

Funktionsanalyse von Glycosphingolipiden  
durch gentechnologische Manipulation ihres Metabolismus  
in Pilzen und Pflanzen

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von  
Sandra Albrecht  
aus Frankfurt/Oder

Biozentrum Klein Flottbek  
Fachbereich Biologie  
Universität Hamburg

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. E. HEINZ  
Weitere Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. G. DAUM  
Tag der Disputation: 09. September 2005

Hamburg, den 20. August 2005



Professor Dr. Arno Frühwald  
Dekan

## Abkürzungsverzeichnis

A <sub>260</sub> , A <sub>280</sub> , A <sub>405</sub>	Absorption bei 260, 280 bzw. 405 nm
bp	Basenpaare
CoA	Coenzym A
Cyt <i>b</i> <sub>5</sub>	Cytochrom <i>b</i> <sub>5</sub>
DC	Dünnschichtchromatographie
DE	Diethylether
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNP-	2,4-Dinitrophenyl-
dsDNA	<i>Double stranded DNA</i> (doppelsträngige DNA)
EE	Eisessig
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Elektrosprüh-Ionisation)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAMES	<i>Fatty acid methylesters</i> (Fettsäuremethylester)
FDNB	1-Fluor-2,4-dinitrobenzol
GC	Gaschromatographie
GCS	Glucosylceramid-Synthase
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (Grün-fluoreszierendes Protein)
GIPC	Glycosylinositolphosphorylceramid
GlcCer	Glucosylceramid
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HFAMES	<i>Hydroxy fatty acid methylesters</i> (Hydroxyfettsäuremethylester)
His	Histidin
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IPC	Inositolphosphorylceramid
kb	Kilo-Basenpaare
LCB	<i>Long chain base</i>
LRR	<i>Leucin-rich repeats</i>
MIC	<i>Minimal inhibition concentration</i> (Minimale Hemm-Konzentration)

MIPC	Mannosylinositolphosphorylceramid
M(IP) <sub>2</sub> C	Mannosyl-(Inositolphosphoryl) <sub>2</sub> -Ceramid
MS	Massenspektrometrie
NAD(P)H	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid(phosphat), reduzierte Form
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>Open reading frame</i> (Offener Leserahmen)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Petrolether
rpm	<i>Revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SG	Sterolglucosid
S1P	Sphingosin-1-phosphat
ssDNA	<i>Single stranded DNA</i> (einzelsträngige DNA)
T-DNA	Transfer-DNA
WT	Wildtyp
mol%	Mol-Prozent
% (v/v)	Prozent <i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
% (w/v)	Prozent <i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen, 1g entspricht dabei 1 ml)

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Struktur und Biosynthese von Sphingolipiden	2
1.2. Enzyme zur Modifizierung des Ceramidgerüsts	8
1.2.1. Sphingolipid- $\Delta$ 4-Desaturase	9
1.2.2. Sphingolipid- $\Delta$ 8-Desaturase	10
1.2.3. Sphingolipid-C4-Hydroxylase	11
1.2.4. Sphingolipid-C9-Methyltransferase	11
1.2.5. Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylase	12
1.3. Funktionen von Sphingolipiden in Pflanzen und Pilzen	12
1.3.1. Pilzliche Sphingolipide	14
1.3.2. Pflanzliche Sphingolipide	17
1.3.3. Defensine - Bestandteile des Abwehrmechanismus der angeborenen Immunität	18
1.4. Die phytopathogenen Pilze <i>Magnaporthe grisea</i> und <i>Ustilago maydis</i>	22
1.4.1. <i>Magnaporthe grisea</i>	22
1.4.2. <i>Ustilago maydis</i>	23
1.5. <i>Pichia pastoris</i> als Modellorganismus zur Aufklärung des Sphingolipid- metabolismus in Pilzen	25
1.6. <i>Arabidopsis thaliana</i> als pflanzlicher Modellorganismus	25
1.7. Zielstellung der Arbeit	27
2. Material und Methoden	28
2.1. Materialien	28
2.1.1. Geräte	28
2.1.2. Vektoren	29
2.1.3. Organismen	29
2.1.4. Sonstiges	30
2.1.5. Medien	30
2.1.5.1. Medien für <i>Escherichia coli</i>	30
2.1.5.2. Medien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
2.1.5.3. Medien für <i>Pichia pastoris</i>	32
2.1.5.4. Medien für <i>Arabidopsis</i>	32
2.1.6. Lösungen	33
2.2. Methoden	34
2.2.1. Molekularbiologische Arbeiten	34
2.2.1.1. Herstellung von Deletionskonstrukten	34
2.2.1.2. Herstellung der Expressionskonstrukte	38
2.2.1.3. Ligation	39

2.2.1.4. DNA-Extraktion aus Agarosegelen	40
2.2.1.5. DNA-Konzentrationsbestimmung	41
2.2.2. Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	41
2.2.2.1. Kompetente <i>E. coli</i> XL1 Blue MRF <sup>+</sup> tet-Zellen für die chemische Transformation	41
2.2.2.2. Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	41
2.2.2.3. Plasmid-Isolierung	42
2.2.3. Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
2.2.3.1. Kompetente <i>S. cerevisiae</i> -Zellen für die chemische Transformation	43
2.2.3.2. Chemische Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	43
2.2.3.3. Induktion der heterologen Genexpression in <i>S. cerevisiae</i>	43
2.2.4. Arbeiten mit <i>Pichia pastoris</i>	44
2.2.4.1. Kompetente <i>P. pastoris</i> -Zellen für die Elektroporation	44
2.2.4.2. Elektroporation von <i>P. pastoris</i>	44
2.2.4.3. Isolierung genomischer DNA aus <i>P. pastoris</i>	45
2.2.4.4. Kolonie-PCR	45
2.2.5. Arbeiten mit <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
2.2.5.1. Kreuzung von <i>A. thaliana</i>	47
2.2.5.2. Selektion transgener <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	48
2.2.5.3. Isolierung pflanzlicher genomischer DNA	48
2.2.5.4. PCR-Analyse der genomischen DNA	49
2.2.6. Weitere biochemische Methoden	49
2.2.6.1. Extraktion der Gesamtlipide und Fraktionierung	49
2.2.6.2. Isolierung von Cerebrosiden	50
2.2.6.3. Acetylierung von Lipiden	51
2.2.6.4. Isolierung von Sphingobasen durch Ba(OH) <sub>2</sub> -Hydrolyse	51
2.2.6.5. DNP-Derivatisierung von Sphingobasen	51
2.2.6.6. Analyse der Sphingobasen mittels HPLC	52
2.2.6.7. Analyse der Sphingobasen mittels HPLC/MS	52
2.2.6.8. Analyse von Fettsäuren	53
3. Ergebnisse und Diskussion	54
3.1. Durch Deletion der Gene Sphingolipid-modifizierender Enzyme in <i>P. pastoris</i> erhält man Mutanten mit ungewöhnlichen Sphingolipidzusammensetzungen	55
3.1.1. Die Deletion der Sphingolipid- $\Delta$ 4-Desaturase in <i>P. pastoris</i> führt zum Verlust der Glucosylceramide	57
3.1.2. Die Herstellung der Sphingolipid- $\Delta$ 8-Desaturase-Deletionsmutante ermöglicht die Analyse der Reaktionssequenz bei der Modifikation	64

von Sphingobasenreste	
3.1.3. Auch die Deletion der putativen Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylase führt in <i>P. pastoris</i> zum Verlust der Glucosylceramide	67
3.2. Die Wirkung pflanzlicher Defensine auf <i>P. pastoris</i> ist abhängig von der Sphingolipidzusammensetzung der pilzlichen Plasmamembran	73
3.2.1. Rs-AFP2 wirkt auf verschiedene <i>P. pastoris</i> -Stämme mit modifizierter GlcCer-Ausstattung unterschiedlich stark	73
3.2.2. Die Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylase-Deletionsmutante ist sensitiv gegenüber Dm-AMP1	76
3.3. Identifizierung der Sphingolipid- $\Delta$ 4- und der $\Delta$ 8-Desaturase sowie der C4-Hydroxylase aus <i>U. maydis</i> durch heterologe Expression in <i>S. cerevisiae</i> bzw. <i>P. pastoris</i>	77
3.3.1. Heterologe Expression der putativen Sphingolipid-C4-Hydroxylase und der $\Delta$ 4-Desaturase in <i>S. cerevisiae</i>	77
3.3.2. Heterologe Expression der putativen Sphingolipid- $\Delta$ 4-Desaturase und der $\Delta$ 8-Desaturase in den <i>P. pastoris</i> -Deletionsmutanten Ppd4 $\Delta$ bzw. Ppd8 $\Delta$	80
3.4. Analyse von <i>A. thaliana</i> T-DNA-Mutanten zur Aufklärung des pflanzlichen Sphingolipidmetabolismus	84
3.5. Ist die Deletion der Sphingolipid- $\Delta$ 4-Desaturase in <i>A. thaliana</i> letal?	87
3.6. Führt die Modifizierung der Sphingolipide in <i>M. grisea</i> zu einer Reduktion der virulenten Eigenschaften dieses Pilzes?	88
3.7. Perspektiven	89
4. Zusammenfassung	92
5. Literaturverzeichnis	95
6. Anhang	110

## Nomenklatur der Sphingobasen

Die Nomenklatur der Sphingobasen erfolgt in Anlehnung an die Empfehlungen der *IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature* (JCBN) von 1997 [1].

Die einfachste Sphingobase, (2*S*,3*R*)-2-Aminooctadecan-1,3-diol, wird als *Sphinganin* bezeichnet.

Von *Sphinganin* abgeleitete Sphingobasen werden in dieser Arbeit wie folgt benannt:

- Sphingobasen mit einer Doppelbindung erhalten die Grundbezeichnung *Sphingenin*, Sphingobasen mit zwei Doppelbindungen *Sphingadienin*. Die Positionen der Doppelbindungen werden der Endung „en“ vorangestellt, z.B. *Sphing-8-enin* für (2*S*,3*R*)-2-Aminooctadec-8-en-1,3-diol, die Konfiguration nach der *E/Z*-Nomenklatur bezeichnet, z.B. (4*E*,8*Z*)-*Sphinga-4,8-dienin*.
- Sphingobasen mit einer zusätzlichen Hydroxygruppe erhalten das Präfix „Hydroxy“, z.B. *4-Hydroxysphinganin*.

Zudem treten Kurzformen der Nomenklatur auf, z.B. d18:0, t18:0 oder d18:1<sup>4*E*</sup>, d18:2<sup>4*E*,8*E*</sup>C9m, die sich folgendermaßen ableiten:

- Sphingobasen mit 2 Hydroxygruppen erhalten ein *d*, Sphingobasen mit 3 Hydroxygruppen ein *t* vorangestellt. Die Konfiguration der chiralen C-Atome entspricht dabei der von Sphinganin bzw. (2*S*,3*S*,4*R*)-4-Hydroxysphinganin.
- Die Zahl vor dem Doppelpunkt gibt die Kettenlänge (ohne Verzweigung) der Sphingobase an, die nach dem Doppelpunkt die Anzahl der vorhandenen Doppelbindungen.
- Hochgestellte Zeichen geben die Positionen und Konfigurationen der Doppelbindungen an.
- C9m verweist auf eine Methylverzweigung an der C9-Position der Sphingobase.

In Tab. 1 sind die in der nachfolgenden Arbeit verwendeten Kurzformen der Sphingobasennomenklatur dargestellt.

**Tab. 1 Erläuterung der in der Arbeit verwendeten Kurzformen der Sphingobasennomenklatur**

Bezeichnung der Sphingobase	alternativ verwendete Kurzform	Anzahl der C-Atome	Anzahl:Position der Hydroxy- gruppen	Anzahl:Position (Konfiguration) der Doppelbindungen	weitere Modifikationen
Sphinganin	d18:0	18	2:1+3	0	
C20-Sphinganin	d20:0	20	2:1+3	0	
Sphing-4-enin	d18:1 <sup>4E</sup>	18	2:1+3	1:4(E)	
Sphing-4,8-dienin	d18:2 <sup>4E,8E</sup>	18	2:1+3	2:4(E)+8(E)	
9-Methylsphing-4,8-dienin	d18:2 <sup>4E,8E</sup> C9m	18	2:1+3	2:4(E)+8(E)	CH <sub>3</sub> an C9
4-Hydroxysphinganin	t18:0	18	3:1+3+4	0	
4-Hydroxy-C20-sphinganin	t20:0	20	3:1+3+4	0	
(8E)-4-Hydroxysphing-8-enin	t18:1 <sup>8E</sup>	18	3:1+3+4	1:8(E)	
(8Z)-4-Hydroxysphing-8-enin	t18:1 <sup>8Z</sup>	18	3:1+3+4	1:8(Z)	

## 1. Einleitung

Der Grundbaustein eines jeden Organismus ist die Zelle. Das Cytoplasma jeder lebenden Zelle wird durch eine Membran von der Umgebung abgegrenzt, die aus einer Lipiddoppelschicht und Proteinen besteht. Aus biophysikalischen und biochemischen Untersuchungen der letzten Jahre sind eine Reihe neuer Aspekte zur Organisation der Lipiddoppelschicht hervorgegangen. Man geht davon aus, dass eine laterale Trennung von Lipidspezies vorliegt, die unter anderem zur Bildung spezialisierter Membrandomänen, den so genannten *lipid rafts* (Abb. 1), führt [2]. Die Hauptkomponenten dieser *lipid rafts* bilden Sphingolipide und Sterole, zwischen deren aliphatischen Kohlenstoffketten schwache Wechselwirkungen vorhanden sind [3].

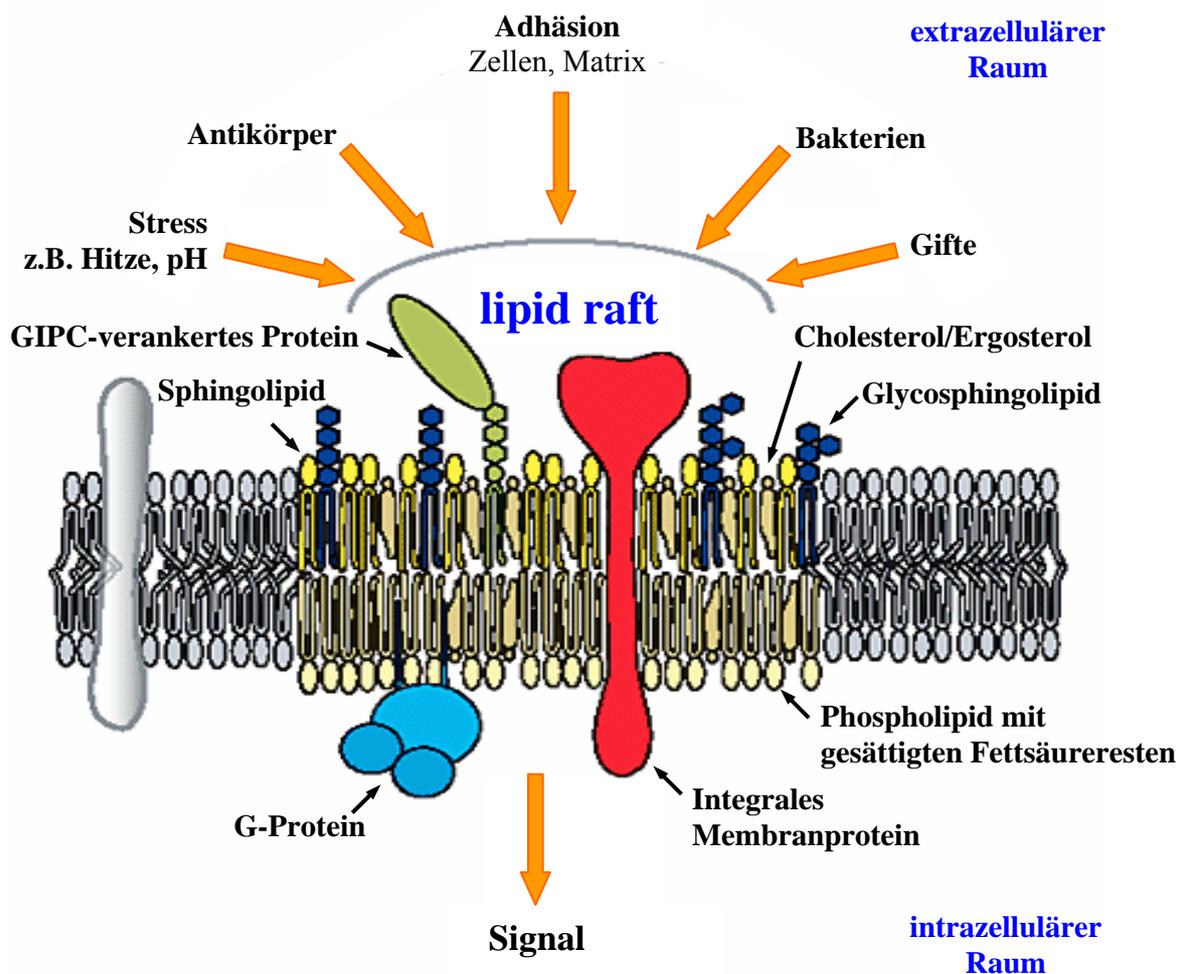


Abb. 1 Schematische Darstellung eines *lipid raft* [4].

Simons et al. entwickelten ein Modell zur Erklärung des asymmetrischen Membranaufbaus. Sphingolipide sind dabei über schwache Wechselwirkungen der Kohlenstoffketten miteinander assoziiert. Die polaren Kopfgruppen der Glycosphingolipide nehmen dabei einen größeren Raum ein als die gegenüberliegenden Kohlenstoffketten, wobei Freiräume entstehen, die durch Cholesterol oder Ergosterol ausgefüllt werden [2]. Die Zusammensetzung der Phospholipide auf der cytoplasmatischen Seite der Mikrodomänen ist noch unklar, man geht aber davon aus, dass diese vorwiegend gesättigte Fettsäurereste enthalten, um eine optimale Packung der Domänen zu erreichen [2]. Die Cluster-Bildung von Sphingolipiden und Sterolen ist nur schwer spektroskopisch detektierbar, deshalb geht man davon aus, dass sich die Lipide individuell und kontinuierlich in die und aus den *rafts* bewegen [5,6]. Sphingolipid-Sterol-*rafts* sind bei 4°C in nichtionischen Detergentien, wie z.B. Triton X-100, nicht lösbar [7,8]. Diese Tatsache ermöglicht zum einen die Trennung der *rafts* von den übrigen Plasmamembranbestandteilen, erschwert die Isolierung und Detektion der einzelnen *raft*-Komponenten aber erheblich [7,8]. *Lipid rafts* sind mit Glycosylphosphatidylinositol (GPI)- bzw. Glycosylinositolphosphorylceramid (GIPC)-verankerten oder transmembranen Proteinen assoziiert [9,10]. Die funktionellen Mikrodomänen existieren in Tier- und Hefezellen und konnten jetzt auch in Tabak-Blättern und BY2-Zellen nachgewiesen werden [11]. Neben der Anordnung von Proteinen in der Membran spielen *lipid rafts* eine wichtige Rolle beim intrazellulären Membrantransport, der Signaltransduktion und der Infektion durch Pathogene [11,2].

### 1.1. Struktur und Biosynthese von Sphingolipiden

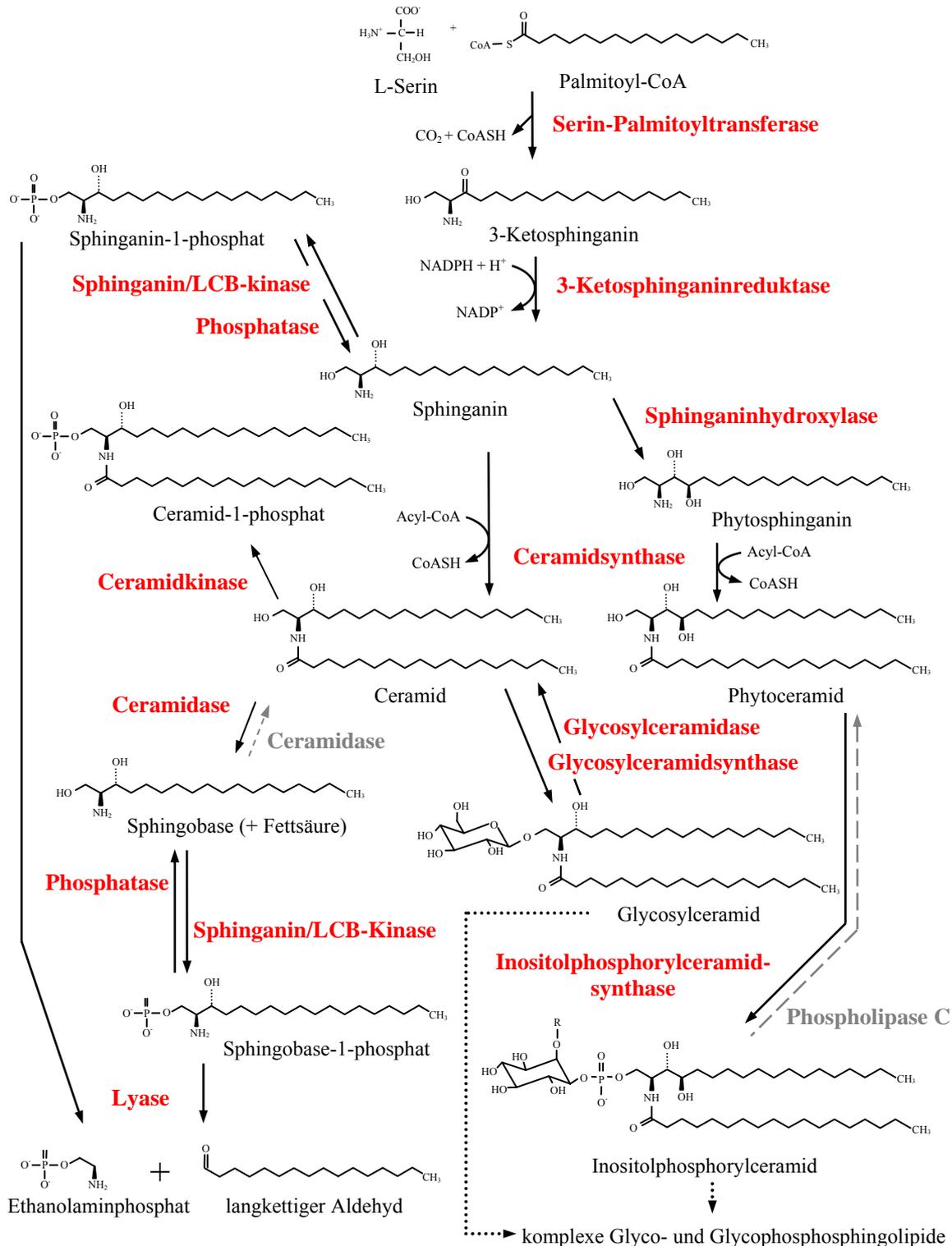
Ende des 19. Jahrhunderts entdeckte der in Büdingen geborene Johann Wilhelm Thudichum (1829-1901) bei der Extraktion von Gehirnen eine bis dahin unbekannte Komponente. Thudichum wies Zuckerreste, Fettsäuren und eine organische Base nach. Da diese Base ein ähnliches Lösungsverhalten wie Triacylglycerole zeigte, ansonsten aber eine sehr rätselhafte Substanz war, benannte er sie nach der rätselhaften Sphinx als Sphingolipid [12]. In den 1930er Jahren erfolgten die ersten Strukturaufklärungen dieser Sphingolipide, in den 1950er Jahren wurden Sphingolipide erstmals außerhalb des Gehirns gefunden [12]. Heute ist bekannt, dass Sphingolipide ubiquitär vorkommen und essentielle Komponenten aller Eukaryoten und einiger Bakterien sind [13,14]. Im Gegensatz zu den Glycerolipiden, deren

Grundbaustein der dreiwertige Alkohol Glycerol ist, basieren Sphingolipide auf dem Aminoalkohol 2-Amino-Octadecan-1,3-diol, der als Sphingobase bezeichnet wird.

Die Biosynthese von Sphingolipiden ist in Abb. 2 dargestellt. In einem ersten Schritt erfolgt die Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA zu 3-Ketosphinganin. Die Reaktion wird durch ein Schlüsselenzym des Sphingolipidmetabolismus, die Serin-Palmitoyltransferase (SPT), katalysiert. Die SPT gehört zur Familie der Pyridoxal-5'-phosphat-abhängigen  $\alpha$ -Oxoaminsynthasen (POAS) [15], deren Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum vermutet wird [16]. Die Analyse von Hefemutanten mit komplettem Verlust der SPT-Aktivität führte zur Isolierung und funktionellen Charakterisierung der SPT-codierenden Gene *LCB1* und *LCB2* [17-19]. Eine detaillierte Strukturaufklärung der analogen Genprodukte in Säugerzellen ergaben 53 kDa (*LCB1*) bzw. 63 kDa (*LCB2*) große Proteine, die ~20% ähnlich zueinander sind. Dies lässt auf eine Bildung eines heterodimeren Komplexes schließen [20,21]. Beide Untereinheiten besitzen stark hydrophobe Transmembrandomänen (TMD) und scheinen nicht glycosyliert zu sein [20,21]. In Hefezellen wurde außerdem ein ca. 10 kDa Produkt des *TSC3*-Gens gefunden, das mit dem *LCB1/LCB2*-Komplex assoziiert und für die optimale Aktivität der SPT in Hefe verantwortlich, aber kein essentieller Bestandteil ist [22,23]. Der Kofaktor für die Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA mit gleichzeitiger Decarboxylierung des Serins ist Pyridoxal-5'-phosphat (PLP), das wahrscheinlich nur an die *LCB2*-Untereinheit gebunden ist [18,19,21]. Zwei verschiedene grundlegende Mechanismen für die Kondensationsreaktion wurden postuliert: (i) es wird ein PLP-stabilisiertes Carbanion bei der Decarboxylierung des L-Serins gebildet, dem eine Acylierung folgt; (ii) zuerst wird das  $\alpha$ -Wasserstoffatom von L-Serin entfernt, wobei ein Carbanion entsteht, dem eine Acylierung und die abschließende Decarboxylierung folgen [15,24].

3-Ketosphinganin wird durch eine NADPH-abhängige Oxidoreduktase zu Sphinganin, der einfachsten Sphingobase, reduziert. Aus *S. cerevisiae* wurde das *TSC10*-Gen isoliert, das dieses membrangebundene essentielle Enzym codiert [25]. In Säugerzellen wurde es an der cytosolischen Seite des ER lokalisiert [26]. Zwei homologe Gensequenzen putativer 3-Ketosphinganinreduktasen wurden in *A. thaliana* gefunden, bisher aber funktionell noch nicht charakterisiert [27].

Sphinganin dient als Substrat für die Biosynthese von Ceramid. In Hefe wird diese Reaktion durch die Ceramid-Synthase katalysiert, die aus mindestens drei Untereinheiten, Lac1p, Lag1p sowie Lip1p besteht [33,34, 35].



**Abb. 2 Schematische Darstellung des Sphingolipidmetabolismus in Pflanzen und Pilzen.** Das Schlüsselenzym für die Sphingolipidbiosynthese ist die Serin-Palmitoyltransferase (SPT), die die Synthese von 3-Ketosphinganine aus Serin und Palmitoyl-CoA katalysiert. Die rot dargestellten Enzyme wurden bereits in Pilzen und/oder Pflanzen identifiziert und charakterisiert [28-45]. Die grau-gestrichelten Linien zeigen hypothetische Biosynthesewege mit zugehörigen Enzymen (ebenfalls grau). Die schwarz gepunkteten Linien weisen auf mehrstufige Biosynthesewege hin.

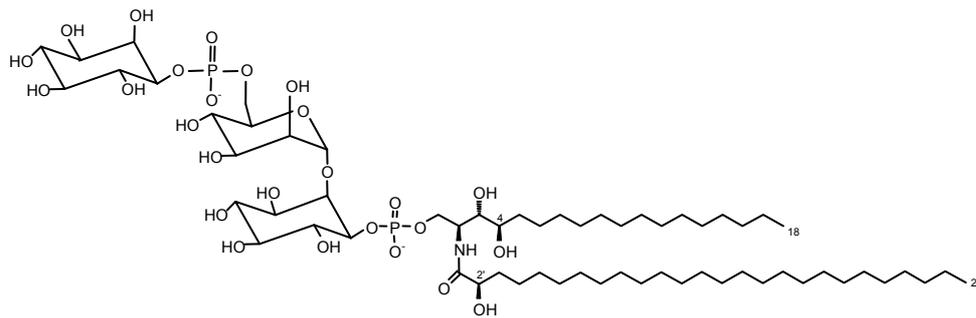
Die beiden Hefe-Ceramidasen, Ypc1 und Ydc1, katalysieren wahrscheinlich ebenfalls zu einem geringen prozentualen Anteil Ceramide, in dem sie in einer Umkehrreaktion freie Fettsäuren nutzen [33,34]. Zwei homologe cDNA-Klone aus *A. thaliana* codieren wahrscheinlich für putative Sphinganin-*N*-Acyltransferasen [46], deren Lokalisation in der ER-Membran vermutet wird [47]. In Hefe sorgt die Ceramidsynthese offensichtlich dafür, dass C<sub>26</sub>-Fettsäuren ausschließlich zur Synthese von GIPC verwendet werden. In Pflanzen wurde für das homologe Enzym eine Substratspezifität für C<sub>16</sub>- bis C<sub>24</sub>-Acyl-CoAs bei der Bildung von Glucosylceramiden (GlcCer) gezeigt. Dies deutet auf die Fähigkeit von Ceramidsynthasen hin, Sphingobasen und Fettsäurereste unterschiedlich zu kombinieren [47]. Die Ceramidspezies bestimmt, welcher der beiden möglichen Biosynthesewege, Bildung von Glycosylceramid oder Inositolphosphorylceramid (IPC), eingeschlagen wird. Während Ceramide ohne Hydroxysphingobasen für die Biosynthese von Glycosylceramiden verwendet werden, erfolgt im Fall von Phytoceramid die Biosynthese von IPCs (Abb. 2).

Die am besten charakterisierte Glycosylceramidsynthese ist die UDP-Glucose:Ceramid-Glucosyltransferase (GCS), die die Synthese von GlcCer aus Ceramid und UDP-Glucose katalysiert. Die erste GCS-codierende cDNA wurde aus *Homo sapiens* isoliert und in GCS-defizienten Maus-Melanomazellen exprimiert [48]. Säuger-GCS gehören zu den NDP-Zucker-Hexosyltransferasen (EC 2.4.1.x) [49]. Sie sind integrale Membranproteine mit einer einzelnen putativen Transmembrandomäne am *N*-Terminus und einem Segment am *C*-Terminus, das hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren besteht und mit der Membran interagiert. Das Reaktionszentrum und der *C*-Terminus liegen dabei auf der cytosolischen Seite der Golgi-Membran [50-52]. In *S. cerevisiae* und *S. pombe* konnten keine homologen Enzyme gefunden werden, während eine Reihe anderer GCS aus Pilzen und Pflanzen heterolog in *S. cerevisiae* und/oder *P. pastoris* exprimiert wurden [30]. Die bisher gefundenen Sequenzen zeigen einige konservierte Aminosäuren im aktiven Zentrum, besitzen aber ansonsten nur sehr geringe Ähnlichkeit zur Säuger-GCS [53].

