytosphingosine (TAPS) by combined genetic engineering of sphingoid base biosynthesis and L-serine availability in the non-conventional yeast *Pichia ciferrii*“ wurden zum Patent angemeldet und sind noch nicht offengelegt worden.

CURRICULUM VITAE

➤ ANGABEN ZUR PERSON:

Name **CHRISTOPH SCHORSCH**
Straße Hegelstraße 12
Adresse 60316 Frankfurt am Main
Telefon +49 (0)151 28260618
eMail Christoph.Schorsch@gmx.net
Geburtsdaten 28. Dezember 1981 in Bad Soden am Taunus
Nationalität deutsch
Familienstand ledig



➤ PROMOTION:

(voraussichtlich) 2007 - 2011 Promotion⁷ an der Goethe Universität Frankfurt
(in Kooperation mit **EVONIK** Degussa GmbH)
Betreuung durch Prof. Dr. Eckhard Boles

➤ HOCHSCHULAUSSILDUNG:

Dipl.-Studiengang Biologie an der Goethe Universität Frankfurt
2006 - 2007 Diplomarbeit⁸
Betreuung durch Prof. Dr. Eckhard Boles
2004 - 2006 Hauptstudium⁹
2002 - 2004 Grundstudium

➤ ZIVILDIENTST:

2001 - 2002 Zentrum für körperlich Schwerbehinderte (ZKS),
Frankfurt / Niederrad

⁷ Titel der Dissertation: „**Molekulargenetische Optimierung der Sphingoidbasen-Produktion der nicht-konventionellen Hefe *P. cijferii***“

⁸ Titel der Diplomarbeit: „**Konstruktion und Charakterisierung von rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen zur effizienteren Vergärung von Saccharose und Pentosezuckern zu Bioethanol**“

⁹ Hauptfächer: Zell- und Entwicklungsbiologie, Genetik und Neurobiologie

➤ **SCHULAUSSBILDUNG:**

1992 - 2001 Carl-Schurz-Schule (-Gymnasium), Frankfurt / Sachsenhausen
1988 - 1992 Mina-Specht-Schule, Frankfurt / Schwanheim

➤ **BIOLOGISCHE PRAKTIKA AUßERHALB DES STUDIUMS:**

04.07.2005 - 12.08.2005 *University of Western Australia, Perth*
(Schwerpunkt Tierphysiologie)

21.02.2005 - 08.04.2005 Paul-Ehrlich-Institut, Langen
(Abteilung „Medizinische Biotechnologie“)