

**MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG DES RETROTRANSPOSONS
YIt1 DER HEFE *YARROWIA LIPOLYTICA***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt
der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Master of Science Senam

geboren am 06.03.1967 in Kulon Progo (Indonesien)

Gutachter :

Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerold Barth

Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Schmidt

Prof. Dr. med. habil. Axel Rethwilm

Eingereicht am : 16 Februar 2004

Tag der Verteidigung : 27 April 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Retrotransposonen	1
1.1.1	Klassifizierung der Retrotransposonen	1
1.1.2	Der Lebenszyklus der Retrotransposonen am Beispiel von Ty	5
1.2	Das Genom der Retroviren	6
1.3	Die Retrotransposonen von Hefen und filamentösen Pilzen	7
1.4	Wechselbeziehungen zwischen Retrotransposonen und Wirtszellen	13
1.4.1	Zielsequenzen der Retrotransposonen	14
1.4.2	Aktivierung und Regulation der Retrotransposonen	14
1.5	Charakterisierung der nichtkonventionellen Hefe <i>Yarrowia lipolytica</i>	15
1.5.1	Dimorphismus von <i>Yarrowia lipolytica</i>	16
1.5.2	Physiologie und C-Quellenverwertung	17
1.5.3	Genetik und Molekularbiologie von <i>Yarrowia lipolytica</i>	18
1.5.4	Evolutionäre Einordnung von <i>Yarrowia lipolytica</i>	21
1.5.5	<i>Yarrowia lipolytica</i> als Modellorganismus	21
1.5.6	Anwendungen in der Biotechnologie und Nahrungsmittelindustrie	22
1.5.7	Die mobilen genetischen Elemente von <i>Yarrowia lipolytica</i>	26
1.6	Zielstellung dieser Arbeit	29
2	Material und Methoden	30
2.1	Geräte	30
2.2	Chemikalien und Biochemikalien	30
2.2.1	Kitsysteme	30
2.2.2	Enzyme	31
2.2.3	Nukleinsäuren	31
2.2.3.1	Verwendete Plasmide	31
2.2.3.2	Neu konstruierte Plasmide	31
2.2.3.3	Oligonukleotide	32
2.2.3.4	DNA-Molekulargewichts-Standards	34
2.3	Mikroorganismen	34
2.3.1	<i>Escherichia coli</i>	34
2.3.2	<i>Yarrowia lipolytica</i>	35
2.4	Medien	35
2.5	Mikrobiologische Methoden	36
2.5.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	36
2.5.2	Kultivierung von <i>Yarrowia lipolytica</i>	36

2.6	Gentechnische Arbeitmethoden	37
2.6.1	Agarosegel-Elektrophorese	37
2.6.2	Restriktionsspaltungen	37
2.6.3	Behandlung von DNA-Fragmenten mit Phosphatase	38
2.6.4	Ligation von DNA-Fragmenten	38
2.6.5	Isolierung von DNA aus Agarosegel	39
2.6.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
2.6.7	DNA-Sequenzierung	40
2.6.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	41
2.6.9	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Yarrowia lipolytica</i> (nach Scheuber, 1993)	42
2.6.10	Isolierung von RNA aus <i>Yarrowia lipolytica</i>	43
2.6.11	Transformation von Mikroorganismen	43
2.6.11.1	Herstellung elektrokompeter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	43
2.6.11.2	Transformation von <i>Escherichia coli</i> Zellen mittels Elektroporation	44
2.6.11.3	Herstellung kompetenter <i>Yarrowia lipolytica</i> Zellen	44
2.6.11.4	Transformation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mittels Elektroporation (nach Dower <i>et al.</i> , 1988)	44
2.6.12	Southern-Hybridisierung	45
2.6.12.1	DNA-Vorbereitung und Transfer auf Nylonmembranen	45
2.6.12.2	Prähybridisierung und Hybridisierung	46
2.6.12.3	Waschschritte, Blockierung, Antikörperbindung und Signaldetektion	46
2.6.13	Northern Hybridisierung	47
2.7	DNA-Konstrukte	48
2.7.1	Konstruktion des Vektor pYLIMCS	48
2.7.2	Konstruktion von pYLEHC	49
2.7.3	Konstruktion einer Integrase-GFP-Fusion im Vektor pYLIG	50
2.7.4	Vektoren zum Nachweis der Promotoraktivität des LTR	50
2.8	Biochemische Methoden	50
2.8.1	Proteinisolierung aus Extrakten	50
2.8.2	Proteinbestimmung	51
2.8.3	Western Hybridisierung	52
2.8.3.1	Proteintrennung mittels SDS-PAGE	52
2.8.3.2	Proteintransfer und Detektion	53
2.8.4	Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität	54
2.9	Programme für die Analyse von Sequenzen	55

3 Ergebnisse	57
3.1 Sequenzierung des Retrotransposons Ylt1	57
3.1.1 Analyse der Sequenz von Ylt1	64
3.1.1.1 Promotoreigenschaft der LTR-Sequenz	64
3.1.1.2 Enhancer	65
3.1.2 Primer-Bindungsstelle	66
3.1.3 Polypurin-Bereich	67
3.1.4 Die terminalen invertierten Sequenzwiederholungen	68
3.1.5 Die Sequenzverdopplung des Integrationsortes	69
3.1.6 Der offene Leserahmen (ORF) des Ylt1	71
3.1.7 Phylogenetische Verwandtschaft des Retrotransposons Ylt1	75
3.2 Das Vorkommen des Retrotransposons Ylt1 in <i>Yarrowia lipolytica</i>	77
3.2.1 Nachweis des Retrotransposons Ylt1 durch Southern Hybridisierung	77
3.2.2 Nachweis des Ylt1 in <i>Yarrowia lipolytica</i> Stämmen durch Sequenzierung	87
3.3 Vorkommen von verschiedenen Retrotransposonen in <i>Yarrowia lipolytica</i>	91
3.4 Die Transpositionsaktivität des Ylt1	96
3.5 Nachweis der Transpositionshäufigkeit des Ylt1	98
3.6 Nachweis der Promotoraktivität des LTR von Ylt1 mit β -Galactosidase	99
3.7 Die natürlichen Transkriptionsprodukte des Retrotransposons Ylt1	101
3.8 Nachweis von Translationsprodukten des Retrotransposons Ylt1	102
3.8.1 Konstruktion des Expressionsvektors pYLIMCS	103
3.8.2 Nachweis der Translationsprodukte des <i>eta</i> -Bereiches	104
3.8.3 Expression einer Integrase-GFP-Proteinfusion	106
4 Diskussion	108
4.1 Struktur des Retrotransposons Ylt1	108
4.2 Kopiezahlveränderung	110
4.3 Homologe Rekombination	111
4.3.1 Vorkommendes Solo-LTR	111
4.3.2 TSD-Austausch	112
4.4 Herkunft des Retrotransposons Ylt1	113
4.5 Spezifische Eigenschaften des Retrotransposons Ylt1	115
4.6 Weitere Retrotransposonen in <i>Yarrowia lipolytica</i>	118
4.7 Nachweis einer Promotoraktivität der LTR-Sequenzen	118
4.8 Die Expression des ORF's von Ylt1	119
4.9 Vorkommen unvollständiger Kopien des Retrotransposons	120
4.10 Die Primer-Bindungsstelle von Ylt1	122

5	Zusammenfassung	126
6	Literaturverzeichnis	128
7	Anlage	152

Abkürzungsverzeichnis

<i>Amp</i> ^R	Ampicillinresistenzgen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARS	Autonom replizierende Sequenz
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA, die aus mRNA revers transkribiert wurde
<i>CEN</i>	Sequenz aus der Centromerregion
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Ethanol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>eta</i>	Bezeichnung für internen Region des Retrotransposons <i>Ylt1</i>
G	Glucose
<i>gag</i>	Gruppenspezifisches Antigen
Gag	Gag-Strukturprotein
<i>GPR1</i>	glyoxylate pathway regulation-Gen aus <i>Y. lipolytica</i>
<i>GPR1t</i>	<i>GPR1</i> -Terminator
h	Stunden
HPLC	high performance liquid chromatography
<i>ICL1</i>	Gen der Isocitratlyase
<i>pICL1</i>	<i>ICL1</i> -Promotor
<i>ICL1t</i>	<i>ICL1</i> -Terminator
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
<i>lacZ</i>	Gen der β -Galactosidase aus <i>E. coli</i>
Leu	Leucin
LB	Luria Bertani
LTR	Long Terminal Repeat des Retrotransposons <i>Ylt1</i> aus <i>Y. lipolytica</i>
M	Minimalmedium

Mb	Megabasen
MCS	Multiklonierungsstelle (<i>multi cloning site</i>)
Met	Methionin
MU	Miller Units
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
ORF	Offener Leserahmen
ori	Replikationsstartpunkt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Primer Bindungsstelle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>pol</i>	Pol-Gen
Pol	Polyprotein
PPT	Polypurin-Bereich (<i>polypurine tract</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Upm	Umdrehungen pro Minute
RST	<i>Random sequence tag</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TSD	Zielstellerverdopplungen des Retrotransposons
U	Unit
Ura	Uracil
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
YPD	Hefeextrakt-Pepton-Glucose (yeast extract-peptone-dextrose) Vollmedium für Hefen
Ylt1	<u>Yarrowia lipolytica</u> Retrotransposon
<i>zeta</i>	Bezeichnung für das LTR des Retrotransposons Ylt1 aus <i>Y. lipolytica</i>

1 Einleitung

1.1 Die Retrotransposonen

Retrotransposonen sind nicht infektiöse mobile genetische Elemente eukaryotischer Zellen, bei denen das Springen von einem zum anderen chromosomalen Ort nicht wie bei den bakteriellen Transposonen über einen Informationsfluß von DNA-Molekül zu DNA-Molekül, sondern wie auch bei Retroviren durch reverse Transkription ihrer RNA-Moleküle eingeleitet wird. Anschließend wird der so erhaltene DNA-Einzelstrang zu einer Doppelhelix (cDNA) ergänzt und an anderer Stelle ins Genom integriert (Boeke *et al.*, 1985; Hansen *et al.*, 1988; Garfinkel, 1992; Luciw und Leung, 1992; Temin, 1992; Grandbastien, 1998; Wilhelm *et al.*, 2001).

Das erste Retrotransposon wurde in den 50er Jahren von Barbara McClintoc in Mais (*Zea mays*) im Cold-Spring-Harbour-Laboratorium entdeckt (Watson *et al.*, 1983). Heute gelten die transponierbaren genetischen Elemente als ubiquitäre Komponenten des eukaryotischen Genoms (Boeke und Sandmeyer, 1991; Kim *et al.*, 1998). Es wurde gezeigt, dass diese Elemente etwa 3,1% der genomischen DNA der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Kim *et al.*, 1998), etwa 10% des Genoms von *Drosophila melanogaster* (Konieczny *et al.*, 1990) und 0,1% im *Arabidopsis thaliana* Genom einnehmen (Konieczny *et al.*, 1990). Dagegen enthält das Mais-Genom interessanterweise mindestens 50% an Retrotransposonen (SanMiguel *et al.*, 1996; SanMiguel und Bennetzen, 1998).

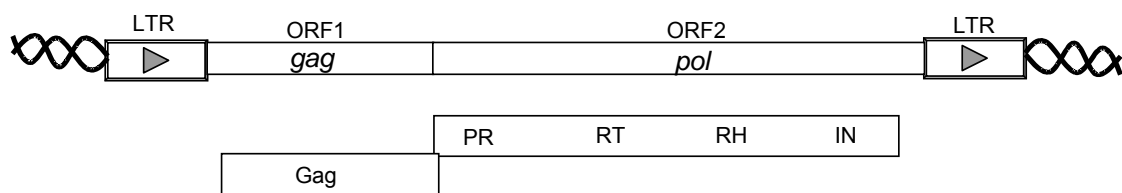
1.1.1 Klassifizierung der Retrotransposonen

Die mobilen genetischen Elemente der Retrotransposonen können in zwei große Klassen unterteilt werden (Abbildung 1). Das sind auf der einen Seite die LTR-Retrotransposonen mit langen terminalen Sequenzwiederholungen (LTR, für *long terminal repeat*) und auf der anderen Seite die Retrotransposonen ohne LTR, die LTR-freie Retrotransposonen oder auch LINE-Elemente (für *Long Interspersed Nuclear Elements*) genannt werden (Grandbastien, 1992, 1998).

Die LTR-Retrotransposonen sind ca. 5-10 kb lang und enthalten zwei gleiche LTR-Sequenzen in derselben Orientierung an beiden Enden und dazwischen einen oder mehrere offene Leserahmen (ORF für *open reading frames*) von etwa 4-8 kb Länge (Voytas und Ausubel, 1988; Bingham und Zachar, 1989; Boeke und Sandmeyer, 1991; Boeke *et al.*, 1985; Grandbastien, 1992; Knoop *et al.*, 1996; Ruiz-Perez *et al.*, 1996; Boeke und Stoye, 1997; Kachroo *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998; Marillonnet und Wessler, 1998; Miller *et al.*, 1998; Wright und Voytas, 1998; Theologis *et al.*, 2000; Neuveglise *et al.*, 2002a,b). Die LTR-Sequenzen sind ca. 250-1000 bp lang (Boeke und Sandmeyer, 1991; Schmid-Berger *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1998; Neuveglise *et al.*, 2002a,b; Goodwin *et al.*, 2003) und werden durch

die spezifischen Sequenzen der kurzen invertierten Sequenzwiederholungen (*short inverted repeats*) begrenzt. Die LTR-Sequenzen der Retrotransposonen und Retroviren weisen eine Besonderheit auf. Sie enthalten das Transkriptionssignal (TATA-Box als RNA-Polymerase-Bindungsbereich) und gleichzeitig auch das Terminierungssignal der Transkription (TTGT-Sequenz, Temin, 1981) sowie die Hexanukleotidsequenz AATAAA als Polyadenylierungssignal (PolyA-Signal) eukaryotischer Gene (Zarkower *et al.*, 1986; Connely und Manley, 1988; Sheets und Wickens, 1989; Sheets *et al.*, 1990; Wickens, 1990; Boeke und Sandmeyer, 1991; Coffin, 1992; Garfinkel, 1992; Grandbastien, 1998). Die TATA- und AATAAA-Sequenzen existieren in beiden LTR-Sequenzen (5'-LTR und 3'-LTR). Die TATA-Box am 5'-Ende der LTR-Sequenz ist die Bindungsstelle der RNA-Polymerase während der Transkription, wodurch diese 5'-LTR-Region als Promotor funktioniert. Im anderen Fall ist die TTGT Sequenz in der 3'-LTR-Sequenz das Terminierungssignal der Transkription, somit funktioniert die 3'-LTR-Sequenz als ein Terminator des Retrotransposons (Boeke und Sandmeyer, 1991; Grandbastien, 1998).

LTR Retrotransposon



LTR-freies Retrotransposon

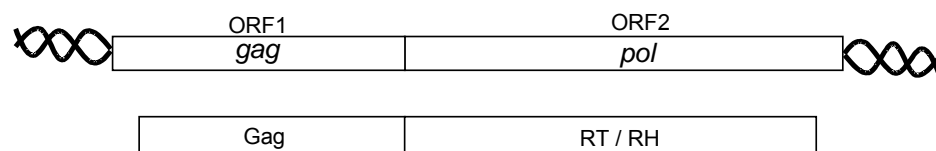


Abbildung 1: Die Klassen der Retrotransposonen. Die LTR-Retrotransposonen besitzen neben ihren internen Bereichen lange terminale Sequenzwiederholungen (LTR) an beiden Enden (Boxen mit Dreieck). Die sogenannte LTR-freie oder LINE-Gruppe (*long interspersed nuclear element*) der Retrotransposonen enthält keine LTR-Bereiche. Der offene Leserahmen (weiße Boxen) der LTR-Retrotransposonen codiert für ein Gag genanntes Strukturprotein (ORF1, gruppenspezifischer Antigen-Bereich *gag*) und ein meist durch einen Frameshiftmechanismus erzeugtes zweites Polyprotein Pol (ORF2, *pol*-Genbereich) bestehend aus Protease (PR), Integrase (IN), reverse Transkriptase (RT) und RNaseH (RH). Im anderen Fall codieren die LTR-freien Retrotransposonen für Gag und RT/RH, nicht jedoch für Protease und Integrase.

Während der Transkription müssen die Bindungsstelle der RNA-Polymerase im 5'-LTR und auch das Transkriptionsterminationssignal im 3'-LTR erkannt werden. Das heißt, dass das Terminationssignal in der 5'-LTR der Retrotransposonen und Retroviren nicht benutzt wird,

wenn sie in der Nähe der Promotorsequenzen auftreten (Sanfacon und Hohn, 1990; Sanfacon *et al.*, 1991).

Der ORF-Bereich der Retrotransposonen von ca. 4-8 kb Länge enthält die codierenden Regionen für Struktur- und Enzymproteine, die für die Transposition des Retrotransposons benötigt werden (Abbildung 1 und 2). Der gruppenspezifische Antigen-Bereich *gag* codiert das Gag-Strukturprotein (ORF1), welches für den Aufbau von cytoplasmatischen virusähnlichen Partikeln (VLP für *virus like particles*) benötigt wird (Garfinkel, 1992; Vogt, 1996). In diesen VLP findet die reverse Transkription statt. Der *pol*-Genbereich codiert im ORF2 das Polyprotein Pol, welches die funktionellen Domänen der Enzyme enthält, die für die reverse Transkription der mRNA des Retrotransposons und die Integration der doppelsträngigen cDNA ins Genom verwendet werden. Der Übergang vom ORF1 (*gag*-Bereich) zum nachfolgenden ORF2 des *pol*-Bereiches wird oft durch einen +1/-1-Frameshiftmechanismus translatiert. Der Protease-Bereich codiert für ein Protein (PR), das während der Reifung von verschiedenen Proteinen des Retrotransposons benötigt wird. Der reverse Transkriptase-Bereich codiert für ein Protein (RT), welches für die cDNA-Synthese während der reversen Transkription genutzt wird. Als Template wird hierbei die mRNA des Retrotransposons verwendet. Der Endonuclease-Bereich (*endo*), welcher auch als Integrase-Bereich bezeichnet wird, codiert für ein Protein (IN), das für die Integration der doppelsträngigen cDNA in das Genom des Wirtes benötigt wird (Covey, 1986; Boeke und Sandmeyer, 1991; Vogt, 1996; Grandbastien, 1998; Wilhelm und Wilhelm, 2001; Dunn *et al.*, 2002; Nymark-McMahon *et al.*, 2002). Die Integrase besitzt zwei unterschiedliche Funktionen, sie arbeitet als Restriktionsendonuclease und Ligase. Sie schneidet die genomische Ziel-DNA, die danach mit der neuen cDNA des Retrotransposons ligiert wird. Vor dem Prozess der reversen Transkription wird die RNA des Retrotransposons zur Stabilisierung zusammen mit der tRNA und anderen benötigten Enzymen in die sogenannten virusähnlichen Partikel (VLP) verpackt.

Die LTR-Retrotransposonen werden in zwei große Familien (Superfamilien) unterteilt, die als Ty3/*gypsy*-Superfamilie und Ty1/*copia*-Superfamilie bezeichnet werden (Abbildung 2). Der Unterschied zwischen beiden Superfamilien besteht in der Position der Bereiche für Integrase (IN) und reverse Transkriptase (RT). In der Ty3/*gypsy*-Superfamilie liegt der IN-Bereich hinter dem RT-Bereich. Diese Struktur hat große Ähnlichkeit mit den Retroviren. Im Fall der Ty1/*copia*-Superfamilie sind die beiden Regionen umgekehrt lokalisiert, die Integrase liegt vor der reversen Transkriptase (Xiong und Eickbush, 1990; Grandbastien, 1998; Malik und Eickbush, 1999, siehe Pfeile in Abbildung 2).

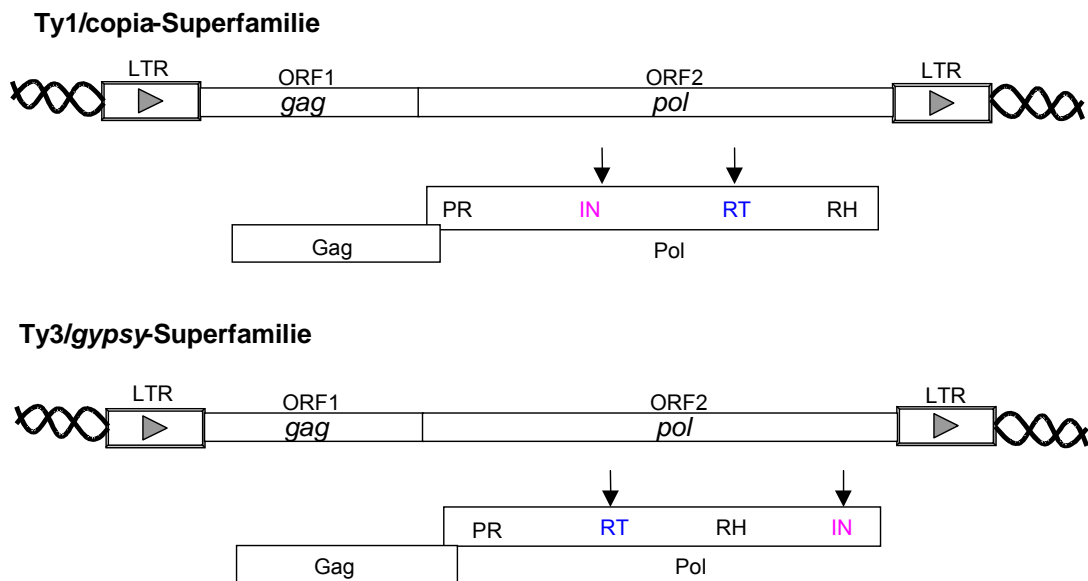


Abbildung 2: Die Klassifizierung der LTR-Retrotransposonen. Die Ty1/*copia*- und Ty3/*gypsy*-Retrotransposonen besitzen nicht nur interne codierende Bereiche (offene Leserahmen als weiße Boxen), sondern auch lange terminale Sequenzwiederholungen (LTR) an beiden Enden des Retrotransposons (Boxen mit Dreiecken). Der offene Leserahmen codiert für folgende Proteine: ein Gag-Strukturprotein (*gag*-Genbereich) und ein meist durch einen Frameshiftmechanismus erzeugtes zweites Polyprotein Pol (*pol*-Genbereich), welches die funktionellen Domänen der Protease (PR), Integrase (IN), reverse Transkriptase (RT) und RNase H (RH) enthält. In der Ty1/*copia*-Superfamilie ist der für die Integrase codierende Bereich (IN) vor der reversen Transkriptase (RT) lokalisiert (Pfeile). In der Ty3/*gypsy*-Superfamilie ist die Anordnung umgekehrt.

Einige Vertreter der Ty3/*gypsy*-Superfamilie enthalten noch eine zusätzliche Region, die ORF3 genannt wird. In einigen Fällen können die ORF3-Regionen für Env-ähnliche Proteine (für *envelope*) der Viren codieren (vgl. 1.2). Diese Gruppe wird deshalb auch als Zwischenglied zwischen den LTR-Retrotransposonen und den Retroviren bezeichnet (Grandbastien, 1998). Beispielsweise enthalten das *tom*-Retrotransposon von *Drosophila ananassae* (Tanda *et al.*, 1994) und auch das *gypsy*-Retrotransposon von *D. melanogaster* (Song *et al.*, 1994) *env*-ähnliche Gene. So konnte gezeigt werden, dass das *gypsy*-Retrotransposon infizierende VLP in den *Drosophila*-Larven produziert (Song *et al.*, 1997). Das Env-Protein ist ca. 70 kDa groß und zeigt Strukturähnlichkeit mit dem Hüllprotein der Retroviren, welches das Signalpeptid für die Lokalisation im Cytoplasma enthält. Damit wurde bewiesen, dass dieses Retrotransposon andere Wirtszellen infizieren kann.

Die Gruppe der LTR-freien Retrotransposonen besitzt, wie der Name schon sagt, keine langen terminalen Sequenzwiederholungen (LTR, vgl. Abbildung 1). Die LTR-freien Retrotransposonen können in zwei verschiedene Klassen unterschieden werden, die als **Long Interspersed Nuclear Elements** (LINE) und **Short Interspersed Nuclear Elements** (SINE) bezeichnet werden. Die Transkriptionsprodukte werden nicht nur bei den LTR-Retrotransposonen, sondern auch bei den LTR-freien Retrotransposonen, wie zum Beispiel

dem Retrotransposon Ylii des LINE-Typs L1, mit einem PolyA-Schwanz beendet (Boeke und Sandmeyer, 1991; Garfinkel, 1992; Casaregola *et al.*, 2002a,b). Die LINE-Elemente von ca. 4,5-6 kb Länge enthalten auch zwei ORFs (Abbildung 1). Der erste ORF codiert ein Nukleinsäure bindendes Protein Gag und der zweite ORF codiert nur die reverse Transkriptase und RNase H (RT-RH). Die meisten LINE-Elemente enthalten keine Endonuclease-Region (IN), aber in einigen Fällen wird eine Nuclease-Region vermutet. Der Transpositionsmechanismus der LINE-Elemente ist bis jetzt noch nicht intensiv untersucht worden. LINE-Retrotransposonen wurden in den meisten eukaryotischen Lebewesen (Pflanzen, Säuger und Pilze) gefunden. Das LINE-Retrotransposon L1 wird mit 15,4% Anteil am menschlichen Genom angegeben (Li *et al.*, 2001). Etwa 800.000 Kopien der LTR-freien Retrotransposonen kommen im menschlichen Genom vor, davon sind jedoch nur ca. 30-60 Kopien aktiv (Sassaman *et al.*, 1997). Die LTR-freien Retrotransposonen sind für die Pseudogen-Bildung verantwortlich (Esnault *et al.*, 2000; Casaregola *et al.*, 2002a,b). Die SINE-Elemente sind ca. 500 bis 1000 bp lang und hochrepetitiv (Van Dellen *et al.*, 2002). Sie enthalten aber keine offenen Leserahmen, können demnach selbst keine eigenen Proteine für ihre Lebenszyklen produzieren. Deshalb wird vermutet, dass die SINE-Elemente fremde reverse Transkriptase anderer Retrotransposonen für ihre Lebenszyklen benutzen (Finnegan, 1997; Grandbastien, 1998).

1.1.2 Der Lebenszyklus der Retrotransposonen am Beispiel von Ty

Im inaktiven Zustand liegen die Retrotransposonen Ty (für *Transposon of yeast*; vgl. auch 1.3) der Hefe *S. cerevisiae* integriert im Genom vor (Boeke und Sandmeyer, 1991; Garfinkel, 1992; Kim *et al.*, 1998; Neugeglise *et al.*, 2002a,b, Abbildung 3).

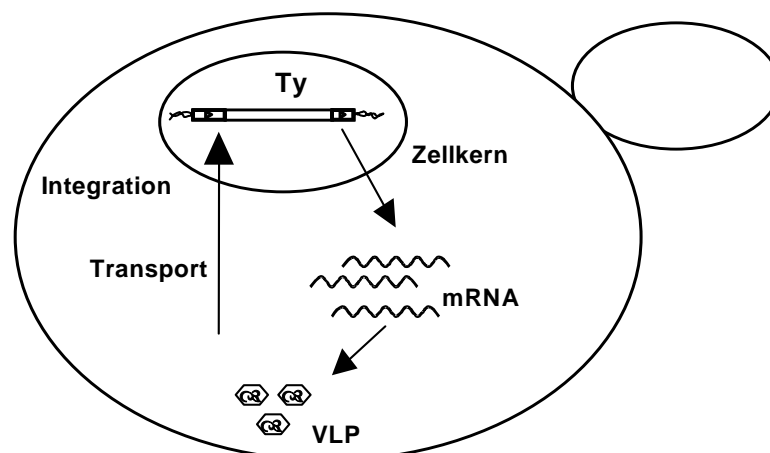


Abbildung 3: Der Lebenszyklus der Retrotransposonen Ty der Hefe *S. cerevisiae*. Die integrierte Ty cDNA im Genom der Hefe wird zur mRNA transkribiert. Zur Stabilisierung wird die mRNA in sogenannte virusähnliche Partikel (VLP) verpackt. In diesen VLP wird die mRNA zu cDNA revers transkribiert, um danach in den Zellkern transportiert zu werden. Dort erfolgt die Integration an eine andere Stelle im Genom.

Die DNA des Retrotransposons wird durch die RNA-Polymerase der Wirtszellen in RNA transkribiert. Die RNA-Moleküle werden danach zur Stabilisierung in ein virusähnliches Partikel (VLP) eingepackt und im Cytoplasma gelagert. In den VLP findet die reverse Transkription statt. Die reverse Transkriptase des Retrotransposons schreibt die gebildete mRNA in cDNA um. Die cDNA wird anschließend in den Kern transportiert. Im Kern wird mit Hilfe der Integrase die doppelsträngige cDNA in das Genom der Wirtszellen integriert (Mellor *et al.*, 1985; Garfinkel, 1992; Pochart *et al.*, 1993; Grandbastien, 1998; Lin *et al.*, 2001; Wilhelm und Wilhelm, 2001; Umezu *et al.*, 2002).

1.2. Das Genom der Retroviren

Retroviren und Retrotransposonen weisen in der Grundstruktur des Genoms eine Reihe von Ähnlichkeiten auf, die auf ihre Verwandtschaft hinweisen (Abbildung 2 und 4). Retroviren sind eine Gruppe von Viren, die RNA als genetisches Material im Viruspartikel und DNA als genetisches Material im Genom der Wirtszellen enthalten (Coffin, 1990; Kati *et al.*, 1992; Temin, 1992; Scheef *et al.*, 2001). Ein Retrovirus enthält als Dimer zwei identische einzelsträngige RNA-Moleküle von je ca. 10 kb Länge. In Abbildung 4 ist beispielhaft die Struktur und die Anordnung der ORF's unterschiedlicher Retroviren dargestellt.

Die Retroviren benutzen die reverse Transkription, um durch die Bildung der cDNA und deren Integration ins Genom in den Wirtszellen zu überleben. Beispielsweise enthält das menschliche Genom 10% Sequenzprodukte der reversen Transkription. Alle Retroviren sind also obligate Parasiten, denn sie können sich nur replizieren, wenn sie sich in den Zellen des Wirtsorganismus befinden.

Die Genomorganisationen aller Retroviren zeigen einige Gemeinsamkeiten. Sie enthalten alle lange terminale Sequenzwiederholungen (LTR). Dort befinden sich Enhancer-, Promotoren- und 3'-RNA-Prozessierungs-Sequenzen. Die Proteine der Retroviren werden entweder von einer Gesamtlängen-RNA oder nach dem Splicen in einzelne mRNA exprimiert. Die RNA-Viren können sehr häufig mutiert werden. Pro Replikationszyklus werden etwa 0,1 bis 1 Base ausgetauscht und es finden gelegentlich Rekombinationen statt (Coffin, 1990, 1992; Kati *et al.*, 1992; Kulkosky *et al.*, 1992; Temin, 1992).

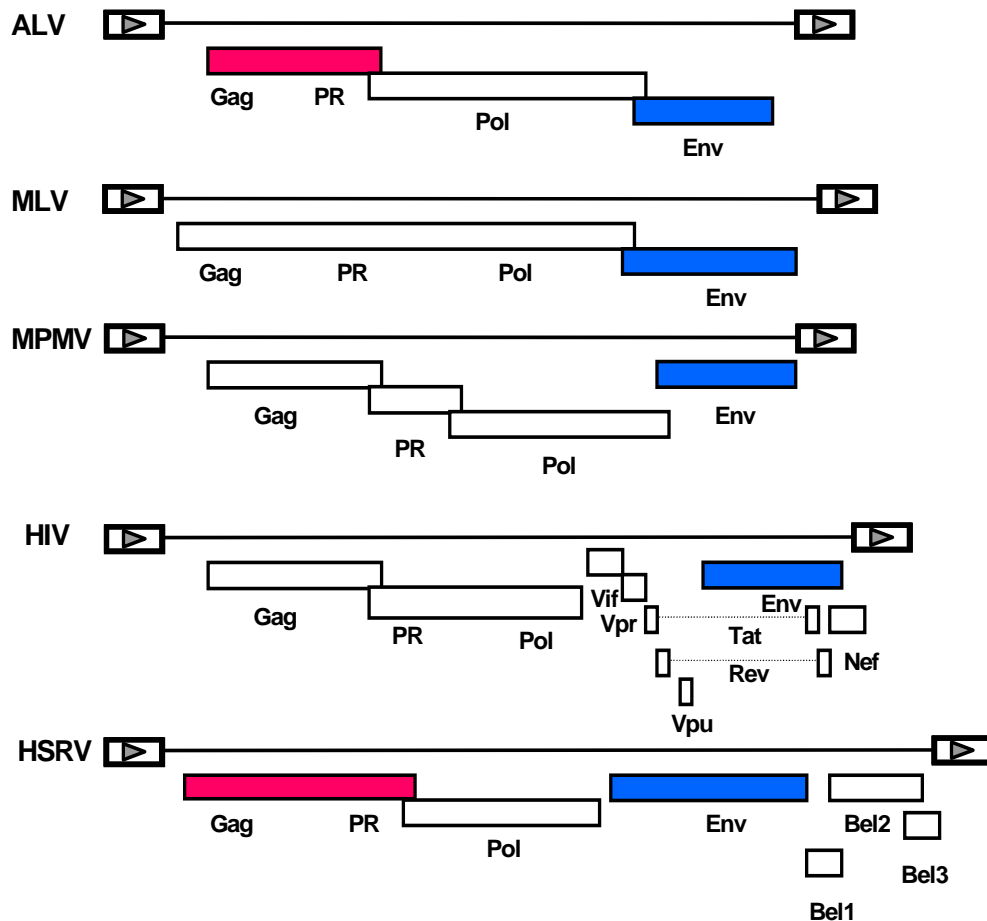


Abbildung 4: Die Genomorganisation ausgewählter Retroviren. Die Boxen mit Dreieck zeigen die langen terminalen Sequenzwiederholungen (LTR) und die weißen Boxen zeigen die internen codierenden Regionen. Die offenen Leserahmen codieren für das Gag genannte Strukturprotein und ein Polyprotein Pol. Die Übergänge von einem ORF zum nächsten ORF werden durch +1/-1 Frameshifts translatiert. Abkürzungen - ALV: Vogel-Leukämievirus (*Avian leukemia virus*), MLV: Maus-Leukämievirus (*Murine - mouse - leukemia virus*), MPMV: Mason-Pfizer Affenvirus (*Mason-Pfizer monkey virus*), HIV: Humanes Immundefizienzvirus (*human immunodeficiency virus*), HSRV: Humanes Spumavirus (*human spuma retrovirus*), Codierende Regionen - Gag: Gag-Strukturprotein aus *gag*-Bereich, PR: Protease, Pol: Polyprotein aus *pol*-Bereich, Vpr: Virenprotein, Vif: Viren infizierender Faktor, Tat: Transkriptionsaktivator, Rev: Regulator der Expression des Virenproteins, Vpu: Virenprotein U, Nef: negativer Faktor, Bel: Transkriptionsaktivatorprotein, Env: Hüll-Glykoprotein (*envelope protein*).

Die Genomorganisation einiger LTR-Retroviren ist bekannt, andere sind noch nicht genügend erforscht. Ihr Genom enthält mehrere offene Leserahmen (Abbildung 4). Typisch für das Virengenom ist neben *gag*- und *pol*-Genen die Anwesenheit des *env*-Genes (für *envelope*). Das vom *env*-Gen gebildete Hüllprotein Env ist für die Ausbildung der infektiösen Partikelform der Retroviren verantwortlich, womit sie andere Zellen des Wirtes infizieren können (Coffin, 1990, 1992; Temin, 1992). Das *env*-Gen unterscheidet Retroviren von Retrotransposonen, die in der Regel keine *env*-Region enthalten und damit keine infektiösen Viruspartikel ausbilden (vgl. 1.1.1). In den Retrotransposonen enthält der ORF1 normalerweise die codierende Sequenz für das Gag-Strukturprotein. Interessanterweise

codiert der ORF1 in den Retroviren ALV und HSRV dagegen jeweils ein Gag-Protease-Fusionsprotein Gag-PR (Coffin, 1992), in den anderen Retroviren wird die Protease PR einzeln oder als Fusion mit dem Pol-Protein exprimiert (Abbildung 4). Im HRSV treten als Bel bezeichnete zusätzliche Proteine auf, die als Aktivatoren der Transkription funktionieren. Im HIV kommen weitere kleinere ORF vor, die für die Proteine Vif, Vpr, Tat, Vpu und Rev codieren (Abbildung 4). Das Vpr-Protein ist verantwortlich für die Assemblierung des HIV1-Virion, Vif für die *in vivo* Replikation, Tat für die Aktivierung der LTR als Promotor durch die Wechselwirkung mit dem Transkriptionsfaktor der Wirtszellen, Rev für die Regulation der Expression der Virenproteine, Vpu (Viren-Protein U) ist für die Replikation verantwortlich und Nef ein negativer Faktor der Transkription. Durch molekularbiologische Untersuchungen wurde die Kontrolle der Genexpression durch die regulatorischen Tat- und Rev-Proteine bei HIV gut belegt.

1.3 Die Retrotransposonen von Hefen und filamentösen Pilzen

Eine umfassende aktuelle Übersicht zum Vorkommen von Retrotransposonen in Hefen wurde kürzlich von Neuveglise *et al.* (2002a,b) gegeben. Die LTR-Retrotransposonen der Hefe *S. cerevisiae* sind schon seit mehr als 20 Jahren bekannt. Sie werden als Ty Elemente (Ty1 bis Ty5) bezeichnet, sind ca. 5,2 bis 6,3 kb lang und gut charakterisiert (Boeke und Sandmeyer, 1991; Goffeau *et al.*, 1996; Zou *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1998; Jordan und MacDonald, 1998, 1999a,b). Details zum Aufbau der Retrotransposonen der Hefe *S. cerevisiae* sind in Abbildung 5 und in Tabelle 1 gezeigt.

Insgesamt wurden 331 komplette bzw. Fragmente der Ty Elemente Ty1 bis Ty5 oder deren LTR im Genom von *S. cerevisiae* gefunden, davon insgesamt 51 vollständige Elemente. Mit 217 stammt der Großteil dabei von Ty1 Insertionen ab, aber nur 32 davon sind vollständige Ty1 Elemente (Goffeau *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1998). Die Ty-Insertionen sind insgesamt 377 kb lang. Nur einige von ihnen, Ty1, Ty2 und Ty3, sind aktiv (Curcio *et al.*, 1988; Hansen *et al.*, 1992; Neuveglise *et al.*, 2002a). In *S. cerevisiae* liegen 85% der Insertionen als isolierte oder Solo-LTR vor, was auch für die meisten anderen Organismen zutrifft. Die gesamten Retrotransposonsequenzen machen etwa 3,1% des Genoms von *S. cerevisiae* aus. Die verschiedenen Ty Elemente entstanden in der Evolution durch Baseninsertionen und Basenverlust. Es wird vermutet, dass die Elemente Ty3 und Ty4 als relativ neue Retrotransposonen im Vergleich mit den anderen Ty Elementen im Genom der *S. cerevisiae* vorkommen (Neuveglise *et al.*, 2002a). Die Verteilung der Ty Elemente im Genom von *S. cerevisiae* ist nicht zufällig. Etwa 80-95% der Ty1-, Ty2-, Ty3- und Ty4-Insertionen liegen in einem Bereich von 750 Basen in der Nachbarschaft von tRNA-Genen oder anderen Genen, die von der RNA-Polymerase III transkribiert werden, vor (Kim *et al.*, 1998).

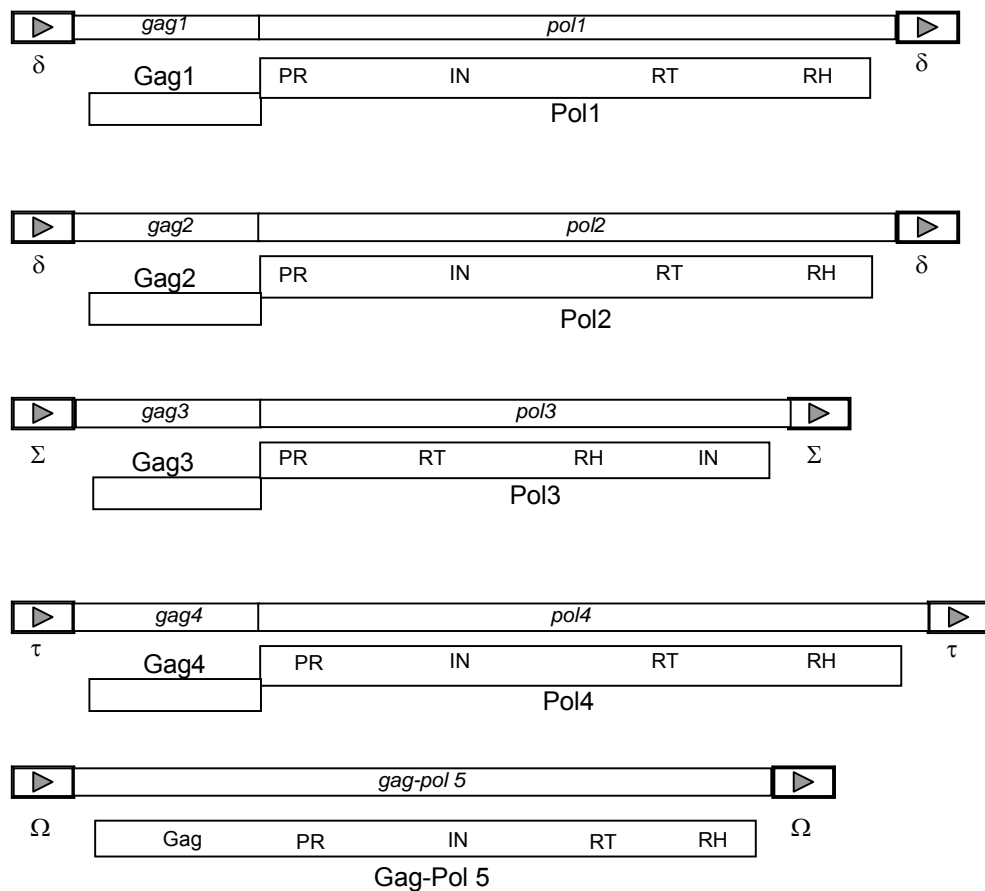


Abbildung 5: Die Retrotransposonen Ty der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Es gibt 5 verschiedene Familien (Ty1 bis Ty5) von Retrotransposon in dieser Hefe. Die Vertreter der Familien Ty1, Ty2, Ty4 und Ty5 gehören zur Ty1/*copia*-Superfamilie und Ty3 gehört zur Superfamilie der Ty3/*gypsy*-Retrotransposonen (vgl. Tabelle 1). Jedes Ty-Element enthält eine LTR an beiden Enden (Boxen mit Dreieck). Die LTR-Sequenzen werden als *delta* (Ty1 und Ty2), *sigma* (Ty3), *tau* (Ty4) und *omega* (Ty5) bezeichnet. Die abgeleiteten Proteine (weiße Boxen der ORF) der Elemente Ty1 bis Ty4 werden über einen Frameshiftmechanismus (Pfeilposition) exprimiert, d.h. vom *gag*- und *pol*-Genbereich werden zunächst zwei Proteine gebildet, die einer weiteren Reifung unterliegen. Nur Ty5 benutzt keinen Frameshiftmechanismus, wodurch *gag*- und *pol*-Bereich einen durchgehenden langen ORF für Gag-Pol bilden. Der interne Bereich codiert für folgende Proteine: der *gag*-Bereich das Gag-Strukturprotein, der *pol*-Bereich das Polyprotein Pol mit den Domänen PR (Protease), IN (Integrase), RT (reverse Transkriptase) und RH (RNase H).

Die virusähnlichen Partikel der Hefe *S. cerevisiae* sind im Vergleich mit den VLP anderer Organismen am besten erforscht. Die elektronenmikroskopische Aufnahme der Abbildung 6 zeigt VLP in der Hefe *S. cerevisiae*. Einige Stämme dieser Hefe können jedoch sowohl VLP der Ty Elemente als auch durch die Ausprägung der Killer-Aktivität (Toxinbildung codiert durch doppelsträngige RNA-Moleküle; Wickner, 1991) produzieren. Diese beiden VLP-Formen unterscheiden sich in ihre Größe.

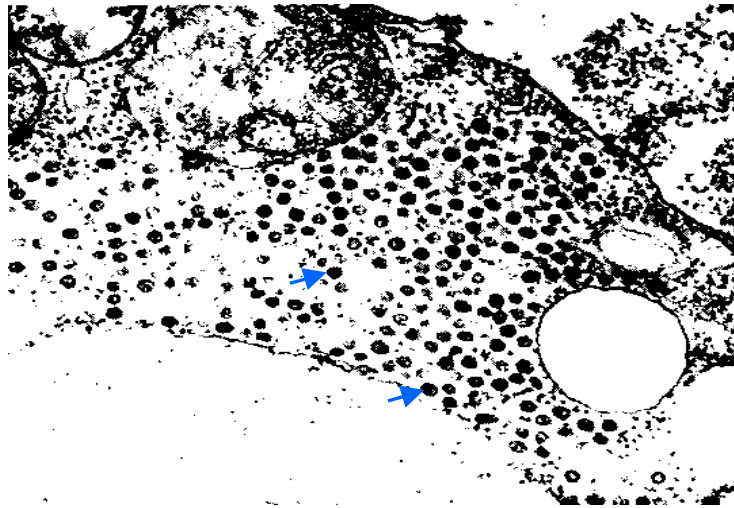


Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme der virusähnlichen Partikel in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. 30.000fache Vergrößerung. Die hexagonalen VLP (Pfeile) sind ca. 60 nm groß und werden im cytoplasmatischen Bereich gefunden. Entnommen aus Weber und Barth (1988).

Ty1/Ty4-ähnliche Elemente kommen auch in verschiedenen Arten der Gattungen *Saccharomyces* (*S. bayanus* oder als Synonym *S. uvarum*, *S. exiguus*, *S. servazzii*, *S. kluyveri*, aber nicht in *Zygosaccharomyces rouxii*) und *Kluyveromyces* (*K. lactis*, *K. marxianus*, aber nicht in *K. thermotolerans*) vor (Neueglise *et al.*, 2002a; vgl. Tabelle 1).

In *S. bayanus* (*uvarum*) konnten bisher nur Solo-LTR des Typs Ty1 (Tsb1) festgestellt werden, jedoch enthält diese Hefe im Gegensatz zu *S. cerevisiae* intakte Ty4-ähnliche Retroelemente (Tsu4). Ty5-ähnliche Elemente existieren in den Hefen *S. paradoxus*, *S. exiguus*, *Pichia angusta*, *Debaryomyces hansenii* und *C. albicans*, in *S. cerevisiae* enthalten sie jedoch Deletionen und sind nicht transpositionsaktiv (Zou *et al.*, 1996; Plant *et al.*, 2000; Neueglise *et al.*, 2002a; Tabelle 1).

In der pathogenen, asexuellen Hefe *C. albicans* wurden bis heute 16 vollständige Retrotransposonen (Tca1 bis Tca16) beschrieben. Mehr als 350 Insertionen wurden gefunden und in verschiedene Familien der Ty1/*copia*- und Ty3/*gypsy*-Superfamilien, der LTR-freien Retrotransposonen und der Klasse II Transposon-Elemente (DNA-Transposonen) eingeordnet (Matthews *et al.*, 1997; Goodwin und Poulter 2000; Goodwin *et al.*, 2001a; Plant *et al.*, 2000). Die Retrotransposonen kommen in *C. albicans* vorwiegend in niedriger Kopiezahl (1-10) vor. Nur drei Vertreter der Familien Tca2 (oder pCa1; Ty1/*copia*-Typ zeigen ungewöhnlichen Eigenschaften: extrachromosomale, doppelsträngige DNA-Form mit hoher Kopiezahl, 2 ORF getrennt durch ein Stop-Codon). Tca4 (Ty1/*copia*-Typ, verwandt mit Tca2) und Tca5 (Ty5 ähnlich) aus dieser Hefe wurden als vollständige und intakte Retrotransposonen identifiziert, die in aktivem Zustand auftreten (Goodwin und Poulter, 2000; Goodwin *et al.*, 2001a; Holton *et al.*, 2001; vgl. Tabelle 1). Die meisten dieser Tca-Insertionen liegen als einzelne LTR (Solo-LTR) oder nur als kleine Reststücke des LTR-Fragmentes vor. Das sind Produkte erfolgter Rekombinationen der Retrotransposonen in und aus dem Genom.

Tabelle 1: Einige Eigenschaften von LTR-Retrotransposonen aus Hefen und Pilzen. Die Einteilung der Ty1/*copia*-Elemente in die vier phylogenetisch verwandten Gruppen erfolgte nach Plant *et al.* (2000) und Neuveglise *et al.* (2002a,b). Species-Bezeichnungen und entsprechende Literaturstellen siehe Text und Abkürzungsverzeichnis der aufgeführten Retroelemente siehe Tabelle 1. Die bisher in *Y. lipolytica* gefundenen Retroelemente sind fett geschrieben. Erläuterungen: -- kein Frameshift-Mechanismus; ? - noch nicht näher beschrieben oder keine Angaben; bp - Basenpaare; aa - Aminosäuren; ORF - offene Leserahmen; * - Transpositionsaktivität gezeigt; Bemerkungen: ¹⁾ inaktiv, nicht funktionell; ²⁾ unvollständige Sequenz; ³⁾ Nachweis von freien LTRyl1 (AJ439559) im Stamm *Y. lipolytica* W29 und E150 ohne Zuordnung zur Superfamilie, vgl. Kapitel 3.3; ⁴⁾ Tyl3 bisher nur im Stamm *Y. lipolytica* W29 gefunden (Casaregola *et al.*, 2000; Neuveglise *et al.*, 2002a,b), vgl. Resultate; ⁵⁾ Zahl der LTR im Genom; ⁶⁾ Anfang des *gag*-Bereiches von Tkl1.1 deletiert; ⁷⁾ ein durchgehender ORF im *gag-pol*-Bereich; ⁸⁾ Cft1 enthält einen ORF3 von 165 aa; ⁹⁾ kein Frameshift, sondern Stop-Codon trennt zwei ORF.

Gruppen Namen	Species	Größe (bp)	Kopiezahl	ORF1 (aa)	ORF2 (aa)	Frameshift	LTR (bp)
<u>Ty1/<i>copia</i>-Superfamilie</u>							
Ty1-Gruppe							
Ty1*	<i>S. cerevisiae</i>	5917	32	435	1321	CUUAGGC	332
Ty2*	<i>S. cerevisiae</i>	5959	13	431	1359	CUUAGGC	332
Tse1	<i>S. exiguus</i>	5691	15-20	383	1235	CUUAGGC	424
Tsk1	<i>S. kluyveri</i>	5905	8	435	1320	CUUAGGC	322-323
Tss1 ^{1,2)}	<i>S. servazzii</i>	?	1-2	?	?	?	
Tkl1.1 ¹⁾	<i>K. lactis</i>	5425	1	202 ⁶⁾	1335	CUUAGGC	393-398
Tkl1.2 ^{1,2)}	<i>K. lactis</i>	?	1	371	?	CUUAGGC	
Tkm1	<i>K. marxianus</i>	5994	10-15	421	1339	CUUAGGC	385
Ty4-Gruppe							
Ty4 ¹⁾	<i>S. cerevisiae</i>	6227	3	363	1440	CUUAGGC	371
Tsu4	<i>S. bayanus</i>	6095	15-20	358	1433	CUUAGGC	321
Ty5-Gruppe							
Ty5 ¹⁾	<i>S. cerevisiae</i>	~5800	7	?	- 1 ORF ⁷⁾	--	251
SpTy5	<i>S. paradoxus</i>	5376	10-15	1698	- 1 ORF ⁷⁾	--	251
Tse5.1	<i>S. exiguus</i>	5286	8-10	1531	- 1 ORF ⁷⁾	--	370
Tca5	<i>C. albicans</i>	5588	1-5	1477	- 1 ORF ⁷⁾	--	685
Tdh5	<i>D. hansenii</i>	5349	~20	1490	- 1 ORF ⁷⁾	--	457
Tpa5	<i>P. angusta</i>	4883	10-15	1417	- 1 ORF ⁷⁾	--	322
Tca2-Gruppe							
Tca2*	<i>C. albicans</i>	6426	1-10	324	1576	-- ⁹⁾	280
Tca4	<i>C. albicans</i>	6895	5	305	1664	-- ⁹⁾	381
Tdh2	<i>D. hansenii</i>	5928	3-5	336	1340	-- ⁹⁾	379
<u>Ty3/<i>gypsy</i>-Superfamilie</u>							
Ty3-g*	<i>S. cerevisiae</i>	5351	2	285	1262	GCGAGUU	340
Tse3*	<i>S. exiguus</i>	6487	10-15	257	1181	AUUAGUA	945-947
Tsk3 ^{1,2)}	<i>S. kluyveri</i>	?	1-2		?	?	
Tss3 ^{1,2)}	<i>S. servazzii</i>	?	1-2		?	?	
Tf1*	<i>Sz. pombe</i>	4941	10-30	1331	- 1 ORF ⁷⁾	--	474
Tf2*	<i>Sz. pombe</i>	4916	10-15	1333	- 1 ORF ⁷⁾	--	349
Tdh3 ^{1,2)}	<i>D. hansenii</i>	?	1-2		?	?	?
Tzr3 ^{1,2)}	<i>Z. rouxii</i>	?	3-5		?	?	?
Tct3 ²⁾	<i>C. tropicalis</i>	?	1-3		?	?	?
Tca3*	<i>C. albicans</i>	6134	11	510	1273	?	313
Tca9	<i>C. albicans</i>	5146	30		?	?	470
Tca13	<i>C. albicans</i>	5060	8 ⁵⁾		?	?	507
Tcd3	<i>C. dubliniensis</i>	~6200	<5		?	?	295
Ylt1*	<i>Y. lipolytica</i>	9453	30-35	2621	- 1 ORF⁷⁾	--	714
Tyl3 ^{1,2,4)}	<i>Y. lipolytica</i>		1-3		?	?	?
LTRyl1 ³⁾	<i>Y. lipolytica</i>		>5-10				273
Tcn2	<i>C. neoformans</i>	7343	70 ⁵⁾	1651	- 1 ORF ⁷⁾	--	942
Cft1	<i>C. fulvum</i>	6971	25	640	1045 ⁸⁾ (1244)	?	427
Skippy	<i>F. oxysporum</i>	7846	5-15	853	1295	?	429
Maggy	<i>M. grisea</i>	5638	30-100	457	1199	?	253

Auf der Basis ihrer Strukturcharakteristika und Sequenzhomologien lassen sich die Retrotransposonen von Hefen und Pilzen in 5 größere Gruppen einteilen (Tabelle 1). Ein Vergleich der bekannten LTR-Retroelemente der Ty1/*copia*-Superfamilie von Hefen zeigte, daß sich diese auf der Basis der Proteinsequenzen der reversen Transkriptase (RT) oder Integrase (IN) in vier phylogenetisch verwandte Familien oder Gruppen (Ty1/Ty2-, Ty4-, Tca2- und Ty5-Gruppe) einordnen lassen (Plant *et al.*, 2000; Neuveglise *et al.*, 2002a). Tca2 und Tca4 von *C. albicans* bilden dabei mit Tdh2 aus *D. hansenii* eine neue selbständige Gruppe (kein Vertreter in *Saccharomyces*), die sich von den vorwiegend in *Saccharomyces*- und *Kluyveromyces*-Arten vorkommenden Vertretern der relativ homogenen Ty1- und Ty4-Gruppen deutlich unterscheidet. Tca2 und Tdh2 enthalten zwei ORFs in gleicher Phase, die jedoch durch ein Stop-Codon getrennt werden, was einmalig für LTR-Retrotransposonen ist, jedoch in einigen Säuger-Retroviren vorkommt (Yoshinaka *et al.*, 1985). Alle Vertreter der Ty1- und Ty4-Gruppen enthalten dagegen zwei überlappende ORFs, die durch einen +1-Frameshift in der hochkonservierten Sequenz CUUAGGC separiert werden (Voytas und Boeke, 1992; Tabelle 1). Die Vertreter der Ty5-Gruppe haben alle nur einen durchgehenden Leserahmen für ein Gag-Pol-Fusionsprotein und enthalten LTRs von sehr unterschiedlicher Länge (Tabelle 1). Auf dem phylogenetischen Baum liegen sie näher an der Tca2-Gruppe als die Ty1/Ty4-Gruppen. Die Ty5-ähnlichen Elemente werden als die ältesten Vertreter der Ty1/*copia*-Superfamilie in Hefen diskutiert, die in vielen Hefen nach dem Auftreten der besser regulierten Retroelemente mit zwei ORFs (Tca2-Typ mit Stop-Codon, Ty1/Ty4-Typen mit +1 Frameshiftmechanismus) verloren gingen (Neuveglise *et al.*, 2002a). Ein vergleichbarer Verlauf der Evolution wurde auch für die LTR-freien Retrotransposonen diskutiert (Malik *et al.*, 1999).

Eine deutlich abgegrenzte fünfte Gruppe wird durch die Vertreter der *gypsy*/Ty3-Superfamilie gebildet. Ein komplettes Ty3/*gypsy*-Element kommt neben Ty3 in *S. cerevisiae* auch in *S. exiguus* (Tse3) vor, dagegen treten partielle und stark degenerierte Ty3-Elemente in *S. servazzii*, *S. kluyveri*, *Z. rouxii*, *Candida tropicalis*, *C. albicans* und *Y. lipolytica* (Ty13) auf (Zou *et al.*, 1996; Goodwin *et al.*, 2001, 2003; Neuveglise *et al.*, 2002a; vgl. Tabelle 1). Weitere LTR-Retrotransposonen des *gypsy*-Typs wurden in der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* (Tf1 und Tf2; Levin *et al.*, 1990; Levin und Boeke, 1992; Weaver *et al.*, 1993; Behrens *et al.*, 2000) beschrieben. Ein neues vollständiges Ty3/*gypsy*-Retrotransposon Tcd3 wurde kürzlich in der pathogenen Hefe *Candida dubliniensis* gefunden (Goodwin *et al.*, 2003). Es wird offensichtlich durch denselben Primingmechanismus wie das Retrotransposon Tf1 in *Sz. pombe* revers transkribiert. Die ORF-Analyse zeigte, dass Tcd3 große Ähnlichkeit mit dem offenen Leserahmen des Tca3 von *C. albicans* hat.

Eine große Zahl von Retrotransposonen aus 15 Familien der Ty1/*copia*- (Tcn6, Tcn9, RF5) und Ty3/*gypsy*-Superfamilien (Tcn2–Tcn5, RF3) wurden in der pathogenen basidio-

mycetalen Hefe *Cryptococcus neoformans* von Goodwin und Poulter (2001a) gefunden. Davon sind 7 potentiell aktiv. Das Vorkommen von LTR- und LTR-freien Retrotransposonen (Ylt1, Schmid-Berger *et al.*, 1994; Ylli, Casaregola *et al.*, 2002a,b) und von DNA-Transposonen (MULE; Casaregola *et al.*, 2003) in der Hefe *Y. lipolytica* ist im Kapitel 1.5.7 beschrieben.

LTR-Retrotransposonen wurden auch in verschiedenen pflanzenpathogenen filamentösen Pilzen gefunden, so im Tomaten-pathogenen Pilz *Cladosporium fulvum* (CfT-1; McHale *et al.*, 1992), in *Fusarium oxysporum* (Skippy; Anaya und Roncero, 1995), in *Botrytis cinerea* (Boty; Diolez *et al.*, 1995), in *Colletotrichum gloeosporioides* (Cgret; Zhu und Oudemans, 2000), in *Alternaria alternata* (REAL; Kaneko *et al.*, 2000) und in dem Gräser, insbesondere Reis schädigenden Pilz *Magnaporthe grisea* (bzw. *Pyricularia grisea*) (MAGGY, grasshopper, Pyret; Hamer *et al.*, 1989; Levy *et al.*, 1991; Dobinson *et al.*, 1993; Farman *et al.*, 1996; Eto *et al.*, 2001; Nakayashiki *et al.* 2001). In *Neurospora crassa* kommen sowohl Vertreter der *copia*-Gruppe (Tcen) als auch der *gypsy*-Gruppe (Tgl2) vor (Cambareri *et al.*, 1998).

Einige Vertreter der mit der Ty3/*gypsy*-Gruppe der LTR-Retrotransposonen verwandten DIRS1-Gruppe (DIRS1, Skipper, DGLT, H3R) kommen im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (Cappello *et al.*, 1985; Marschalek *et al.*, 1992; Goodwin und Poulter, 2001b; Übersicht bei Glöckner *et al.*, 2001) und im zygomycetalen Pilz *Phycomyces blakesleeianus* (prt1, Murillo *et al.*, 1996) vor.

Eine größere Zahl LTR-freier Retrotransposonen (LINE-Elemente) wurde in filamentösen Pilzen und in einigen Hefen entdeckt, sie fehlen jedoch im Genom von *S. cerevisiae* und *Sz. pombe*. Aus Hefen sind die drei Zorro1 bis 3 genannten LINE-Elemente der L1-Gruppe aus *C. albicans* (Goodwin *et al.* 2001), das LINE L1-Element Ylli aus *Y. lipolytica* (Casaregola *et al.*, 2002a,b) und die Vertreter der CRE-Familie aus der basidiomycetalen Hefe *Cryptococcus neoformans* (Goodwin und Poulter, 2001a) bekannt. Dies zeigt, dass LINE-Elemente in einer Urform der heutigen Hefen vorhanden waren und wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei Ausbildung deren Genome spielten.

Die LINE-Elemente Tad1-1 und Tad3-2 wurden in *Neurospora crassa* (Kinsey und Helber, 1989; Cambareri *et al.*, 1994, 1998) gefunden. Weiterhin wurden die LTR-freien Retrotransposonen MGR583 (LINE-Element) aus dem pflanzenpathogenen Pilz *Magnaporthe grisea* (Hamer *et al.*, 1989; Kachroo *et al.*, 1997; Nishimura *et al.*, 1998), CgT1 aus *Colletotrichum gloeosporioides* (He *et al.*, 1996), drei LINE-Elemente des Typs *Mars1* (*methylated Ascobolus repeated sequences*, ähnlich dem Tad aus *N. crassa*), die LTR-Retrotransposonen *Mars2*, *Mars3* (beide *copia*-Typ), *Mars4* (*gypsy*-Typ) und das noch nicht eingeordnete *Mars5*-Element sowie das Ac/Ds-ähnliche Transposon *Ascot-1* aus *Ascobollus immersus* (Goyon *et al.*, 1996; Colot *et al.*, 1998) beschrieben und näher charakterisiert.

Im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* sind den neben bereits genannten LTR-Retrotransposonen (DIRS/gypsy-Gruppe, siehe oben) verschiedene LTR-freie Retrotransposonen der Gruppen TRE3 und TRE5, DNA-Transposonen (Gruppen Tdd4, DDT) und weitere nicht klassifizierte Transposonelemente (thug) bekannt (Marschalek *et al.*, 1992; Übersicht bei Glöckner *et al.*, 2001).

1.4 Wechselbeziehungen zwischen Retrotransposonen und Wirtszellen

Für eine Reihe von Retrotransposonen der Hefen konnten deren Aktivität nachgewiesen werden, so zum Beispiel für Ty1, Ty2 und Ty3 in *S. cerevisiae* (Hansen und Sandmeyer, 1990; Umezumi *et al.*, 2002), Ty5 in *S. paradoxus* (Zou *et al.*, 1996), Tf1 und Tf2 in *Schizosaccharomyces pombe* (Levin und Boeke, 1992; Behrens *et al.*, 2000) sowie Tca2 in *Candida albicans* (Holton *et al.*, 2001). Mit diesen Modellsystemen, insbesondere mit Ty1, wurde untersucht, welchen Einfluß der Wirtsorganismus auf ihre Transposition hat (Tumer *et al.*, 1988; Natsoulis *et al.*, 1989; Chapman *et al.*, 1992; Kirchner *et al.*, 1995; Devine und Boeke, 1996; Holton *et al.*, 2001; Umezumi *et al.*, 2002). So konnte gezeigt werden, daß einige Retrotransposonen durch Transkriptionsfaktoren des Wirtes reguliert werden (Morillon *et al.*, 2000; Holton *et al.*, 2001).

1.4.1 Zielsequenzen der Retrotransposonen

Die Zielsequenzen der Integration der Retrotransposonen Ty von *S. cerevisiae* wurde genauer untersucht und es konnte eine bestimmte Selektivität der Zielsequenzen gezeigt werden. Die Elemente Ty1-4 integrieren bevorzugt in Gene, die durch die RNA-Polymerase III transkribiert werden, wie es für tRNA-Gene der Fall ist. Insbesondere das Retrotransposon Ty3 integriert bevorzugt in einem kleinen Bereich von wenigen Basenpaaren in von der RNA-Polymerase III transkribierten tRNA-Genen (Chalker und Sandmeyer, 1992; Ji *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1998). Die Integration des Ty5 erfolgt dagegen in der Nähe des Telomer-Bereiches oder der sogenannten stillen Paarungsorte (*silent mating loci*; Zou *et al.*, 1996). Die Zielsequenzen anderer gut untersuchter Retrotransposonen sind nicht so eng eingegrenzt. Das Ty1 integriert oft in der Nähe von RNA-Polymerase III transkribierten Genen, es kann aber auch in der Nähe oder innerhalb von RNA-Polymerase II transkribierten Genen oder in schon vorhandenen LTR integriert werden (Ji *et al.*, 1993). Das Retrotransposon Tf1 aus *Sz. pombe* integriert dagegen bevorzugt in die langen Intergenregionen zwischen Polymerase II transkribierten Genen (Behrens *et al.*, 2000). Für die Integration von fünf weiteren Retrotransposonen (LTRsu1, Tsu4, Tse3, Tsk1, und LTRkt1) konnten vergleichbare tRNA-Gene als bevorzugte Zielsequenzen abgeleitet werden (Neuveglise *et al.*, 2002a,b).

1.4.2 Aktivierung und Regulation der Retrotransposonen

Eine spontane Transposition des Retrotransposons Ty3 in der Hefe *S. cerevisiae* konnte nicht detektiert werden und ohne Pheromon-Induktion wurde nur eine geringe Menge Transkriptionsprodukt nachgewiesen. Nach Überführung unter die Kontrolle des *GAL1-GAL10*-Promotors wurde die Aktivität des Retrotransposons Ty3 in einem galactosehaltigen Medium nach 10 Tagen deutlich induziert (Boeke und Sandmeyer, 1991). Pflanzliche Retrotransposonen sind aktiv oder potentiell aktiv. Ihre Transpositionsaktivitäten können durch Stress, toxische Agenzien und andere Umweltfaktoren induziert werden (Rolfe *et al.*, 1986; Ratner *et al.*, 1992; Grandbastien, 1998; Ikeda *et al.*, 2001). Die Aktivität des Retrotransposons Tn1A wurde im Nitratreduktasegen des Tabaks genauer untersucht. Eine Transposition wird als Abwehrreaktion des Organismus vermutet (Grandbastien, 1998).

Die Transposition von Ty1 und Ty3 ist temperatursensitiv. Bei 15°C findet die Integration dieser Retrotransposonen in die Gene *ADH2* und *ADH4* einhundert mal häufiger statt als bei 30°C (Paquin und Williamson, 1988). Bei *in vitro* Untersuchungen mit Ty1 wurde die maximale Aktivität der reversen Transkriptase bei 15°C nachgewiesen und ab 37°C ist keine Aktivität mehr detektierbar (Garfinkel *et al.*, 1985). Die reverse Transkriptase des Ty3 hat ihr Aktivitätsoptimum bei 25°C und ab 37°C nimmt die Aktivität extrem stark ab (Hansen *et al.*, 1992).

Kultiviert man Ty3-retrotransposonenhaltige Hefestämme bei 30°C, produzieren sie zu gleichen Teilen Gag3-Precursorproteine (38 kDa) und reife Gag3-Proteine (26 kDa). Wenn die Kultivierung bei 37°C erfolgt, kann hingegen nur ein Fünftel der Menge an Gag3-Precursorprotein und kein reifes Gag3-Protein detektiert werden. Neben der temperaturabhängigen Regulation wurde auch eine C-Quellen abhängige Repression beobachtet. Bei der Kultivierung der Ty3-haltigen Hefestämme mit 1,55 M Ethanol wird ebensowenig Gag3-Precursorprotein und reifes Gag3-Protein gebildet wie bei 37°C (Plesset *et al.*, 1982).

Das aktive Retrotransposon Tca2 des Ty1/*copia*-Typs unterscheidet sich wesentlich von den anderen Tca Retrotransposonen der pathogenen Hefe *C. albicans*. Es konnten größere Menge mRNA sowie extrachromosomale, lineare, doppelsträngige DNA-Moleküle (dsDNA) mit hohen Kopiezahlen von ca. 50 Kopien/Zelle nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 1). Die Menge der dsDNA variiert erheblich zwischen unterschiedlichen Stämmen und ist stark von der Temperatur abhängig (Matthews *et al.*, 1997; Holton *et al.*, 2001).

Die unterschiedliche Zahl von LTR-Retrotransposonen in Hefen deutet auf artspezifische Reaktionen der Wirtsorganismen auf das Auftreten dieser mobilen genetischen Elemente hin (Neueglise *et al.*, 2002a,b). Einige Arten, wie *S. cerevisiae*, *S. exiguus*, *S. kluyveri*, *K. marxianus* und *D. hansenii*, tendieren zur Konservierung der intakten und wahrscheinlich aktiven Transposonen. Diese Eigenschaft korreliert jedoch nicht mit der phylogenetischen Verwandtschaft dieser Hefen. Andere Arten, wie *S. bayanus*, *S. servazzii* oder *K. lactis*,

neigen zur Reduktion der Kopiezahl und zur Inaktivierung von einigen oder aller Kopien bis nur noch Bruchstücke oder Solo-LTRs vorhanden sind. Als Mechanismus zur Reduktion der Kopiezahl wird in Hefen die Deletion der intakten Elemente durch homologe LTR-LTR-Rekombination mit dem Resultat des Auftretens freier LTR diskutiert (Neueglise *et al.*, 2002a,b).

1.5 Charakterisierung der nichtkonventionellen Hefe *Yarrowia lipolytica*

Hefen werden heute als Modellorganismen für die Zell- und Molekularbiologie eukaryotischer Zellen in der Forschung intensiv verwendet. Dazu wurden zunächst vorwiegend die beiden gut untersuchten konventionellen Hefen *S. cerevisiae* und *Sz. pombe* genutzt. Die damit verbundene Weiterentwicklung der molekulargenetischen und zellbiologischen Forschungsmethoden und ihre Anwendung auf andere Hefen führte dazu, dass heutzutage auch andere, sogenannte nichtkonventionelle Hefen als Modellorganismen für bestimmte Fragestellungen stärker genutzt werden. Eine dieser nichtkonventionellen Hefen ist *Y. lipolytica*, die zur Zeit in verschiedenen Richtungen bis zur Genomsequenzierung intensiv bearbeitet wird (Casaregola *et al.*, 2000, 2003; Barth *et al.*, 2003; vgl. auch 1.5.5).

Anfangs wurde diese obligat aerobe und dimorphe Hefe als *Candida lipolytica* bezeichnet. Nach Entdeckung ihrer Sporulationsfähigkeit wurde sie *Endomycopsis lipolytica*, später *Saccharomycopsis lipolytica* (Wickerham *et al.*, 1969, 1970; Yarrow, 1972) und letztendlich *Yarrowia lipolytica* (van der Walt und von Arx, 1980) genannt. Der Name *Yarrowia* wurde zu Ehren von Prof. David Yarrow für seine Bemühungen zur Systematisierung dieser Hefe ausgewählt. Die Daten zur Biologie, Genetik und biotechnologischen Anwendung von *Y. lipolytica* sind in einer Reihe von Übersichtsartikeln zusammengefaßt (Gaillardin und Heslot, 1988; Ogrzyziak, 1988; Weber und Barth, 1988; Weber *et al.*, 1988; Heslot, 1990; Barth und Gaillardin, 1996, 1997; Casaregola *et al.*, 2000; Barth *et al.*, 2003).