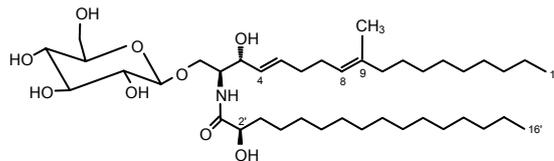
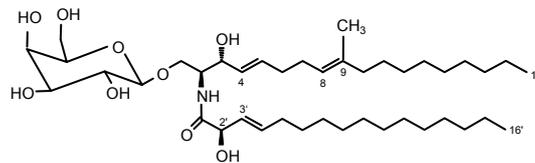
Über mehrstufige Prozesse können komplexe Glyco- bzw. Glycophosphosphingolipide synthetisiert werden. Der einleitende Schritt zur Biosynthese komplexer Glycophosphosphingolipide wird durch die Inositolphosphorylceramidsynthese (IPCS) katalysiert. IPCS-Aktivität wurde sowohl in *S. cerevisiae*-Mikrosomen als auch in pflanzlichen Mikrosomen nachgewiesen [38-40,54]. Die IPCS katalysiert den Transfer von Inositolphosphat aus Phosphatidylinositol (PI) auf Ceramid unter Freisetzung von Diacylglycerol und IPC [54]. Das *AURI*-Gen aus *S. cerevisiae* codiert eine solche IPCS, die

drei transmembrane Domänen besitzt und eine schwache Homologie zu anderen Phosphoalkohol-übertragenden Enzymen zeigt [55]. Bisher ist jedoch noch wenig über weitere IPCS bekannt. Auch die Synthese komplexer Glyco- und Glycophosphosphingolipide ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

In den folgenden Abbildungen (Abb. 3-5) sind Beispiele für die Strukturen pflanzlicher und pilzlicher Sphingolipide dargestellt.

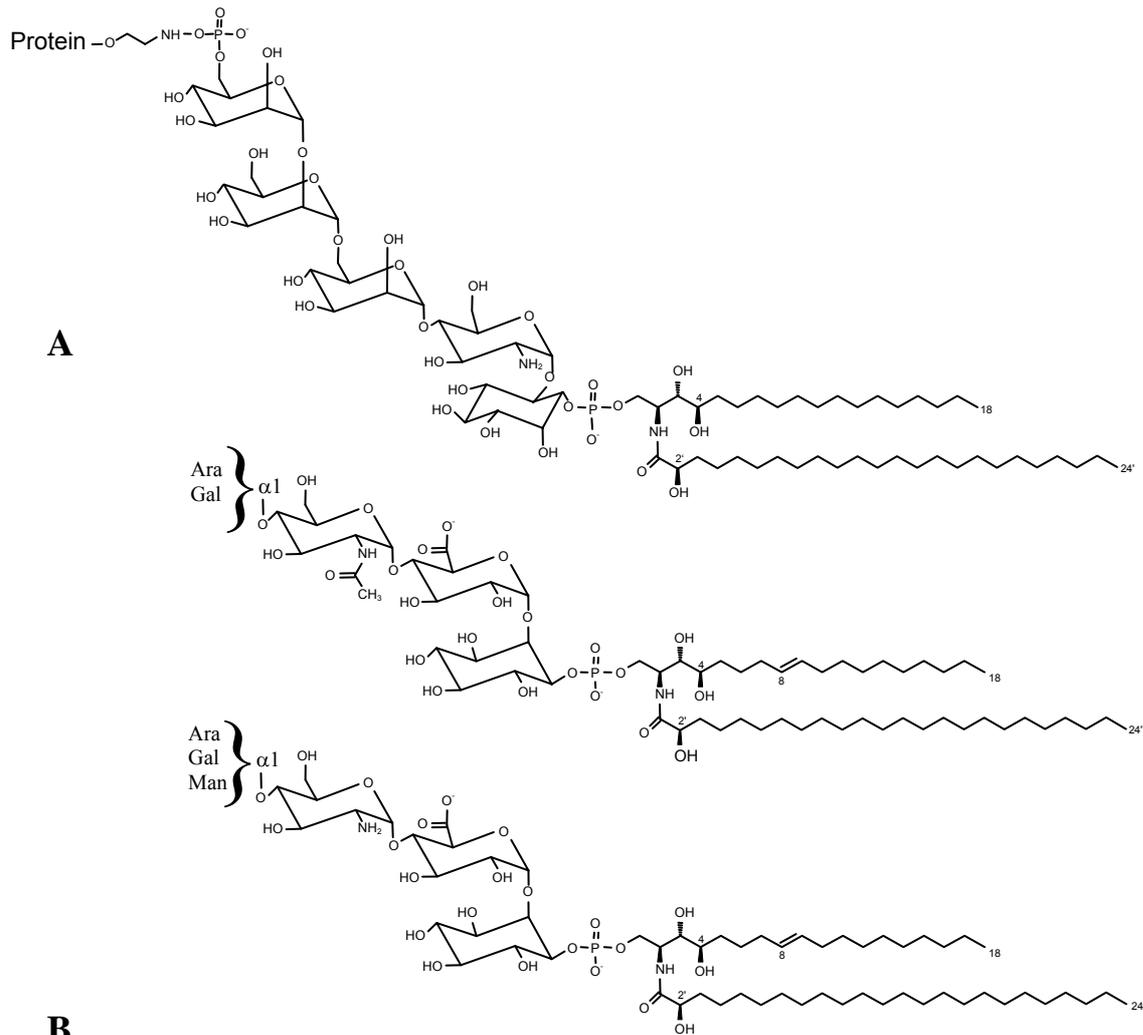


A

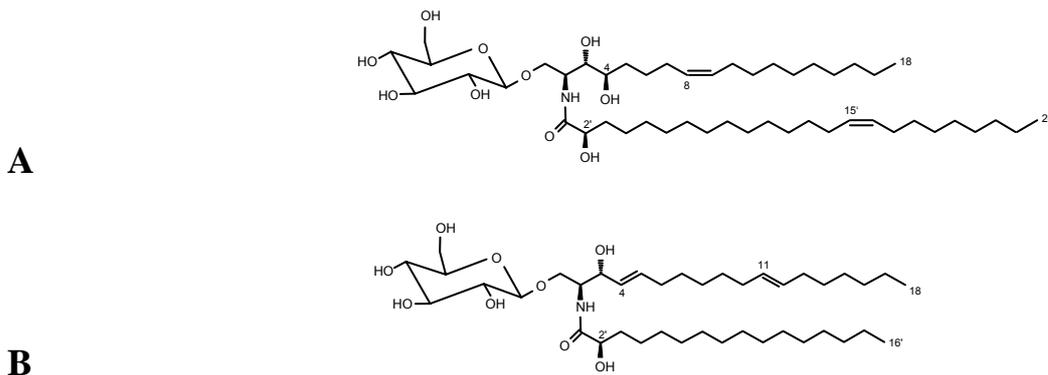


B

**Abb. 3 Beispiele für in Pilzen vorkommende Sphingolipide.** A zeigt ein Mannosyl-(Inositolphosphoryl)<sub>2</sub>-Ceramid (M(IP)<sub>2</sub>C) aus *S. cerevisiae* mit der vollständigen Bezeichnung D-*myo*-Inositolphosphoryl-(1→6)- $\alpha$ -D-Mannosyl-(1→2)-D-*myo*-Inositol-1-*O*-Phosphoceramid [56]. Der Ceramidrest besteht aus einer C4-hydroxylierten Sphingobase und einer langkettigen  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäure mit 26 C-Atomen [56]. In B sind zwei Glycosylceramide dargestellt, die unter anderem aus *Schizophyllum commune* (oben) bzw. aus *Aspergillus fumigatus* (unten) isoliert wurden [57]. Das obere Glycosylceramid ist ein  $\beta$ -D-Galactosylceramid, bestehend aus (4*E*,8*E*)-9-Methylsphinga-4,8-dienin und 2-Hydroxyhexadec-3-ensäure. Das untere Glycosylceramid besitzt die gleiche Sphingobase, hat aber eine  $\beta$ -D-Glucosyl-Kopfgruppe und eine nichtdesaturierte  $\alpha$ -Hydroxyfettsäure [57].



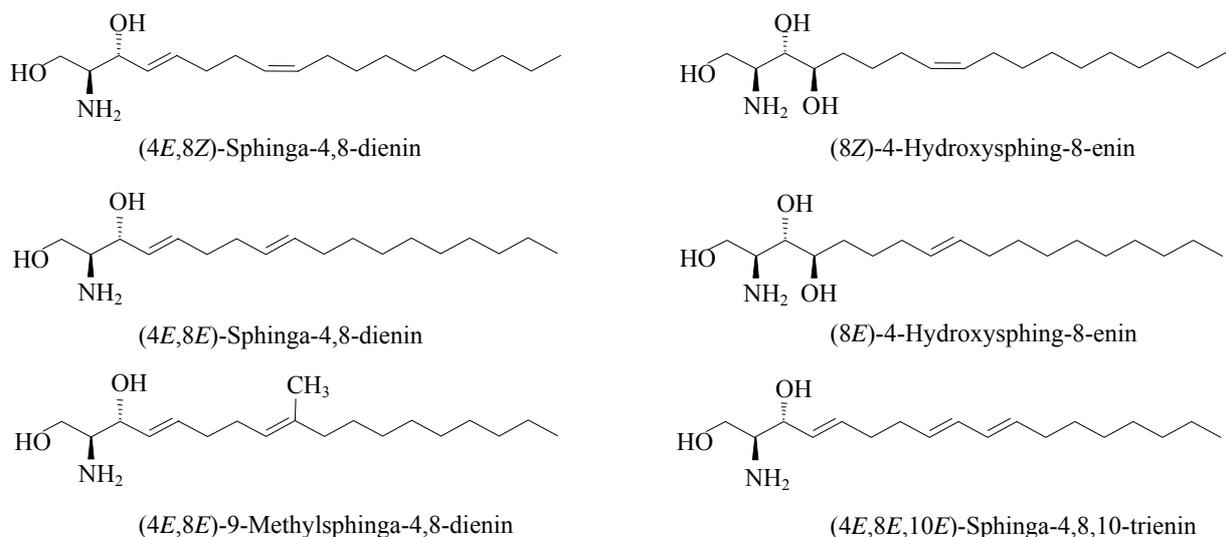
**Abb. 4 Beispiele für in Pflanzen vorkommende Phosphosphingolipide.** In **A** ist ein aus Tabak isolierter GIPC-Anker dargestellt. Das verankerte Protein ist über ein Ethanolaminphosphat an das C6-Atom eines Mannoserestes des GIPCs gebunden. Der Ceramidrest des GIPC ist Bestandteil der Lipidschicht von Membranen, die Glycosylreste und das gebundene Protein befinden sich nativ im extrazellulären Raum. Der vollständige Name des dargestellten GIPC lautet:  $\alpha$ -D-Mannosyl-(1→2)- $\alpha$ -D-Mannosyl-(1→6)- $\alpha$ -D-Mannosyl-(1→4)- $\alpha$ -D-Glucosamin-(1→6)-D-*myo*-Inositol-1-*O*-Phosphoceramid [58,59]. In **B** sind die zwei Glycophosphosphingolipid-Hauptklassen dargestellt, die in *Nicotiana tabacum* gefunden wurden. Die Oligosaccharidketten bestehen entweder aus einer Kombination von D-Arabinose und D-Galactose, die  $\alpha$ -(1→4) an ein  $\alpha$ -D-*N*-Acetylglucosamin-(1→4)- $\alpha$ -D-Glucuronosyl-(1→2)-D-*myo*-Inositol-1-*O*-Phosphoceramid gebunden sind, oder aus einer Kombination von D-Arabinose, D-Galactose und D-Mannose,  $\alpha$ -(1→4)-gebunden an ein  $\alpha$ -D-Glucosamin-(1→4)- $\alpha$ -D-Glucuronosyl-(1→2)-D-*myo*-Inositol-1-*O*-Phosphoceramid [60-62]. Das Ceramidgerüst komplexer Glycophosphosphingolipide aus Pflanzen besteht hauptsächlich aus C4-hydroxylierten Sphingobasen, die zum Teil zusätzlich  $\Delta$ 8-desaturiert sind. Diese sind mit sehr langkettigen  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäuren (22-24 C-Atome) über eine Säureamidbindung verbunden [56].



**Abb. 5 Beispiele für in Pflanzen vorkommende Glycosphingolipide.** Dargestellt sind zwei GlcCer, die sich in der Struktur ihres Ceramidgerüsts stark unterscheiden. Das in **A** dargestellte GlcCer wurde aus *Euphorbia characias* isoliert und enthält eine C4-hydroxylierte,  $\Delta 8$ -*cis*-desaturierte Sphingobase und einen  $\alpha$ -hydroxylierten,  $\Delta 15'$ -*cis*-desaturierten sehr langkettigen Fettsäurerest [57]. Aus *Pinellia ternata* wurde das in **B** dargestellte antimikrobiell wirksame GlcCer isoliert. Das Ceramidgerüst ist durch eine  $\Delta 4$ -*trans*- $\Delta 11$ -*trans*-desaturierte Sphingobase und eine  $\alpha$ -hydroxylierte Fettsäure mit 16 C-Atomen charakterisiert [57].

## 1.2. Enzyme zur Modifizierung des Ceramidgerüsts

Sphingobasen erfahren durch die Einführung funktioneller Gruppen durch Desaturasen, Hydroxylasen und Methyltransferasen eine große strukturelle Variabilität. In Abb. 6 sind einige natürlich vorkommende Sphingobasen dargestellt, die durch derartige Modifikation entstanden sind.



**Abb. 6 Beispiele für natürlich vorkommende Sphingobasen mit ihren Trivialnamen.**

Im Folgenden sollen einige der Enzyme zur Modifikation von einfachen und komplexen Sphingolipiden genauer betrachtet werden.

### 1.2.1. Sphingolipid- $\Delta$ 4-Desaturase

Aus einer Reihe verschiedener Organismen konnten Sphingolipide isoliert werden, die  $\Delta$ 4-*trans*-ungesättigte Sphingobasen aufweisen. Gene für Sphingolipid- $\Delta$ 4-Desaturasen wurden bisher aus *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* und *Homo sapiens* identifiziert und durch heterologe Expression in *S. cerevisiae sur2* charakterisiert [63,64]. Die Existenz eines entsprechenden Gens in *S. cerevisiae* konnte nicht nachgewiesen werden [53].

In Säugern erfolgt die  $\Delta$ 4-*trans*-Desaturierung auf der cytosolischen Seite der ER-Membran auf Ceramidebene – freie Sphingobasen und GlcCer werden nicht als Substrat akzeptiert [65-70]. Sphingolipid- $\Delta$ 4-Desaturasen gehören zu den membrangebundenen Desaturasen und benötigen NAD(P)H und Sauerstoff als Kofaktoren. Sie gehören zu einer Superfamilie von Enzymen, die durch drei Histidin-Boxen – HX<sub>3-4</sub>H, HX<sub>2-3</sub>HH und (H/Q)X<sub>2-3</sub>HH – charakterisiert werden [71]. Den Kern des Reaktionszentrums bildet ein Zwei-Eisen-Zentrum, das durch acht Histidin- bzw. Glutaminseitenketten koordiniert wird. Es kann zwischen vier verschiedenen Oxidationszuständen wechseln. Im reaktionsfähigen Zustand befinden sich beide Eisenatome auf der Oxidationsstufe +4 und sind über zwei Sauerstoffatome der Stufe -2 miteinander verbunden (*bis- $\mu$ -oxo-di-ferryl-Zustand*). Durch *syn*-Eliminierung werden den der zukünftigen Doppelbindung benachbarten C-Atomen insgesamt zwei Wasserstoffatome entfernt, die auf eines der beiden gebundenen Sauerstoffatome übertragen und mit diesem zusammen als Wassermolekül abgespalten werden. Dabei geht das Zwei-Eisen-Zentrum in einen Ruhezustand über ( *$\mu$ -oxo-di-ferri-Zustand*). Nach Reaktionsende wird das Zwei-Eisen-Zentrum durch Übertragung zweier Elektronen (von NAD(P)H) auf die Oxidationsstufe +2 reduziert. Durch Aufnahme von zwei Protonen wird ein weiteres Molekül Wasser freigesetzt, das Zwei-Eisenzentrum enthält dann kein Sauerstoffatom mehr (*di-ferro-Zustand*). Durch Aufnahme eines O<sub>2</sub>-Moleküls wird eine Peroxo-Brücke der Oxidationsstufe -1 zwischen den Eisenatomen der Oxidationsstufe +3 gebildet ( *$\mu$ -peroxo-di-ferri-Zustand*), die sich spontan umlagert, wobei sich das Zwei-Eisenzentrum nun wieder im reaktionsbereiten *bis- $\mu$ -oxo-di-ferryl-Zustand* befindet [71-75].

Pflanzliche Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit zu den pilzlichen  $\Delta 4$ -Desaturase-Sequenzen wurden in *A. thaliana* und *Lysopersicon esculentum* gefunden [27]. Eine heterologe Expression in *S. cerevisiae* ist bisher nicht gelungen, da die Hefe möglicherweise den pflanzlichen Desaturasen kein korrektes Substrat bereitstellen kann [27].

### 1.2.2. Sphingolipid- $\Delta 8$ -Desaturase

Wie die  $\Delta 4$ -Desaturierung konnte auch keine  $\Delta 8$ -Desaturierung in Sphingolipiden aus *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Aus Pilzen wie *Pichia pastoris*, *Rhynchosporium secalis*, *Saccharomyces kluveri* und *Klyuveromyces lactis* konnten nur die *trans*-isomeren Formen  $\Delta 8$ -ungesättigter Sphingobasen isoliert werden [76-78], wohingegen für pflanzliche Sphingolipide eine Mischung aus *cis*- und *trans*-Isomeren charakteristisch ist. Die Gene pilzlicher  $\Delta 8$ -Desaturasen wurden aus *Klyuveromyces lactis* und *P. pastoris* isoliert und durch heterologe Expression in *S. cerevisiae* charakterisiert [78,79]. Pflanzliche Gene, die für  $\Delta 8$ -Desaturasen codieren, wurden aus *A. thaliana*, *Brassica napus*, *Helianthus annuus* und *Borago officinalis* funktionell charakterisiert [80-82]. Die heterologe Expression in *S. cerevisiae* ergab die für Pflanzen charakteristischen *cis*- und *trans*-Isoformen von 4-Hydroxysphing-8-enin mit einer Kettenlänge von sowohl 18 als auch 20 C-Atomen [27]. Dies deutet darauf hin, dass die Enzyme nicht stereoselektiv und kettenlängenunabhängig sind und 4-Hydroxysphinganine als Substrat verwenden [27]. Bei der heterologen Expression der  $\Delta 8$ -Desaturase aus *Aquilegia vulgaris* in *S. cerevisiae* Wildtyp und *S. cerevisiae sur2* verwendete das Enzym neben 4-Hydroxysphinginin auch Sphinginin als Substrat [84]. Die Spezifität und Selektivität weiterer pflanzlicher und pilzlicher  $\Delta 8$ -Desaturasen muss noch aufgeklärt werden [27]. In Abhängigkeit von der Ursprungspflanze konnten zudem verschiedene *E/Z*-Verhältnisse zwischen 3:1 und 7:1 beobachtet werden [27].

Ebenso wie die Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase sind auch die  $\Delta 8$ -Desaturasen membrangebunden und zeigen die charakteristischen Histidin-Boxen  $HX_{3-4}H$ ,  $HX_{2-3}HH$  und  $(H/Q)X_{2-3}HH$ . Außerdem besitzen sie eine Cytochrom *b<sub>5</sub>*-Domäne, die mit dem *N*-terminalen Ende der Desaturase fusioniert ist [73]. Der grundlegende Reaktionsmechanismus ist dem der  $\Delta 4$ -Desaturasen ähnlich, unterscheidet sich aber im Angriff auf die Wasserstoffatome. Bei *trans*-Isomeren geht man von einem Angriff am C8 in *anti*-Orientierung aus, während man für die *cis*-Isomere einen Angriff am C9 in *gauche*-Orientierung annimmt [27].

### 1.2.3. Sphingolipid-C4-Hydroxylase

Neben der Möglichkeit der  $\Delta 4$ -Desaturierung besitzen Pflanzen, Pilze und Tiere ebenfalls die Möglichkeit der C4-Hydroxylierung, wobei das Produkt der Reaktion 4-Hydroxysphingonin ist. *S. cerevisiae* besitzt keine Sphingolipid-Desaturasen, ist aber in der Lage, hydroxylierte Sphingolipide zu synthetisieren [53]. Das Hydroxylasegen *SUR2* wurde aus *S. cerevisiae* kloniert und als nicht essentiell erkannt [31,32]. Ebenso wie die Sphingolipid-Desaturasen gehört die Sphingolipid-C4-Hydroxylase zu den membrangebundenen Enzymen mit den drei charakteristischen Histidinboxen [71,74]. Der Reaktionsmechanismus ist ähnlich, jedoch erfolgt der Übergang des Reaktionszentrums in den  $\mu$ -*oxo-di-ferri*-Zustand nicht durch *syn*-Eliminierung der benachbarten Wasserstoffatome mit anschließender Abgabe eines Wassermoleküls, sondern durch Integration eines der beiden im Eisenzentrum befindlichen Sauerstoffatome in die neu gebildete Hydroxygruppe [85]. *C. albicans* besitzt ein bifunktionales Enzym, welches Ceramide an der C4-Position sowohl desaturieren als auch hydroxylieren kann [86]. In Säugern erfolgt die C4-Hydroxylierung durch eine bifunktionale Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase/C4-Hydroxylase [63]. Hydroxylierte Sphingobasen sind zum Beispiel Bestandteil der IPCs. Aus *A. thaliana* wurden zwei C4-Hydroxylasegene identifiziert und charakterisiert [87]. Der größte Teil der in Pflanzen synthetisierten hydroxylierten Sphingolipide wird zusätzlich *cis/trans*- $\Delta 8$ -desaturiert [88]. Die Substratspezifität der C4-Hydroxylase ist bisher noch nicht geklärt [89,90].

### 1.2.4. Sphingolipid-C9-Methyltransferase

Aus einigen Pilzen und niederen Meerestieren konnten Cerebroside isoliert werden, die neben Desaturierungen und/oder Hydroxylierungen eine zusätzliche Methylverzweigung an der C9-Position aufweisen [57]. Diese konnten in Pflanzen und höheren Tieren nicht nachgewiesen werden. Eine erste Sphingolipid-C9-Methyltransferase wurde aus *P. pastoris* kloniert und durch heterologe Expression in *S. cerevisiae* charakterisiert [79]. Die C9-Methyltransferase-Deletionsmutante ist nicht letal [79]. Sphingolipid-C9-Methyltransferasen gehören zu den S-Adenosylmethionin(SAM)-abhängigen Methyltransferasen, die an der Regulation einer Reihe biologischer Funktionen wie Proteinexpression, Signaltransduktion und Metabolismus kleiner Moleküle beteiligt sind [79,91]. SAM-abhängige Methyltransferasen zeigen ein gemeinsames Faltungsmuster: ein  $\alpha/\beta$ -*sandwich*, bestehend aus annähernd parallelen  $\beta$ -Faltblättern, die von

$\alpha$ -Helices flankiert werden [92,93]. Eine biochemische Charakterisierung der Sphingolipid-C9-Methyltransferase steht noch aus.

### 1.2.5. Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylase

Pflanzliche und pilzliche Sphingolipide enthalten gewöhnlich  $\alpha$ -hydroxylierte Fettsäuren [53]. Aus *S. cerevisiae* wurde ein nichtessentielles Fettsäurehydroxylasegen (*SCS7*) identifiziert und charakterisiert [31,95]. Das resultierende Protein, Scs7p, besitzt sowohl eine Cytochrom *b*<sub>5</sub>- als auch eine Hydroxylase/Desaturase-Domäne, die ebenfalls die charakteristischen Histidinboxen aufweist [31,96]. *A. thaliana* besitzt zwei ähnliche Gene, von denen ein erstes bereits als Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylasegen identifiziert wurde [95]. Das zweite Gen sowie Hydroxylasegene aus weiteren Pflanzen sowie Pilzen müssen noch funktionell charakterisiert werden [53]. In *S. cerevisiae* dienen sehr langkettige Fettsäuren (VLCFA) als Substrat für die SCS7, aber ihre Homologen in anderen Pilzen akzeptieren auch Fettsäuren mit 16 oder 18 C-Atomen [54]. Da die pflanzliche Ceramidsynthese keine hydroxylierten Fettsäuren akzeptiert, erfolgt die Hydroxylierung wahrscheinlich nicht an freien oder aktivierten Fettsäuren sondern auf der Ebene von Ceramiden oder komplexer Sphingolipide [16,97].

### 1.3. Funktionen von Sphingolipiden in Pflanzen und Pilzen

Obwohl bisher nur wenige Funktionen von Sphingolipiden aufgeklärt wurden, ist bekannt, dass sie eine wichtige Rolle als Strukturkomponenten von Membranen, in der Zell-Zell-Erkennung und als bioaktive Moleküle in Signaltransduktionswegen und der Zellregulation erfüllen [98]. Die im folgenden Abschnitt aufgeführten Sphingolipidfunktionen sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2 Zusammenfassung der Sphingolipidfunktionen in Pilzen und Pflanzen

Sphingolipid	Funktion
Sphingobase	<p>→ Regulatoren von Protein-Kinasen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Wachstum</li> <li>• Endocytose</li> <li>• Membranbildung</li> <li>• Actincytoskelettbildung</li> </ul> <p>→ Hitze-, pH-, osmotischer Stress</p>
Sphingosin-1-phosphat	<p>in Pflanzen:</p> <p>→ ABA-vermittelte Signaltransduktion</p> <p>→ Regulation des Spaltöffnungsapparates:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ionenkanalaktivität</li> <li>• Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung</li> </ul> <p>in Pilzen und Pflanzen:</p> <p>→ Signaltransduktion (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Apoptose</li> <li>• Zellproliferation und -differenzierung</li> </ul>
Ceramid	<p>→ Stress- und Abwehrsituationen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Modulation der Apoptose</li> </ul> <p>→ Zelldifferenzierung</p> <p>→ wahrscheinlich Transport GPI-verankerter Proteine vom ER zum Golgi</p>
GlcCer	<p>in Pilzen:</p> <p>→ Induktion der Fruchtbildung</p> <p>→ Keimung</p> <p>→ Hyphenwachstum</p> <p>→ Zellwandsynthese</p> <p>→ Knospung</p> <p>→ Interaktion auf Membranoberfläche</p> <p>in Pflanzen:</p> <p>→ Kältetoleranz</p> <p>→ Elicitoren bei Phytopathogen-Befall</p>
Glycophosphosphingolipide	<p>in Pilzen:</p> <p>→ Interaktion auf Membranoberfläche</p> <p>in Pilzen und Pflanzen:</p> <p>→ Signaltransduktion</p>

### 1.3.1. Pilzliche Sphingolipide

Eine der ersten nachgewiesenen Funktionen von Sphingolipiden betrifft die Fähigkeit zur Induktion der Fruchtbildung bei *Schizophyllum commune* durch GlcCer [99]. Durch Strukturanalyse verschiedener GlcCer-Spezies wurde herausgefunden, dass eine *cis*- oder *trans*- $\Delta$ 8-Doppelbindung essentiell für diese Induktion ist, eine  $\Delta$ 4-Doppelbindung jedoch nicht [99-102]. Fettsäurereste mit zunehmender Kettenlänge führten zu einem Aktivitätsverlust (GlcCer mit C<sub>24</sub>-C<sub>26</sub>-Fettsäureresten sind inaktiv), während weder die Kopfgruppe (Glucose) noch die C9-Methylverzweigung einen Einfluss hatten [99-102]. Es wurde angenommen, dass die Induktion mittels GlcCer über einen hemmenden Effekt auf die replikative DNA-Polymerase erfolgt [103]. Zur Aufklärung der Funktion von GlcCer in Bezug auf pilzliche Entwicklungszyklen wurde eine Reihe von Versuchen mit GCS-Hemmstoffen und antiGlcCer-Antikörpern durchgeführt, die eine deutliche Veränderung der morphologischen Eigenschaften zur Folge hatten [104-108]. So konnten Levery et al. die Konzentration von GlcCer durch den Einsatz der GlcCer-analogen GCS-Inhibitoren *D-threo*-1-Phenyl-2-Palmitoyl-3-Pyrridinopropanol (P4) und *D-threo*-3',4'-Ethyldioxy-P4 in *Aspergillus fumigatus* deutlich herabsetzen und zeigen, dass die Keimung und das hyphale Wachstum dabei stark gehemmt werden [104]. Rodrigues et al. isolierten aus den Seren von Cryptococcosis-Patienten Antikörper gegen ein GlcCer aus *Cryptococcus neoformans*, dessen Ceramidgerüst aus 9-Methylsphinga-4,8-dienin und  $\alpha$ -Hydroxyoctadecansäure besteht [106]. Durch Behandlung von verkapselten und kapsellosen *C. neoformans*-Stämmen mit diesen Antikörpern wurde eine Hemmung des Zellwachstums und der Knospung erreicht [106]. Diese Ergebnisse und die Beobachtung, dass GlcCer hauptsächlich an der Knospungsseite in der Zellwand sich teilender Zellen akkumulieren, zeigen, dass GlcCer eine wichtige Rolle bei der Zellwandsynthese und Knospung spielen [106].

In Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass GlcCer eine wichtige Rolle beim intrazellulären Transport des Schlüsselenzyms des Melaninstoffwechsels spielen [109]. Da eine Reihe pathogener Pilze, z.B. *Magnaporthe grisea*, *Ustilago maydis*, *Blastomyces dermatitidis* und *Monosporascus cannonballus*, ebenfalls Melanin-Pigmentierungen enthalten, die möglicherweise mittel- oder unmittelbar mit ihrer Pathogenität zusammenhängen, bieten diese Organismen eine Grundlage zur Aufklärung der Beteiligung von GlcCer an intrazellulären Transportvorgängen [110-114].

GlcCer erfüllen zudem eine wichtige Funktion bei Wirt-Pathogen-Interaktionen. Thevissen et al. zeigten, dass das pflanzliche Defensin Rs-AFP2 und das insektoide Defensin Heliomicin bei *in vitro*-Assays an GlcCer aus *C. albicans* bzw. *P. pastoris* binden. Die entsprechenden *gcs*-Deletionsmutanten der beiden Hefen sind resistent gegen diese Defensine [115]. Da Heliomicin keine Wirkung auf humane GlcCer hat, wird angenommen, dass die Struktur der GlcCer entscheidend für die Erkennung und Bindung ist [115]. Struktur und Wirkungsmechanismus von Defensinen werden in Abschn. 1.2.3. genauer erläutert.

Auch die Hefe *S. cerevisiae*, die keine GlcCer besitzt, ist sensitiv gegenüber einem pflanzlichen Defensin, dem Dm-AMP1 aus *Dahlia merckii* [116]. Durch einen Komplementationsansatz wurde *IPT1* als Sensitivität-bestimmendes Gen identifiziert [116]. *IPT1* codiert für eine Inositolphosphoryltransferase, die den letzten Schritt der Biosynthese von Mannosyldiinositolposphorylceramid (M(IP)<sub>2</sub>C) aus Mannosylinositolphosphorylceramid (MIPC) katalysiert [117]. *ipt1*-Deletionsmutanten enthalten kein M(IP)<sub>2</sub>C, binden signifikant weniger Dm-AMP1 und sind Defensin-resistent [116,118]. Da diese Mutanten auch gegen das bakterielle Syringomycin aus *Pseudomonas syringae* resistent sind, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass M(IP)<sub>2</sub>C als Zielmolekül für antimykotische Agenzien wirken könnte [53,119]. Ein weiteres Gen der IPC-Biosynthese, *IPCI*, codiert die Inositolphosphorylceramidsynthase, die für die Melanin-Biosynthese in *C. neoformans* und das polarisierte Zellwachstum in *A. nidulans* benötigt wird [120,121].

Die Funktion von Sphingolipiden als Signalmoleküle wurde unter Hitze-, pH- und osmotischen Stresssituationen in *S. cerevisiae* gut charakterisiert [122]. Erfolgt z.B. eine Umstellung der Wachstumstemperatur von 23-25°C auf 37-39°C, produziert *S. cerevisiae* die 2-3-fache Menge Sphinganin (d18:0) und 4-Hydroxysphinganin (t18:0), die Konzentration von d20:0 und t20:0 steigt sogar um mehr als das 100-fache [89,90]. Die entsprechenden phosphorylierten Metabolite steigen um das 5-8-fache [123]. Zudem konnte eine 3-fache Erhöhung der Ceramidkonzentration gemessen werden, die jedoch unter osmotischem Stress oder bei geringen pH-Werten nicht beobachtet wurde [89,90,124]. Eine typische Reaktion der Zellen auf Hitzestress ist die Sphingolipid-abhängige Akkumulation von Trehalose, deren Mechanismus noch nicht im Detail aufgeklärt ist [89]. Nach dem Hitzeschock wird die Zellzyklusphase G1 durch Regulation des Cyclins Cln3p durch Sphingobasen aufrechterhalten [125,126]. Sphinganin und/oder 4-Hydroxysphinganin agieren auch als Regulatoren von Proteinkinasen, die einen direkten Einfluss auf Wachstums-, Endocytose-, Membranbildungs- und Actincytoskelettbildungsprozesse haben [127-132].

Ceramid wird durch die Ceramidsynthese synthetisiert, die aus den Komponenten Lag1p, Lac1p sowie Lip1p besteht [133, 165]. Lag1p ist nicht essentiell, jedoch ist die gleichzeitige Deletion von *LAG1* und *LAC1* letal. Doppelmutanten lassen sich herstellen, indem die Letalität durch die Anwesenheit von YPC1 und YDC1 unterdrückt wird [133]. Die Überexpression von *LAG1* führt bei mäßiger Expression zur Erhöhung der Lebensdauer von *S. cerevisiae* im Vergleich zu Wildtypzellen, verkürzt diese aber bei hoher Expression [133]. Jiang et al. postulieren, dass kleine Veränderungen im Ceramid/Sphingolipid-Metabolismus entscheidend für die Lebensdauer der Hefezellen sind, wobei Lag1p eine entscheidende Rolle spielt [133]. Ceramid ist wahrscheinlich essentiell für den Transport von GPI-verankerten Proteinen vom ER zum Golgi und in Prozessen der Zelldifferenzierung involviert [134-136], während Sphingosin-1-phosphat unter anderem als Signalmolekül in apoptotischen Prozessen wirkt [137]. Beide Moleküle bilden einen Rheostat (Abb. 7) und entscheiden über Leben und Tod der Zelle [137].

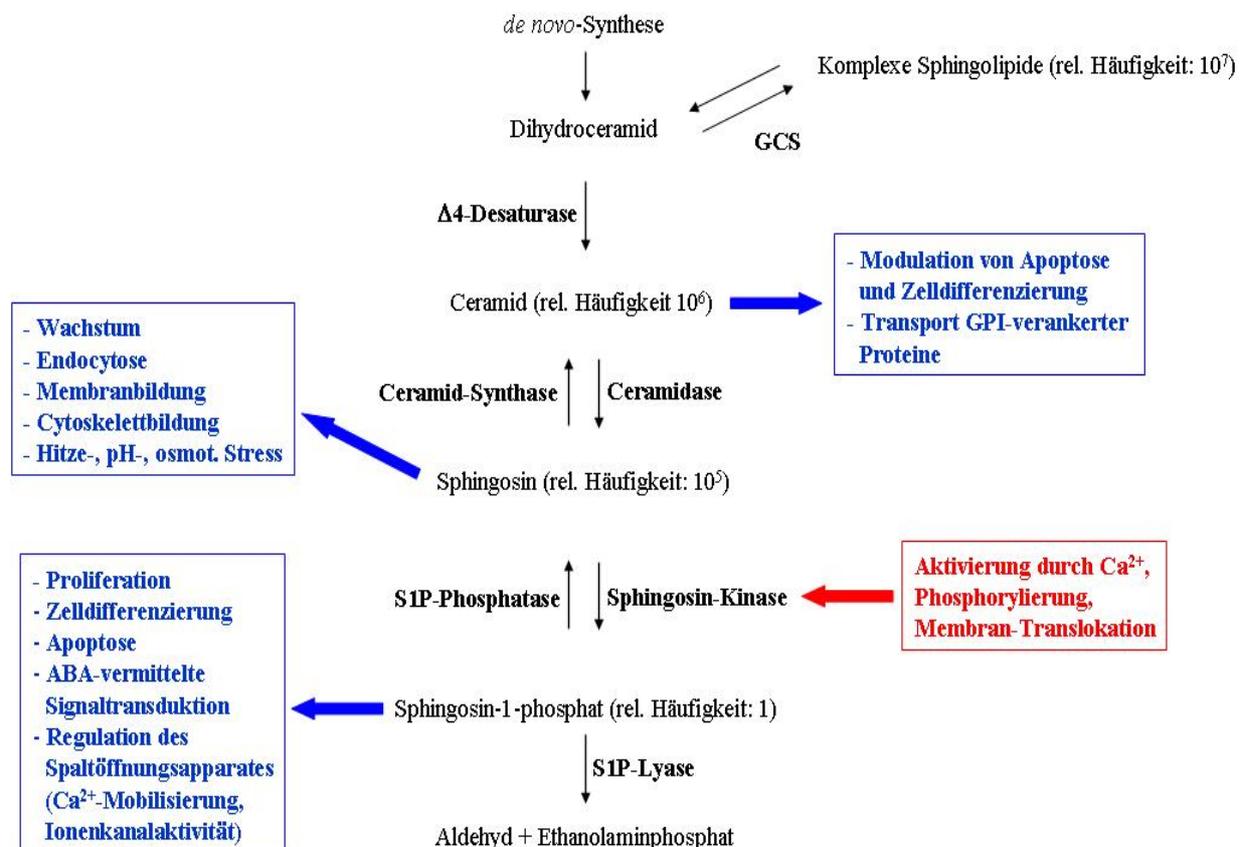


Abb. 7 Schematische Darstellung des Ceramid/Sphingosin-1-phosphat-Rheostats unter Berücksichtigung der bisher bekannten Sphingolipidfunktionen.

### 1.3.2. Pflanzliche Sphingolipide

Obwohl bereits in den 1950er Jahren komplexe Glycophosphosphingolipide im Gewebe von Samen entdeckt wurden, entwickelte sich erst mit der Erkenntnis, dass das einfache Sphingolipid GlcCer eine wichtige Komponente der Plasmamembran und des Tonoplasten ist, ein stärkeres Interesse an der Aufklärung von Sphingolipidstrukturen und -funktionen in Pflanzen [47,98,138-140]. Pflanzliche GlcCer sind häufig mehrfach hydroxyliert [141] und zeigen ein ungewöhnliches physikalisches Verhalten [142-144]. Man nimmt an, dass diese GlcCer die Membran stabilisieren und die Durchlässigkeit für Ionen reduzieren [47,145]. GlcCer werden auch als Induktoren für die laterale Phasentrennung der Membranen bei niedrigen Temperaturen angesehen [146] und spielen eine wichtige Rolle bei der Kältetoleranz von Pflanzen [147-149]. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil von GlcCer in den Membranen kältetoleranter Pflanzen geringer ist als in kältesensitiven und dass sich die Zusammensetzung der molekularen GlcCer-Spezies zwischen toleranten und sensitiven Pflanzen unterscheidet [148,150,151]. So findet man bei Pflanzen, die an kalte Standorte angepasst sind, einen größeren Anteil von GlcCer mit C4-hydroxylierten und *cis*- $\Delta$ 8-desaturierten Sphingobasen, die mit einfach ungesättigten, sehr langkettigen Hydroxyfettsäuren verbunden sind [88,148,150,152-154]. Ein besonderes Interesse liegt derzeit in der Aufklärung der Beteiligung von GlcCer an Pflanzen-Pathogen-Interaktionen (siehe auch Abschn. 1.2.3.). Kommen Pflanzen in Kontakt mit Pathogenen, werden chemische und physikalische Barrieren generiert, die als hypersensitive Antwort bezeichnet werden [155]. Moleküle, die diese Reaktion auslösen, werden als Elicitoren bezeichnet. Koga und Umemura et al. zeigten, dass zwei GlcCer aus dem pathogenen Pilz *M. grisea* als Elicitoren bei dem hypersensitiven Zelltod und der Akkumulation von Phytoalexin in Reispflanzen wirken [155,156]. Es ist wahrscheinlich, dass  $\text{Ca}^{2+}$  in die dabei ausgelösten Signalkaskaden involviert ist [156].

Ein wichtiges phosphoryliertes Sphingolipid ist das Sphingosin-1-phosphat (S1P). S1P wirkt sowohl als intrazelluläres Botenmolekül als auch in exogener Form als Ligand für eine Familie von fünf G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (S1PR<sub>1-5</sub>) [157,158]. Durch die Bindung an diese Rezeptoren werden Signaltransduktionswege aktiviert, die sowohl Prozesse der Apoptose als auch der Zellproliferation regulieren [137,157-160] (Abb. 7). Intrazellulär spielt S1P eine wichtige Rolle in der Abscisinsäure-vermittelten Signaltransduktion zur Regulation der Aktivität des Spaltöffnungsapparates [161] (Abb. 7). Durch S1P wird sowohl die Öffnung

der Schließzellen als auch die Ionenkanalaktivität und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in den Nebenzellen des Spaltöffnungsapparates reguliert [162,163].

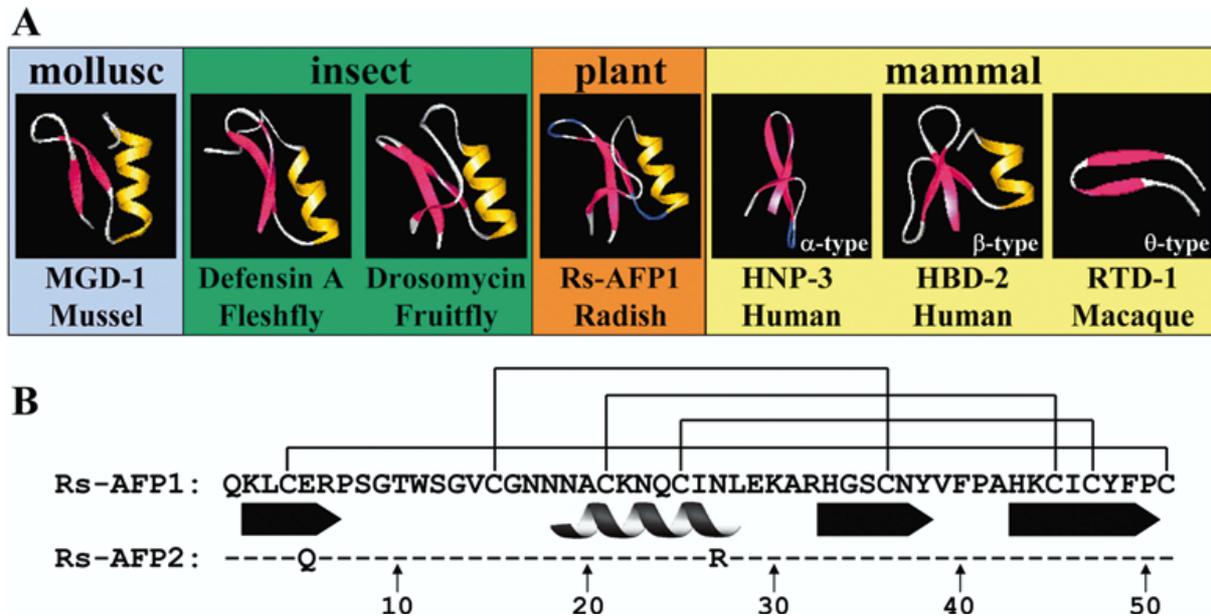
Während Ceramide und verwandte Derivate eine wichtige Funktion als bioaktive Moleküle bei der Signaltransduktion in menschlichen Zellen haben [164], sind entsprechende Funktionen in pflanzlichen Zellen noch nicht sehr gut charakterisiert. Es ist jedoch bekannt, dass das Verhältnis zwischen Ceramid und seinem phosphorylierten Derivat Ceramid-1-phosphat (C1P) entscheidend für die Modulation des programmierten Zelltods in Abhängigkeit von Abwehr- und Stressreaktionen in Pflanzen ist [165]. Ceramidkinase-defiziente *Arabidopsis*-Mutanten besitzen kein C1P und reagieren bei Zugabe von zusätzlichem Ceramid durch Akkumulation von endogenem Ceramid. Diese Akkumulation führt zu einer verstärkten Ausprägung von Krankheitssymptomen nach Pathogenbefall und erst spät in der Entwicklung zu einem Apoptose-ähnlichen Zelltod [166].

Zu den komplexen GIPC zählen z. B. die IPCs. Diese sind zum einen Bestandteile des Lipidankers der GIPC-verankerten Proteine [167-170], zum anderen in glycosylierter Form (GIPC) in *lipid rafts* angereichert und in der Signaltransduktion involviert [171]. Die Analyse pflanzlicher IPCs zeigte, dass diese fast ausschließlich  $\alpha$ -Hydroxyfettsäurereste mit einer Kettenlänge von 22-24 C-Atomen und C4-hydroxylierte Sphingobasen besitzen [56]. Komplexen Glycophosphosphingolipiden werden außerdem wichtige Funktionen in molekularen Erkennungsprozessen und Interaktionen auf der Zelloberfläche zugesprochen, die aber noch nachgewiesen werden müssen.

### 1.3.3. Defensine - Bestandteile des Abwehrmechanismus der angeborenen Immunität

Im Laufe der Zeit haben alle lebenden Organismen Mechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen, sich gegen Angriffe von Pathogenen zu verteidigen. Die adaptive Immunantwort ist der am weitesten entwickelte Mechanismus und nutzt Antikörper und Killerzellen, um körperfremde Substanzen zu erkennen und zu eliminieren. Diese Möglichkeit der Abwehr beschränkt sich jedoch auf höhere Vertebraten [172]. Neben der adaptiven Immunität existiert mit dem Mechanismus der angeborenen Immunität eine phylogenetisch alte Verteidigungsstrategie, die unter anderem die Bildung antimikrobieller Peptide einschließt [173]. Diese Moleküle besitzen zwar nicht die Fähigkeit der spezifischen Antigenerkennung wie Antikörper, können nach erfolgter Infektion aber relativ schnell und mit weniger Aufwand an Energie und Biomasse produziert werden [174]. Obwohl die

angeborene Immunantwort der Pflanzen als primitiv betrachtet wird, kann sie auf verschiedene Mikroorganismen unterschiedlich reagieren [175]. Nur eine Klasse von Peptiden der angeborenen Immunität scheint sowohl bei Pflanzen als auch bei Invertebraten und Vertebraten konserviert zu sein – die Defensine (Abb. 8).



**Abb. 8 Strukturvergleich der Defensine aus Pflanzen, Invertebraten und Vertebraten.** **A** zeigt die dreidimensionalen Strukturen von Defensinen aus Invertebraten (Mollusk, Insekt), Pflanzen und Vertebraten (Säuger). Die  $\alpha$ -Helices sind gelb, die  $\beta$ -Faltblätter rot dargestellt. **B** zeigt die Aminosäuresequenzen der pflanzlichen Defensine Rs-AFP1 und Rs-AFP2 im Vergleich. Die Striche in Rs-AFP2 stehen für identische Aminosäurereste. Die Verbindungslinien zwischen Cysteinresten symbolisieren die Disulfidbrücken im Peptid. Die sekundären Proteinstrukturen sind als Pfeile ( $\beta$ -Faltblätter) bzw. Spirale ( $\alpha$ -Helix) den entsprechenden Aminosäureresten zugeordnet [174].

Die ersten pflanzlichen Defensine wurden zu Beginn der 1990er Jahre aus Weizen und Gerste isoliert und aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den bereits beschriebenen Thioninen zunächst als  $\gamma$ -Thionine bezeichnet [176,177]. Nachfolgende Untersuchungen zeigten keine Verwandtschaft zwischen  $\gamma$ -Thioninen und Thioninen, jedoch eine strukturelle Ähnlichkeit zu Defensinen aus Insekten und Säugern, so dass sich die Bezeichnung pflanzliche Defensine durchsetzte [178,179]. Pflanzliche Defensine sind kleine (45-54 Aminosäuren), stark basische, Cysteinreiche Peptide, die ubiquitär im Pflanzenreich auftreten. Alle bisher identifizierten pflanzlichen Defensine sind durch acht Cysteinreste gekennzeichnet, die vier stabilisierende

Disulfidbrücken bilden [174]. Die dreidimensionalen Peptidstrukturen enthalten je drei  $\beta$ -Faltblätter mit einer dazu parallelen  $\alpha$ -Helix in Form eines Cystein-stabilisierten  $\alpha$ -Helix/ $\beta$ -Faltblatt-Motifs ( $CS\alpha\beta$ ) [180] (Abb. 8). Die Anordnung dieser Sekundärstrukturen ist  $\beta\alpha\beta\beta$  und charakteristisch für pflanzliche Defensine [174]. In Insekten-Defensinen findet man in der Regel eine  $\alpha$ -Helix, die mit einem doppelsträngigen  $\beta$ -Faltblatt kombiniert ist und durch drei Disulfidbrücken stabilisiert wird [180,181]. Davon abweichend zeigen die beiden Pathogen-induzierten Peptide Drosomycin und Heliomicin (isoliert aus *Drosophila melanogaster* bzw. *Heliothis virescens*) eine Kombination aus drei  $\beta$ -Faltblättern und einer  $\alpha$ -Helix, die durch drei (Heliomicin) bzw. vier (Drosomycin) Disulfidbrücken stabilisiert werden (Abb. 8) [182-184]. Aus Mollusken wurden Defensine sowohl mit drei (*Mytilus edulis*) als auch mit vier Disulfidbrücken (MGD-1 aus *M. galloprovincialis*) identifiziert (Abb. 8) [185-187]. In Säugern sind bisher drei Typen von Defensinen bekannt (Abb. 8). Das 18 Aminosäuren große, cyclische Peptid RTD-1, das bisher nur in Makaken nachgewiesen wurde, wird  $\theta$ -Defensin genannt [188,189]. Die beiden anderen Gruppen werden als  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Defensine bezeichnet und unterscheiden sich in der Anzahl und Anordnung der Cysteine in der Aminosäuresequenz [190,191]. Defensine der  $\alpha$ -Klasse besitzen keine  $\alpha$ -Helix und somit auch kein  $CS\alpha\beta$ -Motif [192,193]. Die Faltungsstruktur der Defensine der  $\beta$ -Klasse ist  $\alpha\beta\beta\beta$  ( $\beta\alpha\beta\beta$  für pflanzliche Defensine), wird jedoch durch die N-terminale Anordnung der  $\alpha$ -Helix ebenfalls nicht zu den  $CS\alpha\beta$  gezählt [194-196]. Basierend auf den dreidimensionalen Peptidstrukturen ist die Verwandtschaft zwischen pflanzlichen, Insekten- und  $\beta$ -Defensinen höher als zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensinen [174].

Die Familie der pflanzlichen Defensine zeigt eine große Vielfalt sowohl bezogen auf die Aminosäuresequenzen als auch auf ihre biologische Aktivität [197-200]. Einige Defensine haben antibakterielle oder antimykotische Eigenschaften, während andere keine Wirkung in entsprechenden *in vitro*-Testsystemen zeigten [174]. Bei einigen pflanzlichen Defensinen wurde eine Inhibition der  $\alpha$ -Amylase-Aktivität und der Proteinsynthese nachgewiesen, was auf die Abwehr gegen pflanzenfressende Insekten deutet. Diese Defensine zeigen jedoch keine antimykotische Aktivität [176,177,197,201,202].

Die meisten antimykotisch wirkenden Defensine zeigen bei Erhöhung der Kationen-Konzentration im Medium eine Reduktion dieser Wirkung [197,203-205]. Dies deutet auf eine elektrostatische Interaktion zwischen Defensin und Zielmolekül [198]. Zur Aufklärung

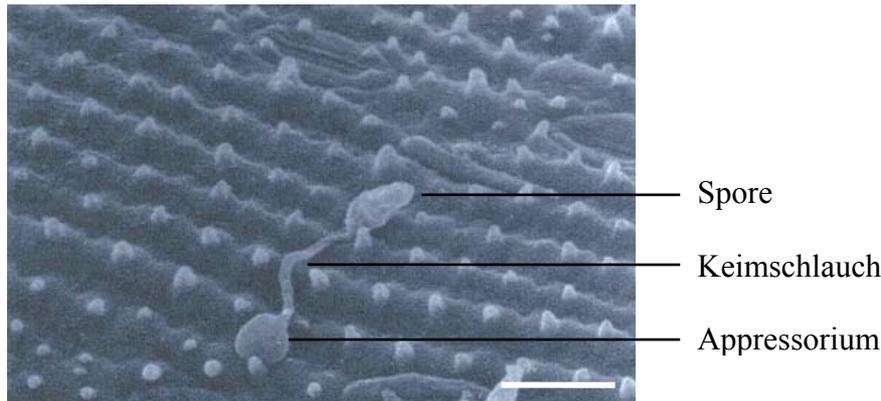
der antimikrobiellen Aktivität von kationischen Peptiden, zu denen auch die Defensine gehören, wurden zwei Modelle entwickelt. Das erste postuliert die Bildung einer multimeren Pore in der mikrobiellen Membran, wobei in einem ersten Schritt eine Bindung der kationischen Moleküle an negativ geladene (Phospho)Lipide der Membran erfolgt. Daran schließt sich die Einlagerung des Moleküls in die Membran und die Bildung einer multimeren Pore in einer spannungsabhängigen Reaktion an [190,205-209]. Das zweite Modell postuliert die Bindung in Form von Monomeren an negativ geladene Lipid-Kopfgruppen der mikrobiellen Membran, wobei die gesamte Membran abgedeckt wird. Diese Neutralisation der anionischen Lipid-Kopfgruppen führt anschließend zur Störung der Membranintegrität und ermöglicht den Eintritt von Ionen und größeren Molekülen in die Zelle [194,210,211]. Zunehmend wird auch die Hypothese diskutiert, dass die antimikrobielle Wirksamkeit nicht nur auf die Erhöhung der Permeabilität zurückzuführen ist, sondern möglicherweise zusätzlich intrazelluläre Zielmoleküle vorhanden sind [212,213]. Durch Bindung der kationischen Peptide an diese Zielmoleküle ist ein Einfluss auf intrazelluläre Vorgänge, wie z.B. Proteinbiosynthese, möglich.

Die Bindung sowohl von Dm-AMP1, isoliert aus *D. merckii*, als auch von Rs-AFP2, isoliert aus *R. sativus*, an Moleküle der äußeren Plasmamembranseite von Pilzen führt u. a. zur Erhöhung des K<sup>+</sup>-Efflux' und der Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme, zur Änderung des Membranpotentials und der Membranpermeabilisation [214,215]. Durch die Entwicklung zweier Rs-AFP2-Varianten (eine mit erhöhter, eine mit geringerer antimykotischer Wirkung) konnte eine direkte Verbindung von Ionenfluss und antimykotischer Wirkung nachgewiesen werden [216]. Der Einsatz radioaktiv markierter Defensine, Hs-AFP1 (aus *Heuchera sanguinea*) und Dm-AMP1, zeigte die Existenz hochaffiner Bindungsstellen an pilzlichen Plasmamembranen [217,218]. Im Gegensatz zu Defensinen aus Säugern und Insekten binden pflanzliche Defensine, die antimykotische Effekte zeigen, nicht direkt an Phospholipide der pilzlichen Membran [214,219]. Für Dm-AMP1 wurden M(IP)<sub>2</sub>C und für Rs-AFP2 GlcCer als Bindungspartner identifiziert [115,118]. Der genaue Mechanismus der Interaktionen und die strukturellen Voraussetzungen der beteiligten Sphingolipide müssen noch geklärt werden. Auch ist bisher nicht bekannt, ob pflanzliche Defensine zudem intrazellulär an Moleküle binden [174]. Sie sind jedoch wichtige Komponenten bei der Verteidigung und könnten zur Generierung von transgenen Getreidepflanzen mit verstärkter Pathogenresistenz beitragen.

### 1.4. Die phytopathogenen Pilze *Magnaporthe grisea* und *Ustilago maydis*

#### 1.4.1. *Magnaporthe grisea*

Reisbrand ist eine Pilzerkrankung, die vor allem bei Reispflanzen verbreitet ist und jährlich Verluste in Höhe von 10-30% der gesamten Reisernte verursacht. Der Erreger dieser auch bei Hirse- und Weizenpflanzen auftretenden Erkrankung ist der filamentöse Ascomycet *Magnaporthe grisea* [220-226]. Die Übertragung auf andere Pflanzen erfolgt in Form von in Tautropfen befindlichen Konidiosporen [227]. Die Infektion beginnt mit dem Kontakt zwischen der asexuellen Konidiospore von *M. grisea* und der Blattoberfläche der Wirtspflanze. Die Spore heftet sich an die Kutikula, indem sie eine adhäsive Substanz, die im apikalen Teil der Spore gefunden wurde, freisetzt [227]. Die Keimung erfolgt in Anwesenheit von Wasser innerhalb von 2 Stunden nach dem ersten Kontakt durch Ausbildung eines polarisierten Keimschlauchs, dem die Entwicklung von infektiösen Strukturen, den Appressorien, folgt [228]. Die Appressorienentwicklung ist abhängig von einer harten, hydrophoben Oberfläche und wird durch mehrere Signaltransduktionskaskaden reguliert [112,229]. So wurde gezeigt, dass z.B. cAMP [229-233], MPG1 hydrophobin [234,235], NPR1 (Regulator für die Stickstoffbereitstellung) [236,237] und PTH11 (membranlokalisiertes Protein) [238,239] wichtige Signalmoleküle für die Morphogenese der Appressorien sind. Die kuppelähnlichen Appressorienzellen (Abb. 9) besitzen eine hoch differenzierte Zellwandstruktur, die reich an Chitin ist und durch eine Melaninschicht vom Cytosol abgegrenzt wird. Die Melaninschicht dient unter anderem als Schutz vor UV-Strahlung und toxischen Metaboliten sowie als Antioxidans. Zudem stellt sie ein Virulenzcharakteristikum für eine Vielzahl phytopathogener Pilze dar [228,240,241]. In den Appressorien wird durch osmotisch wirksame Metabolite ein hoher Turgordruck erzeugt, der zur Bildung einer Penetrationsstruktur (enthält große Mengen Mikrofilamente, Filasomen und Mikrotubuli) führt. Diese ermöglicht *M. grisea*, die Kutikula und Epidermiszellen der Wirtspflanze durch Nutzung mechanischer Kräfte zu durchdringen [228,242,243].



**Abb. 9 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Blattoberfläche einer Reisplanze mit dem Reisbranderreger. *M. grisea*** befindet sich im Stadium der Appressorienbildung vor der Penetration der Epidermiszellen [235]. Balken = 20  $\mu\text{m}$

Es konnte gezeigt werden, dass Melanin-defiziente Zellen nicht in der Lage sind, einen ausreichend hohen Turgordruck aufzubauen und somit keine funktionstüchtigen Appressorien ausbilden [243]. Die Melaninschicht bewahrt die Zellen vor einem Efflux osmotisch aktiver Metabolite und ermöglicht so die Ausbildung eines hohen Zelldrucks [113,243]. Sprong et al. zeigten, dass Glycosphingolipid-defiziente Maus-Melanoma-Zellen kein Melanin synthetisieren. Sie führen dies auf eine Störung des Transports des Schlüsselenzyms der Melaninbiosynthese, der Tyrosinase, zurück [109]. Hier ist ein wichtiger Ansatzpunkt zur Klärung der Frage, ob GlcCer auch an der Melaninbiosynthese in *M. grisea* beteiligt sind und welcher Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein bestimmter GlcCer-Spezies und den virulenten Eigenschaften von *M. grisea* besteht.

#### 1.4.2. *Ustilago maydis*

*U. maydis* ist ein Hemibasidiomycet, der ausschließlich Maispflanzen befällt (Abb. 10) [114]. Er ist ein dimorpher Organismus, der sowohl einzellig als auch in Form echter Hyphen existiert [114].

Während des Lebenszyklus durchschreiten die Zellen sowohl ein nichtpathogenes, haploides als auch ein dikaryotisches Stadium infektiöser Hyphen [114]. Die haploiden Zellen teilen sich durch Knospung und leben saprophytisch. Durch die Fusion kompatibler haploider Zellen entsteht ein Dikaryon, das sich in Form von Hyphen ausbreitet. Die Bildung des Dikaryons wird durch zwei voneinander unabhängige Genloci gesteuert.



**Abb. 10** Mit *U. maydis* infizierter Fruchtstand von Mais. Der phytopathogene Pilz verursacht eine starke Zellteilung, die zur Bildung von Geschwüren an den infizierten Pflanzenteilen führt [114].

Der biallele *a*-Locus enthält sowohl die Sequenz für die Biosynthese spezifischer Lipopeptid-Pheromone als auch die für die Biosynthese von Rezeptoren zur Erkennung der Pheromone des gegensätzlichen Paarungstyps [114,244,245]. Die Fusion haploider Zellen erfolgt nur, wenn sich die betreffenden Zellen in ihrem *a*-Locus und somit in ihren sekretierten Pheromonen unterscheiden. Die Pheromon-Erkennung löst einen G-Protein-gekoppelten Signaltransduktionsweg aus, der zur Bildung von Konjugationsschläuchen (Abb. 11) führt, die in Richtung der Pheromonquellen ausdifferenzieren. Bei der Berührung zweier Schläuche von Zellen mit unterschiedlichem *a*-Locus fusionieren deren Enden [246,247]. Die Zellkerne wandern dabei in das gemeinsame Zytoplasma und bilden ein Dikaryon.



**Abb. 11** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines nach Pheromon-Induktion gebildeten Konjugationsschlauches von *U. maydis* [248]. Balken = 5  $\mu\text{m}$ .