1.5.1 Dimorphismus von *Yarrowia lipolytica*

Y. lipolytica ist eine typische dimorphe Hefe, da sie unter bestimmten Bedingungen als Hefeform, als Pseudomycelform und als filamentöse Hypheform (Mycel) vorkommen kann (van der Walt und von Arx, 1980). Die Hefezellen sind sphäroid, ellipsoid bis länglich geformt, mit einer Größe von 3-5 x 3-15 µm. Die Mycelform besteht aus septierten echten Hyphen bis zu mehreren mm Länge. Der einzelne Hyphen-Abschnitt ist zwischen 50 und 70 µm lang und die Septen haben eine einzelne zentrale Pore (Kreger-van Rij und Veenhuis, 1973).

Die Ausprägung des Dimorphismus, das heißt der Anteil der verschiedenen Zellformen in der Kultur ist abhängig vom eingesetzten Stamm und den Kulturbedingungen. Die Entwicklung

von Hyphen (Anteil an der Zellpopulation bis über 90%) wird bei Wachstum in Medien mit Olivenöl und Milch-Casein bzw. bei Anwesenheit von N-Acetylglucosamin als Kohlenstoffquelle verstärkt, jedoch durch Mangel an Magnesiumsulfat und Eisenchlorid, Zugabe von Cystein und reduziertem Glutathion sowie Hemmung der Atmung und Stickstoffmangel reprimiert (Ota *et al.*, 1984; Rodriguez und Dominguez, 1984; Guevara-Olvera *et al.*, 1993; Szabo, 1999). Die Mycelbildung wird demnach stark reguliert durch die C- und N-Quelle, sowie durch weitere Faktoren wie Citrat, anaeroben Stress und durch den pH des Mediums (Ruiz-Herrera und Sentandreu 2002; Szabo und Stofanikova, 2002). Durch Serum im Medium ist sie analog zur humanpathogenen Hefe *C. albicans* gleichfalls induzierbar (Kim *et al.*, 2000; Dominguez *et al.*, 2000; Perez-Campo und Dominguez 2001). Die molekularen Grundlagen für die Regulation des Dimorphismus sind noch immer wenig bekannt und Gegenstand intensiver Untersuchungen (Herrero *et al.*, 1999; Dominguez *et al.*, 2000; Richard *et al.*, 2001; Szabo, 2001; Barth *et al.*, 2003).

Bis heute sind mindestens 25-30 Gene bekannt, deren codierte Proteine einen Einfluss auf den Übergang von Hefe- zur Hyphenform haben (Übersichten bei Dominguez *et al.*, 2000; Barth *et al.*, 2003). Das Phosphatidylinositol/Phosphatidylcholin-Transfer-Protein (Sec14p) ist im Unterschied zu den homologen Proteinen aus *S. cerevisiae* und *C. albicans* nicht essentiell für Wachstum und Sekretion, aber für die Mycelbildung nötig (Lopez *et al.*, 1994; Riggle *et al.*, 1997; Rambourg *et al.*, 1996). Weitere Gene, die Einfluss auf den Dimorphismus von *Y. lipolytica* haben, sind unter anderem *MHY1*, ein möglicher Transkriptionsfaktor, der für das Wachstum in der Hyphenform spezifisch ist (Hutardo und Rachubinski, 1999); *RAC1* (Hutardo *et al.*, 2000); *HOY1* (Torres-Guzman und Dominguez, 1997), *BEM1* und *BMH1* (Hutardo und Rachubinski, 2002a,b), *CLA4* und *XPR2* (Szabo, 1999; Szabo, 2001), *XPR6* (Enderlin und Ogrydziak, 1994), *ODC* (Jimenez-Bremont *et al.*, 2001), *YWP1* (Ramon *et al.*, 1996, 1999), *GPR1* (Tzschoppe *et al.*, 1999), *SIN3*, *MED4*, *SSY5* und *OPT1* (Gonzalez-Lopez *et al.*, 2002); *SNF5*, *RAS2*, *CDC25*, *KEX2*, *PPH21*, *GP17* und *BUD6* (Richard *et al.*, 2001; Venancio *et al.*, 2002; Cheon *et al.*, 2002), *TUP1*, *MGF1*, und *STE7* (Dominguez, unveröffentlicht, vgl. Barth *et al.*, 2003), sowie *TGD1* und *LAG1* (Cheon *et al.*, 2002). Es ist jedoch vielfach nicht bekannt, ob die durch diese Gene codierten Proteine direkt oder indirekt in die Regulation des Dimorphismus involviert sind.

1.5.2 Physiologie und C-Quellenverwertung

Die Hefe *Y. lipolytica* kann von lipidreichen Nahrungsmitteln wie Margarine, Olivenöl oder Käse, sowie von Ölpflanzen, aus Abwasser oder Bodenproben isoliert werden. In Abhängigkeit von der Herkunft des Stammes sind proteolytische und lipolytische Aktivitäten, der Gehalt an Fettsäuren, deren Sättigung und der Anteil ungeradzahliger Fettsäuren unterschiedlich (Sinigaglia *et al.*, 1994).

Die obligat aerobe Hefe *Y. lipolytica* kann sehr verschiedene Substrate als C-Quelle assimilieren. Neben Kohlenhydraten (Glucose, Fructose u.a., jedoch keine Saccharose), Ethanol und Essigsäure kann *Y. lipolytica* besonders gut hydrophobe Kohlenstoffquellen wie *n*-Alkane, 1-Alkene, Triglyceride und Fettsäuren verwerten (Ishikura und Forster, 1961; Klug und Markovetz, 1967; Barth und Gaillardin, 1997). Polymethylierte und chlorierte Alkane können von dieser Hefe ebenfalls verwertet werden (Hagihara *et al.*, 1977; Murphy und Perry, 1984).

Nach Aufnahme in die Zelle werden *n*-Alkane durch ER-ständige Cytochrom P450 Monooxygenasesysteme terminal hydroxyliert und dann weiter bis zur entsprechenden Fettsäure (oder Dicarbonsäure) oxidiert (primäre Alkanoxidation). Diese Carbonsäuren können nach erfolgter Aktivierung zu Acyl-CoA durch die β -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut werden, welches durch den Tricarbonsäurezyklus (Citratzyklus) und den anaplerotischen Glyoxylatzyklus in den Energie- und Intermediärstoffwechsel eingeht. Die Enzyme der primären Alkanoxidation werden durch Alkane oder Fettsäuren, nicht aber durch Glucose, Ethanol oder Acetat induziert (Mauersberger, 1991; Iida *et al.*, 1998, 2000; Sumita *et al.*, 2002a,b). Triglyceride müssen zunächst durch extrazelluläre Lipasen in Glycerol und Fettsäuren der Kettenlängen C₁₆ bis C₁₈ gespalten werden, welche dann wie oben beschrieben verwertet werden.

Anders als *S. cerevisiae* produziert *Y. lipolytica* kein Ethanol aus Kohlehydraten durch alkoholische Gärung, allerdings kann diese Hefe Ethanol als Kohlenstoffquelle bis zu einer Konzentration von 3% verwerten. Acetat kann von *Y. lipolytica* bis zu einer Konzentration von 0,4% gut verwertet werden, Konzentrationen über 1% inhibieren das Wachstum.

Zum Verständnis dieser Stoffwechselwege und zur Klonierung entsprechender Gene wurden verschiedene *Y. lipolytica* Mutanten mit Defekten in der Verwertung der genannten Kohlenstoffquellen isoliert und charakterisiert (Bassel und Mortimer, 1982, 1985; Barth, 1985; Barth und Weber, 1985; Gentsch *et al.*, 2003; Kujau *et al.*, 1992; Mauersberger, 1991; Mauersberger *et al.*, 2001).

1.5.3 Genetik und Molekularbiologie von *Yarrowia lipolytica*

Die natürlichen Isolate von *Y. lipolytica* waren für genetische Untersuchungen nicht gut geeignet, da sie geringe Sporenvitalität, Kreuzungs- und Sporulationsfrequenzen aufwiesen. Diese Eigenschaften konnten durch eine Reihe von Inzuchtprogrammen verschiedener Arbeitsgruppen verbessert werden. Diese Laborstämme waren für die meisten Methoden der Hefegenetik gut geeignet (Gaillardin *et al.*, 1973; Ogrydziak *et al.*, 1978; Ogrydziak *et al.*, 1982a,b; Kurischko, 1984; Barth und Weber, 1984; Barth und Weber, 1985; Weber und Barth, 1988).

Y. lipolytica ist eine heterothallische Hefe. Die Paarungstypen von *Y. lipolytica* werden als *MATA* (*mating type A*) und *MATB* (*mating type B*) bezeichnet, die entsprechenden Gene sind auf dem Chromosom III in der Nähe des *SLA2*-Genes lokalisiert (Kurischko *et al.*, 1999). Werden beide Typen gemischt, können Zellen der komplementären Paarungstypen konjugieren und diploide Zygoten bilden. Sowohl haploide als auch diploide Stämme können stabil vegetativ vermehrt werden. Die diploiden Zellen können unter bestimmten Bedingungen sporulieren und Asci mit bis zu 4 Sporen bilden. Das Paarungstypallel *MATA* wurde kloniert und näher charakterisiert. Der *MATA*-Locus enthält zwei entgegengesetzt orientierte Gene. *MATA1* codiert ein Protein aus 119 Aminosäuren, das für die Sporulationsinduktion verwendet wird und *MATA2* codiert ein Protein aus 291 Aminosäuren, welches für die Repression der Konjugation benötigt wird (Kurischko *et al.*, 1992; Kurischko *et al.*, 1999).

Die genomische DNA der Hefe *Y. lipolytica* besteht je nach untersuchtem Stamm aus 20 bis 21 Mb (Casaregola *et al.*, 1997, 2000). Das Genom ist damit deutlich größer als die Genome von *Sz. pombe* und *S. cerevisiae*, welche nur 13-14 Mb groß sind. Das *Y. lipolytica*-Genom besitzt einen G+C-Gehalt von 49%, also um ca. 7% geringer als das *S. cerevisiae*-Genom. Durch Elektrophorese können 6 Chromosomen mit einer Größe von 2,6 bis 4,9 Mb unterschieden werden. Stämme unterschiedlicher Herkunft unterscheiden sich in der Größe der Chromosomen, d.h. sie zeigen einen ausgeprägten Polymorphismus (Casaregola *et al.*, 1997).

Y. lipolytica besitzt keine DNA-Plasmide, in einigen Stämmen wurden aber Plasmide aus doppelsträngiger RNA von 4,9 und 6 kb gefunden (Barth und Gaillardin, 1997). Diese RNA liegt frei im Cytosol vor oder ist in *virus-like particles* (VLP) mit 50 nm Durchmesser verpackt (Groves *et al.*, 1983; Treton *et al.*, 1985; 1987; El-Sherbeini *et al.*, 1987). Ein Zusammenhang dieser dsRNA oder VLP mit einem Killer-Phänotyp wie in *S. cerevisiae* konnte für *Y. lipolytica* jedoch bisher nicht gezeigt werden (Barth und Gaillardin, 1997).

Ein Großteil der geclusterten repetitiven Sequenzen im Genom von *Y. lipolytica* wird von den rDNA-Genen gestellt (van Heerikhuizen *et al.*, 1985). Die *Y. lipolytica*-Stämme enthalten stammabhängig zwei bis sechs verschiedene rDNA-Einheiten (van Heerikhuizen *et al.*, 1985; Casaregola *et al.*, 1997). Die Kopiezahl beträgt 50 bis 60 rDNA-Cluster pro haploides Genom (Clare *et al.*, 1986; Le Dall *et al.*, 1994). Die rDNA-Einheiten codieren die 25S und 18S RNA, aber nicht für die 5S rRNA-Species, die separat von rDNA-Cluster angeordnet ist (Clare *et al.*, 1986; van Heerikhuizen *et al.*, 1985). Weitere disperse repetitive Sequenzen des Genoms von *Y. lipolytica*, wie die LTR-Retrotransposonen (Ylt1, Tyl3), die Solo-LTRyl1, die LINE- (Ylli) und MULE-Elemente sind im Kapitel 1.5.7 näher beschrieben.

Autonom replizierende Vektoren benötigen in *Y. lipolytica* die Anwesenheit eines chromosomalen Replikationsstartortes (*ORI*) und einer Centromer-Region (*CEN*) (Fournier *et*

al., 1993; Vernis *et al.*, 1997). Die *ORI*- und *CEN*-Funktionen werden durch zwei unabhängige Regionen der *ARS* codiert und können ausgetauscht werden. Das eröffnete die Möglichkeit mit einem *CEN*-tragenden Plasmid weitere Replikationsstartorte (und umgekehrt) zu klonieren (Vernis *et al.*, 1999, 2001). Keine der isolierten *ORI*- und *CEN*-Sequenzen zeigte eine Homologie zu Sequenzen aus *S. cerevisiae*, *K. lactis* und *Sz. pombe*. Die Anwesenheit der *CEN*-Region in dem Vektor bedingt, dass seine Kopiezahl auf 1-2 Kopien/Zelle begrenzt ist (Fournier *et al.*, 1993; Vernis *et al.*, 1997, 1999).

Zur Zeit sind etwa 160-170 vollständige Gene von *Y. lipolytica* in Datenbanken (GenBank) und Publikationen beschrieben, für etwa 75 Gene ist die chromosomale Lokalisation bekannt (Barth *et al.*, 2003). Die komplette mitochondriale DNA-Sequenz wurde bestimmt (Kerscher *et al.*, 2001a). Das komplette Genom von *Y. lipolytica* wird gegenwärtig durch ein internationales Konsortium verschiedener Gruppen im *French National Sequencing Center* (Genoscope) sequenziert (Casaregola *et al.*, 2000, 2003; Barth *et al.*, 2003). Nach einer ersten Sequenzierung von 4940 *random sequence tags* (RST) von etwa 1 kb aus dem Stamm W29 im Rahmen des französischen Projektes *Génolevures 1* (Souciet *et al.*, 2000) wurden durch Homologievergleiche mit anderen Hefen mindestens 1229 kerncodierte Gene identifiziert. Davon entsprachen 48 schon bekannten *Y. lipolytica*-Genen (Casaregola *et al.*, 2000). Die Sequenzen sind unter <http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php> aufgeführt. Mit einer ersten annotierten Gesamtsequenz des Stammes E150 von *Y. lipolytica* ist Anfang 2004 zu rechnen. Etwa 13% (18/139) der bekannten *Y. lipolytica* Gene (4,8% in *S. cerevisiae*, aber 43% in *Sz. pombe*) enthalten ein oder in wenigen (ca. 10%) Fällen auch zwei Introns, die mit bis zu 400 bp oft relativ groß sind (http://cbi.labri.fr/Genolevures/Y_lipolytica.php).

Die erste funktionelle Klassifikation der bisher bekannten Gene von *Y. lipolytica* zeigte eine deutliche Erhöhung in der Zahl der Gene (Multigenfamilien) in einigen funktionellen Klassen (nach dem funktionellen Katalog von MIPS, modifiziert nach Gaillardin *et al.*, 2000) im Vergleich mit *S. cerevisiae* und das Auftreten neuer Klassen (Casaregola *et al.*, 2000). Das betrifft zum Beispiel Gene der Klassen „Metabolismus von Lipiden, Fettsäuren und Alkanen“, „ β -Oxidation von Fettsäuren“, „Biogenese von Peroxisomen“ oder „Extrazelluläre Proteine“, gekennzeichnet durch das Auftreten von 8 Lipase-Genen (*LIP1-8*; Pignede *et al.*, 2000a,b; Fickers *et al.*, 2003; AJ549520, unveröffentlicht), 5 Acyl-CoA Oxidase-Genen (*POX1-5*; Wang *et al.*, 1999a, b), 8 Cytochrom P450-Genen (*ALK1-8*; Iida *et al.*, 1998, 2000), neuen *PEX*-Genen und mindestens 10 Protease-Genen (Casaregola *et al.*, 2000) in *Y. lipolytica*. Die durch diese Multigenfamilien (mit 8 oder mehr Vertretern in einer Hefeart) codierten Enzyme unterscheiden sich in ihrer Substrat- und Kettenlängenspezifität und tragen damit insbesondere zum hohen Verwertungspotential hydrophober Substrate dieser alkanverwertenden Hefen bei.

Heute sind die meisten genetischen und gentechnischen Methoden und Werkzeuge für Untersuchungen von *Y. lipolytica* auf molekularer Ebene und für biotechnologische Anwendungen einsetzbar. Neuere Übersichten zu Methoden, Markergenen, die Herstellung von *Y. lipolytica* Stämmen mit nicht revertierenden Markern, zu Plasmiden für die Transformation, Expression und Sekretion heterologer Proteine und weitere Anwendungen wurden von Barth und Gaillardin (1996; 1997), Dominguez *et al.* (1998), Nicaud *et al.* (2002a,b), Wolf *et al.* (2003) und Barth *et al.* (2003) gegeben.

Insbesondere die Gene *URA3* (Orotsäure-5-phosphatdecarboxylase, Davidow und DeZeeuw, 1985; Mauersberger *et al.*, 2001), *LEU2* (Davidow *et al.*, 1987a) und neuerdings auch *ADE1* und *TRP1* (Cheon *et al.*, 2003) stehen als Selektionsmarker für die Transformation von *Y. lipolytica* zur Verfügung. Mit der Klonierung von *ARS* konnten autonom replizierende Plasmide geschaffen werden. Für die Genamplifikation durch multi-copy Integration von DNA-Sequenzen wurden mehrere Systeme entwickelt (Le Dall *et al.*, 1994; Pignede *et al.*, 2000b; Juretzek *et al.*, 2001). Für die Expression von Genen in *Y. lipolytica* stehen einige gut regulierbare starke Promotoren (*ICL1*, *POX2*, *POT1*, *XPR2*) und auch natürliche sowie künstliche konstitutive Promotoren zur Verfügung (Barth und Weber, 1987; Blanchin-Roland *et al.* 1994; Müller *et al.*, 1998; Juretzek *et al.*, 2000b; Pignede *et al.*, 2000a,b; Nicaud *et al.*, 2002a,b).

1.5.4 Evolutionäre Einordnung von *Yarrowia lipolytica*

Phylogenetisch nimmt *Y. lipolytica* eine Sonderstellung unter den ascomycetalen Hefen ein. Mehrere Eigenschaften (hoher G+C-Gehalt, Anordnung der rDNA-Gene, Fehlen der Polymerase I Consensussequenz, Aufbau der 7S RNA und snRNA, Codon-Nutzung) stellen *Y. lipolytica* näher zu höheren Eukaryoten als zu anderen Hefen (Barth und Gaillardin, 1997). Die Analyse der Sequenzen konservierter Bereiche ribosomaler Gene (18S und 26S rDNA, glycolytische Gene) zeigte auch, dass sich *Y. lipolytica* phylogenetisch deutlich von anderen Hefen unterscheidet (Barns *et al.*, 1991; Ohkuma *et al.*, 1993; Kurtzman und Robnett, 1998; Keogh *et al.*, 1998).

1.5.5 *Yarrowia lipolytica* als Modellorganismus

Durch ihre besonderen Eigenschaften (sehr gute Verwertung hydrophober Substrate, extensive Proliferation von Peroxisomen, ausgeprägter Dimorphismus und Sekretion von Proteinen) wird die Hefe *Y. lipolytica* in den letzten Jahren verstärkt als Modellorganismus der Grundlagenforschung in folgenden Richtungen genutzt:

- a. Untersuchungen der molekularen Grundlagen des Dimorphismus und von Signaltransduktionswegen (vgl. 1.5.1; Dominguez *et al.*, 2000; Perez-Campo und Dominguez 2001; Richard *et al.*, 2001; Barth *et al.*, 2003);
- b. Untersuchungen zur Genomstruktur (vgl. 1.5.3; Casaregola *et al.*, 1997, 2000, 2002a, b, 2003; Neuveglise *et al.*, 2002a, Bon *et al.*, 2003; Programme *Genolevures* 1 und 2);
- c. Untersuchungen zur Biogenese des mitochondrialen Komplexes I (Kerscher 2000; Kerscher *et al.*, 1999; 2001a,b,c, 2002; Ahlers *et al.*, 2000a,b; Djafarzadeh *et al.*, 2000; Kashani-Poor *et al.*, 2001a,b; Garofano *et al.*, 2003);
- d. Untersuchungen zur Sekretion extrazellulärer Proteine (Balasheva *et al.*, 1990; Fabre *et al.*, 1991; Young *et al.*, 1996; Glover *et al.*, 1997; McEwen und Young, 1998; Dominguez *et al.*, 1998; Pignede *et al.*, 2000a,b; Nicaud *et al.*, 2002a,b) und zum sekretorischen Weg (He *et al.*, 1990, 1992; Boisrame *et al.*, 1996, 1998; 1999; 2002; Mamoun *et al.*, 1996, 1997, 1999; Sanchez *et al.*, 1997; Titorenko *et al.*, 1997, Titorenko und Rachubinski, 1998; Beckerich *et al.*, 1998; Kabani *et al.*, 2000; Kim und Ogrydziak, 2000);
- e. Untersuchungen zur Verwertung von Dikohlenstoffverbindungen und die Regulation des Glyoxylatzyklus (Kujau *et al.*, 1992; Barth und Scheuber, 1993; Juretzek *et al.*, 1997; Juretzek, 1999; Tzschoppe *et al.*, 1999, Augstein, 2001; Augstein *et al.*, 2003);
- f. Untersuchungen zum Metabolismus von Lipiden (Triglyceriden), *n*-Alkanen und Fettsäuren (Tanaka und Fukui, 1989; Mauersberger, 1991; Mauersberger *et al.*, 1992; Berninger *et al.*, 1993; Ilchenko *et al.*, 1994; Destain *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998, 1999a,b; Iida *et al.*, 1998, 2000; Pagot *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 2000, 2002; Pignede *et al.*, 2000a,b; Wache *et al.*, 2000a,b, 2001, 2003; Mauersberger *et al.*, 2001, 2003a,b; Yamagami *et al.*, 2001; Sumita *et al.*, 2002a,b; Fickers *et al.*, 2003);
- g. Untersuchungen der Biogenese und des Abbaus von Peroxisomen (Aitchison *et al.*, 1992, Nuttley *et al.*, 1993; Gunkel *et al.*, 1999; Titorenko und Rachubinski, 1998, 2001; Titorenko *et al.*, 2000, 2002; Smith und Rachubinski, 2001; Tam und Rachubinski, 2002; Bascom *et al.*, 2003; Parshyna und Barth, 2003).

1.5.6 Anwendungen in der Biotechnologie und Nahrungsmittelindustrie

Die spezifischen Eigenschaften der Hefe *Y. lipolytica* (apathogen, sehr gutes Wachstum auf den hydrophoben Substraten Alkane und Fette, ausgeprägte Sekretion von Proteinen und Metaboliten) waren die Basis für die Entwicklung einer Reihe biotechnologischer Anwendungen (Bioconversion, Biotransformation, Produktbildungen) bis hin zum industriellen Maßstab, inklusive Verfahren mit dem Sicherheitsstatus GRAS (für *generally recognized as safe*) durch die *American Food and Drug Administration* (Übersichten bei Barth und Gaillardin, 1996, 1997; Barth *et al.*, 2003). In der Vergangenheit (Mitte der 60er bis 80er

Jahre) war es vor allem der Einsatz der Hefen *Y. lipolytica*, *Candida tropicalis*, *C. maltosa* für die Gewinnung von Einzellerprotein (*single cell protein*, SCP) aus *n*-Paraffinen (Barth und Gaillardin, 1996; Mauersberger *et al.*, 1996), wobei insbesondere auch grundlegende Kenntnisse für großvolumige Hochzelldichte-Fermentationen mit diesen Hefen gewonnen wurden. Heute stehen folgende Anwendungen im Mittelpunkt des Interesses:

- 1) Gewinnung von organischen Säuren** (bis zu 180-200 g/l) aus dem Intermediärstoffwechsel, wie Citronensäure, Isocitronensäure, α -Ketoglutar Säure oder Pyruvat, aus einem Überschuss einer preiswerten C-Quelle (Melasse, Stärkehydrolysate, Alkane, Ethanol) bei gleichzeitiger Limitation des Wachstums durch verschiedene Faktoren (Übersichten bei Stottmeister *et al.*, 1982; Kubicek und Roehr, 1989; Finogenova, 1991; Stottmeister und Weissbrodt, 1991; Matthey, 1992, 1999; Röhr *et al.*, 1996; Barth und Gaillardin, 1996, 1997; Barth *et al.*, 2003). Diese besondere Eigenschaft von *Y. lipolytica* ist seit den 60er Jahren bekannt und heute eine der wichtigsten potentiellen praktischen Anwendungen dieser Hefe in Bioconversionsverfahren (Treton *et al.*, 1978; Oogaki *et al.*, 1983; Behrens *et al.*, 1986; Weißbrodt *et al.*, 1988; Kim und Roberts, 1991; Pan und Pan, 1992; Shah *et al.*, 1993; Rymowicz *et al.*, 1993; Wojtatowicz *et al.*, 1997; Kim, 1999; Arzumanov *et al.*, 2000; Chernyavskaya *et al.*, 2000; Antonucci *et al.*, 2001; Crolla und Kennedy, 2001; Fausek *et al.*, 1991; Ilchenko *et al.*, 2001, 2002; Zarowska *et al.*, 2001; Anastassiadis *et al.*, 2002; Finogenova *et al.*, 2002; Papanikolaou *et al.*, 2002b; Papanikolaou und Aggelis 2003a; Kutschke *et al.*, 2001; Kutschke und Bley 2002a,b; Kruse *et al.*, 2002a,b; Mauersberger *et al.*, 2003a,b; Kamzolova *et al.*, 2003). Heute werden insbesondere neue Verfahren mit nachwachsenden Rohstoffen entwickelt. Ein Verfahren zur Citronensäureproduktion aus Rapsöl soll durch die Firma Archer Daniels Midland (Decatur, Ill., USA) eingeführt werden (Barth *et al.*, 2003).
- 2) Gewinnung wirtseigener extrazellulärer Proteine** mit *Y. lipolytica*, darunter die im Gegensatz zu anderen Hefen in größeren Mengen gebildeten wirtseigenen Proteine (bis zu 1-2 g/l oder 1-2% des Zellproteins im Falle von AEP; Übersichten bei Heslot, 1990; Ogrydziak, 1993), wie alkalische Proteasen AEP (Gene *XPR2* und *AEP2*; Ogrydziak *et al.*, 1977; Ogrydziak und Scharf, 1982; Nicaud *et al.*, 1989a; Fabre *et al.*, 1991; LeDall *et al.*, 1994; Ogrydziak, 2002), saure Protease AXP (Gen *AXP*; Yamada und Ogrydziak, 1983; Balasheva *et al.*, 1990; Fabre *et al.*, 1991; Young *et al.*, 1996; Glover *et al.*, 1997; McEwen und Young, 1998; Hamilton *et al.*, 1999; 2000), Lipasen und Esterasen (Gene *LIP1* bis *8*; Hadeball, 1991; Barth und Gaillardin, 1997; Destain *et al.*, 1997; Pereira-Meirelles *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 1998; Dominguez *et al.*, 1998; Pignede *et al.*, 2000a,b; Souza Martins *et al.*, 2002; Nicaud *et al.*, 2002a,b; Fickers *et al.*, 2003), verschiedene Protein-Phosphatasen (Jolivet *et al.*, 1998, 2001; Queiroz-Claret *et al.*, 1998), saure oder alkalische Phosphatasen (Ogrydziak *et al.*, 1982; Moran *et al.*, 1989;

Treton *et al.*, 1992; Galabova *et al.*, 1993, Vasileva-Tonkova *et al.*, 1996), RNasen (Gen *XRN1*; Cheng und Ogrydziak, 1987; Cheng und Ogrydziak, 1986; Ogrydziak, 2002), bzw. alpha-Mannosidase (Vega and Dominguez, 1986).

3) Heterologe Expression und Sekretion von Proteinen (Übersichten bei Heslot, 1990; Buckholz und Gleeson, 1991; Buckholz, 1993; Romanos *et al.*, 1992; Barth und Gaillardin, 1996, 1997; Dominguez *et al.*, 1998; Madzak *et al.*, 2003), darunter beispielsweise einige kommerziell interessante Proteine wie Prochymosin, α 1-Interferon, Plasminogenaktivator tPA, oder Anaphylatoxin C5a (Referenzen siehe Buckholz und Gleeson, 1991), Blutgerinnungsfaktor XII (Tharaud *et al.*, 1992), Hepatitis B Antigen (*hepatitis B virus middle surface antigen*; Hamsa und Chattoo, 1994), α -Amylase aus Reis (Park *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1997; 1998a,b; Kim *et al.*, 2000), Galactanase, Polygalactorunase, Cellulase und Xylanase aus Pilzen (Müller *et al.*, 1998), epidermaler Wachstumsfaktor (*human epidermal growth factor*; Hamsa *et al.*, 1998), Endoglucanase I (EGI) aus *Trichoderma reesei* (Park *et al.*, 2000; Sohn *et al.*, 1998); Rinder-Chymosin (Madzak *et al.*, 2000), Anti-Ras-Antikörper (scFv; Swennen *et al.*, 2002), Leucin-Aminopeptidase LapA aus *Aspergillus oryzae* (Nicaud *et al.*, 2002a,b), humanes Glycoprotein sCD14 (Gysler *et al.*, 2002), Allergen Alta1p aus *Alternaria alternata* (Morin und Dominguez, 2002), *Vitroscilla* hemoglobin (Bhave und Chattoo, 2002) und zwei Asparagin-Proteinasen (EC 3.4.23) TcAP1 und TcAP2 aus den Samen Kakaopflanze *Theobroma cacao* L. (Laloi *et al.*, 2002).

4) Bioconversion (Biotransformation) insbesondere von hydrophoben Substraten (Fettsäurederivate, Steroide) durch Anwendung von Mutanten und rekombinanten *Y. lipolytica* Zellen, wie die

- Gewinnung von Dicarbonsäuren und Hydroxyfettsäuren aus Alkanen, Fettsäurederivaten oder Pflanzenöl (Übersichten bei Fukui und Tanaka, 1980; Rehm und Reiff, 1981; Wang, 1984; Bühler und Schindler, 1984; Schmid, 1986; Schindler *et al.*, 1987, 1991 - Patente DE3540834, EP229252, DE4019166; Eierdanz *et al.*, 1991a,b - Patente DE4015851, DE3929337; Meusdoerffer, 1988; Schindler *et al.*, 1990; weitere Patente verschiedener Firmen für *Y. lipolytica*, *C. tropicalis* und andere Hefen: DE3721119, DE3738812, DE3514550, DE2951177, DE2937292, DE2853847, DE2164626, DE2140133, US4474882, US4339536, US3975234, GB1405026;
- Aromaproduktion (α -Decalacton) aus α -n Hydroxyfettsäuren wie Methyl-Ricinolsäure mit Wildtypstämmen (Cardillo *et al.*, 1991; Ercoli *et al.*, 1992; Meyer, 1993 - Patent DE4126997, weiterer Patente verschiedener Firmen weltweit, z.B. FR2734843, EP0997533, US6518050, US6451565; US5215901, US5168054 US4560656, WO0024920; Übersichten bei Endrizzi *et al.*, 1996; Häusler und Münch, 1997; Wache *et al.*, 2003) und Optimierung dieser Biotransformation durch Veränderung der Aktivität der

peroxisomalen β -Oxidation, insbesondere der Acyl-CoA Oxidase Gene *POX1-POX5* (Pagot *et al.*, 1997, 1998; Wache *et al.*, 2000a,b, 2001, 2003);

- Biotransformation von Steroiden nach Überexpression von Cytochrom P45017□ des Rindes und Co-Expression mit der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase von *Y. lipolytica* unter Kontrolle des *ICL1* Promotors (Juretzek, 1999; Juretzek *et al.*, 1997, 1999, 2000a; Förster *et al.*, 2002; Mauersberger *et al.*, 2002; Shkumatov *et al.*, 1998, 2003) bzw. die Expression von Cytochrom P450 1A1 (Nthangeni *et al.*, 2002).

5) Gewinnung interessanter Produkte mit *Y. lipolytica* durch Kultivierung unter bestimmten Bedingungen und dem Einsatz von Wildtypstämmen, Mutanten oder Enzymen dieser Hefe für die Biosynthese, Bioconversion oder Biotransformation, wie

- Bioemulgatoren (Sarubbo *et al.*, 1999, 2001; Zinjarde *et al.*, 1997, 2002b; ältere Literatur siehe Barth und Gaillardin, 1996, 1997);
- Lipide und Lipidfraktionen (*single cell oil, cocoa-butter substitute*) (Papanikolaou *et al.*, 2001, 2002a, 2003; Papanikolaou und Aggelis, 2002, 2003b); Wachsester (Sekula, 1991) oder Ceramid (Rupcic und Maric, 1998);
- Aminosäuren wie Lysin mit Mutanten des Lysinabbau und Methionin (Heslot *et al.*, 1979; weitere Literatur vgl. Barth und Gaillardin, 1996, 1997);
- Isopropylmalat mit Leucin-auxotrophen Mutanten (De Zeeuw und Stasko, 1983);
- 2,5-Dihydroxyphenylelessigsäure aus L-Tyrosin oder L-Phenylalanin (Bigelis und Black, 1990 – Patenschriften US4956279, EP0343330);
- optisch aktive (R)-Methylbernsteinsäure aus Squalen (Tsubokura *et al.*, 1992 – EP0481712, US5217887) und optisch aktive 3-Methyladipinsäure (Tsubokura *et al.*, 1992 – EP0481711);
- 2,6-Dihydroxy-3-Naphthonsäure (Kawanaka und Kitahata, 1998 - JP10014589);
- die Biotransformation von Limonenen und Piperitonen (van Rensburg *et al.*, 1997; van Dyk *et al.*, 1998);
- die Fermentation zur Gewinnung von L- β -Hydroxy-Isobuttersäure aus Isobuttersäure (Kim *et al.*, 1999);
- die enantioselektive Oxidation oder Reduktion 2-Alkanolen oder zyklischen Alkoholen (Mauersberger *et al.*, 1992; Fantin *et al.*, 1996a,b, 2000) oder die sehr effiziente enantioselektive Hydrolyse von Estern, Enolestern, Epoxiden oder Lactonen (Fontana *et al.*, 2002; Fantin *et al.*, 2001).

6) Einsatz von *Y. lipolytica* in der Bioremediation von Alkanen und Triglyceriden für

- Abbau von Abfallfett und -öl, beispielsweise in Abwässern von Oliven- oder Palmölmühlen (Scioli und De Felice, 1993; De Felice *et al.*, 1997; Scioli und Vollaro, 1997; Oswal *et al.*, 2002), in anderen fettverarbeitenden Einrichtungen (Milch aus der Käseproduktion, Margarineproduktion) in der Lebensmittelindustrie (De Felice und Scioli,

1994; Thonart *et al.*, 1997; Werner *et al.*, 1997; Portscht *et al.*, 2001), Abbau von Fischöl (Hottinger *et al.*, 1974; Ota und Kushida, 1988; Guo *et al.*, 1999), bzw. die Bioconversion von Altfett und Pflanzenöl in Citronensäure (Kutschke *et al.*, 2001; Kutschke und Bley 2002a,b; Kruse *et al.*, 2002a; vgl. auch Punkt 1);

- Abbau (Bioremediation) und Detektion von Verunreinigungen durch Erdölfraktionen (Alkane und andere Kohlenwasserstoffe (Stormer und Bardy, 1976; Burkhardt-Maturin und Wilson, 1983; Horakova und Nemeč, 1996; Margesin und Schinner, 1997a,b; Alkasrawi *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2000; Zinjarde *et al.*, 1998, Zinjarde und Pant, 2002a; Kim und Svetashev, 2002).

Diese Beispiele belegen das Potential der Hefe *Y. lipolytica* für biotechnologische Anwendungen und die wachsende Bedeutung der nichtkonventionellen Hefen in der Biotechnologie der Zukunft.

Eine Vielzahl von Untersuchungen zeigen das natürliche Vorkommen von *Y. lipolytica* in verschiedenen Lebensmitteln und belegen die Bedeutung dieser Hefe in der Nahrungsmittelindustrie. Beispielsweise wurde der Einfluss von *Y. lipolytica* auf die Pigmentbildung bei der Käseherstellung (Carreira *et al.*, 1998, 2001a,b, 2002) sowie das Vorkommen verschiedener Hefen (darunter auch meist *Y. lipolytica*) und ihr Einfluss auf Herstellung, Reifung und Verderb von traditionellen Lebensmitteln, wie Käse, Wurst und anderen Fleischprodukten näher untersucht (Ferreira und Viljoen, 2003; Vasdinyei und Deak, 2003; Szoltysik *et al.*, 2002; Addis *et al.*, 2001; Gardini *et al.*, 2001; Suzzi *et al.*, 2001; Guerzoni *et al.*, 1998, 2001; Deak, 2001; Deak *et al.*, 2000; Ismail *et al.*, 2000, 2001; Fleet 1990; Wyder und Puhan 1999; Welthagen und Viljoen, 1998; Jakobsen und Narvhus, 1996; Roostita und Fleet, 1996).

1.5.7 Die mobilen genetischen Elemente von *Yarrowia lipolytica*

Da Retrotransposonen in allen eukaryotischen Lebewesen ubiquitär vorkommen (vgl. Kapitel 1.1-1.4) war es keine Überraschung, dass sie auch in der Hefe *Y. lipolytica* entdeckt wurden (Schmid-Berger *et al.*, 1994; Casaregola *et al.*, 2000, 2002a,b; Neugeglise *et al.*, 2002a,b). Genauere Untersuchungen zeigten jedoch bald, dass die Retrotransposonen dieser Hefe einige ungewöhnliche Eigenschaften aufweisen, was ihre weitere Untersuchung besonders interessant erscheinen lässt.

Das erste LTR-Retrotransposon von *Y. lipolytica* wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Gerold Barth (Biozentrum Basel, jetzt TU Dresden) im Stamm B204-12C im Rahmen von Untersuchungen des *GPR1* Genes gefunden und als Ylt1 bezeichnet (Schmid, 1994; Schmid-Berger *et al.*, 1994; Accession-Nummern X74146, AJ310725). Das Retrotransposon Ylt1 gehört zur Ty3/*gypsy*-Superfamilie und liegt im Stamm B204-12C und den daraus abgeleiteten *GPR1*^d-Mutanten in hohen Kopiezahlen dispers über das gesamte Genom verteilt vor. Dieses Retrotransposon von ca. 9,4 kb Länge besteht aus einem internen

Bereich, der als *eta* bezeichnet wurde. Dieser wird an beiden Seiten von identischen, *zeta* genannten LTRs von 714 bp Länge flankiert. Große Teile des Retrotransposons Ylt1 wurden sequenziert, jedoch lag zu Beginn dieser Arbeit noch keine sichere vollständige Sequenz von der internen Region *eta* vor (Schmid-Berger *et al.*, 1994; Barth, persönliche Mitteilung).

Verschiedene *Y. lipolytica* Stämme besitzen eine unterschiedlich große Anzahl des Retrotransposons Ylt1. Etwa 35 komplette Kopien des Ylt1 und ca. 30 bis 50 Kopien der singularär auftretenden Solo-LTR *zeta* liegen im haploiden Genom der von B204-12C abgeleiteten Stämme vor (Schmid, 1994; Schmid-Berger *et al.*, 1994). Eine Insertion eines kompletten Ylt1 erfolgte im Promotorbereich der *GPR1*-Allele, wodurch der *GPR1*-Promotor zerstört wird und nur 77 Basen des authentischen Promotors sich zwischen Ylt1 und dem Startcodon des *GPR1* Gens befinden (Augstein, 2001; Augstein *et al.*, 2003). Dagegen enthalten die *Y. lipolytica* Stämme H222, W29, und PO1d kein intaktes Ylt1 und keine *zeta*-Elemente, in den Stämmen H194 (YB423-12), B512-3, B204-12A-213, CXAU1, E129 und E150 ist es aber in hoher Kopiezahl vorhanden (Juretzek, 1999; Zimmermann *et al.*, 1999; Casaregola *et al.*, 2000; Augstein, 2001; Juretzek *et al.*, 2001; Neugeglise *et al.*, 2002; Augstein *et al.*, 2003; Senam *et al.*, 2003; Senam und Barth, 2003). Das spricht für den Wildtypstamm YB423 (*MATB*; Wickerham *et al.* 1970) als Ausgangspunkt für die Verbreitung des Retrotransposons Ylt1 in verschiedenen Linien von Laborstämmen (Deutsche B-Stammlinie von Barth, Französische E-Stammlinie von Gaillardin, Amerikanische Linie der CX-Stämme; vgl. Barth und Gaillardin, 1996).

Ein weiteres Ty3-ähnliches Retrotransposon (Tyl3, AL414488, AL414575), ein singuläres LTRyl1-Fragment (273 bp hoch repetitive Sequenz, AJ439559) und das LINE-Element Ylli (AJ319752) wurden im Wildtypstamm *Y. lipolytica* W29 bei der Sequenzanalyse von 4940 RST's (*random sequence tags*) im Rahmen des Genolevure-Projektes detektiert und näher analysiert (Casaregola *et al.*, 2000, 2002a,b; Neugeglise *et al.*, 2002a,b). Das Auftreten von Ylt1 und Tyl3 in *Y. lipolytica* zeigt, dass mehrere divergente Ty3/*gypsy*-Retrotransposonen in einigen Hefen vorkommen können, wie das auch für Tca3, Tca8, Tca9 und Tca13 in *C. albicans* gezeigt wurde (vgl. Tabelle 1).

Das LTR-freie Retrotransposon Ylli (steht für **Y**. *lipolytica* **L**INE-Element, AJ319752) wurde im Rahmen des Genolevure-Projektes bei der Sequenzanalyse der 4940 RST's aus *Y. lipolytica* W29 durch ihre Homologie zu den reversen Transkriptasen der LINE-Elemente von Säugern gefunden und nach vollständiger Sequenzierung näher charakterisiert (Casaregola *et al.*, 2000; Casaregola *et al.*, 2002). Es ist 6942 bp lang und besteht aus 2 offenen Leserahmen. Es wurden die charakteristischen Bereiche eines LTR-freien Retrotransposons in dieser Sequenz gefunden. Dabei handelt es sich um einen Cystein-reichen Bereich im ORF1, einen N-terminalen Endonuclease-Bereich, den zentralen Bereich der reversen Transkriptase und den Zink-Finger-Bereich am C-Terminus des ORF2. Ylli kommt im Genom

mit bis zu 100 Kopien vor, davon sind aber nur relative wenige komplett und damit potentiell aktiv. Die phylogenetische Analyse der RT-Domäne zeigte, dass das Ylii gemeinsam mit den LINE-Element Zorro-1 aus *C. albicans* (Goodwin *et al.*, 2001) zur L1 Gruppe der LINE-Elemente gehört. Es steht der TRE-Familie aus *D. discoideum* sehr nahe. Im Gegensatz zum LTR-Retrotransposon Ylt1 kommt das Ylii in allen untersuchten Wildtyp- und Laborstämmen aus Deutschland (H222), Frankreich (W29, E150) und USA (CX161-1B) vor (Casaregola *et al.*, 2002a,b).

Aus der Genomsequenzierung konnte neben den genannten Retrotransposonen (Klasse I der Transposonen) kürzlich auch das Vorkommen einer MULE-Familie (für **M**utator-**l**ike **e**lement) als Vertreter der DNA-Transposonen (Klasse II der Transposonen, die mittels einer speziellen Transposase direkt von DNA zu DNA springen können) in der Hefe *Y. lipolytica* abgeleitet werden (Casaregola *et al.*, 2003). Bisher waren vergleichbare MULE-Sequenzen nur aus Pflanzen bekannt, jedoch gelang ihr Nachweis in der letzten Zeit auch in einer Reihe von Ascomyceten, wie das Auftreten der *Hop*-Elemente in *Fusarium oxysporum*, *Magnaporthe grisea*, *Neurospora crassa* und *Aspergillus fumigatus* (Chalvet *et al.*, 2003) sowie des Cmut1 in *C. albicans* (Datenbank *Retrobases* von R. Poulter) zeigte. Mit dem Vorkommen von Vertretern der Superfamilien Ty3/*gypsy* (intakte und rudimentäre LTR-Retrotransposonen Ylt1, Tyl3 sowie das keiner Familie zugeordnete Solo-LTRYl1), LINE (LTR-freies Retrotransposon Ylii) und MULE (DNA-Transposon) weist die Hefe *Y. lipolytica* offensichtlich eine ungewöhnlich große Vielfalt an mobilen genetischen Elementen auf.

1.6 Zielstellung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine molekulare Charakterisierung des LTR-Retrotransposons Ylt1 vom Ty3/*gypsy*-Typ aus der Hefe *Y. lipolytica* durchgeführt werden. Die Hauptziele dieser Arbeit waren deshalb die vollständige Sequenzierung des kodierenden *eta*-Bereiches und die partielle molekulare Charakterisierung der Transkriptions- und Translations-Produkte des Ylt1 Retrotransposons aus *Y. lipolytica* B204-12C.

Damit stellten sich die folgenden Aufgaben:

1. Der *eta*-Bereich des Retrotransposons Ylt1 sollte aus der genomischen DNA des *Y. lipolytica* Stammes B204-12C-20 mittels PCR amplifiziert und im Vektor pUCBM21 kloniert werden. Davon sollen mindestens zwei unabhängig voneinander isolierte Klone sequenziert werden. Mögliche Translationsprodukte sollten aus dieser Sequenz abgeleitet und mit Datenbanken verglichen werden.
2. Das Vorkommen des Retrotransposons Ylt1 in verschiedenen Stämmen der Hefe *Y. lipolytica* sollte mit ausgewählten DNA-Sonden durch Southern Hybridisierung untersucht werden.
3. Die vorhandenen Sequenz-Datenbanken der *Y. lipolytica* Stämme W29 (*Genolevures* 1) und E150 (*Genolevures* 2) sollten auf die Anwesenheit weiterer Retrotransposon-Sequenzen analysiert werden.
4. Es sollte nachgewiesen werden, ob die Transpositionsaktivität des Retrotransposons Ylt1 im Genom von *Y. lipolytica* unter bestimmten Bedingungen induziert werden kann und der Nachweis der Aktivität durch Southern Blot Hybridisierung möglich ist.
5. Die natürlichen Transkriptionsprodukte des Retrotransposons Ylt1 sollten unter bestimmten Bedingungen induziert und durch Northern Hybridisierung mit unterschiedlichen DNA-Fragmenten als Sonde nachgewiesen werden.
6. Die Promotoraktivität der LTR *zeta* sollte mit dem Reporterprotein β -Galactosidase (*lacZ*-Gen) aus *E. coli* unter verschiedenen Kulturbedingungen und mit unterschiedlichen C-Quellen getestet werden.
7. Der ORF des *eta*-Bereiches des Retrotransposons Ylt1 sollte mit spezifischen Markern, wie HA- und c-myc-Tags, fusioniert, unter der Kontrolle des starken induzierbaren Promotors der Isocitratlyase (*pICL1*) exprimiert und danach die Translationsprodukte mit Antikörpern nachgewiesen werden.
8. Zur Kontrolle der Expression der Integrase sollte diese mit dem grünem Fluoreszenzprotein (GFP) fusioniert werden, um Translationsprodukte mit Anti-GFP-Antikörpern (oder über ihre Fluoreszenz) nachweisen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

- a. Amersham Pharmacia Biotech GmbH: horizontale Gelelektrophorese HOEFER HE 99X, UV / Visible Spektrophotometer
- b. Angewandte Gentechnologie Systeme: horizontale Minigel- Elektrophorese, Stromversorgungsgeräte
- c. Beckman: Ultrazentrifuge mit Rotor Ti45
- d. Beckman Coulter CEQ™ 2000 XL und LI-COR DNA Analyzer Gene Reader 4200 bzw. 4000: Sequenzier-System
- e. Biometra: Hybridisierungssofen DUOTherm, Vakuumblotapparatur, Thermocycler
- f. BioRad: Elektroporator Gene Pulser II
- g. Du Pont Zentrifuge SORVALL RC-5C+ mit Rotoren SS34, SLA1500 und SLA3000
- h. Heidolph: Reagenzglasschüttler, Schüttler
- i. Heraeus Zentrifugen: Biofuge pico, Biofuge fresco, Biofuge 15R, Biofuge 28RS, Kühlbrutschränke und Brutschränke
- j. Infors AG: Inkubationsschüttler
- k. MWG Biotech: PCR Geräte

2.2 Chemikalien und Biochemikalien

Alle zur Arbeit verwendeten Chemikalien und Biochemikalien sind kommerziell erhältlich.

2.2.1 Kitsysteme

Gene Images Random Prime Labelling Module	Amersham Pharmacia Biotech
Gene Images CDP-Star Detection Module	Amersham Pharmacia Biotech
JETquick Gel Extraction Kit	Genomed
JETquick PCR Purification Kit	Genomed
JETquick Plasmid Miniprep Kit	Genomed
Qiagen Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH
Oligotex ^R Poly A ⁺ mRNA Purification System	QIAGEN GmbH
RNA-Isolation Kit	InViTek
Sequencing System	Beckman Coulter
Western Blotting Detection System	Amersham Pharmacia Biotech

2.2.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme wie Phosphatase, T4-DNA-Ligase, T4-DNA-Polymerase und Klenow-Polymerase wurden von MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) oder Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg) bezogen. Für die PCR wurde Combipol-DNA-Polymerase von InViTek GmbH (Berlin) verwendet.

2.2.3 Nukleinsäuren

2.2.3.1 Verwendete Plasmide

Tabelle 2: Übersicht zu den verwendeten Plasmiden. Ausgewählte Plasmidkarten befinden sich in den Abbildungen zu den Ergebnissen.

Plasmid	Charakterisierung	Beschreibung	Referenz
pUCBM21	<i>Amp^R</i>	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
pYLD103	<i>Amp^R LEU2 GPR1-1 ARS18</i>	<i>GPR1-1</i> -Allel (<i>SaII/HindIII</i> -Fragment) in pINA237	Schmid-Berger <i>et al.</i> (1994)
pYLI131D	<i>Amp^R LEU2 ICL1 ARS18</i>	<i>YIICL1</i> -Gen mit dem nativen Promotor und Terminator	Juretzek (1999)
pINAlacZT	<i>Amp^R LEU2 lacZ ARS18</i>	Plasmid pINA237 mit <i>lacZ-ORF</i> aus <i>E. coli</i> vor dem <i>GPR1</i> Terminator	Augstein (2001)
pYLG3HA	<i>Amp^R LEU2 ARS18 GPR1 HA</i>	Plasmid mit HA-Tag	Gentsch (2003)
pYLG3-GFP	<i>Amp^R LEU2 GPR1B-GFP, ARS18</i>	Plasmid mit einem Gpr1-GFP-Fusionsprotein	Augstein <i>et al.</i> (2003)

2.2.3.2 Neu konstruierte Plasmide

Tabelle 3: In der vorliegenden Arbeit hergestellte Plasmide. Ausgewählte Plasmidkarten befinden sich in den Abbildungen zu den Ergebnissen.

Plasmid	Charakterisierung	Beschreibung
pYLIMCS	<i>Amp^R LEU2 pICL1-MCS-ICL1t</i>	Multiple Klonierungsstelle MCS nach dem <i>ICL1</i> -Promotor in pYLI131D
pUCETA	<i>Amp^R eta</i>	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor mit dem <i>eta</i> -Bereich aus Ylt1
pINAZA	<i>Amp^R LEU2 lacZ ARS18 LTRA</i>	pINAlacZ mit LTRA aus dem Ylt1 von <i>Y. lipolytica</i>
pINAZB	<i>Amp^R LEU2 lacZ ARS18 LTRB</i>	pINAlacZ mit LTRB aus dem Ylt1 von <i>Y. lipolytica</i>
pYLIG	<i>Amp^R LEU2 pICL1 ICL1_t IN GFP</i>	Plasmid zur Expression des IN-GFP-Fusionsproteins unter Kontrolle des <i>ICL1</i> Promotors
pYLEHC	<i>Amp^R LEU2 pICL1 ICL1_t eta (HA)₃ c-myc</i>	Plasmid zur Expression des Ylt1 ORF-(HA) ₃ -c-myc-Fusions-proteins unter Kontrolle des <i>ICL1</i> Promotors

2.2.3.3 Oligonukleotide

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide.

Nr.	Name	Länge	Sequenz (5'-3')	Restriktions-schnittstelle
1	eta1	39	TAT AGC ATG CTC TGG TGG ACG ACA CCT CGT TTT TGT TTC	<i>SphI</i>
2	eta2	38	CTA TCG CGG CCG CCC TGC CCA GGT CTA ACG GGG TTT CG	<i>NotI</i>
3	gag1	21	CGT TCC ACC AGG AAG CCT GCC	-
4	gag2	22	AGG AAG TGT AGA GAG CGC TCT G	-
5	SP1	18	GCC AGT GAC ACG GGT CTG	-
6	SP2	19	GAA GCT CGC TCC GAC TCA C	-
7	SP3	20	GGT CAA GGC CAA GTA CCT TG	-
8	SP4	18	CCT CCC CGT CAC TTA CGC	-
9	SP5	18	TCC CCC CAC TGC TAA GCG	-
10	SP6	19	CTT GCG GGT CCT GAC ATC C	-
11	SP7	19	CGG CAC CGG ATA CAT CAG C	-
12	SP8	20	GCA CCA CGG TGA TGT CTC TG	-
13	SP9	21	GCC ATG TAC AAG CCG CTA CAC	-
14	SP10	19	TGA CTG CCA GGG CCT CAA C	-
15	SP11	19	CCC TGG CAG TTC CGA GAA G	-
16	SP12	21	CCG AGT TGA ACT CCC TAA CGC	-
17	SP13	21	GTC TGA GGT TCT CCG AGC TAC	-
18	SP14	19	CCG TCG GGT CTA CAC TGA C	-
19	SP15	18	GAC CTC CGT CCC CAC AAC	-
20	SP1rev	19	CTC GCG GGA CTG ATG TTC C	-
21	SP2rev	20	CTT ACC CGT GGA TGA ACG AC	-
22	SP3rev	20	CAG CGG GAA GGT AGA GGA TG	-
23	SP4rev	18	CAA GTC GGG GGC ACA AGC	-
24	SP5rev	18	GCA GGG CTC ACC ATA GCC	-
25	SP6rev	19	CAT GGC ACG GTG GAA CAC C	-
26	SP7rev	18	CCT CCG TGT CCG ACA TGC	-
27	SP8rev	19	GGG GGT CTG GCA TGA AGA G	-
28	SP9rev	18	GGC CCT CCG AGA GAT GAG	-
29	SP10rev	20	CAG CCT TCG CGA GTA CAA GG	-
30	SP11rev	20	TGG AGT CCT CTA GGT CAG AC	-

Nr.	Name	Länge	Sequenz (5'-3')	Restriktions-schnittstelle
31	SP12rev	19	CGT AAG CGG GCT CCA TGA G	-
32	SP13rev	18	CCG CCT GGG TCT TCA ACG	-
33	SP14rev	19	GAA GGC TCG ACC CAC ATC C	-
34	SP15rev	19	CGT TGA CAC CGC CCA AAG G	-
35	rev-29	18	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	-
36	uni-21	15	TGT AAA ACG GCC AGT	-
37	GAG (Sph, Pac)	49	GAA CAG CAT GCT TAA TTA AAT GTC GAA AGT AAC AAA AGA CGA GTT CCA G	<i>SphI, PacI</i>
38	GAG (NotI)	33	GAA CGC GGC CGC GGA GAG CCT TGG AGT CCT CTA	<i>NotI</i>
39	GPF1 (Pac)	42	GAA CAT TAA TTA AAT GAG TAA AGG AGA AGA ACT TTT CAC TG	<i>PacI</i>
40	GFP2 (Pac)	45	GAA CAT TAA TTA AGC ATG CTT TGT ATA GTT CAT CCA TGC CAT GTG	<i>PacI</i>
41	INT1	43	GAA CGC ATG CTT AAT TAA ATG TTC ACA GAG AAG GAG GTG TCT G	<i>SphI, PacI</i>
42	INT2	35	GAA CGC GGC CGC GAG AAT AAA GGC CCT GAG CAA GG	<i>NotI</i>
43	GFP1	38	GAA CGC GGC CGC AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT GG	<i>NotI</i>
44	GFP2	37	GAA CCT TAA GCT ATT TGT ATA GTT CAT CCA TGC CAT G	<i>AflII</i>
45	Pr1	41	GAA CGC TAG CTG TAA CAC TCG CTC TGG AGA GTT AGT CAT CC	<i>NheI</i>
46	Pr2A	44	GTT CGG ATC CAT TGT GAG AAA ATA AAG TGC TTT GTG CGT ACC AG	<i>BamHI</i>
47	Pr2B	44	GTT CGG ATC CAT GGT GAA AAC GAA AGA ACG GAA AGG GAA GTA AA	<i>BamHI</i>
48	PAUG-ETA	44	GAC AGC ATG CTT AAT TAA TAT GGA CTC CGA CCC TGA GCG TGA CC	<i>SphI, PacI</i>
49	ETA-Xho	23	AGA TCT CGA GGC ACC CCT CCT AG	<i>XhoI</i>
50	cmyc1	44	ACT GCA TGC GAG CAG AAG CTG ATC TCC GAG GAG GAC CTG GGG CC	<i>HpaI, ApaI</i>
51	cmyc2	41	TTG ACG TAC GCT CGT CTT CGA CTA GAG GCT CCT CCT GGA CC	<i>ApaI, HpaI</i>
52	HA1	48	GAA TCT CGA GGT GCA TGC TAC CCA TAC GAT GTT CCT GAC TAT GCG GGC	<i>XhoI, SphI</i>
53	HA2	47	GAA CCA ATT GCA GCA GCA TAA TCT GGA ACG TCA TAT GGA TAG GAT CC	<i>MunI</i>
54	ICLa	20	GCA GCG ATT CAA CAA CGA AG	-
55	ICLb	20	GGA AAA GCT GGG CAA ACC AC	-
56	Orf-1a	19	GTT GCA CCA GTT GGT GTC G	-
57	Orf-1b	20	GTT CAG ACG AGC GTG GGC AC	-
58	Orf-2a	20	GAC TCT GAC TCA TCT GCG TC	-
59	Orf-2b	21	GTA AGC GGG CTC CAT GAG GTC	-
60	Orf-3a	19	CAC TCT CGC CCC ACT TCA C	-
61	Orf-3b	19	GCT TGG CAG CAG GAA ACG C	-

Nr.	Name	Länge	Sequenz (5'-3')	Restriktions-schnittstelle
62	Orf-4a	19	CTT GTC CAT GCG CCA ACA G	-
63	Orf-4b	20	GTT GCG ATG TCG CGG AGA AG	-
64	Orf-5a	21	CAG AAG GAG ATT GCT CCC GAG	-
65	Orf-5b	20	CAT GGC TCC GCC ATA GTC AG	-
66	Orf-6a	20	CGC TAC GAC CCC ACC TTA CC	-
67	Orf-6b	20	GCC AGT GAC ATA GTG ACG GC	-
68	Orf-7a	20	CAG CTC ACC TGG TCT CCA TC	-
69	Orf-7b	20	GGG AAC CAC GAA GTG GAG AC	-
70	Orf-8a	20	GGT GTC TCT GGT GTC TTG CC	-
71	Orf-8b	20	GTG ACA CGC GGT CAC GAT GG	-
72	pol1	22	ACG CGG ACC TCC TGG CTG AGA G	
73	pol2	20	CAT GGC TCC GCC ATA GTC AG	
74	MCS	171	CAT GTA CGC GTG ATT CAG TAA TGA TGT AGT CCA GCG CCT CTA TCA AAC TCG TTA AAT ATA TTT TGC TAA ACA AAC TGC CTT AAG ACT AGT CAA TTG GTT AAC ATT TAA ATG TTT AAA CTT AAT TAA TTT TGT ATG CTT GGT CAG TCT ACT GGG GAT CCC CAG ATC TAT ATA	<i>Mlu</i> I, <i>Afl</i> III (<i>Bsp</i> TI), <i>Spe</i> I, <i>Mun</i> I, <i>Hpa</i> I, <i>Sma</i> I, <i>Pme</i> I, <i>Pac</i> I, <i>Bgl</i> II

2.2.3.4 DNA-Molekulargewichts-Standard

Bei DNA-Elektrophoresen wurde eine 1-kb Leiter (MBI Fermentas) als DNA-Größenstandard benutzt, zur DNA-Konzentrationsbestimmung wurde ein λ -DNA-Standard (MBI Fermentas) verwendet. Für Southern Hybridisierungen wurde λ -DNA, die mit *Eco*RI und *Hind*III verdaut wurde, als Standard genutzt.

2.3 Mikroorganismen

2.3.1 *Escherichia coli*

Tabelle 5: Verwendete *E. coli* Stämme.

Stamm	Genotyp
JM109	<i>recA1 endA1 supE44 gyrA96 hsdR17 relA1 thiΔ</i>
DH5 α c	<i>supE44 ΔlacU169 (Ø80 lacZ ΔM 15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>

2.3.2 *Yarrowia lipolytica*

Tabelle 6: Verwendete *Y. lipolytica* Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
H222	<i>MATA</i> (Wildtyp)	Barth und Weber (1982); Mauersberger <i>et al.</i> (2001)
PO1d	<i>MATA leu2-270 ura3-302 xpr2-322</i>	Le Dall <i>et al.</i> (1994)
B204-12C	<i>MATA met6-1 spo1-1</i>	Kujau <i>et al.</i> (1992)
B204-12C-20	<i>MATA met6-1 spo1-1 leu2-20</i>	Kujau <i>et al.</i> (1992)
B204-12A-213	<i>MATB leu2-17 ura3-12</i>	Barth (nicht publiziert)
CXAU1	<i>MATA ade1 ura3</i>	Iida <i>et al.</i> (1998)
H181	Unbekannt	DSM7806 (ZIMET43720) Behrens <i>et al.</i> (1986), Patent DD232309; aus dem UFZ, Leipzig
B512-3	<i>MATA leu2-17 met6-1 icl1C-108</i>	Barth und Scheuber (1993)
W29	<i>MATA</i> (Wildtyp)	Gaillardin <i>et al.</i> (1975); Stamm auch als CLIB89 oder CBS7504 bezeichnet.
E150	<i>MATB his-1 leu2-270 ura3-302 xpr2-322</i>	Barth und Gaillardin (1996)
H194 (YB423-12)	<i>MATA</i> (Wildtyp)	Wickerham <i>et al.</i> (1970)

2.4 Medien

LB Medium	Bacto-Pepton	1% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	NaCl	1% (w/v)
SOC-Medium	Pankreatisches Pepton aus Kasein	2% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	Glucose	20 mM
YPD-Medium	Hefeextrakt	1% (w/v)
	Bacto-Pepton	2% (w/v)
	Glucose	2% (w/v)

Minimalmedium (M) für *Y. lipolytica*

Salzlösung:	Endkonzentration (g/l):
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0
KH ₂ PO ₄	1,0
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,16
NaCl	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,7
Ca(NO ₃)·4H ₂ O	0,4
Spurenelemente:	Endkonzentration (mg/l):
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,05
FeCl ₃ ·6H ₂ O	2,00
H ₃ BO ₃	0,6
KI	0,12
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,48
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,48
Vitamine:	Endkonzentration (mg/l):
Thiaminhydrochlorid	0,3
Supplemente:	Endkonzentration (mg/l):
Uracil (Ura)	20
Leucin (Leu)	60
Methionin (Met)	50
Adenin (Ade)	50
Kohlenstoffquellen:	Endkonzentration:
Glucose (G)	2% (w/v)
Ethanol (E)	1% (v/v)
Ricinolsäure (R)	1% (v/v)
Natriumacetat (A)	0,4% (w/v)

Bei festen Medien wurden den oben genannten Medien 2% (w/v) Agar zugesetzt.

2.5 Mikrobiologische Methoden**2.5.1 Kultivierung von *Escherichia coli***

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme wurde auf festem bzw. flüssigem LB-Medium bei 37°C durchgeführt. Die Selektion Ampicillin-resistenter Transformanden erfolgte mit 100 µg/ml Ampicillin im Medium. Die Flüssigkulturen wurden unter Schütteln bei 250 Upm inkubiert.

2.5.2 Kultivierung von *Yarrowia lipolytica*

Die Kultivierung von *Y. lipolytica* erfolgte bei 28°C in YPD oder Minimalmedium. In Submerskultur wurden die Ansätze mit 250 Upm geschüttelt. Transformierte Hefestämme wurden zur Selektion in Minimalmedium mit entsprechenden C-Quellen und Supplementen kultiviert. Zur Gewinnung größerer Zellmengen wurden die Zellen in 10 ml Minimalmedium mit 2% (w/v) Glucose ca. 24 h vorkultiviert (Vorkultur). Zum Ansetzen der Hauptkultur mit gewünschter C-Quelle wurden die Zellen geerntet, mit Minimalmedium ohne C-Quelle gewaschen und mit einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 angeimpft. Parallel zur OD₆₀₀-Messung wurde die Zellzahl bestimmt.

2.6 Gentechnische Arbeitsmethoden

Die grundlegenden gentechnischen Arbeitsmethoden wurden nach Sambrook *et al.* (1989) und Ausubel *et al.*, 1998 durchgeführt.

2.6.1 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung und Identifizierung von DNA-Molekülen in einem elektrischen Feld. Die bei der Elektrophorese eingesetzte Agarosekonzentration ist abhängig von dem DNA-Molekulargewichtsbereich, in dem eine effektive Auftrennung der Fragmente erfolgen soll.

Je nach gewünschter Agarosekonzentration (0,5% - 2%) wird die Agarose in 1fach konzentriertem TAE-Puffer aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°- 60°C wird Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml) zugegeben und das Gel luftblasenfrei in einen vorbereiteten Gelträger mit Kamm gegossen. Anschließend wird der Kamm aus dem erstarrtem Gel vorsichtig herausgezogen und das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt, die mit 1xTAE-Puffer gefüllt ist. DNA-Proben werden mit 1/5 Volumen 6xLadepuffer versetzt und bei 8 bis 10 V/cm in 1xTAE aufgetrennt. Da das in die DNA eingelagerte EtBr unter UV-Licht fluoresziert, kann man die Banden auf einem Transilluminator sichtbar machen und mit einer Kamera fotografieren.

50 x TAE	242 g Tris
	57,1 ml Eisessig
	100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
	mit H ₂ O auf 100 ml
Ethidiumbromidlösung	Stammlösung 10 mg/ml
Ladungspuffer für Agarosegel	30 % (v/v) Glycerol
	0,05 % (w/v) Bromphenolblau

2.6.2 Restriktionsspaltungen

Zum Verdau der genomischen oder Plasmid-DNA wurden kommerziell erhältliche Endonukleasen verwendet. Die benutzte Enzymkonzentration betrug 3 U/µg DNA. Die entsprechenden Pufferlösungen (mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen) wurden beigefügt und der Verdauungsansatz bei 37°C über Nacht (für genomische DNA) oder etwa 3 Stunden (für Plasmide) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl Ladungspuffer pro 20 µl Ansatz gestoppt. Die eingesetzten Volumina von verwendeten Komponenten werden in der Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Restriktionsansatz zur Spaltung der genomischen und/oder Plasmid-DNA.

Nr.	Komponenten	Volumen (µl)
1.	H ₂ O (HPLC)	A
2.	10 x Puffer	2
3.	DNA (ca. 0,5-2 µg pro Ansatz)	B
4.	Restriktionsenzym (10 U/µl)	0,5
	Gesamtes Volumen	20

Fällung von DNA

Zur Fällung der DNA wurde der Ansatz mit 0,6 Volumen Isopropanol (reinst) versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation der Probe (10 min, 13.000 Upm) wurde das Pellet mit 70%igem eiskalten Ethanol gewaschen, zentrifugiert, in der Speed Vac getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

TE-Puffer 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
 1 mM EDTA

2.6.3 Behandlung von DNA-Fragmenten mit Phosphatase

Das Enzym intestinale alkalische Phosphatase vom Kalb (CIAP) entfernt die 5'-Phosphatgruppen des DNA-Moleküls, wodurch die Religation des Vektors verhindert wird. Die linearisierte Vektor-DNA wurde mit 10x Dephosphorylierungspuffer, A. bidest. und 1 U CIAP versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 50°C wurde die Reaktion durch die Zugabe von 0,025 M EDTA-Lösung beendet. Danach konnte die DNA über ein Agarosegel gereinigt werden.

2.6.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Vektor-DNA (ca. 50-200 ng) wurde mit Insert-DNA im Molaren Verhältnis von 1:2 bis 1:4 gemischt und mit A. bidest., 10x T4-DNA-Ligase-Puffer (Endkonzentration 1x) und 0,5 U T4-Ligase versetzt. Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 20 µl über Nacht bei 15°C. Die verwendete Komponenten sind in der Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: In der Arbeit verwendeter Ligationsansatz.

Nr.	Komponenten	Volumen (μ l)
1.	H ₂ O (HPLC)	A
2.	Vektor-DNA (50-200 ng)	B
3.	Insert-DNA	4 x B
4.	T4-DNA-Ligase-Puffer	2
5.	T4 DNA-Ligase	1
	Gesamtes Volumen	20

2.6.5 Isolierung von DNA aus Agarosegel

Zur Isolierung von erwünschten DNA-Fragmenten aus Agarosegel wurde der *Genomed Gel Extraction Kit* benutzt und nach Herstellerangaben verfahren. Vor der Extraktion wurden die DNA Fragmente gut getrennt, so dass homogene Fragmente aus dem Gel herausgeschnitten werden konnten.

2.6.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation gewünschter DNA-Fragmente wurde die PCR verwendet. Für analytische Untersuchungen wurden DNA-Polymerasen benutzt, die keine Korrekturlesefunktion (*proofreading*) besaßen (Taq-Polymerase, isoliert aus *Thermus aquaticus*, InVitek). Für präparative Ansätze wurden DNA-Polymerasen mit 3'-5'-Korrekturlesefunktion benutzt, um die Fehlerrate beim Einbau der Nukleotide zu vermindern (Pwo-Polymerase aus *Pyrococcus woesei*, CombiZyme-DNA-Polymerase, InViTek, Berlin). Als Ausgangs-DNA (template) diente gereinigte genomische oder Plasmid-DNA. Der in der Arbeit verwendeten PCR-Standardansatz wird in der Tabelle 9 dargestellt. Die Reaktionszeiten, Temperaturen und Volumen wurden nach Bedarf modifiziert (Tabelle 10).

Die verwendeten Primersequenzen sind in der Tabelle 4 dieser Arbeit dargestellt. Die Primer eta1 und eta2 wurden zur Amplifizierung des Internen Bereiches des Ylt1 Retrotransposons benutzt. Die Primer pol1 und pol2 wurden zur Amplifizierung des kurzen internen POL Bereiches verwendet. Das PCR-Produkt zwischen pol1 und pol2 wurde als Sonde für die Southern Hybridisierung benutzt. Die Primer SP1-SP15, SP1rev-SP15rev, rev-29 und uni-21 dienten zur Sequenzierung des ETA-Bereiches des Ylt1 Retrotransposons.

Tabelle 9: PCR-Standardansatz.

Komponenten	Lange Fragmente		Kurze Fragmente	
	Volumen (µl)	Endkonzentration	Volumen (µl)	Endkonzentration
Template-DNA	X	300 ng	X	300 ng
Primer-1 (100 pmol/µl)	5	50 pmol	5	50 pmol
Primer 2 (100 pmol/µl)	5	50 pmol	5	50 pmol
10 x Reaktionspuffer	5	1x	5	1x
25 mM MgCl ₂ bzw. MgSO ₄	6	3 mM	2,5	2,5 mM
DNTPs	2,5	500 µM	1	200 µM
DANN-Polymerase	1	5 U	1	5 U
H ₂ O (HPLC)	auf 50		auf 50	

Tabelle 10: PCR-Standardprotokoll

Schritt Nr.	Reaktion	Beschreibung
1	Initialschmelzen	4 min/ 94°C
2	Denaturierung	1 min/94°C
3	Annealingsschritt	1 min/55-68°C
4	Elongationsschritt	1 kb pro min/72°C
5	Zyklen	30 Zyklen (5 und 25)
6	Vorläufiger Abschluss	4 min/72°C
7	Ende	8°C

Nach Abschluss der PCR wurden die PCR-Produkte im Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Das gewünschte Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *QIAGEN Gel Extraction Kit* gereinigt (2.6.6.).