Zu diesem Zeitpunkt findet eine selbst/nicht selbst-Erkennung über den multiallelen *b*-Locus statt. Nur wenn sich die fusionierten Zellen in ihren Loci unterscheiden (bisher sind 25

verschiedene Allele bekannt), werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die die Bildung eines stabilen Dikaryons steuern, das sich filamentös vermehrt und Maispflanzen infizieren kann [114,249,250]. In den infizierten Pflanzenzellen proliferieren die dikaryotischen *U. maydis*-Zellen und führen zur Bildung von Tumoren [114]. Der pathogene Zyklus endet mit der Freisetzung Melanin-haltiger diploider Teliosporen, die durch die Luft verbreitet werden und unter geeigneten Bedingungen mittels Meiose haploide, einzellige Sporidien produzieren [114]. Wie bei *M. grisea* liefert die Aufklärung der Rolle verschiedener GlcCer-Spezies im Melaninstoffwechsel einen entscheidenden Ansatz zur Erforschung phytopathogener Eigenschaften von *U. maydis*.

### **1.5. *Pichia pastoris* als Modellorganismus zur Aufklärung des Sphingolipidmetabolismus in Pilzen**

Viele molekularbiologische Versuchsansätze zur Aufklärung der Funktionsweise eukaryoter Organismen können aufgrund fehlender posttranslationaler Modifikationen nicht in prokaryoten Zellen wie *E. coli* durchgeführt werden. Als Modellorganismus für eukaryotische Stoffwechselvorgänge dient unter anderem die Hefe *S. cerevisiae*, die sich durch ihre einfache Handhabung auszeichnet. Zur Aufklärung des pilzlichen Sphingolipidmetabolismus eignet sich *S. cerevisiae* nur begrenzt, da Enzyme zur Biosynthese von Glycosylceramiden fehlen. Einen ebenfalls einfach zu handhabenden Modellorganismus mit entsprechender Enzymausstattung findet man in der methylophilen Hefe *P. pastoris*. Thevissen et al. zeigten, dass die GlcCer-synthetisierenden Pilze *P. pastoris* und *C. albicans* sensitiv auf die Behandlung mit dem pflanzlichen Defensin Rs-AFP2 reagieren, während die *gcs*-Deletionsmutanten von *P. pastoris* und *C. albicans* sowie *S. cerevisiae* und *S. pombe*, die generell keine GlcCer synthetisieren, resistent gegen dieses Defensin sind [115]. *P. pastoris* bietet damit nicht nur eine geeignete Grundlage zur Aufklärung des Sphingolipidbiosyntheseweges in Pilzen, sondern liefert auch Informationen zu den Funktionen von GlcCer bei der Pflanze-Pathogen-Interaktion.

### **1.6. *Arabidopsis thaliana* als pflanzlicher Modellorganismus**

Seit Mitte der 1970er Jahre wurden verschiedene Methoden zur Pflanzen-Transformation entwickelt, unter anderem Elektroporation, Mikroinjektion und Partikelbeschuss mit DNA-

beschichteten Goldpartikeln [251]. Am weitesten verbreitet ist jedoch die Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* [251]. Diese Form der Übertragung genetischen Materials geschieht auch auf natürlichem Weg [252]. *Agrobacterium tumefaciens* ist ein Bodenbakterium, das ein definiertes Fragment seiner eigenen DNA, die so genannte T-DNA, in das Genom von Dikotyledonen einfügen kann, wodurch die Pflanze Tumore ausbildet, die als Lebensgrundlage der Agrobakterien dienen [253]. Die T-DNA codiert zum einen Enzyme zur Synthese von pflanzlichen Hormonen, welche das Wachstum des Tumors stimulieren, und zum anderen Enzyme zur Synthese von Opinen, besonderen Peptiden, die *Agrobacterium* als Nährstoffe dienen [254]. Die Integration der T-DNA erfolgt nicht gezielt und ist unabhängig von der Sequenz der codierenden Teile [254]. Die zur Integration notwendigen Sequenzen flankieren den codierenden Bereich rechts und links und enthalten so genannte *microsimilarities*. Diese kleinen Sequenzabschnitte sind 3-5 bp groß und ermöglichen die Integration an jeder beliebigen Stelle im Genom [254]. Eine weitere wichtige Struktur sind T-reiche Regionen [254]. Der eigentliche Integrationsmechanismus wird als NHEJ (*Non-Homologous End Joining*) bezeichnet und ist ein Mechanismus, der Doppelstrangbrüche sequenzunabhängig repariert [254]. Die Ligase IV ist eine spezifische Ligase, die an diesem Reparaturmechanismus beteiligt ist [254].

Bis heute ist es nicht möglich, T-DNA gezielt in das Wirtsgenom zu integrieren [254]. Es ist jedoch möglich, Sammlungen transformierter Pflanzen zu erstellen. Bei einer großen Anzahl unabhängiger Transformanten ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die T-DNA wenigstens einmal in jedes Gen integriert [254]. Die entstandenen Disruptionsmutanten besitzen möglicherweise bereits einen auffälligen Phänotyp und müssen molekularbiologisch analysiert werden [254]. Solche Sammlungen existieren z. B. für *A. thaliana*. Diese *Brassicaceae* ist eine der wenigen vollständig durchsequenzierten Pflanzen. Durch die relativ einfache Handhabung der Pflanze und den Zugang zur vollständigen genomischen Sequenz ist es möglich, die Funktionen der mehr als 25000 Gene zu identifizieren. Das *Salk Institute Genome Analysis Laboratory* (SIGnAL) hat eine Methode etabliert, die T-DNA-Insertionsstellen von umfangreichen Mutantensammlungen zu identifizieren [255]. Die Bereitstellung der Mutanten mit den ansequenzierten T-DNA-Insertionsstellen erfolgt im Internet (<http://signal.salk.edu>). Durch Sequenzvergleiche der Insertionsstellen mit den zu untersuchenden Sequenzen können Mutantenstämme mit entsprechenden ORF-Disruptionen identifiziert und für Analysezwecke bestellt werden.

### 1.7. Zielstellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit wurde in drei Bereiche unterteilt, um verschiedene Fragestellungen bezüglich des Sphingolipidmetabolismus in Pflanzen und Pilzen zu bearbeiten.

In einem ersten Abschnitt sollte die Interaktion zwischen GlcCer von *P. pastoris* und dem pflanzlichen Defensin Rs-AFP2 untersucht werden. Bisher waren nur Rs-AFP2-sensitive Pilze identifiziert worden, die GlcCer mit d18:2<sup>4E,8E</sup>9m besitzen. Daher wurde angenommen, dass die Bindungsstärke des Rs-AFP2 von der Struktur der pilzlichen GlcCer-Spezies abhängt. Durch gentechnische Manipulation sollten *P. pastoris*-Mutanten hergestellt werden, die sich in ihren GlcCer-Spezies unterscheiden. Im Anschluss an die Analyse der molekularen GlcCer-Spezies mittels HPLC, HPLC/MS bzw. GC sollten die verschiedenen Mutanten und deren GlcCer durch Thewissen et al. sowohl in einem *in vivo*- (Defensin-Aktivität) als auch in einem *in vitro*-Testsystem (Defensin-Bindung) untersucht werden

Im zweiten Abschnitt sollten zunächst putative Sphingolipid-modifizierende Enzyme der phytopathogenen Pilze *U. maydis* und *M. grisea* durch heterologe Expression in *S. cerevisiae* bzw. anderen geeigneten Expressionssystemen identifiziert und anschließend die entsprechenden Deletionsmutanten hergestellt werden. Durch Analyse dieser Mutanten sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein bestimmter GlcCer-Spezies und den Virulenz-Eigenschaften dieser Pilze erkannt werden.

In einem letzten Abschnitt sollte die Analyse pflanzlicher Sphingolipide erfolgen. Bei Mais konnte ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein der  $\Delta 8$ -Doppelbindung und der Aluminiumresistenz festgestellt werden [256]. Dieser Zusammenhang besteht möglicherweise auch in *A. thaliana*. Deshalb wurden T-DNA-Disruptionsmutanten der beiden Sphingolipid- $\Delta 8$ -Desaturasen untersucht. Die Analyse dieser Mutanten und der T-DNA-Mutante der putativen  $\Delta 4$ -Desaturase sollte zeigen, an welchen zellulären Prozessen in *Arabidopsis*  $\Delta 8$ - bzw.  $\Delta 4$ -desaturierte Sphingolipide beteiligt sind.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Geräte

Brutschrank	Binder
Brutschrank	Heraeus Instruments
Elektrischer Heizblock „Dri-Block DB-3“	Techne
Elektrischer Heizblock	Liebisch
Elektroporationsküvetten 2 mm	EquiBio
Elektroporator 2510	Eppendorf
Gelkammer „Horizon 11-14“	BRL
Glasgeräte	VWR
HPLC-Anlage	
Pumpen „SpektraSYSTEM P4000“	ThermoQuest
Autosampler „SpektraSYSTEM AS3000“	ThermoQuest
Entgaser „SpektraSYSTEM SCM1000“	ThermoQuest
UV-Detektor „SpektraSYSTEM UV6000LP“	ThermoQuest
Controller „SpektraSYSTEM SN4000“	ThermoQuest
Software „Version 2.51 für Windows NT“	ChromQuest
Säule „Multospher 100 RP18-5, 250x4 mm“	CS-Chromatographie
Inkubationsrotor „CMV-E“	Fröbel Labortechnik
Inkubationsschüttler „Multitron“	Infors
Kieselgel-60-DC-Platten	VWR
Kieselgel-Säulen „Strata SI-2“	Phenomenex
Magnetrührer „IKAMAG RH“	Janke & Kunkel
Mikroliterspritzen	Hamilton
Mikrozentrifuge „Mikrofuge E“	Beckman
Mikrozentrifuge „Biofuge pico“	Heraeus Instruments
PCR-Gerät „TRIO-Thermoblock TB-1“	Biometra
PCR-Gerät „Primus“	MWG-Biotech
PCR-Gerät „T-Gradient“	Biometra

pH-Meter „761 Calimatic“	Knick
Photometer „Genequant II“	Pharmacia
Pipetten	Gilson International
Pipettierhilfe „Pipetus-Akku“	Hirschmann Laborgeräte
Rotationsverdampfer „Rotavapor RE 120“	Büchi
Sterilbank „DLF/BSS4“	Clean Air
Sterilfilter	Millipore
UV-Transilluminator	Herolab
Vortex „Paramix II“	Julabo Labortechnik
Zentrifuge „Centrifuge 5810R“	Eppendorf
Zentrifuge „Centrikon H-401“	Kontron
Zentrifuge „Rotanta“	Hettich

### 2.1.2. Vektoren

Litmus28i	New England Biolabs
Litmus38i	New England Biolabs
pCB1003	Prof. Dr. Nick J. Talbot (Department of Biological Sciences, University of Exeter, Exeter, U.K.)
pGAPZ/B	Invitrogen Life Technologies
pGEM-T	Promega
pPIC3.5	Invitrogen Life Technologies
pYES2	Invitrogen Life Technologies

### 2.1.3. Organismen

<i>Arabidopsis thaliana</i> L. N510384	NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre)
<i>Arabidopsis thaliana</i> L. 893A12	SIGNal (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory)
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF <sup>+</sup> tet	Stratagene
<i>Magnaporthe grisea</i> guy 11	Prof. Dr. Nick J. Talbot (Department of Biological Sciences, University of Exeter, Exeter, U.K.)

<i>Pichia pastoris</i> GS115	Invitrogen Life Technologies
<i>Pichia pastoris</i> MF3KR5	Frank Müller (Diplomarbeit) [30]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TDY2037- <i>sur2Δ</i>	Prof. Dr. Teresa Dunn (Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, Maryland, U.S.A.)

### 2.1.4. Sonstiges

Lösungsmittel wurden von den Firmen Carl Roth und AppliChem bezogen. Lösungsmittel zur Herstellung von Laufmitteln für die HPLC wurden als „HPLC gradient grade“ geordert.

Sofern nachfolgend nicht anders vermerkt, stammen Chemikalien zur Herstellung von Medien und Lösungen von den Firmen Difco Laboratories, Bioline, Sigma-Aldrich, Merck-Eurolab/VWR, Carl Roth, Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande) und Invitrogen Life Technologies; Antibiotika von Merck-Eurolab/VWR, Invitrogen Life Technologies und Sigma-Aldrich.

Enzyme, DNA-Längenstandards und andere Reagenzien für mikrobiologische Arbeiten wurden von New England Biolabs, Invitrogen Life Technologies und Promega bezogen. Zur DNA-Färbung wurde SYBR<sup>®</sup>-Green von Molecular Probes verwendet.

*Kits* zur Präparation und Reinigung von Plasmiden, PCR-Fragmenten und genomischer DNA wurden bei den Firmen Qiagen, Sigma-Ark, Millipore und Macherey & Nagel entwickelt, PCR-Primer durch Sigma-Genosys synthetisiert.

### 2.1.5. Medien

#### 2.1.5.1. Medien für *Escherichia coli*

LB-Medium	0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) Pepton bzw. Trypton 0,5% (w/v) NaCl 1,5% (w/v) Agar (für Festmedien)
zur Selektion	100 mM Ampicillin (sterilfiltr.; Zugabe nach Autoklavieren) 40 mM IPTG (sterilfiltr.; Zugabe nach Autoklavieren) 0,008% (w/v) X-Gal in DMF (Zugabe nach Autoklavieren)

SOB-Medium	0,5% (w/v) Hefeextrakt
	1% (w/v) Pepton bzw. Trypton
	10 mM (w/v) NaCl
	2,5 mM (w/v) KCl
	10 mM (w/v) MgCl <sub>2</sub> (sterilfiltr.; Zugabe nach Autoklavieren)
	10 mM (w/v) MgSO <sub>4</sub> (sterilfiltr.; Zugabe nach Autoklavieren)

### 2.1.5.2. Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

#### CM (Complete Minimal Dropout Medium)

	0,12% (w/v) Dropout Powder
	0,67% (w/v) Yeast Nitrogen Base (YNB) (Zusammensetzung siehe Herstellerangaben: Dibco)
	2% (w/v) Agar (für Festmedien)
CM-Glc	2% (w/v) Glucose (sterilfiltr.; Zugabe nach Autoklavieren)
CM-Raff	2% (w/v) Raffinose (sterilfiltr.; Zugabe nach Autoklavieren)
zur Selektion	20 mM L-Histidin (sterilfiltriert)
	40 mM L-Tryptophan (sterilfiltriert)
	60 mM L-Leucin (sterilfiltriert)
	20 mM Uracil (sterilfiltriert)
Dropout Powder	3,6% (w/w) Adenin-Hemisulfat Salz
	1,8% (w/w) L-Arginin (HCl)
	9% (w/w) L-Aspartat
	9% (w/w) L-Glutamat (Mononatrium Salz)
	2,7% (w/w) L-Lysin (Mono-HCl)
	1,8% (w/w) L-Methionin
	4,5% (w/w) L-Phenylalanin
	33,6% (w/w) L-Serin
	18% (w/w) L-Threonin
	2,7% (w/w) L-Tyrosin
	13,5% (w/w) L-Valin

### YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)

- 1% (w/v) Hefeextrakt
- 2% (w/v) Pepton bzw. Trypton
- 2% (w/v) D-Glucose (sterilfiltr.; Zugabe nach Autoklavieren)

#### 2.1.5.3. Medien für *Pichia pastoris*

### MM-Glc (Minimal Medium mit Glucose)

- 0,67% (w/v) YNB (sterilfiltr.; Zugabe nach Autoklavieren)
- 2% (w/v) Glucose (sterilfiltr.; Zugabe nach Autoklavieren)  
oder 1% (w/v) Glycerin
- 2% (w/v) Agar (für Festmedien)
- 20 mM Histidin (sterilfiltr.; Zugabe nach Autoklavieren)
  
- zur Selektion            0,7% (v/v) Methanol statt Glucose  
                                  ohne Histidin
- zur Induktion            0,5% (v/v) Methanol statt Glucose

### YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)

- 1% (w/v) Hefeextrakt
- 2% (w/v) Pepton bzw. Trypton
- 2% (w/v) Agar (für Festmedien)
- 2% (w/v) D-Glucose (sterilfiltr.; Zugabe nach Autoklavieren)
  
- zur Selektion            100 mM Zeocin™ (sterilfiltr.; Zugabe nach Autoklavieren)

#### 2.1.5.4. Medien für *Arabidopsis*

- Platten:                    0,44% (w/v) MS Gamberg B5 mit Vitaminen
- 0,05% (w/v) MES
- 0,8% (w/v) Plant-Agar
- auf pH 5,8 einstellen
  
- Selektion:                30 mM Kanamycin

### 2.1.6. Lösungen

BF-Puffer	8% (w/v) Sucrose 0,5% (v/v) Triton X-100 50 mM EDTA pH 8,0 10 mM Tris/HCl pH 8,0
Borat-Puffer	2 M Borsäure pH 10,5 (Einstellung mit KOH)
Breaking-Puffer	2% (v/v) Triton X-100 1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0
FDNB-Lösung	0,5% (v/v) 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol in Methanol
IS-Mix	5 Vol Isopropanol 1 Vol 5 M Ammoniumacetat
Lösung A	1 M Sorbit 10 mM Tricine pH 8,4 3% (w/v) Ethylenglycol
Lösung B	40% (w/v) Polyethylenglycol PEG 3350 200 mM Tricine pH 8,4
Lösung C	0,15 mM NaCl 10 mM Tricine pH 8,4
TB-Puffer	10 mM PIPES-Puffer pH 6,7 (sterilfiltriert) 55 mM MnCl <sub>2</sub> (autoklaviert) 15 mM CaCl <sub>2</sub> (autoklaviert) 250 mM KCl (autoklaviert)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0

SYBR <sup>®</sup> -Green-: Stammlösung	1:100 Verdünnung der Originallösung in DMSO
5x Ladepuffer:	1 Vol SYBR <sup>®</sup> -Green-Stammlösung 4 Vol Blaumarker
FAMES-Lösung	2,8% (v/v) konz. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (96%) 2% (v/v) DMP (Dimethoxypropan) in Methanol
Färbelösungen:	
CuSO <sub>4</sub> -Lösung	6,4% (w/v) CuSO <sub>4</sub> 9,4% (v/v) konz. Phosphorsäure (85%) in H <sub>2</sub> O
α-Naphthol/ Schwefelsäure	3,2% (w/v) α-Naphthol in Methanol 8% (v/v) H <sub>2</sub> O Zugabe von 12% (v/v) konz. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (96%) auf Eis
ANS	0,2% (w/v) 1-Anilino-8-naphthalinsulfonat in Methanol

### 2.2. Methoden

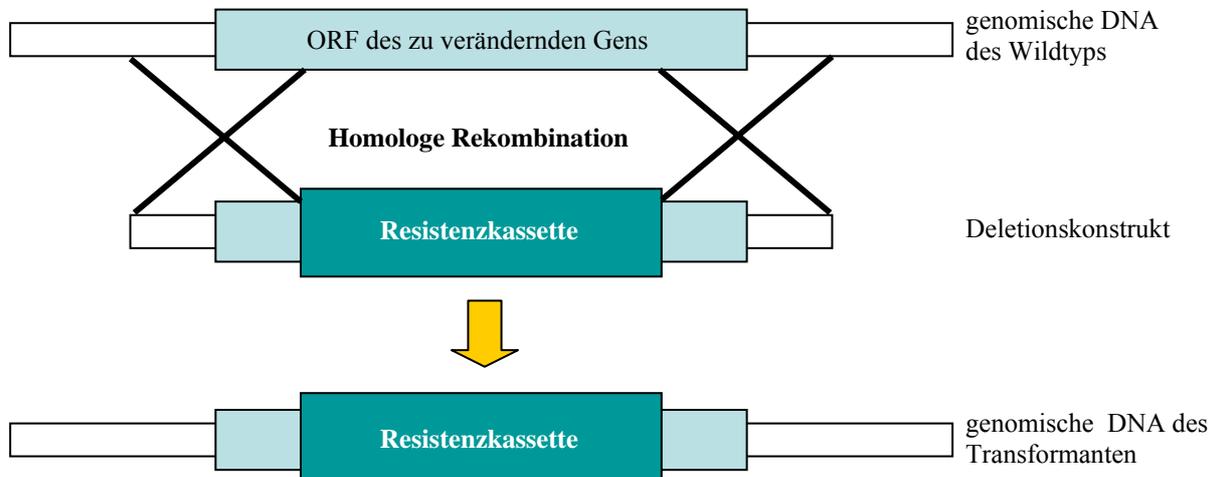
#### 2.2.1. Molekularbiologische Arbeiten

##### 2.2.1.1. Herstellung von Deletionskonstrukten

Durch Sequenzdatenvergleich wurden putative Sequenzen für die Sphingolipid-Δ4- und die Δ8-Desaturase sowie die Fettsäure-α-Hydroxylase aus *P. pastoris* bzw. *M. grisea* identifiziert. Mit Hilfe des Computerprogramms *Clone Manager* konnten ORF- und ORF-flankierende Bereiche dieser Sequenzen unterschieden werden. Mit Hilfe dieser Sequenzinformationen wurden Deletionskonstrukte kloniert, um Mutanten mit unterschiedlicher GlcCer-Ausstattung herzustellen.

Die Transformation von *P. pastoris* und *M. grisea* erfolgt über homologe Rekombination, dargestellt in Abb. 12. Für eine erfolgreiche Transformation benötigen Deletionskonstrukte

ausreichend große homologe Bereiche (*M. grisea*:  $\geq 1$  kb, *P. pastoris*:  $\geq 0,5$  kb, jeweils rechts und links der Resistenzkassette).



**Abb. 12 Schematische Darstellung der homologen Rekombination.** Bei der homologen Rekombination erfolgt ein doppeltes *crossing over*. Bakterien und Pilze besitzen ein Rekombinationssystem, das ihnen erlaubt, *crossing over*-Prozesse sowohl zwischen homologen Bereichen ihres Genoms als auch zwischen Genom und extrachromosomaler linearer DNA durchzuführen, sofern ausreichend große homologe Bereiche vorhanden sind. Die genomische Sequenz wird dabei an den homologen Bereichen geschnitten, wobei die ursprüngliche genomische Sequenz verloren geht und durch das Deletionskonstrukt ersetzt wird.

Zur Herstellung der Deletionskonstrukte wurde jeweils eine der folgenden Strategien verwendet.

- (i) Ein Fragment, das sowohl ORF als auch ORF-flankierende Bereiche umfasst, wird in einen Vektor kloniert, der ORF-Bereich durch Restriktion so weit wie möglich entfernt und durch eine Resistenzkassette ersetzt.
- (ii) Die flankierenden Bereiche werden getrennt amplifiziert und in einem Schritt mit Vektor und Resistenzkassette ligiert (4-Komponentenligation).

### *Amplifikation der ORFs und/oder der flankierenden Bereiche*

Die Fragmente zur Herstellung der Deletionskonstrukte wurden durch PCR mit spezifischen Primern (Tab. 1-Anhang) amplifiziert. Für alle PCR-Reaktionen wurden die hitzestabilen *Pfu*- bzw. *PfuTurbo*-Polymerasen (Stratagene) mit Korrekturlesefähigkeit bei folgendem Programm verwendet:

Denaturierung:	95°C 5 min	
Denaturierung:	95°C 30 s	} 35x
Primer-Hybridisierung:	55°C 30 s	
Polymerisation:	72°C 2 min	
Polymerisation:	72°C 6 min	

Zur gerichteten Klonierung der Fragmente wurden den Primern Adaptersequenzen mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen an das 5'-Ende angehängt (unterstrichen in Tab. 1-Anhang). Fragmente, die direkt verdaut werden sollten, erhielten zusätzliche Nukleotide. Die Primer wurden so gewählt, dass das Verhältnis AT:GC, wenn möglich, 1:1 ergab und die Schmelztemperatur  $T_m$  zwischen 64 und 72°C lag.  $T_m$  wurde dabei nach der Formel  $T_m [^{\circ}\text{C}] = 2 \cdot N_{\text{AT}} + 4 \cdot N_{\text{GC}} + 4$  abgeschätzt, wobei  $N_{\text{AT}}$  der Summe der A- und T-Nukleotide und  $N_{\text{GC}}$  der Summe der G- und C-Nukleotide entspricht. Bei sehr langen Adaptersequenzen wurden Primer mit höher geschätzter  $T_m$  benutzt, da eine durch die Anhänge hervorgerufene sterische Hinderung der Primer-Hybridisierung zu einer deutlichen Herabsetzung der  $T_m$  führt und damit die Anlagerung der komplementären Sequenzabschnitte erschwert. Die Temperatur für die Primer-Hybridisierung ( $T_A$ ) wurde so gewählt, dass  $T_A \leq T_m - 5^{\circ}\text{C}$ , um eine gute Anlagerung der Primer zu gewährleisten. Die PCR-Reaktionen wurden nach Herstellerangaben angesetzt. Als DNA-Matrizen wurden Plasmide (pCB1003 für Hygromycinkassette, pGAPZ/B für Zeocinkassette) bzw. genomische DNA (*P. pastoris* GS115 bzw. *M. grisea* guy11) verwendet. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen der Primer an die Matrizen-DNA erfolgte ein Zusatz von 2% DMSO (Endkonzentration) zum Reaktionsansatz.

### *Zwischenklonierung der Fragmente*

Die entstandenen PCR-Produkte wurden über ein 1%iges (w/v) Agarose-TBE-Gel gereinigt. Die DNA-Banden wurden mit SYBR<sup>®</sup>-Green unter UV-Licht sichtbar gemacht und aus dem Gel extrahiert (Abschn. 2.2.1.4.). Die gereinigten DNA-Fragmente wurden entweder direkt mit den entsprechenden Restriktionsenzymen behandelt oder in pGEM-T (Vektorkarte siehe Anhang) zwischenkloniert. PCR-Fragmente, die mit einer *Pfu*- oder *PfuTurbo*-Polymerase

## 2. Material und Methoden

amplifiziert werden, besitzen glatte Enden. Für die Klonierung in pGEM-T wurden deshalb die PCR-Produkte zunächst mit einer *Taq*-Polymerase behandelt, die 3'-A-Überhänge produziert. Die Reaktionsansätze wurden wie folgt pipettiert und für 30 min bei 70°C inkubiert.

7 µl PCR-Produkt  
1 µl 2 mM dATP  
1 µl ThermoPol-Puffer (NEB; 10x)  
1 µl *Taq*-Polymerase (NEB; 5U/µl)

Eine anschließende Reinigung der DNA-Fragmente war nicht erforderlich. Die Ligationsansätze erfolgten mit Hilfe des pGEM-T-Kits von Promega nach folgendem Schema:

3 µl PCR-Produkt mit A-Überhängen  
1 µl pGEM-T mit T-Überhängen  
5 µl 2x Rapid Ligation-Puffer  
1 µl T4-DNA-Ligase

Die Ligationen erfolgten wahlweise 1 h bei RT, 4 h bei 16°C oder ü. N. bei 4°C. Zur Vervielfältigung der Plasmide wurde *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> tet mit den Ligationsansätzen transformiert (siehe Abschn. 2.2.2.2.).

### *Klonierung der Deletionskonstrukte*

Die gereinigten PCR-Produkte, die in pGEM-T zwischenklonierten DNA-Fragmente sowie die Vektoren für die Deletionskonstrukte wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten:

PpΔ4Des (Tab. 1-Anhang)	<i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>
PpΔ8Des (Tab. 1-Anhang)	<i>BamHI</i> + <i>KpnI</i>
MgΔ4Deslb (Tab. 1-Anhang)	<i>KpnI</i> + <i>MluI</i>
MgΔ4Desrb (Tab. 1-Anhang)	<i>HpaI</i> + <i>HindIII</i>
Zeo1 (Tab. 1-Anhang)	<i>XbaI</i> + <i>XmnI</i>
Zeo2 (Tab. 1-Anhang)	<i>HindIII</i> + <i>XbaI</i>

pCB1003 (Vektorkarte: siehe Anhang)	<i>MluI</i> + <i>HpaI</i>
Litmus38i (Vektorkarte: siehe Anhang)	<i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>
Litmus28i (Vektorkarte: siehe Anhang)	<i>BamHI</i> + <i>KpnI</i>
Litmus28i (Vektorkarte: siehe Anhang)	<i>KpnI</i> + <i>HindIII</i>

Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden über ein 1%iges (w/v) Agarose-TBE-Gel gereinigt, mit SYBR<sup>®</sup>-Green unter UV-Licht sichtbar gemacht und aus dem Gel extrahiert (siehe Abschn. 2.2.1.4.). Die DNA-Fragmente Pp $\Delta$ 4Des und Pp $\Delta$ 8Des wurden mit Litmus38i (L38i) bzw. Litmus28i (L28i) ligiert. Die Reaktionen wurden mit der T4-Ligase (NEB) durchgeführt (siehe Abschn. 2.2.1.3.). Nach Vervielfältigung der entstandenen Plasmide L38iPp $\Delta$ 4Des und L28iPp $\Delta$ 8Des in *E. coli* XL1-Blue MRF' tet (siehe Abschn. 2.2.2.2.) wurden diese mit *XbaI* + *XmnI* (L38iPp $\Delta$ 4Des) bzw. *HindIII* + *XbaI* (L28iPp $\Delta$ 8Des) geschnitten. Die Reinigung der Fragmente erfolgte über ein 1%iges (w/v) Agarose-TBE-Gel und die Extraktion der DNA wie in Abschn. 2.2.1.4.. In einer anschließenden Reaktion wurden die Zeocinkassetten Zeo1 bzw. Zeo2 mit den geschnittenen Vektoren L38iPp $\Delta$ 4Des bzw. L28iPp $\Delta$ 8Des ligiert (siehe Abschn. 2.2.1.3.), so dass die Deletionskonstrukte L38iPp $\Delta$ 4desZeo und L28iPp $\Delta$ 8desZeo entstanden.

Die Ligation der vier Teilfragmente für das Konstrukt zur Deletion der  $\Delta$ 4-Desaturase aus *M. grisea*, Mg $\Delta$ 4Deslb, Mg $\Delta$ 4Desrb, Hph (aus pCB1003) und L28i, erfolgte in einer Reaktion mit Hilfe des *Quick-Ligation-Kit* von NEB. Die Vervielfältigung der entstandenen Vektoren erfolgte über *E. coli* XL1-Blue MRF' tet (siehe Abschn. 2.2.2.2.).

### 2.2.1.2. Herstellung der Expressionskonstrukte

Durch Expression der Sphingolipid- $\Delta$ 4- und - $\Delta$ 8-Desaturase sowie der Sphingolipid-C4-Hydroxylase aus *U. maydis* (siehe Anhang) sollten diese Gene funktionell charakterisiert werden. Die Expressionen in *S. cerevisiae* erfolgten mit Hilfe des Expressionsvektors pYES2 (Vektorkarte: siehe Anhang), die Expressionen in *P. pastoris* mit Hilfe des Expressionsvektors pPIC3.5 (Vektorkarte: siehe Anhang). Während pYES2 extrachromosomal in *S. cerevisiae* vorliegt, integriert pPIC3.5 in das AOX1-Gen von *P. pastoris* durch homologe Rekombination.

### *Amplifikation der ORFs*

Die vollständigen ORFs der Gene aus *U. maydis* wurden durch PCR mit spezifischen Primern (Tab. 2-Anhang) wie unter 2.2.1.1. amplifiziert. Zur gerichteten Klonierung der Fragmente wurden den Primern Adaptersequenzen mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen an das 5'-Ende angehängt (unterstrichen in Tab. 2-Anhang). Die Primerkonstruktion erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie unter 2.2.1.1.. Als DNA-Matrize wurde genomische DNA (*U. maydis*) verwendet.