2.6.7 DNA-Sequenzierung

Die gewonnenen PCR-Fragmente wurden in ein Plasmid kloniert. Danach wurden die DNA-Sequenzen mittels Sequenzierung bestimmt (Sanger *et al.*, 1977). Diese wurde an zwei Geräten durchgeführt (LI-COR DNA Analyzer Gene Reader und BeckmanCoulter CEQ™ 2000 XL). Bei der Benutzung des LI-COR-Gerätes wurde zuerst ein Acrylamidgel gegossen. Dazu wurden die Glassplatten mit 10% SDS gereinigt und gut mit Wasser gespült. Um DNA-Rückstände zu zerstören, wurden die Glassplatten noch mal mit 0,1% Essigsäure und destilliertem Wasser gewaschen. Die Gelküvette wurde zusammengebaut und in einer

entsprechenden Vorrichtung befestigt. Die Gel-Lösung wurde hergestellt und in die Gelküvette gegossen, sofort der Probenkamm eingesetzt und für zwei Stunden stehen gelassen bis das Gel fest war. Die Sequenzerapparatur wurde zusammengebaut und mit 1x TBE-Lösung gefüllt. Der Probenkamm wurde vorsichtig entfernt und die Geltasche mit 1x TBE-Lösung gespült. Die PCR-Produkte, die von genomischer oder Plasmid-DNA als Template mit markierten Oligonukleotid-Primer amplifiziert wurden, wurden auf das Gel aufgetragen und die Apparatur angeschaltet. Nach Beenden der Elektrophorese wurden die Glassplatten herausgenommen und das Gel vorsichtig entfernt. Die Sequenziererergebnisse wurden gespeichert und mit dem Gene-Image Programm analysiert.

Bei einigen Versuchen wurde das erwünschte Fragment mit nicht modifizierten Primern amplifiziert und die DNA-Sequenz mit dem Beckman-Sequenzer bestimmt. Dafür wurde der entsprechende Sequenzierkit benutzt und nach Herstellerangaben verfahren. Vor dem Auftragen wurde das PCR-Produkt mit 20 mg/ml Glycogen ausgefällt, mit eiskaltem 70%-igen Ethanol gewaschen und in der Speed Vac getrocknet. Die Probe wurde in Probenpuffer gelöst und auf die Sequenzerapparatur aufgetragen. Nach Beenden der Sequenzierung wurden die Ergebnisse gespeichert und direkt analysiert.

1 x TBE-Puffer	10 mM Borsäure
	1 mM EDTA
	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
SDS	10 % (w/v)
Essigsäure	0,1 % (v/v)
Ethanol	70 % (v/v)
Glycogen	20 mg/ml
Natrium Acetat	1,5 M, pH 5,2

2.6.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde der *JETQUICK Plasmid Miniprep Kit* bzw. *Midiprep Kit* von Genomed benutzt und nach Herstellerangaben verfahren. Für analytische Untersuchungen wurde Plasmid-DNA aus einer 3-ml Kultur mittels der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.*, 1989) präpariert. Mit dieser Methode konnten ca. 5-50 µg Plasmid-DNA gewonnen werden.

2.6.9 Isolierung von genomischer DNA aus *Yarrowia lipolytica* (nach Scheuber, 1993)

Gewinnung von Sphäroplasten oder Protoplasten. 10 ml YPD-Medium wurden mit Einzelkolonien angeimpft und zur Vorkultur 24 h bei 28°C kultiviert. 50 ml YPD-Medium (Hauptkultur) wurden mit etwa 500 µl der Vorkultur beimpft und 8-12 h bei 28°C geschüttelt. Anschließend wurde die Zellzahl durch Zählung mit der Thomakammer bestimmt und die Kultur zur Zellernte (bei etwa 5×10^7 Zellen/ml) zentrifugiert (3.000 Upm, 5 min). Die Zellen wurden mit 50 ml sterilem dH₂O gewaschen und bei 3.000 Upm für 5 min erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml SPβ-Puffer aufgenommen. Zu je 1 ml Hefesuspension in SPβ-Puffer wurden 250 µl Zymolyase (Stammlösung: 10 mg/ml in SP-Puffer) und 200 µl Glusulase zugegeben und bei 37°C inkubiert bis nach ca. einer Stunde eine etwa 90%ige Protoplastierung der Zellen erreicht war.

Kontrolle der Protoplastenbildung. Die Kontrolle erfolgte durch Mikroskopie bzw. durch den Lysis-Test (visuelle Kontrolle). Die osmotische Lyse der Protoplasten lässt sich direkt unter dem Mikroskop durch Zugabe von Wasser zur Protoplastensuspension verfolgen. Die Protoplasten werden größer und platzen. Beim Lysis-Test werden 50 µl der Zellsuspension mit 400 µl H₂O und 50 µl 10%ige SDS-Lösung versetzt. Als Vergleich werden 50 µl Zellsuspension in 450 µl SP-Puffer aufgenommen. Die trübe Suspension klärt deutlich auf, wenn die Protoplastenbildung weit fortgeschritten ist.

DNA-Isolierung nach osmotischer Lyse der Sphäroplasten. Die Protoplasten wurden bei 3.000 Upm für 10 min abzentrifugiert und mit 5 ml SP-Puffer gewaschen. Nach der Zentrifugation bei 3.000 Upm für 10 min wurden die Protoplasten in 5 ml Tris-EDTA-Puffer resuspendiert. Zur Zellyse wurden 0,5 ml 10%ige SDS-Lösung zugegeben und der Ansatz bei 70°C für 30 min inkubiert. Danach wurden 1,5 ml Kaliumacetat-Lösung zupipettiert und die Probe zur Proteinfällung für 1 h auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde bei 4°C, 13.000 Upm für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die DNA wurde aus dem Überstand mit 0,7 Volumen Isopropanol für 10 min bei RT ausgefällt und dann bei 13.000 Upm für 15 min bei RT abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde einmal mit 2,5 ml eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und nach Zentrifugation bei 13.000 Upm für 5 min der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zur Entfernung des Ethanols leicht getrocknet. Die DNA wurde in 2,5 ml TE-Puffer mit RNaseA (Endkonzentration 100 µg/ml) gelöst und bei 37°C für 20 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 2,5 ml Phenol durch kurzes Schütteln extrahiert und nach Zentrifugation bei 13.000 Upm für 5 min zur Phasentrennung die untere wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Die Extraktion wurde einmal mit 2,5 ml Phenol, einmal mit 2,5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und zweimal mit je

2,5 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zur Phenolentfernung wiederholt. Die obere wässrige Phase wurde danach in ein neues Gefäß überführt und mit 250 µl 3 M Natriumacetat und 2,5 ml Isopropanol zur DNA-Fällung versetzt, 10 min bei RT stehen gelassen und bei 13.000 Upm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, bei 13.000 Upm für 5 min zentrifugiert und getrocknet. Die DNA wurde in 250 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration und Qualität der Präparation wurde durch eine Elektrophorese in einem 0,8%igem Agarosegel überprüft. Als Standard diente eine λ -DNA-Lösung (25 ng/µl).

SP-Puffer	1,2 M Sorbitol
	0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5
SP β -Puffer	20 mM β -Mercaptoethanol in SP-Puffer
Ethanol	70 % (v/v)
Isopropanol	pur
Natrium Acetat	3 M, pH 5,2
RNase A	100 mg/ml
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	25:24:1
Phenol/ Isoamylalkohol	24:1
Tris-EDTA-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0
	20 mM EDTA

2.6.10 Isolierung von RNA aus *Yarrowia lipolytica*

Zur Gewinnung der gesamten RNA aus der Hefe *Y. lipolytica* wurde das Kitsystem *RNA Isolation Systems* (InViTek) verwendet und nach der beiliegenden Vorschrift verfahren. Spezifische Isolierung der mRNA aus Hefezellen erfolgte mittels Kitsystem *mRNA Isolation Kit System* (Qiagen).

2.6.11 Transformation von Mikroorganismen

2.6.11.1 Herstellung elektrokompetenter *Escherichia coli*

Eine Kolonie des *E. coli* Stammes DH5 α oder JM109 wurden in 10 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C als Vorkultur inkubiert. Zur Herstellung der Hauptkultur wurde 500 ml LB-Medium in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit 5 ml der Vorkultur beimpft auf 0,3-0,6 OD₆₀₀/ml wachsen gelassen. Die Kultur wurde für 10-15 min auf Eis inkubiert und danach 10 min bei 4°C und 4.200 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden einmal mit 1 Volumen eiskaltem sterilem destilliertem Wasser gewaschen. Der Waschschrift wurde mit 0,5 Volumen Wasser wiederholt. Das Pellet wurde in 1,5 ml 10% Glycerin

vorsichtig aufgenommen. Die Zellsuspension (etwa $3 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml) wurde zu je 50 μ l in vorgekühlte Eppendorfggefäße aliquotiert. Die Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff oder in einem Kältegemisch aus 96% Ethanol versetzt mit Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

Ethanol	96 % (v/v) vergällt
Glycerin	10 % (v/v)

2.6.11.2 Transformation von *Eschericia coli* mittels Elektroporation

Die Transformation kompetenter Zellen von *E. coli* wurde nach der Methode von Dower *et al.* (1988) durchgeführt. Zur Transformation wurden in vorgekühlten Elektroporationsküvetten (0,2 cm Küvetten, Peqlab) 40 μ l kompetente Zellen mit bis zu 4 μ l Ligationsansatz versetzt, 5 min auf Eis inkubiert und einem elektrischen Puls von 2,25 kV bei 200 Ω und 25 μ F (Gene Pulser II, BioRad) ausgesetzt. Danach wurde sofort 1 ml steriles auf 37°C , angewärmtes SOC-Medium zupipettiert und der Ansatz 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zur Selektion auf LB-Medium mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.6.11.3 Herstellung kompetenter *Yarrowia lipolytica*-Zellen

Der Hefestamm wurde über Nacht bei 28°C in 10 ml YPD-Medium als Vorkultur kultiviert. 200 ml YPD wurden von der Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 28°C und 250 Upm geschüttelt. Bei einer Zelldichte von $1,5 \times 10^7$ Zellen/ml wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000 Upm, 4°C , 5 min) geerntet. Die Zellen wurden mit 200 ml eiskaltem destilliertem Wasser gewaschen, zentrifugiert und nochmals mit 100 ml Wasser und 10 ml eiskaltem 1 M Sorbitol gewaschen. Das Pellet wurde in 2-3 ml 1 M Sorbitol resuspendiert, in vorgekühlten Eppendorfggefäße aliquotiert, auf Trockeneis mit Ethanol schock gefroren und bei -80°C gelagert.

2.6.11.4 Transformation von *Yarrowia lipolytica* mittels Elektrotransformation (nach Dower *et al.*, 1988)

Diese Methode wurde für die Transformation von *Y. lipolytica* mit autonom replizierenden Hefevektoren verwendet.

40 μ l der Zellsuspension wurden auf Eis mit 10 bis 100 ng DNA versetzt, in eine Elektroporationsküvette (0,2 cm Küvetten, Peqlab) überführt und einem Puls von 1,6 kV bei 200 Ω und 25 μ F ausgesetzt (Gene Pulser II, Biorad). Die Zellen wurden danach sofort in 1 ml eiskaltem 1 M Sorbitol aufgenommen, auf Selektivmedium ausplattiert und bei 28°C inkubiert.

2.6.12 Southern-Hybridisierung

Für Southern Hybridisierungen wurden das *Gene Images random prime labelling module* und das *Gene Images CDP-star detection module* von Amersham Pharmacia Biotech genutzt und nach den Herstellerangaben verfahren.

2.6.12.1 DNA-Vorbereitung und Transfer auf Nylonmembranen

Die genomische DNA wurde in folgendem Ansatz mit den gewünschten Restriktionsendonukleasen über Nacht bei 37°C verdaut. Der Reaktionsansatz ist in der Tabelle 11 gezeigt. Als Marker-DNA wurden 5 ng λ -DNA (mit *EcoRI/HindIII* verdaut) aufgetragen.

Tabelle 11: Verdau genomischer DNA von *Y. lipolytica*.

Komponenten	Volumen (μ l)
Genomische DNA (100 ng)	15
10 x Puffer	5
Enzym (3-10 U/ μ l)	1
H ₂ O (HPLC)	29

Für die Auftrennung der Banden wurde die gespaltene DNA mittels Elektrophorese getrennt. Aufgetrennte DNA-Fragmente wurden vom Agarosegel auf die Nylonmembran mittels Vakuumbiotapparatur transferiert. Das Gel wurde in der Depurinisierungslösung inkubiert bis der Bromphenolblaumarker gelb gefärbt war. Das Gel wurde mit destilliertem Wasser kurz abgespült und die Denaturierungslösung zugegeben. Als die Bromphenolblaubande wieder blau gefärbt war, wurde das Gel nochmals mit destilliertem Wasser gespült und die Neutralisierungslösung wurde zugegeben. Nach 30 min Inkubationszeit wurde das Gel verworfen und die Membran mit 5x SSC Lösung gewaschen. Der hohe Salzgehalt und die starke Basizität der verwendeten Reagenzien gewährleisten, dass die DNA denaturiert und einzelstrangig auf der Membran vorliegt. Anschließend wurde die Membran für 2 h bei 80°C gebacken oder 4 min unter UV-Licht (UV-Transilluminator) behandelt. Dieser Schritt dient der festen Bindung der DNA an die Membran.

TAE 50 x	100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) 57,1 ml Eisessig 242 g Tris-Base
Agarose	0,8 % (w/v), gelöst in 1 x TAE-Puffer
Depurinisierungslösung	0,25 M HCl

Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5
20 x SSC	3,0 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat

2.6.12.2 Prähybridisierung und Hybridisierung

Zur Bandenmusterbestimmung wurden die DNA-Fragmente mit einer bestimmten Sonde im Hybridisierungssofen hybridisiert. Dazu wurde der Hybridisierungssofen auf 60°C vorgeheizt. Die Membran wurde mit 5x SSC befeuchtet und mit der DNA-tragenden Seite nach oben in eine Hybridisierungsröhre eingelegt. Danach wurde der Hybridisierungspuffer (auf 60°C vorgewärmt) entsprechend 0,125 ml/cm² auf die Membran gegeben und für 1 h bei 60°C prähybridisiert. Die spezifische DNA-Sonde für die Proben und den λ -Marker (1-2 μ l/ml Hybridisierungspuffer) wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und für 5 min bei 95°C denaturiert, danach sofort auf Eis gestellt und nach kurzer Zentrifugation zum Hybridisierungspuffer zupipetiert. Der Hybridisierungsprozess erfolgt über Nacht bei 60°C.

Hybridisierungspuffer	5,0 % (w/v) Dextransulfat 0,1 % (w/v) SDS 5 x SSC
-----------------------	---

Liquid Block-Lösung (Kitsystem II) 1:2 mit dH₂O verdünnt

2.6.12.3 Waschschritte, Blockierung, Antikörperbindung und Signaldetektion

Die Waschschritte erfolgten bei 60°C mit vorgewärmten Waschlösungen in sterilisierten Glasschalen. Zuerst wurde die Membran einmal in Waschlösung I (3 ml/cm² Membran) und einmal in Waschlösung II für jeweils 15 min unter Schütteln inkubiert. Dann wurde der Blot 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in der Blocklösung (0,8 ml/cm² Membran) und danach 1 h in der Antikörperlösung (0,3 ml/cm² Membran) inkubiert. Anschließend wurde der Blot 3 x 10 min mit der Waschlösung III (3 ml/cm² Membran) gewaschen. Die Membran wurde aus der Waschlösung genommen und auf eine Saranfolie gelegt. Der Blot wurde mit Detektionsreagenz (30 μ l/cm²) überschichtet, 5 min bei RT inkubiert und in eine Folientasche gelegt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm (HyperfilmTM ECL) auf der Membran in einer Filmkassette aufgelegt (Expositionszeit 10 bis 30 min) und anschließend entwickelt. Die Lagerung des Blots erfolgte in Saranfolie bei 2-6°C.

Puffer A	0,1 M Tris-HCl, pH 9,5 0,3 M NaCl autoklavieren
Waschlösung I	1 x SSC 0,1 % (w/v) SDS
Waschlösung II	0,1 x SSC 0,1 % (w/v) SDS
Waschlösung III	0,3 (v/v) Tween 20 in Puffer A
Blocklösung	1:10 Verdünnung der liquid Block-Lösung (Kitsystem II) In Puffer A
Antikörperlösung	Antifluorescein-AP-Konjugat 5000fach in 0,5 % (w/v) BSA in Puffer A

2.6.13 Northern Hybridisierung

Zum Nachweis des Transkriptionsproduktes des Ylt1 sollte dessen mRNA durch Northern Blot Hybridisierung nachgewiesen werden. Dazu wurde die gesamte RNA oder mRNA der Hefe *Y. lipolytica* benutzt. Alle verwendete Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt bzw. die verwendeten Geräte mit DEPC-haltigem Wasser gereinigt. Desweiteren wurde bei allen Arbeitsschritten mit Handschuhen gearbeitet. Zur Vorbereitung des Agarose/Formaldehyd Gels wurde 1 g Agarose in 72 ml DEPC-Wasser unter Erhitzen gelöst und in einem 60°C warmen Wasserbad abgekühlt. 10 ml MOPS-Puffer 10x und 18 ml Formaldehyd 12,3 M wurden der flüssigen Agarose zugegeben und vorsichtig durch leichtes Schütteln gemischt. Die Mischung wurde in eine Gelkammer unter dem Abzug gegossen. Nach ca. 30 min war das Gel fest.

Die RNA wurde auf 11 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt und mit 5 µl MOPS-Puffer 10x, 9 µl Formaldehyd 12,3 M und 25 µl Formamid versetzt und mit dem Vortexer gut gemischt. Nach kurzem Runterzentrifugieren wurde die RNA für 15 min bei 55°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 10 µl Formaldehyd-Lade-Puffer zugegeben und die Probe auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde abgebrochen als der Bromphenolblau marker $\frac{3}{4}$ des Gels gelaufen ist. Anschließend wurde das Gel mehrmals gewaschen. Zuerst 3 mal mit DEPC-Wasser (Entfernung Formaldehyd), dann für 30 min mit 0,05 M NaOH/1,5 M NaCl und am Schluss mit 10x dem Gelvolumen 0,5 M Tris-HCl (pH 7,4)/1,5 M NaCl. Vor dem RNA-Transfer wurde das Gel nochmals mit 20x SSC für 45 min gewaschen. Danach erfolgte der RNA Transfer auf die Nylonmembran mittels Vakuumapparatur für ca. 2 Stunden. Nach Beenden des Transfers wurde die Nylonmembran mit 2x SSC gewaschen und für 2 Stunden bei 80°C gebacken. Zum Nachweis der Qualität des Transfers wurde die RNA-tragende

Nylonmembran mit 0,03 % (w/v) Methylenblau in Natrium Acetat 0,3 M, pH 5,2 für 45 Sekunden gefärbt und anschließend 2 min mit Wasser gewaschen.

Die Membran wurde mit 6x SSC Lösung befeuchtet und mit der RNA-tragenden Seite nach oben zur Hybridisierung in ein Falcontube gelegt. Die Prähybridisierungs-Lösung (1 ml/20 cm² Membran) wurde dem Falcon zugegeben und dann für 1 Stunde bei 42°C unter ständigen Drehen inkubiert. Die DNA-Sonde wurde für 10 min bei 100°C denaturiert, sofort auf Eis gestellt und anschließend dem Hybridisierungstube zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 42°C.

Nach Beenden der Hybridisierung wurde die Membran 2 mal mit 2x SSC/0,1 % SDS (1:1) unter Drehen für 5 min bei RT gewaschen. Der Waschschrift wurde mit 0,2x SSC/0,1 % SDS (1:1) wiederholt. Danach wurde der Blot nochmals mit 2x SSC bei RT gewaschen. Die Waschschriffe, Blockierung, Antikörperbindung und Signaldetektion wurden wie in der Southern Hybridisierung durchgeführt (vgl. 2.6.13.3).

Formaldehyd	12,3 M
Formaldehyd-Ladepuffer	0,025 % (w/v) Bromphenolblau 1 mM EDTA, pH 8,0 0,25 % (w/v) Xylene Cyanol 50 % (v/v) Glycerin
Formamid	keine Verdünnung
Hybridisierungs-Lösung	5x SSC
Prähybridisierungs-Lösung	5x Denhardt-Lösung 50% (w/v) Formamid 1% (w/v) SDS 100 µg/ml denaturierte Salmonsamen-DNA (BioRad AG)
Methylenblau-Lösung	0,03 % (v/v) Natrium Acetat 0,3 M, pH 5,2
MOPS-Lauf-Puffer 10x	0,4 M MOPS, pH 7,0 0,1 M Natrium Acetat 0,01 M EDTA (bei 4°C gelagert).
SSC 20x	3,0 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat

2.7 DNA-Konstrukte

2.7.1 Konstruktion des Vektors pYLIMCS

Die in der Arbeitsgruppe vorhandenen Expressionsvektoren mit dem *ICL1*-Promotor waren für den Nachweis von Translationsprodukten aus dem gesamten ORF des 8 kb langen *eta*-

Bereichs nicht geeignet, da dieser zu viele verschiedene Schnittstellen enthält. Deshalb musste der neue Expressionsvektor pYLIMCS aufgebaut werden (vgl. Abbildung 36). Der dazu genutzte Ausgangsvektor pYLI131D enthält ein vollständiges *ICL1*-Gen mit dem kompletten Promotor D (*pICL1D*), Intron, offenem Leserahmen (*ICL1* ORF) und Terminator (*ICL1t*). Das Plasmid pYLI131D wurde mit den Restriktionsenzymen *BglII* und *MluI* geöffnet und so ein kleines Stück des 3'-Bereichs von *pICL1*, das Intron und der offene Leseramen des *ICL1*-Gens ausgeschnitten. In den so frei gewordenen Bereich zwischen dem *BglII*-Ort des *pICL1* und dem *MluI*-Ort des *ICL1t* wurde das mit den selben Restriktionsenzymen aus dem Plasmid pPCR-Script Amp (enthält das synthetische Oligonukleotid MCS, Entelechon GmbH) isolierte DNA-Fragment MCS (155 bp lang) eingesetzt. Auf diese Weise wurde in den resultierenden Vektor pYLIMCS ein neuer MCS-Bereich (*multi cloning site*) mit Schnittstellen für *AflII* (*BspTI*), *SpeI* (*BcuI*), *MunI*, *HpaI* (*KspAI*), *SwaI* (*SmiI*), *PmeI* (*MssI*) und *PacI* eingeführt. Der Vektor pYLIMCS wurde zur Konstruktion der Expressionsvektoren pYEHC (Expression des kompletten, mit HA- und cmyc-Tags markierten ORF des *eta*-Bereichs) und pYLIG (Expression des Integrase-Bereichs als gfp-Fusion) genutzt (vgl. 2.7.2, 2.7.3 und Resultate 3.8.2 und 3.8.3).

2.7.2 Konstruktion von pYLEHC

Zum Nachweis der Translationsprodukte des Retrotransposons *Ylt1* wurde der interne ORF des *eta*-Bereichs mit HA- und c-myc-Tags markiert und in den Expressionsvektor pYLIMCS überführt. Ausgehend vom Vektor pUCETA (vgl. Abbildung 7 im 3.1) wurde dazu zuerst direkt vor das Start-ATG (Position 826 bp im *Ylt1*) des ORF eine *PacI* Schnittstelle eingeführt. Mit den Primern GAG (*SphI*, *PacI*) und ETA-*XhoI* wurde ein PCR-Produkt hergestellt und nach Verdau mit *SphI* und *XhoI* in das auch mit diesen Enzymen geöffnete Plasmid pUCETA eingesetzt. Dadurch entstand das Plasmid pUCATGETA, welches den kompletten ORF des *Ylt1* ab dem ATG mit einer *PacI*-Stelle direkt davor enthält.

Zur Einführung eines HA-Tag zwischen Gag und Protease wurde das Plasmid pUCATGETA mit *XhoI* (2577 bp in *Ylt1*) und *MunI* (2729 bp) geschnitten und ein mit PCR aus dem Plasmid pYG3HA (Gentsch, 2003) mit den Primern HA1 (*XhoI*) und HA2 (*MunI*) amplifizierter modifizierter HA-Tag eingesetzt. In das resultierende Plasmid pUCAEH wurde nachfolgend ein zusätzlicher c-myc-Tag in den vor der Integrase liegenden Bereich zwischen Position 5940 (*HpaI*) und 6010 (*ApaI*) im *Ylt1* eingeführt. Der c-myc-Tag wurde durch die Paarung der Oligonukleotide *cmcy1* und *cmcy2* hergestellt, wodurch im 45 bp Fragment die Enden eines Verdau mit *HpaI* (5'-Ende) und *ApaI* (3'-Ende) entstanden, die für das Einsetzen in das entsprechend geöffnete Plasmid pUCAEH genutzt wurden. Aus dem resultierenden Plasmid pUCAEHC wurde der gesamte mit HA- und c-myc-Tag modifizierte kodierende Bereich von *eta* mit *PacI* und *AflII* isoliert und in den ebenso geöffneten Vektor pYLIMCS eingesetzt (vgl.

Abbildungen 7 und 36). Der resultierende Expressionvektor pYLEHC enthält den mit HA- und c-myc-Tags als Proteinmarker modifizierten offenen Leserahmen des *eta*-Bereiches von Ylt1 unter Kontrolle des Promotors pICL1.

2.7.3 Konstruktion einer Integrase-GFP-Fusion im Vektor pYLIG

Zum Nachweis, ob die Integrase einzeln exprimiert werden kann, wurde eine Fusion des Integrase-Bereiches von Ylt1 mit dem GFP-Gen (kodierend für das grün fluoreszierende Protein) aufgebaut und als Integrase-GFP-Konstrukt (IN-GFP) unter die Kontrolle des pICL1 gesetzt (vgl. Abbildung 38). Die Integrase wurde mit den Primern INT1 (Schnittstellen für *SphI* und *PacI*) und INT2 (Schnittstelle *NotI*) aus dem Vektor pUCETA amplifiziert und in den mit *SphI* und *NotI* geöffneten Vektor pUCBM21 überführt (pUCINT). Das GFP-Gen wurde mit den Primern GFP1 (mit *NotI*) und GFP2 (*AflII*) aus dem Plasmid pYLG3-GFP (Augstein *et al.*, 2003) amplifiziert und anschließend in den mit *NotI* und *AflII* geöffneten Vektor pUCINT kloniert. Das resultierenden Plasmid pUCINTGFP vorliegende Konstrukt INT-GFP wurde nach Verdau mit *PacI* und *AflII* in den Expressionsvektor pYLIMCS gebracht. Der entstandene Expressionsvektor pYLIG enthält damit eine Expressionskassette für das INT-GFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des *ICL1*-Promotors (vgl. Abbildung 38).

2.7.4 Vektoren zum Nachweis der Promotoraktivität des LTR

Um die Promotoraktivität der 5'-LTR-Sequenz nachzuweisen, wurde Vektoren konstruiert, in denen das für die β -Galactosidase kodierende Reportergen *lacZ* aus *E. coli* mit LTR-haltigen Fragmenten fusioniert vorlag (vgl. Abbildung 34). Dazu wurde als Ausgangsplasmid pINAlacZT (Augstein, 2001) genutzt. Die LTRA wurde mit den Primern Pr1 (*NheI*) und Pr2A (*BamHI*) amplifiziert. Die LTRB wurde durch PCR mit den Primern Pr1 (*NheI*) und Pr2B (*BamHI*) amplifiziert. Anschließend wurden beide PCR-Produkte und der Vektor pINAlacZT mit *BamHI* und *NheI* verdaut und mit den Fragmenten LTRA oder LTRB ligiert, wodurch die Expressionstestvektoren pINAZA und pINAZB entstanden.

2.8 Biochemische Methoden

2.8.1 Proteinisolierung aus Extrakten

Einzelne Kolonien von Transformanten des Stammes PO1d und die Kontrollstämme wurden auf verschiedenen C-Quellen kultiviert. Die Zellen wurden bei einer OD_{600} von 6 durch Zentrifugation geerntet (3 min, 3.500 Upm). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 1 ml Lysis-Puffer aufgenommen. Danach wurden 100 μ l NaOH 2 M zugegeben und gemischt. Die Suspension wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von TCA und

nach Durchmischung eine weitere Inkubation von 10 min auf Eis. Anschließend wurde 5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 70 µl Samplepuffer resuspendiert und 10 min bei 95°C inkubiert. Unlösliche Präzipitate wurden für 1 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß übergeführt und davon 15 µl auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen.

Lysispuffer :	50mM Tris-HCl pH 7,4
	0,4 M Sorbitol
NaOH	2 M NaOH
TCA-Lösung	72 % (w/v) Trichloroacetatsäure
Samplepuffer :	210 µl 4x Ladepuffer
	84 µl M Dithiothreitol
	167 µl Tris 1M (ohne pH einzustellen)
	123 µl Lysispuffer

2.8.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der klassischen Methode nach Lowry *et al.* (1951). Zur Fällung der Proteine wurden die Proben mit sterilem H₂O auf 0,9 ml aufgefüllt und mit 0,1 ml 0,15 % (w/v) Natriumdesoxycholat versetzt. Der Ansatz wurde für 15 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden 0,1 ml 72%iges TCA zugegeben und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Dann erfolgte die Zentrifugation der Proben für 15 min bei 13.000 Upm. Das Pellet wurde zuerst mit 0,5 ml 0,5 % TCA und anschließend mit 0,5 ml 50% Aceton gewaschen. Dann wurde es getrocknet und in 0,2 ml NaOH 0,1 M aufgenommen. Als Proteinstandard diente in NaOH 0,1 M gelöste BSA (Fa. Merck). Gegebenenfalls erfolgte eine Verdünnung der Proben in 0,1 M NaOH. Die Proben wurden mit 1 ml Lösung D versetzt, gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Dann wurde 0,1 ml Lösung E zugegeben, sofort kräftig geschüttelt und für weitere 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 720 nm bestimmt.

Lösung A : 2 % (w/v) Na₂CO₃ in 0,1 M NaOH

Lösung B : 1 % (w/v) CuSO₄·5H₂O

Lösung C : 2 % (w/v) Kalium Natrium Tartrat

Lösung D : 49 ml Lösung A wurde mit 0,5 ml Lösung B und 0,5 ml Lösung C gemischt

Lösung E : 1 N Folin-Ciocalteu-Reagenz

2.8.3 Western Hybridisierung

2.8.3.1 Proteintrennung mittels SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Proteine wurde eine SDS-PAGE nach Laemmli (1970) durchgeführt. Zur Vorbereitung der Elektrophoresekammer wurden beide Glasplatten gründlich zuerst mit sterilem Wasser und dann mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die Gelküvetten wurden in eine entsprechende Vorrichtung gebaut. Anschließend wurden Trenn- und Sammelgel gegossen. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Komponenten	Trenngel		4 % Sammelgel
	10 %	8 %	
Steriles Wasser	3,35 ml	4,75 ml	3,05 ml
Fertige Acrylamid/Bis Acrylamid-Lösung (30 % / 0,8 %)	4,0 ml	2,6 ml	650 µl
Trenngel-Puffer pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	-
Sammelgel-Puffer pH 6,8	-	-	1,25 µl
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml	50 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5µl
Gesamtes Volumen	10 ml	10 ml	5 ml

Nach der Polymerisierung der Gele wurde die Glasküvette in ein geeignete Elektrophoreseapparatur gebaut und mit 1x Elektroden-Puffer gefüllt. Nach vorsichtigem Entfernen des Kamms wurden die Geltaschen mit Elektroden-Puffer gespült. Die Proben wurden mit 0,75 Volumen Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Anschließend erfolgte das Auftragen der Proben auf das Gel und der Start der Elektrophorese (Trennbedingungen: 15-20 mA Sammelgel, 20-25 mA Trenngel). Nach Beenden der Elektrophorese wurde die Glasküvette vorsichtig geöffnet und das Trenngel gewonnen.

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	29,2 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid (oder fertige Lösung Acrylamid/Bis 30 %/ 0,8%)
APS-Lösung	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
Elektrodenpuffer (10x)	1,92 M Glycin 1 % SDS 0,25 M Tris pH 8,3 gestellt.

Probenpuffer (4x)	0,25 M Tris-HCl, pH 6,8 8 % (w/v) SDS 40 % (v/v) Glycerin 20 % (v/v) β -Mercaptoethanol 0,008 % (w/v) Bromphenolblau
Sammelgel-Puffer	1,0 M Tris-HCl, pH 6,8
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
TEMED	unverdünnt

2.8.3.2 Proteintransfer und Detektion

Der Proteintransfer aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Membran erfolgte mittels der semi dry Elektrobplot-Methode. Das Polyacrylamidgel wurde in Transferpuffer 1x für 10 min inkubiert. Vor Benutzung der PVDF-Membran wurde diese für je 3 min zuerst in 100% Methanol, dann in Aqua dest. und anschließend in Transferpuffer eingelegt. Die Blotapparatur bestand aus 3 Lagen Filterpapier, der Membran, dem Gel und noch mal 3 Lagen Filterpapier. Der Transfer erfolgte bei einem stabilen Strom von 0,8 mA/cm² der Gelfläche. Nach Beenden des Elektrotransfers wurde das Gel mit Coomassieblau für 5 min gefärbt, um die Vollständigkeit des Transfers zu überprüfen (Färbung nichttransferierter Proteine). Zur Entfernung des Farbstoff aus dem Gel wurde es mit Entfärberlösung gewaschen. Zur Visualisierung der transferierten Proteine auf der Membran wurde die PVDF-Membran mit Ponceau-Lösung für ca. 5 min gefärbt und danach zur Entfernung des Ponceau mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde sie in Blockierungslösung überführt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 3 mal mit TBS-T unter leichtem Schütteln gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation der Membran für 1h mit dem primären Antikörper. Zur Entfernung des primären Antikörper nach der Inkubation wurde die Membran 3 mal mit TBS-T unter leichtem Schütteln gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 30 min. Nach der Inkubation erfolgte noch mal ein Waschschrift mit TBS-T unter leichtem Schütteln, der 3 mal wiederholt wurde. Die Detektion erfolgte unter Verwendung des ECL-Kitsystems der Firma Amersham. Für die Filmentwicklung wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm™ ECL) verwendet, der für eine bestimmte Zeit exponiert wurde.

Antikörper	Anti-HA	(1 : 1.000 verdünnt)
	Anti-c-myc	(1 : 5.00 verdünnt)
	Anti-GFP	(1 : 1.000 verdünnt)
	Anti-Mouse	(1 : 5.000 verdünnt)
Blockierungslösung	5 % Magermilchpulver in TBS-T 1x	

Entfärberlösung	5% Essigsäure 5% Methanol
Farblösung	17 % (v/v) Essigsäure 42 % (v/v) Methanol 0,1 % (w/v) Serva-Blau G250
Methanol	100%
Transferpuffer 10x	1,9 M Glycin 10 % (v/v) Methanol 0,1 % SDS 0,25 M Tris pH wurde auf 8,3 gestellt.
Waschpuffer 10 x	1,37 M NaCl 0,2 M Tris Der Waschpuffer wurde mit HCl auf pH 7,6 eingestellt und danach autoklaviert. Vor jeder Benutzung des 1x Puffers wurde 0,1% (v/v) Tween 20 zugesetzt.

2.8.4 Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität

Die Enzymaktivität der β -Galactosidase kann mit dem Substrat o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG) photometrisch durch einen Farbumschlag bei $\lambda = 420$ nm in zellfreien Extrakten gemessen werden (Miller, 1972; Ausubel *et al.*, 1997). 2 ml der Zellkultur wurden geerntet und das Pellet in 2 ml Z-Puffer resuspendiert. Zu 0,5 ml der in Z-Puffer gelösten Zellen wurden 10 μ l SDS und 10 μ l Chloroform zugegeben und 15 Sekunden gevortext. Dann wurde die Suspension für 5 min bei 28°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,1 ml ONPG-Stammlösung. Die so gestartete Reaktion wurde für mindestens 2 min aufrechterhalten und dann mit 0,5 ml Natriumcarbonat-Lösung 1 M gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde für 3 min bei 13.000 Upm zentrifugiert und der Überstand bei λ_{420} bestimmt. Die Enzymaktivität wurde nach der unten stehenden Formel in Miller Units (MU) berechnet.

$$\text{MU} : \frac{\text{OD}_{420} \times 1,7 \times 1.000}{\text{OD}_{600} \times V \times t}$$

OD_{420} : Extinktion des ONPG bei $\lambda = 420$ nm

OD_{600} : Extinktion der Zellsuspension in Z-Puffer bei $\lambda = 600$ nm

1,7 : Korrekturfaktor für das Reaktionsvolumen

V : Probenvolumen (ml)

T : Reaktionszeit (min)

Z-Puffer pH 7,0	10 mM KCl 1 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O 60 mM Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 40 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O β-Mercaptoethanol 50 mM (frisch zugeben)
ONPG-Stammlösung	13,3 mM (o-Nitrophenil-β-D-Galactopyranosid) in Puffer Z
Natriumcarbonat	1 mM Na ₂ CO ₃
Sodium-Dodecyl-Sulphate	0,1 % (w/v) SDS
Chloroform	unverdünnt

2.9 Programme für die Analyse von Sequenzen

Für Nukleotid- bzw. abgeleitete Aminosäuresequenz-Analyse wurde zuerst die gesamte Sequenz des Ylt1 Retrotransposons mit verschiedenen Auswerte-Programmen analysiert. Die LTR-Sequenz wurde auf ihren Gehalt an Motiven mit Promotorcharakter analysiert. Dafür wurde das BCM search launcher tool (<http://www.searchlauncher.bcm.tmc.edu/>) benutzt (Reese und Eeckman, 1995). Der Startpunkt der Transkription wurde mit dem Signal Prediction und AUG Evaluator tool von WEBGENE (<http://www.itba.mi.cnr.it/webgen/>) analysiert (Rogozin *et al.*, 2001). Die Aminosäure-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programmes ClustalX 1,81 (Thomson *et al.*, 1997) miteinander verglichen und mit dem Programm Genedoc weiter bearbeitet (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>). Sie wurden mit dem Protein-Datenbank mit Hilfe von BLAST verglichen (Altschult *et al.*, 1997). Zur Bestimmung der Verwandtschaft des Retrotransposons Ylt1 mit anderen Retrotransposonen und Retroviren wurde ein phylogenetischer Baum mit Hilfe von Programmen PROSITE (Falquet *et al.*, 2002), PHYLIP (Felsenstein, 1993) und TreeView (Page, 1996) dargestellt. Die Accession-Nummern der in dieser Arbeit zum Vergleich benutzen Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen von Retrotransposonen und Viren sind in Tabelle12 aufgeführt.

Tabelle 12: Accession-Nummern für die Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen der Retrotransposonen und Viren von verschiedenen Organismen. Adresse für Retrobase: <http://biocadmin.otago.ac.nz/retrobase/home.htm>

Retrotransposonen und Viren	Organismen	Accession-Nummer	Referenz
CfT-1	<i>C. fulvum</i>	Z11866	McHale <i>et al.</i> (1992)
Cgt1	<i>Glomerella cingulata</i>	L76205	He <i>et al.</i> (1996)
Copia	<i>D. melanogaster</i>	X04456	Mount und Rubin (1985)
del1-46	<i>A. thaliana</i>	AE005172	Theologis <i>et al.</i> (2000)
gypsy	<i>D. melanogaster</i>	AF033821	Petropoulos (1997)
HIV1	<i>Humanes Immundefizienzvirus 1</i>	NC_001802	Petropoulos (1997)
HIV2	<i>Humanes Immundefizienzvirus 2</i>	NC_001722	Gonda (1988)
L1Hs	LINE des Humangenom	AC145435	Lander <i>et al.</i> (2001)
L1Ms	<i>Mus musculus</i>	P11369	Loeb <i>et al.</i> (1986)
LTRsu1	<i>S. bayanus</i>	AJ316069	Bon <i>et al.</i> (2000)
Mag	<i>Bombyx mori</i>	X17219	Miclaille <i>et al.</i> (1990)
MAGGY	<i>M. grisea</i>	L35053	Farman <i>et al.</i> (1996)
Micropia-Dm11	<i>D. melanogaster</i>	X14037	Lankenau <i>et al.</i> (1988)
Osser	<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>	S32437	Lindauer <i>et al.</i> (1993)
R1Bm	<i>B. mori</i>	M19755	Xiong und Eickbush (1988)
Skipper	<i>D. discoideum</i>	AF017040	Leng <i>et al.</i> (1998)
Skippy	<i>F. oxysporum</i>	L34658	Anaya und Roncero (1995)
SpTy5	<i>S. paradoxus</i>	U19263	Zou <i>et al.</i> (1996)
Sushi	<i>Takifugu rubripes</i>	AF030881	Poulter und Butler (1998)
Ta1	<i>A. thaliana</i>	S05465	Voytas <i>et al.</i> (1990)
Tad1-1	<i>N. crassa</i>	L25662	Cambareri <i>et al.</i> (1994)
Tca3	<i>C. albicans</i>	AF510498	Goodwin <i>et al.</i> (2003)
Tca4	<i>C. albicans</i>	Retrobase	Adresse siehe Legende
Tca5	<i>C. albicans</i>	AF065434	Plant <i>et al.</i> (2000)
Tca8	<i>C. albicans</i>	AF142436	Goodwin und Poulter (2000)
Tcd3	<i>C. dubliniensis</i>	AF499464	Goodwin <i>et al.</i> (2003)
Tdh2	<i>D. hansenii</i>	AJ439551	Neueglise <i>et al.</i> (2002)
Tdh5	<i>D. hansenii</i>	AJ439552	Neueglise <i>et al.</i> (2002)
Tf1	<i>Sz. pombe</i>	M38526	Levin <i>et al.</i> (1990)
Tf2	<i>Sz. pombe</i>	L10324	Levin <i>et al.</i> (1990)
Tkm1	<i>K. marxianus</i>	AJ439546	Neueglise <i>et al.</i> (2002)
Tnt1	<i>Nicotiana tabacum</i>	S04273	Grandbastien <i>et al.</i> (1989)
Tom	<i>D. ananassae</i>	Z24451	Tanda <i>et al.</i> (1994)
Tpa5	<i>Pichia angusta</i>	AJ439553	Neueglise <i>et al.</i> (2002)
Tsk1	<i>S. kluyveri</i>	AF492702	Neueglise <i>et al.</i> (2002)
Tse1	<i>S. exiguus</i>	AJ439547	Neueglise <i>et al.</i> (2002)
Tsu4	<i>S. bayanus</i>	AJ439550	Neueglise <i>et al.</i> (2002)
Ty1	<i>S. cerevisiae</i>	Z48149	Boeke und Sandmeyer (1991)
Ty2	<i>S. cerevisiae</i>	S69966	Boeke und Sandmeyer (1991)
Ty3	<i>S. cerevisiae</i>	M23367	Hansen <i>et al.</i> (1988)
Ty4	<i>S. cerevisiae</i>	X67284	Janetzky und Lehle (1992)
Ty5	<i>S. cerevisiae</i>	X59720	Zou <i>et al.</i> (1996)
Yli	<i>Y. lipolytica</i>	AJ319752	Casaregola <i>et al.</i> (2002)
Ylt1	<i>Y. lipolytica</i>	AJ310725	Senam und Barth (2002)
17,6	<i>D. melanogaster</i>	X01472	Saigo <i>et al.</i> (1984)
297	<i>D. melanogaster</i>	X03431	Inouye <i>et al.</i> (1986)
412	<i>D. melanogaster</i>	X04132	Yuki <i>et al.</i> (1986)
1731	<i>D. melanogaster</i>	X07656	Fourcade-Peronnet <i>et al.</i> (1988)

3 Ergebnisse

3.1 Sequenzierung des Retrotransposons Ylt1

In dieser Arbeit sollte die vollständige Sequenz des Retrotransposons Ylt1 ermittelt und eine partielle molekulare Charakterisierung der Transkriptions- und Translationsprodukte vorgenommen werden. Das Retrotransposon Ylt1 der Hefe *Y. lipolytica* wurde zuerst im Stamm B204-12C-112 detektiert (Schmid-Berger *et al.*, 1994).

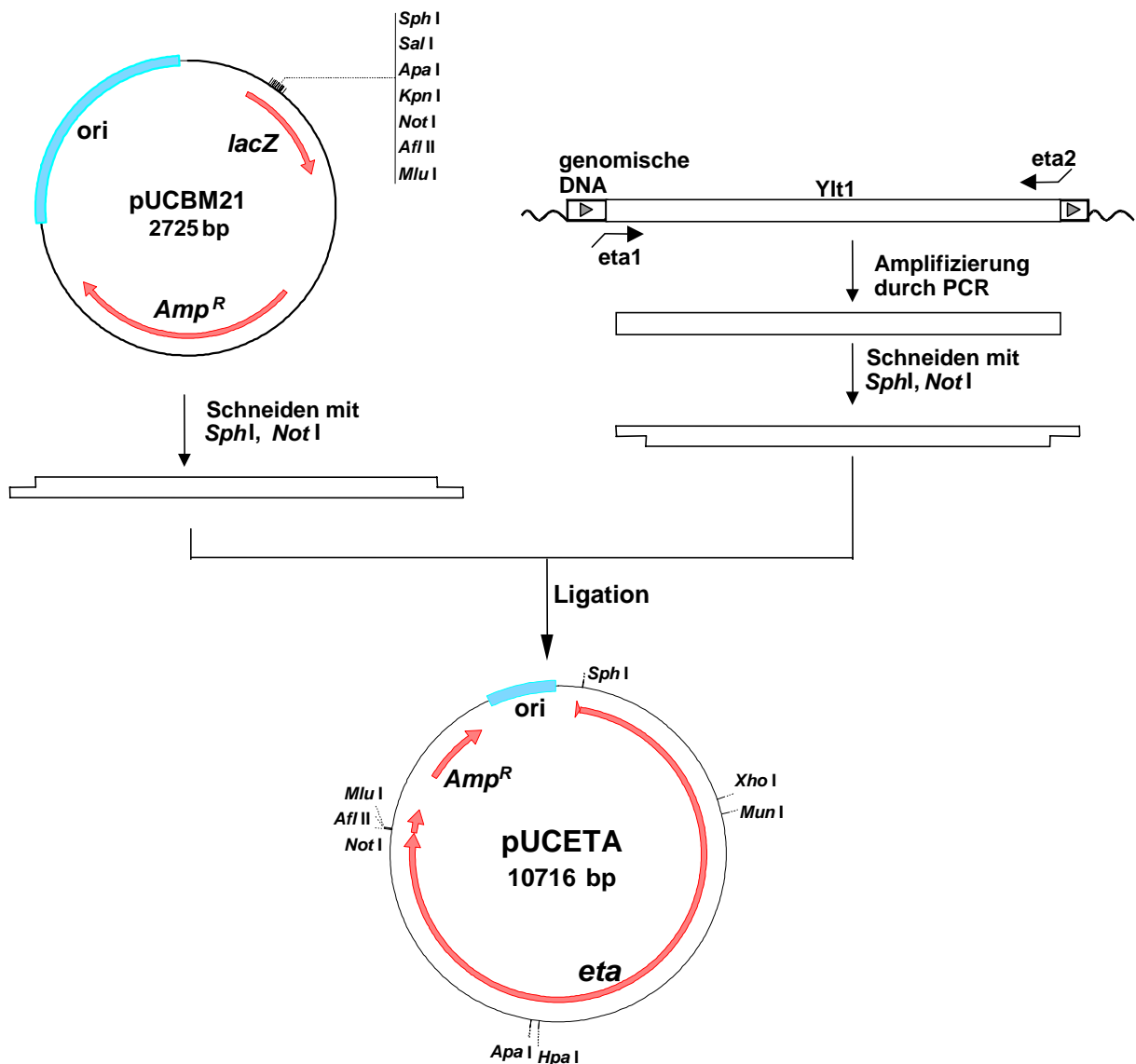


Abbildung 7: Strategie zur Klonierung des *eta*-Bereiches des Retrotransposons Ylt1. Der *eta*-Bereich wurde mittels PCR (Primer *eta1* und *eta2*) aus dem Stamm B204-12C-20 amplifiziert. Die Primer für die Amplifizierung enthielten bereits die Schnittstelle für die Restriktions-Enzyme *SphI* und *NotI*. Danach erfolgte der Verdau der PCR-Produkte mit diesen Enzymen. Das geschnittene DNA-Fragment wurde in den ebenfalls mit *SphI* und *NotI* geöffneten Vektor pUCBM21 integriert, wodurch der Vektor pUCETA entstand. Zur Einführung eines HA-Tags (zwischen *XhoI* und *MunI*) und eines c-myc-Tags (zwischen *HpaI* und *ApaI*) in den ORF des *eta*-Bereiches wurde nach dem *SphI* Ort direkt vor dem Startcodon ATG ein *PacI* Ort eingeführt (vgl. 2.7.2, Abbildung 37 und 46).

Dieses Retrotransposon besteht aus einem internen Bereich, der als *eta* bezeichnet wird und wird an beiden Seiten von identischen LTRs begrenzt, die als *zeta* bezeichnet werden. Die Sequenzen mehrerer LTRs, sowohl von kompletten Kopien des Retrotransposons als auch von singulär auftretenden LTRs, waren bereits bekannt (Schmid-Berger *et al.*, 1994), die Sequenz der internen Region *eta* dagegen noch nicht vollständig bestimmt (Barth, persönliche Mitteilung).

Für die Isolierung des Retrotransposons Ylt1 wurde der Stamm B204-12C-20, der mit dem Stamm B204-12C-112 eng verwandt ist, ausgewählt, weil er im Gegensatz zu B204-12C-112 auf Acetat als C-Quelle wachsen kann und zusätzlich eine *leu2*-Mutation aufweist. Die *leu2*-Mutation kann als Marker zur Selektion von Transformanten verwendet werden. Für die Amplifizierung des *eta*-Bereiches mittels PCR wurde die genomische DNA aus dem Stamm B204-12C-20 präpariert. Mit Hilfe der Primer *eta1* und *eta2* (siehe Tabelle 4) konnte ein ca. 8 kb großes DNA-Fragment amplifiziert werden. Die Primer wurden so konstruiert, dass sie die Schnittstelle für die Restriktions-Enzyme *SphI* und *NotI* enthalten. Das erhaltene PCR-Fragment wurde über die *SphI* und *NotI* Schnittstelle in den *E. coli* Vektor pUCBM21 kloniert (Abbildung 7). Es wurden danach zwei unabhängig gewonnene Klone mit Hilfe der Primern SP1 - SP15, SP1rev - SP15rev, rev-29 und uni-21 (vgl. Tabelle 4, rev: revers) durch „Primer-Walking“ vollständig sequenziert (Abbildung 8 und 9).

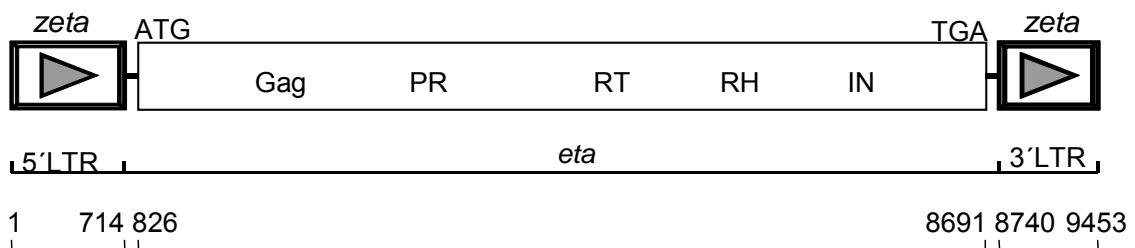


Abbildung 8: Die Struktur des Retrotransposons Ylt1. Das Retrotransposon Ylt1 besteht aus dem *eta*-Bereich und wird an beiden Enden durch jeweils eine *zeta*-Region begrenzt. Der durchgehende Leserahmen dieses Retrotransposon reicht von 826 bp bis zur Position 8691 bp. *zeta*: LTR Bereich (LTR: lange terminale Sequenz-Wiederholungen, *long terminal repeats*), *eta*: interner Bereich, ATG: Startcodon (826 bp), *gag*, *PR*, *RT* und *IN*: jeweils Kodierungsbereich für ein Gag-Strukturprotein, eine Protease, eine reverse Transkriptase, eine RNase H und eine Integrase, TGA: Stopcodon (8691 bp).

Die Grundstruktur des Retrotransposons Ylt1 und seine vollständige Sequenz sind in den Abbildung 8 und 9 dargestellt. Die ermittelte Nukleotidsequenz ergab, dass die *eta*-Region des Retrotransposons Ylt1 aus 8025 Nukleotiden besteht. Da die LTR Regionen an den flankierenden Enden 714 Nukleotiden lang sind, ergibt sich somit für das Retrotransposon Ylt1 eine Gesamtsequenz von 9453 bp. Das Retrotransposon Ylt1 hat einen einzigen langen ununterbrochenen offenen Leserahmen (von Position 826 bis 8691 bp).

2281 - TTTGAAAAGTATCTATCGCCTGTTGATGCTGACTTCCCTCTAAAACAGAGCGCTCTCTAC
F E K Y L S P V D A D F P L K Q S A L Y
2341 - ACTTCCTGGAAGCAGAAGGAATGGTCAATCCGCTTATGGAGCCTAGACTTCAACTTTC
T S W K Q K E W S N P L M E P R L R T F
2401 - AATGCGCAGTGGCGTCTCTGCCCTAGCTGGCCGCGTAAATGCCGTTGAATTTGTACACGTT
N A Q W R P A L A G R V N A V E F V H V
2461 - GAAGACCCAGGCGGGCCTTTGGATAACAGCTATGACTCTGACTCATCTGCGTCTGGTTAT
E D P G G P L D N S Y D S D S S A S G Y
2521 - GACTTCCAGGACCTTCTCCAACCCGCGCAGTTCAGTGTCTGTCTAGGAGGGGTGCCTCGA
D F Q D L L Q P G T F S V C L G G V P R
2581 - GATCTTCTGTCTGATACGTTTTCCTCCTACGACGAGCCTCGCACTATCATTGACTCCACT
D L L S D T F S S Y D E P R T I I D S T
2641 - GACTCCCAGCTTGAGCTCACGAAAGAGGCAATCCACCAGCACATTCTCCAGATGGCAAAA
D S Q L E L T K E A I H Q H I L Q M A K
2701 - CAGCCACACCCCTCCCCGTCACCTACGCAATTGATGCGCCTGTGTGAGGCTCCTACAGT
Q P T P L P V T Y A I D A P V S G S Y S
2761 - GGCAACATGAAGCGCCTTGTGGCACACCCAGCCTTCATGCAGCTCGTAGCTCGCTTAACT
G N M K R L V A H P A F M Q L V A R L T
2821 - GCTCCCCCGGGCAGTTCAAAGCCTCCACGCTTGAAGCGGGTTTTGTAGGTGCTGTTATG
A P P G T F K A S T L E A G F V G A V M
2881 - GCCCGTCTTCCCCAGTTGCCGGCCGTGTCTACTTTGTTGATGCGGTCCAGCGATTGCTC
A P S S P V A G R V Y F V D A V Q R L L
2941 - AACAAGTACAACGTAGTATTGCCACGAAGCTTTACGAGTGTTCGCTACAGTCCGAAAT
N K Y N V V L P T K L Y E C F A T V R N
3001 - GACCTCATGGAGCCCGCTTACGCCACEGAAGGCGATCCTCGCCGACAGTCTCTCAAGACC
D L M E P A Y A T E G D P R R Q S L K T
3061 - AACATCAACCCCTTGAAAACCTTGTGTCGACGCAAGCACCCCTGACAGACCAGTGGCTCCG
N I N A L K T V V D S K H P D R P V A P
3121 - TTGCCGCGACGACGCCCCCGTCTGTGATGTCCGTGAAGACATGCCCCCGCTGCTTTGCCT
L P R R S P R R D V R E D M P P P A L P
3181 - CAAGCGACAAAAACGTGGTGCCGCTTCTTCTACGGTATCTTCCGCTGCTCCCCCACTGCT
Q A T K R G A A S S T V S S A A P P T A
3241 - AAGCGAACCAAGGCTGTAGCCAATCCCTCCTCAGTGGGGCCGACTGACTCCGCATCCTCC
K R T K A V A N P S S V G P T D S A S S
3301 - ACGGGCGCTGTTGTTGACGTCCCAGCTCTCGTGTGGCTGTTACCCCCCGCTCTGGGT
T G A V V D V P S S R V A V H P P R L G
3361 - GATAACCACTACGTGAGCCCTGGAACCCGTGTCACCAACCACATCCACGATGCCTCTGCC
D N H Y V S P G T R V T N H I H D A S A
3421 - GTTGCGGAGAATGCACCCTTAAAAGATTACAAGGATGCTCTGGACCGCCTCCCGTCTGAC
V A E N A P L K D Y K D A L D R L P S D
3481 - CTAGAGGACTCCAAGGCTCTCTTACCAGAGATCATCCTCGTTACGACAATGCCTTGCTG
L E D S K A L F T R D H P R Y D N A L L
3541 - AAGGCTGGGCGTCTCCCTCTTCAAGCTTGAGGCCATTGCTGCTGCGGAAATCGGAA
K A G R L P L F K L E A I H A L P E S E
3601 - AAAGCAGACTTGTGTTGAGCGCATCCTCAAGGCGTGGATGTTGATGGCCTCGTCTTTTT
K A D L F E R I L K A S D V D G L V L F
3661 - GAGCTTCTCCAGGTGTGCCCTGACCTCACAAAGTACATTTGGAAGAACTTCCGTCACCAG
E L L Q V C P D L T K Y I W K N F R H Q
3721 - CGGCACCGGCTTGGGGTCCGACATCCAAGCCATCGCTCTTGAGCTCGGGGACGATCTC
R H R L A G P D I Q A I A L E L G D D L
3781 - ATGGAGTGTGCCATGGATCTTGCCTCAACGTGATTTTCGTCCACACCGTATGAGCTCAAC
M E C A M D L A L N V I S S T P Y E L N
3841 - TCTGGACCTTCCGGTCTTTCAGGAGTTTTTACCACCATTGACCGTCAGCTGTACGAC
S G T F G R L Q E V F T T I D R Q L Y D
3901 - GACAAAAGTTGGTAGGCCACTCTCGCCCCACTTACCAGACAACATTGCTCTTTTCGACCAA
D K V G R P L S P H F T D N I A L F D Q
3961 - CAGACCAGCGCCCTTTTTGACAGTGGCTCGTCTAACAACGTCATCGACTGATTTCTTT
Q T S A L F **D S G** S S N N V I D T D F F
4021 - GCCCTTGTACTCGGAAGGCTGGTGTACCCCTGACCGGTGATTGTTTTTCTGACGGA
A L V L A K A G V T P D R V I V F S D G
4081 - CAGTCCCACGCCACAGTCGCAAACGGAGCCAAGGTAAGTTGATTTCTGGGCGCTTCTC
Q S H A T V A N G A K V K V D F W A L L

DSG

4141 - CCTGTCACTTTCTGGGTGTCGTTACTCTTGAAACATTTTGTGTCATGAAGTGCAGCATG
P V T F L G V V T L E T F C V M K C S M
4201 - AAGTGTATTCTCGGCACCGGATACATCAGCAAACCTGCGCATTTCGTTTCGACCATGATCGT
K C I L G T G Y I S K L R I S F D H D R
4261 - TACCGTGTGCTTCAGTGGAGAACCCCTGGTAACCCCTGGCGTCCGGTGTACCCTAGTGAC
Y R V A S V E N P G N P G V R C Y P S D
4321 - AGACCTTCAGCTGGCCTTGTGCTCACCTGGGTTGCTTGACCGTCTTGTGAGGCCCGGC
R P S A G L V A H L G L L D R L V R P G
4381 - CGCCGGCCTGTGCCTGCGTTTCTGCTGCCAAGCTGTCTGCCAAAACGTCATGGCACAC
R L P V P A F P A A K L S R Q N V M A H
4441 - GTTCGACCCACTCCCTCACTCTGTGGTGATGTTGATGAAGCAACAAATCTCCTTGACGCC
V R P T P S L C G D V D E A T N L L D A
4501 - TCATCTCTCGGAGGGCCTCAGCCTGGATCTTACTCCCACCGTTCTGAAACAGCGGCAGGC
S S L G G P Q P G S Y S H R S E T A A G
4561 - TGTTTTGCCATATCCTTTGCTGATGACTGTGAGTCTGCCGGCCCGCCTTCGAGCGCTGCC
C F A I S F A D D C E S A G P P S S A A
4621 - ACCGCCATTCTCAAGGCTTAGCGTCCAGCTCCGGCCCTGATCCCCTTGGCATTCCCCCT
T A I L K A L A S S S G P D P L G I P P
4681 - CGTGATGACCTGACGAGTCTTACTCCTCATCACCTGGGCACCACGGTGATGTCTCTGGC
R D D P D E S Y S S S P G H H G D V S G
4741 - GAGCCCAACTCCTCATCACCTGGGCACACCTCCGCTCCCGTCCGACGGTACGCTTGGACCT
E P N S S S P G H T S A P V D G T L G P
4801 - TTA CTGCCTACCGATGCCTCATCTGTGGATGACTCCAACGAGCTCTGCTCCTCCTCTTCA
L L P T D A S S V D D S N E L C S S S S
4861 - GGCTCGGAAGCCCCGTCGGAAGCCCCGTCCGGAGTCTCGGCCCGCCTTGTGAGATGTAGGC
G S E A P S E A P S G V S A A L S D V G
4921 - ACCGTTTTCCAGGAGACTACACGTCGTACCGTTTTCCATGACAACCTTGCAGACAATGCT
T V F Q E S Y T S Y R F H D N L A D N A
4981 - CTTTCATGCCAGACCCCCGACGCTCATGCTCTCAGTGGTTTTTATTTCTTCTGCCACCTC
L H A R P P D A H A L S G F I S S A D L
5041 - GACAGTGTTTTTCCAGTATCCACCTCCTGCATCGCCCTGCAGCTGCTGCCAGCAGCCTGTA
D S V F Q Y P P P A S P C S C C Q Q P V
5101 - CGTGAGTGTGCTGTA CTTGGTAACACTGTTTTTCATCATGGCTGACATTGGCGACTCGGCT
R E C R V L G N T V F I M A D I G D S A
5161 - ACCATCGTTCAGGTTCAACCGGATACTGACCTGTCCATGCGCCAACAGCTCTACCTTGCT
T I V Q V Q P D T D L S M R Q Q L Y L A
5221 - GAAGTTCTCAGTGATGCCCAAGAAATCACCCCTGAAGACTCTCTGCATTCTTTATCTGTC
E V L S D A Q E I T P E D S L H S L S V
5281 - TCCGTC AATGCCATGTACAAGCCGTACACAAGCGTTCTCTGCCTCTAAATAAGCTTCGC
S V N A M Y K P L H K R S L P L N K L R
5341 - CCGGACGGTTCTTTCTGTCGGTGACGGCTCCAAGCCTTCTCCGCGACATCGCAACTTC
P D G G S F P V G D G S K P S P R H R N F
5401 - TCTGCGACGAGTCTTGCCAAATTTGATGCCAAACTTGCTCCAGTCCCTTTCCCGGCCGAG
S G D E S C Q F D A K L A P V L F P A E
5461 - CTTGCTCTCTGTCGCCATCGCATGTGCGACACGGAGGGTGTCTGGGCTTTCAACGAAGAC
L A L C R H R M S D T E G V W A F N E D
5521 - CAGGAGGGTGTCTCAGTCACCATATTGAGGAGCCCACCAAGATCTACGTGGAAGAGGGA
Q E G V L S H H I E E P T K I Y V E E G
5581 - GGCGTTATCAACTCAAAGCACTTCCCTCTCCGCGGGGCTATGGTCCGCGCTGCCAAAGAC
G V I N S K H F P L R G A M V G A A K D
5641 - ATCATCATGAAGGGTCTCGCCAACGGCCAGATGGAGCCAGCTCCTCCCCCACC GCAAC
I I M K G L A N G Q M E P S S S P H R N
5701 - GCCTGGTTCTCTGAGCAAAAAGAGCTCGGGATACCGTTTTATCCTTGACTGCCAGGGC
A W F L V S K K S S G Y R F I L D C Q G
5761 - CTCAACAAGATCACCTTGAGAGATGCTTTCCACCCACCCAACGCGGACCTCCTGGCTGAG
L N K I T L R D A F H P P N A D L L A E
5821 - AGTTTCTGTGGTCTGCTGTAACCTCCCTGCTTGACATTAAGAATGGTTACGGTCAGAAG
S F C G R A V T S L L D I K N G Y G Q K
5881 - GAGATTGCTCCCGAGTCCCGTGACTTGACGGCTTTTAACACAGATTTTGGCTCCTATCGG
E I A P E S R D L T A F N T D F G S Y R
5941 - TTAACGCGCCTGCCTCAAGGTTGGTGCAACTCTCCAGCGGTGTTCCACCGTCCATGCTG
L T R L P Q G W C N S P A V F H R A M L

6001 - CGCGTACTTGGGCCCTCTTTCCGGATCAGGCTGTTGTTTTCTTGGACGATATTGGCGTT
R V L G P L F P D Q A V V **F L D D I** G V **FLDDI**

6061 - CTCGGGCTAAGACTGACTATGGCGGAGCCATGCATGACGACTTTCCGGGCTGCCGCCGG
L G P K T D Y G G A M H D D F P G C R R

6121 - TACATCGTCGAACACATGGACAACCTCATGGCTGTGCTTCAGAATCTCTATGAAGCGGGT
Y I V E H M D N L M A V L Q N L Y E A G

6181 - CTGACTGTGTCTTTCGACAAGGCCGAGCTTTTCGTCAGTGAGGCTGAGTTCCTCGGTTTC
L T V S F D K A E L F V S E A E F L G F

6241 - CTCACTACCTGAAGGCCGCTTCCCCTGCCAGTTCGAGATCCGAGAAGATCGAATCTTTC
L T T S E G R F P S P G S S E K I E S F

6301 - GAGTTCCCACTACTGTCCGTGGTGTGCGCTCTTTTCTCGGTGCTGTGGTGTATTTTCGC
E F P T T V R G V R S F L G A V V Y F R

6361 - ATGTGGATCCCTCATTTTCAGCAGTATCGCTGCACCTCTGTACGACTGCATCTCCGCTGCG
M W I P H F S S I A A P L Y D C I S A A

6421 - CAGAAGGCTGGCAAACCTCAAGATCACCAAGACCGAGGCCACCGAGTCTGCTTTTATGGCG
Q K A G K L K I T K T E A T E S A F M A

6481 - CTA AAAAAGGCTATGGTGAGCCCTGCGGTTCTGCACCGCTACGACCCACCTTACCTATT
L K K A M V S P A V L H R Y D P T L P I

6541 - GTCATCACCCTGATGCGTCCCTCCCTCGGATGGGGCGCAGTAATGTCTCACATCGTCAGT
V I T **T D A S** S L G W G A V M S H I V S **TDAS**

6601 - GTTGGCCCTCCGGCTGCCCGTCCGCCCGTCCGTTTCGAGAGTGGTTTGTGGAACCCCACT
V G P P A A R R P V R F E S G L W N P T

6661 - GAGCGTACCTACGCATCCACCAAGACTGAGTGCCTTGCTGTAAAACGTGCCTTGGAGAAG
E R T Y A S T K T E C L A V K R A L E K

6721 - TGCCGTCACTATGTCACTGGCGTTCATTTTCGTGATCGAAACTGACAACCAGGCCCTGGTT
C R H Y V T G V H F V I E T D N Q A L V

6781 - TTCCTACTGCAGCAATCCCGAGTTGAACTCCCTAACGCTATGTTACCCGGTGGTTTGCT
F L L Q Q S R V E L P N A M F T R W F A

6841 - TACATCAAACAGTTTGATTACGAGGTTTCGATTTGTTAAAGCCGAGACAATCCAGTGGCC
Y I K Q F D Y E V R F V K G R D N P V A

6901 - GATTGGCTGAGTCGTGAGAAAATTTTCTGACTTCCGACCTGTGATTTTCGCCCTCCTGTT
D W L S R E K F S D F R P V D F R P P V

6961 - GCTGATACAGCTCGACAAGCTGATGAGCTTGCTCCGCTTGTCGCCCCGACTTGGTCCCCT
A D T A R Q A D E L A P L V P P T W S P

7021 - GTGGCCTCCATCACTGTCTGTCCATTGGTCCAGAGCCCGTTTTTCATCCACAAAGGCATC
V A S I T V L S I G P E P V F I H K G I

7081 - TCTCTCGATCTCATTTTCACCACCATTCGCTCCGGCGATCTTGATCGAGATGGTGTGAC
S L D L I F T T I A S G D L D R D G V D

7141 - ATTCCGCCTAGACTGCGTCAAATCTGCTCTGAGTTCCTCATTTTTGACGACATTCCTCTA
I P P R L R Q I C S E F F I F D D I L L

7201 - CTGATCAGCTCACCTGGTCTCCATCGACGTGTTCTCTTCACAGAGAAGGAGGTGTCTGAG
L I S S P G L H R R V L F T E K E V S E

7261 - GTTCCCGACTACCCATGAACAATATGGCCACCGGCTGCTGCTGCCATCCTTCATGCT
V L R A T **H E Q Y G H R G A A A I L H A** **H H**

7321 - CTCCGTCGCTCTATTACTGGCCGGGCATGGCTGATCACGTGAAGTCCCATCGTGCATCA
L R R L Y Y W P G M A D H V K S H R A S

7381 - TGCGGCACGTGTGCAAAAAGCCACCAACCATGGTCTTCTCAAGGCGAGTCTCCACTTCGTG
C G T C A K A T N H G L L K A S L H F V **C C**

7441 - GTTCCCCGTTCTCATTTGGGAGACAGTCCAGCTGGACATCCTCTACCTTCCCGCTGTTTAT
V P R L I W E T V Q L D I L Y L P A V H

7501 - GGTCCACCAAGGAGTACCCCGATCTGGCTGATCCCGCCAAGGCTCTCGCTGCTCAAACC
G P T K E Y P D L A D P A K A L A A Q T

7561 - ACCCTCACCGACTTCTCCCACTGCCCTCAGTTCAGTACTGATGTTTCTCTGCCCCCCGC
T L T D F L P T A P Q F T D V S S A P R

7621 - GGACGGCTAAATGTCACTATTGCCCCCTACCAGTATGTCCTTGTGCTCGTGTGATGAATTC
G R L N V T I A P Y Q Y V L V A R D E F

7681 - TCTGGCTGGCTGAGGCGGTGCCCTTACGAAGTATCAACTCTCTCTCCACAGCCGCTTTC
S G W P E A V P L R S I N S L S T A A F

7741 - TTCTACGATTTTCATCATTGCTCGTTTTGGCGTTCCCCGTCGGTCTACACTGACGGTGGT
F Y D F I I A R F G V P R R V Y T D G G

7801 - AGTGAGTTCAAGGGTGATTTTAAGCATCTCTGCGAAGATTTCCACATCAAGCAGGTTTTTC
S E F K G D F K H L C E D F H I K Q V F

```

7861 - ACCACTCCTGCTCATGGTCAATCGACTGGCATTGTGGAACGCGGTCACCAAACCTCCTC
      T T P A H G Q S T G I V E R G H Q N L L
7921 - CACTGCCTGCGCAAATACGGTCTGTCAGTGGATCTTATACCTCCACACCGCCCTCTGGGCT
      H C L R K Y G R Q W I L Y L H T A L W A
7981 - GACCGGTGCACCCGTCGTTTCATCCACGGGTAAGTCACCTTTTGAGCTGATGTATGGTGTG
      D R C T R R S S T G K S P F E L M Y G V
8041 - TCTGGTGTCTTGCTGTCGAAAGTCGTTTCCTGACCTGGAATTACCTCAGTGGCAAGACC
      S G V L P V E S R F L T W N Y L S G K T
8101 - GACCTGGCCACAACGACCCGCTCATGCTGCTTTTCTGCGCACCTTGCAACTTGCTGCT
      D L A H N D P A H A A F L R T L Q L A A D
8161 - TCTACTTTCGAAGTTGGCTCTGCTCGTGACCACCTGACCCTGCAACGCCAGCGTCAAAAG
      S T F E V G S A R D H L T L Q R Q R Q K
8221 - GCGTTCTACGACAAAACATCACAACACAGCTGATACAGATCCCTTGGCCGTAATGATTTTC
      A F Y D K H H N T A D T D P L A V N D F
8281 - GTTTTTGTTACGACCTCCGTCACCAACAAGCTGACTCCTCGTTGGACTGGTCCCTCC
      V F V H D L R P H N K L T P R W T G P S D
8341 - ATCGTGACCGCGTGTACCCCTGAGACCAGCACGTACACTGTCAACGATGTTGACGGTGAG
      I V T A C H P E T S T Y T V N D V D G E E
8401 - AACCCGCGGCGTATCCACCGCAACCGCCTCAAGTTTTCCACCCGCTTCCATCGTTGAG
      N P R R I H R N R L K V F H P A S I V E
8461 - TTCCAGGACCGCATGAAGGAACATCAGTCCCGCGAGTCTGCTCTCCCTGCCATTCCCTGGC
      F Q D R M K E H Q S R E S A L P A I P G
8521 - CGCTTTTCTGCCTGTTCTCCACATGTTCTTCCCCGGCTTTCAGTGGCTACTCGTTCGGTC
      R F S A C S P H V L P P A S V A T R S V
8581 - CGTTCTGCAGTACCCTGCGTGCAGTACTAGAGTTACTTCTCGGTGGAAGCTCGCTCGTGT
      R S A A T T A S T R V T S R S K L A R V
8641 - GATTCTGGGCTTGTCTAGGGCTCCTTCCCTTGTCTCAGGGCCTTTATTCTTGAATCTTCTAA
      D S G L A Q G S F L A Q G L Y S -
8701 - CCAGGGCTTCGGGACGAAACCCCGTTAGACCTGGGCAGGTGTAACACTCGCTCTGGAGAG PPT
8761 - TTAGTCATCCGACAGGGTAACTCTAATCTCCCAACACCTTATTAACCTCGCGTAACTGTA
8821 - ACTCTTCTTGCCACGTCGATCTTACTCAATTTTCTGCTCATCATCTGCTGGATTGTTGT
8881 - CTATCGTCTGGCTCTAATAACATTTATTGTTTATTGCCCAAACAACCTTTCATTGCACGTAA
8941 - GTGAATTGTTTTATAACAGCGTTCGCCAATGCTGCGCCATCGTCTCGGCTGTCTTAC
9001 - CGTTAGGGGTAGTGTGTCTCACACTACCGAGGTTACTAGAGTTGGGAAAGCGATACTGCC
9061 - TCGGACACACCACCTGGGTCTTACGACTGCAGAGAGAATCGGCGTTACCTCTCTCACAAA
9121 - GCCCTTCAGTACCGCCGCTGTGCGGAACCGCGTTCAGGTGGAACAGGACCACCTCCCTT
9181 - GCACTTCTTGGTATATCAGTATAGGCTGATGTATTCATAGTGGGGTTTTTCATAATAAA TATA,
9241 - TTACTAACGGCAGGCAACATTCACCTCGGCTTAAACGCAAAACGGACCGTCTTGATATCTT AATAAA
9301 - CTGACGCATTGACCACCGAGAAAATAGTGTTAGTTACCGGGTGAGTTATTGTTCTTCTACA
9361 - CAGGCGACGCCATCGTCTAGAGTTGATGTACTAACTCAGATTTCACTACCTACCCTATC
9421 - CCTGGTACGCACAAAAGCACTTTATTTTCTCACA

```

Abbildung 9: Die Nukleotidsequenz des Retrotransposons Ylt1. Die *zeta*-Bereiche sind unterstrichen. Regulatorische DNA-Sequenzen sind rot und konservierte Motive in der Aminosäuresequenz blau markiert. Im LTR-Bereich befindet sich das Transkriptionssignal (TATA-Box), das Terminationssignal der Transkription (TATG) und das Polyadenylierungs-Signal (AATAAA). Die Primer-Bindungsstelle (PBS) (TGGTGGACG) liegt downstream des 5'LTR und der Polypurin-Bereich (*polypurine tract*, PPT) (TGGGCAGG) wurde upstream des 3'LTR lokalisiert (lila markiert). Die konservierten Motive für Gag (CCHC), Protease (DSG), reverse Transkriptase (FLDDI), RNase H (TDAS) und Integrase (HHCC und D₃₄E) sind in der Protein-Sequenz blau und umrahmt dargestellt. Das Startcodon (826 bp) ist hellgrün und das Stopcodon (8691 bp) ist türkis markiert.