### *Klonierung in die Expressionsvektoren*

Die gereinigten PCR-Produkte sowie die Vektoren pYES2 und pPIC3.5 wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten:

Um $\Delta$ 4DesORF (Tab. 2-Anhang)	<i>EcoRI</i> + <i>NotI</i>
Um $\Delta$ 4DesORF (Tab. 2-Anhang)	<i>BamHI</i> + <i>KpnI</i>
Um $\Delta$ 8DesORF (Tab. 2-Anhang)	<i>EcoRI</i> + <i>NotI</i>
UmC4HydORF (Tab. 2-Anhang)	<i>HpaI</i> + <i>HindIII</i>
pYES2 (Vektorkarte: siehe Anhang)	<i>XbaI</i> + <i>XmnI</i>
pPIC3.5 (Vektorkarte: siehe Anhang)	<i>EcoRI</i> + <i>NotI</i>

Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden über ein 1%iges (w/v) Agarose-TBE-Gel gereinigt, mit SYBR<sup>®</sup>-Green unter UV-Licht sichtbar gemacht und aus dem Gel extrahiert (siehe Abschn. 2.2.1.4.). Die ORFs der  $\Delta$ 4- und  $\Delta$ 8-Desaturase, Um $\Delta$ 4DesORF (mit *EcoRI* + *NotI*) und Um $\Delta$ 8DesORF, wurden mit pPIC3.5 wie unter 2.2.1.3. ligiert: Um $\Delta$ 4DesORF (mit *BamHI* + *KpnI*) und die C4-Hydroxylase, UmC4HydORF, analog mit pYES2. Die Vervielfältigung der entstandenen Plasmide, pYES2Um $\Delta$ 4Des, pYES2UmC4Hyd, pPICUm $\Delta$ 4Des und pPICUm $\Delta$ 8Des, erfolgte in wie unter 2.2.2.2..

### *2.2.1.3. Ligation*

Ligationen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit der T4-DNA-Ligase von NEB nach folgendem Schema durchgeführt:

x ng Plasmid  
3x ng Insert  
1 µl 10x Ligationspuffer  
1 µl T4-DNA-Ligase (400 U/µl)  
ad 10 µl H<sub>2</sub>O

Die Reaktionsansätze wurden wahlweise 1 h bei RT, 4 h bei 16°C oder ü. N. bei 4°C inkubiert.

### 2.2.1.4. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Extraktion der DNA aus Agarosegelen wurde nach einem der beiden folgenden Protokolle durchgeführt.

(i) Der Deckel eines 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßes wurde mit einer Kanüle durchstoßen. Dann wurde eine mit Glaswolle gestopfte 1000 µl-Pipettenspitze in das Loch gesteckt. Die zu extrahierende DNA-Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und das Gelstück in die Pipettenspitze überführt. Diese Konstruktion wurde mit dem Eppendorf-Reaktionsgefäß nach unten in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen gestellt, verschlossen und bei 3000 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge 5 min bei RT zentrifugiert. Dabei sammelten sich die im Gel enthaltene Flüssigkeit und die DNA im Eppendorfgefäß an. Nach Überführung der wässrigen Lösung in ein neues 2 ml-Eppendorfgefäß erfolgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 2,5 Vol 96% Ethanol (eiskalt) und 0,1 Vol 3 M KAc. Die Lösung wurde durch Schwenken gemischt und 20 min bei 4°C aufbewahrt. Daran schloss sich eine 15-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C an. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und wie oben zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend bei 37°C getrocknet und in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

(ii) Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits von Qiagen. Die entsprechende DNA-Bande wurde dazu mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA wurde nach Angaben des Herstellers extrahiert und mit H<sub>2</sub>O von der Membran der QIAquick-Säule eluiert.

### 2.2.1.5. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentrationen erfolgte mit Hilfe eines Photometers bei 260 nm. Die Absorption  $A_{260 \text{ nm}} = 1$  entspricht einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  dsDNA bzw. 33  $\mu\text{g/ml}$  ssDNA [260]. Die Reinheit der isolierten DNA wird über das Verhältnis  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  bestimmt, das für reine DNA zwischen 1,8 und 1,9 liegt. Die Proben wurden für die Bestimmung so verdünnt, dass die Absorptionen  $< 1$  waren.

### 2.2.2. Arbeiten mit *Escherichia coli*

#### 2.2.2.1. Kompetente *E. coli* XL1 Blue MRF' tet-Zellen für die chemische Transformation nach Inoue et al. [261]

2 ml SOB-Medium wurden mit *E. coli* XL1 Blue MRF' tet-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Vorkultur wurde in 200 ml SOB-Medium überführt und bis zu einer  $OD_{600} \sim 0,5$  bei 37°C und 200 rpm inkubiert. In Falcon-Röhrchen wurde die Zellkultur 10 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation - 10 min bei 4000 rpm und 4°C - pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und wie oben zentrifugiert. Nachdem das Pellet in 15 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert worden war, wurde es mit 1,2 ml (7%) DMSO versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 200  $\mu\text{l}$  Portionen aliquotiert und in flüssigem  $\text{N}_2$  eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C für mehrere Monate.

#### 2.2.2.2. Chemische Transformation von *E. coli* nach Sambrook et al. [260]

Ein Aliquot gefrorener Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit ca. 50 ng DNA (max. 10  $\mu\text{l}$  auf 200  $\mu\text{l}$  Zellen) versetzt und 20 bis 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C. Anschließend wurden die Zellen in 800  $\mu\text{l}$  SOB-Medium suspendiert, 45 min bei 37°C inkubiert und auf LB-Platten mit entsprechender Selektion ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

### 2.2.2.3. Plasmid-Isolierung

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurde nach einem der folgenden Protokolle durchgeführt.

(i) Die Plasmid-Isolierung wurde leicht modifiziert nach dem Protokoll von McLachlan & Riggs [262] durchgeführt. Je eine 2 ml-Kultur (LB-Medium mit Antibiotikum zur Selektion) wurde mit einem transformierten *E. coli*-Klon angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden in 1,5 ml-Eppendorfgläser überführt und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die entstandenen Pellets in 200 µl BF-Puffer mit Lysozym ( $c_{\text{End}} = 1 \text{ mg/ml}$ ) resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden 1 min in einem kochenden Wasserbad erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Danach folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm. Die Überstände wurden in neue Eppendorfgläser überführt und mit 480 µl IS-Mix versetzt. Durch mehrmaliges Schwenken wurde eine homogene Lösung erhalten. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte für 5 min bei RT. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach sorgfältigem Entfernen der Überstände wurden die Pellets bei 37°C getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

(ii) Die Plasmid-Isolierung erfolgte mit dem GenElute Plasmid Mini Kit von Sigma. 2-10 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer *E. coli*-Kolonie angeimpft und ü. N. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 13000 rpm 1 min zentrifugiert. Die Isolierung der Plasmide erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde mit H<sub>2</sub>O von der Säulenmembran eluiert und bei -20°C gelagert.

(iii) Die Plasmid-Isolierung in großem Maßstab wurde mit dem Nucleobond AX Kit von Macherey & Nagel durchgeführt. 200 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einem *E. coli*-Klon angeimpft und  $\geq 20 \text{ h}$  bei 37°C und 180-200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei 4000 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Die anschließende Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers mit einer AX-500-Säule. Nach Fällung der DNA wurde diese in H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

### 2.2.3. Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

#### 2.2.3.1. Kompetente *S. cerevisiae*-Zellen für die chemische Transformation nach Dohmen et al., (modifiziert von M. von Pein, Dissertation 1992) [263]

Eine 5 ml-Übernachtskultur wurde in 100 ml YPG-Medium überführt und ca. 4 h bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Nachdem die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei RT und 4000 x g geerntet worden waren, wurden die Zellen mit 20 ml Lösung A gewaschen und anschließend wie oben zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 4 ml Lösung A resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml, zerschallt auf mittlere Fragmentgröße von 7 kb, hitzedenaturiert) und 100 µl 1M Histaminlösung (sterilfiltriert), wurde die Zellsuspension in 200 µl Portionen aliquotiert, bei -70°C eingefroren und mehrere Monate gelagert.

#### 2.2.3.2. Chemische Transformation von *S. cerevisiae* nach Dohmen et al. (modifiziert von M. von Pein, Dissertation 1992) [263]

Ein Aliquot gefrorener Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 1-5µg DNA (max. 1/10 des Volumens der Zellsuspension = 20 µl) versetzt und 5 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 1,2 ml Lösung B wurde die Probe vorsichtig gemischt und 1 h bei 30°C ohne Schütteln inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 700 µl Lösung C aufgenommen, erneut abzentrifugiert und ein zweites Mal mit 700 µl Lösung C gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl Lösung C resuspendiert und auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für 2 bis 8 Tage bei 28-30°C.

#### 2.2.3.3. Induktion der heterologen Genexpression in *S. cerevisiae*

Die Genexpression mit Hilfe von pYES2 steht unter der Kontrolle des *GALI*-Promotors und wird durch Zugabe von Galactose induziert. Nach P. Ternes (persönliche Mitteilung) erfolgt eine optimale Expression von Sphingolipid-Δ4-Desaturasen unter folgenden Bedingungen: Anzucht der Vorkultur in CM-Glucose-Medium, Anzucht der Hauptkultur und Induktion in CM-Raffinose-Medium (mit 2% Gal) [85]. Für die Expression der Sphingolipid-C4-Hydroxylase wurde sowohl die Anzucht der Vorkultur als auch die der Hauptkultur in CM-Raffinose-Medium durchgeführt, da die Expression von Sphingolipid-C4-Hydroxylasen auch

mit Raffinose als einziger Kohlenstoffquelle hohe Ausbeuten an Hydroxysphinganolin liefert [87]. Dadurch konnte ein experimenteller Schritt eingespart werden.

Zunächst wurden 10 ml-Vorkulturen in CM-Medium ohne Uracil mit 2% Glucose (für pYES2Um $\Delta$ 4Des) bzw. Raffinose (pYES2UmC4Hyd) ü. N. bei 30°C und 180-200 rpm angezogen. Die Übernachtskulturen wurden in CM-Medium ohne Uracil mit 2% Raffinose und 2% Galactose ad 50 ml überführt. Da Glucose den *GALI*-Promotor reprimiert, wurde die Vorkultur von pYES2Um $\Delta$ 4Des zunächst bei 1500 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert und das Pellet zweimal mit CM-Raffinose-Medium gewaschen. Die Zentrifugationen erfolgten wie oben beschrieben. Das gewaschene Pellet wurde in 50 ml Medium resuspendiert. Die Inkubation der Hauptkultur von pYES2UmC4Hyd erfolgte 2 Tage bei 30°C und 180-200 rpm. Die Expression der Sphingolipid- $\Delta$ 4-Desaturase erfolgte unter Hitzeschockbedingungen, da dies laut verschiedener Studien zu einem erhöhten Anteil an freiem Ceramid führt [85,89,90]. Dieser Effekt wurde ausgenutzt, um die Bildung  $\Delta$ 4-ungesättigter Sphingolipide bei der Expression zu erleichtern. Die Hauptkultur wurde zunächst für 3 Tage bei 25°C inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 37°C für 2 h, dem sich eine Inkubation über Nacht bei 30°C anschloss.

### 2.2.4. Arbeiten mit *Pichia pastoris*

#### 2.2.4.1. Kompetente *P. pastoris*-Zellen für die Elektroporation (nach Angaben von Invitrogen)

100 ml YPD-Medium wurden mit einem Tropfen einer 15 ml Übernachtskultur angeimpft und eine weitere Nacht bei 30°C und 180-200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> ~ 1,2 bis 1,5 inkubiert. Die Zellkultur wurde bei 4°C und 1500 x g fünf Minuten zentrifugiert. Nachdem das Pellet mit 100 ml eiskaltem, sterilem aqua dest. gewaschen worden war, wurde wie oben zentrifugiert. Der Waschschrift wurde mit 50 ml eiskaltem, sterilem aqua dest. wiederholt. Das Zellpellet wurde mit 4 ml eiskaltem, sterilem 1 M Sorbitol gewaschen, wie oben zentrifugiert und in 300  $\mu$ l 1 M Sorbitol aufgenommen. Da die Transformationsrate der kompetenten Zellen sehr schnell sinkt, wurden für jede Transformation frische kompetente Zellen hergestellt.

#### 2.2.4.2. Elektroporation von *P. pastoris* (nach Angaben von Invitrogen)

80  $\mu$ l kompetente Zellen wurden mit 5-20  $\mu$ g (max. 20  $\mu$ l) linearisierter DNA in einer eiskalten Elektroporationsküvette gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Das Pulsieren der

## 2. Material und Methoden

Zellen erfolgte bei 1500 V (Feldstärke ~ 7500 V/cm). Anschließend wurden die Zellen mit 2 x 500 µl 1 M Sorbitol aus der Küvette in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 2-3 h bei 30°C ohne Schütteln inkubiert. Die Zellsuspension wurde in Aliquots von 100 µl auf insgesamt 10 Platten ausplattiert und 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

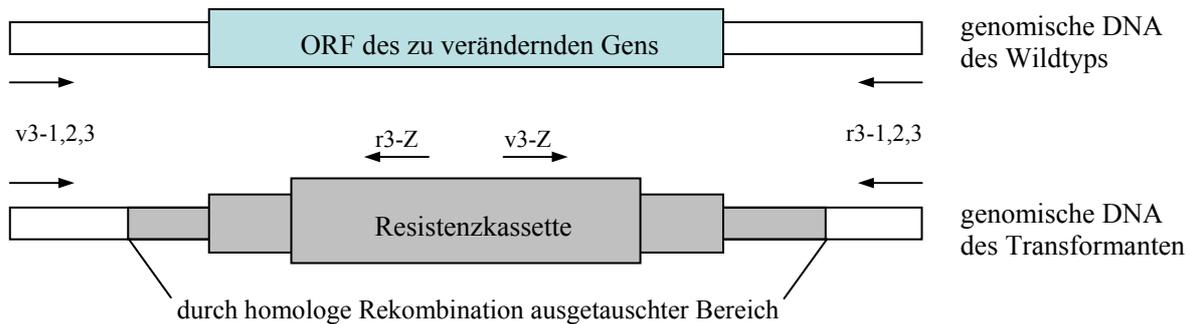
### 2.2.4.3. Isolierung genomischer DNA aus *P. pastoris* nach Ausubel et al. (1995)

Die Hefezellen einer 15 ml Übernachtskultur wurden in einem 15 ml Falcon-Röhrchen 5 min bei RT und 800xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Breaking-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von ca. 300 mg Glasperlen (Ø 0,45-0,5 mm) und 1 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 wurde die Zellsuspension 4 min bei maximaler Geschwindigkeit gevortext. Anschließend wurde die Lösung mit 1 ml TE-Puffer versetzt und 10 min bei RT und 2500xg zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in 600 µl-Aliquots auf Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 versetzt, sorgfältig gemischt und bei RT und 5000xg zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis sich keine Protein-Interphase mehr bildete. Die in der wässrigen Phase befindliche genomische DNA wurde mit 1/10 Volumen 3 M KAc und 2,5 Volumen abs. Ethanol (eiskalt) 30 min bei -80°C gefällt. Danach wurde die DNA durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm pelletiert, mit 500 µl 70% Ethanol (eiskalt) gewaschen und erneut 15 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Nach sorgfältiger Entfernung des Ethanols wurde die DNA bei 37°C getrocknet und anschließend in 50-100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

### 2.2.4.4. Kolonie-PCR

Zur schnellen Überprüfung der Transformation mit den Deletionskonstrukten wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Zunächst wurden die Reaktionsansätze nach Herstellerangaben pipettiert und auf Eis gestellt. Die Reaktionen wurden mit spezifischen Primern (Tab. 3-Anhang) und der *Taq*-Polymerase von NEB durchgeführt. Die Primerpaarungen wurden so gewählt, dass die in Abb. 13 dargestellten Fragmente entstanden:

v3-1,2,3 + r3-Z	→	Fragment1	nur bei Transformanten
v3-Z + r3-1,2,3	→	Fragment2	nur bei Transformanten
v3-1,2,3 + r3-1,2,3	→	Fragment3	bei Transformanten und Wildtyp; unterschiedliche Größe



**Abb. 13 Primerpaarungen zur Überprüfung der Transformation mit den Deletionskonstrukten.** Für die Kolonie-PCR wurden alle abgebildeten Primerpaarungen verwendet. Dies ergab für Wildtypgene 1 Fragment und für den veränderten Gen-Bereich 3 Fragmente.

Die Primer wurden nach den unter 2.2.1.1. angegebenen Gesichtspunkten ausgewählt. Von den transformierten Kolonien wurden geringe Zellmengen mit sterilen Pipettenspitzen entnommen und in die Reaktionsansätze überführt. Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Denaturierung:	95°C 6 min	
Denaturierung:	95°C 30 s	} 35x
Primer-Hybridisierung:	50°C 30 s	
Polymerisation:	72°C 2 min	
Polymerisation:	72°C 6 min	

Die Auswertung der PCRs erfolgte über ein 1%iges (w/v) Agarose-TBE-Gel. Die DNA-Banden wurden mit SYBR<sup>®</sup>-Green unter UV-Licht sichtbar gemacht.

### 2.2.5. Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana*

*A. thaliana* Columbia sowie die angeforderten T-DNA-Mutanten (NASC bzw. Syngenta) wurden auf Erde bei 22°C Dauertemperatur und 16/8 h Tag/Nacht angezogen. Vor der Aussaat wurden die Samen für 2 Tage bei 4°C stratifiziert. Nach ca. 4 Wochen, wenn die

Pflanzen neben den beiden Keimblättern mindestens vier weitere Blätter ausgebildet hatten, wurden diese vereinzelt, um ein optimales Wachstum jeder Pflanze zu gewährleisten.

### 2.2.5.1. Kreuzung von *A. thaliana*

Für die Kreuzung eignen sich besonders kräftige Pflanzen mit relativ großen Blüten. Dies kann erreicht werden, indem die Pflanzen wenige Tage vor dem Kreuzungsversuch nicht mehr gegossen und etwas kühler (18-20°C) gestellt werden. Um eine erfolgreiche Kreuzung zu gewährleisten, muss für die Empfängerpflanze (Bereitstellung des Fruchtknotens) ein Entwicklungsstadium gewählt werden, in dem die Fruchtknoten vollständig ausgebildet und befruchtungsbereit sind, während die Antheren noch keine befruchtungsfähigen Pollen besitzen dürfen. Wird der Zeitpunkt zu früh gewählt, ist der Fruchtknoten noch nicht bereit, Pollen aufzunehmen. Ist der Zeitpunkt zu spät gewählt, hat sich die Pflanze bereits mit eigenem Pollen befruchtet. Eine hohe Wahrscheinlichkeit für den optimalen Zeitpunkt erhält man, wenn man Knospen wählt, bei denen die weißen Kronblätter an der Öffnung der Knospen leicht zu sehen sind. Mit Hilfe von Pinzetten wurden die Kelch-, Kron- und Staubblätter vorsichtig entfernt ohne das Fruchtblatt zu beschädigen. Unter dem Binokular wurde überprüft, ob bereits reife Pollen an den Antheren sichtbar waren. War dies der Fall, wurde diese Blüte nicht verwendet, da die Wahrscheinlichkeit einer Selbstung zu hoch war. Unreife Staubblätter erschienen glatt und durchsichtig, während der Pollen bereits bei geringer Vergrößerung an der gelblichen und rauen Oberfläche zu erkennen war. Nachdem das Fruchtblatt freigelegt worden war, wurden der Spenderpflanze (Bereitstellung des Pollens) Staubblätter mit einer Pinzette entnommen. Durch leichtes Drücken der Antheren auf die Narbe erfolgte die Übertragung des Pollens. Optimale Staubblätter für die Kreuzung sollten spätestens 12 h nach der Öffnung der Knospe entnommen werden. Zu alter Pollen ist nicht mehr befruchtungsfähig. Nach der Übertragung des Pollens auf die Empfängerpflanze wurde das Fruchtblatt vorsichtig mit etwas Folie umwickelt, um eine Austrocknung zu verhindern. Die Folie wurde nach 2-3 Tagen entfernt, um einen Befall durch Schimmelpilze zu vermeiden. Die Befruchtung wurde zu diesem Zeitpunkt gegebenenfalls wiederholt, um eine Befruchtung eventuell zu jung gewesener Fruchtblätter zu gewährleisten. Bei erfolgreicher Kreuzung war bereits nach 2-3 Tagen eine deutliche Verlängerung des Fruchtknotens zu erkennen. Begannen sich die Spitzen der gebildeten Schötchen gelblich zu verfärben, wurde die Wasserzufuhr gestoppt. Die Früchte reiften dann noch ca. 2 Wochen

nach, bevor sie geerntet wurden. Die Lagerung der Samen erfolgte unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur.

### 2.2.5.2. Selektion transgener *Arabidopsis*-Pflanzen

Die transgenen Pflanzen trugen eine Kanamycin- und/oder eine BASTA-Resistenz. BASTA-resistente Pflanzen wurden, wie oben beschrieben, auf Erde angezogen. Nachdem die Pflanzen mindestens 4 Laubblätter ausgebildet hatten, wurden sie mit einer BASTA-Lösung (200 mg/l) stark besprüht. Diese Prozedur wurde am darauf folgenden Tag wiederholt. Nach wenigen Tagen begannen die nichttransgenen Pflanzen abzusterben.

Da die erworbenen kanamycinresistenten Samen nur in geringer Menge vorhanden waren, wurden diese ebenfalls in Erde ohne Selektionsdruck angezogen. Die Überprüfung der Pflanzen auf Transgenität erfolgte über PCR.

Die F2-Generation der gekreuzten Pflanzen enthielt ein Gemisch aus nichttransgenen Pflanzen, Pflanzen, die nur je eine der beiden Resistenzen besaßen, und Pflanzen mit beiden Resistenzen. Deshalb wurden die Samen zunächst sterilisiert und auf Agarplatten mit Kanamycin (30 µg/ml) angezogen. Für die Sterilisation wurden die Samen in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und 1 min in 96% Ethanol geschwenkt. Nach Entfernen des Ethanols wurden die Samen in 15 ml 6% NaOCl + 0,04% Triton X-100 6-8 min geschwenkt. Anschließend wurden die Samen 5-mal mit aqua dest. gespült, in wenig aqua dest. aufgenommen und auf einer oder mehreren Platten verteilt. Die Platten wurden mit einem luftdurchlässigen Band verschlossen. Unter Lichtausschluss erfolgte eine 2-tägige Stratifikation der Samen bei 8°C. Danach wurden sie bei 22°C und 16/8 h Tag/Nacht inkubiert. Die überlebenden Pflanzen wurden nach Ausbildung von mindestens 6 Laubblättern vorsichtig aus dem Agar gelöst und in Erde umgesetzt. Nach wenigen Tagen Ruhe erfolgte die Besprühung der Pflanzen mit der BASTA-Lösung wie oben. Die Pflanzen mit beiden Resistenzen wurden dann für weitere Analysen bei 22°C und 16/8 h Tag/Nacht unter mäßiger Wasserzufuhr angezogen.

### 2.2.5.3. Isolierung pflanzlicher genomischer DNA

Die Isolierung der genomischen DNA aus *Arabidopsis* erfolgte mit dem GenElute Plant Genomic DNA Minprep Kit von Sigma. Von den zu untersuchenden Pflanzen wurde ca. 100 mg frisches Blattmaterial in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem N<sub>2</sub>

eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Das tiefgefrorene Blattmaterial wurde in einem Mörser in flüssigem  $\text{N}_2$  zerkleinert und in ein Reaktionsgefäß des GenElute Plant Mini Kits überführt. Aufarbeitung und Isolierung wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die genomische DNA wurde mit TE-Puffer von der Säulenmembran eluiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.5.4. PCR-Analyse der genomischen DNA

Mittels PCR wurde überprüft, ob es sich bei den T-DNA-Mutanten um heterozygote oder homozygote Disruptionsmutanten handelte. Für die PCR-Reaktionen wurden spezifische Primer (Tab. 4-Anhang), die *Taq*-Polymerase (NEB) und folgendes Programm verwendet:

Denaturierung:	95°C 5 min	
Denaturierung:	95°C 30 s	} 35x
Primer-Hybridisierung:	55°C 30 s	
Polymerisation:	72°C 2 min	
Polymerisation:	72°C 6 min	

Als Matrizen-DNA wurde genomische DNA der einzelnen Pflanzen verwendet. Die Auswertung der PCRs erfolgte über ein 1%iges (w/v) Agarose-TBE-Gel. Die DNA-Banden wurden mit SYBR<sup>®</sup>-Green unter UV-Licht sichtbar gemacht.

### 2.2.6. Weitere biochemische Methoden

#### 2.2.6.1. Extraktion der Gesamtlipide und Fraktionierung

Eine stationär gewachsene Zellkultur wurde bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $3000\times g$  für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in möglichst wenig 0,45% NaCl-Lösung (max. 1/10 des Kulturvolumens) resuspendiert und 10 min in kochendem Wasser erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde die Lösung 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $3000\times g$  zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Chloroform/Methanol 1:2 (ca. 1/20 des Kulturvolumens) resuspendiert und für mindestens 4 h bei  $8^{\circ}\text{C}$  geschüttelt (1. Extraktion). Nachdem die Lösung einige Minuten bei

RT und 2000 rpm (Hettich-Zentrifuge) zentrifugiert worden war, wurde der Überstand in einen Rundkolben überführt und das Pellet in Chloroform/Methanol 2:1 (gleiches Volumen wie Chloroform/Methanol 1:2) resuspendiert. Diese 2. Extraktion erfolgte unter Schütteln bei 8°C über Nacht. Nach Zentrifugation der Lösung (wie nach der 1. Extraktion) wurde der Überstand mit dem der 1. Extraktion vereinigt und am Rotationsverdampfer zur vollkommenen Trockene gebracht. Die getrockneten Lipide wurden in einem geringen Volumen Chloroform aufgenommen und über eine wattegestopfte Pasteurpipette filtriert.

Der Lipidextrakt wurde nun über Kieselgel-Säulen fraktioniert [264] und/oder qualitativ mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Für die Fraktionierung wurde der gesamte Lipidextrakt auf eine, bei großen Mengen auf mehrere Säulen aufgetragen. Der Lipidextrakt wurde in drei Fraktionen von der Säule eluiert. Die Elution der ersten Fraktion (Neutrallipide) erfolgte mit Chloroform, die der zweiten (Glycolipide) mit Aceton/Isopropanol 9:1 und die der dritten (Phospholipide) mit Methanol.

Für qualitative Analysen der Lipidextrakte wurden Kieselgel-Platten verwendet, die in Petrolether/Diethylether/Eisessig 70:30:0,5 (für Neutrallipide), Chloroform/Methanol 85:15 (für Glycolipide) oder Chloroform/Methanol/Eisessig 65:25:8 (für Phospholipide) entwickelt wurden. Neutral- und Phospholipide wurden vorzugsweise mit  $\text{CuSO}_4$ -Lösung und Veraschen sichtbar gemacht, Glycolipide mit  $\alpha$ -Naphthol/Schwefelsäure und Veraschen.

### 2.2.6.2. Isolierung von Cerebrosiden

Zur Gewinnung von Cerebrosiden wurde die Glycolipidfraktion unter Argon vollständig getrocknet. Die Isolierung der Cerebroside erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie. Dazu wurden Glas-DC-Platten (Kieselgel 60) verwendet, die im Laufmittel Chloroform/Methanol 85:15 entwickelt wurden. Als Standards wurden GlcCer und Sterolglucosid (SG) aufgetragen. Durch Besprühen mit ANS (8-Anilinonaphthalinsulfonat) wurden die Lipidbanden unter UV-Licht sichtbar gemacht und markiert. Nach vollständiger Entfernung der markierten Kieselgelbereiche von der Glasplatte wurden die Lipide mit 7,5 ml Chloroform/Methanol/0,45% NaCl 2:1:0,75 durch kräftiges Schütteln extrahiert. Die untere Chloroformphase wurde über eine wattegestopfte Pasteurpipette in ein neues Sovirell-Gläschen überführt, die obere, wässrige Phase mit 4 ml Chloroform nachextrahiert. Die vereinigten Chloroformphasen wurden unter Argon getrocknet. Die Lagerung der GlcCer erfolgte in Chloroform/Methanol 2:1 bei -20°C.

### 2.2.6.3. Acetylierung von Lipiden

Bestimmte GlcCer-Spezies lassen sich in den Laufmitteln für Glycolipide nur schwer von SG trennen. Durch Acetylierung werden die Laufeigenschaften unterschiedlich stark verändert. Die getrockneten Lipide wurden mit je 500 µl trockenem Pyridin und 200 µl Essigsäureanhydrid versetzt, die Gefäße sofort verschlossen und ü. N. bei RT inkubiert. Mit PE/DE/0,45% NaCl 1:1:0,5 wurden die acetylierten Lipide extrahiert. Durch mehrmaliges Waschen der oberen PE-Phase mit 0,5 Volumen 0,45% NaCl wurde überschüssiges Pyridin entfernt. Die gewaschene PE-Phase wurde unter Argon getrocknet. Die Dünnschichtchromatographie erfolgte über Kieselgel-Platten in PE/DE 1:1. Mittels  $\alpha$ -Naphthol/Schwefelsäure und Veraschen wurden die Lipide sichtbar gemacht.

### 2.2.6.4. Isolierung von Sphingobasen durch $Ba(OH)_2$ -Hydrolyse nach Morrison et al. [265]

In einem Sovirell-Gläschen wurden  $\leq 0,5$  g des Ausgangsmaterials (Zellen oder gereinigtes und getrocknetes Cerebosid) in 1,5 ml  $H_2O$  resuspendiert. Nach Zugabe von 1,5 ml 1,4-Dioxan und ca. 300 mg  $Ba(OH)_2$  wurde die Probe fest verschlossen, gut gemischt und 20 h bei  $110^\circ C$  im Heizblock erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 2,5 ml  $H_2O$  und 4 ml Chloroform zugegeben, so dass sich ein Verhältnis von  $H_2O$ /Dioxan/Chloroform 8:3:8 ergab. Dann wurde die Probe kräftig geschüttelt und ein paar Minuten bei RT und 3000 rpm zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge), bis sich eine saubere Phasentrennung eingestellt hatte. Die Chloroformphase (unten) wurde in ein 20 ml-Schliffgläschen überführt und die obere, wässrige Phase mit 4 ml Chloroform nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 8 ml 0,1 M KOH/0,5 M KCl gewaschen und bei RT und 2500 rpm zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge). Die untere, organische Phase wurde ein weiteres Mal mit 8 ml 0,1 M KOH/0,5 M KCl gewaschen, wie oben zentrifugiert und unter Argon getrocknet.

### 2.2.6.5. DNP-Derivatisierung von Sphingobasen

Die freigesetzten Sphingobasen wurden in 200 µl FDNB-Lösung gelöst und mit 800 µl Borat-Puffer tropfenweise unter ständigem Vortexen versetzt. Die fest verschlossene Probe wurde dann 30 min bei  $60^\circ C$  im Heizblock erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden 1,2 ml  $H_2O$ , 1,8 ml Methanol und 4 ml Chloroform zugegeben, so dass sich ein Verhältnis  $H_2O$ /Methanol/Chloroform 4:2:4 ergab. Die Probe wurde kräftig geschüttelt und ein paar Minuten bei RT und 3000 rpm zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge), bis sich eine saubere

Phasentrennung eingestellt hatte. Die untere, organische Phase wurde in ein neues Sovirell-Gläschen überführt, die obere, wässrige Phase mit 4 ml Chloroform nachextrahiert. Die vereinigten Chloroformphasen wurden unter Argon abgedampft.