Eine Analyse der genomischen Sequenz des Stammes E150 (Analyse der aus der Genomsequenzierung dieses Stamm vorliegenden RST-Daten (*Genolevures* 2, vgl. 1.5.7) zeigte, dass neben dieser Ylt1-Sequenz eine zweite Variante existiert, in der ein G an der Position 2213 fehlt, wodurch zwei offene Leserahmen entstehen (vgl. 4.1).

Die Nukleotidsequenz und eine davon abgeleitete Aminosäuresequenz wurden analysiert. Es konnten mögliche Kodierungsbereiche für ein Gag-Strukturprotein (Gag, HHCC Motiv), eine Protease (PR, DSG Motiv), eine reverse Transkriptase (RT) (FXDD Motiv), eine RNase H (RH, TDAS Motiv) und eine Integrase (IN, CCHC und D₃₄E Motive) zugeordnet werden. Das Retrotransposon Ylt1 gehört zu der Ty3/gypsy Superfamilie, da die reverse Transkriptase vor der Integrase lokalisiert ist (Abbildung 8). Auf die Aminosäuresequenzmotive wird im Kapitel 3.1.6 näher eingegangen.

3.1.1 Analyse der Sequenz von Ylt1

Die gesamte Ylt1-Sequenz wurde mit verschiedenen Auswerte-Programmen analysiert. Der Startpunkt der Transkription wurde mit dem Signal Prediction und AUG Evaluator tool von WEBGENE (<http://www.itba.mi.cnr.it/webgen/>) analysiert (Rogozin *et al.*, 2001). Für die Promotor-Analyse wurde das BCM search launcher tool (<http://www.search-launcher.bcm.tmc.edu/>) verwendet (Reese und Eeckman, 1995). Die Aminosäure-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programmes ClustalX 1,81 (Thomson *et al.*, 1997) miteinander verglichen und in Genedoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>) dargestellt.

3.1.1.1 Promotoreigenschaft der LTR-Sequenz

Es ist bekannt, dass die Sequenz des LTR-Bereiches von Retrotransposonen Promotor-Aktivität enthält. Der 5'-Bereich des Retrotransposons Ylt1 wurde von Position 1 bis 825 auf mögliche Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen untersucht. Es konnte eine TATA-Box von Nukleotid 453 bis 456 im U3-Bereich des LTRs detektiert werden. Überlappend mit der hypothetischen Promotorregion sind auch Transkriptions-Terminationssignale und ein Polyadenylierungssignal vorhanden. Das Polyadenylierungssignal AATAAA ist an der Position von Nukleotid 494 bis 499 und das Terminationssignal der Transkription TAGT Sequenz ähnlich wie in Retroviren (TTGT; Temin, 1981) ist an der Position von Nukleotid 480 bis 483 im R-Bereich der LTR-Sequenz lokalisiert. Außerdem wurde ein mögliches „stress response element“ CCCCT an der Position von Nukleotid 266 bis 270 identifiziert.

beide Motive notwendig sind um eine Aktivitätssteigerung zu bewirken. Die zwischen den Domänen liegenden Sequenzen werden als Enhancer-Kern-Sequenz bezeichnet. In der LTR-Sequenz des Retrotransposons Ylt1 wurden zwei potentielle Enhancer entdeckt, das Sequenzmotiv GTGTGT an der Position von Nukleotid 273 bis 278 und das Motiv TCTCTC an der Position von Nukleotid 371 bis 376. Ob die beide Sequenzen in der LTR-Sequenz des Retrotransposons Ylt1 als Enhancer aktiv sind, ist noch unklar.

3.1.2 Primer-Bindungsstelle

Die Primer-Bindungsstelle (PBS) ist eine kurze Nukleotidsequenz, welche mit dem 3' Bereich einer spezifischen tRNA, die als Primer für die cDNA-Synthese des Minusstranges während der reversen Transkription bei den Retrotransposonen und Retroviren verwendet wird, paaren kann. Die hypothetische Primer-Bindungsstelle des Retrotransposons Ylt1 TGGTGGACGACACC ist downstream des 5'LTR an der Position von Nukleotid 717 bis 730 lokalisiert. Ein Vergleich mit der Genom-Sequenz von *Y. lipolytica* ergab, dass das Genom dieser Hefe eine tRNA^{Ala} (Accession-Nummer: AL414293) mit einer zur Primer-Bindungsstelle komplementären Sequenz enthält. Die Paarung mögliche zwischen der PBS und tRNA^{Ala} ist in Abbildung 12 dargestellt.

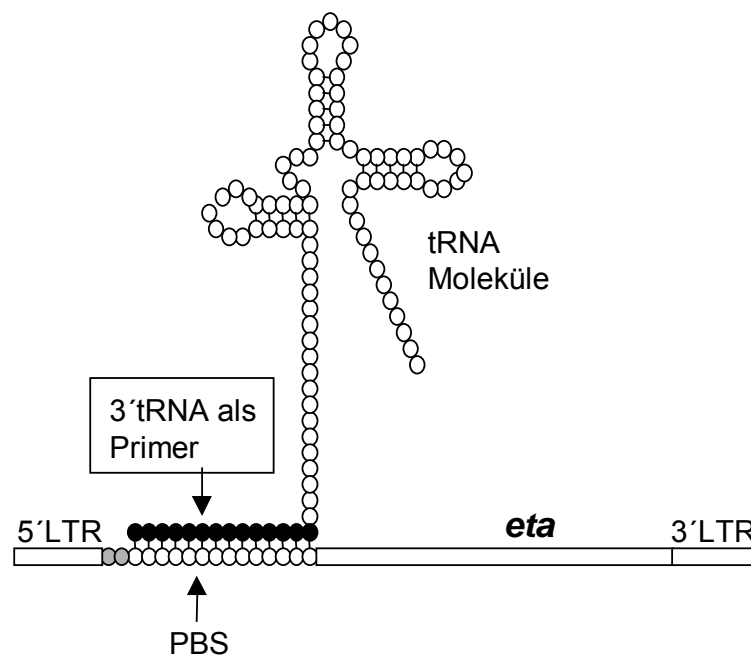


Abbildung 12: Paarung zwischen Primer-Bindungsstelle des Retrotransposons Ylt1 und tRNA^{Ala} der Hefe *Y. lipolytica*. Schwarze und weiße Kreise stellen Nukleotide dar.

Die Primer-Bindungsstelle des Retrotransposons Ylt1 im Vergleich zu anderer Retrotransposonen ist in der Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Primer-Bindungsstellen ausgewählter Retrotransposonen

Gruppen	Retrotransposon	Primer-Bindungsstelle	Organismus
Ty1-ähnliche Elemente	Ty1 Ty2 Tkm1 Tse1	TGGTAGCGCC TGGTAGCGCC TGGTAGCGCCTGT TGGTAGCGCCGC	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>K. marxianus</i> <i>S. exiguus</i>
Ty4-ähnliche Elemente	Ty4 Tsu4	CGACCCAGTGAGGGATGAA CGACCCAGTGAGGGATGA	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. bayanus</i>
Ty5-ähnliche Elemente	Ty5 SpTy5 Tca5	GGTTATGAGCCCT GGTTATGAGCCCT GGTTATTGCCTC	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. paradoxus</i> <i>C. albicans</i>
Tca2-ähnliche Elemente	Tca2 Tdh2	GATTAGAAGTCAAAAGCGATAA GATTAGAAGTCAAAC	<i>C. albicans</i> <i>D. hansenii</i>
Ty3/gypsy-ähnliche Elemente	Ty3 Tf1 Tcd3 Tca8 Tca13 Ylt1	TGGTAGCG ATAACTGAACT AATTTTCTGA TGGTAGCATTGCCTCGTTAAGATCCAG TGGTGGACGAGAUGAGAG TGGTGGACGACACC	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. pombe</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>C. albicans</i> <i>C. albicans</i> <i>Y. lipolytica</i>

3.1.3 Polypurin-Bereich

Für die reverse Transkription der Retrotransposonen wird außer der Primer-Bindungsstelle noch ein weiterer Sequenz-Bereich benötigt, der als Primer für die Gegenstrang-Synthese fungiert. Diese Region ist Purin reich und wird deshalb als Polypurin-Bereich (*polypurine tract*, PPT) bezeichnet. Während der cDNA-Synthese wird der RNA-Strang vom RNA/DNA-Duplex außer dem Polypurin-Bereich von RNase H abgebaut. Der PPT fungiert somit als Primer für die cDNA-Synthese des Gegenstranges (Boeke und Sandmeyer, 1991; Garfinkel, 1992; Wilhelm und Wilhelm, 2001). Im Retrotransposon Ylt1 konnte das Oktanukleotide TGGGCAGG als PPT identifiziert werden. Tabelle 14 zeigt den PPT des Ylt1 im Vergleich zu PPTs anderer Retrotransposonen.

Tabelle 14: Der Polypurin-Bereich (PPT) verschiedener Retrotransposonen in upstream-Bereich der 3'LTR-Sequenz. (*) und (**): gleiche PPT-Sequenz.

Gruppen	Retrotransposon	PPT	Organismus
Ty1-ähnliche Elemente	Ty1 Ty2 Tkm1 Tse1	GGTGGTA* GGTGGTA* AGGGGGTG GGTGGTA*	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>K. marxianus</i> <i>S. exiguus</i>
Ty4-ähnliche Elemente	Ty4 Tsu4	AAGGGAGCA AAGGGGGCA	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. bayanus</i>
Ty5-ähnliche Elemente	Ty5 SpTy5 Tca5	GGGGGGA** GGGGGGA** GGGGAAG	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. paradoxus</i> <i>C. albicans</i>
Tca2-ähnliche Elemente	Tca2 Tdh2	AATCAGGGGAG CTAGGGGAG	<i>C. albicans</i> <i>D. hansenii</i>
Ty3/gypsy-ähnliche Elemente	Ty3 Tf1 Tcd3 Ylt1	GAGAGAGAGGAAGA GGGGAGGGCAA GGAGGAAAGGGTAGA TGGGCAGG	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. pombe</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>Y. lipolytica</i>

Die PPT-Sequenzen von Ty1/ *copia*-Elementen weisen eine relativ hohe Homologie untereinander auf. Es gibt auch Sequenzen mit gleichem PPT, wie zum Beispiel Ty1, Ty2 und Tse1 bzw. Ty5 und SpTy5 Retrotransposonen. Im Gegensatz dazu haben die Ty3/gypsy-Elemente relativ unterschiedliche PPT.

3.1.4 Die terminalen invertierten Sequenzwiederholungen

An den 5'- und 3'-Enden der LTR-Sequenzen des Retrotransposons Ylt1 befinden sich kurze spezifische Nukleotidsequenzen, die zueinander invertiert vorliegen und somit das LTR begrenzen. Sie werden als terminale invertierte Sequenzwiederholungen (*short inverted repeats*) bezeichnet. Die *zeta*-Region von Ylt1 wird von den Nukleotiden TGT ... ACA flankiert. In Tabelle 15 sind diese terminalen invertierten Sequenzen im Vergleich mit denen anderer Retrotransposonen dargestellt.

Tabelle 15: Terminal invertierte Sequenzwiederholungen (*short inverted repeats*) verschiedener Retrotransposonen. Die Sequenzen befinden sich an beiden Enden der LTR-Bereiche der Retrotransposonen. (*) und (**): gleiche Sequenzen. Die in allen LTR-Sequenzen auftretenden homologen invertierten Sequenzen sind unterstrichen.

Gruppen	Retrotransposon	Terminale invertierte Sequenzwiederholungen	Organismus
Ty1-ähnliche Elemente	Ty1 Ty2 Tkm1 Tse1	<u>TG</u> ... <u>CA</u> * <u>TG</u> ... <u>CA</u> * <u>TGTTG</u> ... <u>CAACA</u> ** <u>TGA</u> ... <u>TCA</u>	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>K. marxianus</i> <i>S. exiguus</i>
Ty4-ähnliche Elemente	Ty4 Tsu4	<u>TGTTG</u> ... <u>CAACA</u> ** <u>TGTTG</u> ... <u>CAACA</u> **	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. bayanus</i>
Ty5-ähnliche Elemente	Ty5 SpTy5 Tca5	<u>TGTTG</u> ... <u>CAACA</u> ** <u>TGTTG</u> ... <u>CAACA</u> ** <u>TGTTG</u> ... <u>CAACA</u> **	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. paradoxus</i> <i>C. albicans</i>
Tca2-ähnliche Elemente	Tca2 Tdh2	<u>TGTTG</u> ... <u>CATCA</u> <u>TGTTGG</u> ... <u>CCAACA</u>	<i>C. albicans</i> <i>D. hansenii</i>
Ty3/ <i>gypsy</i> -ähnliche Elemente	Ty3 Tf1 Tcd3 Tca13 Ylt1	<u>TGTTGTAT</u> ... <u>ATACAACA</u> <u>TGTCA</u> ... <u>TAACA</u> <u>TGACG</u> ... <u>CTTCA</u> <u>TGTCG</u> ... <u>CGACA</u> <u>TGT</u> ... <u>ACA</u>	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. pombe</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>C. albicans</i> <i>Y. lipolytica</i>

Tabelle 15 ist zu entnehmen, dass die terminalen invertierten Sequenzwiederholungen voneinander verschieden sind. Trotzdem ist es auffällig, dass einige invertierte Sequenzen sehr homolog zu einander sind, obwohl sie in unterschiedlichen Hefearten auftreten. Zum Beispiel haben Tkm1, Ty4, Tsu4, Ty5, SpTy5 und Tca5 bzw. Ty1 und Ty2 Retrotransposonen die gleiche terminale invertierte Sequenzwiederholungen. Interessanterweise werden alle LTR's durch die Nukleotide TG und CA begrenzt.

3.1.5 Die Sequenzverdopplung des Integrationsortes

Retrotransposonen sowie Retroviren integrieren sich ins Wirtsgenom an spezifischen Stellen, die durch kurze konservierte Nukleotidsequenzen erkennbar sind. Vor der Integration wird das DNA-Molekül in dieser Stelle durch die Integrase gespalten, so dass kurze einzelsträngige DNA-Sequenzen entstehen. Nach der Integration des Retrotransposons werden die einzelsträngige Bereiche wieder aufgefüllt, wodurch eine Verdopplung des Integrationsortes entsteht, was auch als Sequenzverdopplung des

Integrationsortes (*target site duplication*, TSD) bezeichnet wird. Somit hat die Integrase zwei Aufgaben, zuerst als Restriktionsenzym und danach als Ligase zu wirken. Für das Retrotransposon Ylt1 wurden die Sequenzen CATG bzw. TATG als Integrationsorte identifiziert (Schmid-Berger *et al.*, 1994). Zuerst wird die genomische DNA in der spezifischen Sequenz CATG durch die Integrase gespalten und danach wird die vollständige cDNA des Retrotransposons Ylt1 in diese Stelle integriert. Das hypothetische Schema des Integrationsprozesses des Ylt1 ist in Abbildung 13 dargestellt.

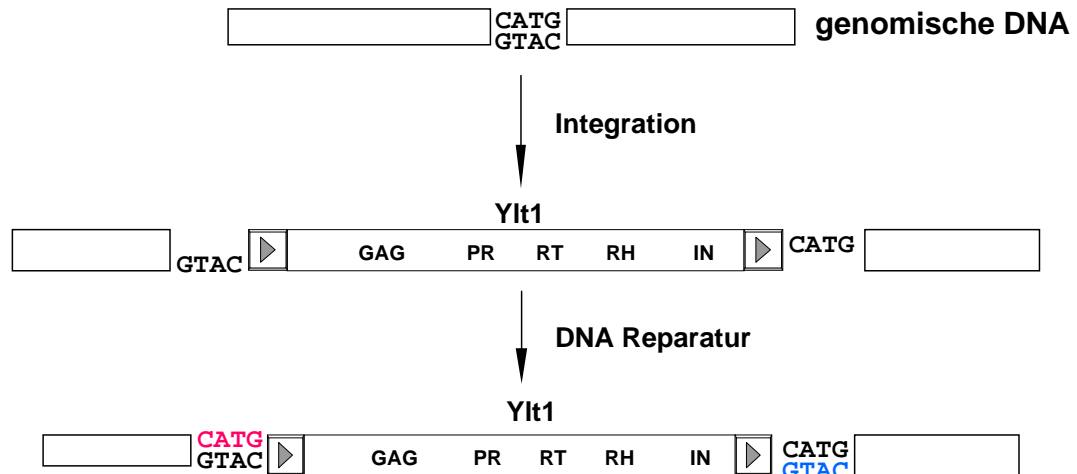


Abbildung 13: Integration des Retrotransposons Ylt1 in die genomische Zielsequenz CATG und die Entstehung der Sequenzverdupplung am Integrationsort.

In der Tabelle 16 sind die TSD verschiedener Retrotransposonen im Vergleich dargestellt. Einige Retrotransposonen wie z.B. Ty1 und Ty2, haben gleiche Sequenzen des Integrationsortes. Auffällig ist, dass Ylt1 ein Tetranukleotid anstatt ein Pentanukleotid wie die anderen Retrotransposonen als Integrationserkennungsstelle nutzt.

Tabelle 16: Einige Sequenzverdupplungen des Integrationsortes verschiedener Retrotransposonen. Diese Sequenz befinden sich upstream und downstream der Retrotransposonen.

Gruppen	Retrotransposon	TSD	Organismus
Ty1-ähnliche Elemente	Ty1 Ty2 Tse1	TATGG ... TATGG TATGG ... TATGG ATAAT ... ATAAT	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. exiguus</i>
Ty4-ähnliche Elemente	Ty4	TATTA ... TATTA	<i>S. cerevisiae</i>
Ty5-ähnliche Elemente	Ty5 SpTy5	GTTAT ... GTTCT TCGTA ... TCGTA	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. paradoxus</i>
Tca2-ähnliche Elemente	Tca2	ACACG ... ACACG	<i>C. albicans</i>
Ty3/ <i>gypsy</i> -ähnliche Elemente	Ty3 Ylt1	TTAAT ... TTAAT CATG ... CATG	<i>S. cerevisiae</i> <i>Y. lipolytica</i>

3.1.6 Der offene Leserahmen des Ylt1

Das Retrotransposon Ylt1 besteht aus einem großen einzelnen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF), welcher alle notwendigen Proteine für den Lebenszyklus des Retrotransposons kodiert. Der ORF kodiert für ein Gag-Strukturprotein (Gag), eine Protease (PR), eine reverse Transkriptase (RT), eine RNase H (RH) und eine Integrase (IN) (Abbildung 14). Die Reihenfolge der Kodierungsregionen des Retrotransposons Ylt1 ist Gag, PR, RT, RH, IN.

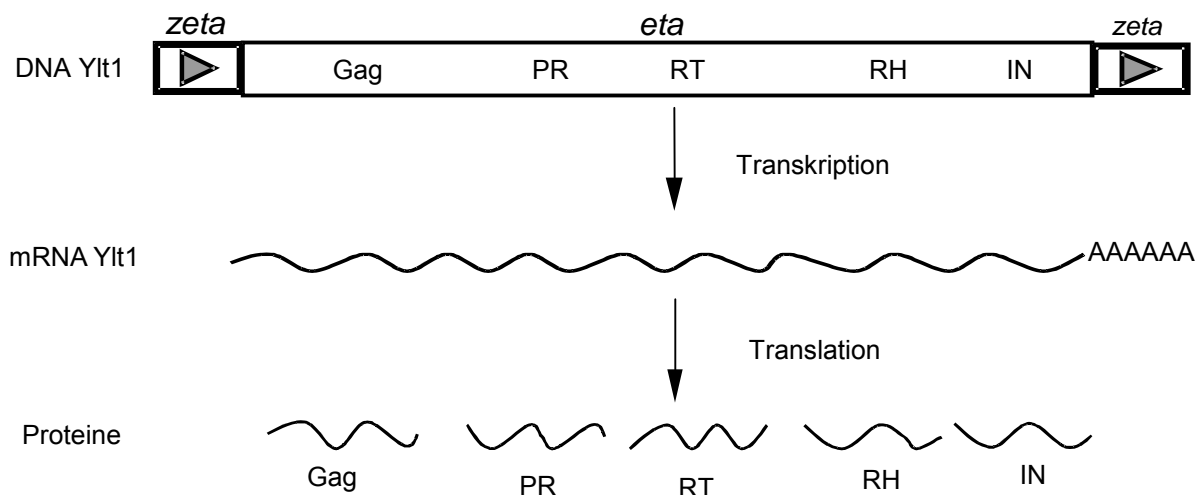


Abbildung 14: Das Retrotransposon Ylt1 wird als lange mRNA mit einem Poly A Anhang transkribiert, danach in ein Polyprotein translatiert. Außer dem Gag-Strukturprotein (Gag) werden einige Proteine mit Enzym-Aktivitäten translatiert. Dies sind Protease (PR), reverse Transkriptase (RT), RNase H (RH) und Integrase (IN). *Zeta*: LTR-Sequenzen und *eta*: interne Region.

Die Reihenfolge der Ylt1-Translationsprodukte ist typisch für die Ty3/*gypsy* Superfamilie des Retrotransposons. Das Gag ist ein Strukturprotein, das für den Aufbau der VLPs gebraucht wird. Die Sequenz des Gag-Proteins ist in verschiedenen Retroelementen unterschiedlich (Garfinkel, 1992; Boeke und Sandmeyer, 1991; Neuveglise *et al.*, 2002), aber sie enthält ein konserviertes RNA-Bindungsmotiv (CX₂CX₄HX₄C), das einen Zn-Finger formt. An der Position von Nukleotid 2158 bis 2199 von Ylt1 (von Aminosäure 445 bis 458) wurde ein solches Bindungsmotiv mittels CLUSTALX- und GeneDoc-Programmen gefunden. Es hat in Ylt1 die Aminosäuresequenz CVFCGSTAHALVNC. Abbildung 15 zeigt den konservierten Bereich (schwarz unterlegt) des Gag-Proteins verschiedener Retrotransposonen.

```

Cft-1   : RETRTCYGCCKPGHIARDCRGKNM
1731    : RKDVVCYNCGERRHFKANCRREKV
MAGGY   : KENMLCYRCGSQEHFVAKCPEPDT
SpTy5   : VKDRLCFYCKKEGHLNECRARNA
Tsu4    : YTERNCKYCKSELHSSVNCRKKVN
copia   : KYKVKCHHCGREGHIKKDCFHYKR
HIV2    : PRRQGCWKCGKPGHIMANCPERQA
Tdh5    : KSKLTCFKCGGIGHKSNVCPERSD
Tnt1    : SRVRNCYNCNQPGEHFKRDCPNPRK
Tpa5    : KKKIICTRCQKEGHSFECRAPAP
Mag     : INFNECSRCDRRHQAKDCIYKDY
Skipper : QSKGYCLNCGKSNHSTSTCRIDPV
Tad1    : SNVQQCFRCWGIHTARFCRQDDI
Ty3     : IKNRLCFYCKKEGHLNECRARKA
Ylli    : NGDNICVKCKSTKHIREACPEKDM
Ylt1    : ADKAPCVFCGSTAHALVNCDDSEG
          C C H C

```

Abbildung 15: Das konservierte Motiv des Gag-Bereiches des Retrotransposons Ylt1 im Vergleich mit anderen Retrotransposonen. Das Motiv CX₂CX₄HX₄C ist an der Position von Nukleotid 2158 bis 2199 (von Aminosäure 445 bis 458) des Ylt1 lokalisiert. Hoch konservierte Basen sind schwarz schattiert. Cft-1: *C. fulvum*, 1731, copia: *D. melanogaster*, MAGGY: *M. grisea*, Mag: *Bombyx mori* SpTy5: *S. paradoxus*, Tsu4: *S. bayanus*, HIV2: *Humanes Immundefizienzvirus2*, Tdh5: *D. hansenii*, Tnt1: *N. tabacum*, Tpa5: *Pichia angusta*, Skipper: *Dictyostelium discoideum*, Tad1: *Neospora crassa*, Ty3: *S. cerevisiae*, Ylli, Ylt1 : *Y. lipolytica*.

Die Protease spielt eine wichtige Rolle für die Reifung der Proteine des Retrotransposons Ylt1. Sie spaltet das Polyprotein, um funktionelle Proteine herzustellen. Bei der Analyse der Sequenz von Ylt1 wurde an der Stelle von Nukleotid 3979 bis 3987 (von Aminosäure 1052 bis 1054) ein mögliches Motiv des aktiven Zentrums einer Aspartylprotease (DSG) identifiziert. Das Konsensus-Protease-Motiv, welches in den meisten Retrotransposonen detektiert werden konnte, besteht aus den hydrophoben Aminosäuren D-T/S-G-A/S. Ein Vergleich der konservierten Motive von Proteasen aus verschiedenen Retrotransposonen wird in Abbildung 16 gezeigt.

```

copia   : DNCGFVLDSGASDHLIN
Tf1     : CSIPCLIDTGAQVNVIT
Tf2     : CSIPCLIDTGTQANIIT
Tnt1    : PESEWVVDTAASHHATP
Mag     : EPVAVVNDSGKSSSPPK
Ty1     : LPGHLLLD SGASRTLIR
Ty2     : LPDHLLD SGASQTLVR
Ty3     : TKVKTLFD SGSPTSFIR
Ty4     : SKKLVLD SGVNIITN
Cft-1   : HKTDA MIDSGASGNFAS
Ylt1    : QQTSALFD SGSSNNVID
          D T/S G

```

Abbildung 16: Vergleich des konservierten Motivs des Protease-Bereiches von Ylt1 mit Proteasen anderer Retrotransposonen. Das Motiv DSG wurde an der Position von Nukleotid 3979 bis 3987 (von Aminosäure 1052 bis 1054) in Ylt1 detektiert. Hoch konservierte Aminosäure sind schwarz schattiert und geringe konservierte grau schattiert. copia: *D. melanogaster*, Tf1, Tf2: *S. pombe*, Tnt1: *N. tabacum*, Mag: *B. mori*, Ty1, Ty2, Ty3, Ty4 : *S. cerevisiae*, Cft-1: *C. fulvum*, Ylt1: *Y. lipolytica*.

Eine weitere Region der Proteinssequenz hat große Homologie zur Sequenzen der reversen Transkriptase anderer Retrotransposonen. Das konservierte Motiv der reversen Transkriptase ist Y/EXDD, welches an der Position von Nukleotid 6040 bis 6054 (AVVFLDDIGV, Aminosäure von 1739 bis 1743) in Ylt1 lokalisiert ist. Dieses Aminosäuresequenzmotiv ist in verschiedenen reversen Transkriptasen von Retrotransposonen konserviert (siehe Abbildung 17, schwarz: hoch konserviert, grau: mäßig konserviert).

Tse1	:	YINKICVVYLDDILLYSKNEKE
copia	:	NENIYVLLLYVDDVVIATGDMTR
Tca5	:	DKRTIMGVYVDDILICAPSDSE
Tf1	:	AKESHVVCYMDLILHKSSESE
Tf2	:	IRKLMSKANVDDFHFTRLFILWM
Tnt1	:	GGNKYFVTFIDDASRKLWVYIL
Cft-1	:	LLDVCVVAYMDDILVYTKGSLQ
Mag	:	KNVPNVVFYDDILIRNQDLDS
Tad1-1	:	LSKEELQEYLLDDGVKAERILSW
Ty1	:	NSQVTICLFVDDMILFSKDLNA
Ty3	:	RDLRFVNVYLDDILIFSESPEE
Ty4	:	DKNLMIAYVDDCVIAASNEQR
SpTy5	:	RDLRFVNVYLDDILIFSESQEE
CgT1	:	DNQRLRFGYADDIGLLETSPSL
Ylt1	:	LFPDQAVVFLDDIGVLGPKTDY

FXDDI

Abbildung 17: Das konservierte Motiv des reversen Transkriptase-Bereiches des Retrotransposons Ylt1 im Vergleich mit den Motiven anderer Retrotransposonen. Das Motiv FLDDI wurde in der Position von Nukleotid 6040 bis 6054 (Aminosäure von 1739 bis 1743) des Ylt1 lokalisiert. Dieses Motiv ist auch in anderen Retrotransposonen vorhanden. Hoch konservierte Aminosäure sind schwarz schattiert und geringer konservierte grau schattiert. Tse1: *S. exiguus*, copia: *D. melanogaster*, Tca5: *C. albicans*, Tf1, Tf2: *S. pombe*, Tnt1: *N. tabacum*, Cft-1: *C. fulvum*, Mag: *B. mori*, Tad1-1: *N. crassa*, Ty1, Ty3, Ty4: *S. cerevisiae*, SpTy5: *S. paradoxus*, CgT1: *G. cingulata*, Ylt1: *Y. lipolytica*.

Die RNase H spielt eine wichtige Rolle während der reversen Transkription des Retrotransposons Ylt1. Sie spaltet die mRNA in dem RNA-DNA-Hybrid nach der Synthese des Minusstranges von der cDNA. Für die RNase H ist die gut konservierte Aminosäuresequenz TDAS charakteristisch. Im Ylt1 wurde das TDAS-Motiv der RNase H downstream der RT entdeckt. Es ist an der Position von Nukleotid 6550 bis 6561 (von Aminosäure 1809 bis 1812) lokalisiert. Die RNase H kann separat oder mit der reversen Transkriptase als Fusionsprotein translatiert werden.


```

Ty1      : TPSPESGNTFTDSSSADSDMTSTK
Ty2      : PLPDLTNKSPDTSDVSKDIPHIH
Ty3      : FNNKANYRLTTDASKDGIGAVLEE
Ty4      : CNKDKKVIATTDASVGSEYDAQSR
SpTy5    : FNNKAIYRLTTDASKDGIGAVLEE
Tf1      : FDFS KILLETDASDVAVGAVLSQ
Tf2      : FDFS KILLETDASDVAVGAVLSQ
Cft-1    : FDGSKEVHIETDASDMAIGACTQ
Tad1-1   : RSTEFVRVVTDAVHTAWKLGAVT
Tnt1     : WDALNTKFGATDASNDLYIMEQFH
gypsy    : PDFKKPFDLTTDASASGIGAVLSQ
HIV2     : DPIPGAETFYTDGSCNRQSKEGKA
Ylli     : IFDRAADINDTDDSAFLDLFPEET
Ylt1     : YDPTLPIVITTDASSLGWAVMSH

```

TDAS

Abbildung 18: Das konservierte Motiv des RNase H-Bereiches des Retrotransposons Ylt1 im Vergleich mit anderen Retrotransposonen. Das Motiv TDAS wurde an der Position von Nukleotid 6550 bis 6561 (von Aminosäure 1809 bis 1012) in Ylt1 lokalisiert. Hoch konservierte Aminosäure sind schwarz schattiert und geringer konservierte grau schattiert. Die Abkürzungen zeigen die Retrotransposonen Ty1, Ty2, Ty3, Ty4: *S. cerevisiae*, SpTy5: *S. paradoxus*, Tf1, Tf2: *S. pombe*, Cft-1: *C. fulvum*, Tad1-1: *N. crassa*, Tnt1: *N. tabacum*, gypsy: *D. melanogaster*, HIV2: *Humanes Immundefizienzvirus2*, Ylli, Ylt1: *Y. lipolytica*.

Die letzte Region des Polyprotein-Bereiches ist die Integrase-kodierende Sequenz. Die retroviralen Integrasen besitzen die konservierten Motive HHCC, DD₃₅-E, GPY/E und KKR. Die konservierte HHCC Sequenz (Zn-Finger-Motiv) konnte im N-terminalen Bereich der Integrase von Ylt1 identifiziert werden. In den meisten Integrasen der Retrotransposonen wurde das HHCC-Motiv ebenfalls im N-Terminus detektiert (Abbildung 19).

```

Ty1      : PYPFIHRMLA--H (29) CPDCLIGKS
Ty2      : PYPLIHRMLG--H (29) CPDCLIGKS
Ty3      : RLYHDHTLFG-GH (29) CVQCQLIKS
Ty4      : TLEDAHKRMG--H (29) CQTCISKKA
SpTy5    : KLYHDHTLFG-GH (29) CVQCQLTKS
Mag      : IITELHDP----H (32) CTVCAAVAD
Tca5     : PAFTVHIPQ--LH (32) CETCRLGKA
Tf1      : IIKKYHEEGKLIH (29) CHTCQINKS
Tf2      : IIKKYHEEGKLIH (29) CHTCQINKS
copia    : NFRLWHERFG--H (29) CEPCLNGKQ
Cft-1    : CIRQHHDEPTYGH (29) CVHCQQNKA
Ylli     : WQEVMDLRLK--H (29) CGLCDKAI I
Ylt1     : VLRATHEQYG--H (28) CGTCAKATN

```

H H
C C

Abbildung 19: Das konservierte Motiv des Integrase-Bereiches des Retrotransposons Ylt1 im Vergleich mit denen anderer Retrotransposonen. Das Motiv HHCC ist an der Position von Nukleotid 7276 bis 7392 (von Aminosäure 2151 bis 2189) des Ylt1 lokalisiert. Hoch konservierte Aminosäure sind schwarz schattiert und geringer konservierte grau schattiert. Ty1, Ty2, Ty3, Ty4: *S. cerevisiae*, SpTy5: *S. paradoxus*, Mag: *M. grisea*, Tca5: *C. albicans*, Tf1, Tf2: *S. pombe*, copia: *D. melanogaster*, Cft-1: *C. fulvum*, Tnt1: *N. tabacum*, Ylt1: *Y. lipolytica*.

Das katalytische Motiv DDE wurde als D,D₃₄-E (ein Aminosäure-Unterschied) in mittlerem Bereich der Integrase detektiert. Im Gegensatz dazu wurden sowohl das GGPY/F-Motiv als

auch die sogenannte Kernlokalisierungssignal KKR (*nuclear localisation signal*, NLS) in der Aminosäuresequenz der Integrase des Ylt1 nicht gefunden. Möglicherweise gibt es einen spezifischen Mechanismus bzw. eine andere Erkennungssequenz für den Transport der Integrase zum Zellkern.

In Abbildung 20 ist ein Vergleich der Sequenzen um das DD₃₅E Motiv aus Retrotransposon Ylt1 und aus anderen Retrotransposonen dargestellt.

Ty1	:	QYLHTDIFG	(54)	VLV	IQMDRGSEY	TNRTLHK	LEKNG	ITPCY	TTTAD	SRAC	VAER	LNRTLL	DDC	RT
Ty2	:	QYLHTDIFG	(54)	VLV	IQMDRGSEY	TNKTLLHK	FTNRG	ITACY	TTTAD	SRAC	VAER	LNRTLL	ND	CR
Ty3	:	LD	ISMDFVTG	(50)	PRT	ITSDR	DVRMTADKYQEL	TKRLG	IKSTM	SSANHP	QTDG	QSERT	IQT	LNRL
Ty4	:	SSWC	MDIFG	(54)	VRE	INSDRG	TEFTNDQIEE	YFISK	GIIHIL	TSTQD	HAANG	RAERY	IIRTI	ITD
SpTy5	:	QMVQ	ADLCGG	(56)	VGS	VRTDNG	TEFVNKNLHAE	FKSKG	IEHQ	LTIPI	YHSYQ	NGAVER	AHRTI	EERT
copia	:	FVVH	SDVCGP	(52)	VVY	YIDNG	REYLSNEMRQ	FVCKG	GISYHL	IVPHT	PQLNG	VSERM	IRTI	TEK
Tca5	:	ELLH	VDVHGP	(56)	TKI	IRSDNG	GEFLNKTLLTY	LDSKY	ITHQT	SNAYE	HHENGA	AERAIR	SVKDM	ARV
Tnt1	:	DLVY	SDVCGP	(52)	LKR	IRSDNG	GEYTSREFEE	YCSSH	GIRHEK	ITVPG	TPQHNG	VAERM	NRTI	VEK
Cft1	:	DEV	TMDFITK	(55)	PEV	FITDR	DKLFTSNY	WKTLMGT	IGIKH	KLSTAY	HPETD	GQTER	TNQ	TLE
1731	:	DM	IHSDL	CGP	(52)	IKC	IRSDNG	GEFVNNV	FDDYL	KAHG	IARQL	TIPHT	PQNG	V
Osser	:	ERVH	MDL	AGP	(52)	VKE	VRTDR	GREYLN	AELRE	FYGER	GIVHQ	TSAPY	TPQNG	I
Ta1	:	RYVH	ADLWGS	(53)	VKC	LRD	NGLEFC	NLKFDA	YCKEH	GIERH	KTCTY	TPQNG	V	A
Tdh2	:	FRLH	S	DTLGI	(41)	WNN	KFVDAN	VAF	FRTD	NALE	MP	TKDQL	A	E
Tf1	:	ES	ISMDFITA	(49)	PKE	IAD	N	DHIF	T	SQT	WKD	FAH	KY	N
Tkm1	:	EYLH	TDVFGP	(55)	VKT	I	QMDK	GSEYLN	TKVQK	ELR	ERG	I	VSRE	I
Tse1	:	QYLH	SDIFG	(52)	ILS	FHMD	RGSEY	TNTE	MQM	FQKH	GIIPI	YSST	TD	S
Tsk1	:	QYLH	TDIFG	(54)	VLV	IQMDRGSEY	TNKTLLHK	LLKKG	ITACY	TTTAD	SRAC	VAER	LNRTLL	DD
Ylt1	:	LSGKT	DLAHN	(53)	DFV	FVHDL	LRPHN	KLTP	RWTG	PSIV	TACH	PET	STY	T
					D		D						E	

Abbildung 20: Das konservierte Motiv der Integrase. Das katalytische Motiv D,D₃₄E wurde in der Position von Nukleotid 8101 bis 8400 (von Aminosäure 2426 bis 2525) lokalisiert. Hoch konservierte Aminosäure sind schwarz schattiert und geringer konservierte grau schattiert. Ty1, Ty2, Ty3, Ty4: *S. cerevisiae*, SpTy5: *S. paradoxus*, copia, 1731: *D. melanogaster*, Tca5: *C. albicans*, Tnt1: *N. tabacum*, Cft-1: *C. fulvum*, Osser: *Volvox carteri*, Ta1: *A. thaliana*, Tdh2: *D. hansenii*, Tf1: *S. pombe*, Tkm1: *K. marxianus*, Tse1: *S. exiguus*, Tsk1: *S. kluyverii*, Ylt1: *Y. lipolytica*.

3.1.7 Phylogenetische Verwandtschaft des Retrotransposons Ylt1

Zur Bestimmung der Verwandtschaft des Retrotransposons Ylt1 mit anderen Retrotransposonen und Retroviren wurde ein phylogenetischer Baum erstellt. Im Kapitel 3.1.6 wurde bereits beschrieben, dass das Retrotransposon Ylt1 aufgrund der Reihenfolge der kodierten Proteine zur Ty3/gypsy Superfamilie gehört.

In diesen Untersuchungen wurde das Retrotransposon Ylt1 weiter phylogenetisch analysiert. Diese vergleichende Studie beruht auf einem multiplen Alignment (modifiziert nach Xiong und Eickbush, 1990) der reversen Transkriptasen unterschiedlicher Organismen. Die Sequenz der reversen Transkriptase kann in sieben konservierte Bereiche unterteilt werden. Jeder Teil oder ganze Bereiche werden mit reversen Transkriptasen anderer Retrotransposonen verglichen, um Homologien zu finden. Danach wurde ein phylogenetischer Baum erstellt, der in Abbildung 21 dargestellt ist.

Die Abbildung 21 zeigt, dass Ylt1 nah verwandt mit Tca3 von *C. albicans* und Tcd3 von *C. dubliniensis* ist. Interessant ist, dass in dieser phylogenetischen Gruppe gemeinsam mit Ylt1

auch die Retroviren HIV1, HIV2 und MMLV enthalten sind. Außerdem ergab sich noch eine weitere engere Verwandtschaft mit Mag von *B. mori* und Skipper von *D. discoideum*. Obwohl Ylt1 zur Ty3/gypsy Untergruppe der Retrotransposonen gehört ist es aber nur mäßig mit Ty3 von *S. cerevisiae* und gypsy von *D. melanogaster* verwandt.

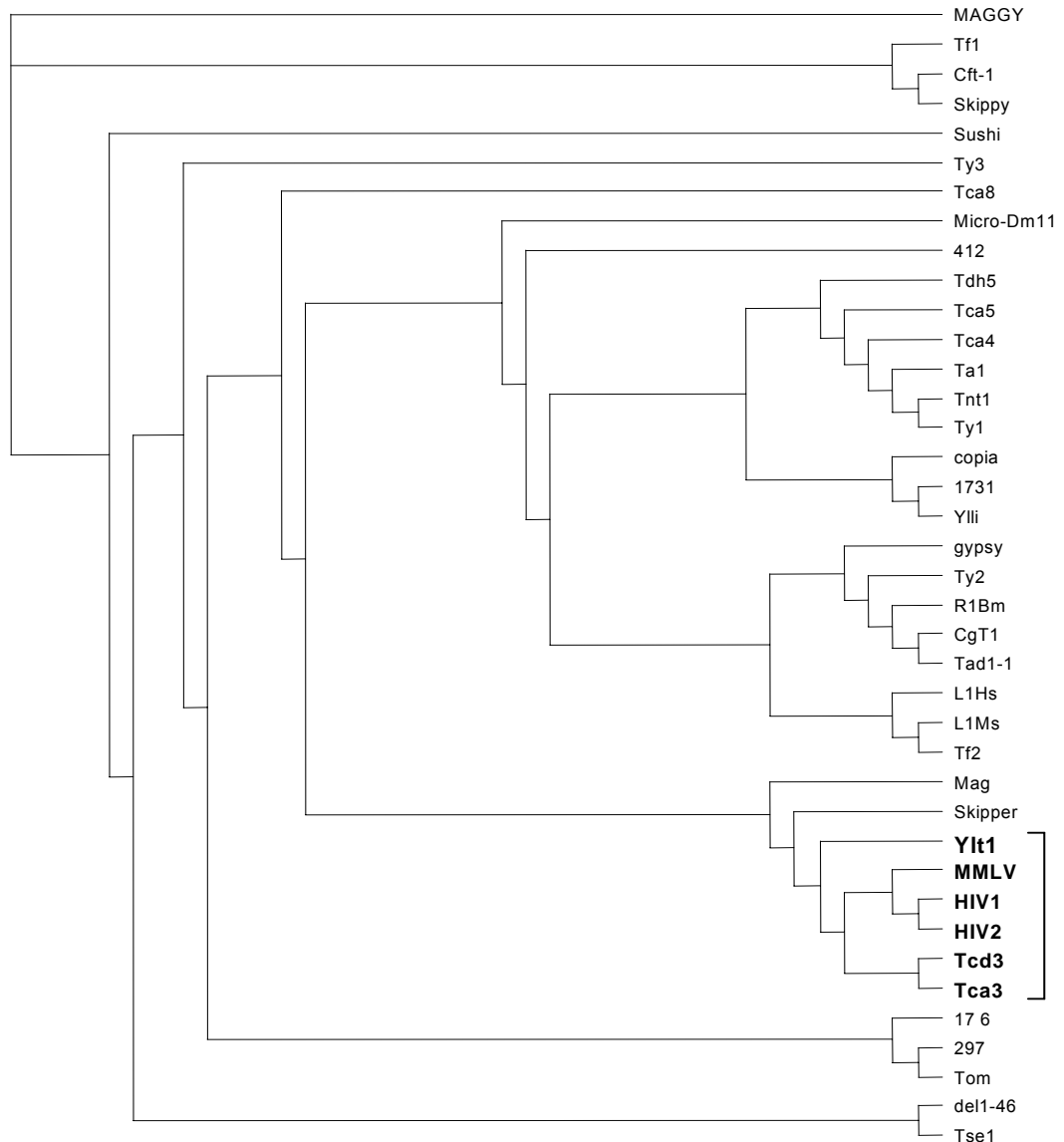


Abbildung 21: Der phylogenetische Baum einer Auswahl von Retrotransposonen, konstruiert auf der Basis des Vergleiches von sieben verschiedenen Aminosäure-Teilsequenzen der reversen Transkriptase von Ylt1 mit reversen Transkriptasen anderer Retrotransposonen. MAGGY: *M. grisea*, Mag: *B. mori*, Tf1: *S. pombe*, Cft-1: *C. fulvum*, Skippy: *F. oxysporum*, Sushi: *Takifugu rubripes*, Ty1, Ty2, Ty3: *S. cerevisiae*, Tca3, Tca4, Tca5, Tca8: *C. albicans*, copia, gypsy, Micro-Dm11, 412, 17,6, 297, 1731: *D. melanogaster*, Tdh5: *D. hansenii*, Ta1: *A. thaliana*, Tnt1: *N. tabacum*, Ylli, Ylt1: *Y. lipolytica*, R1Bm: *B. mori*, CgT1: *G. cingulata*, Tad1-1: *N. crassa*, L1Hs: LINE-like des *Homo sapiens*, L1Ms: LINE-like des *M. musculus*, Skipper: *D. discoideum*, MMLV: *M. musculus*, HIV1, HIV2: *Humanes Immundefizienzvirus2*, Tcd3 : *C. dubliniensis*, tom: *D. ananassae*, del1-46: *A. thaliana*, Tse1: *S. exiguus*.

3.2 Das Vorkommen des Retrotransposons Ylt1 in *Yarrowia lipolytica*

In den bisherigen Untersuchungen wurde das Retrotransposon Ylt1 zuerst im *Y. lipolytica* Stamm B204-12C und in seinen Derivaten gefunden (Sonde: *EcoRV*-*Bsa*AI-Fragment des *zeta*-Bereiches, Schmid-Berger *et al.*, 1994). Weitere Southern Hybridisierung mit anderen Stämmen zeigten, dass in einigen Wildtypstämmen (H222, W29 und sein Derivat PO1d) kein Ylt1 nachweisbar war, andere Stämme (B204-12C und Derivate, E129, E150) enthielten jedoch viele Ylt1-Kopien (Juretzek 1999, Juretzek *et al.* 2001 – Sonde für den Southern-Blot: *zeta*-Bereich; Augstein, 2001; Mauersberger und Augstein, persönliche Mitteilung - Sonde: *EcoRV*-*Nco*I-Fragment des *zeta* mit wenigen Nukleotiden des Promotorbereiches des *GPR1*-Gens).

3.2.1 Nachweis des Retrotransposons Ylt1 durch Southern Hybridisierung

Um zu prüfen, ob dieses Retrotransposon in weiteren Stämmen von *Y. lipolytica* vorhanden ist oder nur in speziellen Stammlinien vorkommt, wurde eine Reihe von Vertretern der bekannten Stammlinien (vgl. Abbildung 44) und weitere Wildtypstämme (H181, H194) auf die Anwesenheit von Ylt1 getestet. Insgesamt wurden in diese Untersuchungen die Stämme H222, H181, B204-12C, B204-12C-20, B204-12A-213, B512-3, W29, PO1d, E150, H194 und CXAU1 auf die Anwesenheit des Retrotransposons untersucht (Abb. 22, 24, 25, 27). Die Stämme H222 und W29 sind zwei verschiedene, unabhängige Wildisolate und H181 ist eine Selektante aus einem anderen Wildtypstamm, dagegen stammen die Stämme B204-12C, B204-12A-213, B512-3 und ihre Derivate (B204-12C-112, -20 u.a.), wie auch die Stämme E129, E150 und CXAU1 aus Inzuchtlinien, in die alle der Elternstamm H194 (YB423-12) eingekreuzt wurde (siehe Kapitel 4.4 , Abbildung 44).

In diesem Versuch wurde die genomische DNA aus den Hefestämmen mit dem oft schneidenden Restriktionsenzym *Hind*III gespalten, um die DNA Fragmente in Agarosegel besser zu trennen. Dieses Enzym *Hind*III hat einige Schnittstellen im Retrotransposon Ylt1, deshalb entstanden bei dem Verdau kleinere *zeta*-haltige DNA-Fragmente (Abbildung 22). Die geblotteten DNA-Fragmente wurden mit der Zeta-Sonde, die nur aus dem LTR des Retrotransposons Ylt1 (ein bis 714 Nukleotide) besteht, hybridisiert. Die Sonde wurde aus genomischer DNA des Stammes B204-12C-20 mit Hilfe der beiden Primer Pr1 und Pr2A amplifiziert.

Die Abbildung 22 zeigt in Übereinstimmung mit den oben genannten früheren Befunden, dass die Stämme H222 und W29 kein Retrotransposon Ylt1 besitzen. Dagegen enthalten aber die Stämme B204-12C, B512-3, E150, H194 und CXAU1 höhere Kopiezahl dieses Retrotransposons bzw. seiner einzeln vorliegenden LTR (Solo-LTR). Eine einzige Bande wurde interessanterweise im Stamm H181 nachgewiesen (Pfeil, Abbildung 22). Diese eine

Bande zeigt wahrscheinlich ein Solo-LTR des Ylt1 oder ein degeneriertes Ylt1 an, da ein intaktes Ylt1 zwei Banden ergeben sollte. Es ist aber auch möglich, dass ein anderes, nicht charakterisiertes Retrotransposon mit Homologie zu *zeta* vorkommt.

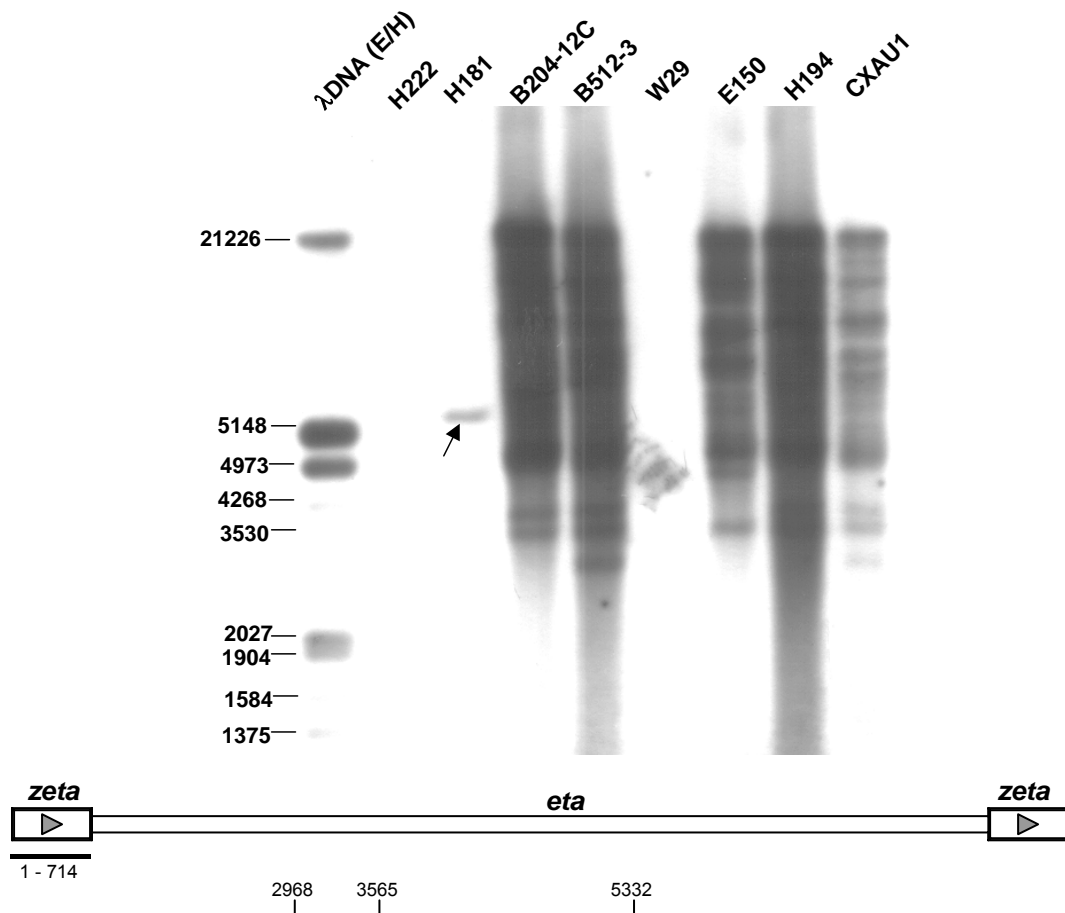


Abbildung 22: Southern Hybridisierung zum Nachweis des Retrotransposons Ylt1 in den *Y. lipolytica*-Stämmen H222, H181, B204-12C, B512-3, W29, E150, H194 und CXAU1. Die genomische DNA der untersuchten Stämme wurde mit *Hind*III gespalten und mit der Zeta-Sonde (714 bp langes PCR-Fragment mit den Primern Pr1 und Pr2A) hybridisiert. Die Sonde ist durch eine Linie unter dem *zeta*-Bereich markiert. Als Molekulargewichts-Standard wird λ DNA (mit *Eco*RI für E und *Hind*III für H verdaut) genutzt. Die mit den Zahlen versehenen Striche auf dem unteren Balken sind Schnittstellen für *Hind*III.

Um festzustellen, ob das Retrotransposon Ylt1 in verschiedenen Stämmen als intaktes Element bzw. Solo-LTR vorhanden ist, wurden die fünf unterschiedlichen Stämme H222, PO1d, CXAU1, B204-12C-20 und B204-12A-213 nach Restriktionsverdau mit anderen Enzymen (*Cl*I, *Not*I, *Sal*I oder als Kombination mit *Hind*III) und Hybridisierung mit anderen Sonden (Zeta-eta- bzw. Pol-Sonde) auf das Vorkommen dieses Retrotransposon überprüft (Abbildungen 23-27).

Zunächst wurde die genomische DNA dieser fünf Stämme mit den Restriktionsendonukleasen *Cl*I, *Not*I bzw. *Hind*III+*Sal*I geschnitten. Die beiden Enzyme *Cl*I und *Not*I haben keine Schnittstellen im Ylt1, schneiden aber selten im Genom, weshalb bei dem

Verdau größere DNA-Fragmente entstehen. *HindIII* und *SaI* haben dagegen einige Schnittstellen im Retrotransposon Ylt1 (Abbildung 24) und viele Restriktionsstellen im Genom, so dass kleinere DNA-Fragmente entstehen.

Die elektrophoretisch getrennten DNA-Fragmente wurde auf eine Nylonmembran geblottet und anschließend wurde dieser DNA-Blot mit einer Zeta-eta-Sonde hybridisiert. Die Sonde wurde aus dem Plasmid pYLD303 nach Verdau mit *EcoRI* und *PstI* gewonnen und enthält einen Teil von *zeta* (368 bp) und ein kleineres Stück der *eta*-Sequenz (226 bp) des Retrotransposons Ylt1 (siehe Abbildung 23).

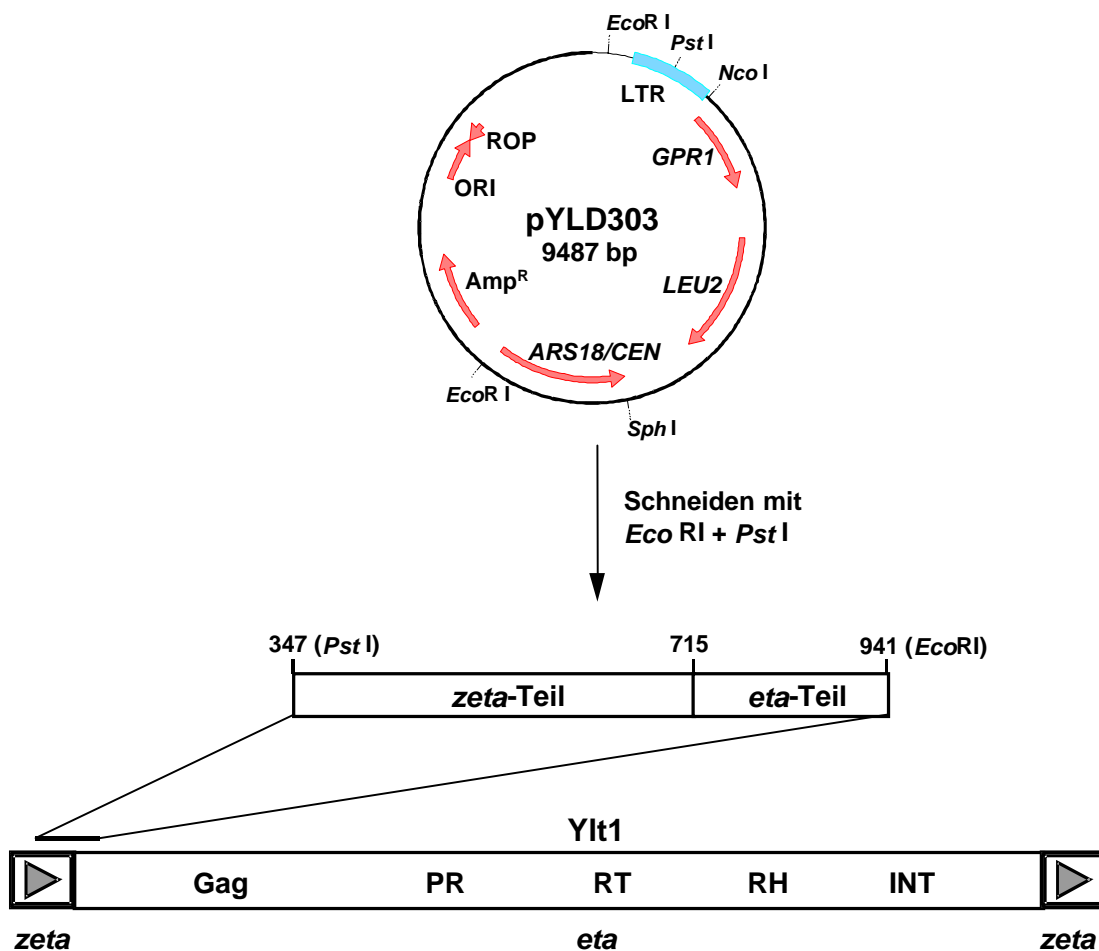


Abbildung 23: Die verwendete Zeta-eta-Sonde. Die Sonde wurde aus dem mit *EcoRI* und *PstI* gespaltenen Plasmid pYLD303 isoliert und ist 594 bp groß.

Die Hybridisierung zeigte folgendes Ergebnis (Abbildung 24). Die Hybridisierung mit der *NotI* verdauten DNA ergab nur Signale mit Banden, die größer als ca. 10 kb sind. Dies ist dadurch erklärbar, dass *NotI* nicht im Retrotransposon Ylt1 und nur sehr selten im Genom schneidet. Die Intensität der Hybridisierungssignale der DNA aus den Stämmen CXAU1, B204-12C-20, und B204-12A-213 lässt vermuten, dass mehrere Retrotransposon-haltige Fragmente existieren, die aber mit diesem Agarosegel nicht weiter auftrennbar waren. H222 und PO1d

zeigen keine Hybridisierungssignale, da sie keine Kopie des Retrotransposons Ylt1 enthalten.

Die mit *Clal* verdaute DNA ergab kleinere Fragmente, die eine Hybridisierung anzeigen (Abbildung 24). Dies ist dadurch erklärbar, dass *Clal* häufiger im Genom schneidet als *NotI*. Da *Clal* nicht im Retrotransposon Ylt1 schneidet, sollten alle Fragmente, die das komplette Retrotransposon enthalten, größer als 9,45 kb sein. Die Hybridisierungssignale mit kleineren Fragmenten kann mit dem Auftreten von Solo-LTR's, die bereits von Schmid-Berger *et al.* (1994) im Stamm B204-12C-112 nachgewiesen wurden, erklärt werden.

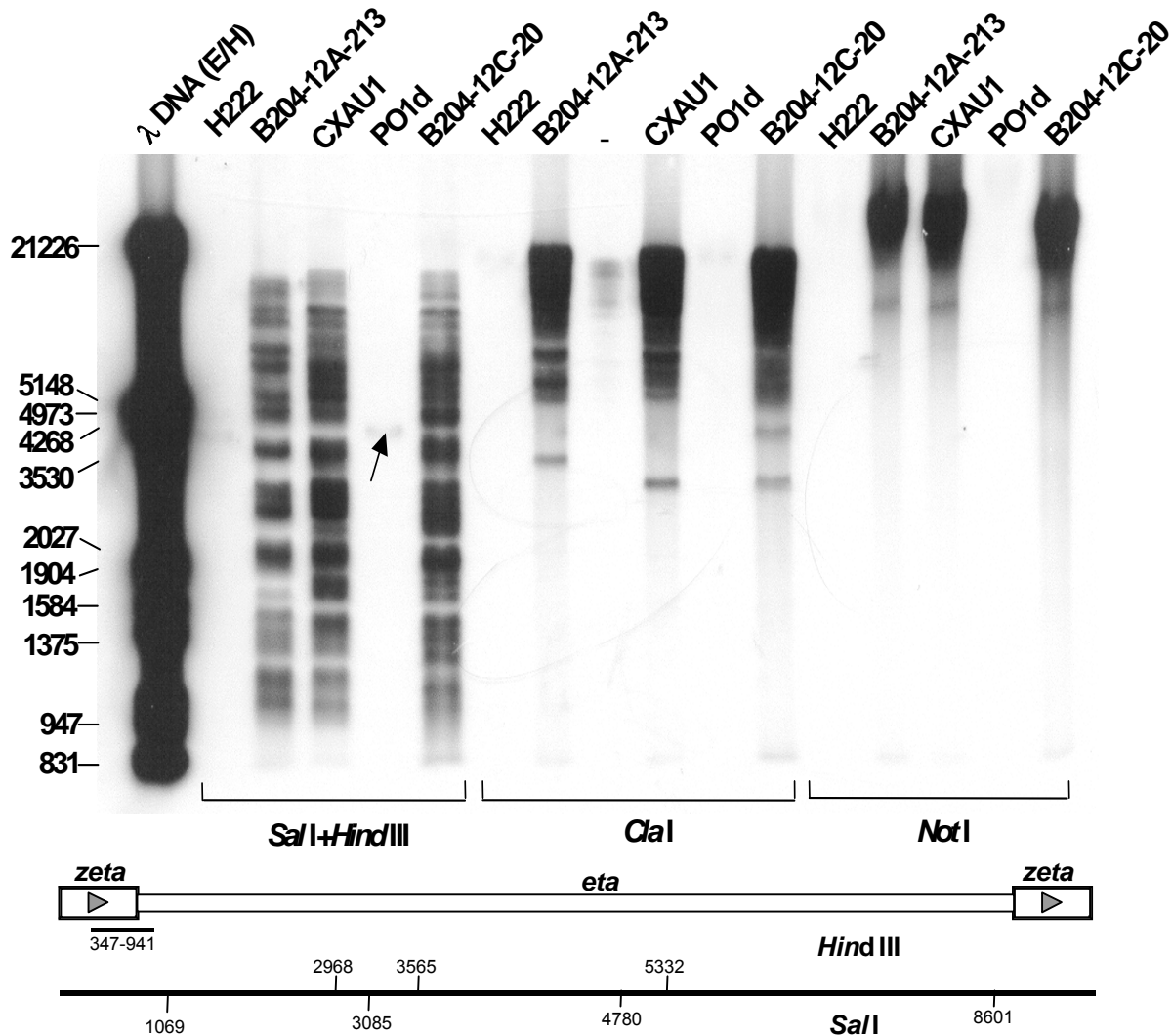


Abbildung 24: Nachweis des Vorkommens des Retrotransposons Ylt1 in verschiedenen Stämmen der Hefe *Y. lipolytica* mittels Southern-Hybridisierung. Die genomische DNA der Hefestämme B204-12C-20, B204-12A-213, PO1d, H222 und CXAU1 wurden mit den Restriktionsenzymen *Clal*, *NotI* und *SalI*+*HindIII* geschnitten. Die DNA-Fragmente wurden mit der Zeta-eta-Sonde hybridisiert. Die Sonde ist durch eine Linie unter dem *zeta-eta*-Bereich markiert. Als Molekulargewichts-Standard wurde λ DNA (mit *EcoRI* für E und *HindIII* für H verdaut) genutzt. Die Striche am unteren Balken sind Schnittstellen für *HindIII* (nach oben) und für *SalI* (nach unten).

Möglicherweise ist ein Teil der Hybridisierungen mit den kleineren Fragmenten durch das Vorhandensein degenerierter Retrotransposonen Ylt1 bedingt, die allerdings bisher noch

nicht nachgewiesen wurden. Diese Hybridisierung ergab ebenfalls keine Signale mit der *ClaI* verdauten DNA der Stämme H222 und PO1d.

Die Hybridisierung der mit den *HindIII*+*SalI* verdauten DNA mit der Zeta-eta-Sonde ergab eine Vielzahl von Banden mit sehr unterschiedlicher Intensität (Abbildung 24). Mit der ausgewählten Sonde sollte bei diesen Verdauungen die 3'- und 5'-Enden des Retrotransposons Ylt1 (Abbildungen 24, 25) mit angrenzenden Sequenzen sowie Solo-LTR's nachweisbar sein. Die unterschiedliche Intensität der Hybridisierungssignale wird somit durch eine zufällig gleiche Größe von *zeta*-enthaltenden Fragmenten erklärbar, da mit dieser Sonde keine internen Ylt1-Fragmente detektiert werden können. Die unterschiedlichen Banden in Abbildung 24 (links) können demnach auch entstanden sein, wenn eine Hybridisierung der Sonde mit Solo-LTR's erfolgte. Die Fragmente, auf denen diese Solo-LTR's liegen, können unterschiedlich lang sein, da *zeta* keine Schnittstellen für *HindIII* und *SalI* enthält und somit außerhalb von *zeta* liegende Schnittorte zur Entstehung der Fragmente führen. Neben Solo-LTR's hybridisieren auch die 5'- und 3'-Enden von Ylt1, die *zeta* und einen Teil von *eta* (bis zum nächstliegenden *SalI*-Ort) enthalten.

Im Gegensatz zum Stamm H222 und den Verdauungen mit *ClaI* und *NotI* konnte im Stamm PO1d ein schwaches Hybridisierungssignal mit ca. 4,5 kb detektiert werden (Abbildung 24, Pfeil). Das bedeutet, dass beide Stämme keine Kopie des Retrotransposons Ylt1 enthalten, aber im Stamm PO1d eine Sequenz vorhanden ist, die dem LTR oder dem 5'-Ende von *eta* ähnlich ist. Dies könnte daraufhin deuten, dass in PO1d ein weiteres Retrotransposon vorhanden ist. Zur Bestätigung der schwachen Hybridisierungsbande im Stamm PO1d und der Anwesenheit des Ylt1 in den drei Stämmen B204-12C-20, B204-12A-213 und CXAU1 wurden für eine weitere Southern Hybridisierung andere Restriktionsenzyme für den Verdau der genomischen DNA eingesetzt (Abbildung 25). Die genomische DNA wurde in diesem Fall mit den Restriktionsenzymen *SalI*, *HindIII* bzw. *HindIII*+*SalI* geschnitten. Diese Enzyme schneiden im *eta*-Bereich des Retrotransposons Ylt1 (siehe Abbildung 25, unten). Für die Hybridisierung wurde die Zeta-eta-Sonde wie im vorherigen Versuch verwendet. Mit dieser Southern Hybridisierung wurde das Vorkommen hoher Kopiezahlen des Retrotransposons Ylt1 bzw. von Solo-LTR's im Genom der Stämmen B204-12C-20, B204-12A-213 und CXAU1 bestätigt (Abbildung 25).

In den Stämmen B204-12C-20 und B204-12A-213 treten Unterschiede im Bandenmuster auf, obwohl sie beide direkt vom Stamm B204 abstammen. Diese Stämme sind aber zwei verschiedene Sporen aus einem Ascus des diploiden Stammes B204. Somit ist anzunehmen, dass es während der Meiose zu einer Umverteilung des Retrotransposons Ylt1 gekommen ist (die Elternstämme von B204 waren nicht isogen). Die Unterschiede in den Bandenmustern der beiden Stämmen könnten aber auch darauf hinweisen, dass das Retrotransposon Ylt1 seine Lage verändert hat.

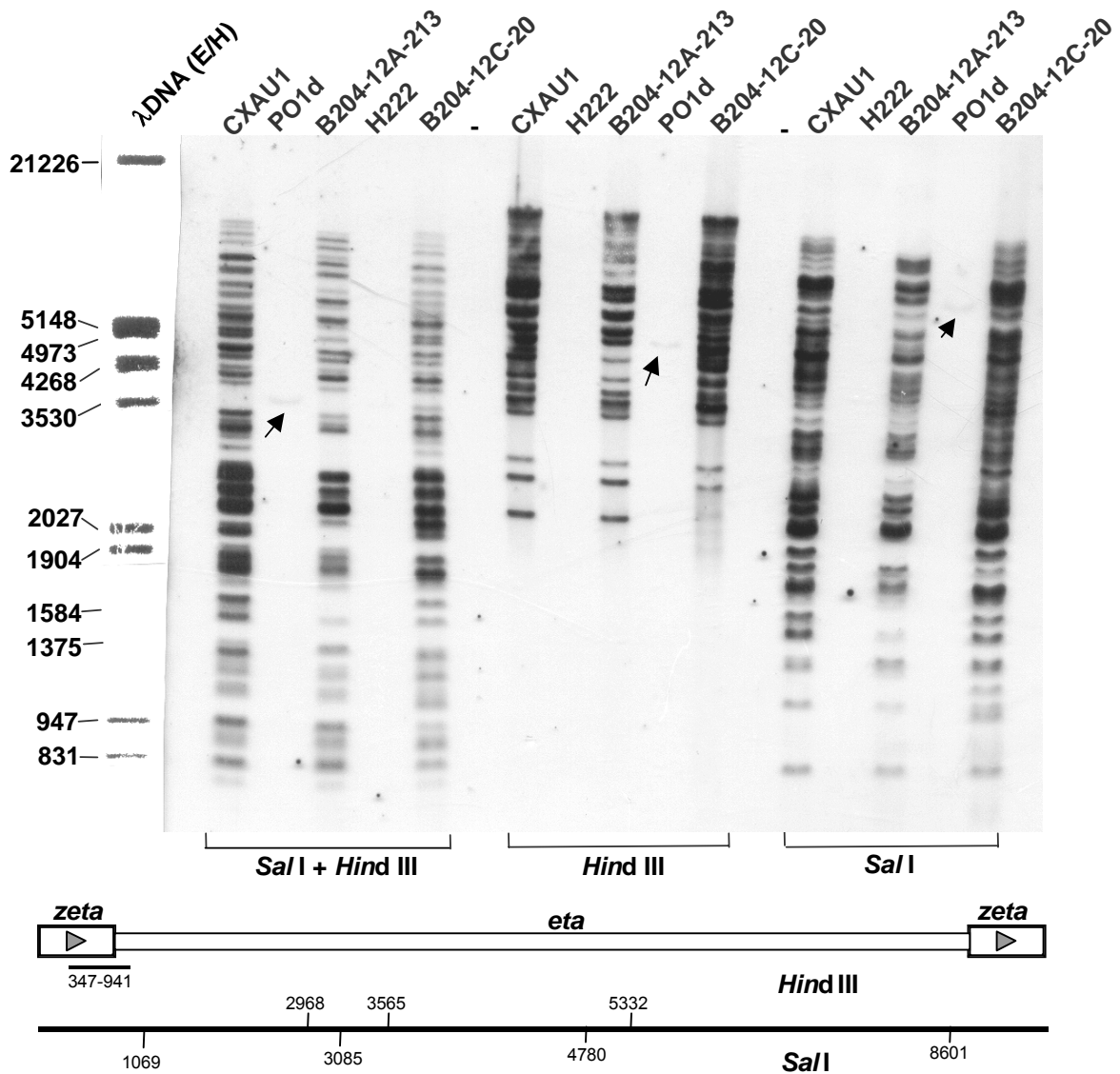


Abbildung 25: Nachweis der Existenz des Retrotransposons Ylt1 in verschiedenen Stämmen von *Y. lipolytica*. Die DNA-Fragmente wurden mit der Zeta-eta-Sonde hybridisiert. Die Sonde ist durch eine Linie unter dem *zeta-eta*-Bereich markiert. Als Molekulargewichts-Standard wurde λ DNA (mit *EcoRI* für E und *HindIII* für H verdaut) genutzt. Die Striche am unteren Balken sind Schnittstellen für *HindIII* (nach oben) und für *SalI* (nach unten). Die Pfeile markieren das Auftreten einer schwach reagierenden Bande im Stamm PO1d.

In der *HindIII*+*SalI* verdauten DNA des Stammes PO1d wurde erneut eine schwache Bande mit einer Größe von ca. 4,2 kb detektiert und in der *HindIII* verdauten DNA dieses Stammes wurde eine größere Bande mit mehr als 5 kb nachgewiesen (siehe Pfeile in Abbildung 25). Bei der Hybridisierung mit der *SalI* verdauten DNA entsteht eine Bande, welche größer als 10 kb ist. Dieses Ergebnis bestätigt, dass wahrscheinlich ein anderes Retrotransposon, welches eine geringe Homologie mit dem Retrotransposon Ylt1 aufweist, im vom Wildtyp W29 abgeleiteten Stamm PO1d existiert, die jedoch im Wildtypstamm H222 nicht oder nur sehr schwach nachweisbar ist.

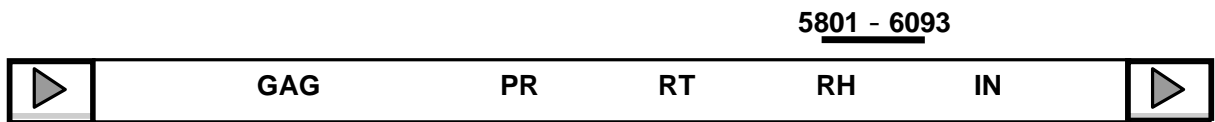


Abbildung 26: Die Sonde für den *pol*-Bereich des Ylt1. Die Pol-Sonde wurde vom internen Bereich des Retrotransposons Ylt1 mit den Primern *pol1* und *pol2* durch PCR amplifiziert und ist 292 bp groß (5801-6093 bp).

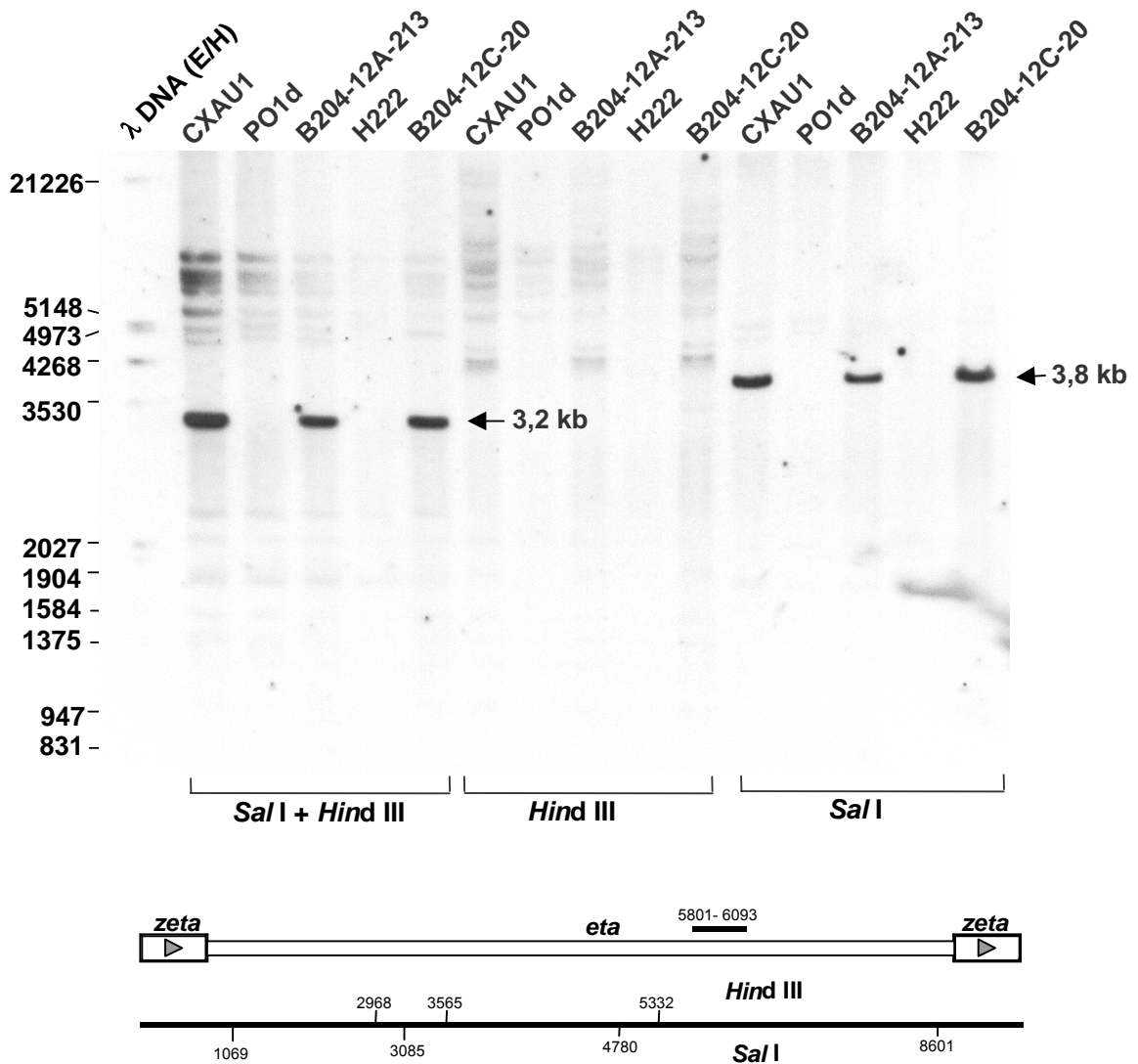


Abbildung 27: Nachweis des internen Bereiches des Retrotransposons Ylt1 in verschiedenen Stämmen der Hefe *Y. lipolytica*. Die genomische DNA der Stämme B204-12C-20, B204-12A-213, PO1d, H222 und CXAU1 wurde mit den Restriktionsenzymen *SalI*, *HindIII* und *SalI+HindIII* geschnitten und die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit der Pol-Sonde (5801 bis 6093 bp vgl. Abbildung 26) hybridisiert. Die Sonde ist durch eine Linie über dem *eta*-Bereich dargestellt. Bahn 1 λ DNA (*EcoRI*: E und *HindIII*: H verdaut) wurde als Molekulargewichts-Standard verwendet. Die Striche am unteren Balken zeigen die Schnittstellen für *HindIII* (nach oben) und für *SalI* (nach unten).

Um zu überprüfen, ob die das Pol-Protein kodierende Region von Ylt1 in den ausgewählten Stämmen größeren Veränderungen, wie z.B. Deletionen, unterliegt, wurde eine Sonde konstruiert, die Bereiche umfasst, die für die reverse Transkriptase und die RNase H kodieren (Abbildung 26). Wenn größere Veränderungen auftreten, sollten in der Southern Hybridisierung der mit *SalI* und *SalI+HindIII* verdauten DNA mehrere Banden auftreten. Wenn dies nicht erfolgt, wäre nur eine Bande zu erwarten. Die verwendete Sonde wurde von genomischer DNA des Stammes B204-12C-20 mit Hilfe der Primer *pol1* und *pol2* (vgl. Tabelle 4) amplifiziert.

Für diesen Versuch wurde die genomische DNA mit *SalI*, *HindIII* bzw. *SalI+HindIII* geschnitten und die geblottete DNA wurde mit der Pol-Sonde hybridisiert (Abbildung 27). In der unterschiedlich verdauten DNA der Hefestämme B204-12C-20, B204-12A-213 und CXAU1 wurde jeweils eine Bande deutlich detektiert. Diese Banden waren je nach Verdau ca. 3,2 kb (*SalI+HindIII* verdaute DNA) oder ca. 3,8 kb groß (*SalI* verdaute DNA) und entsprachen damit der erwarteten Größe. Die Enzyme *SalI* und *HindIII* schneiden mehrfach im *eta*-Bereich des Retrotransposons Ylt1 (Abbildung 27, unten). Weil keine weitere *HindIII*-Schnittstellen nach der Position 5332 bp des Ylt1 liegt, konnte keine einheitlich große Bande unter den *HindIII* verdauten DNA-Fragmenten detektiert werden. Die unterschiedliche Fragment-Größe hängt von den *HindIII*-Schnittstellen außerhalb des Retrotransposons Ylt1 ab. In allen hier getesteten Stämmen waren weitere schwach hybridisierende DNA-Fragmente zu erkennen, die ein ähnliches Bandenmuster in allen Stämmen ergaben. Da dies auch in den Stämmen PO1d und H222 (sehr schwach, da weniger DNA aufgetragen wurde) auftrat, die kein Ylt1 enthalten, wurde angenommen, dass diese Banden durch unspezifische Hybridisierungen entstanden waren.

In den bisher dargestellten Versuchen (Abbildungen 22-27) und in früheren Untersuchungen (Schmid-Berger *et al.*, 1994; Juretzek, 1999; Juretzek *et al.*, 2001; Augstein, 2001; Mauersberger und Augstein, persönliche Mitteilung) wurde das Vorkommen des Retrotransposons Ylt1 in verschiedenen Stämmen der Hefe *Y. lipolytica* durch Southern Hybridisierung nachgewiesen. Die dabei erzielten Resultate sind in der Tabelle 15 zusammengefasst und mit den bisher vorliegenden Daten aus der Genomsequenzierung von *Y. lipolytica* (Daten zu den Stämmen W29 und E150) und der Sequenzanalyse einzelner Gene (vgl. 3.2.2) verglichen.

Tabelle 15: Zusammenfassung zum Vorkommen des Retrotransposons Ylt1 in verschiedenen Stämmen von *Y. lipolytica*.

Resultate der Southern Hybridisierungen: + - Ylt1 oder Solo-LTR nachweisbar mit hohen Kopiezahlen; +/- - schwache Hybridisierung einzelner Banden mit geringer Kopiezahl, siehe Erläuterungen; - - nicht nachweisbar; n.b. - nicht untersucht. Erläuterungen: ¹⁾ - Daten dieser Arbeit (vgl. 3.2.1, Abbildungen 22-27); ²⁾ - Schmid-Berger *et al.* (1994); Schmid (1994); ³⁾ - Juretzek (1999); Juretzek *et al.* (2001); ⁴⁾ - Augstein (2001), Mauersberger und Augstein, pers. Mitteilung; ⁵⁾ - Nur eine mit der Zeta-Sonde hybridisierende Bande (Abbildung 22); ⁶⁾ - jeweils eine schwach hybridisierende Bande mit der Zeta-eta-Sonde (Abbildungen 24 und 25). Abkürzungen der Restriktionsenzyme: EV - *EcoRV*, EI - *EcoRI*, Bsl - *BsaAI*, NI - *NcoI*. Resultate der Sequenzierungen (vgl. 3.2.2 und Tabelle 16): + - Sequenzen von kompletten Ylt1 oder von Solo-LTR nachweisbar im Stamm E150 durch vollständige Genomsequenzierung (Projekt *Genolevures 2*, Casaregola *et al.*, 2003), im Stamm CX161-1B (Umgebung des *ALK2*-Genes AB010389), im Stamm B204-12C und seinen Derivaten (vollständige Ylt1-Sequenz AJ310725 und Sequenz des *GPR1*-Genbereiches X74146); - - keine Sequenz von kompletten Ylt1 oder von Solo-LTR *zeta* in der partiellen Genomsequenz von W29 nachweisbar (Daten aus dem Projekt *Genolevures 1*: Casaregola *et al.*, 2000; Neuveglise *et al.*, 2002); n.b. - keine Sequenzdaten bekannt.

Nachweis durch Southern Hybridisierung: Verwendete Sonden	Untersuchte <i>Y. lipolytica</i> -Stämme							
	H222	PO1d	W29	YB423-12 (H194)	H181	CXAU1, CX161-1B	B204-12C, B204-12C-20, B204-12C-112, B204-12A-213, B512-3	E150, E129
Zeta-Sonde (PCR-Fragment) ¹⁾	-	n.b.	-	+	+/- ⁵⁾	+	+	+
Zeta-eta-Sonde ¹⁾	-	+/- ⁶⁾	n.b.	n.b.	n.b.	+	+	n.b.
Pol-Sonde ¹⁾	-	-	n.b.	n.b.	n.b.	+	+	n.b.
EV-Bsl-Fragment des <i>zeta</i> ²⁾	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	+	n.b.
Fragment von <i>zeta</i> ³⁾	-	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	+	+
EV-NI-Fragment des <i>zeta</i> ⁴⁾	-	-	-	+	n.b.	+	+	+
Nachweis durch Genomsequenzierung oder die Sequenzierung einzelner Gene (<i>GPR1</i> , <i>ALK2</i>) bzw. des Ylt1	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	+	+	+

Mit den bisher eingesetzten Sonden für die *zeta-eta*- bzw. *pol*-Bereiche und den Sonden für das Fragment LTR *zeta* (als *EcoRV-NcoI*-, *EcoRV-BsaAI*-Fragmente bzw. als komplettes PCR-Fragment von *zeta*) wurde das Retrotransposon Ylt1 in den Stämmen CXAU1, CX161-1B (beide aus der Amerikanischen Laborstammlinie der CX-Stämme von Ogrydziak), B204-12C, B204-12A-213, B204-12C-20, B512-3 (Stämme B204 und seine Derivate, alle aus der Deutschen Laborstammlinie B von Barth), E129, E150 (beide aus der Französischen Laborstammlinie der E-Stämme von Gaillardin) sowie im Amerikanischen Wildtypstamm YB423-12 (Wickerham *et al.*, 1970) nachgewiesen. Diese Untersuchungen zeigten das Vorkommen hoher Kopiezahlen des Retrotransposons Ylt1 bzw. der daraus entstandenen Solo-LTR's im Genom der genannten Stämme (Abbildungen 22-27 und Tabelle 15). Diese Stämme entstanden durch unterschiedliche Inzuchtprogramme in verschiedenen Laboratorien (Deutsche Stammlinie, Amerikanische Stammlinie, Französische Stammlinie), jedoch wurden für alle drei Stammlinien die vom diploiden Stamm YB423 abgeleiteten haploiden Stämme YB423-3 (H195) oder YB423-12 (H194) als ursprüngliche Paarungspartner genutzt (vgl. 4.4, Abbildung 44). Diese Resultate zeigen eindeutig, dass das Retrotransposon Ylt1 ursprünglich aus dem von Wickerham isolierten diploiden Wildtypstamm YB423 herkommt.

Im Gegensatz dazu waren keine vollständigen Kopien des Retrotransposons Ylt1 in den Wildtypstämmen H222 (Naturisolat aus Deutschland), W29 (Naturisolat aus Frankreich) und dem direkt aus W29 abgeleiteten mehrfach auxotrophen Stamm PO1d sowie im Stamm H181 (Selektande eines Wildtypstammes) nachweisbar (Tabelle 15). Die hier dargestellten Versuchsergebnisse (Abbildungen 22-27) weisen jedoch auch auf das Vorkommen von weiteren Retrotransposonen mit geringer Ähnlichkeit zu Ylt1 oder ihrer degenerierten Varianten in den bisher untersuchten Wildtypstämmen aus Frankreich und Deutschland (W29 und sein Derivat PO1d, H181) hin, die jedoch offensichtlich in sehr geringer Kopiezahl vorkommen. Die Natur dieser anderen Retrotransposonen ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Die schwache positive Hybridisierung (eine Bande) mit der Zeta-Sonde im Stamm H181 ist der erste Nachweis eines Restes von Ylt1 oder eines verwandten Retroelementes in einem von YB423-12 (H194) verschiedenen Wildtypisolat.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen das Vorkommen des Retrotransposons Ylt1 in verschiedenen Stämmen von *Y. lipolytica*. Es ist bekannt, dass verschiedene Stämme von *Y. lipolytica* deutliche Unterschiede in der Länge der Chromosomen haben. Es wäre denkbar, dass auch die Aktivität des Retrotransposons Ylt1 zur Entstehung der unterschiedlich langen Chromosomen in Stämmen dieser Hefe führen kann.

3.2.2 Nachweis des Ylt1 in *Yarrowia lipolytica* Stämmen durch Sequenzierung

Die Anwesenheit des Retrotransposons Ylt1 in verschiedenen *Y. lipolytica*-Stämmen wird auch durch die bereits veröffentlichten Sequenzen einzelner Gene (GenBank-Daten X74146 für *GPR1* und AB010389 für *ALK2*), des kompletten Ylt1 (AJ310725, diese Arbeit) bzw. durch die laufenden Arbeiten zur Sequenzierung des gesamten Genoms dieser Hefe (Stämme E150 und W29, *Genolevures* 1 und 2, vgl. 1.5.3; Casaregola *et al.*, 2000, 2003; Barth *et al.*, 2003) gut belegt (Tabellen 15 und 16).

Die Arbeiten zur Genomsequenzierung zeigen viele Kopien des Retrotransposons Ylt1 im *Y. lipolytica*-Stamm E150 und seine vollständige Abwesenheit im Stamm W29 (Tabelle 15). Im Rahmen des Projektes *Genolevures* 1 erfolgte eine Sequenzierung von 4940 RSTs (*random sequence tags*) von etwa 1 kb aus dem Stamm W29 (Souciet *et al.*, 2000). Die Sequenzen sind unter <http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php> aufgeführt. Diese partielle Genomsequenz (ca. 4,9 Mb) des Stammes W29 enthält jedoch keine Sequenzen von kompletten Ylt1 oder von Solo-LTR *zeta* (Casaregola *et al.*, 2000; Neueglise *et al.*, 2002a,b). Die im Rahmen des Projektes *Genolevures* 2 (Casaregola *et al.*, 2003) kurz vor dem Abschluss stehende vollständige Sequenzierung des Stammes E150 erbrachte dagegen eindeutige Beweise für die Anwesenheit einer großen Zahl vollständiger Ylt1, teilweise degenerierter Ylt1 und vieler Kopien von Solo-LTR *zeta* im Genom dieses Stamm, was in guter Übereinstimmung mit den dargestellten Resultaten der Southern-Blots steht (vgl. 3.2.1; Tabelle 15). Diese Sequenzdaten (<http://genome.iouy.inra.fr/clib/consortium/>) sind noch nicht frei zugänglich, stehen den am Konsortium zur Sequenzierung von *Y. lipolytica* beteiligten Gruppen (u.a. auch unserer Arbeitsgruppe am Institut für Mikrobiologie der TU Dresden) zur Verfügung. Das Retrotransposon Ylt1 der Hefe *Y. lipolytica* wurde ursprünglich in der aus dem Stamm B204-12C abgeleiteten dominanten *GPR1*^d Mutante B204-12C-112 bei der Sequenzierung des Mutanten-Allels *GPR1-1* gefunden (Schmid-Berger *et al.*, 1994; Schmid 1994; Datenbankeintrag X74146). In allen bisher untersuchten Stämmen der Deutschen Stammlinie B von Barth (B204-12C und seine Derivate, B204-12A-213, B512-3) liegt eine Insertion des kompletten Ylt1 im Promotorbereich des *GPR1*-Genes (5'-I in Position -77 bp) in entgegengesetzter Richtung (stromaufwärts) liegend vor, was durch weitere Sequenzierungen der *GPR1*-Allele und durch entsprechende Southern Blots bestätigt werden konnte (Augstein, 2001; Augstein *et al.*, 2003; Mauersberger und Augstein, persönliche Mitteilung; vgl. Tabelle 16 und Abbildung 28). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte vollständige Sequenzierung des Retrotransposons Ylt1 aus dem Stamm B204-12C-20 (Datenbankeintrag AJ310725) und eine erste Analyse dieser Sequenz wurden bereits im Kapitel 3.1 näher beschrieben und belegen die Anwesenheit von kompletten Ylt1-Elementen in Stämmen der Stammlinie B von Barth (Tabellen 15 und 16).

Tabelle 16: Die Insertion des Retrotransposons Ylt1 in die Bereiche der Gene *GPR1* und *ALK2* in verschiedenen *Y. lipolytica* Stämmen. Insertion des Ylt1 in den Promotorbereich des *GPR1*-Gens (Daten aus Southern-Blots und Sequenzierung von *GPR1* - X74146, Augstein, 2001; Augstein *et al.*, 2003; Mauersberger und Augstein, persönliche Mitteilung; Ylt1- AJ310725, diese Arbeit; vgl. Abbildung 28); Insertion des Ylt1 in den Promotorbereich des *ALK2*-Gens (Daten aus der Sequenzierung des *ALK2* - AB010389 - und der Genomsequenzierung innerhalb der Projekte *Genolevures* 1 und 2; Iida, 1999; Iida *et al.*, 2000; Casaregola *et al.*, 2000, 2003; Neugeglise *et al.*, 2002; vgl. Tabelle 15 und Abbildung 29); Abkürzungen: WT - Wildtyp-Allele vorliegend, 5'-I – Insertion des Ylt1 im 5'-Bereich (5'-Insertion) beider Gene, n.b. – keine Daten.

Gen-Bereiche	<i>Yarrowia lipolytica</i> -Stämme						
	H222, H181	PO1d	W29	YB423-12 (H194)	CXAU1, CX161-1B	B204-12C, B204-12C-20, B204-12C-112, B204-12A-213, B512-3	E150, E129
<i>GPR1</i>	WT	WT	WT	5'-I	5'-I	5'-I	WT
<i>ALK2</i>	n.b.	n.b.	WT	n.b.	5'-I	n.b.	WT

Vergleichbare Insertionen von wahrscheinlich kompletten Ylt1-Retroelementen liegen offensichtlich auch in den Stämmen YB423-12 (H194) und CXAU1 vor (Tabelle 16). Interessanterweise enthalten die Stämme E150 und E129 jedoch keine Ylt1-Insertionen im *GPR1*-Gen (Wildtypallel von *GPR1* - WT), obwohl beide Stämme viele Kopien des Ylt1 tragen. In den Stämmen H222, H181, W29 und PO1d liegen ebenfalls Wildtyp-Allele von *GPR1* (WT) mit einem kompletten Promotor vor, da diese Stämme kein Ylt1 enthalten (Augstein, 2001; Augstein *et al.*, 2003, vgl. Tabellen 15 und 16). Demzufolge konnte das intakte *GPR1*-Gen mit dem vollständigen Promotor aus dem Stamm PO1d isoliert werden (Augstein, 2001; Augstein *et al.*, 2003; Datenbankeintrag AJ313508).

Die Insertion des Ylt1 in den Promotorbereich des *GPR1*-Gens in der Position -77 bp upstream, in den Stämmen B204-12C und den daraus erhaltenen Mutanten (*GPR1A*) führte zu einer deutlichen Verringerung der mit dem Reporterprotein β -Galactosidase bestimmten *GPR1*-Promotoraktivität (2-5 Miller-Units) im Vergleich mit dem vollständigen *GPR1*-Promotor (Allel *GPR1B*, 80-120 Miller-Units auf Glucose, 200-300 Miller-Units mit Ethanol oder Acetat) aus dem Stamm PO1d (Augstein, 2001; Augstein *et al.*, 2003).

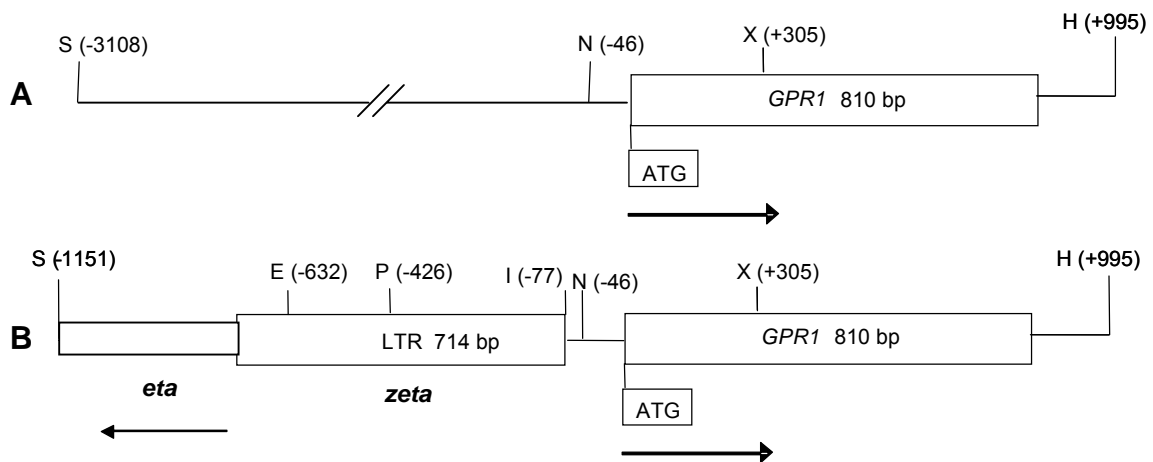


Abbildung 28: Die Insertion von Ylt1 in den Promotorbereich des *GPR1*-Genes (**B**) in den *Y. lipolytica*-Stämmen der Stammlinien B (X74146) und CX und H194 (YB423) im Vergleich mit dem vollständigen *GPR1*-Allel ohne 5'-Insertion (**A**) in den Stämmen PO1d, W29, E150, E129, H222 und H181 (modifiziert nach Schmid-Berger *et al.*, 1994; Augstein, 2001; Augstein *et al.*, 2003, vgl. Tabelle 16). Die Insertion (I) des Ylt1 im *GPR1*-Promotor erfolgte in der Position -77 bp ($5'$ -I). Die Pfeile zeigen die Richtung des offenen Leserasters (ORF) in *GPR1* und Ylt1 an. Abkürzungen - LTR: long terminal repeat, S: Sall, E: EcoRV, P: PstI, N: NcoI, X: XhoI, H: HindIII.

Eine Analyse der bisher vorliegenden Sequenzdaten (GenBank-Einträge und Daten der Genomsequenzierung der Stämme W29 und E150 im Rahmen der Projekte *Genolevures* 1 und 2, vgl. Kapitel 1.5.3) aus verschiedenen Stämmen von *Y. lipolytica* ergab, dass ein komplettes Retrotransposon Ylt1 z.B. auch im Bereich des Genes *ALK2* vorliegt, welches für ein alkan-induzierbares Cytochrome P450 aus der Genfamilie *CYP52* kodiert (Iida *et al.*, 2000; Tabellen 15 und 16; Abbildung 29). Das *ALK2*-Gen wurde aus dem Stamm CX161-1B isoliert und unter der Accession-Nummer AB010389 veröffentlicht. Die genauere Analyse dieser Sequenz von 3739 bp zeigte, dass wahrscheinlich ein intaktes Retrotransposons Ylt1 oberhalb des direkten Promotorbereiches des *ALK2*-Gens ($5'$ -Insertion) vorkommt (Tabelle 15 und 16, Abbildung 29). Wie im Falle der $5'$ -Insertion im *GPR1*-Gen liegen auch die Gene Ylt1 und *ALK2* in entgegengesetzter Richtung. Die Insertion erfolgte aber im Gegensatz zum *GPR1*-Gen in der Position -744 bp des Promotors von *ALK2*, was wahrscheinlich zu keiner so drastischen Veränderung der Promotoraktivität des *ALK2*-Gens führen sollte wie für die $5'$ -Insertion im *GPR1*-Gen beschrieben.

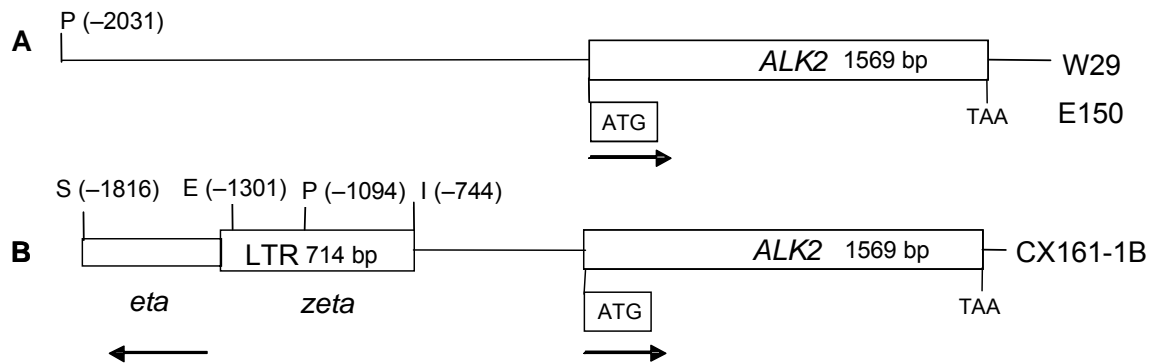


Abbildung 29: Die Insertion des Retrotransposons Ylt1 in den 5'-Bereich des *ALK2*-Genes in verschiedenen Stämmen von *Y. lipolytica*. Der Wildtypstamm W29 (A) enthält kein Ylt1 (Genomsequenzdaten *Genolevures* 1) und damit ein vollständiges Gen *ALK2*. Dieses Allel liegt auch im Stamm E150 vor (Genomsequenzdaten *Genolevures* 2, vgl. Tabelle 16). Die Insertion eines wahrscheinlich vollständigen Ylt1 liegt im Stamm CX161-1B (B) vor (GenBank AB010389). Die Insertion (I) des Ylt1 erfolgte in der Position -744 bp (5'-I). Die Pfeile zeigen die Richtung des offenen Leserahmens (ORF) in *ALK2* und Ylt1 an. Abkürzungen - LTR: long terminal repeat, *ALK2*: alkan-induzierbares Cytochrom P450 Gen aus der Genfamilie CYP52, beteiligt an der primären Oxidation von Alkanen (Alkanverwertung), ATG: Startcodon, TAA: Stopcodon, S: Sall, E: EcoRV, P: PstI.

Der Vergleich der Umgebung des *ALK2*-Genes in verschiedenen *Y. lipolytica* Stämmen lieferte ein weiteres anschauliches Beispiel für die Insertion eines vollständigen Ylt1 (Abbildung 29). Der Wildtypstamm W29 enthält kein Ylt1 (vgl. Southern-Daten in 3.2.1, Tabellen 15, 16; Genomsequenzdaten *Genolevures* 1: Casaregola *et al.*, 2000, Neuveglise *et al.*, 2002), somit liegt das Gen *ALK2* in diesem Stamm offensichtlich auch ohne 5'-Insertion des Ylt1 vor, obwohl keine Sequenzdaten des *ALK2*-Allels aus diesem Stamm vorhanden sind (Abbildung 29A). Die 5'-Insertion (5'-I) eines wahrscheinlich vollständigen Ylt1 in der Position -744 bp des *ALK2*-Genes (AB010389) liegt im Stamm CX161-1B vor (Abbildung 29B). Dieser Stamm ist ebenfalls mit dem Stamm YB423-12, dem ursprünglichen Träger des Ylt1, verwandt (vgl. 4.4, Abbildung 44).

Die Sequenz des *ALK2*-Gens wurde mit der RST-Datenbank und der uns jetzt vorliegenden Gesamtsequenz aller 6 Chromosomen des Stammes E150 (Genomsequenzierungs-Projekt *Genolevures* 2) verglichen. Das entsprechende *ALK2*-Allel liegt auf Chromosom VI (ORF von Position 213229 bis 211658) und zeigt absolute Homologie zum *ALK2*-Allel aus CX161-1B (523 Aminosäuren zu 100% identisch, 2 Basenaustausche). Der Stamm E150 enthält demnach an dieser Position keine Insertion des Ylt1 wie in CX161-1B (Abbildung 29A, vgl. Tabelle 16). Offensichtlich liegt in E150 noch das *ALK2*-Allel aus dem Stamm W29 vor, da der Stamm E150 aus einer Kreuzung von YB423-12 und W29 und der Stamm CX161-1B auch aus einer Kreuzung mit YB423-12 entstand (Abbildung 44). Eine Ausrekombination des Ylt1 aus dem *ALK2*-Allel des CX161-1B unter Zurücklassen einer Solo-LTR liegt demnach im Stamm E150 nicht vor. Die Promotorsequenzen des *ALK2*-Gens aus E150 und CX161-1B stimmen bis zur Position -744 bp weitgehend überein. Die Zielsequenz für die Integration des Ylt1 ist demnach auch in diesem Fall eine CATG-Sequenz (vgl. 3.1.5).

3.3 Vorkommen von verschiedenen Retrotransposonen in *Yarrowia lipolytica*

Neben den bereits unter 3.2 dargestellten Daten zum Vorkommen des Retrotransposons Ylt1 in verschiedenen Stämmen von *Y. lipolytica* (Tabellen 15 und 16) konnten vor allem durch die Arbeiten zur Genomsequenzierung dieser Hefe eindeutige Beweise für die Anwesenheit von weiteren Retroelementen gewonnen werden (Tabelle 17, vgl. auch Kapitel 1.5.7).

Die im Rahmen des Projektes *Genolevures 1* erhaltenen Daten zur Analyse der partiellen Genomsequenz des Wildtypstamm *Y. lipolytica* W29 (4940 RST's mit einer Gesamtlänge von ca. 4,9 Mb) wurden bereits teilweise publiziert (Casaregola *et al.*, 2000, 2002a,b; Neuveglise *et al.*, 2002a,b). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen zum Vorkommen von anderen Retroelementen in *Y. lipolytica* auf die uns vorliegende komplette Genomsequenz des Stammes E150 (Daten aus der Genomsequenzierung im Rahmen des Projektes *Genolevures 2*: 262.343 RST's zu insgesamt 232.031.544 bp assembliert als 6 Chromosomensequenzen zu insgesamt 20.329.008 bp) ausgedehnt (Tabelle 17).

Vertreter von Retrotransposonen der Ty1/*copia*-Superfamilie (Ty1/ Ty2, Ty4 und Ty5, vgl. Tabelle 1) wurden in der partiellen Genomsequenz von W29 nicht gefunden (Casaregola *et al.*, 2000a; Neuveglise *et al.*, 2002a). In der kompletten Genomsequenz des Stammes E150 finden sich jedoch einige wenige Sequenzen mit Homolgien zu den Vertretern der Ty1/*copia*-Superfamilie. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen (tblastn) mit Ty1B oder Ty2B zeigte nur wenige RSTs mit höheren Homologien über 25%. Ein RST ist zu 29 % identisch mit dem reversen Transkriptasebereich von Ty1 über 276 Aminosäuren, ein weiteres RST ist 26 % identisch mit diesem Bereich von Ty2 (288 Aminosäuren). Interessanterweise erhält man ca. 5 RSTs mit relativ guter Homologie (maximal 34% Identität und 58% Homologie inklusive konservative Austausch über 262 Aminosäuren) im Bereich von Integrase und reverse Transkriptase des Tca5 (Tabelle 17). Ob diese Homologiebereiche von bisher nicht bekannten Vertretern vollständiger Retrotransposonen der Ty1/*copia*-Superfamilie in der Hefe *Y. lipolytica* stammen, bedarf weiterer Untersuchungen.

Wie bereits weiter oben dargestellt, kommt das Retrotransposon Ylt1 des Typs *gypsy*/Ty3 in der partiellen Genomsequenz des Stammes W29 in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Southern-Blots (vgl. 3.2) nicht vor. In der kompletten Genomsequenz des Stammes E150 jedoch finden sich, wiederum in Übereinstimmung mit den Resultaten der Southern-Blots, viele Kopien kompletter Retrotransposonen Ylt1 und der daraus entstandenen Solo-LTR *zeta*. Aus den Sequenzdaten von E150 können mindestens 19 intakte Ylt1 und ebenso viele Solo-LTR über fast alle Chromosomen (Chromosom VI enthält kein intaktes Ylt1) verteilt nachgewiesen werden. Die Ylt1-Elemente kommen interessanterweise in zwei allelen Varianten im Genom von E150 vor, die sich durch eine Verschiebung im Leseraster infolge

Tabelle 17: Die Anwesenheit verschiedener Arten von Retrotransposonen in der Hefe *Y. lipolytica*.
¹⁾ – Daten für Ylt1 vgl. Tabellen 15 und 16 unter 3.2;
²⁾ – Die Ty13-Teilsequenz kommt in der Sequenzdatenbank des Stammes W29 vor (Genolevures 1, Casaregola *et al.*, 2000, Neuveglise *et al.*, 2002a,b), nicht jedoch im Stamm E150. Im Gegensatz dazu enthält die komplette Sequenzdatenbank des Stammes E150 (Genolevures 2, Casaregola *et al.*, 2003) das vollständige Retrotransposon Ty13B;
³⁾ – Anwesenheit von mindestens 18 Ylli im Stamm E150, die jedoch teilweise ein verkürztes 5'-Ende enthalten; Southern-Resultate aus Casaregola *et al.* (2002a);
⁴⁾ – Der Homologie-Vergleich der RSTs aus dem Stamm E150 ergab einige Homologien mit der Pol-Aminosäuresequenz von Ty1Bp, Ty2Bp und Tca5; Die partielle Datenbank des Stammes W29 enthält dagegen keine homologen Sequenzen (Neuveglise *et al.*, 2002);
⁵⁾ – Anwesenheit von mindestens 19 vollständigen Ylt1 im Stamm E150; davon gibt es zwei allele Varianten, die sich in Position 2213 durch Insertion eines G unterscheiden, vgl. 4.1;
⁶⁾ – Anwesenheit vieler Kopien von Solo-LTRyl1 in den Datenbanken beider Stämme, ohne Hinweise auf vollständige Retroelemente;
+ - vorhanden; - - nicht vorhanden; n.b. - nicht überprüft.

Retrotransposon	Größe (bp)	Methode	<i>Y. lipolytica</i> -Stämme			
			H222	W29 (CLIB89)	YB423-12 (H194), CX161-1B	E150
Ty1/copia-Gruppe (Ty1, Ty2, Ty4, Ty5 oder Tca5)		Sequenz	n.b.	- ⁴⁾	n.b.	+/- ⁴⁾
Ylt1 ¹⁾ (Ty3/gypsy-Typ)	9453	Sequenz	n.b.	- ⁵⁾	+	+ ⁵⁾
		Southern	-	-	+	+
Ty13 ²⁾ (Ty3/gypsy-Typ)	998, 911	Sequenz	n.b.	+	n.b.	+/-
Ty13B ²⁾ (Ty3/gypsy-Typ)	5108	Sequenz	n.b.	+/-	n.b.	+
LTRyl1 (Solo-LTR)	273	Sequenz	n.b.	+ ⁶⁾	n.b.	+ ⁶⁾
Ylli ³⁾ (LINE L1)	6942	Sequenz	n.b.	+	n.b.	+
		Southern ²⁾	+	+	+	n.b.

Deletion/Insertion eines Nukleotids G an der Position 2213 voneinander unterscheiden. Die Deletion eines G an dieser Position 2213 führt durch Verschiebung des Leserahmens zu einer wahrscheinlich inaktiven Form von Ylt1 (A. Kovalchuk, persönliche Mitteilung; vgl. Abbildung 40 unter 4.1).

In der partiellen Sequenz des Wildtypstammes *Y. lipolytica* W29 wurden im Gegensatz zur Abwesenheit von Ylt1 jedoch Teilsequenzen eines Ty3-ähnlichen Retrotransposons Tyl3 (AL414488 mit 998 bp und AL414575 mit 911 bp), mehrere Kopien eines einzeln vorkommenden Fragmentes LTRyl1 (273 bp, AJ439559) und Teilsequenzen des LINE-Elementes Ylli (AJ319752) gefunden und bereits veröffentlicht (Tabelle 17, Casaregola *et al.*, 2000, 2002a,b; Neuveglise *et al.*, 2002a,b).

Die Sequenzen AL414488 und AL414575 wurden aus insgesamt 7 RST's erhalten und überlappten in einem Bereich von 407 Nukleotiden. Die abgeleiteten Proteinsequenzen zeigten im Blast mit der NCBI-Datenbank gute Homologien mit der funktionellen Domäne der reversen Transkriptase (Contig 1 mit 371 bp aus 2 RST's) und insbesondere mit der RNase/Integrase-Domäne (Contig 2 mit 665 bp aus 3 RST's) aus dem Ty3B-Protein (*pol*-Bereich von Ty3, M34549) von *S. cerevisiae* in (ca. 32-33% Identität über 137 Aminosäuren bzw. 370 Aminosäuren). Das daraus abgeleitete Retrotransposonfragment in *Y. lipolytica* W29 wurde deshalb als Tyl3 bezeichnet, da es zur Ty3/*gypsy*-Superfamilie gehört. Das Tyl3 liegt in der Datenbank des Stammes W29 nur als Teilsequenz vor und ist wahrscheinlich degeneriert (nicht funktionell), da keine dazugehörigen LTR-Fragmente gefunden werden konnten (Casaregola *et al.*, 2000a; Neuveglise *et al.*, 2002a). Die Teilproteinsequenz von Tyl3 zeigt aber auch nur geringe Homologie (6 %) mit der Sequenz von Ylt1.

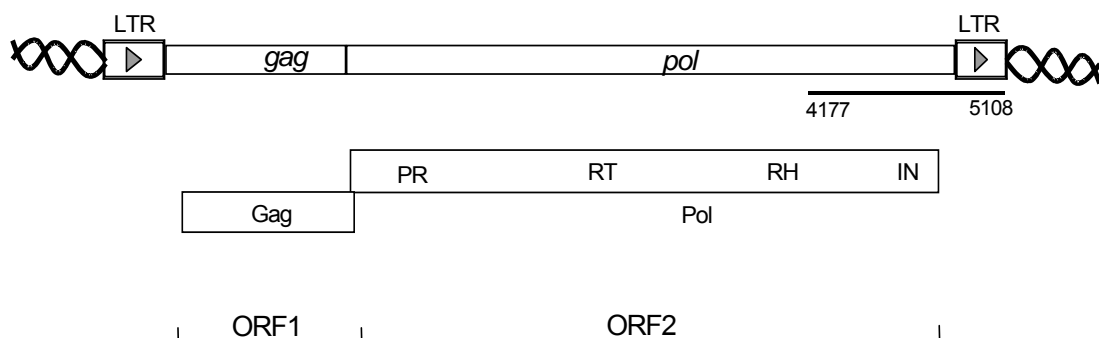


Abbildung 30: Struktur des neuen Retrotransposons Tyl3B aus *Y. lipolytica* E150. Dieses Retrotransposon des Ty3/*gypsy*-Typs besteht aus 4556 Nukleotiden der internen Region und wird von jeweils 276 Nukleotiden der LTRs flankiert. Das Tyl3B enthält zwei offene Leserahmen (ORF1: 357-1112 bp, ORF2: 1115-4822 bp), welche für Gag-Strukturprotein, sowie als Pol-Protein für Protease (PR), reverse Transkriptase (RT), RNase H (RH) und Integrase (IN) kodieren. Die beiden ORF werden durch einen –1 Frameshift getrennt translatiert. LTR - terminalen Sequenzwiederholungen. Der Balken unter der internen Region und dem 3'LTR stellt ist die zuerst aus RST's abgeleitete Teilsequenz mit hoher Homologie zum RH/IN-Protein des Ty3B-Proteins und des Tyl3-Proteins (vgl. Abbildung 31).

Interessanterweise wurden die für das Tyl3 in W29 kodierenden Nukleotid-Sequenzen AL414488 und AL414575 zunächst in der Gesamtsequenz des Stammes E150 nicht gefunden. Ein Homologie-Vergleich (tblastn) mit der abgeleiteten Tyl3-Proteinteilsequenz ergab jedoch auch für den Stamm E150 Hinweise auf das Vorkommen entsprechender homologer Tyl3-Sequenzen (7 RST's). Aus diesen RST's wurde ein Nukleotidsequenz von 984 bp abgeleitet, die als Teilsequenz eines weiteren Retrotransposons Tyl3B bezeichnet wurde, da die daraus erhaltene Proteinsequenz (265 Aminosäuren) die höchsten Homologien zur Ty3B-Proteinsequenz (Pol-Bereich) aus *S. cerevisiae* (32 % Identität über 213 Aminosäuren im RH/IN-Bereich) und zur Tyl3-Proteinsequenz aus *Y. lipolytica* (35-40 % Identität, 49-55 % Homologie mit konservativen Austauschungen über 217 oder 249 Aminosäuren) aufwies (vgl. Abbildung 31). Mit dieser Teilsequenz von Tyl3B konnte letztendlich die komplette Nukleotidsequenz des neuen Retrotransposons Tyl3B für *Y. lipolytica* aus der kompletten Genomsequenz des Stammes E150 erhalten werden (Tabelle 17, Abbildung 30, Gesamtsequenz des Tyl3B siehe Anhang 1). Das Retrotransposon Tyl3B ist 5108 bp lang und liegt auf dem Chromosom V. Das Tyl3B enthält entsprechende LTR's von 276 bp Länge und zwei Leserahmen für ein relativ kleines Gag-Protein (ORF1 Start bei 357 bp über 252 Aminosäuren, ca. 27 kDa) und ein Pol-Protein (ORF2 über 1235 Aminosäuren), welches durch einen -1 Frameshift-Mechanismus abgelesen wird (Abbildung 30). Offensichtlich liegt das Tyl3B nur als eine Kopie im Genom von *Y. lipolytica* E150 vor, was dafür spricht, das es nicht aktiv ist. Diese Daten stimmen mit neueren experimentellen Befunden von A. Kovalchuk überein. Weitere Untersuchungen zum Nachweis dieses Retrotransposons werden gegenwärtig durchgeführt (Kovalchuk, persönliche Mitteilung). Die Nukleotidsequenz des Tyl3B war in der Sequenzdatenbank des Stammes W29 nicht zu finden, ein tblastn ergibt jedoch erwartungsgemäß eine Reihe homologer Sequenzen (Tabelle 17).

```

Tyl3Bp : -----EAVYGYIPDGPIYASTRELTKVHHQMDAWMDKLRATISNSMHDRLIEHQRVQEN
Tyl3p  : GYSPFEVNYGFVPDGPAYESTFMMDRPHHQMDWELEKMKTVQGEVDRDRIVEMQGAQEA

Tyl3Bp : RVNQHRVPVAFQINDQVLVHRKAFFDKAKYAKMYDVYFGPFPIEKKIDTNVYKVQLPY
Tyl3p  : RVNQHRRDVSVKVGDMVLVHRKAYYNKGEDSKMHDVFFGYPYRALKQVYDNAFEVALPP

Tyl3Bp : DSTRHKNNINQHLKKFIPRPEYDINPPSTEYSQECSLHQITSLVGID--DDPYFVTWE
Tyl3p  : ESKRHRNNINQVFLKKYEERDEYLSQPPVHEEQQRANIHTIIVRFAGMDRENEEVLCTWE

Tyl3Bp : DCDPSIASSISKEMFHR--IPKDKRDSLLDQWNQFIKTPAESE-----
Tyl3p  : GCDPLIATPVPRALLEECMDPARLEQLTEDWLRWEKFFHEEVEREEQAELEQVMVEHPG

Tyl3Bp : -----DYVDIS
Tyl3p  : SVEEEDDEDHEDHVTES

```

Abbildung 31: Sequenzvergleich zwischen den Aminosäuresequenzen des RH/IN-Bereiches des Tyl3p aus dem Stamm W29 und des Tyl3Bp aus Stamm E150. Es zeigt sich eine hohe Homologie (35% Identität über 214 Aminosäuren) zwischen beiden Proteinssequenzen. Identische und hoch konservierte Aminosäuren sind schwarz schattiert. Geringe Homologie sind grau schattiert.

Aus der partiellen Genomsequenz des Stammes W29 (CLIB89) konnte aus 18 RST's das Vorkommen von vielen Kopien des einzeln vorkommenden Fragmentes LTRyl1 von 273 bp Länge mit den charakteristischen Sequenzwiederholungen TGTTG am 5'-Ende und CAATA am 3'-Ende (AJ439559, Casaregola *et al.*, 2000a; Neuveglise *et al.*, 2002a,b) abgeleitet werden. Ein Teil (5 von 18) dieser LTRyl1-Sequenzen sind von 5 bp-Sequenzwiederholungen umgeben, die wahrscheinlich die Integrationsstellenverdopplungen (TSD) darstellen. Im Genom des Stammes E150 wurde ebenfalls ein hohe Kopiezahl der LTRyl1-Sequenzen über alle Chromosomen verteilt gefunden, ohne irgendwelche Hinweise für die Anwesenheit entsprechender vollständiger Retroelemente zu erhalten (Tabelle 17). Dies spricht für den Verlust der ursprünglich vorhandenen vollständigen Retrotransposonen dieses Typs.

Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für das in vielen Kopien im Genom von *Y. lipolytica* vorkommende LINE-Element Ylli (steht für *Y. lipolytica* LINE-Element, AJ319752; vgl. Tabelle 17; Casaregola *et al.*, 2000, 2002a,b) erzielt werden. Dieses LTR-freie Retrotransposon Ylli wurde zuerst als Teilsequenz bei der Analyse der 4940 RST's aus *Y. lipolytica* W29 im Rahmen des Projektes *Genolevures* 1 durch ihre Homologie zu reversen Transkriptasen der LINE-Elemente von Säugern gefunden (Casaregola *et al.*, 2000) und nach weiterer Sequenzierung als vollständiges Retroelement näher charakterisiert (Casaregola *et al.*, 2002a). Es ist insgesamt 6942 bp lang und enthält in 2 offenen Leserahmen die charakteristischen Bereiche eines LTR-freien Retrotransposons, einen Cystein-reichen Bereich im ORF1, einen N-terminalen Endonuclease-Bereich, den zentralen Bereich der reversen Transkriptase und den Zink-Finger-Bereich am C-Terminus des ORF2. Die phylogenetische Analyse der RT-Domäne zeigte, dass das Ylli gemeinsam mit den LINE-Element Zorro-1 aus *C. albicans* (Goodwin *et al.*, 2001) zur L1 Gruppe der LINE-Elemente gehört. Das Ylli kommt im Genom von W29 mit bis zu 100 Kopien vor, davon sind aber nur relative wenige komplett und damit potentiell aktiv. Das Ylli wurde im Gegensatz zum LTR-Retrotransposon Ylt1 durch Southern Blot außer in W29 auch in den Stämmen H222 und CX161-1B nachgewiesen (Tabelle 17, Casaregola *et al.*, 2002a). Interessanterweise liegen die etwa 18 Kopien des Ylli in der vollständigen Genomsequenz des Stammes E150 in leicht modifizierter Form vor. Die Sequenz dieser Form des Ylli beginnt erst bei Position 677 bp und bricht bei ca. 6930 bp ab, im Vergleich mit der publizierten Sequenz AJ319752.

Aus der Genomsequenzierung des Stammes E150 konnte neben den genannten Retrotransposonen (Klasse I der Transposonen) kürzlich auch das Vorkommen einer MULE-Familie (für **M**utator-*like element*) als Vertreter der DNA-Transposonen (Klasse II der Transposonen, vgl. Einleitung) in der Hefe *Y. lipolytica* abgeleitet werden (Casaregola *et al.*,

2003). Der Nachweis dieser MULE-Elemente in anderen *Y. lipolytica* Stämmen steht noch aus.

Das Auftreten der Retrotransposonen Ylt1, Tyl3 und Tyl3B in *Y. lipolytica* und insbesondere das gleichzeitige Vorkommen von Ylt1 und Tyl3B im Stamm E150 zeigt, dass mehrere unterschiedliche Ty3/*gypsy*-Retrotransposonen in einem Stamm dieser Hefe vorkommen können, wie das auch für einige Retrotransposonen (Tca3, Tca8, Tca9 und Tca13) in *C. albicans* bereits gezeigt wurde (vgl. Tabelle 1). Mit dem Vorkommen von intakten oder rudimentären Vertretern weitere Superfamilien von LTR-Retrotransposonen (das keiner Familie zugeordnete Solo-LTRyl1), der LTR-freien Retrotransposonen Ylli (LINE-Elemente) und der MULE-Elemente (DNA-Transposon) weist die Hefe *Y. lipolytica* offensichtlich eine ungewöhnlich große Vielfalt an mobilen genetischen Elementen auf.

3.4 Die Transpositionsaktivität des Ylt1

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Transpositionsaktivität von Retrotransposonen durch Stress, toxische Agenzien und Umweltfaktoren induziert werden kann (Grandbastien, 1998). Mit den folgenden Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob eine Transpositionsaktivität des Retrotransposons Ylt1 anhand der Veränderung des Bandenmusters im Southern Blot beschrieben werden kann.

Schmid-Berger *et al.* (1994) haben in ihren Untersuchungen festgestellt, dass die Anzahl der auftretenden Essigsäure resistenten *gpr1*-Revertanten im Stamm B204-12C-112 während die Kultivierung im acetathaltigen Medium deutlich erhöht war im Vergleich zu Reversionsraten anderer Punktmutationen. Die Sequenzierung des *GPR1* Allels ergab, dass im Promotor dieses Gens eine Kopie des Retrotransposons Ylt1 insertiert ist. Obwohl bisher die Ursache der hohen Reversionsrate des *GPR1*-Allels noch nicht eindeutig geklärt ist, gibt es Hinweise, dass das Retrotransposon dazu beiträgt (Barth, persönliche Mitteilung). Deshalb wurde Acetat als potenzieller Induktor der Aktivität des Retrotransposons Ylt1 für die nachfolgenden Untersuchungen genutzt.

In diesen Untersuchungen wurde die Aktivität des Retrotransposons Ylt1 im Hefestamm B204-12C-20 unter folgenden Bedingungen getestet. Die Ylt1-enthaltenden Zellen wurden im flüssigen YPD Medium, Minimalmedium mit Glucose (MG) bzw. Acetat (MA) als C-Quelle kultiviert. Die Zellen jeder Kultur aus Minimalmedium mit den zwei verschiedenen Kohlenstoffquellen wurden auf YPD-Agarmedium ausgestrichen und jeweils vier Einzelkolonien ausgewählt. Wie in Material und Methoden (Kapitel 2.6.9) beschrieben, wurde aus diesen Isolaten die genomische DNA isoliert und anschließend mit *SalI*+*HindIII* geschnitten. Die dadurch entstandenen DNA-Fragmente wurden in einem 0,8 % Agarosegel getrennt, auf Nylon Membran geblottet und mit der Zeta-eta-Sonde hybridisiert (Abbildung 32). In der genomischen DNA aus den Zellen, welche im glucosehaltigen Minimalmedium

kultiviert wurden, konnte keine Bandenmusteränderung nachgewiesen werden. Dagegen wurde aber in der DNA von Zellen aus acetathaltigem Minimalmedium zwei neue Banden (Abbildung 32, markiert durch Pfeile) von etwa 0,85 bzw. 0,95 Kb detektiert.

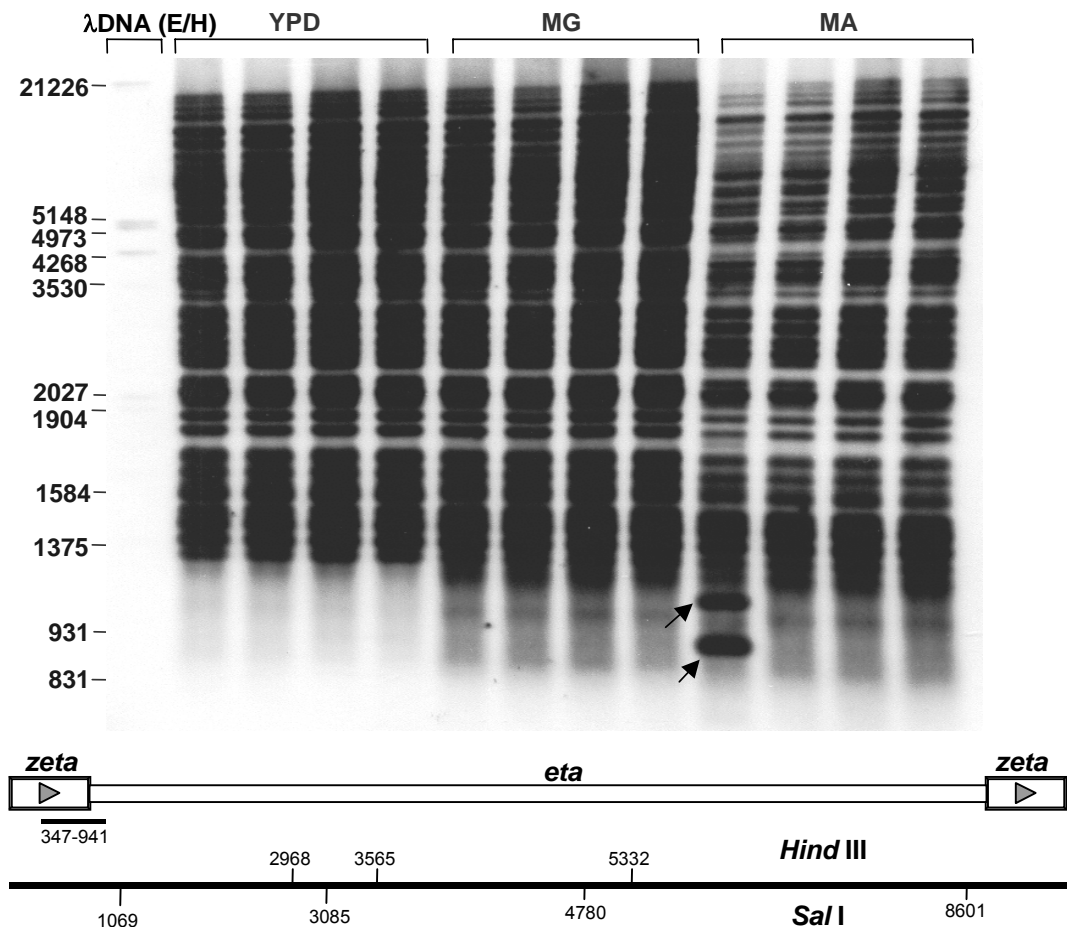


Abbildung 32: Southern Blot zum Nachweis der Aktivität des Retrotransposons Ylt1 in der Hefe *Y. lipolytica*. Der Hefestamm B204-12C-20 wurde in Medien mit verschiedenen C-Quellen kultiviert. Die genomische DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Sal*I+*Hind*III gespalten und die DNA-Fragmente mit der Zeta-eta-Sonde hybridisiert. MG: Minimalmedium mit Glucose; MA: Minimalmedium mit Natriumacetat. Als Molekulargewichts-Standard wurde λ DNA (mit *Eco*RI für E und *Hind*III für H verdaut) genutzt. Die Striche am unteren Blaken zeigen Schnittstellen für *Hind*III (nach oben) und für *Sal*I (nach unten) an. Die Sonde ist durch eine Linie unten dem *zeta-eta*-Bereich markiert.

Diese neuen Banden könnten durch eine interne Rekombination von Ylt1 entstanden sein. Dabei würde ein komplettes LTR mit 714 Bp am ursprünglichen Ort verbleiben. Da im LTR weder eine *Sal*I noch eine *Hind*III Schnittstelle vorhanden ist, müssten außerhalb des LTR liegende Schnittstellen zur Entstehung der detektierten neuen Banden führen. Da sich 852 bp vor dem 3'-Ende von Ylt1 eine Schnittstelle für *Sal*I befindet ist es aber auch vorstellbar, dass zumindest die größere Bande durch die Integration einer neuen Kopie von Ylt1 ins Genom entstanden sein könnte. Dies wäre der Fall, wenn sich unmittelbar nach dem 3'-Ende von Ylt1 eine Schnittstelle für *Sal*I oder *Hind*III in der genomischen DNA befinden würde.

3.5 Nachweis der Transpositionshäufigkeit des Ylt1

Es sollte getestet werden, ob die Aktivität des Retrotransposons Ylt1 erhöht werden kann, wenn die Zellen auf Acetat für einige Passagen kultiviert wurden. Dafür wurden die Zellen des Stammes B204-12C-20 im acetathaltigen Minimalmedium in drei Passagen kultiviert und anschließend die genomische DNA von Zellen aus 11 Einzelkolonien gewonnen und mittels Southern Hybridisierung untersucht.

In zehn von elf Proben war keine Bandenmusteränderung nachweisbar. Dagegen trat in der DNA-Probe auf Bahn 6 (Abbildung 33, Pfeil) eine Veränderung des Bandenmusters auf. Eine Bande von etwa 1,7 kb fehlte in dieser Bahn. Dies deutet erneut daraufhin, dass eine interne Rekombination des Ylt1 in Genom stattgefunden haben könnte.

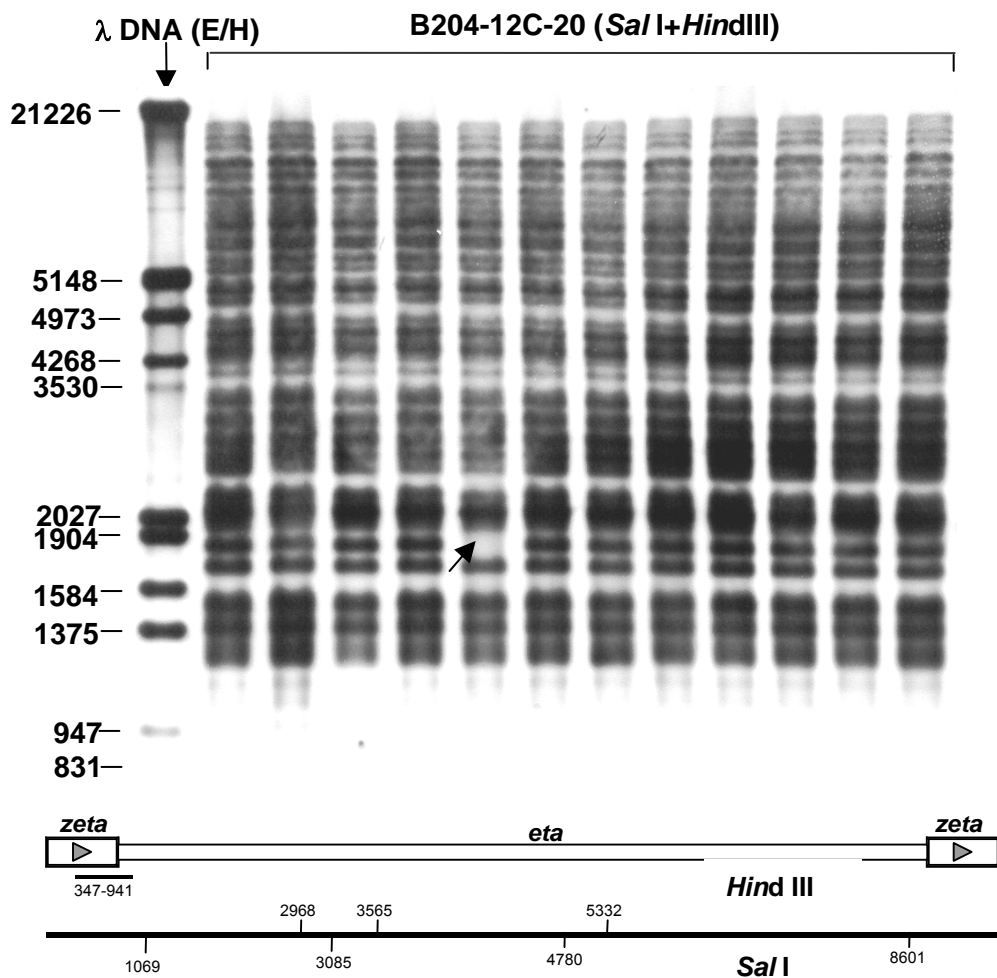


Abbildung 33: Einfluss der wiederholten Inkubation im acetathaltigen Minimalmedium auf die Aktivität des Retrotransposons Ylt1. Der Hefestamm B204-12C-20 wurde drei Passagen im acetathaltigen Minimalmedium kultiviert. Die genomische DNA wurde mit Restriktionsenzymen *Sal*I+*Hind*III gespalten und die DNA-Fragmente wurde mit der Zeta-eta-Sonde hybridisiert. Ein Isolat von YPD-Medium (Abbildung 33: erste Bahn nach dem Standard) und elf verschiedener Kolonien von acetathaltigem Minimalmedium. Als Molekulargewichts-Standard wurde λ DNA (mit *Eco*RI für E und *Hind*III für H verdaut) genutzt. Die Striche sind Schnittstellen für *Hind*III (nach oben) und für *Sal*I (nach unten). Die Sonde ist durch eine Linie unter dem *zeta-eta*-Bereich markiert.

3.6 Nachweis der Promotoraktivität des LTR von Ylt1 mit β -Galactosidase

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass Acetat als C-Quelle im Medium möglicherweise die Aktivität (Rekombination oder Transposition) positiv beeinflussen könnte. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Promotorsequenzen in der *zeta*-Region die Expression der Gene des Retrotransposons erhöhen. Deswegen wurde ein Fusionskonstrukt mit dem LTR als Promotor und dem *lacZ*-Gen aus *E. coli* als Reporter gen hergestellt, um die direkte Messung der Promotoraktivität der LTR-Sequenz zu ermöglichen. Als Terminator wurde der *GPR1*-Terminator verwendet (siehe Abbildung 34).

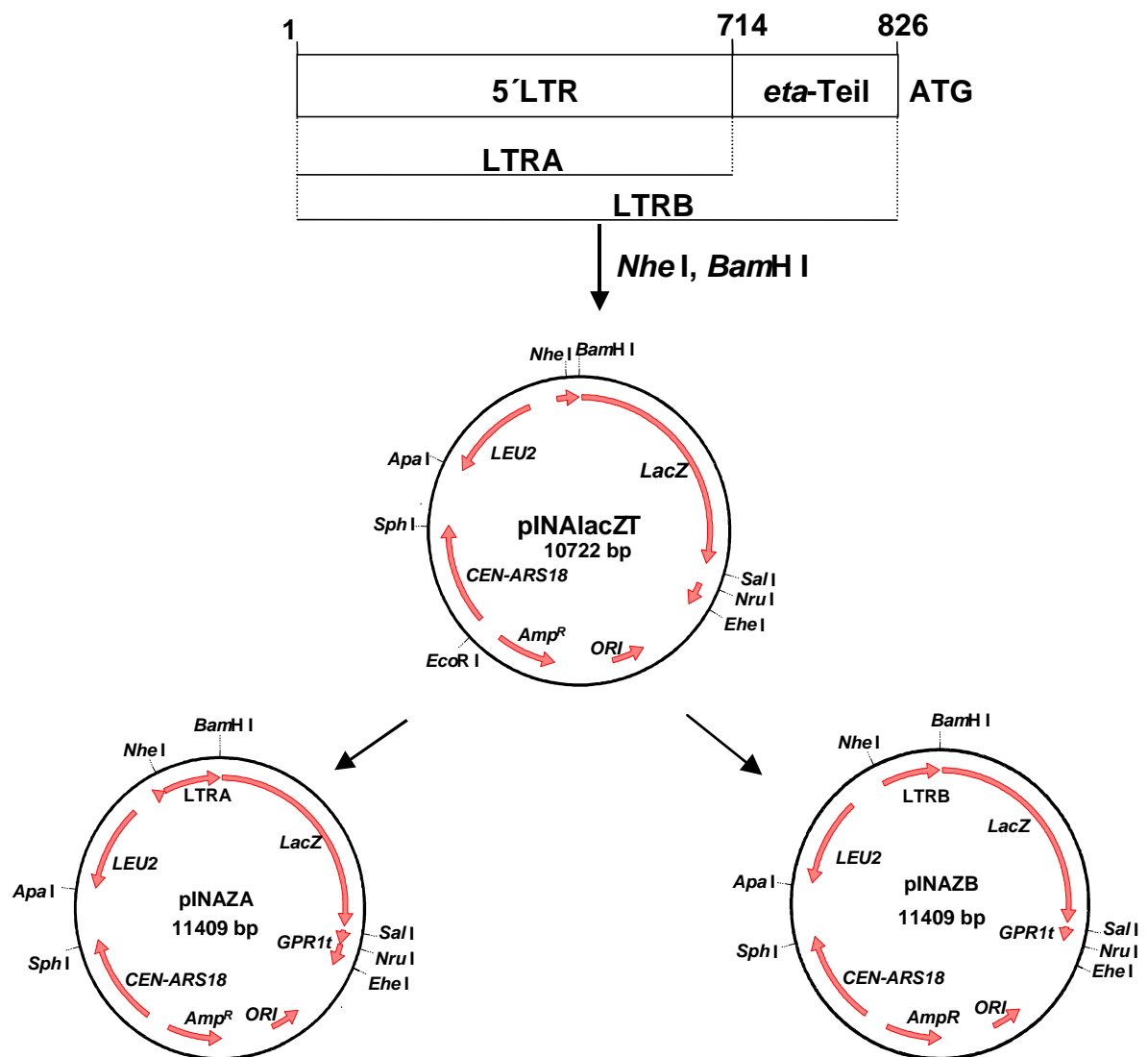


Abbildung 34: Konstruktion der LTR-*lacZ*-Fusionen in den Plasmiden pINAZA und pINAZB. Zwei verschiedene LTR-Fragmente wurden in pINA-lacZT vor das *lacZ*-Gen eingefügt.

Die LTR-Sequenz enthält die notwendigen Eigenschaften eines Promotors. Das erste mögliche Startcodon befindet sich an der Position von Nukleotid 826 bis 828, ca. 100 bp von 3'Ende des 5`LTR Bereiches entfernt. In diesen Untersuchungen sollte zugleich getestet werden, ob die Nukleotide zwischen der LTR Sequenz und dem vermuteten Startcodon eine wichtige Funktion für die Promotoraktivität haben. Deswegen wurden zwei verschiedene lange Sequenzen (LTRA und LTRB) vor dem *lacZ*-Gen integriert. LTRA besteht aus den Nukleotiden der Position von 1 bis 714 (dem „reinen“ LTR) und LTRB (1 bis 825 Nukleotide), das zusätzlich die Nukleotide enthält, welche sich zwischen dem LTR und dem ersten ATG befinden (Abbildung 34).