An die Derivatisierung der Sphingobasen schloss sich eine Reinigung mittels Dünnschichtchromatographie an. Dazu wurden die LCBs in einer geeigneten Menge (50-300  $\mu$ l) Chloroform/Methanol 2:1 aufgenommen und auf einer Glas-DC-Patte (Kieselgel 60) aufgetragen. Als Standard wurde ein Gemisch aus DNP-derivatisierten LCBs (d18:0 + t18:0) verwendet. Als mobile Phase wurde Chloroform/Methanol 9:1 verwendet. Die Lipidbanden waren unter UV-Licht sichtbar (DNP-derivatisierte LCBs erscheinen dunkelblau) und wurden mit einem Bleistift markiert. Die markierten Bereiche des Kieselgels wurden sorgfältig von der Glasplatte gekratzt und in ein Sovirell-Gläschen überführt. Nach Zugabe von 6 ml Chloroform/Methanol 2:1 und 1,5 ml 0,45% NaCl wurde die Probe kräftig geschüttelt, wobei die LCBs aus dem Kieselgel extrahierten und in die Chloroformphase übergingen. Die Probe wurde zur schnelleren Phasentrennung einige Minuten bei RT und 3000 rpm zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge). Die untere, organische Phase wurde in ein neues Sovirell-Gläschen überführt und die obere, wässrige Phase mit 4 ml Chloroform nachextrahiert. Die vereinigten Chloroformphasen wurden unter Argon abgedampft und die LCBs in einer geeigneten Menge (150-500  $\mu$ l) Methanol aufgenommen und bei -20°C gelagert.

### 2.2.6.6. Analyse der Sphingobasen mittels HPLC

Die HPLC-Untersuchungen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Verwendet wurde eine 250 mm lange und 4 mm durchmessende Reversed Phase-Säule (Multisphere 100 RP 18-5). Als mobile Phase dienten die Laufmittel A – H<sub>2</sub>O und Laufmittel B – Methanol/Acetonitril/ Isopropanol 10:3:1. Der Lauf erfolgte über einen konkaven Gradienten von 84 auf 100% Laufmittel B in 55 min und anschließend für 5 min isokratisch mit 100% Laufmittel B bei einer Flussrate von 0,8 ml/min. Die DNP-derivatisierten Sphingobasen wurden mittels UV bei 350 nm detektiert.

### 2.2.6.7. Analyse der Sphingobasen mittels HPLC/MS

Die Analyse der DNP-derivatisierten Sphingobasen mittels HPLC-ESI-MS wurde von Herrn Dr. Stephan Franke am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt. Die Durchführung der MS erfolgte auf einem MAT 95XL-Trap-

Massenspektrometer von Thermoquest mit *Electrospray*-Ionisation (ESI) und hochauflösendem Quadrupol mit nachgeschalteter Ionenfalle. Alle Messungen wurden im negativen Ionenmodus durchgeführt.

Die DNP-derivatisierten Sphingobasen wurden zunächst über ein HPLC-System (Hitachi) aufgetrennt. Ein kleiner Teil der Probe wurde anschließend über ein Splitventil in das MS eingelassen. Während des HPLC-Laufs erfolgte eine Echtzeitaufzeichnung des Massenspektrums im Bereich  $m/z = 300$  bis 1200 und die Bestimmung des Gesamtionenstroms. HPLC-Säule und Laufbedingungen waren mit denen in Abschn. 2.2.6.6. identisch.

### 2.2.6.8. Analyse von Fettsäuren

Die in Sphingolipiden enthaltenen Fettsäuren wurden in Fettsäuremethylester umgewandelt. Dazu wurden trockene Zellpellets oder Lipide in Sovirell-Gläschen mit 1 ml FAMES-Lösung versetzt, fest verschlossen und 1 h (Lipide) bzw. ü. N. (Zellpellet) bei 80°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit 1 ml 0,9% (w/v) NaCl und 1 ml PE versetzt, kräftig geschüttelt und zur schnelleren Phasentrennung kurz zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und die wässrige Phase mit 1 ml PE nachextrahiert. Die vereinigten PE-Phasen wurden unter Argon getrocknet. Zur Analyse der FAMES mittels DC wurden die Proben in geringen Mengen Chloroform/Methanol 2:1 aufgenommen und auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetragen. Als mobile Phase wurde PE:DE:EE 70:30:0,5 verwendet. Die Färbung der Lipide erfolgte mit CuSO<sub>4</sub>-Lösung und Veraschen.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, durch den Einsatz verschiedener Mutanten den Sphingolipidmetabolismus bei ausgewählten Vertretern von Pilzen und Pflanzen zu untersuchen. Zur Klärung der verschiedenen Fragestellungen wurde die Arbeit in mehrere Teile gegliedert:

In einem ersten Abschnitt sollte anhand verschiedener *P. pastoris*-Mutanten die Reaktionsfolge für die Modifikation von Sphingobasenresten aufgeklärt werden.

In einem weiteren Abschnitt wurde die Wirkung pflanzlicher Defensine auf die verschiedenen *P. pastoris*-Mutanten und deren GlcCer untersucht, wobei ein Zusammenhang zwischen der GlcCer-Struktur der Pilze und der Wirkung pflanzlicher Defensine gefunden werden sollte.

Schließlich sollte die Identifizierung der Sphingolipid-modifizierenden Enzyme in *U. maydis* sowie die Herstellung eines ersten Deletionskonstrukts für die Transformation von *M. grisea* die Basis zur Herstellung der entsprechenden Deletionsmutanten bei diesen phytopathogenen Pilzen sein. Aus zeitlichen Gründen waren die Mutantenherstellung und -analyse jedoch nicht mehr Bestandteile dieser Arbeit.

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit sollten aus Phänotypen von *Arabidopsis*-T-DNA-Mutanten Rückschlüsse auf die Funktionen desaturierter Sphingolipide erhalten werden.

Die im nachfolgenden Text und in den Legenden verwendeten Kurzformen für die verschiedenen Stämme sind in Tab. 3 erklärt.

**Tab. 3 Erklärung der verwendeten Kurzformen.**

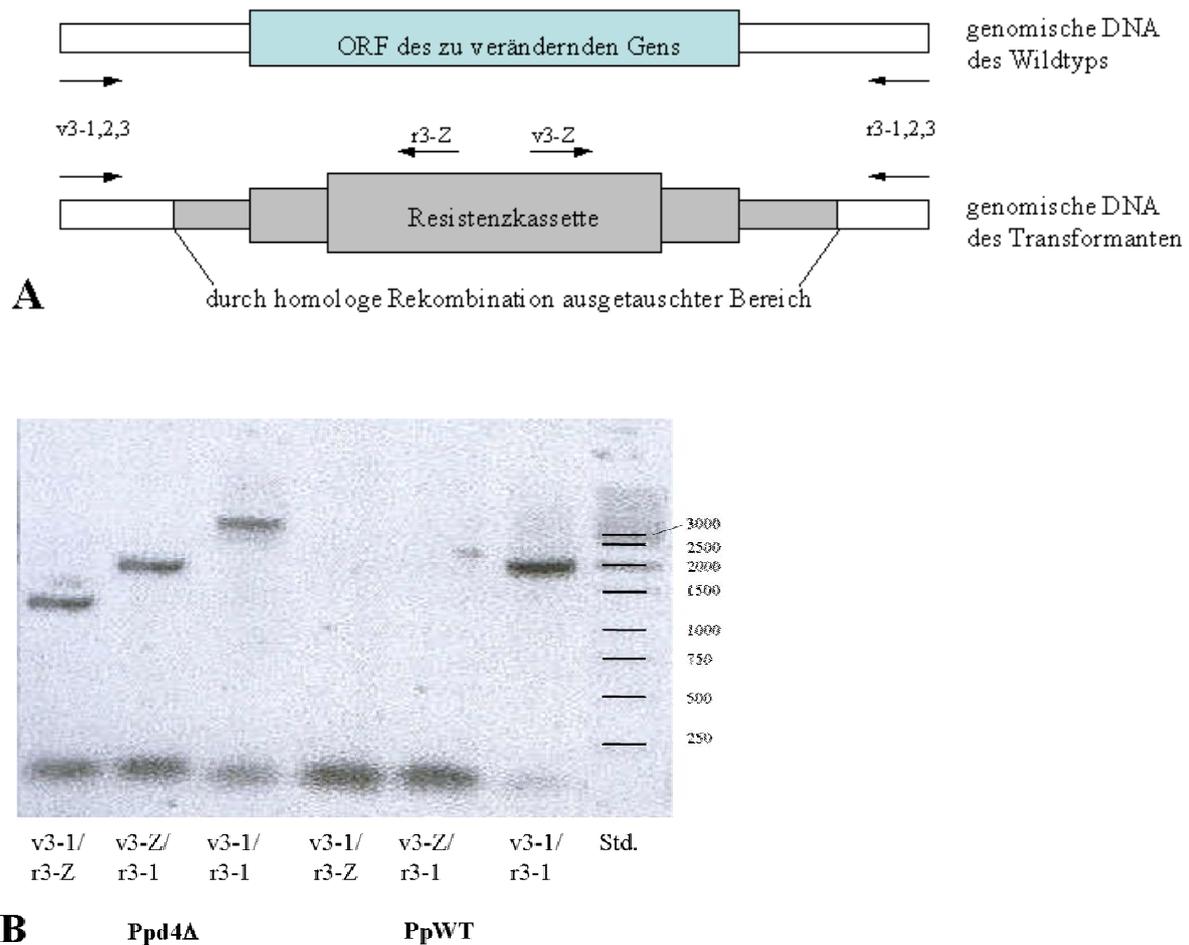
Stamm	Kurzform
<i>P. pastoris</i> GS115	PpWT
<i>P. pastoris</i> MF3KR5	PpMF
<i>P. pastoris</i> GS115 mit $\Delta 4$ -Desaturase-Deletion	Ppd4 $\Delta$
<i>P. pastoris</i> GS115 mit $\Delta 8$ -Desaturase-Deletion	Ppd8 $\Delta$
<i>P. pastoris</i> GS115 mit Fettsäurehydroxylase-Deletion	PpGscs7
<i>P. pastoris</i> MF3KR5 mit Fettsäurehydroxylase-Deletion	PpMscs7
<i>P. pastoris</i> GS115 mit C9-Methyltransferase-Deletion	PpC9M
<i>P. pastoris</i> GS115 mit Glucosylceramidsynthase-Deletion	Ppgcs
<i>P. pastoris</i> GS115 mit $\Delta 4$ -Desaturase-Deletion und Expression der GCS aus <i>P. pastoris</i>	Ppd4 $\Delta$ GCS
<i>P. pastoris</i> GS115 mit $\Delta 4$ -Desaturase-Deletion und Expression der $\Delta 4$ -Desaturase aus <i>U. maydis</i>	PpUmd4D
<i>P. pastoris</i> GS115 mit $\Delta 8$ -Desaturase-Deletion und Expression der $\Delta 8$ -Desaturase aus <i>U. maydis</i>	PpUmd8D
<i>P. pastoris</i> GS115 mit Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylase-Deletion und Expression der GCS aus <i>P. pastoris</i>	Ppscs7GCS
<i>S. cerevisiae</i> TDY2037- <i>sur2A</i>	Scsur2 $\Delta$
<i>S. cerevisiae</i> TDY2037- <i>sur2A</i> mit Expression der $\Delta 4$ -Desaturase aus <i>U. maydis</i>	ScUmd4D
<i>S. cerevisiae</i> TDY2037- <i>sur2A</i> mit Expression der C4-Hydroxylase aus <i>U. maydis</i>	ScUmC4H

#### 3.1. Durch Deletion der Gene Sphingolipid-modifizierender Enzyme in *P. pastoris* erhält man Mutanten mit ungewöhnlichen Sphingolipidzusammensetzungen

Die Deletion der Gene, die die Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase ( *$\Delta 4Des$* ) (AY700778) und die  $\Delta 8$ -Desaturase ( *$\Delta 8Des$* ) (AY700777) sowie die putative Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylase (*SCS7*) codieren, erfolgte durch homologe Rekombination. Dazu wurden Konstrukte hergestellt, die eine Zeocin-Resistenzkassette enthielten, die von ca. 500 bp langen Bereichen flankiert wurde. Die Sequenzen der flankierenden Bereiche entsprachen dabei den *up-* bzw. *downstream* Bereichen des im Wildtyp vorhandenen ORFs des jeweiligen Gens. Die flankierenden Bereiche der beiden Desaturase-Deletionskonstrukte enthielten aufgrund der gewählten Strategie zusätzlich Teilsequenzen der ORF-Bereiche. Die Histidinboxen-

### 3. Ergebnisse und Diskussion

codierenden Sequenzbereiche und damit wichtige Teile der aktiven Zentren wurden jedoch komplett durch die Resistenzkassette ersetzt. Nach Transformation des *P. pastoris*-Stammes GS115 mit den linearisierten Deletionskonstrukten wurden die Klone zunächst aufgrund der Zeocinresistenz selektioniert. Die genomische DNA der vereinzelt Klone wurde mittels PCR überprüft. In Abb. 14 ist dies beispielhaft für die Deletion der  $\Delta 4$ -Desaturase dargestellt.



**Abb. 14 Deletion der Gene Sphingolipid-modifizierender Enzyme in *P. pastoris*.** In **A** sind die Primerpaarungen zur Überprüfung der Transformationen dargestellt. **B** zeigt beispielhaft die PCR-Produkte für die Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase-Deletionsmutante. Die Auftrennung erfolgte in einem 1%igen TBE-Agarosegel, die Färbung mit SYBR-Green.

Für jeden Klon wurden jeweils drei PCRs durchgeführt, wobei die in Abb. 14 (siehe auch Tab. 3-Anhang) erklärten Primerkombinationen verwendet wurden. Klone mit der Insertion der Resistenzkassette an der gewünschten Stelle im Genom lieferten für alle drei PCRs charakteristische Banden (Abb. 13). Klone, bei denen die Resistenzkassette an anderer Stelle

im Genom integriert worden war, lieferten nur bei der PCR mit der Primerkombination v3-1,2,3/r3-1,2,3 eine Bande mit einer Größe, die charakteristisch für das Wildtyp-Allel ist. Die für die verschiedenen Deletionsmutanten erwarteten Banden sind in Tab. 4 dargestellt.

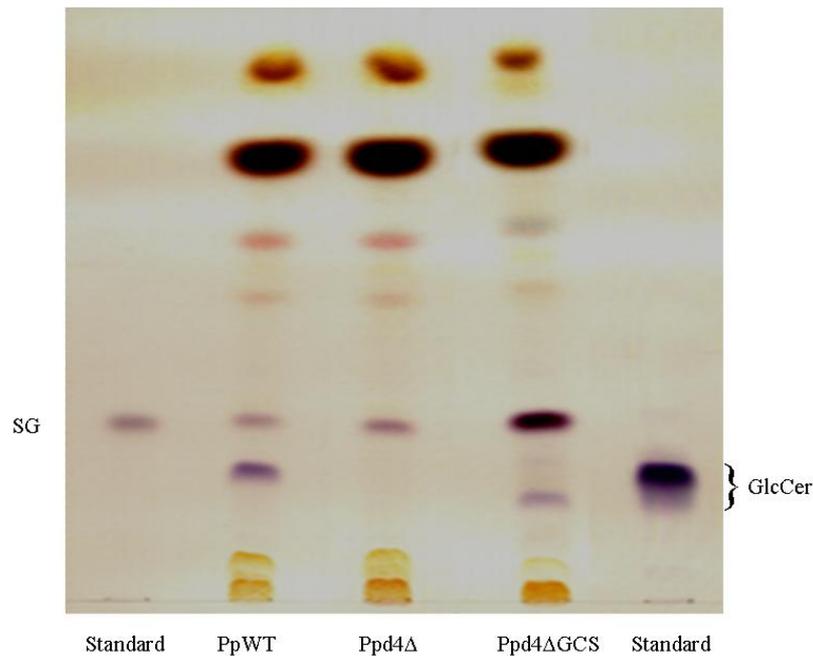
**Tab. 4 Die verschiedenen Deletionsmutanten mit ihren charakteristischen PCR-Banden.**

Transformant	Primerpaarung	PCR-Bande	Kontrolle	Primerpaarung	PCR-Bande
Ppd4 $\Delta$	v3-1/r3-Z	1,1 kb	PpWT	v3-1/r3-Z	-
	v3-Z/r3-1	1,5 kb		v3-Z/r3-1	-
	v3-1/r3-1	3,0 kb		v3-1/r3-1	1,7 kb
Ppd8 $\Delta$	v3-1/r3-Z	1,0 kb	PpWT	v3-1/r3-Z	-
	v3-Z/r3-1	1,4 kb		v3-Z/r3-1	-
	v3-1/r3-1	2,4 kb		v3-1/r3-1	2,3 kb
PpGscs7 $\Delta$ / PpMscs7 $\Delta$	v3-1/r3-Z	1,2 kb	PpWT/ PpMF	v3-1/r3-Z	-
	v3-Z/r3-1	1,2 kb		v3-Z/r3-1	-
	v3-1/r3-1	2,8 kb		v3-1/r3-1	2,8 kb

Aus jeder Transformation wurden mehrere unabhängige Klone mittels PCR analysiert und jeweils zwei Deletionsmutanten für die Sphingolipid-Desaturasen (Ppd4 $\Delta$  bzw. Ppd8 $\Delta$ ) sowie die Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylase (PpGscs7 $\Delta$ /PpMscs7 $\Delta$ ) identifiziert.

#### 3.1.1. Die Deletion der Sphingolipid- $\Delta$ 4-Desaturase in *P. pastoris* führt zum Verlust der Glucosylceramide

Die Lipide von zwei unabhängigen *4des*-Mutanten und PpWT als Kontrolle wurden mit Chloroform/Methanol extrahiert und über DC analysiert (Abb. 15).



**Abb. 14** Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipidextrakte von PpWT und den Mutanten Ppd4 $\Delta$  sowie Ppd4 $\Delta$ GCS. Die Auftrennung der Lipide erfolgte in Chloroform/Methanol 85:15, die Färbung mit  $\alpha$ -Naphthol/Schwefelsäure und Veraschung. SG = Sterolglucosid, GlcCer = Glucosylceramid

Die Analyse der *Δdes*-Mutante (Ppd4 $\Delta$ ) zeigte einen kompletten Verlust der GlcCer, der durch verschiedene Annahmen erklärt werden kann, von denen einige nahe liegende nachfolgend aufgezählt werden:

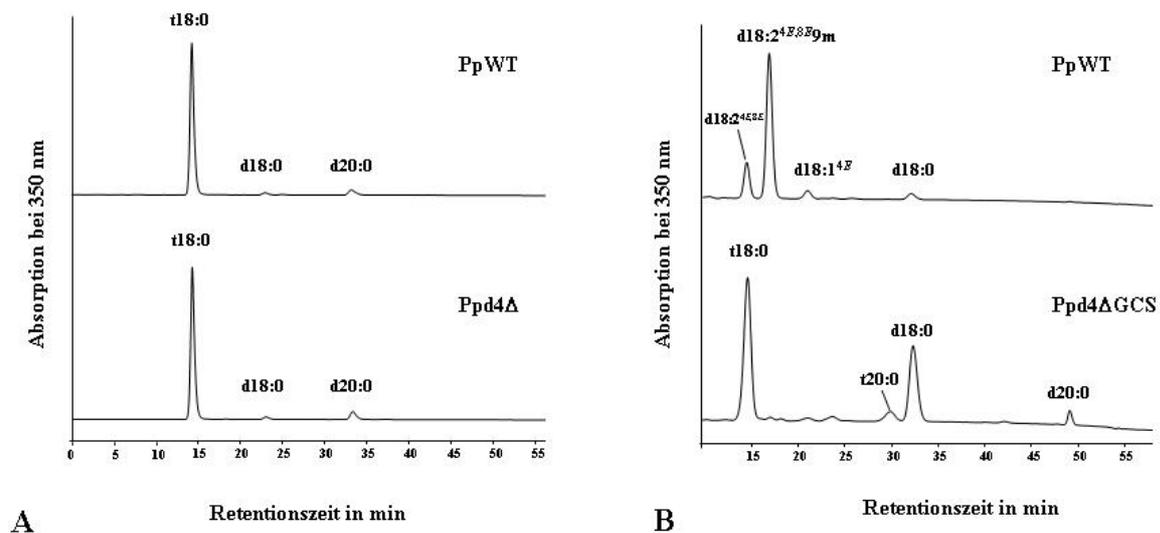
- (i) Die Glucosylceramid-Synthase (GCS) akzeptiert nur  $\Delta$ 4-desaturierte Ceramide als Substrate.
- (ii) Der Biosyntheseort der GCS-Substrate (wahrscheinlich ER) ist vom Ort der GCS-Aktivität (wahrscheinlich Golgi-Apparat) räumlich getrennt. Damit ist ein Substrattransport an den Ort der Umsetzung notwendig, der wegen des Fehlens  $\Delta$ 4-desaturierter Sphingobasen bzw. Ceramide nicht stattfindet.
- (iii) Die Biosynthese der GCS wird herunterreguliert.
- (iv) Die Biosynthese der Substrate wird herunterreguliert.

Zur Überprüfung dieser Annahmen wurde zunächst die *GCS* aus *Pichia* (*PGCS*) in Ppd4 $\Delta$  überexprimiert, um Informationen zu den in Ppd4 $\Delta$  noch vorhandenen Ceramidgerüsten zu erhalten. Dazu wurde der ORF der *PGCS* in pPIC3.5 kloniert, der den starken *AOX1*-

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Promotor (Promotor der *Pichia*-eigenen Alkoholoxidase 1) enthält. Die linearisierte Vektor-DNA kann im *Pichia*-Genom sowohl in das *AOX1*- als auch in das *HIS4*-Gen durch homologe Rekombination integrieren. Für die Expression der *PGCS* unter dem *AOX1*-Promotor waren jedoch nur Integrationen in das *AOX1*-Gen erwünscht, so dass die Selektion der Expressionsmutanten sowohl durch Histidin-Auxotrophie als auch anhand ihrer Fähigkeit zur Methanolmetabolisierung erfolgte. Dabei wurden mehrere unabhängige Klone (Ppd4ΔGCS) identifiziert. Die Lipide der positiven Klone wurden mit Chloroform/Methanol extrahiert und analysiert (Abb. 15). Die Expressionsmutante Ppd4ΔGCS synthetisierte wieder GlcCer.

Nun stellte sich die Frage, welche Substrate die GCS zur Synthese von GlcCer verwendet hatte. Um die Sphingobasenzusammensetzung der in Ppd4ΔGCS synthetisierten GlcCer zu identifizieren, wurden die GlcCer durch präparative DC isoliert und mit Ba(OH)<sub>2</sub> hydrolysiert. Die DNP-derivatisierten Sphingobasen wurden über DC gereinigt und mittels HPLC (Abb. 16) und HPLC-MS analysiert. Die relativen Mengen der Sphingobasen sind in Tab. 5 dargestellt.



**Abb. 16 HPLC-Analyse der DNP-derivatisierten Sphingobasen aus PpWT, Ppd4Δ und Ppd4ΔGCS.** In **A** sind die Gesamtsphingobasen (isoliert aus ganzen Zellen) von PpWT und Ppd4Δ, in **B** die aus den GlcCer isolierten Sphingobasen von PpWT und Ppd4Δ dargestellt. Die Identifizierung der Peaks erfolgte mittels HPLC-MS.

Ein Vergleich der Gesamtsphingolipide aus PpWT und Ppd4Δ (Abb. 16A und Tab. 5) zeigte keine sichtbaren Veränderungen in den Sphingobasensmustern vor und nach Deletion der

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase. Desaturierte Sphingobasen findet man in *P. pastoris* hauptsächlich in GlcCer. Da GlcCer nur einen sehr geringen Teil der gesamten in Membranen vorkommenden Sphingolipide ausmachen [263], konnten die Hauptkomponenten der GlcCer, d18:1<sup>4E</sup>, d18:2<sup>4E,8E</sup> und d18:2<sup>4E,8E</sup>9m, in den Gesamtsphingolipiden nicht in signifikanter Menge nachgewiesen werden.

Die relativen Mengen der Hauptkomponenten der Gesamtsphingolipide (Tab. 5) zeigten keinen Unterschied im Vergleich zwischen PpWT und Ppd4 $\Delta$ , was darauf hindeutet, dass die Deletion der Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase keine nachweisbaren Auswirkungen auf die Biosynthese von d18:0, d20:0 sowie t18:0 hatte. Die Überexpression der PGCS in Ppd4 $\Delta$  lieferte GlcCer, deren Analyse Aufschluss über die molekularen Ceramidspezies der *A4des*-Deletionsmutante bringen sollte (Abb. 16B und Tab. 5).

**Tab. 5 Relative Mengen der Sphingobasen aus PpWT, Ppd4 $\Delta$  und Ppd4 $\Delta$ GCS.**

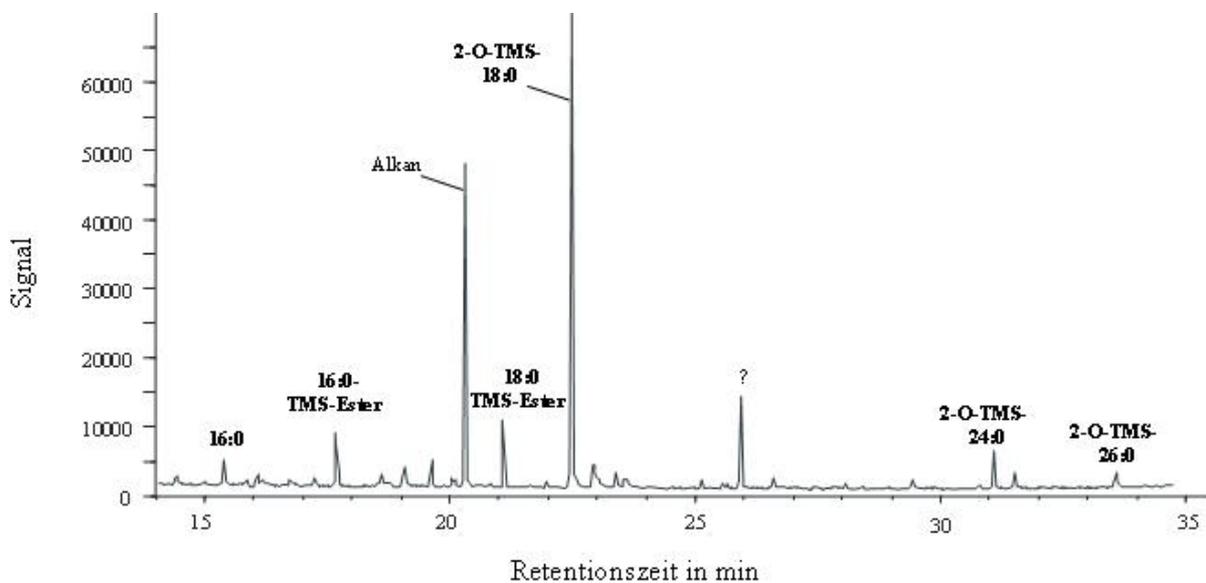
Stamm	Analyse	Sphingobase	rel. Menge in mol%
PpWT	Gesamtsphingolipide	d18:0	2
		d20:0	6
		t18:0	92
	GlcCer	d18:0	4
		d18:1 <sup>4E</sup>	5
		d18:2 <sup>4E,8E</sup>	17
		d18:2 <sup>4E,8E</sup> 9m	74
Ppd4 $\Delta$	Gesamtsphingolipide	d18:0	2
		d20:0	7
		t18:0	91
Ppd4 $\Delta$ GCS	GlcCer	d18:0	35
		d20:0	4
		t18:0	56
		t20:0	5

In PpWT-Zellen verwendet die GCS Ceramide als Substrate, die entweder d18:0, d18:1<sup>4E</sup>, d18:2<sup>4E,8E</sup> oder d18:2<sup>4E,8E</sup>9m enthalten. Die Ceramide der Deletionsmutanten Ppd4Δ und Ppd4ΔGCS enthalten keine desaturierten Sphingobasen mehr. Leipelt et al. und Levery et al. stellten die Hypothese auf, dass zwei verschiedene Ceramid-Pools in Pilzen existieren, die als Substrate für die Biosynthese von IPCs bzw. von GlcCer dienen [30,264]. Dabei sollten die Ceramide des Pools für die IPCs nur t18:0 und d18:0 sowie deren Homologe mit 20 C-Atomen enthalten, während die Ceramide des Pools zur Biosynthese von GlcCer nur d18:1<sup>4E</sup>, d18:2<sup>4E,8E</sup>, d18:2<sup>4E,8E</sup>9m sowie in Spuren d18:0 besitzen. Bei der Überexpression der PGCS setzte die GCS auch Ceramide um, die in PpWT ausschließlich zur Synthese von IPCs genutzt werden, nämlich t18:0 und t20:0. Da in Ppd4ΔGCS auch GlcCer mit nichtdesaturierten Sphingobasen gefunden wurden, konnte die Annahme, dass die GCS nur Δ4-desaturierte Ceramide umsetzt, damit widerlegt und die Ergebnisse von Leipelt et al. [30] bestätigt werden.

Die Trennung der beiden Sphingolipid-Biosynthesewege erfolgt wahrscheinlich räumlich durch Lokalisation der Enzyme und/oder der entsprechenden Ceramid-Pools in unterschiedlichen Membransystemen. Dadurch würde erreicht werden, dass sich nur bestimmte Sphingobasen in den Endprodukten der beiden Biosynthesewege wieder finden, Hydroxysphingarin in IPCs und desaturierte Sphingobasen in GlcCer. Bei der Überexpression der PGCS wurde wahrscheinlich sehr viel Enzym gebildet, das nicht alles korrekt zu den Zielmembranen transportiert werden konnte und die Membransysteme der Zelle praktisch überschwemmte. Dadurch wurde die räumliche Trennung von Substrat und Enzym wahrscheinlich aufgehoben. Ein möglicher Ansatz zur Überprüfung der Annahmen (ii) und (iii) wäre die Lokalisierung der GCS in normalen und in überexprimierenden Zellen sowohl von PpWT als auch der Δ4des-Deletionsmutante. Dies könnte mit klassischer Zellfraktionierung in Kombination mit modernen immunologischen Methoden erfolgen. Es wäre aber auch möglich, entsprechende Fusionsproteine, z.B. GCS-GFP, in den Zellen zu exprimieren und sie durch mikroskopische Methoden in der Zelle zu lokalisieren. Da die Zellen von *P. pastoris* jedoch sehr klein sind, ist eine lichtmikroskopische Identifizierung der subzellulären Strukturen sehr schwer. Die Methode der Immunogold-Lokalisierung [265-268] von GFP ermöglicht die Visualisierung der GFP-Fusionsproteine mittels Transmissionselektronenmikroskopie, wobei die als schwarze Punkte erscheinenden Goldmarkierten Proteine eindeutig den subzellulären Strukturen zugeordnet werden können. Die Durchführung dieser Versuche war im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Da in Ppd4ΔGCS keine der für GlcCer spezifischen Sphingobasen zu finden waren, lag die Vermutung nahe, dass die Deletion der Δ4-Desaturase den Verlust des gesamten Ceramid-Pools für die GlcCer-Biosynthese zur Folge hatte. Um diese Vermutung zu beweisen wurden die aus Ppd4ΔGCS isolierten GlcCer mit methanolischer Schwefelsäure hydrolysiert, die Amid-gebundenen Fettsäurereste als Methylester freigesetzt und mittels GC analysiert (Abb. 17). Die Analyse ergab, dass die GlcCer α-hydroxylierte Fettsäuren sowohl mit 16 als auch 18, 24 sowie 26 C-Atomen enthielten. Das dabei ermittelte Verhältnis war 16:0 (2-OH) : 18:0 (2-OH) : 24:0 (2-OH) : 26:0 (2-OH) = 2 : 10 : 2 : 1. Die Hauptkomponenten der GlcCer aus Ppd4ΔGCS waren demnach t18:0 als Sphingobasenrest und 18:0 als Fettsäurerest.