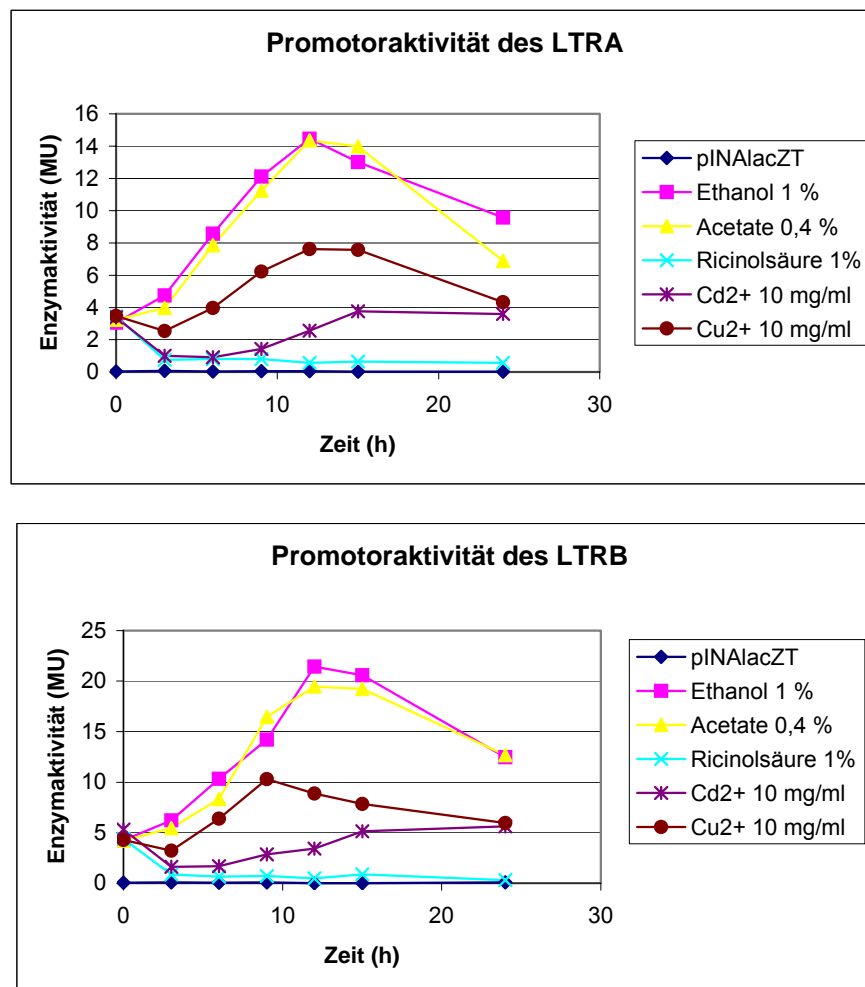


Abbildung 35: Aktivität des Reporterproteins β -Galactosidase, das von einer LTR-*lacZ*-Fusion exprimiert wurde. Transformanten des Stammes PO1d mit den Plasmiden pINAZA und pINAZB wurden auf Minimalmedien mit den Kohlenstoffquellen 1% Ethanol, 0,4% Acetat, 1% Ricinolsäure und auf 10 mg/ml Cd²⁺-haltigem bzw. Cu²⁺-haltigem Minimalmedium (Glucose als C-Quelle) kultiviert. Als Kontrolle wurden Transformanten mit pINAlacZT auf dem Medium MA verwendet.

Die konstruierten Plasmide pINAZA, pINAZB und pINAlacZT wurden als Kontrolle in den Ylt1-freien Stamm PO1d transformiert und drei einzelne Kolonien der Transformanden wurden für die β -Galactosidase-Messungen verwendet (Abbildung 35).

Die Promotoraktivität der LTR-Region sollte auf unterschiedlichen C-Quellen getestet werden. Vor der Induktion wurden die Transformanden auf glucosehaltigen Minimalmedium MG kultiviert, danach auf Minimalmedien mit verschiedenen C-Quellen bzw. Metallionen enthaltenden MG-Medium zur Induktion der Promotoraktivität übertragen. Die Transformanden wurden im Minimalmedium mit 0,4% Acetat (MA), mit 1% Ethanol (ME) oder 1% Ricinolsäure (MR) als C-Quelle kultiviert, um zu überprüfen, ob diese C-Quellen ebenfalls einen Effekt auf die Expression haben. In weiteren Versuchen sollte geprüft werden, ob starke Stressfaktoren wie Schwermetallionen die Expression beeinflussen können. Es wurde 10 mg/ml Cd^{2+} bzw. 10 mg/ml Cu^{2+} dem glucosehaltigen Medium MG zugegeben. Cadmium ist sehr toxisch für die Zellen. Im Gegensatz können die Kupferionen, die als Kofaktor für einige Proteine essentiell sind, von der Hefezelle besser toleriert werden. Die Aktivität der β -Galactosidase wurde in Form von Miller Units (MU) ab dem Zeitpunkt Null des Umsetzens auf das neue Medium gemessen. Das Ergebnisse zeigten, dass die β -Galactosidaseaktivität auf glucosehaltigen Medium etwa $3,2 \pm 0,2$ MU für LTRA und etwa $4,2 \pm 0,2$ MU für LTRB betrug. Auf Ricinolsäure- und Cd^{2+} -haltigem Medium war die Aktivität nicht messbar. Auf Cu^{2+} -haltigem Medium wurde eine Aktivität von $7,6 \pm 0,6$ MU für LTRA und von $10,3 \pm 1,0$ MU für LTRB gemessen. Eine etwas höhere Aktivität der β -Galactosidase wurde auf acetathaltigem Medien mit $14,3 \pm 0,7$ MU für LTRA und $19,5 \pm 1,3$ MU für LTRB gemessen. Die Enzymaktivität auf dem ethanolhaltigen Medium lag bei $14,5 \pm 0,3$ MU für LTRA und $21,4 \pm 1,9$ MU für LTRB (Abbildung 35).

In allen getesteten Medien konnte nur eine sehr geringe Promotoraktivität der beiden LTR enthaltenden Sequenzen anhand der β -Galaktosidaseaktivität detektiert werden. Dennoch konnte gezeigt werden, dass auf acetat- und ethanolhaltigen Medien eine vier- bis fünffache Steigerung gegenüber glucosehaltigen Medien auftritt. Weiterhin gibt es geringe Unterschiede in der Promotoraktivität zwischen LTRA und LTRB. Die Promotoraktivität ist insgesamt sehr niedrig, dennoch ist zu erkennen, dass die Promotoraktivität von LTRB etwashöher ist im Vergleich zu LTRA. Möglicherweise hat die Sequenz zwischen LTR und ATG eine bestimmte Funktion, die für die Expression benötigt wird.

3.7 Die natürlichen Transkriptionsprodukte des Retrotransposons Ylt1

Abgeleitet vom vorhandenen offenen Leserahmen sollte eine lange mRNA des Retrotransposons Ylt1 von 8 Kb nachweisbar sein. Aus der Literatur ist bekannt (Boeke und Sandmeyer, 1991), dass die Transpositionsrate bei verschiedenen Retroelementen deutliche

Unterschiede zeigt. Die mRNA des Retrotransposons kann relativ gering gebildet werden oder wie zum Beispiel bei Ty1 bis zu 1% der gesamten mRNA der Zellen ausmachen. In den nachfolgenden Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob eine mRNA von Retrotransposon Ylt1 in *Y. lipolytica* nachweisbar ist.

Zum Erreichen des Ziels wurde sowohl die gesamte RNA als auch gesamte mRNA der Hefe isoliert. Dazu wurde der Ylt1-enthaltende Stamm B204-12C-20 auf Glucose als Kohlenstoffquelle kultiviert, und danach zur Induktion die Aktivität des Retrotransposons Ylt1 auf acetathaltigen Minimalmedium transferiert. Die gesamte RNA bzw. mRNA wurde isoliert und in einem Formaldehyd-Agarosegel getrennt. Die auf eine Nylon-Membran übertragende und fixierte mRNA wurde jeweils mit den verschiedenen Fragmente des *gag*-Bereiches oder *pol*-Bereiches mittels Northern Blot hybridisiert. Die eingesetzten Sonden wurden mit Hilfe von Primern Orf1a – Orf1b bis Orf8a – Orf8b (a: forward und b: revers) von genomischer DNA des Stammes B204-12C-20 amplifiziert.

Es konnte keine Banden detektiert werden. Das heißt, dass die mRNA unter den ausgewählten Bedingungen nicht ausreichend vorhanden ist, um sie nachweisen zu können. Wie bereits die Bestimmung der β -Galactosidaseaktivitäten gezeigt hat erfolgt möglicherweise die Transkription des Ylt1 auf einem niedrigen Niveau. Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung überein, dass das LTR ein schwacher Promotor ist. Dies könnte eine Ursache dafür sein, dass die mRNA nicht nachweisbar ist. Möglicherweise könnte aber auch bei der Präparation die mRNA wegen ihrer Bindung an das Gag-Protein verloren gegangen sein. Die gute Qualität der mRNA-Präparation und des Membrantransfers wurden mit Hilfe der *ICL1*-mRNA nachgewiesen, die mit einer DNA-Sonde des *ICL1*-Gens sehr gut detektierbar war (Ergebnis nicht dargestellt).

3.8 Nachweis von Translationsprodukten des Retrotransposons Ylt1

Die unter 3.7 dargestellten Resultate zeigten, dass die Expression des Ylt1 offensichtlich sehr schwach ist. Um dennoch die Translationsprodukte des Retrotransposons Ylt1 untersuchen zu können, wurde in den weiteren Untersuchungen versucht, den offenen Leserahmen des Retrotransposons mit Hilfe des starken und regulierbaren Promotors des *ICL1*-Genes zu exprimieren.

3.8.1 Konstruktion des Expressionsvektors pYLIMCS

Für die Untersuchung der Produkte des Retrotransposons Ylt1 wurde der gut regulierbare Promotor des *ICL1*-Gens ausgewählt, der in Medien mit Acetat oder Ethanol besonders stark induziert wird. Der offene Leserahmen aus dem *eta*-Bereich des Ylt1 sollte in den Vektor pYL131D eingefügt werden, der den vollständigen *ICL1* Promotor enthält. Die Schnittstellen des Plasmides waren aber nicht verwendbar, da die relevanten Schnittstellen des Plasmides auch im internen Bereich des Retrotransposons Ylt1 existieren und somit nicht zur Klonierung verwendet werden konnten. Deshalb wurde der neue Expressionsvektor pYLIMCS konstruiert (Abbildung 36).

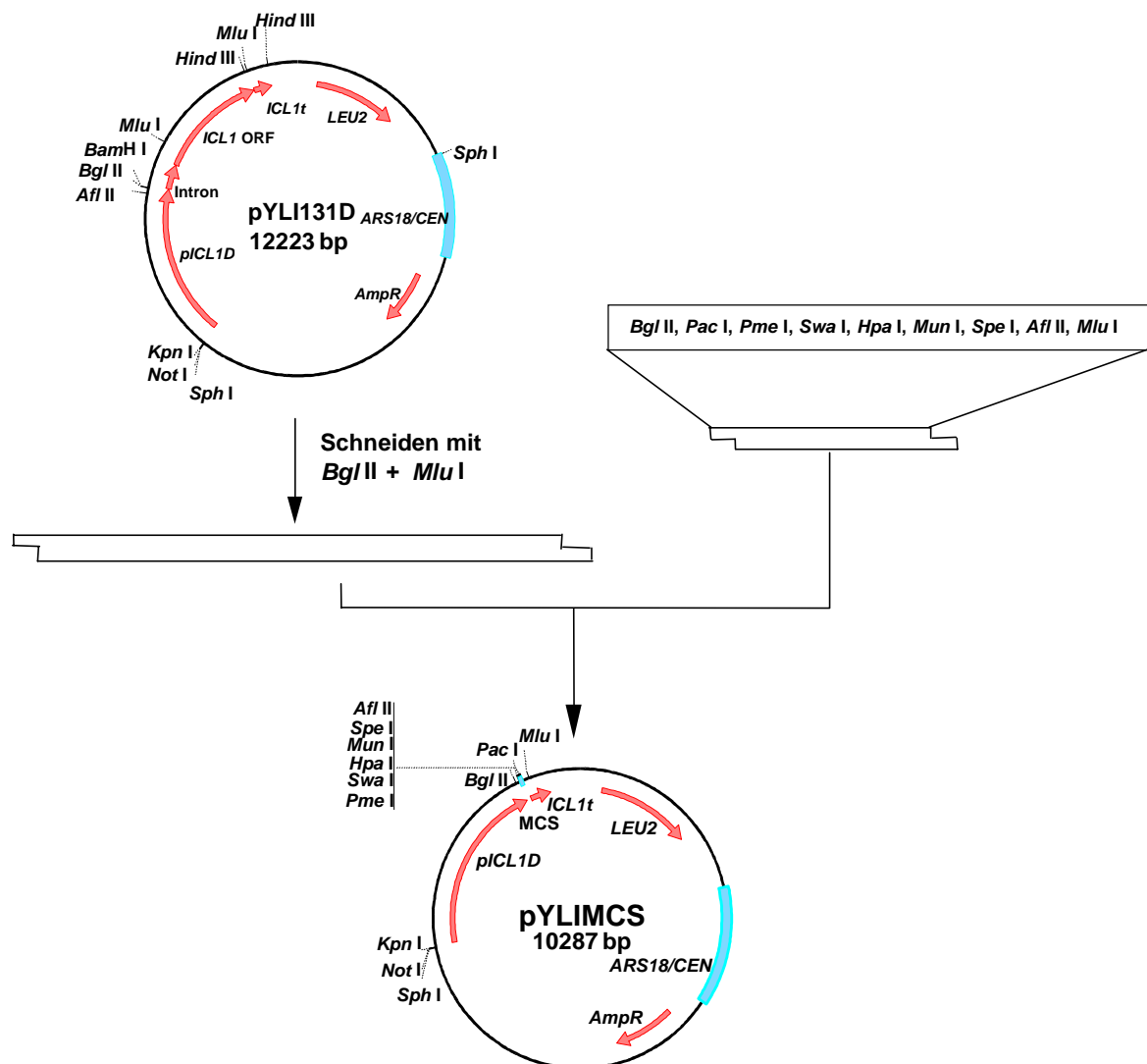


Abbildung 36: Die Konstruktion des Expressionsvektors pYLIMCS aus dem Vektor pYL131D. Nach Öffnen des Vektors pYL131D mit *BglII* und *MluI* wurde das die angegebenen Multiklonierungsstelle tragende Oligonukleotid-Fragment MCS von 155 bp Länge eingefügt. Der resultierende Vektor pYLIMCS ist 10.287 bp groß. *pICL1D* – vollständiger *ICL1*-Promotor D ohne Intron, *ICL1t* - *ICL1*-Terminator; *ARS18/CEN* – autonom replizierende Sequenz ARS18 für *Y. lipolytica* gekoppelt mit einer Centromerregion *CEN*, *LEU2* – *LEU2* Gen aus *Y. lipolytica*, *Amp^R* – Ampicillinresistenzgen aus *E. coli*.

Das *ICL1* Intron und der *ICL1*-ORF wurden mit *Bgl*II und *Mlu*I aus dem Ausgangvektor pYLI131D herausgeschnitten und durch das ebenso geschnittene, 155 bp lange DNA-Fragment MCS aus dem Plasmid pCR-Script Amp (enthält das synthetische Oligonukleotid MCS, Entelechon GmBH, vgl. Tabelle 4) ersetzt. Das Oligonukleotid-Fragment MCS enthält eine Multi-Klonierungsstelle für die Enzyme *Afl*III (*Bsp*TI), *Spe*I (*Bcu*I), *Mun*I, *Hpa*I (*Ksp*AI), *Swa*I (*Smi*I), *Pme*I (*Mss*I) und *Pac*I (Abbildung 36, vgl. 2.7.1). Der resultierende Vektor pYLIMCS wurde zur Konstruktion der Expressionsvektoren pYLEHC für die Expression des kompletten, mit HA- und cmyc-Tags markierten ORF des *eta*-Bereichs und pYLIG für die Expression des Integrase-Bereichs als GFP-Fusion genutzt (vgl. 3.8.2 und 3.8.3).

3.8.2 Nachweis der Translationsprodukte des *eta*-Bereiches

Um potentielle Translationsprodukte des einzigen langen ORF des *eta*-Bereiches von Ylt1 nachweisen zu können, wurde in den nachfolgenden Untersuchungen die Expression des gesamten ORF mit Hilfe des Vektors pYLEHC (Abbildung 51) unter der Kontrolle des starken und regulierbaren *ICL1*-Promotors (*pICL1*) durchgeführt. Dabei konnte die Expression eines Gag-Protease-Fusionsproteins gezeigt werden (Abbildung 37). In weiteren Versuchen konnte zusätzlich die Expression des Integrase-Bereichs als GFP-Fusionsprotein (INT-GFP) mit Hilfe des Vektors pYLIG gezeigt werden (vgl. 3.8.3, Abbildung 39).

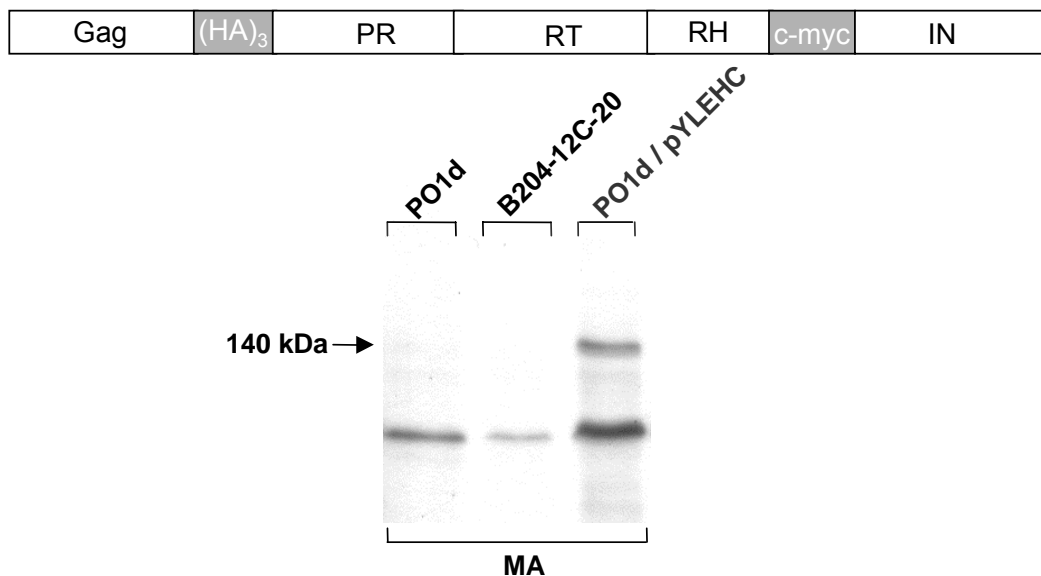


Abbildung 37: Nachweis eines Translationsproduktes des Retrotransposons Ylt1 mit dem Expressionsvektor pYLEHC im Western Blot. Der Balken im oberen Teil stellt den im Plasmid pYLEHC vorliegenden modifizierten ORF des *eta*-Bereiches des Ylt1 dar. Das Plasmid pYLEHC (*eta*-(HA)₃-c-myc-Konstrukt unter Kontrolle des *pICL1*) wurde in den Stamm PO1d transformiert. Die Transformante PO1d/pYLEHC und die Kontrollstämme PO1d und B204-12C-20 wurden über 12 h im acetathaltigen Minimalmedium (MA) kultiviert und danach ein Zellextrakt (vgl. 2.8.1) für den Western Blot hergestellt. Die Detektion erfolgte mit Anti-HA-Antikörpern. Ein Protein in der Größe von 140 kDa (Pfeil) konnte in PO1d/pYLEHC deutlich nachgewiesen werden, neben einer kleineren unspezifischen Bande in allen Stämmen.

Da kein Antikörper gegen das Gag-Protein des Retrotransposons Ylt1 zur Verfügung stand, wurde der ORF von Ylt1 mit den Epitopen (HA)₃ (kurz HA-Tag genannt) oder c-myc zur Detektion mit Antikörpern fusioniert. Das HA-Tag wurde in der Position von Nukleotid 2577 (*XhoI*) bis 2729 (*MunI*) des kompletten Ylt1 zwischen Gag und Protease wie unter vgl. 2.7.2 beschrieben eingefügt, um das Gag-Protein zu markieren (Abbildungen 37 und 46). In diesem Bereich existiert jedoch die potentielle Protease-Schnittstelle Leu-Pro-Val, welche als eine Erkennungsstelle für die Protease des Virus HIV-2 beschrieben wurde (Pear und Taylo, 1987). Das HA-Tag wurde dennoch an dieser Stelle integriert, weil kein anderer geeigneter Bereich für die Integration gefunden werden konnte. Dies könnte allerdings bewirken, dass die Schnittstelle von der Ylt1 kodierten Protease nicht mehr erkannt wird und somit keine Trennung des Gag-Proteins von der Protease erfolgen kann. Um die Untersuchung des Polyproteins zu ermöglichen, wurde zusätzlich zum HA-Tag ein c-myc-Tag in der Position von Nukleotid 5940 (*HpaI*) bis 6010 (*ApaI*) vor der Integrase wie unter vgl. 2.7.2 beschrieben eingefügt (Abbildungen 37 und 46). Das dadurch entstandene *eta*-(HA)₃-c-myc-Fragment wurde in das Plasmid pYLIMCS (Abbildungen 7 und 36) integriert. Der resultierende Vektor pYLEHC wurde nach Transformation in den Stamm PO1d erfolgreich zur Expression des mit HA- und c-myc-Tags markierten offenen Leserahmens des *eta*-Bereiches von Ylt1 unter Kontrolle des Promotors pICL1 eingesetzt (Abbildung 37). Die im Expressionsvektor pYLEHC durch die Einführung der HA- und c-myc-Epitope veränderten Bereiche des Ylt1 ORF führten zu keiner Veränderung des durchgehenden Leserasters und nur zu geringfügigen Veränderungen der erwarteten Protein-Molekulargewichte, was durch Sequenzierung dieser DNA-Bereiche überprüft wurde.

Die replikativen Transformanden des Ylt1-freien Stammes PO1d mit dem Expressionsplasmid pYLEHC (PO1d/pYLEHC) und entsprechende Plasmid-freie Kontrollstämme (PO1d, B204-12C-20) wurden nach MG-Vorkultur in Minimalmedium mit Acetat als Kohlenstoffquelle (MA) etwa 12 h kultiviert. Der Stamm PO1d wurde für diese Versuche ausgewählt, weil er im Gegensatz zu anderen verfügbaren Rezipientenstämmen (B204-12C und Derivate, E150, E129) zur Vermeidung von unerwünschten Interaktionen kein endogenes Retrotransposon Ylt1 enthält und gut auf Acetat bzw. Ethanol wachsen kann. Die wie unter 2.8.1 gewonnenen Proteine des Zellextraktes wurden gelelektrophoretisch im PAGE getrennt und im Western-Blot mit Anti-HA-Antikörpern bzw. Anti-c-myc-Antikörpern detektiert (Abbildung 37).

Aus der DNA-Sequenz des ORFs von Ylt1 kann das Auftreten eines Polyproteins (mit Gag) mit einer Größe von etwa 300 kDa bzw. eines Gag-Proteins von etwa 90 kDa und weiterer Einzelproteine des *pol*-Bereiches erwartet werden, die jedoch mit den eingesetzten Antikörpern nicht alle nachweisbar sind (Abbildung 37 und 46). Im Western Blot war jedoch nur ein Protein mit einer Größe von 140 kDa mit dem Anti-HA-Antikörper nachweisbar. Die

Bande von 140 kDa könnte darauf hindeuten, dass das Gag-Protein (ca. 90 kDa) und die Protease (ca. 50 kDa) gemeinsam als Fusionsprotein translatiert wurden. Es ist aber nicht auszuschließen, dass möglicherweise durch die Einführung des HA-Tags zwischen den *XhoI* und *MunI* Schnittstellen die Prozessierung des Gag-Proteins und der Protease verhindert wird.

Mit Hilfe des Anti-c-myc-Antikörpers wurde jedoch keine spezifische Bande im Western Blot detektiert (nicht gezeigt). Möglicherweise wird das Polyprotein entweder nur in sehr geringer Menge gebildet oder sehr schnell abgebaut, so dass ein Nachweis im Western Blot nur sehr schwierig möglich ist. Es könnte auch sein, dass das Polyprotein mit ca. 300 kDa zu groß ist, um auf die verwendete Membran in nachweisbarer Menge geblottet werden zu können.

Somit kann geschlussfolgert werden, dass durch den Einsatz des Expressionsvektors pYLEHC unter der Kontrolle des *ICL1*-Promotors ein Protein synthetisiert wird, welches mit seiner Größe von 140 kDa dem Fusionsprodukt von Gag+Protease entspricht. Es sind aber weitere Untersuchungen, z.B. mit dem natürlichen Promotor und anders markierten Proteinen notwendig, um die natürlich auftretenden Proteine des Retrotransposons Ylt1 identifizieren zu können.

3.8.3 Expression einer Integrase-GFP-Proteinfusion

In ersten Versuchen sollte im Rahmen dieser Arbeit die Expression der Integrase als Einzelprotein unabhängig von den anderen Proteinen des *pol*-Bereiches nachgewiesen werden. Diese Strategie sollte eine leichte Lokalisierung der Integrase in der Zelle ermöglichen, um einen Weg für zukünftig geplante Untersuchungen der Transportprozesse der Integrase in den Zellkern zu eröffnen.

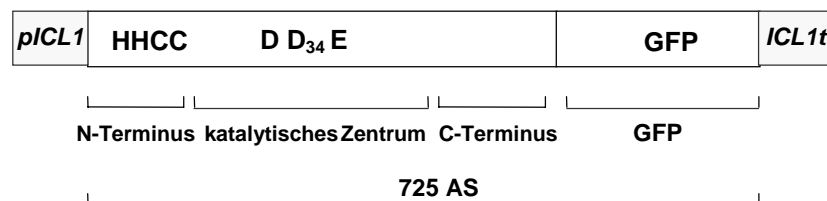


Abbildung 38: Die Struktur des Integrase-GFP-Konstruktes im Vektor pYLIG. Das Konstrukt ermöglicht die Expression eines Fusionsproteins von insgesamt 725 Aminosäuren (AS) der Integrase vor dem Grün Fluoreszierenden Protein GFP am C-Terminus unter Kontrolle des *ICL1*-Promotors.

Zum Erreichen des Ziels wurde die Integrase mit GFP (Grün Fluoreszierendes Protein) fusioniert (Abbildung 38) und unter der Kontrolle des starken *ICL1*-Promotors in den Vektor pYLIMCS integriert, wie unter 2.7.3 beschrieben. Die von der kodierenden DNA des

Retrotransposons Ylt1 abgeleitete Aminosäuresequenz der Integrase enthält ein HHCC-Motiv als Zn^{2+} -Fingermotiv im N-Terminus und D₃₄E als katalytisches Zentrum im mittleren Bereich (vgl. Abbildungen 19 und 20). Der entstandene Expressionsvektor pYLIG wurde zum Nachweis der Expression des Integrase-GFP-Fusionsproteins durch Western Blot mit Anti-GFP-Antikörpern (Abbildung 39) und durch GFP-Fluoreszenz in replikativen Transformanten des Stammes *Y. lipolytica* PO1d eingesetzt.

Von vier unabhängigen Transformanten, die nach Vorkultur in MG 12 h in Minimalmedium Acetat (MA, drei Transformanten) bzw. mit Ethanol (ME, eine Transformante) kultiviert wurden, wurden die Protein-Zellextrakte (vgl. 2.8.1) hergestellt und für den Western Blot eingesetzt (Abbildung 39). Im Vergleich mit den Kontrollstämmen PO1d/pYLIMCS (leere Expressionskassette) konnte in allen vier Transformanten mit Hilfe des Anti-GFP-Antikörpers in Western Blot ein Proteinbande von ca. 75 kDa deutlich nachgewiesen werden, die der erwarteten Größe des Fusionsproteins Integrase-GFP entspricht.

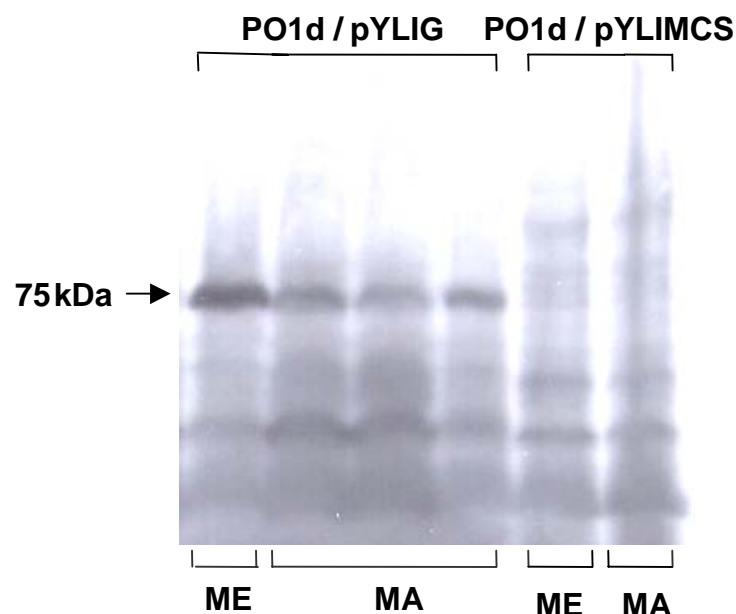


Abbildung 39: Western Blot der Zellextrakte von vier ausgewählten Transformanten des Stammes PO1d mit dem Plasmid pYLIG (Expressionskassette mit dem IN-GFP-Konstrukt unter Kontrolle des pICL1) im Vergleich mit dem Kontrollplasmid pYLIMCS (leere Expressionskassette). Die Transformanten wurden 12 h im Minimalmedium mit Ethanol (ME) bzw. Acetat (MA) als C-Quellen kultiviert. Die Hybridisierung erfolgte mit Anti-GFP-Antikörpern. Das detektierte Protein entspricht mit einer Größe von ca. 75 kDa der erwarteten Größe des Integrase-GFP Fusionsproteins.

Die erfolgreiche Expression des Fusionsproteins konnte in ersten Versuchen auch anhand der Fluoreszenz des intrazellulären Grün-Fluoreszierenden-Proteins GFP in den Transformanten nachgewiesen werden. Dieses Fusionsprotein kann demnach für die weitere Untersuchung der Kernlokalisierung der Integrase genutzt werden, wofür aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Zeit mehr zur Verfügung stand.

4 Diskussion

Das Ziel der Arbeit bestand darin, das Retrotransposon Ylt1 der Hefe *Y. lipolytica* mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden zu charakterisieren. Die gewonnenen Ergebnisse sollten zur Struktur- und Funktionsaufklärung dieses Retrotransposons beitragen.

4.1 Struktur des Retrotransposons Ylt1

Zu Beginn dieser Untersuchungen war die gesamte Sequenz des Retrotransposons Ylt1 bis auf die von Schmid-Berger *et al.* (1994) sequenzierten LTR-Sequenzen nicht sicher, weil die Sequenzen einiger Teile des internen Bereiches nur anhand von jeweils einem PCR-Produkt bestimmt worden waren (Barth, persönliche Mitteilung). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Sequenz des *eta*-Bereiches des Retrotransposons Ylt1 anhand mehrerer, unabhängig isolierter PCR-Produkte des gesamten *eta*-Bereiches überprüft und die potentiell codierenden Bereiche bestimmt.

Die Ergebnisse zeigten, dass das Retrotransposon Ylt1 insgesamt aus 9453 bp besteht. Der interne *eta*-Bereich des Ylt1 (8025 bp) wird an beiden Enden von LTR's mit jeweils 714 Nukleotiden flankiert.

Viele Retrotransposonen und Retroviren existieren im Genom der Wirtszellen in einer aktiven und einer inaktiven Kopie nebeneinander. Während der reversen Transkription entstehen oft neue Mutationen, da die reverse Transkriptase eine höhere Fehlerrate als die DNA-Polymerase aufweist (Garfinkel, 1992; Temin, 1992; Götte *et al.*, 1995). Diese Mutationen können im LTR-Bereich oder im ORF- des Retrotransposons stattfinden, wobei Mutationen in der LTR-Sequenz möglicherweise einen geringeren Effekt für die Transpositions-Aktivität des Retrotransposons haben. In den LTR-Bereichen befinden sich wichtige Signale für die Transkription und Polyadenyl-Synthese, in denen Mutationen Effekte verursachen können. Eng verwandte Retrotransposonen wie zum Beispiel Ty1 und Ty2 weisen eine hohe Homologie innerhalb der LTR Sequenz auf (Boeke und Sandmeyer, 1991; Kim *et al.*, 1998). Demgegenüber können Mutationen im ORF-Bereich dazu führen, dass die vom Retrotransposon kodierten Enzyme, welche für dessen Lebenszyklus essentiell sind, unter Umständen nicht mehr funktionell sind. In der Datenbank des *Y. lipolytica*-Genomprojekts wurden solche Mutationen auch im Retrotransposon Ylt1 gefunden. Die Analyse der im Genom des Stammes E150 vorliegenden Kopien von Ylt1 ergab, dass zwei verschiedene Klassen des Ylt1 vorliegen, die sich durch eine Verschiebung im Leseraster infolge der Deletion/Insertion eines Basenpaares voneinander unterscheiden (Abbildung 40) (A. Kovalchuk, persönliche Mitteilung).

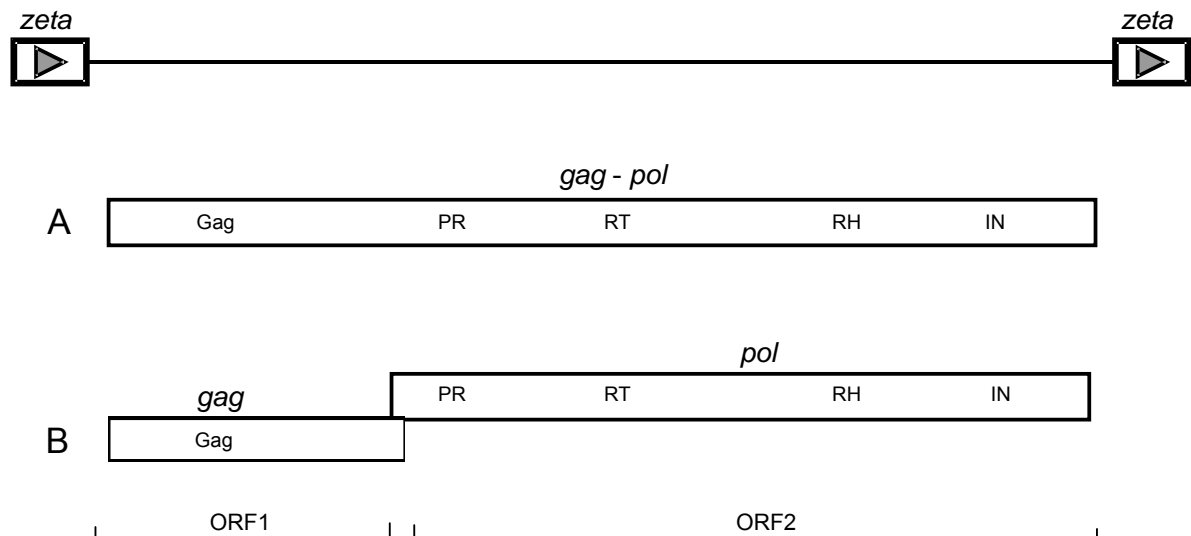


Abbildung 40: Zwei Möglichkeiten der Struktur des Retrotransposons Ylt1. Beide Formen kommen in der Hefe *Y. lipolytica* vor. Während die in (A) dargestellte Form an der Stelle 2213 ein G-Nukleotid enthält, fehlt dieses in der in (B) dargestellten Form. *Zeta* ist das LTR. ORF: offener Leserahmen, Gag: Gag-Strukturprotein, PR: Protease, RT: Reverse Transkriptase, RH: RNase H und IN: Integrase.

Auf der Basis der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sequenzierungen des Retrotransposons Ylt1 des Stammes B204-12C-20 ergab sich, dass der Unterschied an der Stelle 2213 im Vorhandensein bzw. Fehlen eines G-Nukleotides besteht.

Für die ORF-Analyse ist es wesentlich, ob dieses G-Nukleotid an dieser Stelle existiert oder nicht, da dadurch der offene Leserahmen verändert werden würde. Deswegen gibt es für die Organisation des offenen Leserahmens des Retrotransposons Ylt1 zwei Möglichkeiten. In Anwesenheit von G in Position 2213 wäre nur ein einziger langer Leserahmen zu erwarten, während in Abwesenheit von G in Position 2213 zwei Leserahmen auftreten würden. Bei den meisten bekannten Retrotransposonen findet die Expression des Polyproteins durch einen Frameshift während der Translation statt. Dieser Mechanismus sorgt für die Produktion von größeren Mengen des Gag-Proteins, welches für die Lebenszyklen der Retrotransposonen wichtig ist.

So wird beschrieben, dass bei den Retrotransposonen Ty1 und Ty2 von *S. cerevisiae* neben der Translation des ersten ORF in geringerem Maße (10 %) auch eine durch Frameshift vermittelte Translation beider ORF stattfindet und ein Polyprotein gebildet wird (Boeke und Sandmeyer, 1991; Kim *et al.*, 1998, siehe 1.3).

In neueren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde mittels Western Blot nachgewiesen, dass wahrscheinlich nur die Kopien des Ylt1 mit G an Position 2213 aktiv sind (A. Kovalchuk, persönliche Mitteilung).

Somit kann angenommen werden, dass von den beiden Formen des Retrotransposons Ylt1, die in *Y. lipolytica* E150 vorkommen, die inaktive Form durch Deletion eines G an der

Sequenzstelle 2213 entstanden ist. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das aktive Retrotransposon Ylt1 nur einen offenen Leserahmen enthält. Diese bei Retroelementen selten vorkommende Struktur findet man auch z. B. bei Tf1 und Tf2 von *S. pombe* (Weaver *et al.*, 1993).

4.2 Kopiezahlveränderung

Retrotransposonen können sich im Genom des Wirtsorganismus unter bestimmten Bedingungen vermehren. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Southern Blot Hybridisierung bereits gezeigt, dass nach der Kultivierung Retrotransposon-haltiger Zellen in acetathaltigen Minimalmedium zusätzliche Banden auftreten. Das Vorkommen der neuen Banden (Abbildung 32 und 33) zeigt, dass unter diesen Bedingungen auch Kopien des Ylt1 aus dem Genom der Hefe *Y. lipolytica* unter Zurücklassen einer Kopie von *zeta* ausrekombinieren können. Als Ergebnis solcher Ausrekombination entsteht ein Solo-LTR. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass sowohl die Aktivität des Retrotransposons selbst, als auch die Ausrekombination des Retrotransposons aus dem Genom, auf acetathaltigem Minimalmedium aktiviert wird. In Abbildung 41 ist dargestellt, wie die Vermehrung von Ylt1 verlaufen könnte.

Nicht alle Stämme von *Y. lipolytica* enthalten das Retrotransposon Ylt1. Einige Stämme von *Y. lipolytica* haben eine hohe Kopiezahl des Retrotransposons Ylt1, während andere Stämme kein Retrotransposon Ylt1 enthalten. Es ist aus der Literatur bekannt, dass verschiedene Isolate von *Y. lipolytica* oft nur entfernt verwandt sind und große Unterschiede in der Chromosomengröße zeigen. Diese Unterschiede könnten zum Teil auf das Vorkommen des Retrotransposons Ylt1 im Genom einiger *Y. lipolytica*-Stämme zurückgeführt werden. Allerdings sind die Größenunterschiede der Chromosomen zwischen den einzelnen Stämmen größer, als dies allein durch die Anwesenheit des Retrotransposons Ylt1 erklärt werden könnte. Eine weitere Erklärung wäre, dass ebenfalls die Rekombination verschiedener Retrotransposonen untereinander zu den unterschiedlichen Chromosomengrößen führt.

Weiterhin geht man davon aus, dass eine erhöhte Aktivität des Retrotransposons auch zu einer erhöhten Kopiezahl führt (Boeke und Sandmeyer, 1991; Garfinkel, 1992). Das ursprüngliche Retrotransposon bleibt nach dem Transpositionsprozess erhalten (Wilhelm und Wilhelm, 2001; Neuveglise *et al.*, 2002a).

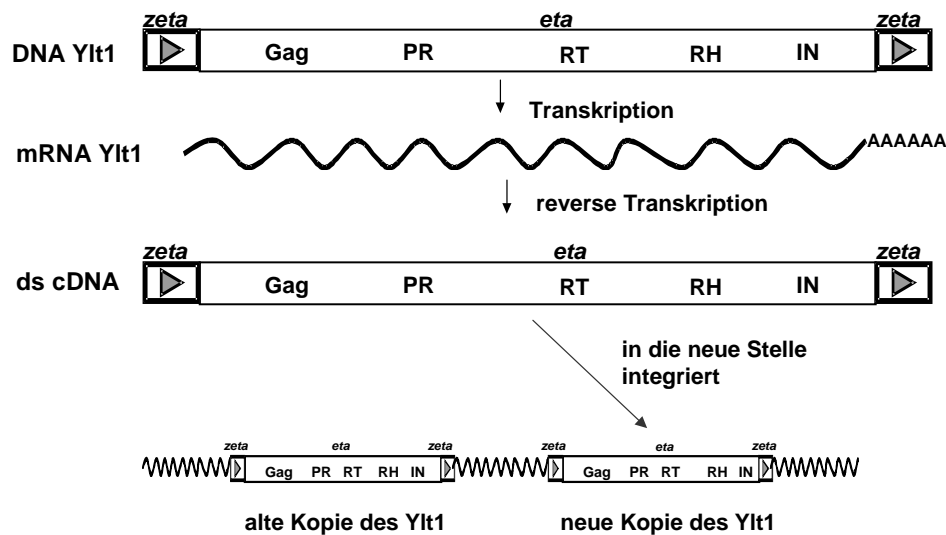


Abbildung 41: Die vermutliche Vermehrungsweise des Retrotransposons Ylt1. Nach der Transkription wird die mRNA in VLP verpackt und dort durch die reverse Transkriptase in die cDNA transkribiert. Die neue doppelsträngige cDNA wird in eine andere Stelle des Genoms integriert. Gag: Gag-Strukturprotein, PR: Protease, RT: reverse Transkriptase, RH: RNase H, IN: Integrase.

Man findet auch Unterschiede in der Kopiezahl zwischen verschiedenen Ylt1-haltigen Hefe-Stämmen. Während der *Y. lipolytica* Stamm E150 ca. 19 Kopien des Retrotransposons Ylt1 enthält, wie dessen Genomsequenzierung zeigte, konnten im Stamm B204-12C-20 etwa 35 Kopien nachgewiesen werden (Schmid-Berger *et al.*, 1994). Der Stamm YB423-12 ist ein gemeinsamer Elternstamm für die Stämme E150 und B204-12C-20 (Barth und Gaillardin, 1996). Der Stamm E150 stammt aus der Kreuzung der Stämme YB423-12 und W29. Während YB423-12 das Retrotransposon Ylt1 enthält, ist der Stamm W29 Ylt1-frei. Die Kopiezahl des Retrotransposons Ylt1 im Stamm E150 ist also möglicherweise im Verlauf des Inzuchtprogrammes (Abbildung 44) deutlich verändert worden.

Einige Retrotransposonen können von einer Zelle auf andere Zellen übertragen werden, wie z. B. das *gypsy* Retrotransposon von *D. melanogaster* und *D. ananase* (Tanda *et al.*, 1994; Song *et al.*, 1994). Diese Retrotransposonen enthalten den sogenannte ORF3, der für das Env-Protein kodiert. Obwohl das Retrotransposon Ylt1 zur Ty3/*gypsy*-Superfamilie gehört, konnte aber kein solcher ORF bei der Ylt1-Sequenzanalyse gefunden werden. Deshalb wird eine solche Übertragung im Fall des Retrotransposons Ylt1 als unwahrscheinlich betrachtet.

4.3 Homologe Rekombination

4.3.1 Vorkommendes Solo-LTR

Das Retrotransposon Ylt1 besteht neben dem Protein codierenden offenen Leserahmen aus den beiden LTRs, welche die Enden des ORF flankieren. Die Sequenzanalyse zeigte, dass die 5'LTR-Sequenz mit der 3'LTR Sequenz des Ylt1 identisch ist. Deshalb könnte es mit hoher Wahrscheinlichkeit zur homologen Rekombination zwischen den LTR-Sequenzen

kommen. Dadurch entstehen sogenanntes Solo-LTR sowie zirkuläre DNA, welche nur ein LTR mit dem internen Bereich (ORF) des Retrotransposons Ylt1 enthält. In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die so entstandene zirkuläre DNA nicht als Plasmid erhalten bleibt, sondern abgebaut wird (Boeke und Sandmeyer 1991; Garfinkel, 1992). Demgegenüber bleibt das restliche LTR stabil als Solo-LTR im Genom integriert.

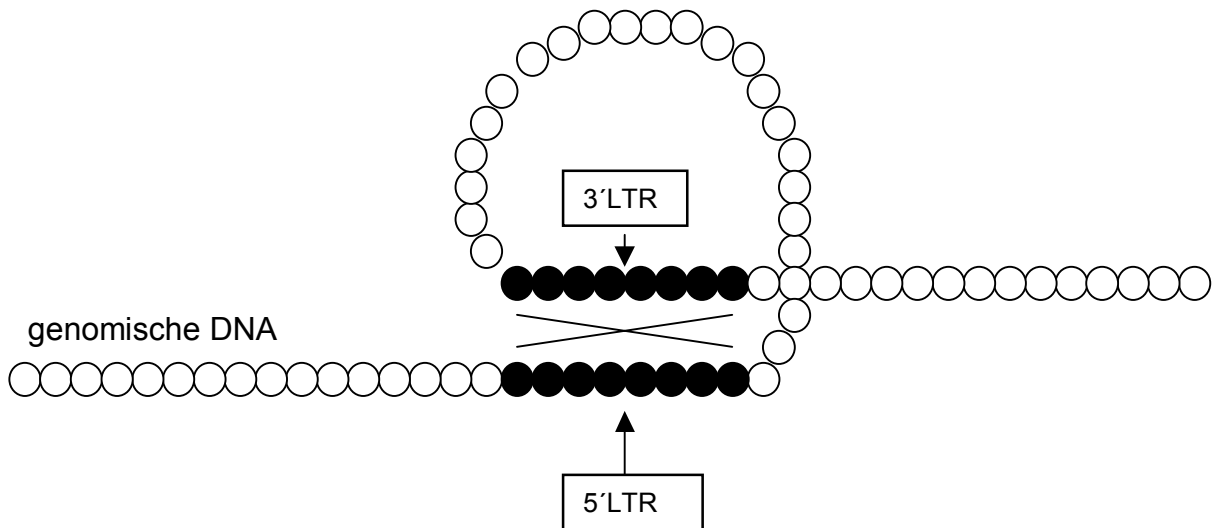


Abbildung 42: Die Entstehung eines Solo-LTR. Im Bereich des LTR kann die homologe Rekombination zwischen 5'LTR und 3'LTR stattfinden. Danach entsteht ein Solo-LTR und eine zirkuläre DNA. Das Solo-LTR bleibt stabil im Genom integriert und die zirkuläre DNA wird abgebaut. Die schwarzen Kreise zeigen die Nukleotide der LTRs und die weißen Kreise zeigen die Nukleotide des internen Bereiches des Retrotransposons und des Genoms.

Stabile Solo-LTR kommen nicht nur bei Retrotransposonen sondern auch bei den Retroviren vor. Etwa 10 % des menschlichen Genoms besteht aus Solo-LTR oder mutierten offenen Leserahmen der genomischen Retroviren. Interessanterweise können die Solo-LTRs als Promotor für downstream liegende Gene fungieren (Ling *et al.*, 2002).

4.3.2 TSD-Austausch

Es ist bekannt, dass die Retrotransposonen in unterschiedlicher Anzahl von identischen Kopien vorkommen können (Boeke und Sandmeyer, 1991; Schmid-Berger *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1998; Neuveglise *et al.* 2002). Deshalb können die Kopien des Retrotransposons Ylt1 im Genom von *Y. lipolytica* miteinander homolog rekombinieren. Die Rekombination zwischen Molekülen des Retrotransposons Ylt1 könnte teilweise unterschiedliche TSD-Sequenzen ergeben, wenn eine Rekombination zwischen zwei Retrotransposonen mit unterschiedlichen Zielstellen stattfindet (Abbildung 43). Schmid-Berger *et al.* (1994) haben anhand angrenzender Sequenzen von Solo-LTR's nachgewiesen, dass solche Ereignisse mit Ylt1 Kopien stattgefunden haben müssen.

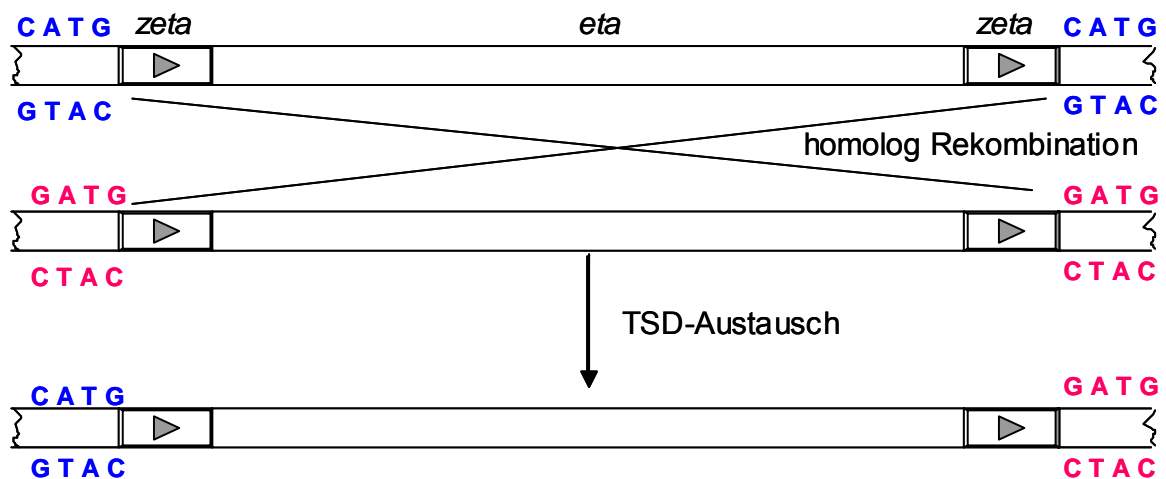


Abbildung 43: Mechanismus des TSD-Austausches des Retrotransposons Ylt1. Nach der homologen Rekombination beider Kopien des Retrotransposons Ylt1 unterscheidet sich die linke TSD von der rechten TSD.

4.4 Herkunft des Retrotransposons Ylt1

Wie schon erklärt, können sich Retrotransposonen in Wirtszellen vermehren, aber auch durch Kreuzung auf Tochterzellen übertragen werden. Mittels Southern-Blot-Hybridisierung konnte festgestellt werden, dass die Stämme B512, B204-12C, B204-12C-20, B204-12A-213 E150, H194 (YB423-12) und CXAU1 hohe Kopienzahlen des Retrotransposons Ylt1 enthalten, während es in anderen Stämmen, wie z. B. PO1d, H181, W29 und H222, fehlt. Bei der Analyse genomischer DNA von PO1d bzw. H181 konnte auch eine schwache Bande mit der Zeta-eta- bzw. mit der Zeta-Sonde detektiert werden. Es wurde deshalb vermutet, dass sich in diesem Stamm ein anderes, bisher nicht charakterisiertes Retrotransposon befindet. Dabei müsste es sich allerdings um ein dem Ylt1 teilweise homologes Retrotransposon handeln, da es mit der verwendeten Ylt1 Sonde detektiert werden konnte.

Da sich die Bandenmuster im Southern Blot von verschiedenen Stämmen, deren genomische DNA mit der Zeta-eta-Sonde hybridisiert wurde, unterscheiden, ist anzunehmen, dass das Ylt1 im Genom der verschiedenen Stämme an unterschiedlichen Orten lokalisiert ist.

Alle bisher überprüften Stämme, welche das Retrotransposon Ylt1 enthalten, stammen aus Inzuchtlinien, in denen der Stamm YB423-12 als ein Elternstamm verwendet wurde (siehe Abbildung 44).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Retrotransposon Ylt1 aus dem Stamm YB423-12 durch Kreuzung auf die anderen Stämme übertragen wurde. Die Inzuchtlinie der Stämme E150 und B204-12C ist in Abbildung 44 dargestellt.

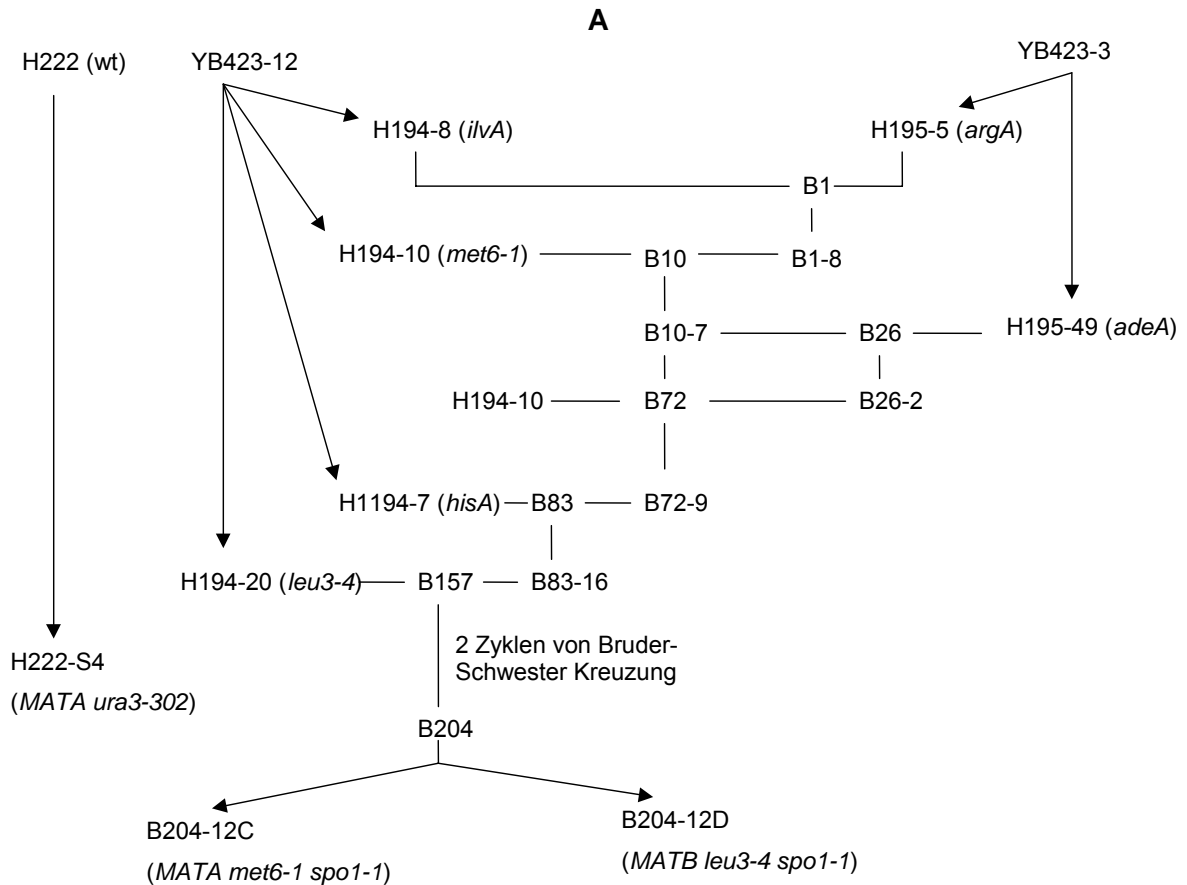


Abbildung 44: (Teil 1 von 2) *Y. lipolytica* Stammlinien. Die Stämme der deutschen Inzuchtlinie (A), der französischen Inzuchtlinie (B) und der amerikanischen Inzuchtlinie (C) sind dargestellt (nach Barth und Gaillardin, 1996, modifiziert).

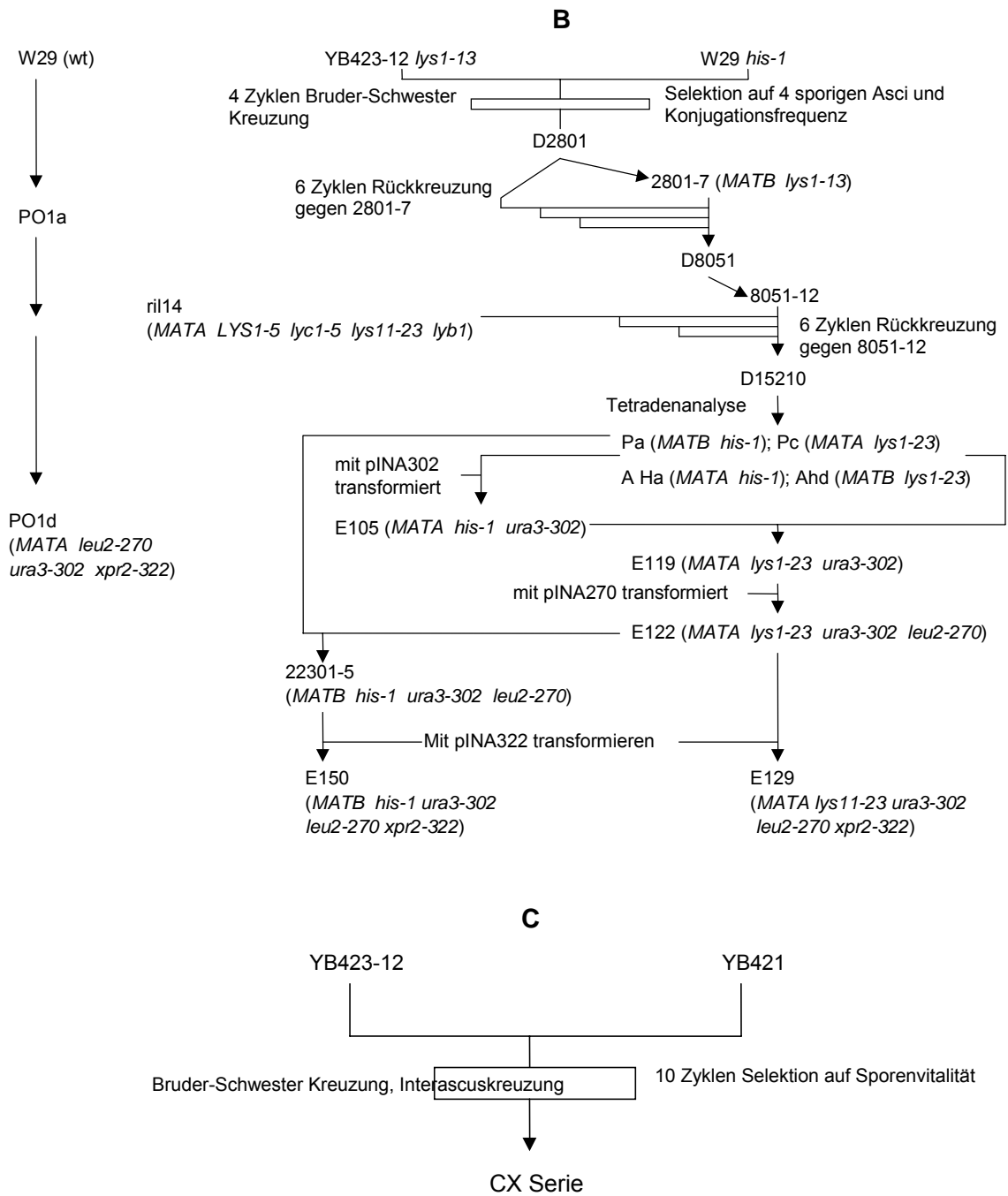


Abbildung 44: (Teil 2 von 2) *Y. lipolytica* Stammlinien. Die Stämme der deutschen Inzuchtlinie (A), der französischen Inzuchtlinie (B) und der amerikanischen Inzuchtlinie (C) sind dargestellt (nach Barth und Gaillardin, 1996, modifiziert).

4.5 Spezifische Eigenschaften des Retrotransposons Ylt1

Der Vergleich des Retrotransposons Ylt1 mit Retrotransposonen aus anderen Hefen zeigte, dass es sich beim Retrotransposon Ylt1 um ein besonders interessantes Retrotransposon handelt. Das Retrotransposon Ylt1 kommt im Gegensatz zu den meisten anderen Retroelementen der *gypsy*-Gruppe mit einer hohen Kopiezahl (ca. 35) pro Zelle vor (Tabelle 18). Im Vergleich zu Retrotransposonen anderer Hefen hat Ylt1 längere LTRs und einen

einzigem, langen offenen Leserahmen. Weiterhin ist das Retrotransposon Ylt1 das größte bisher in Hefen identifizierte Retrotransposon.

Tabelle 18: Das Retrotransposon Ylt1 im Vergleich zu den Retrotransposonen anderer Hefen. n.b. : nicht bekannt/keine Daten verfügbar. ¹⁾ keine vollständige Sequenz in der Datenbank von Stamm W29, *Genolevures* 1, ²⁾ Ein vollständiges Retrotransposon wurde in RSTs und in der gesamten Sequenz von Stamm E150 entdeckt.

Gruppen	Name	Kopien	LTR (bp)	ORF1 (bp)	Größe (bp)	Species
Ty1-ähnliche Elemente	Ty1	32	332	1305	5917	<i>S. cerevisiae</i>
	Ty2	13	332	1293	5959	<i>S. cerevisiae</i>
	Tkm1	10-15	385	1263	5994	<i>K. marxianus</i>
	Tse1	15-20	424	1149	5691	<i>S. exiguus</i>
Ty4-ähnliche Elemente	Ty4	3	371	1089	6227	<i>S. cerevisiae</i>
	Tsu4	15-20	321	1074	6095	<i>S. bayanus</i>
Ty5-ähnliche Elemente	SpTy5	10-15	251	Ein ORF	5376	<i>S. paradoxus</i>
	Tca5	0-5	685	Ein ORF	5588	<i>C. albicans</i>
Tca2-ähnliche Elemente	Tca2	5-10	280	975	6426	<i>C. albicans</i>
	Tdh2	3-5	379	1011	5928	<i>D. hansenii</i>
Ty3/ <i>gypsy</i> -ähnliche Elemente	Ty3	2	340	855	5351	<i>S. cerevisiae</i>
	Tf1	10-30	474	Ein ORF	4941	<i>S. pombe</i>
	Tcd3	<5	295	n.b.	6200	<i>C. dubliniensis</i>
	Tca13	8	507	n.b.	5060	<i>C. albicans</i>
	Ylt1	35	714	Ein ORF	9453	<i>Y. lipolytica</i>
	Tyl3 ¹⁾	1 - 3	n.b.	n.b.	n.b.	<i>Y. lipolytica</i>
	Tyl3B ²⁾	1	276	252	5108	<i>Y. lipolytica</i>

Wie aus Tabelle 18 hervorgeht, enthalten die meisten bekannten Retrotransposonen zwei offene Leserahmen (ORF1 und ORF2), die durch einen Frameshift-Mechanismus translatiert werden. Bei den meisten Retrotransposonen codiert der ORF1 für das Gag-Protein und ORF2 für das Pol-Protein. In einigen Retroviren kommt aber auch eine andere Genanordnung vor. Hierbei codiert der erste offene Leserahmen für ein Gag-Protease-Fusionsprotein, während der zweite offene Leserahmen für ein Polyprotein codiert. Diese Struktur konnte bei den *Humanes spuma Retroviren* und *Avian leukosis Viren* charakterisiert werden (Coffin, 1992).

Beim Ty3 Retrotransposon der Hefe *S. cerevisiae* und dem *gypsy* Retrotransposon von *D. melanogaster* erfolgt bei der Translation der Gag-kodierenden RNA in geringem Maße ein +1 Frameshift zwischen der *gag*- und der *pol*-Region, der zur Expression des Polyproteins führt (Boeke und Sandmeyer, 1991; Song *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1998; Neugeglise *et al.*, 2002). Im Gegensatz erfolgt bei den Retroviren wie HIV ein -1 Frameshift zwischen der *gag*- und

der *pol*-Region, der zur Expression des zweiten ORF führt (Boeke und Sandmeyer, 1991; Coffin, 1992).

Interessanterweise konnte in Ylt1 nur ein einzelner, langer ununterbrochener offener Leserahmen gefunden werden. Dies bedeutet, dass im Fall von Ylt1 wie auch bei den SpTy5, Tca5 und Tf1 Retrotransposonen kein Frameshift-Mechanismus erforderlich ist, um die Genprodukte zu synthetisieren (Levin *et al.*, 1990; Levin und Boeke, 1992; Levin, 1995; Zou, 1996; Plant *et al.*, 2000).

Das Polyprotein enthält somit aus das Gag-Strukturprotein und einige Enzymaktivitäten, die für den Lebenszyklus des Retrotransposons von Bedeutung sind: Protease, Reverse Transkriptase, RNase H und Integrase. Im Gag Protein befindet sich ein konserviertes Zn-Finger Motiv CX₂CX₄HX₄C. Dieses fungiert als Nukleinsäure-Bindungs-Domäne (Dannul, *et al.* 1997) und ist für den Nukleocapsid-Aufbau wichtig. Es ist eine Voraussetzung für die Transpositionsaktivität des Retrotransposons im Genom der Wirtszellen (Kirchner und Sandmeyer, 1993). Bei der VLP-Bildung findet eine Wechselwirkung zwischen der mRNA des Retrotransposons und des Bereiches des Zn-Finger Motiv des Gag-Strukturproteins statt (Boeke und Sandmeyer, 1991; Hajek und Friesen, 1998). Da das Gag-Protein als Capsid-Protein für den Aufbau der VLP verwendet wird, muss es in großer Menge gebildet werden.

Die Prozessierung des Gag-Strukturproteins ist beim Ty1 Retrotransposon am besten beschrieben. Sie findet in folgenden Schritten statt: Das Gag-Strukturprotein (P1) des Retrotransposons wird in einer Größe von ca. 50 kDa translatiert. Die Aspartyl Protease prozessiert P1 zu P2 (48 kDa). P2 wird weiter prozessiert und es entsteht P4 (38 kDa), P5 (33 kDa) und P6 (26 kDa). P4 fungiert als Matrix-Protein, P5 als Capsid-Protein und P6 als Nucleocapsid-Protein. Bei der Wechselwirkung zwischen P4, P5 und P6 mit der Ty1 RNA erfolgt die Bildung des reifen VLP (Boeke und Sandmeyer, 1991). Das potentielle Zn-Finger Motiv des Gag Proteins des Retrotransposons Ylt1 ist in der Abbildung 45 dargestellt.

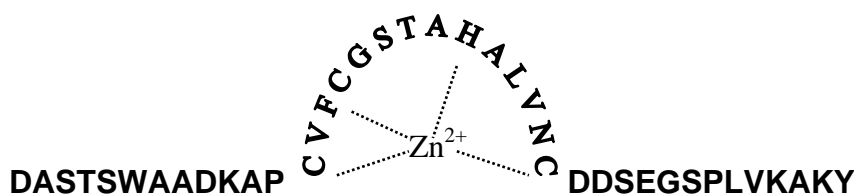


Abbildung 45: Das potentielle Zn-Finger Motiv des Gag-Strukturproteins des Retrotransposons Ylt1. Die Wechselwirkungen von Zn²⁺ mit den entsprechenden Aminosäuren ist durch gestrichelte Linien veranschaulicht.

Die anderen vom Retrotransposon Ylt1 kodierten Enzyme werden vermutlich nur in geringem Maße translatiert, da sie nicht in der Menge wie das Gag-Protein benötigt werden.

Besonders im Fall der Retrotransposonen, bei denen ein Frameshift-Mechanismus nötig ist, um ORF2 zu translatieren, wird dieser ORF2 mit einer etwa 90 % geringeren Häufigkeit als

das Gag-Strukturprotein translatiert (Boeke und Sandmeyer, 1991; Grandbastien, 1998). Die Translationseffizienz kann durch einen Vergleich zwischen der Menge des Gag- und Gag-Pol-Fusion-Proteins berechnet werden. Je öfter das Gag-Pol-Fusion-Protein vorkommt, desto effizienter ist die Frameshift-Translation.

4.6 Weitere Retrotransposonen in *Yarrowia lipolytica*

Augstein (2001) wies das Retrotransposon Ylt1 mittels Southern Blot Hybridisierung in verschiedenen *Y. lipolytica*-Stämmen nach, wobei die LTR-Sequenz von Ylt1 als Sonde verwendet wurde. Mit dieser Sonde konnten keine Banden in den beiden Stämmen PO1d und H222 nachgewiesen werden. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die beiden Stämme kein Retrotransposon Ylt1 enthalten. In dem unter 3.2 beschriebenen Versuch wurde im Southern Blot eine Sonde verwendet, welche Sequenzen von *zeta* und *eta* enthält. Interessanterweise konnte mit dieser Sonde eine schwache Bande nach der Hybridisierung von geblotteter genomischer PO1d-DNA detektiert werden. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass es Homologien zwischen dem *zeta-eta*-Teil des Retrotransposons Ylt1 mit einem anderen uncharakterisierten Retrotransposon gibt. Der Sequenzvergleich des LTR-freien Retrotransposons Ylli mit der Zeta-eta-Sonde zeigte, dass beide Sequenzen keine längeren Homologiebereiche aufwiesen. Damit scheint eine Hybridisierung der Zeta-eta-Sonde mit dem Ylli Retrotransposon unwahrscheinlich. Deshalb wird angenommen, dass das Hybridisierungssignal mit der DNA von PO1d im Southern Blot auf die Anwesenheit eines anderen Retrotransposons hinweisen könnte bzw. ein unspezifischer Bereich, der mit der Sonde schwach paaren kann, in Genom von PO1d vorhanden ist. Dies deckt sich mit Genom-Sequenzdaten, die zeigen, dass in *Y. lipolytica* neben dem Retrotransposon Ylt1 weitere Retrotransposonen, wie z.B. Tyl3 und LTRyl1, existieren. Das in der genomischen Sequenz des Stammes E150 neu entdeckte Retrotransposon Tyl3B ist ein weiterer Beweis dafür, dass in *Y. lipolytica* eine große Anzahl verschiedener Retrotransposonen vorkommen.

4.7 Nachweis einer Promotoraktivität der LTR-Sequenzen

Es ist bekannt, dass die LTR Sequenz der Retroviren und Retrotransposonen als Promotor fungiert (Ling *et al.*, 2002). Zum Nachweis einer möglichen Promotoraktivität wurden die Sequenzen von LTRA (von Nukleotid 1 bis 714) und LTRB (von Nukleotid 1 bis 825, vor dem ATG) des Retrotransposons Ylt1 mit dem *lacZ*-Gen als Reporter gen fusioniert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Promotoraktivität des LTR in Abhängigkeit von verschiedenen Kohlenstoffquellen analysiert.

Wie unter 3.6 gezeigt wurde, ist die Aktivität der β -Galactosidase von in Minimalmedium mit Glucose kultivierten Transformanten sehr niedrig. Bei der Kultivierung in acetat- bzw.

ethanolhaltigem Minimalmedium konnte aber eine geringe, aber signifikante Erhöhung der β -Galactosidase-Aktivität auf das 4-5fache festgestellt werden. Dieses Ergebnis bestätigt damit die bereits aufgrund der Ergebnisse der Southern-Blot-Hybridisierung vermutete erhöhte Aktivität des Retrotransposons Ylt1 nach der Kultivierung in Minimalmedium mit Acetat bzw. Ethanol als Kohlenstoffquelle (Schmid-Berger *et al.*, 1994).

Allerdings ist die Promotoraktivität von LTR auch bei der Kultivierung in Minimalmedium mit Acetat bzw. Ethanol gering, so dass davon ausgegangen wird, dass die LTR-Sequenz nur ein sehr schwacher Promotor ist. Dies könnte eine Ursache dafür sein, dass keine spezifischen Transkriptionsprodukte des Retrotransposons Ylt1 mittels Northern-Blot-Hybridisierung nachgewiesen werden konnten.

4.8 Die Expression des ORFs von Ylt1

Um zu untersuchen inwieweit das Gag-Protein bzw. das gesamte Polyprotein gebildet wird, wurde der HA-Tag hinter das Gag-Protein (zwischen Gag-Protein und Protease) und der c-myc-Tag in den Bereich zwischen RH und IN integriert. Damit sollte sowohl das Gag-Protein mit Anti-HA-Antikörpern als auch das gesamte Polyprotein mit Anti-c-myc-Antikörpern bzw. Anti-HA-Antikörpern nachgewiesen werden.

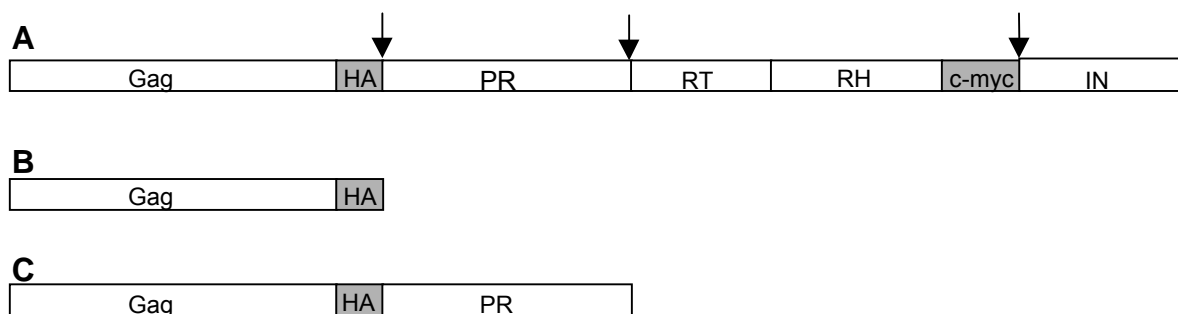


Abbildung 46: Einige mögliche Translationsprodukte des Retrotransposons Ylt1 mit den HA- bzw. c-myc-Tags. Gag: Gag-Strukturprotein, PR: Protease, RT: reverse Transkriptase, RH: RNase H, IN: Integrase. Pfeile: mögliche Schnittstellen der Protease.

Würde das gesamte Polyprotein (ca. 300 kDa) translatiert (Abbildung 46A) könnte dieses sowohl mit Anti-HA-Antikörpern als auch mit Anti-c-myc-Antikörpern nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu könnten die in Abbildung 46B und C (ca. 90 kDa bzw. ca. 140 kDa) dargestellten prozessierten Produkte nur mit Anti-HA-Antikörpern nachgewiesen werden.

Mittels Western Blot konnte eine starke Bande im Bereich von 140 kDa mit Anti-HA-Antikörpern detektiert werden. Diese Größe entspricht in etwa der, welche ein Fusionsprotein aus Gag (90 kDa) und Protease (50 kDa) haben würde (Abbildung 46C). Eigentlich sollten diese beiden Proteine nach der Translation von der ebenfalls gebildeten Protease gespalten werden, so dass man auch diese Spaltprodukte hätte nachweisen können. Möglich wäre

aber, dass die Erkennungssequenz der Aspartylprotease durch die Insertion des HA-Tags zerstört wurde und damit keine Spaltung an dieser Stelle mehr stattfinden konnte. Allerdings wird davon ausgegangen, dass eine Spaltung zwischen Protease und RT stattfand. Dort befindet sich eine potentielle Schnittstelle der Aspartylprotease (Glu-Glu-Pro-Val). Damit wurde hier wahrscheinlich ein Gag-HA-Protease-Fusionsprotein gebildet, das im Western Blot nachweisbar war.

Demgegenüber konnten mit dem Anti-c-myc-Antikörper keine spezifischen Banden detektiert werden. Eine Ursache dafür könnte sein, dass die Proteine, welche mit c-myc markiert worden waren (RH und IN), schnell (schneller als Gag und Protease) abgebaut wurden.

Wie bereits erläutert werden die Enzyme reverse Transkriptase, RNase H und Integrase bei den Retrotransposonen, in denen bei der Translation ein Frameshift stattfinden kann, in 10fach geringerer Menge als das Gag-Strukturprotein gebildet (Boeke und Sandmeyer, 1991). Allerdings wird aufgrund der Sequenz des in dieser Arbeit untersuchten Ylt1 angenommen, dass hier nur das gesamte Polyprotein gebildet wird, da es nur einen offenen Leserahmen gibt. Damit ist eine unterschiedliche Translationshäufigkeit der verschiedenen Komponenten des Ylt1 unwahrscheinlich. Eher könnte von einem verstärkten Abbau der reversen Transkriptase, RNase H und Integrase ausgegangen werden, so dass diese nicht mehr mit Anti-c-myc-Antikörper nachweisbar waren.

Es ist bekannt, dass das Gag-Strukturprotein von Viren in drei verschiedene Formen prozessiert wird (Hajek und Friesen, 1998). So wurde gezeigt, dass das Gag-Protein nicht prozessiert wird, wenn es nur allein exprimiert wird. Wird dagegen eine Gag-Protease-Fusion exprimiert, konnte die Protease Gag prozessieren wodurch drei verschiedene Formen von Gag nachgewiesen werden konnten (Hajek und Friesen, 1998). Ob bei der Expression der Ylt1 Proteine solche eine Prozessierung des Gag-Proteins stattfindet war mit den in dieser Arbeit verwendeten Konstrukten nicht nachweisbar, weil höchstwahrscheinlich durch die Insertion des HA-Epitops zwischen Gag und Protease dieser Prozess möglicherweise verhindert wird.

Zum Nachweis der Expression der Integrase wurde die Integrase Region mit GFP fusioniert (siehe 2.8.3). Im Western Blot wurde nach zwölfstündiger Kultivierung der jeweiligen Transformanten in acetat- bzw. ethanolhaltigen Minimalmedien eine spezifische, durch das IN-GFP-Fusionsprotein verursachte Bande bei etwa 75 kDa nachgewiesen. Dies war auch die Größe, die für dieses Fusionsprotein erwartet wurde (siehe 2.8.3). Damit konnte bestätigt werden, dass das IN-GFP-Fusionsprotein exprimiert wurde.

4.9 Vorkommen unvollständiger Kopien des Retrotransposons

Die reverse Transkriptase des Ty1 Retrotransposons ist sehr temperatursensitiv und wird durch höhere Temperaturen als ihrer Optimaltemperatur von 23 °C inaktiviert (Boeke und

Sandmeyer, 1991; Garfinkel, 1992). Außerdem weist sie eine hohe Fehlerrate während der reversen Transkription auf (Boeke und Sandmeyer, 1991; Temin, 1992). Bedingt durch diese hohe Fehlerrate der reversen Transkriptase können Mutationen auftreten, die zu einem fehlerhaften Replikationszyklus oder zur Inaktivierung des Retrotransposons führen können. Bei der reversen Transkription können damit unvollständige cDNA-Stränge entstehen. Es ist möglich, dass die cDNA des Plusstranges nach der „strong stop“ DNA-Synthese nicht weiter verlängert werden kann. Damit könnte die reverse Transkriptase nicht die gesamte mRNA revers transkribieren. Die hierbei gebildete unvollständige cDNA der reversen Transkription, die nicht bis zum 5'-Ende des mRNA-Templates umgeschrieben werden konnte, kann aber möglicherweise ins Genom nicht integriert werden.

Die Temperatursensitivität der reversen Transkriptase produziert neben unvollständiger cDNA auch mutierte cDNA. Retrotransposons-Mutanten sind mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht aktiv. Dies könnte auch ein Grund dafür sein, dass häufig inaktive Retrotransposons in den Wirtszellen vorkommen.

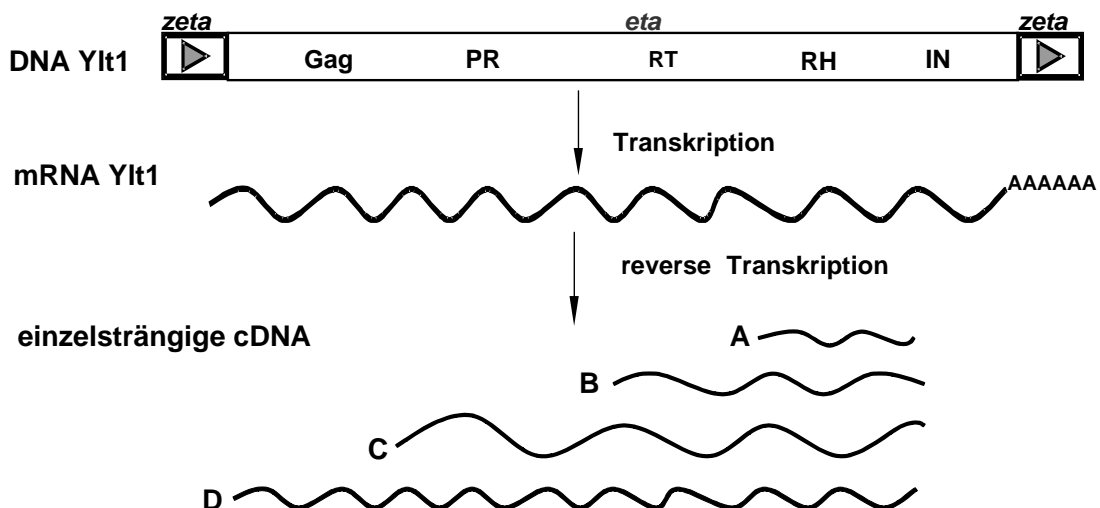


Abbildung 47: Die Produktmöglichkeiten der reversen Transkription. Die mRNA des Retrotransposons im VLP wird revers transkribiert. Aufgrund der Temperatursensitivität der reversen Transkriptase kann es passieren, dass nicht die vollständige mRNA revers transkribiert wird. A, B und C sollen die unvollständigen cDNA Moleküle darstellen und D zeigt die Gesamtlänge der cDNA des Retrotransposons. Nur vollständige cDNA kann ins Genom integriert werden. eta: interne Region, zeta: LTR, Gag: Gag-Strukturprotein, PR: Protease, RT: Reverse Transkriptase, RH: RNase H, IN: Integrase.

Bei *gypsy* Retrotransposon von *D. melanogaster* wurde von Arkhipova *et al.* (1986) nachgewiesen, dass die „strong stop“-DNA des Plusstranges in 5–10fach höherer Konzentration als die Minusstrang „strong stop“-DNA vorkommt. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Effektivität des Polypurin-Bereiches (PPT) als Primer für die cDNA-Synthese des Plusstranges höher ist als die des 3'-Endes der tRNA, welche als Primer für

die cDNA-Synthese des Minusstranges fungiert. Dies liegt höchstwahrscheinlich daran, dass der Polypurin-Bereich (PPT) zum internen Bereich des Retrotransposon Ylt1 gehört und bereits gepaart mit der cDNA des Minusstranges vorliegt, während die tRNA von genomischer DNA codiert wird und erst mit dem PBS-Bereich paaren muss. Die kurzen cDNAs, die nicht bis zum 5'-Ende des mRNA-Templates vollständig revers transkribiert wurden, können die notwendigen Enzyme für ihren Lebenszyklus nicht produzieren. Damit hängt der Lebenszyklus solcher Retrotransposonmoleküle von der Verfügbarkeit von Enzymen anderer Retrotransposonen ab.

4.10 Die Primer-Bindungsstelle von Ylt1

Die meisten Retroviren und LTR-Retrotransposon enthalten eine Primer-Bindungsstelle, welche für die Initiation der cDNA-Synthese des Minusstranges während der reversen Transkription verwendet wird (Garfinkel, 1992; Luciw und Leung, 1992; Wilhelm und Wilhelm, 2000; Neuveglise, 2002). Die spezifische tRNA bindet als Primer in der PBS des Retrotransposons. Dieser Mechanismus findet aber nicht beim Tf1 Retrotransposon von *S. pombe* und beim Tcd3 Retrotransposon von *C. dubliniensis* statt. Hier findet ein sogenanntes „Selbst-Priming“ für eine reverse Transkription statt, womit kein spezifischer tRNA Primer notwendig ist.

Die verschiedenen tRNA, welche mit den PBS von typischen Vertretern der Retrotransposonen paaren können, sind in der Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Vergleich der Primer-Bindungsstelle (PBS) des Retrotransposons Ylt1 mit den PBS anderer Retrotransposonen von verschiedenen Organismen. Eine Ausnahme der Primer-Paarung entsteht beim Tf1 und beim Tcd3 Retrotransposonen durch das sogenannte „Selbst-Priming“. n.b.: nicht bekannt.

Gruppen	Name	Priming	Organismus
Ty1-ähnliche Elemente	Ty1 Ty2 Tkm1 Tse1	tRNA ^{iMet} tRNA ^{iMet} tRNA ^{iMet} tRNA ^{iMet}	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>K. marxianus</i> <i>S. exiguus</i>
Ty4-ähnliche Elemente	Ty4 Tsu4	tRNA ^{Asn} tRNA ^{Met}	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. bayanus</i>
Ty5-ähnliche Elemente	Ty5 Tca5	tRNA ^{iMet} tRNA ^{iMet}	<i>S. paradoxus</i> <i>C. albicans</i>
Tca2-ähnliche Elemente	Tca2 Tdh2	tRNA ^{Arg} tRNA ^{Asn}	<i>C. albicans</i> <i>D. hansenii</i>
Ty3/ <i>gypsy</i> -ähnliche Elemente	CfT-1 Ty3 Tf1 Tcd3 Tca13 Ylt1 Ty13 Ty13B	tRNA ^{Ser} tRNA ^{iMet} Selbst-Priming Selbst-Priming tRNA ^{Ala} tRNA ^{Ala} n.b. n.b.	<i>C. fulvum</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. pombe</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>C. albicans</i> <i>Y. lipolytica</i> <i>Y. lipolytica</i> <i>Y. lipolytica</i>

Die reverse Transkription des Retrotransposons Tf1 findet statt, wenn die Primer-Bindungsstelle mit den ersten 11 Basen der Tf1 Transkripte hybridisiert (Levin, 1995). Eine einzelne Mutation in dieser Region blockiert die Transposition und auch die reverse Transkription. Das Selbst-Priming des Tf1 Retrotransposons ist in Abbildung 48 dargestellt. Nach der Transkription formiert sich die mRNA, so dass der 5'-Bereich mit dem komplementären Bereich paaren kann. Danach wird die mRNA von RNase H als definierter Primer gespalten (nur PPT-Bereich). Die Verlängerung des Primers findet in 3'-Richtung der cDNA des Minusstranges statt.

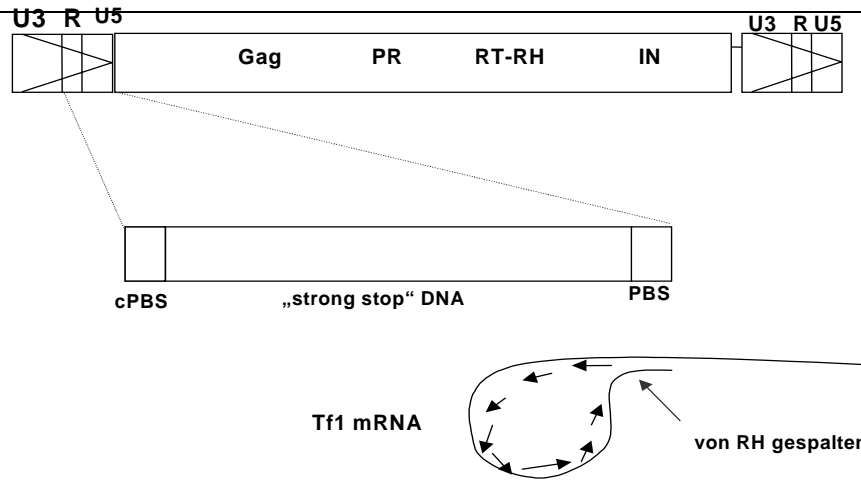


Abbildung 48: „Selbst-Primierung“ des Retrotransposons Tf1. Die RNA des Tf1 wird gerollt. Das „Selbst-Primierung“ beginnt nachdem die 11 Nukleotide des 5´-Bereiches der mRNA mit dem PBS-Bereich zu hybridisieren. Danach findet die Verlängerung des Primers und die Synthese der cDNA des Plusstranges statt. U3: Unikum 3, R: Wiederholungen, U5: Unikum 5, PBS: Primer-Bindungsstelle, Gag: Gag-Strukturprotein, PR: Protease, RT-RH: reverse Transkriptase-RNase H, IN: Integrase. (entnommen aus Levin, 1996).

Die Sequenzanalyse des Retrotransposons Ylt1 zeigte, dass die notwendigen Sequenzen für eine reverse Transkription in dieser Sequenz existieren. Es gibt keinen Beweis dafür, dass das Retrotransposon Ylt1 durch „Selbst-Primierung“ revers transkribiert werden kann. Die Primer-Bindungsstelle TGGTGGACGACACC des Ylt1 kann mit den Nukleotiden des 3´-Endes der tRNA^{Ala} von *Y. lipolytica* hybridisieren, um eine reverse Transkription zu beginnen. Der Primer für die cDNA-Synthese des Plusstranges (TGGGCAGG, PPT-Sequenz) liegt upstream der 3´-LTR-Sequenz. Der reverse Transkriptionsprozess des Retrotransposons Ylt1 findet vermutlich in folgenden Schritten statt :

Die cDNA-Synthese des Minusstranges

- Die Nukleotide 3´-ACCACCTGCTGTGG-5´ der 3´-tRNA^{Ala} primen mit der PBS-Sequenz (TGGTGGACGACACC) der mRNA des Retrotransposons Ylt1. Danach beginnt die cDNA-Synthese des Minusstranges. Die Verlängerung des Primers erfolgt bis in den 5´-Bereich der Ylt1-mRNA (Template endet hier). Die hierbei synthetisierte cDNA wird als „strong-stop-cDNA“ des Minusstranges bezeichnet.
- Die „strong-stop“-cDNA „springt“ anschließend vom 5´-Ende in das 3´-Ende der mRNA des Retrotransposons Ylt1 und paart dort mit dem r-Bereich des 3´-mRNA-Templates des Retrotransposon Ylt1. Die cDNA-Synthese wird bis zum pbs im 5´-Ende der mRNA des Retrotransposons Ylt1 fortgesetzt.
- Der nichtprimende Teil der tRNA^{Ala} (5´-Ende der tRNA) wird ebenso wie das gesamte mRNA-Template außer dem Polypurin Bereich (ppt) von RNase H abgebaut.

Die cDNA Synthese des Plusstranges

- Die verbleibende mRNA des Polypurin-Bereiches (ppt, TGGGCAGG-Sequenz) dient als Primer für cDNA-Synthese des Plusstranges. Die Verlängerung erfolgt bis zum Primer

Bindungsbereich der tRNA Reste. In dieser Schritt wird „strong-stop“-DNA des Plusstranges synthetisiert.

- e. Die „strong-stop-DNA“ des Plusstranges springt von 5`-Ende in das 3`-Ende der Ylt1-cDNA des Minusstranges und paart mit der Primer-Bindungsstelle des Minusstranges. Die Verlängerung erfolgt bis zum PPT-Bereich der cDNA des Minusstranges.
- f. Die doppelsträngige cDNA des Retrotransposons Ylt1 wird komplett synthetisiert und kann nun ins Genom der *Y. lipolytica*-Wirtszellen integriert werden (siehe Abbildung 49).

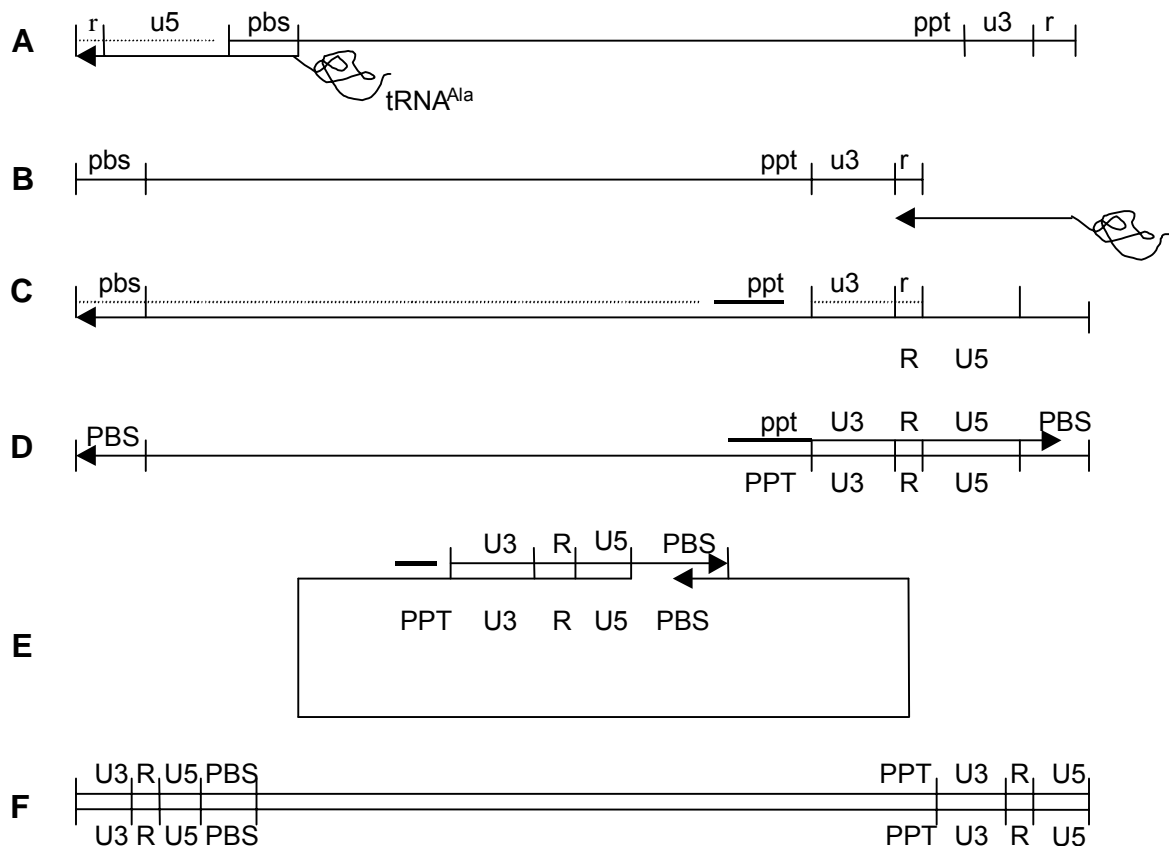


Abbildung 49: Der vermutliche Prozess der reversen Transkription des Retrotransposons Ylt1. Erklärung siehe Text. R: Wiederholungen im Bereich der LTR, U3: Unikaler Bereich des LTR, PBS: Primer-Bindungsstelle, PPT: Polypurin-Bereich (polypurine tract), U5: Unikaler Bereich des LTR, tRNA^{Ala}: tRNA für Alanin. Die r, u3, u5, pbs und ppt existieren in der mRNA und R, U3, U5, PBS und PPT existieren in der cDNA.

Der hier vorgeschlagene reverse Transkriptionsprozess des Retrotransposons Ylt1 von *Y. lipolytica* ist bisher noch nicht genau untersucht. Weitere Untersuchungen sind nötig, um diesen Prozess in *Y. lipolytica* aufzuklären.

5 Zusammenfassung

In der Hefe *Y. lipolytica* existiert neben anderen Retrotransposonen das Retrotransposon Ylt1. Dieses Retrotransposon besteht aus den flankierenden „Long Terminal Repeats“ (LTR) *zeta*, die in ihrer Sequenz identisch sind, und dem internen Bereich *eta*. Dieses Retrotransposon wurde erstmalig von Schmid-Berger *et al.* (1994) isoliert und charakterisiert. Allerdings war die Sequenz des *eta*-Bereiches zu Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit noch nicht vollständig bekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Struktur und Funktion des Retrotransposons Ylt1. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt :

- Die vollständige Sequenz (9453 bp) des Retrotransposons Ylt1 wurde durch die Sequenzierung zweier unabhängiger Klone ermittelt. Der interne Bereich *eta* des Retrotransposons enthält einen durchgängigen ORF. Ein möglicher Translationsstartpunkt (ATG) in der mRNA des Ylt1 befindet sich in Position 826 bis 828. Die Termination der Translation (TGA) könnte ab der Position 8689 erfolgen. Die LTR-Sequenzen enthalten nicht nur einen RNA-Polymerasebindungsbereich (TATA Box) sondern auch ein mögliches Terminations-Signal der Transkription (TATG) sowie ein Polyadenylierungssignal (AATAAA) und könnten damit als Promotor wie auch als Terminator fungieren. Eine Primer Bindungsstelle (**primer binding site**, PBS) (TGGTGGACGACACC-Sequenz) für die cDNA-Synthese des Minusstranges und ein Polypurin-Bereich (**polypurine tract**, PPT) (TGGGCAGG Sequenz) für die cDNA-Synthese des Plusstranges sind ebenfalls innerhalb der Ylt1 Sequenz enthalten.
- Aufgrund des Vergleiches der Sequenz des Retrotransposons Ylt1 mit anderen bereits charakterisierten Retrotransposonen konnten in dem offenen Leserahmen die codierenden Bereiche für das Gag-Strukturprotein (Gag) (CCHC Motiv), die Protease (PR) (DSG Motiv), die reverse Transkriptase (RT) (FXDD Motiv), die RNase H (RH) (TDAS) und die Integrase (IN) (HHCC und D₃₄E Motive) zugeordnet werden.
- Mittels Southern Hybridisierung konnte das Retrotransposons Ylt1 in den *Y. lipolytica*-Stämmen B512-3, B204-12C, B204-12C-20, B204-12A-213 E150, H194 (YB423-12) und CXAU1 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu enthalten die *Y. lipolytica* Stämme PO1d, H181, W29 und H222 kein Ylt1 Retrotransposon. Ein möglicherweise bisher nicht charakterisiertes Retrotransposon mit einer geringen Homologie zum LTR bzw. zum LTR-5'*eta*-Bereich des Ylt1 wurde in den Stämmen PO1d bzw. H181 detektiert.
- Aus der Analyse von Sequenzdaten genomischer DNA der Stämme W29 und E150 war bekannt, dass neben Ylt1 ebenfalls die transponiblen Elemente Tyl3, LTRYl1 und Ylli vorkommen. Ein weiteres Retrotransposon Tyl3B wurde in der genomischen Sequenz des Stammes E150 entdeckt. Dies besteht aus 4556 Nukleotiden der internen Region und wird von jeweils 276 Nukleotiden der LTRs flankiert. Es enthält 2 ORFs (ORF1: 252

Aminosäuren und ORF2: 1235 Aminosäuren), welche für Gag und Pol codieren. Die Sequenzdaten deuten darauf hin, dass bei der Translation zwischen Gag und Pol ein –1 Frameshift stattfinden kann. Das abgeleitete Pol-Protein enthält die Regionen für Protease (PR), reverse Transkriptase (RT), RNase H (RH) und Integrase (IN). Bisher konnte nur eine Kopie im Genom von E150 nachgewiesen werden, weshalb nicht klar ist, ob dieses Retrotransposon aktiv ist.

- Nach der Kultivierung von *Y. lipolytica* B204-12C-20 in acetathaltigem Minimalmedium konnten im Southern Blot zusätzliche durch Ylt1 verursachte Banden detektiert werden. Bei der Kultivierung in Minimalmedium mit Glucose konnte dies nicht beobachtet werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Retrotransposon Ylt1 durch Acetat aktiviert wird.
- Die Promotoraktivität des LTR-Bereichs (LTRA) und die des Bereichs von LTR mit den Sequenzen bis zum ATG (LTRB) wurde mittels *lacZ*-Reporteranalysen untersucht. Hierbei konnte eine höhere Aktivität des LTRB-Promotors im Vergleich zum LTRA-Promotor festgestellt werden. Die Aktivität des LTR-Promotors ist von der Kohlenstoffquelle abhängig. Während in glucosehaltigem Minimalmedium nur eine minimale Expression der β -Galactosidase unter Kontrolle dieses LTR-Promotors festgestellt werden konnte (ca. 4 Millerunits), bewirkten Acetat und Ethanol eine Erhöhung der Promotoraktivität auf das 4fache (ca. 16-20 Millerunits) dieser basalen Aktivität.
- Aufgrund der niedrigen Expression des Ylt1 Retrotransposons konnten keine mRNA-Transkripte mittels Northern Blot nachgewiesen werden.
- Nachdem der Ylt1-ORF unter Kontrolle des *ICL1*-Promotors aus *Y. lipolytica* exprimiert wurde, konnte ein 140 kDa großes Protein im Western Blot nachgewiesen werden. Dieses Protein ist möglicherweise ein Gag-Protease-Fusionsprotein, wobei unklar ist, ob dies natürlicherweise auftritt, weil durch die Insertion eines HA-Epitops möglicherweise die Proteaseschnittstelle zerstört wurde.
- Ebenso konnte die Expression einer Integrase-GFP-Fusion von etwa 75 kDa unter Kontrolle des *ICL1*-Promotors nachgewiesen werden.

6 Literaturverzeichnis

- Addis E, Fleet GH, Cox JM, Kolak D, Leung T (2001) The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *Int J Food Microbiol* 69(1-2): 25-36.
- Ahlers PM, Garofano A, Kerscher SJ, Brandt U (2000a) Application of the obligate aerobic yeast *Yarrowia lipolytica* as a eucaryotic model to analyse Leigh syndrome mutations in the complex I core subunits PSST and TYKY. *Biochim Biophys Acta* 1459(2-3): 258-265.
- Ahlers PM, Zwicker K, Kerscher S, Brandt U (2000b) Function of conserved acidic residues in the PSST homologue of complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* 275(31): 23577-23582.
- Aitchison JD, Szilard RK, Nuttley WM, Rachubinski RA (1992) Antibodies directed against a yeast carboxyl-terminal peroxisomal targeting signal specifically recognize peroxisomal proteins from various yeasts. *Yeast* 8: 721-734.
- Alkasrawi M, Nandakumar R, Margesin R, Schinner F, Mattiasson B (1999) A microbial biosensor based on *Yarrowia lipolytica* for the off-line determination of middle-chain alkanes. *Biosensors Bioelectronics* 14: 723-727.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Anastassiadis S, Aivasidis A, Wandrey C (2002) Citric acid production by *Candida* strains under intracellular nitrogen limitation. *Appl Microbiol Biotechnol* 60(1-2): 81-77.
- Anaya N, Roncero MI (1995) Skippy, a retrotransposon from the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Gen Genet* 249(6): 637-647.
- Antonucci S, Bravi M, Bubbico R, Di Michele A, Verdone N (2001) Selectivity in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme Microb Technol* 28(2-3): 189-195.
- Arkhipova IR, Mazo AM, Cherkasova VA, Gorelova TV, Schuppe NG, Ilyin YV (1986) The steps of reverse transcription of *Drosophila* mobile dispersed genetic elements and u3-R-U5 structure of their LTRs. *Cell* 44: 555-563.
- Arzumanov TE, Shishkanova NV, Finogenova TV (2000) Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 525-529.
- Augstein A (2001) Molekularbiologische Charakterisierung und funktionelle Analyse des GPR1-Genproduktes in der Hefe *Yarrowia lipolytica*. Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Dresden.
- Augstein A, Tzschoppe K, Gentsch M, Kohlwein SD, Barth G (2003) Characterization, localization and functional analysis of Gpr1p, a protein affecting sensitivity to acetic acid in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* 149(3): 589-600.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (Editor) (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley.
- Balashova M, Petkov P, Galabova D (1990) Characterization of the extracellular alkaline phosphatase from *Candida lipolytica*. *Comptes Rendus De L'Academie Bulgare Des Sciences* 43: 49-52.
- Barns S M, Lane DJ, Sogin ML, Bibeau C, Weisburg WG (1991) Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J Bacteriol* 173: 2250-2255.
- Barth G (1985) Genetic regulation of isocitrate lyase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* 10: 119-124.
- Barth G, Gaillardin C (1996) *Yarrowia lipolytica*. In: *Nonconventional yeasts in biotechnology. A handbook* (K Wolf, ed), Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 313-388.
- Barth G, Gaillardin C (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev* 19(4): 219-237.

- Barth G, Scheuber T (1993) Cloning of the isocitrate lyase gene (*ICL1*) from *Yarrowia lipolytica* and characterization of the deduced protein. *Mol Gen Genet* 241: 422-430.
- Barth G, Weber H (1982) Genetic studies on the yeast *Saccharomycopsis lipolytica*. Inactivation and mutagenesis. *Z Allg Mikrobiol* 23: 147-157.
- Barth G, Weber H (1984) Improved conditions for mating of the yeast *Saccharomycopsis lipolytica*. *Z Allg Mikrobiol* 24 : 403-405.
- Barth G, Weber H (1985) Improvement of sporulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 51: 167-177.
- Barth G, Weber H (1987) Genetic analysis of the gene *ICL1* of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 3: 255-262.
- Barth G, Beckerich J-M, Dominguez A, Kerscher S, Ogrydziak D, Titorenko V, Gaillardin C (2003) Functional genetics of *Yarrowia lipolytica*. In: deWinde JH (ed), *Functional genetics of industrial yeasts*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 227–271.
- Bascom RA, Chan H, Rachubinski RA (2003) Peroxisome Biogenesis Occurs in an Unsynchronized Manner in Close Association with the Endoplasmic Reticulum in Temperature-sensitive *Yarrowia lipolytica* Pex3p Mutants. *Mol Biol Cell* 14(3):939-957.
- Bassel JB, Mortimer RK (1982) Genetic and biochemical studies of n-alkane non-utilizing mutants of *Saccharomycopsis lipolytica*. *Curr Genet* 5, 77-88.
- Bassel JB, Mortimer RK (1985) Identification of mutations preventing n-hexadecane uptake among 26 n-alkane non-utilizing mutants of *Yarrowia (Saccharomycopsis) lipolytica*. *Curr Genet* 9: 579-586.
- Beckerich JM, Boisrame-Baudevin A, Gaillardin C. (1998) *Yarrowia lipolytica*: a model organism for protein secretion studies. *Int Microbiol* 1(2): 123-130.
- Behrens U, Ringpfeil M, Stottmeister U, Weißbrodt E, Karbaum K, Hubald M (1986) Verfahren zur Herstellung von Citronensäure durch Hefen. Patent DD232309.
- Behrens R, Hayles J, Nurse P (2000) Fission yeast retrotransposon Tf1 integration is targeted to 5' ends of open reading frames. *Nucleic Acids Res* 28(23): 4709-4716.
- Berninger G, Schmidtchen R, Casel G, Knoerr A, Rautenstrauss K, Kunau WH, Schweizer E (1993) Structure and metabolic control of the *Yarrowia lipolytica* peroxisomal 3-oxoacyl-CoA-thiolase gene. *Eur J Biochem* 216: 607-613.
- Bhave SL, Chattoo BB (2002) Expression of *Vitroscilla* hemoglobin enhances growth in *Yarrowia lipolytica*. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting (TYLIM2002). Dresden, July 17–20, 2002., Abstracts p 112.
- Bigelis ER, Black KA (1990) Biotransformation of L-tyrosine and L-phenylalanine to 2,5-dihydroxy phenyl acetic acid. Patenschrift US4956279, EP0343330.
- Bingham PM, Zachar Z (1989) Retrotransposons and the FB transposons from *Drosophila melanogaster*. In: Berg, DE, Howe, MM (eds) *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Whashington DC: 485-502.
- Boeke JD, Garfinkel DJ, Styles CA, Fink GR (1985) Ty Elements Transpose Through an RNA Intermediate, *Cell* 40: 491-500.
- Boeke JD, Sandmeyer SB (1991) Yeast transposable elements. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics*. JR Broach (ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 193-261.
- Boeke JD, Stoye JP (1997) Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the volution of retroelements. In: *Retroviruses*, J.M. Coffin, S. H. Hughes, and H. E. Varmus (Eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 343-435.
- Boisrame A, Beckerich JM, Gaillardin C. (1996) SIs1p, an endoplasmic reticulum component, is involved in the protein translocation process in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem*. 271(20): 11668-11675.

- Boisrame A, Kabani M, Beckerich JM, Hartmann E, Gaillardin C. (1998) Interaction of Kar2p and Sls1p is required for efficient co-translational translocation of secreted proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* 273(47): 30903-30908.
- Boisrame A, Beckerich JM, Gaillardin C. (1999) A mutation in the secretion pathway of the yeast *Yarrowia lipolytica* that displays synthetic lethality in combination with a mutation affecting the signal recognition particle. *Mol Gen Genet* 261(4-5): 601-609.
- Boisrame A, Chasles M, Babour A, Beckerich JM, Gaillardin C. (2002) Sbh1p, a subunit of the Sec61 translocon, interacts with the chaperone calnexin in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Sci* 115(Pt 24): 4947-4956.
- Bon E, Casaregola S, Blandin G, Llorente B, Neuveglise C, Munsterkotter M, Guldener U, Mewes HW, Van Helden J, Dujon B, Gaillardin C (2003) Molecular evolution of eukaryotic genomes: hemiascomycetous yeast spliceosomal introns. *Nucleic Acids Res* 31(4): 1121-1135.
- Bon E, Neuveglise C, Casaregola S, Artiguenave F, Wincker P, Aigle M, Durrens P (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 5. *Saccharomyces bayanus* var. *Uvarum*. *FEBS Lett.* 487 (1): 37-41.
- Buckholz RG (1993) Yeast systems for the expression of heterologous gene products. *Curr Opin Biotechnol* 4(5): 538-542.
- Buckholz RG, Gleeson MA (1991) Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology* 9(11): 1067-1072.
- Burkhardt-Maturin R, Wilson TE (1983) Continuous culture of *Azotobacter vinelandii* and *Candida lipolytica* in artificial seawater. *Microbiol Immunol* 27(6): 547-550.
- Bühler M, Schindler J (1984) Aliphatic hydrocarbons. *In: Biotechnology*, Vol 6a, Rehm HJ, Reed G (eds), Verlag Chemie, Weinheim, pp 229-385.
- Cambareri EB, Helber J, Kinsey JA (1994) Tad1-1, an active LINE-like element of *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet* 242(6): 658-665.
- Cambareri EB, Aisner R, Carbon J (1998) Structure of the chromosome VII centromere region in *Neurospora crassa*: degenerate transposons and simple repeats. *Mol Cell Biol* 18(9): 5465-5477.
- Capello J, Handelsman K, Lodish HF (1985) Sequence of *Dictyostelium* DIRS-1: An apparent retrotransposon with inverted terminal repeats and an internal circle junction sequence. *Cell* 43: 105-115.
- Cardillo R, Fronza G, Fuganti C, Grasselli P, Mele A, Pizzi D (1991) Stereochemistry of the microbial generation of delta-decanolide, gamma-dodecanolide and gamma-nonanolide from C18 13-hydroxy, C18 10-hydroxy, and C19 14-hydroxy unsaturated fatty acids. *J Org Chem* 56: 5237-5239.
- Carreira A, Dillinger K, Eliskases-Lechner F, Loureiro V, Ginzinger W, Rohm H (2002) Influence of selected factors on browning of Camembert cheese. *J Dairy Res* 69(2): 281-292.
- Carreira A, Ferreira LM, Loureiro V (2001a) Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* result from extracellular accumulation of homogentisic acid. *Appl Environ Microbiol* 67(8): 3463-3468.
- Carreira A, Ferreira LM, Loureiro V (2001b) Production of brown tyrosine pigments by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Appl Microbiol* 90(3): 372-379.
- Carreira A, Paloma L, Loureiro V (1998) Pigment producing yeasts involved in the brown surface discoloration of ewes' cheese. *Int J Food Microbiol* 41(3): 223-230.
- Casaregola S, Feynerol C, Diez M, Fournier P, Gaillardin C (1997) Genomic organization of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Chromosoma* 106(6): 380-390.
- Casaregola S, Neuveglise C, Lepingle A, Bon E, Feynerol C, Artiguenave F, Wincker P, Gaillardin C (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*. *FEBS Lett* 487(1): 95-100.

- Casaregola S, Neuveglise C, Bon E, Gaillardin C (2002a). Ylli, a non-LTR retrotransposon L1 family in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol Biol Evol* 19(5): 664-677.
- Casaregola S, Neuveglise C, Bon E, Gaillardin C (2002b). Ylli, a non-lon terminal repeat retrotransposon L1 family in *Yarrowia lipolytica*. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting (TYLIM2002). Dresden, July 17–20, 2002, Abstracts p 43.
- Casaregola S, Neuveglise C, Wincker P, Anthourard V, Weissenbach J, Gaillardin C (2003) The dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* genome sequencing project. *Yeast* 20(S1): S277 (Abstract 16-8 XXIth YGM conference, Göteborg, Sweden, July 7-12th, 2003).
- Chalker DL, Sandmeyer SB (1992) Ty3 integrates within the region of RNA polymerase III transcription initiation. *Genes Dev* 6(1): 117-28.
- Chalvet F, Grimaldi C, Kaper F, Langin T, Daboussi MJ (2003) *Hop*, an active *Mutator*-like element in the genome of the fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol Biol Evol* 20: 1362-1375.
- Chang CC, Rye DD, Park CS, Kim JY (1997) Enhancement of rice α -amylase production in recombinant *Yarrowia lipolytica*. *J Ferment Bioeng* 84: 421-427.
- Chang CC, Ryu DD, Park CS, Kim JY. (1998a) Improvement of heterologous protein productivity using recombinant *Yarrowia lipolytica* and cyclic fed-batch process strategy. *Biotechnol Bioeng*. 59(3): 379-385.
- Chang CC, Ryu DD, Park CS, Kim JY, Ogrzydziak DM (1998b). Recombinant bioprocess optimization for heterologous protein production using two-stage, cyclic fed-batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 49(5): 531-537.
- Chapman KB, Bystrom AS, Boeke JD (1992) Initiator methionine tRNA is essential for Ty1 transposition in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(8):3236-3240.
- Cheng SC, Ogrzydziak DM (1987) Processing and secretion of the *Yarrowia lipolytica* RNase. *J Bacteriol* 169: 1433-1440.
- Cheng SC, Ogrzydziak DM (1986) Extracellular RNase produced by *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* 168(2): 581-589.
- Cheon SA, Song YY, Kim JW, Kim JY (2002) Characterization of genes involved in hyphal development of *Yarrowia lipolytica*. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting (TYLIM2002). Dresden, July 17–20, 2002, Abstracts p 37.
- Cheon SA, Han EJ, Kang HA, Ogrzydziak DM, Kim JY (2003) Isolation and characterization of the *TRP1* gene from the yeast *Yarrowia lipolytica* and multiple gene disruption using a TRP blaster. *Yeast* 20(8): 677-685.
- Chernyavskaya OG, Shishkanova NV, Ilchenko AP, Finogenova TV (2000) Synthesis of alpha-ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 152-158.
- Clare JJ, Davidow LS, Gardner DC, Oliver SG (1986) Cloning and characterisation of the ribosomal RNA genes of the dimorphic yeast, *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* 10(6): 449-452.
- Coffin JM (1990) Retroviridae and their replication. In: Fields B.N, Knipe, D.M. (eds). *Virology*, 2nd edn. Raven, New York, 1437-1500.
- Coffin JM (1992) Structure and classification of retroviruses. In: The Retroviridae, Levy JA (eds), Plenum Press New York and London, pp. 19-44.
- Colot V, Haedens V, Rossignol J-L (1998) Extensive, nonrandom diversity of excision footprints generated by *Ds*-like transposon *Ascot-1* suggests new parallels with V(D)J recombination. *Molec Cell Biol* 18(7): 4337-4346.
- Connelly S, Manley JL (1988) A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II. *Genes Dev* 2(4): 440-452.
- Covey SN (1986) Amino acid sequence homology in gag region of reverse transcribing elements and the coat protein gene of *cauliflower mosaic virus*. *Nucleic Acids Res* 14(2): 623-33.

- Crolla A, Kennedy KJ (2001) Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using *n*-paraffin. *J Biotechnol* 89: 27-40.
- Curcio MJ, Sanders NJ, Garfinkel DJ (1988) Transpositional competence and transcription of endogenous Ty elements in *Saccharomyces cerevisiae*: implications for regulation of transposition. *Mol Cell Biol* 8(9): 3571-3581.
- Davidow LS, Kaczmarek FS, DeZeeuw JR, Conlon SW, Lauth MR, Pereira DA, Franke AE (1987) The *Yarrowia lipolytica* LEU2 gene. *Curr Genet* 11: 377-383.
- Deak T (2001) Identification of yeasts isolated from poultry meat. *Acta Biol Hung* 52(2-3): 195-200.
- Deak T, Chen J, Beuchat LR (2000) Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Appl Environ Microbiol* 66(10): 4340-4344.
- De Felice B, Scioli D (1994) Use of crude whey by *Kluyveromyces marxianus* and *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution of effluents. *Ann Microbiol Enzimol* 44: 65-72.
- De Felice B, Pontecorvo G, Carfagna M (1997) Degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *Pseudomonas putida*. *Acta Biotechnol* 17(3): 231-239.
- Destain J, Roblain D, Thonart P (1997) Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* 19: 105-107.
- Devine SE, Boeke JD (1996) Integration of the yeast retrotransposon Ty1 is targeted to regions upstream of genes transcribed by RNA polymerase III. *Genes Dev* 10(5):620-633.
- Diolez A, Marches F, Fortini D, Brygoo Y (1995) Boty, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol* 61(1): 103-108.
- Djafarzadeh R, Kerscher S, Zwicker K, Radermacher M, Lindahl M, Schagger H, Brandt U. (2000) Biophysical and structural characterization of proton-translocating NADH-dehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim Biophys Acta*. 1459(1):230-238.
- Dobinson KF, Harris RE, Hamer JE (1993) Grasshopper, a long terminal repeat (LTR) retroelement in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* 6(1): 114-126.
- Dominguez A, Ferminan E, Sanchez M, Gonzalez FJ, Perez-Campo FM, Garcia S, Herrero AB, San Vicente A, Cabello J, Prado M, Iglesias FJ, Choupina A, Burguillo FJ, Fernandez-Lago L, Lopez MC (1998) Non-conventional yeasts as hosts for heterologous protein production. *Int Microbiol* 1(2): 131-42.
- Dominguez A, Ferminan E, Gaillardin C (2000) *Yarrowia lipolytica*: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analysing dimorphism in fungi. *Contrib Microbiol* 5: 151-172.
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16: 6127-6145.
- Dunn BM, Goodenow MM, Gustchina A, Wlodawer A (2002) Retroviral proteases. *Genome Biol* 3(4).
- Eierdanz H, Lorenz P, Meusdörffer F, Schindler J, Stoll G, Waldhoff H (1991a) Verfahren zur Herstellung verzweigter Carboxylverbindungen. Patent DE4015851.
- Eierdanz H, Giesel-Bühler H, Hänggi U, Meusdörffer F, Schindler J (1991b) Selektionsverfahren für Hefezellen. Patent DE3929337.
- El-Sherbeini M, Bostian KA, Levitre J, Mitchell DJ (1987) Gene-protein assignments within the yeast *Yarrowia lipolytica* dsRNA viral genom. *Curr Genet* 11: 483-490.
- Enderlin CS, Ogydziaik DM (1994) Cloning, nucleotide sequence and functions of XPR6, which codes for a dibasic processing endoprotease from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 10: 67-79.
- Endrizzi A, Pagot Y, Le Clainche A, Nicaud JM, Belin JM (1996) Production of lactones and peroxisomal beta-oxidation in yeasts. *Crit Rev Biotechnol* 16(4): 301-329.

- Ercoli B, Fuganti C, Graselli P, Servi S, Allegrano G, Barbeni M, Pisciotta A (1992) Stereochemistry of the biogenesis of C-10 and C-12 gamma-lactones in *Yarrowia lipolytica* and *Pichia ohmeri* Biotechnol Lett 14: 665-668.
- Esnault C, Maestre J, Heidmann T (2000) Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. Nat Genet 24(4): 363-367.
- Eto Y, Ikeda K, Chuma I, Kataoka T, Kuroda S, Kikuchi N, Don LD, Kusaba M, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S (2001) Comparative analyses of the distribution of various transposable elements in *Pyricularia* and their activity during and after the sexual cycle. Mol Gen Genet 264(5): 565-577.
- Fabre E, Nicaud JM, Lopez MC, Gaillardin C (1991) Role of the proregion in the production and secretion of the *Yarrowia lipolytica* alkaline extracellular protease. J Biol Chem 266: 3783-3790.
- Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, Sigrist CJ, Hofmann K, Bairoch A (2002) The PROSITE database, its status in 2002. Nucleic Acids Res 30(1): 235-258.
- Fantin G, Fogagnolo M, Giovannini PP, Medici A, Pedrini P, Gardini F, Lanciotti R (1996a) Anti-Prelog microbial reduction of prochiral carbonyl compounds. Tetrahedron 52(10): 3547-3552.
- Fantin G, Fogagnolo M, Guerzoni E, Lanciotti R, Medici A, Pedrini P, Rossi D (1996b) Effect of high hydrostatic pressure and high pressure homogenization on enantioselectivity of microbial reductions. Tetrahedron: Asymmetry 7: 2879-2887.
- Fantin G, Fogagnolo M, Medici A, Pedrini P, Fontana S (2000) Tetrahedron Asymmetry 11: 2367-2371.
- Fantin G, Fogagnolo M, Guerrini A, Medici A, Pedrini P, Fontana S (2001) Enantioselective hydrolysis with *Yarrowia lipolytica*: a versatile strain for esters, enolesters, epoxides, and lactones. Tetrahedron: Asymmetry 12: 2709-2713.
- Farman ML, Tosa Y, Nitta N, Leong SA (1996) MAGGY, a retrotransposon in the genome of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Mol Gen Genet 251(6): 665-674.
- Fausek EA, Shishkanova NV, Eremina SS, Finogenova TV (1991) Enzyme activities in the citrate and glyoxylate cycles during growth of *Candida lipolytica* on a medium containing ethanol and synthesis of isocitric acid. Microbiology Moscow (Mikrobiologiya) 60: 10-14.
- Felsenstein J (1993) PHYLIP manual, version 3.5., Seattle: University of Washington.
- Ferreira AD, Viljoen BC (2003) Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. Int J Food Microbiol 86(1-2): 131-140.
- Fickers P, Nicaud JM, Destain J, Thonart P (2003) Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. Appl Microbiol Biotechnol, im Druck.
- Finnegan DJ (1997) How non-LTR retrotransposons do it. Curr Biol 7: 245-248.
- Finogenova TV (1991) Overproduction of metabolites by yeasts and its regulation (Russian). In: Finogenova TV, Sharyshev AA, (eds), Alkane metabolism and oversynthesis of metabolites by microorganisms, Center Biological Research USSR Academy Sciences, Pushchino, Russia, pp 96-114.
- Finogenova TV, Kamzolova SV, Dedyukhina EG, Shishkanova NV, Ilchenko AP, Morgunov IG, Chernyavskaya OG, Sokolov AP (2002) Biosynthesis of citric and isocitric acids from ethanol by mutant *Yarrowia lipolytica* N 1 under continuous cultivation. Appl Microbiol Biotechnol 59(4-5): 493-500.
- Fleet GH (1990) Yeast in dairy products – a review. J ppl Bacteriol 68: 199-211.
- Fleet GH (2001) The rising power of yeasts in science and industry in The Tenth International Symposium on Yeasts (ISY 2000). FEMS Yeast Res.
- Fontana S, Casanova E, Fantin G, Fogagnolo M, Guerrini A, Medici A, Pedrini P (2002) *Yarrowia lipolytica* strains in kinetic resolution of organic compounds. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting (TYLIM2002), Dresden, Germany, 17–20 July 2002, Abstracts p110 (Poster 37).

- Förster A, Gärtner K, Juretzek T, Fleig R, Barth G, Mauersberger S (2002). Proliferation of the endoplasmic reticulum during expression of cytochrome P450 17α and NADPH-P450 reductase in *Yarrowia lipolytica*. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting (TYLIM2002), Dresden, Germany, 17–20 July 2002, Abstracts p115 (Poster 42).
- Fourcade-Peronnet F, d'Auriol L, Becker J, Galibert F, Best-Belpomme M (1988). Primary structure and functional organization of *Drosophila* 1731 retrotransposon. *Nucleic Acids Res.* 16 (13): 6113-6125.
- Fournier P, Abbas A, Chasles M, Kudla B, Ogrydziak DM, Yaver D, Xuan JW, Peito A, Ribet AM, Feynerol C (1993) Colocalization of centromeric and replicative functions on autonomously replicating sequences isolated from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(11): 4912-4916.
- Fukui S, Tanaka A (1980) Production of useful compounds from alkane media in Japan. *Adv Biochem Eng* 17: 1–35.
- Galabova D, Tuleva B, Balasheva M. (1993) Phosphatase activity during growth of *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Lett* 109(1): 45-48.
- Gaillardin CM, Charoy V, Heslot H (1973) A study of copulation, sporulation and meiotic segregation in *Candida lipolytica*. *Arch Mikrobiol* 92: 69-83.
- Gaillardin C, Duchateau-Nguyen G, Tekaiia F, Llorente B, Casaregola S, Toffano-Nioche C, Aigle M, Artiguenave F, Blandin G, Bolotin-Fukuhara M, Bon E, Brottier P, de Montigny J, Dujon B, Durrens P, Lepingle A, Malpertuy A, Neuveglise C, Ozier-Kalogeropoulos O, Potier S, Saurin W, Termier M, Wesolowski-Louvel M, Wincker P, Souciet J, Weissenbach J. (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 21. Comparative functional classification of genes. *FEBS Lett* 487(1): 134-149.
- Gaillardin C, Heslot H (1988) Genetic engineering in *Yarrowia lipolytica*. *J Basic Microbiol* 28: 161-174.
- Gaillardin C, Poirier L, Heslot H (1975) Studies on an unstable phenotype induced by UV irradiation: the lysine-excreting (lex⁻) phenotype of the yeast *Saccharomycopsis lipolytica*. *Arch Mikrobiol* 104: 89-94.
- Gardini F, Suzzi G, Lombardi A, Galgano F, Crudele MA, Andrighetto C, Schirone M, Tofalo R (2001) A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. *FEMS Yeast Res* 1(2):161-167.
- Garfinkel DJ (1992) Retroelements in microorganisms. In: *The Retroviridae*, Levy JA (eds), Plenum Press New York and London, pp. 107-145.
- Garfinkel DJ, Boeke JD, Fink GR (1985) Ty element transposition: reverse transcriptase and virus-like particles. *Cell* 42: 507-517.
- Garofano A, Zwicker K, Kerscher S, Okun P, Brandt U (2003) Two aspartic acid residues in the PSST-homologous NUKM subunit of complex I from *Yarrowia lipolytica* are essential for catalytic activity. *J Biol Chem*, 278(43): 42435-42440.
- Gentsch M (2003) Funktionelle Analyse und Charakterisierung des Gpr1-Proteins in der Hefe *Yarrowia lipolytica*. Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Dresden.
- Gentsch M, Kuschel M, Barth G (2003) Expression of mutant Gpr1p in *Yarrowia lipolytica* and its effect on growth on different media. In: Wolf K, Breunig K, Barth G (eds), *Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 379–384.
- Glover DJ, McEwen RK, Thomas CR, Young TW (1997) pH-regulated expression of the acid and alkaline extracellular proteases of *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* 143, 3045-3054.
- Glöckner G, Szafranski K, Winckler T, Dingermann T, Quail MA, Cox E, Eichinger L, Noegel AA, Rosenthal A (2001) The complex repeats of *Dictyostelium discoideum*. *Genome Res* 11(4): 585-594.

- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274(5287): 546, 563-567.
- Gonda MA (1988) Molecular genetics and structure of the human immunodeficiency virus. *J Electron Microscop Tech.* 8(1):17-40.
- Gonzalez-Lopez CI, Szabo R, Blanchin-Roland S, Gaillardin C. (2002) Genetic control of extracellular protease synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Genetics*.160(2): 417-427.
- Goodwin TJ, Ormandy JE, Poulter RT (2001). L1-like non-LTR retrotransposons in the yeast *Candida albicans*. *Current Genet* 39(2): 83-91.
- Goodwin TJ, Dalle Nogare DE, Butler MI, Poulter RT (2003). Ty3/gypsy-like retrotransposons in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: Tca3 and Tcd3. *Yeast* 20(6): 493-508.
- Goodwin TJ, Poulter RT (2000) Multiple LTR-retrotransposon families in the asexual yeast *Candida albicans*. *Genome Res* 10(2): 174-191.
- Goodwin TJ, Poulter RT (2001a) The diversity of retrotransposons in the yeast *Cryptococcus neoformans*. *Yeast* 18(9): 865-880.
- Goodwin TJ, Poulter RT (2001b) The DIRS1 group of retrotransposons. *Mol Biol Evol* 18(11): 2067-2082.
- Götte M, Fackler S, Hermann T, Perola E, Cellai L, Gross HJ, Le Grice SF, Heumann H (1995) HIV-1 reverse transcriptase-associated RNase H cleaves RNA/RNA in arrested complexes: implications for the mechanism by which RNase H discriminates between RNA/RNA and RNA/DNA. *EMBO J* 14(4): 833-841.
- Goyon C, Rossignol JL, Faugeron G (1996) Native DNA repeats and methylation in *Ascombolus*. *Nucleic Acids Res* 24(17): 3348-3356.
- Grandbastien MA (1992) Retroelements in Higher Plants. *Trends Genet* 8: 103-108.
- Grandbastien MA (1998) Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends in Plant Science (Review)* 3(5): 181-187.
- Grandbastien MA, Spielmann A, Caboche M (1989) Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. *Nature* 337 (6205): 376-380.
- Groves DP, Clare JJ, Oliver SG (1983) Isolation and characterization of a double-stranded RNA virus-like particle from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* 7, 185-190.
- Guevara-Olivera L, Calvo-Mendez C, Ruiz-Herrera J (1993) The role of polyamine metabolism in dimorphism of *Yarrowia lipolytica*. *J Gen Microbiol* 139: 485-493.
- Guerzoni ME, Gobetti M, Lanciotti R, Vannini L, Chaves Lopez C (1998) *Yarrowia lipolytica* as potential ripening agent in milk products. In: Jakobsen M, Narhus J, Vijoen BC (eds) IDF symp yeasts in dairy industry: positive and negative aspects, Copenhagen, Denmark, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, pp 23-33.
- Guerzoni ME, Lanciotti R, Vannini L, Galgano F, Favati F, Gardini F, Suzzi G (2001) Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *Int J Food Microbiol* 69(1-2):79-89.
- Gunkel K, van der Klei IJ, Barth G, Veenhuis M (1999) Selective peroxisome degradation in *Yarrowia lipolytica* after a shift of cells from acetate/oleate/ethylamine into glucose/ammonium sulfate containing media. *FEBS Lett* 451: 1-4.
- Guo X, Tomonaga T, Yanagihara Y, Ota Y (1999) Screening for yeasts incorporating the exogenous eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from crude fish oil. *J Biosci Bioeng* 87(2): 184-188.
- Gysler C, Duboc P, Vidal K, Nicaud J-M, Affolter M, Pampel L, Niederberger P (2002) Expression of biologically active human sCD14 in *Yarrowia lipolytica*. *Third Yarrowia lipolytica International Meeting (TYLIM2002)*. Dresden, July 17–20, 2002, Abstracts p 57.
- Hadeball W (1991) Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. *Acta Biotechnol* 11: 159-167.

- Hagihara T, Mishina, M, Tanaka A, Fukui, S (1977) Utilization of tristane by the yeast *Candida lipolytica*. Fatty acid composition of pristane-grown cells. *Agric Biol Chem* 41: 1745-1748.
- Hajek KL, Friesen PD (1998) Proteolytic processing and assembly of gag and gag-pol proteins of TED, a baculovirus-associated retrotransposon of the gypsy family. *J Virol* 72(11): 8718-8724.
- Hamer JE, Farrall L, Orbach MJ, Valent B, Chumley FG (1989) Host species-specific conservation of a family of repeated DNA sequences in the genome of a fungal plant pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(24): 9981-9985.
- Hamilton GE, Luechau F, Burton SC, Lyddiatt A (2000) Development of a mixed mode adsorption process for the direct product sequestration of an extracellular protease from microbial batch cultures. *J Biotechnol* 79(2):103-115.
- Hamilton GE, Morton PH, Young TW, Lyddiatt A (1999) Process intensification by direct product sequestration from batch fermentations: application of a fluidised bed, multi-bed external loop contactor. *Biotechnol Bioeng* 64:310-321.
- Hamsa PV, Chattoo BB (1994) Cloning and growth-regulated expression of the gene encoding the hepatitis B virus middle surface antigen in *Yarrowia lipolytica*. *Gene* 143: 165-170.
- Hamsa PV, Kachroo P, Chattoo BB (1998) Production and secretion of biologically active human epidermal growth factor in *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* 33(3): 231-237.
- Hansen LJ, Chalker DL, Orlinsky KJ, Sandmeyer SB (1992) Ty3 GAG3 and POL3 genes encode the components of intracellular particles. *J Virol* 66(3): 1414-1424.
- Hansen LJ, Chalker DL, Sandmeyer SB (1988) Ty3, a yeast retrotransposon associated with tRNA genes, has homology to animal retroviruses. *Mol Cell Biol* 8(12):5245-56.
- Hansen LJ, Sandmeyer SB (1990) Characterization of a transpositionally active Ty3 element and identification of the Ty3 integrase protein. *J Virol* 64(6): 2599-2607.
- Häusler A, Münch T (1997) Microbial production of natural flavors. *ASMNews* 63(10): 551-559.
- He C, Nourse JP, Kelemu S, Irwin JA, Manners JM (1996) CgT1: a non-LTR retrotransposon with restricted distribution in the fungal phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mol Gen Genet* 252(3): 320-331.
- Herrero AB, Lopez MC, Fernandez-Lago L, Dominguez A (1999) *Candida albicans* and *Yarrowia lipolytica* as alternative models for analysing budding patterns and germ tube formation in dimorphic fungi. *Microbiology* 145: 2727-2737.
- Heslot P (1990) Genetics and genetic engineering of the industrial yeast *Yarrowia lipolytica*. *Adv Biochem Eng/Biotechnol* 43: 43-73.
- Heslot H, Gaillardin C, Beckerich JM, Fournier P (1979) Control of lysine metabolism in the petroleum yeast *Saccharomycopsis lipolytica*. In: Sebek O, Laskin A (Eds) *Genetics of industrial microorganisms*. American Society for Microbiology, Washington DC, pp 54-60.
- Holton NJ, Goodwin TJ, Butler MI, Poulter RT (2001) An active retrotransposon in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* 29(19): 4014-4024.
- Horakova D, Nemeč M – BIOREM AG, Schweiz (1996) Use of the yeast *Yarrowia lipolytica* for industrial biodegradation of oils and fats in sewage and biodegradation process using it. *Weltpatent* WO9638389, und EP0846084 (1998)
- Hottinger HH, Richardson T, Amundson CH, Stuiber DA (1974) Utilization of fish oil by *Candida lipolytica* and *Geotrichum candidum*. I. Basal conditions. II. Optimazation of conditions. *J Milk Food Technol* 37: 463-468, 522-528.
- Hutardo CA, Beckerich JM, Gaillardin C, Rachubinski RA (2000) A rac homolog is required for induction of hyphal growth in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* 182: 2376-2386.

- Hurtado CA, Rachubinski RA (2002a) Isolation and characterization of *YIBEM1*, a gene required for cell polarization and differentiation in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Eukaryot Cell* 1(4): 526-537.
- Hurtado CA, Rachubinski RA (2002b) *YIBMH1* encodes a 14-3-3 protein that promotes filamentous growth in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* 148 (11): 3725-3735.
- Iida T, Ohta A, Takagi M (1999) Cloning and characterization of an *n*-alkane-inducible cytochrome P450 gene essential for *n*-decane assimilation by *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 14(15): 1387-1397.
- Iida T, Sumita T, Ohta A, Tagaki M (2000) The cytochrome P450ALK multigene family of an *n*-alkane-assimilating yeast, *Yarrowia lipolytica*: cloning and characterization of genes coding for new *CYP52* members. *Yeast* 16: 1077-1087.
- Ikeda K, Nakayashiki H, Takagi M, Tosa Y, Mayama S (2001) Heat shock, copper sulfate and oxidative stress activate the retrotransposon *MAGGY* resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Genet Genomics* 266(2): 318-25.
- Ilchenko AP, Morgunov IG, Honeck H, Mauersberger S, Vasytkova NN, Müller H-G (1994) Purification and some properties of alcohol oxidase from the yeast *Yarrowia lipolytica* H222 (Russ). *Biokhimiya (Moscow)* 59: 1312-1319
- Ilchenko AP, Cherniavskaya OG, Shishkanova NV, Finogenova TV. (2001) Metabolic characteristics of the *Yarrowia lipolytica* strain producing alpha-ketoglutaric and citric acids from ethanol and the effect of $[\text{NH}_4^+]$ and $[\text{O}_2]$ on yeast respiration and biosynthesis. *Mikrobiologiya* 70(2):189-195 [Russian].
- Ilchenko AP, Cherniavskaya OG, Shishkanova NV, Finogenova TV (2002) Metabolism of *Yarrowia lipolytica* grown on ethanol under conditions promoting the production of alpha-ketoglutaric and citric acids: a comparative study of the central metabolism enzymes *Mikrobiologiya* 71(3): 316-322 [Russian].
- Inouye S, Yuki S, Saigo K (1986) Complete nucleotide sequence and genome organization of a *Drosophila* transposable genetic element, 297. *Eur. J. Biochem.* 154 (2): 417-425.
- Ishikura T, Forster JW (1961) Incorporation of molecular oxygen during microbial utilization of olefins. *Nature* 192: 892-893.
- Ismail SA, Deak T, Abd El-Rahman H, Yassien MA, Beuchat LR (2001) Effectiveness of immersion treatments with acids, trisodium phosphate, and herb decoctions in reducing populations of *Yarrowia lipolytica* and naturally occurring aerobic microorganisms on raw chicken. *Int J Food Microbiol* 64(1-2):13-19.
- Ismail SA, Deak T, El-Rahman HA, Yassien MA, Beuchat LR (2000) Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. *Int J Food Microbiol* 62(1-2): 113-121.
- Jakobsen M, Narvhus J (1996) Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int Dairy Journal* 6: 755-768.
- Janetzky B, Lehle L (1992) Ty4, a new retrotransposon from *Saccharomyces cerevisiae*, flanked by tau-elements. *J. Biol. Chem.* 267 (28): 19798-19805.
- Ji H, Moore DP, Blomberg MA, Braiterman LT, Voytas DF, Natsoulis G, Boeke JD (1993) Hotspots for unselected Ty1 transposition events on yeast chromosome III are near tRNA genes and LTR sequences. *Cell* 73(5):1007-1018.
- Jimenez-Bremont JF, Ruiz-Herrera J, Dominguez A (2001) Disruption of gene *YIODC* reveals absolute requirement of polyamines for mycelial development in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* 1(3):195-204.
- Jordan IK, McDonald JF (1998) Evidence for the role of recombination in the regulatory evolution of *Saccharomyces cerevisiae* Ty elements. *J Mol Evol* 47(1): 14-20.
- Jordan IK, McDonald JF (1999a) The role of interelement selection in *Saccharomyces cerevisiae* Ty element evolution. *J Mol Evol* 49(3):352-357.

- Jordan IK, McDonald JF (1999b) Tempo and mode of Ty element evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 151(4):1341-1351.
- Jolivet P, Bergeron E, Benyair H, Meunier JC (2001) Characterization of major protein phosphatases from selected species of *Kluyveromyces*. Comparison with protein phosphatases from *Yarrowia lipolytica*. *Can J Microbiol* 47(9): 861-870.
- Jolivet P, Queiroz-Claret C, Bergeron E, Meunier JC (1998) Characterization of an exocellular protein phosphatase with dual substrate specificity from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Int J Biochem Cell Biol* 30(7): 783-796.
- Juretzek T (1999) Entwicklung von Wirts-Vektor-Systemen zur heterologen Expression von Proteinen in der nichtkonventionellen Hefe *Yarrowia lipolytica* und ihre Anwendung für die Cytochrom P450-katalysierte Stoffumwandlung, Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Dresden.
- Juretzek T, Prinz A, Schunck W-H, Barth G, Mauersberger S (1997) Expressionskassetten zur heterologen Expression von Proteinen in der Hefe *Yarrowia lipolytica* unter der Kontrolle des regulierbaren Promotors der Isocitratlyase. Patentschrift DE19525282 (angemeldet 29.06.95).
- Juretzek T, Mauersberger S, Schunck W-H, Nicaud J-M, Barth G (1999) Functional expression of heterologous cytochrome P450 in the yeast *Yarrowia lipolytica* and its use in biotransformation of steroids. *Current Genetics* 35: 457.
- Juretzek T, Mauersberger S, Barth G (2000a). Rekombinante haploide oder diploide *Yarrowia lipolytica* Zellen zur funktionellen heterologen Expression von Cytochrom P450 Systemen. Patentschrift DE19932811; Recombinant haploid or diploid *Yarrowia lipolytica* cells for the functional heterologous expression of cytochrome P450 systems. Patentschrift WO0003008.
- Juretzek T, Wang H-J, Nicaud J-M, Mauersberger S, Barth G (2000b) Comparison of promoters suitable for regulated overexpression of heterologous genes in the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Bioprocess Eng* 5: 320-326
- Juretzek T, Le Dall MT, Mauersberger S, Gaillardin C, Barth G, Nicaud J-M (2001) Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 18: 97-113.
- Kabani M, Beckerich JM, Gaillardin C. (2000) SIs1p stimulates Sec63p-mediated activation of Kar2p in a conformation-dependent manner in the yeast endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 20(18): 6923-6934.
- Kachroo P, Ahuja M, Leong SA, Chattoo BB (1997) Organisation and molecular analysis of repeated DNA sequences in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Curr Genet* 31(4): 361-369.
- Kamzolova SV, Shishkanova NV, Morgunov IG, Finogenova TV (2003) Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* 3: 217-222.
- Kaneko I, Tanaka A, Tsuge T (2000) REAL, an LTR retrotransposon from the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *Mol Gen Genet* 263(4): 625-634.
- Kashani-Poor N, Zwicker K, Kerscher S, Brandt U (2001a) A central functional role for the 49-kDa subunit within the catalytic core of mitochondrial complex I. *J Biol Chem* 276(26): 24082-24087.
- Kashani-Poor N, Kerscher S, Zickermann V, Brandt U (2001b) Efficient large scale purification of his-tagged proton translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim Biophys Acta*. 1504(2-3): 363-370.
- Kati WM, Johnson KA, Jerva LF, Anderson KS (1992) Mechanism and fidelity of HIV reverse transcriptase. *J Biol Chem* 267(36): 25988-25997
- Keogh RS, Seoighe C, Wolfe KH (1998) Evolution of gene order and chromosome number in *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and related fungi. *Yeast* 14: 443-457.

- Kerscher SJ (2000) Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta.* 1459(2-3):274-283.
- Kerscher SJ, Okun JG, Brandt U. (1999) A single external enzyme confers alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase activity in *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Sci* 112(14): 2347-2354.
- Kerscher S, Durstewitz G, Casaregola S, Gaillardin C, Brandt U (2001a) The complete mitochondrial genome of *Yarrowia lipolytica*. *Comp Funct Genom* 2: 80-90.
- Kerscher S, Kashani-Poor N, Zwicker K, Zickermann V, Brandt U. (2001b) Exploring the catalytic core of complex I by *Yarrowia lipolytica* yeast genetics. *J Bioenerg Biomembr.* 2001 33(3):187-196.
- Kerscher SJ, Eschemann A, Okun PM, Brandt U. (2001c) External alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase redirected to the internal face of the mitochondrial inner membrane rescues complex I deficiency in *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Sci.* 114(Pt 21): 3915-3921.
- Kerscher S, Drose S, Zwicker K, Zickermann V, Brandt U (2002) *Yarrowia lipolytica*, a yeast genetic system to study mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta.* 1555(1-3): 83-91.
- Kim JM, Vanguri S, Boeke JD, Gabriel A, Voytas DF (1998). Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Res* 8(5): 464-478.
- Kim E (1999) Effect of thiamine on the by-products formation by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Bioprocess Eng* 4: 185-188.
- Kim EK, Roberts RS (1991) Rate equations for the vigorous stationary phase fermentation of citric acid by *Saccharomycopsis lipolytica*. *Biotechnol Bioeng* 37: 985-988.
- Kim HS, Yu JY, Suh JH, Shin CS (1999) Optimized fed-batch fermentation of L- β -hydroxyisobutyric acid. *Bioprocess Eng* 20: 189-193.
- Kim JW, Cheon SA, Park S, Song YY, Kim JY (2000) Serum-induced hypha formation in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Lett* 190: 9-12.
- Kim JW, Park TJ, Ryu DD, Kim JY (2000) High cell density culture of *Yarrowia lipolytica* using a one-step feeding process. *Biotechnol Prog.* 16(4): 657-660.
- Kim K, Ogrzydziak DM (2000) *Yarrowia lipolytica* SRP receptor alpha-subunit. *Yeast* 16: 1243-1252.
- Kim S-J, Svetashev VI (2002) Application of *Yarrowia lipolytica* for oil bioremediation and monitoring of its activity using phospholipid fatty acid analysis. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting (TYLIM2002). Dresden, July 17–20, 2002, Abstracts p 60.
- Kinsey JA, Helber J (1989) Isolation of a transposable element from *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(6): 1929-1933.
- Kirchner J, Connolly CM, Sandmeyer SB (1995) Requirement of RNA polymerase III transcription factors for in vitro position-specific integration of a retroviruslike element. *Science* 267(5203):1488-1491.
- Kirchner J, Sandmeyer S (1993) Proteolytic processing of Ty3 proteins is required for transposition. *J Virol* 67(1):19-28.
- Klug MJ, Markovetz AJ (1967) Degradation of hydrocarbons by members of the genus *Candida*. II. Oxidation of n-alkanes and 1-alkenes by *Candida lipolytica*. *J Bacteriol* 93: 1847-1852.
- Knoop V, Unseld M, Marienfeld J, Brandt P, Sunkel S (1996). *Copia*-, *gypsy*-, and LINE-Like retrotransposon fragments in the mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 142: 579-585.
- Konieczny A, Voytas DF, Cummings MP, Ausubel FM (1990). A Superfamily of *Arabidopsis thaliana* retrotransposon. *Genetics* 127 (4): 631-810.
- Kreger-van Rij, N.J.W. and Veenhuis, M. (1973). Electron microscopy of septa in ascomycetous yeasts. *Mol Gen Genet* 146: 101-106.