**Abb. 17 GC-Analyse der Fettsäurereste der GlcCer aus Ppd4ΔGCS.** Die Identifizierung der Peaks erfolgte durch GC-MS.

Hätte die PGCS in Ppd4ΔGCS nur Ceramide aus dem Pool zur IPC-Biosynthese verwendet, müssten ausschließlich GlcCer mit sehr langkettigen Fettsäuren gebildet worden sein, da IPCs ebenfalls nur sehr langkettige α-hydroxylierte Fettsäurereste (24 bzw. 26 C-Atome) besitzen. Die GC-Analyse ergab jedoch, dass die GlcCer-typischen Fettsäurereste 16:0 (2-OH) und 18:0 (2-OH) viermal häufiger auftraten als die IPC-typischen 24:0 (2-OH) und 26:0 (2-OH). Die Analyse der zugehörigen Sphingobasenreste ergab ein Verhältnis von t18:0 : d18:0 : t20:0 : d20:0 = 15 : 9 : 1 : 1. Aus diesen Verhältnissen ergibt sich zwangsläufig, dass in Ppd4ΔGCS auch GlcCer mit 16/18:0 (2-OH)-d18:0 vorhanden sein müssen, die auch in GlcCer aus PpWT

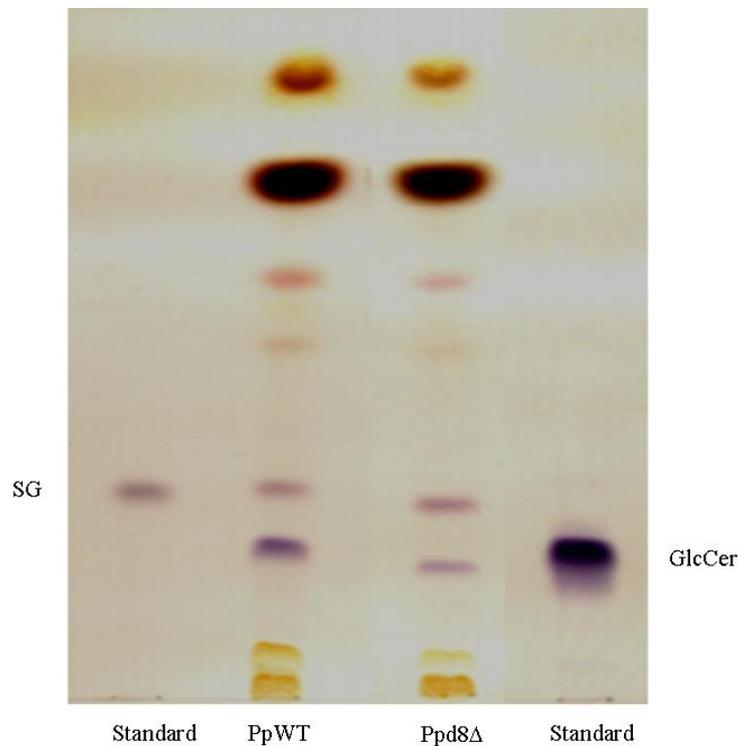
nachgewiesen wurden (Abb. 16B). Damit wird die Annahme, dass die Biosynthese der Substrate durch die Deletion der  $\Delta 4$ -Desaturase herunterreguliert wird, widerlegt, da eindeutig GlcCer-typische Ceramide in Ppd4 $\Delta$ GCS nachgewiesen werden konnten. Somit standen auch der PGCS in Ppd4 $\Delta$  Substrate zur Verfügung.

Wie in PpWT unterschied sich auch in der Deletionsmutante Ppd4 $\Delta$ GCS das Sphingobasenummuster der GlcCer vom Gesamtsphingolipidmuster (Abb. 16). In den GlcCer von Ppd4 $\Delta$ GCS wurde ein hoher Anteil an d18:0 nachgewiesen. d18:0 tritt, wie oben bereits erwähnt, auch bei den GlcCer von PpWT auf. Würden jedoch die in Ppd4 $\Delta$ GCS detektierten GlcCer-typischen Fettsäurereste alle aus Ceramiden des ursprünglichen Pools zur Biosynthese von GlcCer stammen, müsste der Anteil von d18:0 in den GlcCer aus Ppd4 $\Delta$ GCS mindestens viermal so hoch sein wie t18:0, da bisher keine Ceramidspezies mit 16/18:0 (2-OH)-t18:0, sondern nur solche mit 16/18:0 (2-OH)-d18:0 in *P. pastoris* nachgewiesen wurden [30]. Die durch GC ermittelten Verhältnisse zwischen den verschiedenen Fettsäureresten deuten darauf hin, dass in Ppd4 $\Delta$  und Ppd4 $\Delta$ GCS die PpWT-untypischen Ceramid-Spezies 18:0 (2-OH)-t18:0 bzw. 16:0 (2-OH)-t18:0 gebildet wurden. Dieses unerwartete Ergebnis zeigt die Komplexität in der Abstimmung der Biosynthesewege von Teilkomponenten der Sphingolipide bei Pilzen, da schon das Fehlen eines einzelnen Enzyms zur Vermischung ursprünglich getrennter Biosynthesewege führen kann.

Die Analyse der Sphingobasenzusammensetzung der GlcCer von Ppd4 $\Delta$ GCS und der Verlust der GlcCer nach Deletion der  $\Delta 4$ -Desaturase zeigte, dass die  $\Delta 4$ -Desaturierung ein essentieller Schritt in der Biosynthese der GlcCer ist, der wahrscheinlich auf der Ebene der Ceramide abläuft und damit die Substrate für die  $\Delta 8$ -Desaturase und die C9-Methyltransferase liefert. Ternes et al. zeigten, dass die  $\Delta 8$ -Desaturase aus *P. pastoris* auch Sphingamin in 8-Sphingenin umsetzen kann. Da jedoch kein d18:1<sup>8E</sup> in Ppd4 $\Delta$ GCS nachgewiesen werden konnte, ist es möglich, dass bei dem Verlust  $\Delta 4$ -desaturierter Sphingolipide für die  $\Delta 8$ -Desaturase ein ähnliches Problem auftritt wie für die GCS. Durch die Herstellung und Analyse von  $\Delta 8des$ - bzw. C9m-Deletionsmutanten sollte daher versucht werden, die Sequenz in der Abfolge dieser drei Modifikationen der Sphingobasenereste aufzuklären.

3.1.2. Die Herstellung der Sphingolipid- $\Delta 8$ -Desaturase-Deletionsmutante ermöglicht die Analyse der Reaktionssequenz bei der Modifikation von Sphingobasenreste

Die Lipide von zwei unabhängigen  $\Delta 8des$ -Deletionsmutanten (Ppd8 $\Delta$ ) sowie PpWT als Kontrolle wurden mit Chloroform/Methanol extrahiert und über DC analysiert (Abb. 18). Im Gegensatz zur Deletion der  $\Delta 4$ -Desaturase führte die Deletion der Sphingolipid- $\Delta 8$ -Desaturase zu keiner Veränderung des Glycolipdmusters. Zur Analyse der Sphingobasenzusammensetzung der GlcCer wurden diese wie oben beschrieben isoliert, derivatisiert und mittels HPLC analysiert (Abb. 19).



**Abb. 18** Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipidextrakte aus PpWT und Ppd8 $\Delta$ . Die Auftrennung der Lipide erfolgte in Chloroform/Methanol 85:15, die Färbung mit  $\alpha$ -Naphthol/Schwefelsäure und Veraschung. SG = Sterolglucosid, GlcCer = Glucosylceramid

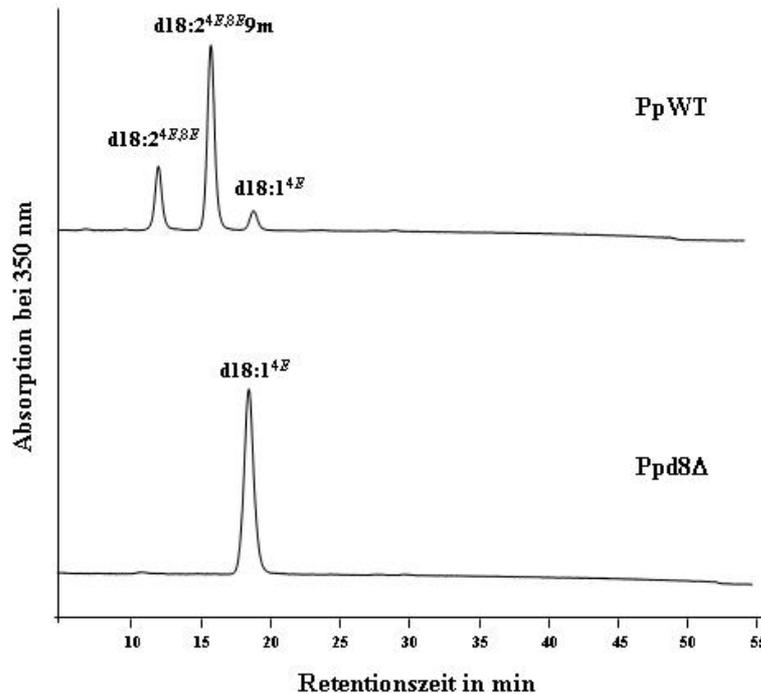
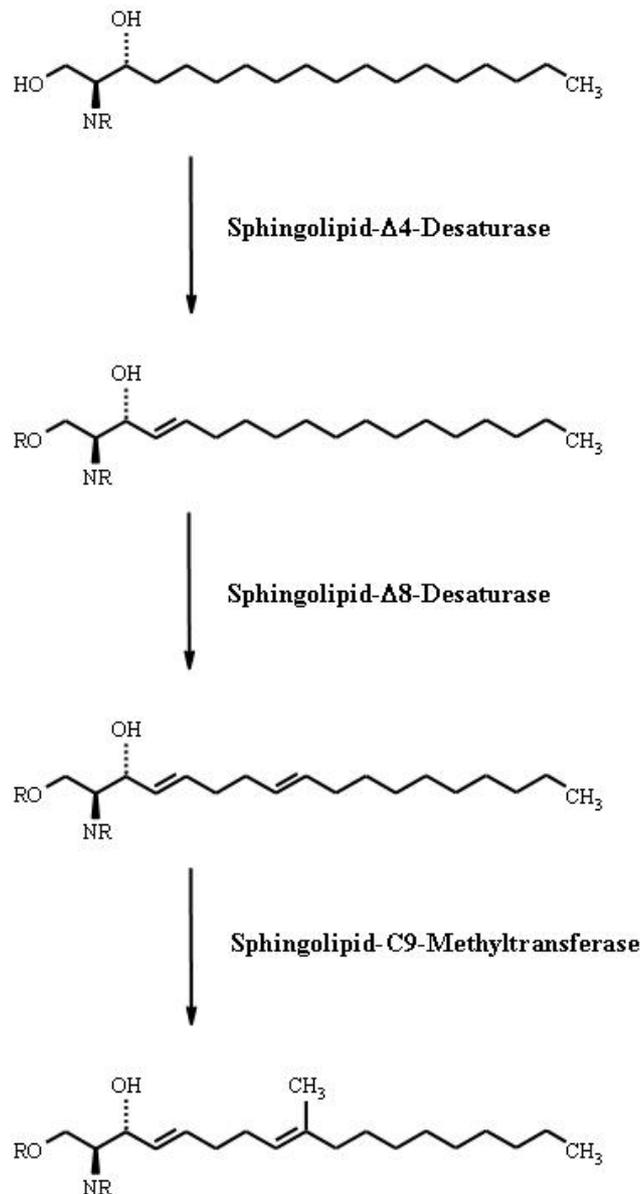


Abb. 19 HPLC-Analyse der DNP-derivatisierten Sphingobasen aus den GlcCer von PpWT und Ppd8Δ.

Ppd8Δ besitzt nur noch GlcCer mit d18:1<sup>4E</sup> (Abb. 19). Das Fehlen C9-methylierter Sphingobasen bestätigt, dass die Sphingolipid-C9-Methyltransferase nur Δ8-desaturierte Substrate umsetzt. Ternes et al. zeigten, dass die GlcCer der *P. pastoris* C9-Methyltransferase-Deletionsmutante d18:1<sup>4E</sup> und d18:2<sup>4E,8E</sup> enthielten und dass bei heterologer Expression dieser Methyltransferase in *S. cerevisiae* nur Δ8-desaturierte Substrate umgesetzt wurden [79]. Auf der Basis dieser Ergebnisse kann für die Modifizierung der Sphingobasenreste in *P. pastoris* jetzt eine Abfolge für die sequenzielle Modifikation von Sphingobasen aufgestellt werden (Abb. 20).

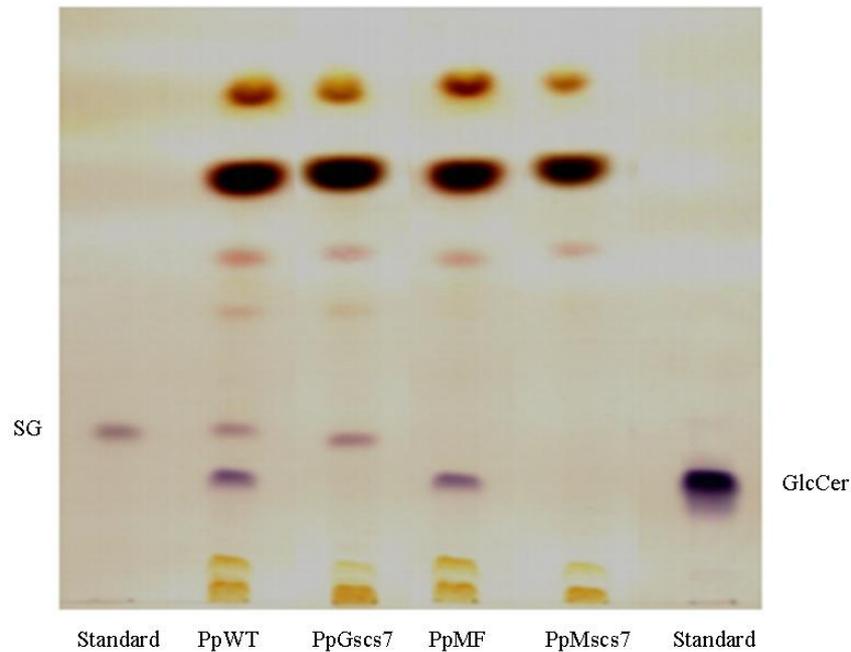


**Abb. 20** Schema zur sequenziellen Modifizierung des Ceramidgerüsts von Sphingolipiden bei Pilzen.

Dabei dient das Produkt der ersten Reaktion als Substrat für die zweite und das daraus resultierende Produkt wiederum als Substrat für die dritte Reaktion. Experimentelle Nachweise für Querverbindungen dieser Reaktionsabfolge konnten nicht gefunden werden, da die postulierten Produkte, z.B. d18:1<sup>8E</sup> und d18:1<sup>8E</sup>9m, in keiner der Mutanten detektiert wurden. Neben der GCS scheint auch die  $\Delta$ 8-Desaturase räumlich von den Substraten getrennt zu sein, wohingegen die C9-Methylierung wahrscheinlich spezifisch für  $\Delta$ 8-desaturierte Sphingobasenreste ist.

3.1.3. Auch die Deletion der putativen Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylase führt in *P. pastoris* zum Verlust der Glucosylceramide

Die Lipide von zwei unabhängigen *scs7*-Deletionsmutanten (PpGscs7) sowie PpWT als Kontrolle wurden mit Chloroform/Methanol extrahiert und über DC analysiert (Abb. 21).



**Abb. 21** Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipidextrakte aus PpWT, PpMF und den Deletionsmutanten PpGscs7 und PpMscs7. Die Auftrennung der Lipide erfolgte in Chloroform/Methanol 85:15, die Färbung mit  $\alpha$ -Naphthol/Schwefelsäure und Veraschung. SG = Sterolglucosid, GlcCer = Glucosylceramid

Wie Ppd4 $\Delta$  wies auch PpGscs7 keine Bande in Höhe des GlcCer-Standards auf. Zunächst lag die Vermutung nahe, dass sich mit dem Verlust der Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylierung das Laufverhalten der GlcCer veränderte und die modifizierten GlcCer einen ähnlichen  $R_f$ -Wert wie SG haben. Leipelt et al. zeigten dies bereits für GlcCer mit nichthydroxylierten Fettsäuren, die nach Überexpression der humanen GCS in *P. pastoris* gefunden wurden [30]. Aus diesem Grund wurde eine zweite *scs7*-Deletionsmutante in dem SG-defizienten *P. pastoris*-Stamm MF3KR5 [30] hergestellt. Auch hier wurden die Lipidextrakte von zwei unabhängigen Klonen (PpMscs7) mittels DC analysiert (Abb. 20). Die Deletion der putativen

*SCS7* hatte einen kompletten Verlust von GlcCer zur Folge. Analog zu *Ppd4Δ* könnte dieser Verlust durch folgende Annahmen erklärt werden:

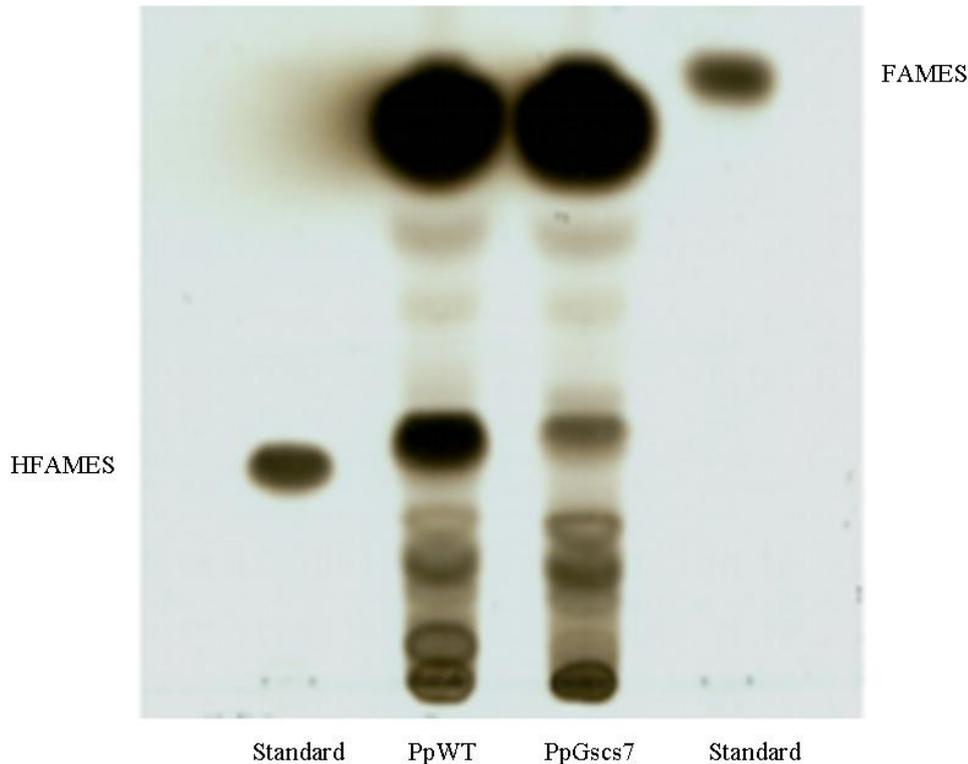
- (v) Die Glucosylceramid-Synthase (GCS) akzeptiert nur Ceramide mit  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäureresten als Substrate.
- (vi) Der Biosyntheseort der Ceramide als GCS-Substrate (wahrscheinlich ER) ist vom Ort der GCS-Aktivität (wahrscheinlich Golgi-Apparat) räumlich getrennt. Dadurch ist ein Transport der Ceramide an den Ort ihrer Umsetzung notwendig, von dem Ceramide ohne Hydroxylierung ausgeschlossen sind.
- (vii) Die Biosynthese der GCS wird herunterreguliert.
- (viii) Die Biosynthese der Substrate wird herunterreguliert.

Zum Nachweis der Annahmen (vi) und (vii) wären Enzym-Lokalisationen erforderlich, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich waren.

Bereits Leipelt et al. wiesen durch die Überexpression der PGCS in der *gcs*-Deletionsmutante die Biosynthese von GlcCer mit nichthydroxylierten Fettsäureresten nach [27]. Deshalb kann die Annahme (v) nicht zutreffen.

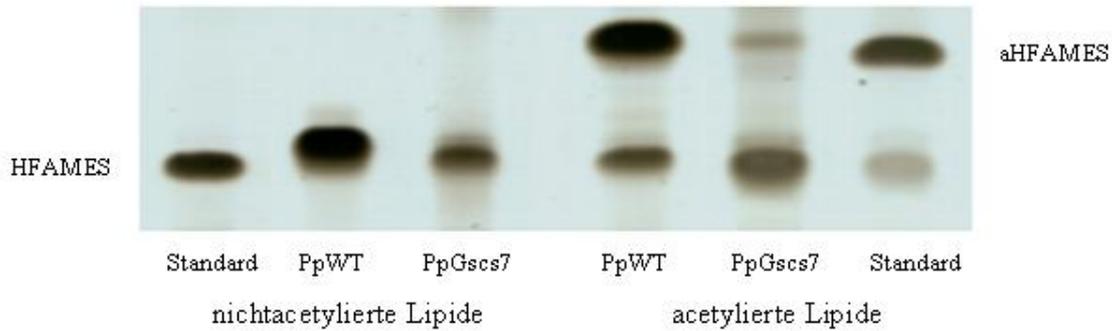
Da bisher keine funktionelle Charakterisierung der putativen *SCS7* durchgeführt wurde, bestand die Möglichkeit, dass das Gen nicht für eine Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylase, sondern für ein anderes Enzym codiert, das essentiell für die Biosynthese von GlcCer ist. Aus diesem Grund wurden zwei weitere Versuche durchgeführt.

Zunächst wurde der bei der Lipidextraktion entstandene Zellrückstand (in Form eines Sediments) untersucht. *Pichia*-Wildtypzellen enthalten  $\alpha$ -Hydroxyfettsäuren nicht nur in GlcCer, sondern auch in GIPC-Ankern und IPCs. Diese können nicht durch Chloroform/Methanol-Extraktion aus den Membranen isoliert werden und verbleiben nach Zentrifugation in den Sedimenten. Daher wurden diese Sedimente mit methanolischer Schwefelsäure hydrolysiert. Die entstandenen Fettsäuremethylester (FAMES) wurden mit Petrolether extrahiert und mittels DC analysiert (Abb. 22).



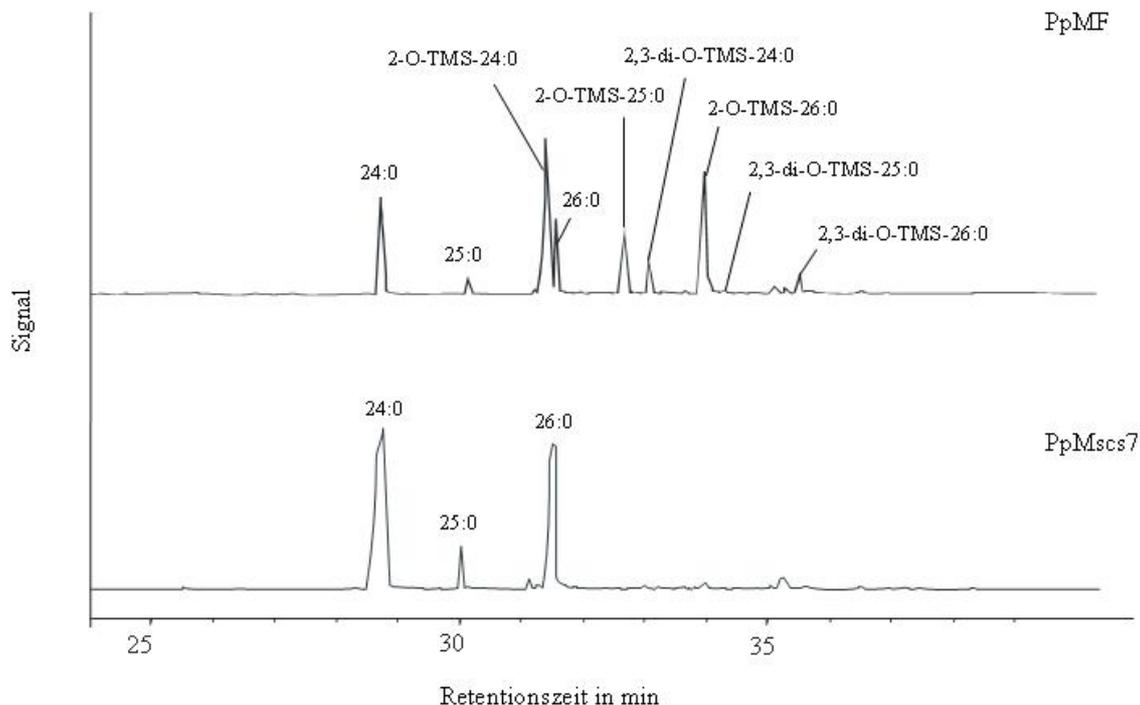
**Abb. 22** Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Fettsäuremethylester-Fraktion aus den Zellresten von PpWT und PpGscs7 nach Chloroform/Methanol-Extraktion. Die Auftrennung der Lipide erfolgte in Petrolether/Diethylether/Eisessig 70:30:0,5, die Färbung mit  $\text{CuSO}_4$ -Lösung und Veraschung. FAMES = Fettsäuremethylester, HFAMES = Hydroxyfettsäuremethylester

Auf der DC war sowohl bei PpWT als auch bei PpGscs7 eine Bande in Höhe des Hydroxyfettsäuremethylester (HFAMES)-Standards zu sehen. Jedoch wurde eine unterschiedliche Zeitspanne bis zur Schwärzung dieser Banden beobachtet, so dass die Vermutung nahe lag, dass eine weitere Substanz mit dem gleichen  $R_f$ -Wert extrahiert und co-chromatographiert wurde. Aus diesem Grund wurde eine präparative DC von gleichen Lipidmengen aus PpWT und PpGscs7 durchgeführt, bei der die fraglichen Lipide aus dem Kieselgel extrahiert, acetyliert und rechromatographiert wurden (Abb. 23).



**Abb. 23** Dünnschichtchromatographische Auftrennung der nichtacetylierten und der acetylierten Lipide aus den HFAMES-Bereichen von PpWT und PpGscs7. Die Auftrennung der Lipide erfolgte in Petrolether/Diethylether/Eisessig 70:30:0,5, die Färbung mit  $\text{CuSO}_4$ -Lösung und Veraschung. HFAMES = Hydroxyfettsäuremethylester, aHFAMES = acetylierte Hydroxyfettsäuremethylester

Dadurch konnte eine Trennung der HFAMES von den überlagernden Lipiden erreicht und ein Verlust der Fettsäurehydroxylierung in PpGscs7 gezeigt werden. Zur Bestätigung der erfolgreichen Deletion der *SCS7* wurden die FAMES aus den Extraktionsrückständen von PpMF und PpMscs7 mittels GC analysiert (Abb. 24).



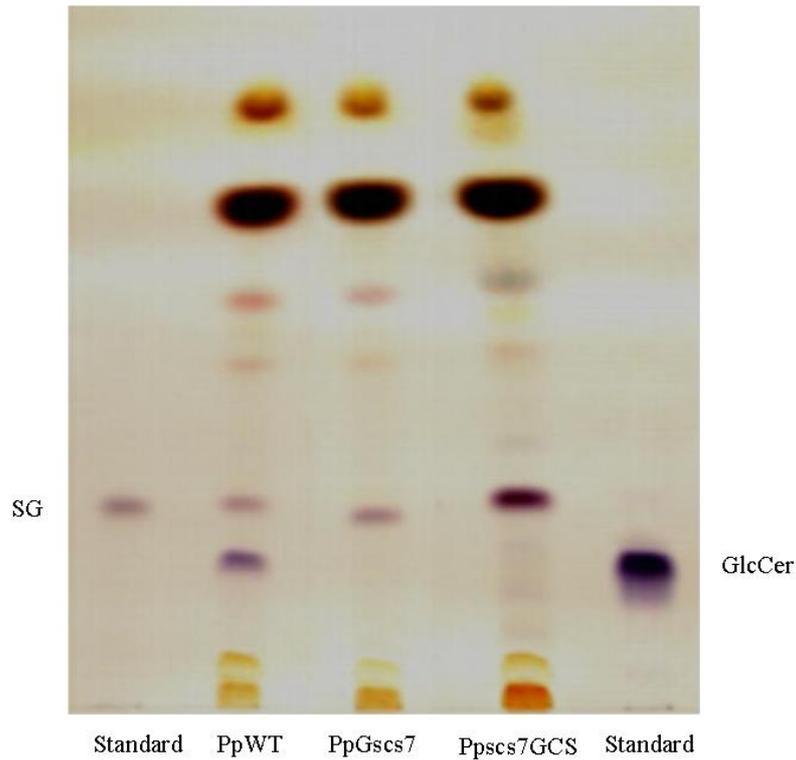
**Abb. 24** Gaschromatographische Auftrennung der Fettsäurereste aus den Extraktionsrückständen von PpMF und PpMscs7. Die Identifizierung der Peaks erfolgte durch GC-MS.

Bei dieser Analyse waren in PpMscs7 keine Hydroxyfettsäuren mehr zu finden. Während in PpMF sowohl sehr langkettige 2-Hydroxyfettsäuren als auch 2,3-Dihydroxyfettsäuren nachgewiesen werden konnten, zeigte das Gaschromatogramm von PpMscs7 nur noch sehr langkettige nichthydroxylierte Fettsäuren. Mit der Deletion der Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylase in *P. pastoris* wurde somit gleichzeitig die 3-Hydroxylierung der Fettsäuren verhindert. Dies könnte zum einen dadurch verursacht worden sein, dass die  $\alpha$ -Hydroxylase unspezifisch auch die C3-Position hydroxyliert oder dass eine hypothetische „3-Hydroxylase“ nur 2-hydroxylierte Substrate umsetzt.