- Kruse K, Förster A, Juretzek T, Mauersberger S, Barth G (2002a) Verfahren zur biotechnologischen Herstellung von Citronensäure mit einer genetisch veränderten Hefe *Yarrowia lipolytica*. DE 10233600.8, Patent 16.07.2002 angemeldet.
- Kruse K, Förster A, Mauersberger S, Barth G (2002b). Overexpression of the *ICL1* gene changes the product ratio during citrate production by *Yarrowia lipolytica*. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting (TYLIM2002), Dresden, Germany, 17–20 July 2002, Abstracts p 122.
- Kubicek, C., Roehr, M. (1989) Citric acid fermentation. Crit. Rev. Biotechnol. 3: 331-367.
- Kujau M, Weber H, Barth G (1992) Characterization of mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* defective in acetyl-coenzyme A synthetase. Yeast 8(3): 193-203.
- Kulkosky J, Jones KS, Katz RA, Mack JPG, Skalka M (1992) Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases. Mol Cell Biol 12: 2331-2338.
- Kurischko C (1984) Analysis of genetic markers in new breeding stocks of the yeast *Saccharomyces lipolytica*. Z Allg Mikrobiol 24: 545-550.
- Kurischko C, Fournier P, Chasles M, Weber H, Gaillardin C (1992) Cloning of the mating-type gene *MATA* of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Mol Gen Genet 232: 423-426.
- Kurischko C, Schilhabel MB, Kunze I, Franzl E (1999) The *MATA* locus of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* consists of two divergently oriented genes. Mol Gen Genet 262(1): 180-188.
- Kurtzman CP, Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie Van Leeuwenhoek 73: 331-371.
- Kutschke S, Kruse K, Mauersberger S, Barth G, Bley T (2001) Prozessoptimierung zur Zitronensäureproduktion aus Altfett. 19. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, 13.-15. März 2001, Leipzig, Abstractband S. 279 (Poster).
- Kutschke S, Bley T (2002a) Citric acid production from used grease by *Yarrowia lipolytica*: Effect of mass transfer. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting (TYLIM2002). Dresden, July 17–20, 2002, Abstracts p 126.
- Kutschke S, Bley T (2002b) Optimierung des Stoffübergangs bei der Synthese von Zitronensäure aus Altfett. 20. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Laloi M, McCarthy J, Morandi O, Gysler C, Bucheli P (2002) Molecular and biochemical characterisation of two aspartic proteinases TcAP1 and TcAP2 from *Theobroma cacao* seeds. Planta 215(5): 754-762.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, usw. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409(6822): 860-921.
- Lankenau DH, Huijser P, Jansen E, Miedema K, Hennig W (1988) Microopia: a retrotransposon of *Drosophila* combining structural features of DNA viruses, retroviruses and non-viral transposable elements. J Mol Biol 204(2): 233-246.
- Le Dall MT, Nicaud J-M, Gaillardin C (1994) Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Curr Genet 26(1): 38-44.
- Leng P, Klatt DH, Schumann G, Boeke JD, Steck TL (1998) Skipper, an LTR retrotransposon of *Dictyostelium*. Nucleic Acids Res. 26 (8): 2008-2015.
- Levin HL (1995) A novel mechanism of self-primed reverse transcription defines a new family of retroelements. Mol Cell Biol 15(6): 3310-3317.
- Levin HL, Boeke JD (1992) Demonstration of retrotransposition of the Tf1 element in fission yeast. EMBO J 11(3): 1145-1153.
- Levin HL, Weaver DC, Boeke JD (1990). Two related families of retrotransposons from *Schizosaccharomyces pombe*. Mol Cell Biol 10(12): 6791-6798.

- Levy M, Romao J, Marchetti MA, Hamer JE (1991) DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. *Plant Cell* 3(1): 95-102.
- Li WH, Gu Z, Wang H, Nekrutenko A (2001) Evolutionary analyses of the human genome. *Nature* 409(6822): 847-849.
- Lin SS, Nymark-McMahon MH, Yieh L, Sandmeyer SB (2001) Integrase mediates nuclear localization of Ty3. *Mol Cell Biol* 21(22): 7826-7838.
- Lindauer A, Fraser D, Bruderlein M, Schmitt R (1993) Reverse transcriptase families and a copia-like retrotransposon, *Osser*, in the green alga *Volvox carteri*. *FEBS Lett.* 319 (3): 261-266.
- Ling J, Pi W, Bollag R, Zeng S, Keskinetepe M, Saliman H, Krantz S, Whitney B, Tuan D (2002) The solitary long terminal repeats of ERV-9 endogenous retrovirus are conserved during primate evolution and possess enhancer activities in embryonic and hematopoietic cells. *J Virol* 76(5): 2410-2423.
- Loeb DD, Padgett RW, Hardies SC, Shehee WR, Comer MB, Edgell MH, Hutchison CA (1986) The sequence of a large L1Md element reveals a tandemly repeated 5' end and several features found in retrotransposons. *Mol. Cell. Biol.* 6 (1): 168-182.
- Lopez MC, Nicaud JM, Skinner HB, Vergnolle C, Kader JC, Bankaitis VA Gaillardin C (1994) A phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein is required for differentiation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* from the yeast to the mycelial form. *J Cell Biol* 125: 113-127.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Follin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Luciw PA und Leung NJ (1992) Mechanisms of retroviruses replication. In: *The Retroviridae*, Levy JA (eds), Plenum Press New York and London, pp. 159-263.
- Luo YS, Wang HJ, Gopalan KV, Srivastava DK, Nicaud JM, Chardot T. (2000) Purification and characterization of the recombinant form of Acyl CoA oxidase 3 from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Arch Biochem Biophys.* 384(1): 1-8.
- Luo YS, Nicaud JM, Van Veldhoven PP, Chardot T (2002) The acyl-CoA oxidases from the yeast *Yarrowia lipolytica*: characterization of Aox2p. *Arch Biochem Biophys* 407(1): 32-38.
- Madzak C, Treton B, Blanchin-Roland S (2000) Strong hybrid promoters und integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2: 207-216.
- Madzak C, Gaillardin c, Beckerich JM (2003) Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biotech*, im Druck
- Malik HS, Eickbush TH (1999) Modular evolution of the integrase domain in the Ty3/*gypsy* class of LTR retrotransposons. *J Virol* 73(6): 5186-5190.
- Malik HS, Burke WD, Eickbush TH (1999) The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements *Mol Biol Evol* 16: 793-805.
- Mamoun CB, Beckerich JM, Gaillardin C (1996) The *TSR1* gene of *Yarrowia lipolytica* is involved in the signal recognition particle-dependent translocation pathway of secretory proteins. *J Biol Chem* 271(39): 23895-23901.
- Mamoun CB, Beckerich JM, Gaillardin C. (1997) *Yarrowia lipolytica* *TSR1* gene product. A novel endoplasmic reticulum membrane component involved in the signal recognition particle-dependent translocation pathway. *J Biol Chem* 272(39): 24594-24598.
- Mamoun CB, Beckerich JM, Gaillardin C, Kepes F. (1999) Disruption of *YHC8*, a member of the *TSR1* gene family, reveals its direct involvement in yeast protein translocation. *J Biol Chem.* 274(16): 11296-112302.
- Marillonnet S, Wessler SR (1998) Extreme structural heterogeneity among the members of a maize retrotransposon family. *Genetics* 150: 1245-1256.

- Margesin R, Schinner F (1997a) Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. *Appl Environ Microbiol* 63: 2660-2664.
- Margesin R, Schinner F (1997b) Effect of temperature on oil degradation by a psychrotrophic yeast in liquid culture and soil. *FEMS Microbiol Ecology* 24: 243-249.
- Marschalek R, Hofmann J, Schumann G, Gosseringer R, Dingermann T (1992) Structure of DRE, a retrotransposable element which integrates with position specificity upstream of *Dictyostelium discoideum* t RNA gene. *Mol Cell Biol* 12(1): 229-239.
- Matthews GD, Goodwin TJD, Butler MI, Berryman TA, Poulter RTM (1997) pCA1, a highly unusual Ty1/ *copia* retrotransposon from the pathogen yeast *Candida albicans*. *J Bacteriol* 179(22): 7118-7128.
- Mauersberger S (1991) Alkane oxidation mutants of the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Candida maltosa*. In: Sharyshev, A.A. and Finogenova, T.V. (eds), Alkane metabolism and oversynthesis of metabolites by microorganisms. Center for Biological Research, USSR Academy of Sciences, pp 59-78.
- Mauersberger S, Drechsler H, Oehme G, Müller H-G (1992) Substrate specificity and stereoselectivity of the fatty alcohol oxidase from the yeast *Candida maltosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 37: 66-73.
- Mauersberger S, Ohkuma M, Schunck W-H, Takagi M (1996) *Candida maltosa*. In: Nonconventional yeasts in biotechnology: A handbook. (Wolf, K, ed) Springer, Berlin, Heidelberg, New York. pp 411-580.
- Mauersberger S, Wang H-J, Gaillardin C, Barth G, Nicaud J-M (2001) Insertional mutagenesis in the *n*-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*: Generation of tagged mutants in genes involved in hydrophobic substrates utilization. *J Bacteriol* 183: 5102-5109.
- Mauersberger S, Förster A, Gerber J, Juretzek T, Barth G (2002). Functional expression of heterologous cytochrome P450 in *Yarrowia lipolytica* and its use in biotransformation of steroids. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting (TYLIM2002), Dresden, Germany, 17–20 July 2002, Abstracts p114 (Poster 41).
- Mauersberger S, Kruse K, Barth G (2003) Induction of citric acid/isocitric acid and α -ketoglutaric acid production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. In: Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology, Wolf K, Breunig K, Barth G (eds), Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 393-400.
- Meusdoerffer F (1988) Omega-hydroxylations. In: World conference on biotechnology for the fats and oil industry, Applewhite TH (ed), American Oil Chemists's Society, Champaign, Ill, USA, pp 142-147.
- Meyer J (1993) Verbessertes Verfahren zur fermentativen Herstellung von α -Lactonen. Patentschrift DE4126997 durch BASF AG, Ludwigshafen.
- McEwen RK, Young TW (1998) Secretion and pH-dependent self-processing of the pro-form of the *Yarrowia lipolytica* acid extracellular protease. *Yeast* 14(12):1115-1125.
- McHale MT, Roberts IN, Noble SM, Beaumont C, Whitehead MP, Seth D, Oliver RP (1992) CfT-I: an LTR-retrotransposon in *Cladosporium fulvum*, a fungal pathogen of tomato. *Mol Gen Genet* 233(3): 337-347.
- Mellor J, Malim MH, Gull K, Tuite MF, McCreedy SM, Dibbayawan T, Kingsman SM, Kingsman AJ (1985) Reverse transcriptase activity and Ty RNA are associated with virus-like particles in yeast. *Nature* 318: 583-586
- Michaille JJ, Mathavan S, Gaillard J, Garel A (1990) The complete sequence of mag, a new retrotransposon in *Bombyx mori*. *Nucleic Acids Res.* 18 (3): 674.
- Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 433.

- Moran A, Burguillo FJ, Lopez MC, Dominguez A (1989) Kinetic properties of derepressible acid phosphatase from the yeast from of *Yarrowia lipolytica*. *Biochim Biophys Acta* 990(3): 288-296.
- Morin M, Dominguez A (2002) Allergen expression in *Yarrowia lipolytica*. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting (TYLIM2002). Dresden, July 17–20, 2002, Abstracts p 111.
- Morillon A, Springer M, Lesage P (2000) Activation of the Kss1 invasive-filamentous growth pathway induces Ty1 transcription and retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 20(15): 5766-5776.
- Mount SM, Rubin GM (1985) Complete nucleotide sequence of the Drosophila transposable element copia: homology between copia and retroviral proteins. *Mol Cell Biol* 5(7):1630-1638.
- Müller S, Sandal T, Kamp-Hansen P, Dalboge H (1998) Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 14: 1267-1283.
- Murphy GL, Perry JJ (1984) Assimilation of chlorinated alkanes by hydrocarbon-utilizing fungi. *J Bacteriol* 160: 1171-1174.
- Nakayashiki H, Matsuo H, Chuma I, Ikeda K, Betsuyaku S, Kusaba M, Tosa Y, Mayama S (2001) Pyret, a Ty3/Gypsy retrotransposon in *Magnaporthe grisea* contains an extra domain between the nucleocapsid and protease domains. *Nucleic Acids Res* 29(20): 4106-4113.
- Natsoulis G, Thomas W, Roghmann MC, Winston F, Boeke JD (1989) Ty1 transposition in *Saccharomyces cerevisiae* is nonrandom. *Genetics* 123(2): 269-279.
- Neueglise C, Feldmann H, Bon E, Gaillardin C, Casaregola S (2002a) Genomic evolution of the long terminal repeat retrotransposons in hemiascomycetous yeasts. *Genome Res* 12(6): 930-943.
- Neueglise C, Feldmann H, Bon E, Gaillardin C, Casaregola S (2002b) Genomic evolution of the LTR-retrotransposons in hemiascomycetous yeasts. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting (TYLIM2002). Dresden, July 17–20, 2002, Abstracts p 90.
- Nicaud JM, Fabre E, Beckerich JM, Fournier P, Gaillardin C (1989) Cloning, sequencing and amplification of the alkaline protease (*XPR2*) gene of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol* 12: 285-298.
- Nicaud JM, Madzak C, van den Broek P, Gysler C, Duboc P, Niederberger P, Gaillardin C. (2002a) Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* 2(3): 371-379.
- Nicaud JM, Madzak C, Niederberger P, Duboc P, Fickers P, Gaillardin C. (2002b) Vectors for expression, secretion and for gene disruption in *Yarrowia lipolytica*. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting (TYLIM2002). Dresden, July 17–20, 2002, Abstracts p 55.
- Nishimura M, Nakamura S, Hayashi N, Asakawa S, Shimizu N, Kaku H, Hasebe A, Kawasaki S (1998) Construction of a BAC library of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* and finding specific genome regions in which its transposons tend to cluster. *Biosci Biotechnol Biochem* 62(8): 1515-1521.
- Nthangeni G, Steyn NP, Alberts M, Steyn K, Levitt NS, Laubscher R, Bourne L, Dick J, Temple N (2002) Dietary intake and barriers to dietary compliance in black type 2 diabetic patients attending primary health-care services. *Public Health Nutr* 5(2):329-338.
- Nuttley WM, Brade AM, Gaillardin C, Eitzen GA, Glover JR, Aitchison JD, Rachubinski R A (1993) Rapid identification and characterization of peroxisomal assembly mutants in *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 9: 507-517.
- Nymark-McMahon MH, Beliakova-Bethell NS, Darlix JL, Le Grice SF, Sandmeyer SB (2002) Ty3 Integrase Is Required for Initiation of Reverse Transcription, *J Virol* 76(6): 2804-2816.

- Ogrydziak DM (1988). Development of genetic maps of non-conventional yeasts. *J Basic Microbiol* 28: 185-196.
- Ogrydziak DM (1993) Yeast extracellular proteases. *Crit Rev Biotechnol* 13: 1-55.
- Ogrydziak DM (2002) Secretion stories - extracellular ribonuclease (*XRN1*), α -factor, *AEP2*, and secretory capacity. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting (TYLIM2002). Dresden, July 17–20, 2002, Abstracts p 54.
- Ogrydziak DM, Demain AL, Tannenbaum SR (1977) Regulation of extracellular protease production in *Candida lipolytica*. *Biochim Biophys Acta* 497: 525-538.
- Ogrydziak DM, Bassel J, Contopoulou R, Mortimer R (1978) Development of genetic techniques and the genetic map of the yeast *Saccharomycopsis lipolytica*. *Mol Gen Genet* 163: 229-240.
- Ogrydziak DM, Scharf SJ (1982) Alkaline extracellular protease produced by *Saccharomycopsis lipolytica* CX161-1B. *J Gen Microbiol* 128: 1225-1234.
- Ogrydziak DM, Cheng SC, Scharf SJ (1982) Characterization of *Saccharomycopsis lipolytica* mutants producing lowered levels of alkaline extracellular proteases. *J Gen Microbiol* 128: 2271-2280.
- Ogrydziak DM, Bassel J, Mortimer R (1982). Development of the genetic map of the yeast *Saccharomycopsis lipolytica*. *Mol Gen Genet* 188: 179-183.
- Oh YS, Maeng J, Kim SJ (2000) Use of microorganism-immobilized polyurethane foams to absorb and degrade oil on water surface. *Appl Microbiol Biotechnol* 54(3): 418-423.
- Ohkuma M, Hwang CW, Masuda H, Sugiyama J, Ohta A, Takagi M (1993) Evolutionary position of n-alkane-assimilating yeast *Candida maltosa* shown by nucleotide sequence of small-subunit ribosomal RNA gene. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 1793-1794.
- Oogaki M, Nakahara T, Uchiyama H, Tabuchi T (1983) Extracellular production of D-(+)-2-hydroxyglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* from glucose under aerobic thiamine deficient conditions. *Agr Biol Chem* 47: 2616-2624.
- Oswal N, Sarma PM, Zinjarde SS, Pant A (2002) Palm oil mill effluent treatment by a tropical marine yeast. *Bioresource Technol* 85(1): 35-37.
- Ota Y, Kushida Y (1988) Isolation of a yeast growing on sardine oil and its characteristics. *J Ferment Technol* 66: 273-277.
- Page RD (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12(4): 357-358.
- Pagot Y, Le Clainche A, Nicaud JM, Wache Y, Belin JM. (1998) Peroxisomal beta-oxidation activities and gamma-decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 49(3): 295-300.
- Pagot Y, Endrizzi A, Nicaud JM, Belin, JM (1997) Utilization of an auxotrophic strain of the yeast *Yarrowia lipolytica* to improve γ -decalactone production yields. *Lett Appl Microbiol* 25: 113-116.
- Pan TM, Pan FH.(1992) Microbial production of citric acid from salad oil. *Chinese J Microbiol Immunol (Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi)* 25(3): 129-137.
- Papanikolaou S, Aggelis G (2003a) Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *J Chem Technol Biotechnol* 78: 542-547.
- Papanikolaou S, Aggelis G (2003b) Modeling lipid accumulation and degradation in *Yarrowia lipolytica* cultivated on industrial fats. *Curr Microbiol* 46(6): 398-402.
- Papanikolaou S, Aggelis G (2002) Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour Technol* 82(1): 43-49.
- Papanikolaou S, Chevalot I, Komaitis M, Aggelis G, Marc I (2001) Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie Van Leeuwenhoek* 80(3-4): 215-224.

- Papanikolaou S, Chevalot I, Komaitis M, Marc I, Aggelis G (2002a) Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 58(3): 308-312.
- Papanikolaou S, Muniglia L, Chevalot I, Aggelis G, Marc I (2002b) *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J Appl Microbiol* 92(4): 737-744.
- Papanikolaou S, Muniglia L, Chevalot I, Aggelis G, Marc I (2003) Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues. *Curr Microbiol* 46(2): 124-130.
- Park CS, Chang CC, Kim JY, Ogrzydziak DM, Ryu DD (1997) Expression, secretion and processing of rice alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* 272: 6876-6881.
- Park CS, Chang CC, Ryu DD (2000) Expression and high-level secretion of *Trichoderma reesei* endoglucanase I in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Biochem Biotechnol* 87(1): 1-15.
- Parshyna I und Barth G (2003) Detection of biosynthesis and degradation of peroxisomes by different carbon sources with a combined assay using a β -Galactosidase-GFP-SKL chimaeric protein for labeling of peroxisomes and the peroxisomal isocitrate lyase as control. In: Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology, Wolf K, Breunig K, Barth G (eds), Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Paquin CE, Williamson VM (1988) Effect of Temperature on Ty transposition. *Ban Rpt* 30: 235-243.
- Pear LH und Taylo WR (1987) Sequence specificity of retroviral proteases. *Nature* 328: 482.
- Pereira-Meirelles FV, Rocha-Leao MHM, Sant'Anna GR (1997) A stable lipase from *Candida lipolytica* lipase. cultivation conditions and crude enzyme characteristics. *Appl Biochem Biotechnol* 63-65: 73-85#
- Perez-Campo FM, Dominguez A (2001) Factors affecting the morphogenetic switch in *Yarrowia lipolytica*. *Curr Microbiol*. 43(6): 429-433.
- Petropoulos CJ (1997) Retroviral taxonomy, protein structure, sequences, and genetic maps in Coffin JM (Ed.) *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA
- Pignede G, Wang HJ, Fudalej F, Gaillardin C, Seman M, Nicaud JM (2000a) Characterisation of an extracellular lipase encoded by *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* 182: 802-2810.
- Pignede G, Wang HJ, Fudalej F, Seman M, Gaillardin C, Nicaud JM (2000b) Autocloning and amplification of *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 66(8): 3283-3289.
- Plant EP, Goodwin TJ, Poulter RT (2000) Tca5, a Ty5-like retrotransposon from *Candida albicans*. *Yeast* 16(16): 1509-1518.
- Plesset J, Palm C, McLaughlin CS (1982) Induction of heat shock proteins and thermotolerance by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Comm* 108: 1340-1345.
- Pochart P, Agoutin B, Rousset S, Chanet R, Doroszkiewicz V, Heyman T (1993) Biochemical and electron microscope analyses of the DNA reverse transcripts present in the virus-like particles of the yeast transposon Ty1. Identification of a second origin of Ty1DNA plus strand synthesis. *Nucleic Acids Res* 21(15) : 3513-3520.
- Portsch U, Werner A, Bley T (2001) Kontinuierlicher Fettabbau in Prozeßabwässern mit immobilisierten fettspaltenden Mikroorganismen. 19. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, 13-15. März 2001, Leipzig, Abstracts, S. 325.
- Poulter R, Butler M (1998) A retrotransposon family from the pufferfish (fugu) *Fugu rubripes*. *Gene* 215 (2): 241-249.
- Queiroz-Claret C, Jolivet P, Meunier JC (1998) Modifications of phosphatase by an immobilized protein phosphatase from *Yarrowia lipolytica*. *Nahrung* 42(3-4): 166-167.

- Rambourg A, Clermont Y, Nicaud JM, Gaillardin C, Kepes F (1996) Transformations of membrane-bound organelles in *sec14* mutants of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica*. *Anat Rec* 245: 447-458.
- Ramon AM, Gil R, Bungal M, Sentandreu R, Valentin E (1996) A novel cell wall protein specific to the mycelial form of *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 12: 1535-1548.
- Ramon AM, Montero M, Sentandreu R, Valentin E (1999) *Yarrowia lipolytica* cell wall architecture: interaction of Ywp1, a mycelial protein, with other wall components and the effect of its depletion. *Res Microbiol* 150: 95-103.
- Ratner VA, Zabanov SA, Kolesnikova OV, Vasilyeva LA (1992) Induction of the mobile genetic element Dm-412 transpositions in the *Drosophila* genome by heat shock treatment. *Proc Natl Acad Sci* 89(12): 5650-5654.
- Reese MG, Eeckman FH (1995) Novel Neural Network Algorithms for Improved Eukaryotic Promoter Site Recognition. *In: The Seventh International Genome Sequencing and Analysis Conference*. Hilton Head Island, South Carolina, USA.
- Rehm HJ, Reiff I (1981) Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. *Adv BiochemEng* 19: 175-215.
- Richard M, Quijano RR, Bezzate S, Bordon-Pallier F, Gaillardin C (2001) Tagging morphogenetic genes by insertional mutagenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* 183(10):3098-3107.
- Rieger R, Michaelis A, Green MM (1991) *Glossary of Genetics*, Berlin, Springer-Verlag.
- Riggle PJ, Slobodkin IV, Brown DH Jr, Hanson MP, Volkert TL, Kumamoto CA (1997) Two transcripts, differing at their 3' ends, are produced from the *Candida albicans* SEC14 gene. *Microbiology* 143: 3527-3535.
- Robson ND, Telesnitsky A (2000) Selection of optimal polypurine tract region sequences during *Moloney murine leukemia virus* replication. *J Virol* 74(22): 10293-10303.
- Rodriguez C, Dominguez A (1984) The growth characteristics of *Saccharomycopsis lipolytica* morphology and induction of mycelium formation. *Can J Microbiol* 30: 605-612.
- Rogozin IB, Kochetov AV, Kondrashov FA, Koonin EV, Milanese L (2001) Presence of ATG triplets in 5' untranslated regions of eukaryotic cDNAs correlates with a 'weak' context of the start codon. *Bioinformatics* 17(10): 890-900.
- Rolfe M, Spanos A, Banks G (1986) Induction of yeast Ty element transcription by ultraviolet light. *Nature* 319: 339-340.
- Röhr M, Kubicek CP, Kominek J (1996) Citric acid. *In: Rehm H-J, Reed G, Delweg D (eds) Biotechnology, Vol 6, Verlag Chemie Weinheim*, pp 308-345.
- Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*. 8(6): 423-488.
- Roostita R, Fleet GH (1996) The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue-veined cheeses. *Int J Food Microbiol* 28(3): 393-404.
- Ruiz-Herrera J, Sentandreu R (2002) Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Arch Microbiol* 178(6): 477-483.
- Ruiz-Perez VL, Murillo FJ, Torres-Martinez S (1996) *Prt1*, an unusual retrotransposon-like sequence in the fungus *Phycomyces blakesleeenanus*. *Mol Gen Genet* 253: 324-333.
- Rupic J, Maric V (1998) Isolation and chemical composition of the ceramide of the *Candida lipolytica* yeast. *Chem Phys Lipids* 91: 153-161.
- Rymowicz W, Kautola H, Wojtatowicz M, Linko YY, Linko P (1993) Studies on citric acid production with immobilized *Yarrowia lipolytica* in repeated batch and continuous air-lift bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 1-4.
- Saigo K, Kugimiya W, Matsuo Y, Inouye S, Yoshioka K, Yuki S (1984) Identification of the coding sequence for a reverse transcriptase-like enzyme in a transposable genetic element in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 312 (5995): 659-661.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. ed.. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanchez M, Beckerich JM, Gaillardin C, Dominguez A. (1997) Isolation and cloning of the *Yarrowia lipolytica* SEC65 gene, a component of the yeast signal recognition particle displaying homology with the human SRP19 gene. *Gene* 203(1): 75-84.
- Sanfacon H, Hohn T (1990) Proximity to the promoter inhibits recognition of cauliflower mosaic virus polyadenylation signal. *Nature* 346(6279): 81-84.
- Sanfacon H, Brodmann P, Hohn T (1991) A dissection of the *cauliflower mosaic virus* polyadenylation signal. *Genes Dev* 5(1): 141-149.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-5467.
- SanMiguel P, Bennetzen JL (1998). Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Annals of Botany* 82 (Suppl A): 37-44.
- SanMiguel P, Tikhonov A, Jin YK, Motchoulskaia N, Zakharov D, Melake-Berhan A, Springer PS, Edwards KJ, Lee M, Avramova Z, Bennetzen JL (1996). Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274(5288): 765-768.
- Sarubbo LA, Porto AL, Campos-Takaki GM (1999) The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. *Can J Microbiol* 45(5): 423-426.
- Sarubbo LA, Marcal MC, Neves ML, Silva MP, Porto AL, Campos-Takaki GM (2001) Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. *Appl Biochem Biotechnol* 95(1): 59-67.
- Sassaman DM, Dombroski BA, Moran JV, Kimberland ML, Naas TP, DeBerardinis RJ, Gabriel A, Swergold GD, Kazazian HH Jr (1997) Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat Genet* 16(1):37-43.
- Scheef G, Fischer N, Krach U, Tonjes RR (2001) The number of a U3 repeat box acting as an enhancer in long terminal repeats of polytropic replication-competent porcine endogenous retroviruses dynamically fluctuates during serial virus passages in human cells. *J Virol* 75(15): 6933-6940.
- Scheuber T (1993) Constitutive expression of the *GPR1* gene causes pleiotropic effects on substrate utilization and cell morphology in the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. Diploma Thesis, Department of Microbiology, Biozentrum, University of Basel.
- Schindler J, Viehweg H, Schmid R, Weiss A, Ott K-H, Eierdanz H (1987) Verfahren zur Herstellung von Dicarbonsäuren. Patente DE3540834, EP0229252.
- Schindler J, Meusdörffer F, Stoll G, Eierdanz H, Waldhoff H (1991) Verfahren zur Herstellung von Etherdicarbonsäuren. Patent DE4019166.
- Schindler J, Meusdörffer F, Giesel-Bühler H (1990) Mikrobiologische Herstellung von Industriechemikalien: Grundlagen der Dicarbonsäurebildung mit Hefen. *Forum Mikrobiol* 5: 274-281.
- Schmid RD (1986) Innovationsfeld Biotechnologie – Ansatzpunkte in der Fettchemie. *Fette Seifen Anstrichmittel* 88: 555-560.
- Schmid B (1994) The cloning and characterisation of Ylt1 - a highly repetitive retrotransposon in the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. Diploma Thesis, Department of Microbiology, Biozentrum, University of Basel.
- Schmid-Berger N, Schmid B, Barth G (1994) Ylt1, a highly repetitive retrotransposon in the genome of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* 176(9): 2477-2482.
- Scioli C, Vollaro L (1997) The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive oil mills wastewaters. *Water Research* 31(10): 2520-2524.
- Scioli C, De Felice B (1993) Impiego de ceppi di lievito nella depurazione die reflui dell'industria olearia. *Ann Microbiol Enzimol* 43: 61-69.
- Sekula W (1991) A review of household budget surveys in 17 countries. *WHO Reg Publ Eur Ser.* 34:163-171.

- Senam S, Kovalchuk A, Barth G (2002). Structural organization of the retrotransposon Ylt1 of yeast *Yarrowia lipolytica*. Third *Yarrowia lipolytica* international meeting, Cell biology and biotechnology of a nonconventional yeast. Dresden, Germany, 17th-20th July 2002. Abstract book. p. 91.
- Senam S and Barth G (2003). Detection and activation of the Ylt1 retrotransposon in the yeast *Yarrowia lipolytica*. In: Wolf, K; Breunig, K; Barth, G. (Eds), Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. pp. 357-364.
- Shah DN, Chatto BB, Kothari RM, Hedge MV (1993) Starch hydrolysate, an optimal source of carbon for the secretion of citric acid by *Yarrowia lipolytica* DS-1. *Starch* 45(3): 104-109.
- Sheets MD, Ogg SC, Wickens MP (1990) Point mutations in AAUAAA and the poly (A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation in vitro. *Nucleic Acids Res* 18(19): 5799-5805.
- Sheets MD, Wickens M (1989) Two phases in the addition of a poly(A) tail. *Genes Dev* 3(9): 1401-1412.
- Shkumatov VM, Radyuk VG, Usova EV, Schunck W-H, Mauersberger S (1998) Transgenic strains of microorganisms in the biosynthesis of steroids [in Russian]. In: Chemical problems in the creation of new materials and technologies (Sviridov VV, ed, Minsk University Press, Minsk 1998, pp. 559-566
- Shkumatov VM, Usova EV, Radyuk VG, Kashkan ZN, Kovganko NV, Juretzek T, Mauersberger S (2003) Oxidation of 7 α ,20 α -dihydroxypregn-4-en-3-ones, side products of progesterone biotransformation by recombinant microorganisms, expressing cytochrome P-45017 α . *Russian J Bioorgan Chem* (im Druck).
- Sinigaglia M, Lanciotti R, Guerzoni ME (1994) Biochemical and physiological characteristics of *Yarrowia lipolytica* strains in relation to isolation source. *Can J Microbiol* 40: 54-59.
- Smith JJ, Rachubinski RA (2001) A role for the peroxin Pex8p in Pex20p-dependent thiolase import into peroxisomes of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem*. 276(2):1618-1625.
- Sohn YS, Park CS, Lee SB, Ryu DD (1998) Disruption of PMR1, encoding a Ca²⁺-ATPase homolog in *Yarrowia lipolytica*, affects secretion and processing of homologous and heterologous proteins. *J Bacteriol* 180(24): 6736-6742.
- Song SU, Gerasimova T, Kurkulos M, Boeke JD, Corces VG (1994) An *env*-like protein encoded by a *Drosophila* retroelement: evidence that *gypsy* is an infectious retrovirus. *Genes Dev* 8(17): 2046-2057.
- Song SU, Kurkulos M, Boeke JD, Corces VG (1997) Infection of the germ line by retroviral particles produced in the follicle cells: a possible mechanism for the mobilization of the *gypsy* retroelement of *Drosophila*. *Development* 124(14): 2789-2798.
- Souciet J, Aigle M, Artiguenave F, Blandin G, Bolotin-Fukuhara M, Bon E, Brottier P, Casaregola S, de Montigny J, Dujon B, Durrens P, Gaillardin C, Lepingle A, Llorente B, Malpertuy A, Neuveglise C, Ozier-Kalogeropoulos O, Potier S, Saurin W, Tekaiia F, Toffano-Nioche C, Wesolowski-Louvel M, Wincker P, Weissenbach J. (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 1. A set of yeast species for molecular evolution studies *Genes Dev* 8(17): 2046-2057.
- Souza Martins S, Malaquias Abreu F, Pereira-Meirelles FV, Dellamora-Ortiz GM (2002) Partial characterization of three forms of *Yarrowia lipolytica* lipase. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting (TYLIM2002). Dresden, July 17–20, 2002, Abstracts p 107.
- Stormer FC, Bardy F (1976) Crude oil. Degradation of crude oil seawater. *Ambio* 5: 141-145.
- Stottmeister U, Behrens U, Weissbrodt E, Barth G, Franke-Rinker D, Schulze E (1982) Nutzung von Paraffinen und anderen Nichtkohlenhydrat-Kohlenstoffquellen zur mikrobiellen Citronensäuresynthese. *Z Allg Mikrobiol* 22: 399-424.

- Stottmeister U, Weissbrodt E (1991) Product formation by *Yarrowia lipolytica* - some generalizing aspects. In: Alkane metabolism and oversynthesis of metabolites by microorganisms (Finogenova TV, Sharyshev AA, eds.). Center for Biological Research USSR Academy of Science, Pushchino, Russia, pp 147-158.
- Sumita T, Iida T, Yamagami S, Horiuchi H, Takagi M, Ohta A. (2002a). *YIALK1* encoding the cytochrome P450ALK1 in *Yarrowia lipolytica* is transcriptionally induced by *n*-alkane through two distinct *cis*-elements on its promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 294(5): 1071-1078.
- Sumita T, Iida T, Hirata A, Horiuchi H, Takagi M, Ohta A (2002b) Peroxisome deficiency represses the expression of *n*-alkane-inducible *YIALK1* encoding cytochrome P450ALK1 in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Lett* 214(1): 31-38.
- Suzzi G, Lanorte MT, Galgano F, Andrighetto C, Lombardi A, Lanciotti R, Guerzoni ME (2001) Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *Int J Food Microbiol* 69(1-2): 69-77.
- Swennen D, Paul MF, Vernis L, Beckerich JM, Fournier A, Gaillardin C. (2002) Secretion of active anti-Ras single-chain Fv antibody by the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology*. 148(1): 41-50.
- Szabo R. (1999) Dimorphism in *Yarrowia lipolytica*: filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration. *Folia Microbiol (Praha)*. 44(1):19-24.
- Szabo R (2001) Cla4 protein kinase is essential for filament formation and invasive growth of *Yarrowia lipolytica*. *Mol Genet Genomics* 265(1):172-9.
- Szabo R, Stofanikova V (2002) Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Lett* 206(1): 45-50.
- Szołtysik M, Gdula A, Chrzanoswka J, Wojtatowicz M, Guerzoni ME (2002) *Yarrowia lipolytica* as adjunct culture in cheese production. Third *Yarrowia lipolytica* International Meeting (TYLIM2002). Dresden, July 17–20, 2002, Abstracts p 65.
- Tam YY, Rachubinski RA. (2002) *Yarrowia lipolytica* cells mutant for the PEX24 gene encoding a peroxisomal membrane peroxin mislocalize peroxisomal proteins and accumulate membrane structures containing both peroxisomal matrix and membrane proteins. *Mol Biol Cell*.13(8): 2681-2691.
- Tanaka A, Fukui S (1989) Metabolism of *n*-alkanes. In: Rose, A.H., Harrison, J.S. (eds). *The yeast. Metabolism and physiology of yeasts*. Vol 3, 2 edn. Academic Press, London, pp 261-287.
- Tanda S, Mullor JL, Corces VG (1994) The *Drosophila* *tom* retrotransposon encodes an envelope protein. *Mol Cell Biol* 14(8): 5392-5401.
- Temin HM (1981) Structure, variation and synthesis of retrovirus long terminal repeat. *Cell*. 27:1-3.
- Temin HM (1992) Origin and general nature of retroviruses. In: *The Retroviridae*, Levy JA (eds), Plenum Press New York and London, pp. 1-17.
- Tharaud C, Ribet AM, Costes C, Gaillardin C (1992) Secretion of human blood coagulation factor XIIIa by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Gene* 121:111-119.
- Theologis A, Ecker JR, Palm CJ, Federspiel NA, Kaul S, White O, Alonso J, Altaf H, Araujo R, Bowman CL, Brooks SY, Buehler E, Chan A, Chao Q, Chen H, Cheuk RF, Chin CW, Chung MK, Conn L, Conway AB, Conway AR, Creasy TH, Dewar K, Dunn P, Etgu P, Feldblyum TV, Feng J, Fong B, Fujii CY, Gill JE, Goldsmith AD, Haas B, Hansen NF, Hughes B, Huizar L, Hunter JL, Jenkins J, Johnson-Hopson C, Khan S, Khaykin E, Kim CJ, Koo HL, Kremenetskaia I, Kurtz DB, Kwan A, Lam B, Langin-Hooper S, Lee A, Lee JM, Lenz CA, Li JH, Li Y, Lin X, Liu SX, Liu ZA, Luros JS, Maiti R, Marziali A, Militscher J, Miranda M, Nguyen M, Nierman WC, Osborne BI, Pai G, Peterson J, Pham PK, Rizzo M, Rooney T, Rowley D, Sakano H, Salzberg SL, Schwartz JR, Shinn P, Southwick AM, Sun H, Tallon LJ, Tambunga G, Toriumi MJ, Town CD, Utterback T, van Aken S, Vaysberg M,

- Vysotskaia VS, Walker M, Wu D, Yu G, Fraser CM, Venter JC, Davis RW (2000) Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408 (6814): 816-820.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25(24): 4876-4882.
- Thonart P, Destain J, Zgouli S, Antoine P, Godefroid J, Evrard P (1997) Problems of fatty acid biodegradation in real site. *Tribune de l'Eau* 50: N°586/2, 3-9 und 41-46.
- Titorenko VI, Nicaud JM, Wang H, Chan H, Rachubinski RA. (2002) Acyl-CoA oxidase is imported as a heteropentameric, cofactor-containing complex into peroxisomes of *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Biol* 156(3): 481-94.
- Titorenko VI, Ogrzydziak DM, Rachubinski RA (1997) Four distinct secretory pathways serve protein secretion, cell surface growth and peroxisome biogenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol Cell Biol* 17: 5210-5226.
- Titorenko VI, Rachubinski RA (1998) Mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* defective in protein exit from the endoplasmic reticulum are also defective in peroxisome biogenesis. *Mol Cell Biol* 18, 2789-2803.
- Titorenko VI, Rachubinski RA (2001) Dynamic of peroxisome assembly and function. *Trends Cell Biol* 11: 22-29.
- Titorenko VI, Smith JJ, Szilard RK, Rachubinski RA. (2000) Peroxisome biogenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Cell Biochem Biophys*. 32 Spring: 21-26.
- Torres-Guzman JC, Dominguez A (1997) *HOY1*, a homeo gene required for hyphal formation in *Yarrowia lipolytica*. *Mol Cell Biol* 17(11): 6283-6293.
- Treton BY, Le Dall M-T, Heslot H (1978) Excretion of citric acids by yeast *Saccharomyces lipolytica*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 6: 67-77.
- Treton BY, Le Dall MT, Heslot H (1985) Virus-like particles from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* 9: 279-284.
- Treton BY, Le Dall MT, Heslot H (1987) UV-induced curing of the double-stranded RNA virus of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* 12: 37-40.
- Treton BY, Le Dall MT, Gaillardin CM. (1992) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* acid phosphatase mutation by a genomic sequence from the yeast *Yarrowia lipolytica* identifies a new phosphatase. *Curr Genet*. 22(5): 345-355.
- Tumer NE, Parikh BA, Li P, Dinman JD (1998) The pokeweed antiviral protein specifically inhibits Ty1-directed +1 ribosomal frameshifting and retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* 72(2):1036-1042.
- Tzschoppe K, Augstein A, Bauer R, Kohlwein SD, Barth G (1999) Trans-dominant mutations in the GPR1 gene cause high sensitivity to acetic acid and ethanol in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 15: 1645-56.
- Umezumi K, Hiraoka M, Mori M, Maki H (2002) Structural Analysis of Aberrant Chromosomes That Occur Spontaneously in Diploid *Saccharomyces cerevisiae*. Retrotransposon Ty1 plays a crucial role in chromosomal rearrangements. *Genetics* 160(1): 97-110.
- Van Dellen K, Field J, Wang Z, Loftus B, Samuelson J (2002) LINEs and SINE-like elements of the protist *Entamoeba histolytica*. *Gene*. 297(1-2): 229-239.
- Van Dyk TK, Ayers BL, Morgan RW, Larossa RA (1998) Constricted flux through the branched-chain amino acid biosynthetic enzyme acetolactate synthase triggers elevated expression of genes regulated by rpoS and internal acidification. *J Bacteriol* 180(4):785-792.
- van Heerikhuizen H, Ykema A, Klootwijk J, Gaillardin C, Ballas C, Fournier P (1985) Heterogeneity in the ribosomal RNA genes of the yeast *Yarrowia lipolytica*; cloning and analysis of two size classes of repeats. *Gene* 39(2-3): 213-222.

- van der Walt JP, von Arx JA (1980) The yeast genus *Yarrowia* gen. Nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 46 : 517-521.
- van Rensburg P, van Zyl WH, Pretorius IS (1997) Over-expression of the *Saccharomyces cerevisiae* exo-beta-1,3-glucanase gene together with the *Bacillus subtilis* endo-beta-1,3-1,4-glucanase gene and the *Butyrivibrio fibrisolvens* endo-beta-1,4-glucanase gene in yeast. *J Biotechnol* 55(1): 43-53.
- Vasdinyei R, Deak T (2003) Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *Int J Food Microbiol* 86(1-2): 123-130.
- Vasileva-Tonkova E, Balasheva DM, Galabova D (1996) Influence of growth temperature on the acid phosphatase activity in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Lett* 145(2): 267-271.
- Vega R, Dominguez A (1986) Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Yarrowia lipolytica*. *Arch Microbiol* 144: 124-130.
- Venancio EJ, Daher BS, Andrade RV, Soares CM, Pereira IS, Felipe MS (2002) The *kex2* gene from the dimorphic and human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* 19(14):1221-1231.
- Vernis L, Abbas A, Chasles M, Gaillardin CM, Brun C, Huberman JA, Fournier P (1997) An origin of replication and a centromere are both needed to establish a replicative plasmid in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol Cell Biol* 17(4): 1995-2004.
- Vernis L, Chasles M, Pasero P, Lepingle A, Gaillardin C, Fournier P (1999) Short DNA fragments without sequence similarity are initiation sites for replication in the chromosome of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol Biol Cell* 10(3): 757-69.
- Vernis L, Poljak L, Chasles M, Uchida K, Casaregola S, Kas E, Matsuoka M, Gaillardin C, Fournier P (2001) Only centromeres can supply the partition system required for *ARS* function in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Mol Biol* 305: 203-217.
- Vogt VM (1996) Proteolytic processing and particle maturation. *Curr Topics Microbiol Immunol* 214: 95-131.
- Voytas DF, Ausubel FM (1988) A copia-like transposable element family in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 336 (6196): 242-244.
- Voytas DF, Boeke JD (1992) Yeast retrotransposons revealed [letter]. *Nature* 358: 717.
- Voytas DF, Konieczny A, Cummings MP, Ausubel FM (1990) The structure, distribution and evolution of the Ta1 retrotransposable element family of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 126(3): 713-721.
- Wache Y, Bergmark K, Courthaudon JL, Aguedo M, Nicaud JM, Belin JM. (2000a) Medium-size droplets of methyl ricinoleate are reduced by cell-surface activity in the gamma-decalactone production by *Yarrowia lipolytica*. *Lett Appl Microbiol.* 30(3):183-187.
- Wache Y, Laroche C, Bergmark K, Moller-Andersen C, Aguedo M, Le Dall MT, Wang H, Nicaud JM, Belin JM. (2000b) Involvement of acyl coenzyme A oxidase isozymes in biotransformation of methyl ricinoleate into gamma-decalactone by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol.* 66(3): 1233-1236.
- Wache Y, Aguedo M, Choquet A, Gatfield IL, Nicaud JM, Belin JM. (2001) Role of beta-oxidation enzymes in gamma-decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 67(12):5700-5704.
- Wache Y, Aguedo M, Nicaud JM, Belin JM (2003) Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 61(5-6): 393-404.
- Wang XY (1984) Development of petroleum microbiology in China. *Z Allg Mikrobiol* 24(9): 655-662.
- Wang HJ, Le Clainche A, Le Dall MT, Wache Y, Pagot Y, Belin JM, Gaillardin C, Nicaud J-M. (1998) Cloning and characterization of the peroxisomal acyl CoA oxidase *ACO3* gene from the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast.* 14(15): 1373-1386.

- Wang HJ, Le Dall MT, Wache Y, Laroche C, Belin JM, Gaillardin C, Nicaud JM (1999a) Evaluation of acyl coenzyme A oxidase (Aox) isozyme function in the n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* 181(17): 5140-5148.
- Wang H, Le Dall MT, Wache Y, Laroche C, Belin JM, Nicaud JM. (1999b) Cloning, sequencing, and characterization of five genes coding for acyl-CoA oxidase isozymes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Cell Biochem Biophys* 31(2): 165-174.
- Watson JD, Tooze J, Kurtz DT (1983) Recombinant DNA: A short course. W.H. Freeman & Company, New York.
- Weaver DC, Shpakovski GV, Caputo E, Levin HL, Boeke JD (1993) Sequence analysis of closely related retrotransposon families from fission yeast. *Gene* 131: 135-139.
- Weber H, Barth G (1988) Nonconventional yeasts: their genetics and biotechnological applications. *CRC Crit Rev Biotechnol* 7: 281-337.
- Weber H, Kurischko C, Barth G (1988) Mating in the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*: *J Basic Microbiol* 28: 229-240.
- Weißbrodt E, Gey M, Barth G, Weber H, Stottmeister U, Duresch R, Richter H-P (1988) Verfahren zur Herstellung von 2-Oxoglutarsäure durch Hefen. DD Patent no. 267999 A1.
- Welthagen JJ, Viljoen BC (1998) Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. *Int J Food Microbiol* 41(3): 185-194.
- Werner A, Boschke E, Bley T (1997) Immobilisierung fettsplattender Mikroorganismen zur Reinigung fetthaltiger Abwässer der Lebensmittelindustrie, *Wiss Zeitschrift TU Dresden* 46(6): 33-39
- Wickens M (1990) How the messenger got its tail: addition of poly(A) in the nucleus. *Trends Biochem Sci* 15(7): 277-81.
- Wickerham LJ, Kurtzman CP, Herman AI (1969) Sexuality in *Candida lipolytica*. *Recent Trends in Yeast Research*. Miner Institute, Chazy, New York, 81-92.
- Wickerham LJ, Kurtzman CP, Herman AI (1970) Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. *Science* 167: 1141.
- Wickner RB (1991) Yeast RNA virology: The killer system. *In: The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics*. JR Broach (ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 263-296.
- Wilhelm M, Uzun O, Mules EH, Gabriel A, Wilhelm F (2001) Polypurine Tract Formation by Ty1 RNase H, *J Biol Chem* 276 (50): 47695-47701.
- Wilhelm M, Wilhelm FX (2001) Reverse transcription of retroviruses and LTR retrotransposons. *Cell Mol Life Sci* 58(9):1246-1262.
- Wolf K, Breunig K, Barth G (eds) (2003) Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology. *Practical Protocols*. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Wojtatowicz M, Rymowicz W, Robak M, Zarowska B, Nicaud J-M (1997) Kinetics of cell growth and citric acid production by *Yarrowia lipolytica* Suc⁺ transformants in sucrose media. *Pol J Food Nutr Sci* 47: 49-54.
- Wright DA, Voytas DF (1998) Potential Retroviruses in Plants : *Tat1* Is Related to a Group of *Arabidopsis thaliana* Ty3/Gypsy Retrotransposons That Encode Envelope-Like Proteins. *Genetics* 149: 703-715.
- Wyder MT, Puhani Z (1999) Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in aseptic cheese curd slurries. *Int Dairy J* 9: 117-124.
- Xiong Y, Eickbush TH (1990). Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J* 9(10): 3353-3362.
- Xiong Y, Eickbush TH (1988) The site-specific ribosomal DNA insertion element R1Bm belongs to a class of non-long-terminal-repeat retrotransposons. *Mol Cell Biol* 8 (1): 114-123.
- Yamada T, Ogrydziak DM (1983) Extracellular acid proteases produced by *Saccharomycopsis lipolytica*. *J Bacteriol* 154(1): 23-31.

- Yamagami S, Iida T, Nagata Y, Ohta A, Takagi M (2001) Isolation and characterization of acetoacetyl-CoA thiolase gene essential for *n*-decane assimilation in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochem Biophys Res Commun* 282(3): 832-838.
- Yarrow D (1972) Four new recombinations in yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 38: 357-360.
- Yoshinaka Y, Katoh I, Copeland TD, Oroszlan S (1985) Murine leukemia virus protease is encoded by the *gag-pol* gene and is synthesized through suppression of an amber termination codon. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 1618-1622.
- Young TW, Wadeson A, Glover DJ, Quincey RV, Butlin MJ, Kamei EA (1996) The extracellular acid protease gene of *Yarrowia lipolytica*: sequence and pH-regulated transcription. *Microbiology* 142: 2913-2921.
- Yuki S, Ishimaru S, Inouye S, Saigo K (1986) Identification of genes for reverse transcriptase-like enzymes in two *Drosophila* retrotransposons, 412 and gypsy; a rapid detection method of reverse transcriptase genes using YXDD box probes. *Nucleic Acids Res.* 14 (7): 3017-3030.
- Zarkower D, Stephenson P, Sheets M, Wickens M (1986) The AAUAAA sequence is required both for cleavage and for polyadenylation of simian virus 40 pre-mRNA in vitro. *Mol Cell Biol* 6(7): 2317-2323.
- Zarowska B, Wojtatowicz M, Rymowicz W, Robak M (2001) Production of citric acid on sugar beet molasses by single and mixed cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Biotechnology*, Vol. 4, Issue 2; <http://www.eipau.media.pl>.
- Zhu P, Oudemans PV (2000) A long terminal repeat retrotransposon Cgret from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* on cranberry. *Curr Genet* 38(5): 241-247.
- Zimmerman A, Augstein A, Senam S, Barth G (1999) Ylt1 is a member of a family of retrotransposons in the genome of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Second Yarrowia lipolytica International Meeting*. Peniscola (Castellon), Spain, 15th-18th September 1999. Abstract book. p. 29.
- Zinjarde SS, Pant AA (2002a) Hydrocarbon degraders from tropical marine environments. *Mar Pollut Bull* 44(2): 118-121.
- Zinjarde SS, Pant A (2002b) Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *J Basic Microbiol* 42(1): 67-73.
- Zinjarde SS, Deshpande MV, Pant A (1998) Dimorphic transition in *Yarrowia lipolytica* isolated from oil polluted sea water. *Mycological Research* 102: 553-558.
- Zinjarde SS, Savelle C, Lachke AH, Pant A (1997) Isolation of an emulsifier from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 using a modified mini isoelectric focusing unit. *Letters Appl Microbiol* 24: 117-121.
- Zou S, Ke N, Kim JM, Voytas DF (1996) The *Saccharomyces* retrotransposon Ty5 integrates preferentially into regions of silent chromatin at the telomeres and mating loci. *Genes Dev* 10(5): 634-645.

7. Anlage

7.1 Gesamte DNA-Sequenz von Retrotransposon Tyl3B

1 TGTAATGATTCCGGAGACACTCATAAGATGTCAGTGGGAGGCACGTGACATAGAGACTAGG
61 GTTACGTGGAAGGCACGTGCCTGTGTGACTGCGAGTGCCCAAATAGGACATGCGGGGTAC
121 TCGCCTTTGGAGGTATAAGAAGGATTATTGTATATGATTAATTGATTAGCTTATTATTGA
181 AGTTCGACGAGACCAGTAGATCCAGGAGCGCAGTATTGAGACTAGCAGCCTTGGATAGAG
241 TATTACGACAAGAGATAGTACGCCCGATCTGTTACACGTGGTAGCGATGCATCCTCAACA
301 AACTAGAACAACCTTGAAGTTCCCGAACAGTTTCGAGTCGGTGTGGCCGTCGTGGCCATGA
361 CCGGCCTTGCAGAGGAATGGTGGTTCGACAGTGGTAGGGCCGCTCTGGGCGCAGACGCCA
421 GAGATTGGAAGAAATTCACCCAGGCCCTCGAGAGCCGATTCACTCCCTCGACTTACGCCA
481 TGAACATGGAGGAGGACTGGAGCAATCTGCAATGTGGGCCCAACGAGTCATCCTATTCTT
541 ATGAGACACGCTTCCGAGCGGCACGACACCACCTGTCCAGAGAGGCCGCCCCAGAGGAGG
601 CCTGGTTACGGCTGACCAGTGGTATGAAGGACATGTGGCGACGTGAGATCATGAAGCAGG
661 GCCCCATACTGCAGAACAACGTCGAGGAGACCCTGCGTCATATGCACATTGTGGCAGGCG
721 CAGAATACTTCCAGGAGCTCACGCCAGACACC CGCGGCCGCACCTGTGGCCACACCTA
780 CATCCACCAGCCAGTACGGTCTTGGACCGATGGAGGTGGACAACGCGGTGCTGCTCAAGG
841 CTATGATGGAATCGCAGGAGGCCAGCCAGAAGCGAATGATGGAACAGCAGACCCATATGG
901 TTGAACTGATGGCAAACGCCATTGGACGAGCTAACAACAACGGCTCCCAAAACGGCCGCA
961 ACAACCGTGGTGGCCGTGGTAACTACTACAACCAGCGAACCTCTCGTGAGTGCTACACCT
1021 GCGGCAAGATTGGCCACCTGGCTCGTGACTGCCGACATCGTGAACGTGTTTCAGGAACTGA
1081 TTCAACAGGACCAGGGAAATGTGCGACAGCAGTAATGACCGGAGACCATTACTGCTGAGCC
1141 ACTCGAAGATCTCGAATCGGTGAGTGTGCCACCTGCGGAGTATGATATAATCAATAAATC
1201 CAACTTTGTAGAGGACACTACCGGAGAACCGGAGGATGCAGGGGTAGAGGTGCATCTGGA
1261 GGAAGAGCAAACGGAGGAACCAATGCAGCTGGAGGAAGAACAAGTGGGGGAACAAGTGA
1321 GGAACCACTGATTGCTGCACGAGTTGAGGTGGTAGATGGTAAGCGGCGACGAGCCTTGAT
1381 CAAGGGCGACCGACCACCGATCTCGATCCCGTACTGCTACAACGGTACCACAGTGCAGGC
1441 GTTGTGGACTGTGGCGCGAGCTCGTGCTTCATTAGCAGGAACCTGGCTGAGAAATTAGG
1501 CCTGAAAATGACGCCCTGCAAACCAGCAAGTCCAGTCCGTGCATAGCATGGAGACAAC
1561 CAACTATACTGTGGAAGTACCGGTTGAGCTGGGTAAGTGGGGTTGCGACGTGTTTGCCTA
1621 CGTCTTACCCAGATGGTTCGGACAAGAGCTACTATTAGGCATGCCCTTCTTTCGAAGAGTA
1681 TCATGAAGCCGTGGATTTCAAAGCTCGAACGTTACACCCGACGGGTACGAGGTACCGGC
1741 ATGGCCAGCTAACGAGTCAACTACGTGGGACAAACACGGCCACATCAAGTCGTGCTCACT
1801 AGAGAAAGCTACGCAGCTGGCCGAACACCACGGTGCAGCTGTTCCCTCTACATGGTACG
1861 GGAGAAGCCAGAGGGGGAGGAGCATGAGCCGGATGTCGATACCCGAGAGGTGCTGGAGGA
1921 GTATGCAGATGTGATTGTTGACAAAATGCCAATGGAGCTACCTCCGAAACGAGCGTAGA
1981 ACATAACCATCGACTCCGATGAGACGGCAGACCTCCAGCCAGGGCATCGTATCGACTTAC
2041 CCGATTTCGAATGGGCTGAGGTGACAAAGCAGGTAACGACTTGTGGAGCGAGGAATCAT
2101 CCGACCATCGAAGTCACCTTACAGCGCACCGTTAGTGATTGTAAAAAAGAAAGGAGGTGA
2161 ACTTCGTATCTGCACAGACTATCGCGCCCTCAACGAGCTTACCACCAAGGATCGATTTCC
2221 GCTGCCCCGTATCGATGACATTCTGGATTGCCCTTGACGGCGCCGACACCTTCTCCAAGTT
2281 CGATCTTTTGTGGGCTACTGGCAGGTGTTGGTAAAAGAGTCTGATGTACACAAGACGGC
2341 CTTCTCGACTCGATCGGGACATTATGAGTACCTGGTAATGCCGTTCCGGTCTATGCAACGC
2401 TCCCGCCACCTTCCAGAGATTGATGAATGACGCCCTACGACCATTCTTAAACAAGACAGT
2461 CTGTGTGTATCTTGACGACATCATCGTGTTCAGCCGAAACCGAGAGGACCACAAACGACA
2521 CGTGAGGGAAGTCTTGGACGCCCTGAGAGCACAGAAGTTCTATGCCAAGAAGTCGAAATG
2581 TGAGTTATTTCAGGAAGAAGATGGGATTCTGGGCCACGTGGTGTCTGCGGCAGGAGTGG
2641 GCCAGACCCTGAGAAAGTGAAGGTTGTGGAAGAGTGGGTACCTCCCAACACGCCGAAAGG
2701 CCTCTTGAGCTTTCTAGGACTGACTGGGTATTATCGACGGTTCATCGAAGACTACGCTAA
2761 AATCGCCGCCCCACTCACAGACGCTGCCACATTGTGCGCAACTGACTTTAAATGGACTGA
2821 GGCATGCCAGGTGGCGTTTGAACAGATGAAGGCCAAGCTAGTATCGAACGAGGTCATGAT
2881 CATACTACAATGGAGGACACGTTCAAGGTGAGTACGGACCGGTGCGATATTGCGATGGG
2941 CGGAGTACTACAGCAGTGGAGTCCCAAGGACCAAGAGTTCGACCTGTGGCATATGAGTC
3001 CACGAAGTTCAAGAAACACGAGATGAACTACCCGACGCGTGAGAAGGAATTCATGCTAT
3061 CATCCATGCCCTACGGAAGTGGCGACACTACCTACTTGGCCGACCCTTCTTGATTGAGAC

```

3121 AGATCATCAGTCTCTGAGTTACTTTACGTCCCAGACACACCCTCCCAGTGGACGACTGAG
3181 TCGATGGCTCGACTTCCTAGCGGAATACGACTTTGAGATCAAGTACGTGCCGGGCAAAGA
3241 CAACGACGCAGCCGACGGGTTGTCTCGTATGTTGGCACAGACAGCGATGGTGTTCGAGCC
3301 GGACGACTCGTTGCTAGACATCATCAAGCAGGGCTATGAGTCGGACGAGTACTTTAAGGA
3361 CGTCTTCAAGGTACTGGCCACGGAACCGGTGGTCATCCCCAAAGAGATGCACAACCACGC
3421 CCGCCATTTCCGATACGACAAGAACACAGGACTGCTGTATTTTCGCCTCCGTTTACAAGGG
3481 GGAGGGAGAGCGACTCTGCGTGCCAAGAGGTAAGGCCAGAAAAATGCTGATGAAGGAGGC
3541 TCATGACGCACCCCTTGCTGGTCACTACGGATACTTCAAAAAGCTATGAAAAGGCTGGCGAG
3601 GGCTTACTACTGGCCACGAATGATAGACCACATGCGCAACCACACCAGATCCTGTCTGAT
3661 CTGCCAGACCACGAAGGCCAGACGAGCACCACCCAGGGCTTGCTGAAGCAGCTGCCGGT
3721 ACCGACGGGAAATTGGCAGGAGATCACAATGGACTTCATTGGAGGCATCCCAACGACCCA
3781 TCGAGGCCACAACAATATCTGGGTACCGTTGATAGGATGTCAAAGATGGTACATCTGAT
3841 TCCTTGCAAGACGAGCACGGATGGAGAAGAGTTGGCGGACATGTACATTGACCGCATTGT
3901 TCGATATCACGGAGTACCTCGTTCGATCGTGTGCGACAGGGACAAGCTATTCACAGCAAA
3961 GCTATGGCAGACGTTACAGACACGTCTAGGCACAGAGTTGAAGTTTTCCACAGTCAATCA
4021 CCCCAGACTGATGGACAGTCAGAACGAGTGAACACCGAGCTGATTCGACAGATGAAGCA
4081 ACACTTCGTCACGGACAAAACTGGGACCTCTGGTTACCTGTCATCGAGTTTGGCGATGAA
4141 TTCTGCAAAGCATTCGTCCACCGGATACGCACCCTTCGAGGCGGTGTATGGATACATCCC
4201 AGACGGACCAACGTATGCCTCGACTCGAGAGCTCACCAAGGTACACCATCAAATGGACGC
4261 TTGGATGGACAACTACGGGCTATTTCCAATTCGATGCACGACCGATTAATCGAGACCA
4321 ACGGGTCCAGGAGAACAGGGTGAATCAGCATCGAGTGCCAGTCGCGTTTCAGATTAACGA
4381 CCAAGTCTTGGTACATCGGAAGGCGTTCTTTGACAAGGCCAAGTACGCAAAGATGTATGA
4441 CGTCTACTTTGGACCATTTCCCATCGAGAAGAAGATTGACACCAATGTCTACAAGGTGCA
4501 GCTACCATACGACTCGACTCGACACAAGAATATCAATGTACAACACTTGAAGAAGTTTCAT
4561 ACCTCGACCTGAGTATGACATCAACCCACCCAGTACGGAGTACTCTCAAGAATGCAGCCT
4621 GCATCAGATCACCAGCCTGGTGGGTATTGATGACGACCGTTACTTCGTAACTTGGGAAGA
4681 TTGTGACCCCTCTATTGCCTCTTCAATTTGAAAGAGATGTTCCACCGCATCCCTAAAGA
4741 CAAACGGGATTCACTATTGGATCAATGGAACCAGTTCATTAAGACCCCTGCGGAAAGCGA
4801 GGACTATGTGGACATCTCCTAGGGGGGAGAGTGTAATGATTCGGAGACACTCATAAGAT
4861 GTCAGTGGGAGGCACGTGACATAGAGACTAGGGTTACGTGGAAGGCACGTGCCTGTGTGA
4921 CTGCGAGTGCCCAAATAGGACATGCGGGTACTCGCCTTTGGAGGTATAAGAAGGATTAT
4981 TGTATATGATTAATTGATTAGCTTATTATTGAAGTTCGACGAGACCAGTAGATCCAGGAG
5041 CGCAGTATTGAGACTAGCAGCCTTGGATAGAGTATTACGACAAGAGATAGTACGCCCGAT
5101 CTGTTACA

```

Abbildung 50: Gesamtsequenz des Retrotransposons Tyl3B. Dieses Retrotransposons enthält 4556 Nukleotide der internen Region und 276 Nukleotide der LTRs an beiden Enden (unterstreichende Nukleotide). Die Start- und Stopcodon sind blau und rot gefärbt und der Frameshift-Ort ist lila gefärbt.

7.2 Klonierungsweg des Expressionsvektors pYLEHC

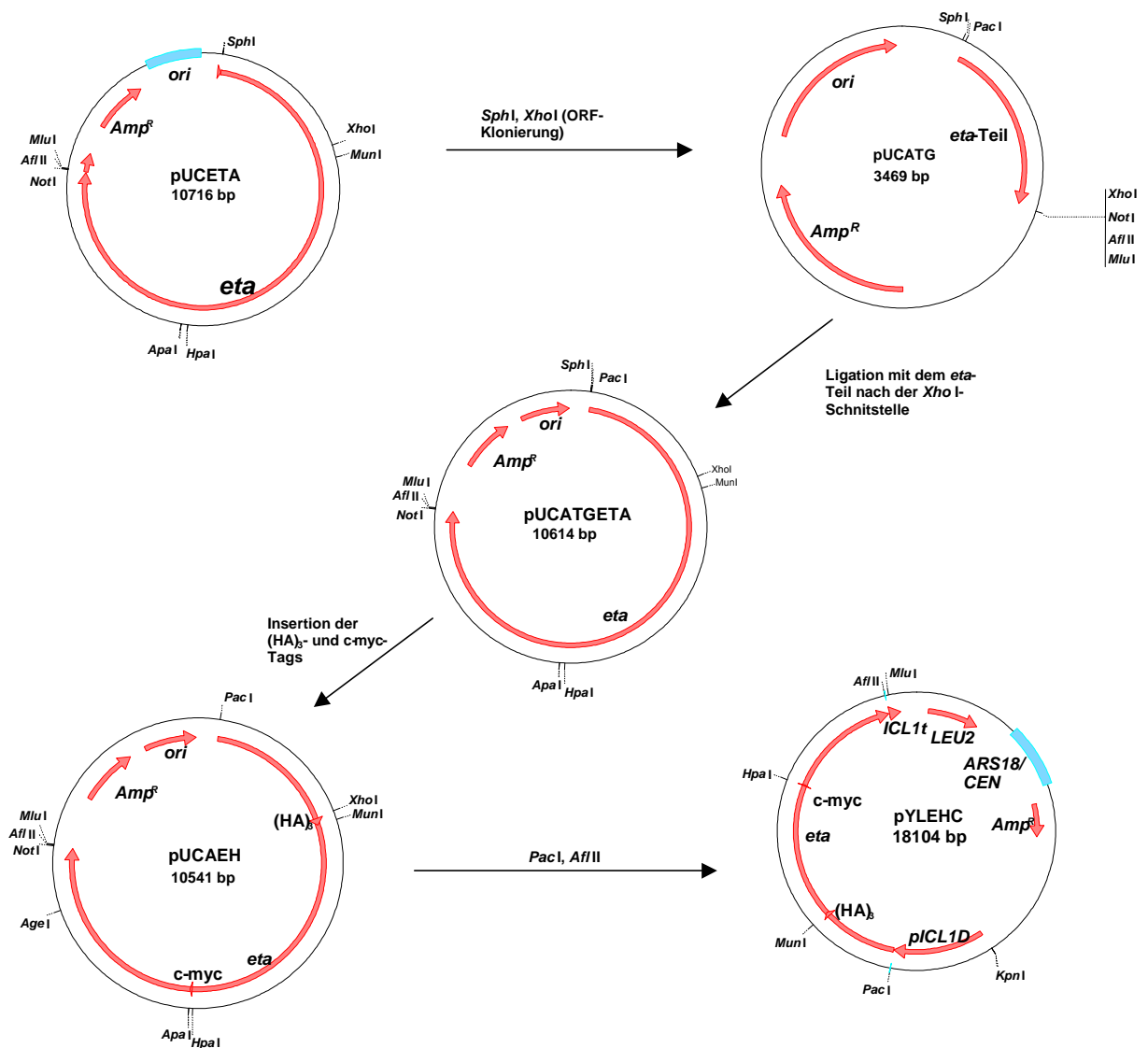


Abbildung 51: Klonierungsweg für den Expressionsvektors pYLEHC. Ein Teil der Sequenz des Ylt1-ORFs vor AUG wurde von Plasmid pUCETA entfernt. Der ORF des Ylt1 wurde mit den $(HA)_3$ - und *c-myc*-Tags modifiziert und danach in Expressionsvektor pYLIMCS inseriert (siehe 2.7.2).

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie der Technische Universität Dresden unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerold Barth angefertigt.

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter sowie ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden, den 10.02.2004

Senam

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerold Barth bedanken für das überlassene interessante Thema, seine konstruktive Kritik sowie für die intensive Betreuung meiner Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. Stephan Mauersberger für seine Bereitschaft, mit mir über meine Arbeit zu diskutieren und seine kritischen Hinweise.

Ich danke Frau Dr. Antje Augstein und Herrn Dr. Thomas Juretzek für ihre Hilfe insbesondere zu Beginn, aber auch während meiner Arbeit im Institut für Mikrobiologie der Technische Universität Dresden.

Zu Dank verpflichtet bin ich der indonesischen Regierung, die mir meinen Aufenthalt in Deutschland finanziert hat. Danken möchte ich auch dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), der meinen Deutschkurs finanziert hat und mich auch während meines Aufenthalts in Deutschland unterstützt hat.

Mein großer Dank gehört Margret Kuschel, Andriy Kovalchuk, Dr. Marcus Gentsch, Kati Schöntier, Irina Parshyna und Andre Förster für ihr Verständnis sowie die moralische und liebevolle Unterstützung, die wesentlich zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen haben.

Herzlichen Dank auch allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie, für ihre Hilfe und die gute Zusammenarbeit.

Ich bin sicher, dass diese Arbeit ohne die Unterstützung und Hilfe von allen Kollegen und Kolleginnen des Institutes für Mikrobiologie der Technische Universität Dresden in dieser Form nicht realisierbar gewesen wäre.

Lebenslauf

06 März 1967	geboren in Kulon Progo, Indonesien
Januar 1973 – Juni 1979	Besuch der Grundschule in Kulon Progo
Juli 1979 – Juni 1982	Besuch der Mittelschule in Kulon Progo
Juli 1982 – Juni 1985	Besuch der Oberschule in Kulon Progo mit der nationalen Abitur-Prüfung
Juli 1985 – Juli 1991	Studium der Chemie an der Yogyakarta State Universität in Yogyakarta mit dem Abschluss des Studium „Sarjana S1“ Grad.
September 1993 – Dezember 1996	Aufbaustudium mit dem Abschluss „Master of Science“ in Biochemie an der Technische Institut Bandung. Thema der Masterarbeit: „Konstruktion und Charakterisierung des <i>sal4</i> Mutanten von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stamm BSC483/1a“ unter Betreuung von Frau Dr. Muliawati Sindumarta und Herrn Akhmaloka, Ph.D.
Ab April 1999	Beginn der Doktorarbeit am Institut für Mikrobiologie der Technische Universität Dresden zum Thema „Molekulare Charakterisierung des Retrotransposons Ylt1 der Hefe <i>Yarrowia lipolytica</i> “ unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. G. Barth.