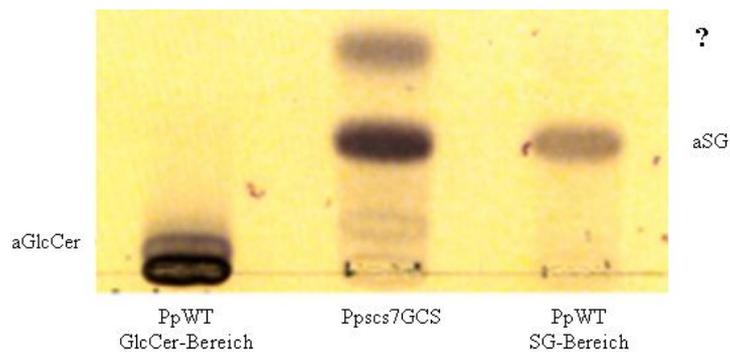
In einem Fütterungsversuch an PpGscs7/PpMscs7 mit 2-hydroxylierten sehr langkettigen Fettsäuren könnte überprüft werden, ob eine 3-Hydroxylase aktiv ist. Dieser Ansatz konnte leider im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Die Ergebnisse der GC-Analysen deuten darauf hin, dass in den *scs7*-Deletionsmutanten Ceramidspezies (z. B. aus den IPCs) zu finden sein müssten, die nichthydroxylierte Fettsäuren besitzen. Durch Überexpression der PGCS in einer der beiden *scs7*-Deletionsmutanten sollte die Biosynthese von GlcCer mit nichthydroxylierten Fettsäureresten erreicht werden. Da PpMscs7 sowohl über eine Kanamycin- und Zeocin-Resistenz als auch einen funktionstüchtigen *HIS4*-ORF verfügt, war eine GCS-Expression in dieser Mutante nicht möglich, da keine weitere Selektionsmöglichkeit für diesen Stamm existierte. Deshalb sollte die Überexpression der PGCS in PpGscs7 erfolgen. Die Klonierung der PGCS in pPIC3.5 und die Selektion der Transformanten erfolgte wie unter 3.1.1. beschrieben. Mehrere unabhängige Klone (Ppsc7GCS) wurden identifiziert und die entsprechenden Lipidextrakte mittels DC analysiert (Abb. 25).

Da die Trennung der GlcCer mit nichthydroxylierten Fettsäureresten von SG in Chloroform/Methanol 85:15 schwierig ist, wurde eine präparative DC durchgeführt. Von PpWT wurden der SG- sowie der GlcCer-Bereich getrennt isoliert, von Ppsc7GCS nur der SG-Bereich, da keine Bande in Höhe des GlcCer-Standards zu finden war. Die Lipide der isolierten Bereiche wurden aus dem Kieselgel extrahiert, acetyliert und rechromatographiert (Abb. 26).



**Abb. 25** Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipidextrakte aus PpWT, PpGscs7 und Ppscs7GCS. Die Auftrennung der Lipide erfolgte in Chloroform/Methanol 85:15, die Färbung mit  $\alpha$ -Naphthol/Schwefelsäure. SG = Sterolglucosid, GlcCer = Glucosylceramid



**Abb. 26** Dünnschichtchromatographische Auftrennung der acetylierten Lipide aus den SG- bzw. GlcCer-Bereichen von PpWT und Ppscs7GCS. Die Auftrennung der Lipide erfolgte in Petrolether/Diethylether 1:1, die Färbung mit  $\alpha$ -Naphthol/Schwefelsäure und Veraschung. aSG = acetyliertes Sterolglucosid, aGlcCer = acetyliertes Glucosylceramid, ? = unbekannte Substanz

Die acetylierten Lipide aus dem SG- bzw. GlcCer-Bereich von PpWT erschienen jeweils als einzelne Bande, während die Lipide des SG-Bereichs von Ppsc7GCS nach der Acetylierung in zwei Banden aufgetrennt wurden. Diese beiden Banden wurden durch eine präparative DC getrennt und die Lipide aus dem Kieselgel isoliert. Durch die MS-Analyse wurde das Lipid der unteren Bande als acetyliertes Ergosterolglucosid identifiziert. Die obere Bande war kein GlcCer und konnte bisher keiner Lipidklasse zugeordnet werden. Die Analyse der unbekannt Substanz konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollendet werden. Die endgültige Identifizierung wird aber für die Klärung der Frage, welche anderen Reaktionen durch die Deletion der *SCS7* beeinträchtigt wurden, relevant sein. Damit könnten auch Hinweise für das Fehlen der GlcCer in den Deletionsmutanten erhalten werden.

#### **3.2. Die Wirkung pflanzlicher Defensine auf *P. pastoris* ist abhängig von der Sphingolipidzusammensetzung der pilzlichen Plasmamembran**

##### 3.2.1. Rs-AFP2 wirkt auf verschiedene *P. pastoris*-Stämme mit modifizierter GlcCer-Ausstattung unterschiedlich stark

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von K. Thevissen (Katholieke Universiteit Leuven, Belgium) wurden die verschiedenen Mutanten und ihre GlcCer-Spezies mit zwei verschiedenen Methoden untersucht. In einem ersten Versuch wurde durch Thevissen et al. die Konzentration von Rs-AFP2 bestimmt, die mindestens benötigt wird, um das Wachstum der von mir hergestellten *P. pastoris*-Stämme zu 100% zu hemmen. Das Wachstum der Zellen auf PDB:YPD (4:1 (v/v), pH 7,0)-Agar mit unterschiedlichen Rs-AFP2-Konzentrationen wurde mikroskopisch analysiert. Die Ergebnisse (Tab. 6) zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von GlcCer und der Sensitivität gegenüber Rs-AFP2.

Die GlcCer-defiziente *gcs*-Deletionsmutante von *P. pastoris* war resistent gegenüber Rs-AFP2 [115]. Deshalb wurde erwartet, dass die ebenfalls GlcCer-defizienten Stämme Ppd4 $\Delta$  und Ppsc7 ebenfalls resistent gegenüber Rs-AFP2 sind. Dies konnte bestätigt werden. Die anderen Stämme zeigten eine Abnahme der Defensin-Sensitivität in der Reihenfolge PpWT/PpMF > PpC9M > Ppd8 $\Delta$ .

**Tab. 6 Minimale Konzentration von Rs-AFP2 zur vollständigen Wachstumshemmung der verschiedenen *P. pastoris*-Stämme**

<i>P. pastoris</i> -Stamm	MIC* in nM	GlcCer vorhanden
PpWT	25	ja
PpMF	25	ja
PpC9M <sup>#</sup>	50	ja
Ppd8Δ	100	ja
Ppd4Δ	>200	nein
PpGscs7	>200	nein
PpMscs7	>200	nein
Ppgcs <sup>##</sup>	>200	nein

\* Minimale Konzentration von Rs-AFP2, die benötigt wird, um das Wachstum von *P. pastoris* zu 100% zu hemmen.

<sup>#</sup> Dieser Stamm enthält die Deletion der Sphingolipid-C9-Methyltransferase, wurde von Herrn P. Ternes generiert [79] und für die Defensin-Versuche zur Verfügung gestellt.

<sup>##</sup> Dieser Stamm enthält die Deletion der GCS, wurde von Frau M. Leipelt generiert [30] und bereits in früheren Defensin-Versuchen untersucht [115].

Im Vergleich zu den meisten untersuchten Pilzen zeigten Pflanzen keine Sensitivität gegenüber Rs-AFP2. Da ein wesentlicher struktureller Unterschied zwischen den Pilz- und Pflanzen-GlcCer in der C9-Methylgruppe liegt, lag die Vermutung nahe, dass die C9-Methylgruppe essentiell für die Aktivität des Defensins sei. Die C9-Methyltransferase-Deletionsmutante wies als Sphingobasen nur d18:1<sup>4E</sup> und d18:2<sup>4E,8E</sup> auf [79], unterschied sich in der Sensitivität jedoch kaum von PpWT. Damit konnte die oben genannte Annahme nicht bestätigt werden. Da die verschiedenen Stämme durch unterschiedliche GlcCer-Ausstattungen gekennzeichnet sind, lässt sich schlussfolgern, dass Rs-AFP2 nicht nur generell GlcCer für die wachstumshemmende Wirkung benötigt, sondern dass bestimmte Strukturen der GlcCer diese optimieren.

In einem weiteren Versuch wurde die Bindung von Rs-AFP2 an die isolierten GlcCer-Spezies von PpWT, PpC9M, Ppd8Δ und Ppd4ΔGCS mittels ELISA untersucht (Abb. 27). Die

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Herstellung der verschiedenen Mutanten ermöglichte dabei die Untersuchung von GlcCer, die sich vollkommen von denen in PpWT natürlich vorkommenden unterschieden. Mit den GlcCer aus Ppd4ΔGCS war es zudem möglich, PpWT-untypische Strukturen (C4-Hydroxy-Gruppe) zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Bindung von Rs-AFP2 von der GlcCer-Spezies abhängt (Abb. 27). In PpWT findet man hauptsächlich die Sphingobasen d18:1<sup>4E</sup>, d18:2<sup>4E,8E</sup> und d18:2<sup>4E,8E</sup>9m sowie Spuren von d18:0. In dieser Kombination der molekularen GlcCer-Spezies wurde die stärkste Bindung mit Rs-AFP2 gemessen.

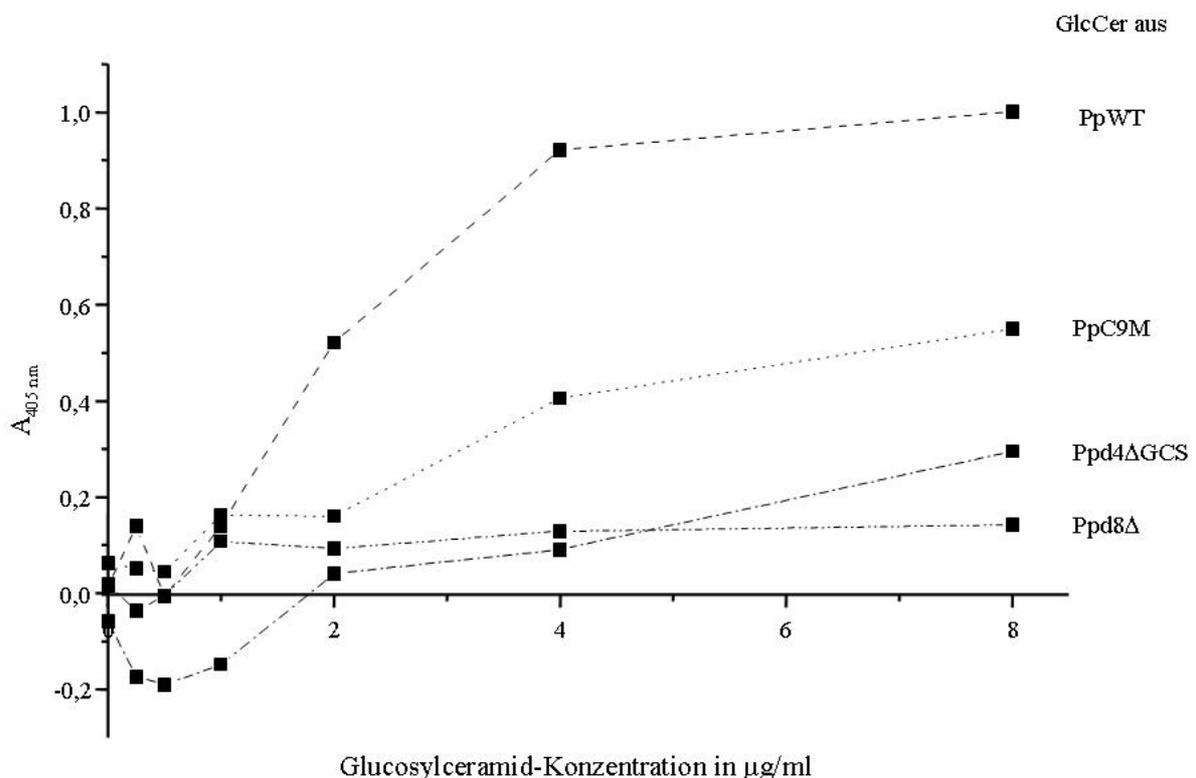


Abb. 27 Graphische Darstellung der Ergebnisse aus dem ELISA zur Untersuchung der Bindung von Rs-AFP2 an verschiedene GlcCer-Spezies.

Aus PpC9M wurden nur GlcCer mit d18:1<sup>4E</sup> sowie d18:2<sup>4E,8E</sup> isoliert. Der Wachstumstest deutete bereits darauf hin, dass die C9-Methylgruppe nicht essentiell für die Bindung des Rs-AFP2 an die GlcCer auf der Oberfläche der Pilzmembran ist. Die Ergebnisse des ELISA-Tests zeigten eine Bindung von Rs-AFP2 an die aus PpC9M isolierten GlcCer und bestätigen damit die Ergebnisse aus dem Wachstumstest (Abb. 27). Da die Bindung jedoch nicht so stark war wie die an die GlcCer aus PpWT (Abb. 27), scheint die C9-Methylverzweigung zwar

nicht essentiell für die Defensinbindung zu sein, aber doch die Defensin-Aktivität zu verbessern. Ppd8 $\Delta$  zeigte *in vivo* gegenüber Rs-AFP2 eine deutlich geringere Sensitivität (Tab. 6). Die aus Ppd8 $\Delta$  isolierten GlcCer, die nur noch d18:1<sup>4E</sup> enthielten, zeigten im ELISA nur eine schwache Bindung (Abb. 27). Eine vergleichbar starke Bindung zeigte das Defensin an die aus Pp4 $\Delta$ GCS isolierten GlcCer mit t18:0/d18:0/t20:0/d20:0. Leider war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, eine entsprechende Ppd4 $\Delta$ GCS-Mutante mit konstitutivem Promotor herzustellen, die es ermöglicht hätte, *in vivo*-Studien zur Sensitivität der lebenden Zellen durchzuführen. Aus den Ergebnissen der *in vivo*-Studien und der ELISA-Versuche lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Die Aktivität von Rs-AFP2 ist GlcCer-abhängig. Die Stärke der Bindung ist dabei abhängig von der GlcCer-Spezies.
- Die Sensitivität der *Pichia*-Zellen ist proportional zur Bindung des Defensins an die entsprechenden molekularen GlcCer-Spezies *in vitro*.
- Die Bindung von Rs-AFP2 an GlcCer nimmt von d18:2<sup>4E,8E</sup>9m über d18:2<sup>4E,8E</sup> zu d18:1<sup>4E</sup> hin ab.
- Da die Bindung an GlcCer mit d18:1<sup>4E</sup> genauso stark ist wie an ein Gemisch aus GlcCer mit t18:0/d18:0/t20:0/d20:0, wird postuliert, dass die Sensitivität von Ppd4 $\Delta$ GCS *in vivo* der von Ppd8 $\Delta$  entspricht.

Die Bindung von Rs-AFP2 und damit die Sensitivität der *P. pastoris*-Zellen ist demnach von verschiedenen Strukturmotiven der GlcCer in der Pilzmembran abhängig. Bisher konnte noch nicht geklärt werden, ob die stereochemischen Details der Glucose-Kopfgruppe essentiell für die Aktivität von Rs-AFP2 sind oder ob der Austausch der Glucose durch andere Zuckerreste, z.B. Mannose oder Galactose, eine Auswirkung auf die Defensinwirkung hat.

#### 3.2.2. Die Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylase-Deletionsmutante ist sensitiv gegenüber Dm-AMP1

Durch die Herstellung von PpGscs7 war es möglich, die Wirkung von Dm-AMP1 sowohl auf *P. pastoris* Wildtyp sowie auf Mutanten-Zellen durchzuführen, deren IPC durch die Deletion der Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylase nur nichthydroxylierte Fettsäurereste enthielten. Die Ergebnisse des Wachstumstests, der analog zu dem mit Rs-AFP2 von Thevissen et al. durchgeführt wurde, zeigten keinen Unterschied in der Sensitivität der Mutante gegenüber PpWT. Danach

ist die Aktivität von Dm-AMP1 unabhängig von der  $\alpha$ -Hydroxylierung der Fettsäurereste in den IPCs.

#### **3.3. Identifizierung der Sphingolipid- $\Delta$ 4- und der $\Delta$ 8-Desaturase sowie der C4-Hydroxylase aus *U. maydis* durch heterologe Expression in *S. cerevisiae* bzw. *P. pastoris***

*U. maydis* besitzt die für phytopathogene Pilze charakteristische Melaninschicht auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran. GlcCer wird in Säugerzellen eine entscheidende Rolle im Transport der Tyrosinase, dem Schlüsselenzym der Melaninbiosynthese, zugesprochen [109]. Durch die Deletion der Sphingolipid-modifizierenden Enzyme in *U. maydis* könnte festgestellt werden, in wie weit GlcCer bzw. bestimmte GlcCer-Spezies Einfluss auf die Melaninbiosynthese in *U. maydis* und damit den virulenten Eigenschaften dieses Pilzes haben. Dazu mussten die entsprechenden Gene aus *U. maydis* identifiziert und charakterisiert werden. Dies sollte anhand der heterologen Expression in einem Hefeexpressionssystem durchgeführt werden.

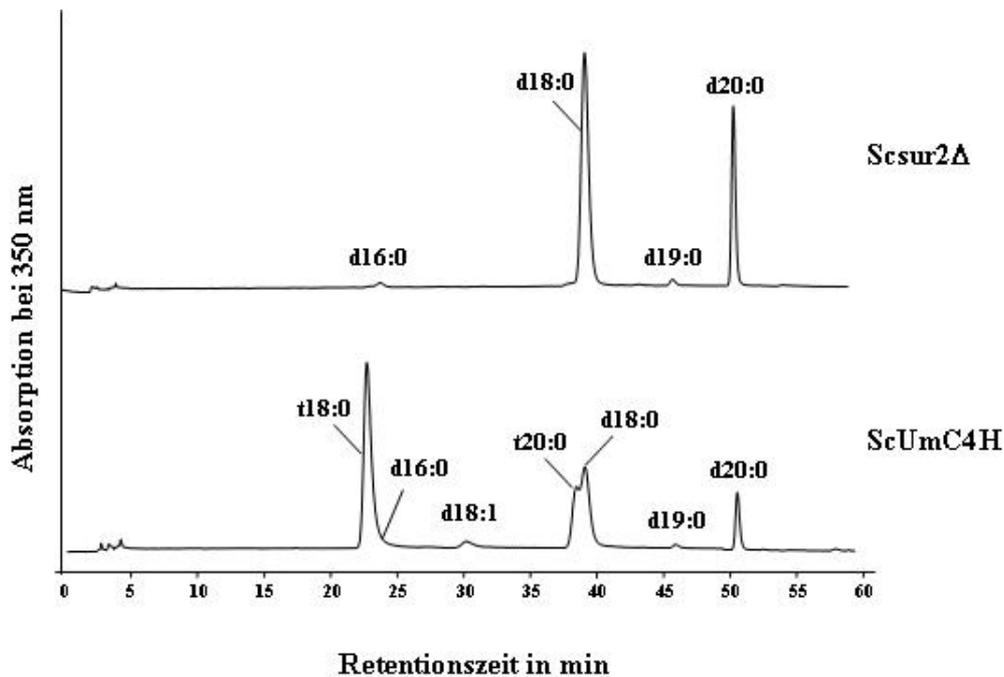
Durch Kooperation mit der Bayer AG wurden die Sequenzen der putativen Sphingolipid- $\Delta$ 4- und - $\Delta$ 8-Desaturase sowie der -C4-Hydroxylase zur Verfügung gestellt. Mittlerweile sind die genomischen Sequenzdaten von *U. maydis* allerdings auch über das Internet zugänglich. Die oben genannten putativen Gene sind unter folgenden Accession-Nummern zu finden: putative Sphingolipid- $\Delta$ 4-Desaturase ( *$\Delta$ 4Des*) = XM\_400266, putative Sphingolipid- $\Delta$ 8-Desaturase ( *$\Delta$ 8Des*) = XM\_400113, putative Sphingolipid-C4-Hydroxylase (*C4Hyd*) = XM\_399092. Die heterologe Expression erfolgte mit den von der Bayer AG zur Verfügung gestellten Sequenzen.

##### 3.3.1. Heterologe Expression der putativen Sphingolipid-C4-Hydroxylase und der $\Delta$ 4-Desaturase in *S. cerevisiae*

Für die Expressionen der putativen C4-Hydroxylase sowie der  $\Delta$ 4-Desaturase wurde der *S. cerevisiae*-Stamm TDY2037-*sur2* $\Delta$  (*Scsur2* $\Delta$ ) gewählt, da dieser nur nichtmodifizierte Sphingobasenreste wie d18:0 und d20:0 synthetisieren kann. In einem ersten Versuch wurde *Scsur2* $\Delta$  mit pYES2UmC4Hyd und dem Leervektor pYES2 als Kontrolle transformiert. Die Selektion erfolgte durch Uracil-Auxotrophie. Je zwei unabhängige *ura*<sup>+</sup>-Klone (*Scsur2* $\Delta$  bzw.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

ScUmC4H) wurden in Flüssigkultur angezogen. Die Expression der *C4Hyd* erfolgte nach Induktion mit Galactose und sollte zur Biosynthese C4-hydroxylierter Sphingolipide führen. Zur Analyse der Sphingolipide wurden die induzierten Zellen (Abschn. 2.2.3.3) sedimentiert und die daraus isolierten Sphingobasen mittels HPLC analysiert (Abb. 28).



**Abb. 28** HPLC-Analyse der DNP-derivatisierten Sphingobasen aus ScWT bzw. ScUmC4H. Die *C4Hyd* aus *U. maydis* zeigte neben einer C4-Hydroxylase- (*t18:0*, *t20:0*) auch eine geringe  $\Delta^4$ -Desaturase-Aktivität (*d18:1*).

Durch die Analyse der aus den Gesamtsphingolipiden freigesetzten Sphingobasen konnte das putative Gen eindeutig als Sphingolipid-C4-Hydroxylase identifiziert werden. Die *C4Hyd* kann sowohl *d18:0* als auch *d20:0* umsetzen. Bezogen auf *Scsur2Δ* wurden ca. 68% *d18:0* und ca. 60% *d20:0* umgesetzt (Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen). Ca. 65% *d18:0* wurden dabei C4-hydroxyliert und ca. 3%  $\Delta^4$ -desaturiert (Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen). Dies lässt auf ein bifunktionales Enzym mit Hydroxylase- und Desaturase-Aktivität schließen.

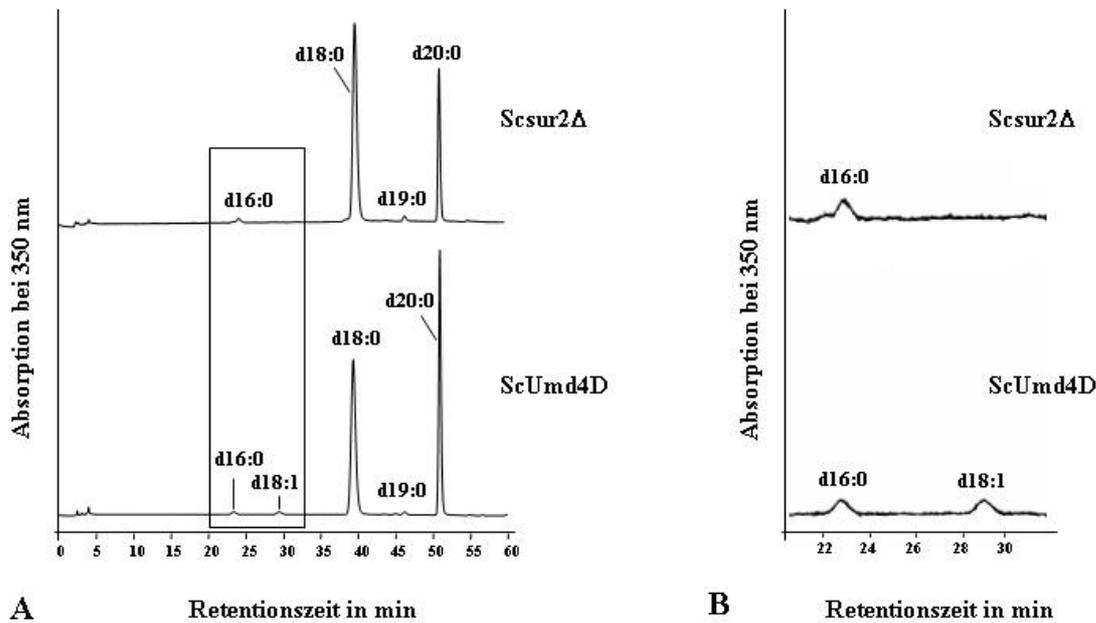
Durch einen Vergleich zwischen der von der Bayer AG bereitgestellten und der unter der Accession-Nummer XM\_399092 zu findenden Sequenz wurden starke Abweichungen in der Größe der ermittelten ORFs sowie der Sequenz gefunden. Während der ORF der Bayer-Sequenz 1173 bp umfasst, ist der ORF von XM\_399092 mit 5235bp um 4062 bp größer. Da

### 3. Ergebnisse und Diskussion

---

die Expression der Bayer-Sequenz (durch Sequenzierung bestätigt) erfolgreich war, stellt diese Sequenz eine funktionstüchtige Sphingolipid-C4-Hydroxylase dar. Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei XM\_399092 um eine Fusion mehrerer ORFs handelt, die durch eine Verschiebung des Leserahmens zustande kam. Durch einen Sequenzvergleich mit Hilfe der „Align two sequences (bl2seq)“-Option auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> konnte festgestellt werden, dass der zur Bayersequenz homologe Bereich von XM\_399092 um 2 bp größer ist. Dadurch war kein Stopp-Codon mehr vorhanden, so dass der ORF bis zum nächsten auftretenden Stopp-Codon vergrößert war. Der dadurch entstandene ORF stellt offenbar eine Fusion mehrerer Gene dar. Um diese Behauptung zu bestätigen, wurde die Proteinsequenz von XM\_399092 mit Hilfe der „Protein-Protein Blast (Blastp)“-Option auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> analysiert. Diese Analyse zeigte, dass XM\_399092 drei verschiedene Domänen enthält. Die erste Domäne zeigte starke Homologie zu Sur2p aus *S. cerevisiae*. Die zweite Domäne war homolog zu LRR (*leucine-rich repeats*) von *S. pombe* und anderen Spezies. LRR sind kleine Sequenzmotife (20-29 Aminosäuren), die zur Ribonuclease-Inhibitor-Superfamilie gehören und als Bestandteile vieler Proteine zu finden sind, die u. a. an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind. Die dritte Domäne zeigte starke Homologie zu WD40-Domänen. Diese Domänen umfassen 40 Aminosäuren und sind in einer Reihe eukaryotischer Proteine zu finden, die z. B. als Adaptor/Regulator-Module in Signaltransduktionsprozessen oder beim Aufbau des Cytoskeletts fungieren. LRR und WD40 sind keine Bestandteile von bisher bekannten Sphingolipid-C4-Hydroxylasen, so dass eine Fusion verschiedener ORFs sehr wahrscheinlich ist.

In einem weiteren Versuch sollte die Bayer-Sequenz der putativen  $\Delta 4Des$  auf analoge Weise in *Scsur2 $\Delta$*  exprimiert werden. Für die Transformation wurden pYES2Um $\Delta 4Des$  und pYES2 als Kontrolle verwendet. Die Transformanten wurden ebenfalls anhand ihrer Uracil-Auxotrophie selektiert. Je zwei unabhängige *ura*<sup>+</sup>-Klone (*Scsur2 $\Delta$*  bzw. *ScUmd4D*) wurden in Flüssigkultur angezogen und mit Galactose induziert. Die aus den Zellen von Kontrolle und Mutante isolierten Sphingobasen wurden mittels HPLC analysiert (Abb. 29).



**Abb. 29 HPLC-Analyse der DNP-derivatisierten Sphingobasen aus Scsur2 $\Delta$  und ScUmd4D.** A zeigt die gesamten detektierten Sphingobasen. Zur besseren Veranschaulichung der für den Versuch entscheidenden Peaks wurde der in A markierte Bereich in B vergrößert dargestellt. Die  $\Delta 4Des$  aus *U. maydis* zeigte eine geringe Desaturase-Aktivität (d18:1).

Da d18:1 detektiert wurde, konnte das putative Gen als Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase identifiziert werden. Der Umsatz von d18:0 bezogen auf die Kontrolle betrug ca. 1% (Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen). Eine Ursache für die geringe Desaturase-Aktivität war möglicherweise die Wahl des Expressionssystems. Auch die heterologen Expressionen der Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen aus *A. thaliana* und *L. esculentum* blieben in *S. cerevisiae* bisher erfolglos. Durch die Verwendung von Ppd4 $\Delta$  als alternatives Expressionssystem sollte die  $\Delta 4Des$ -Aktivität des putativen Enzyms bestätigt werden.

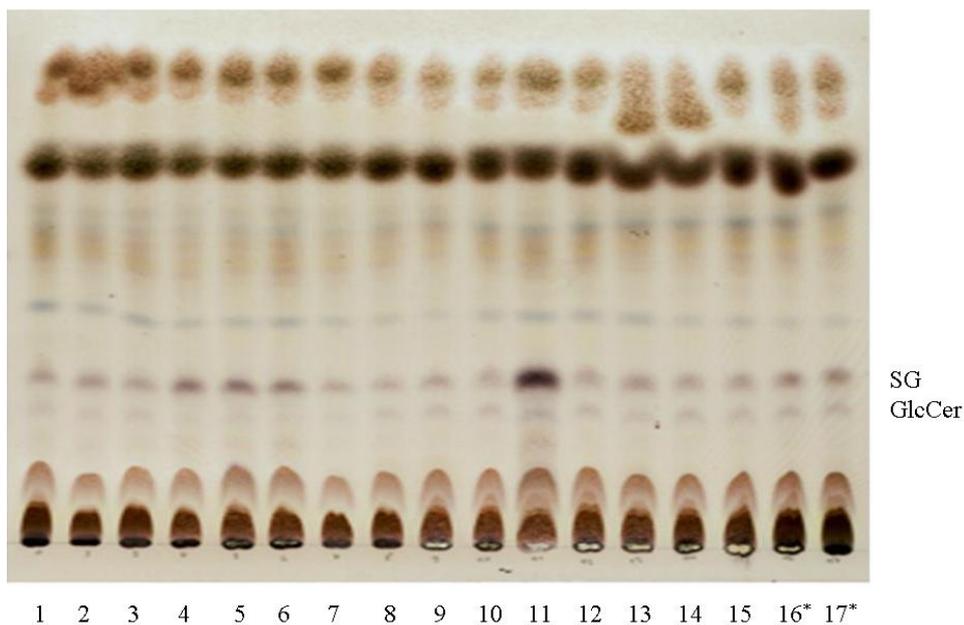
### 3.3.2. Heterologe Expression der putativen Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase und der $\Delta 8$ -Desaturase in den *P. pastoris*-Deletionsmutanten Ppd4 $\Delta$ bzw. Ppd8 $\Delta$

*P. pastoris* Wildtyp-Zellen besitzen sowohl eine eigene Sphingolipid- $\Delta 4$ - als auch eine eigene  $\Delta 8$ -Desaturase. Mit der Herstellung der  $\Delta 4des$ - bzw.  $\Delta 8des$ -Deletionsmutanten war es nun möglich,  $\Delta 4$ - bzw.  $\Delta 8$ -Desaturasen aus anderen Organismen heterolog zu exprimieren. Da

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Ppd4 $\Delta$  keine GlcCer mehr synthetisiert, war eine zusätzliche Selektion der Expressionsmutanten anhand ihres Glycolipidmusters möglich.

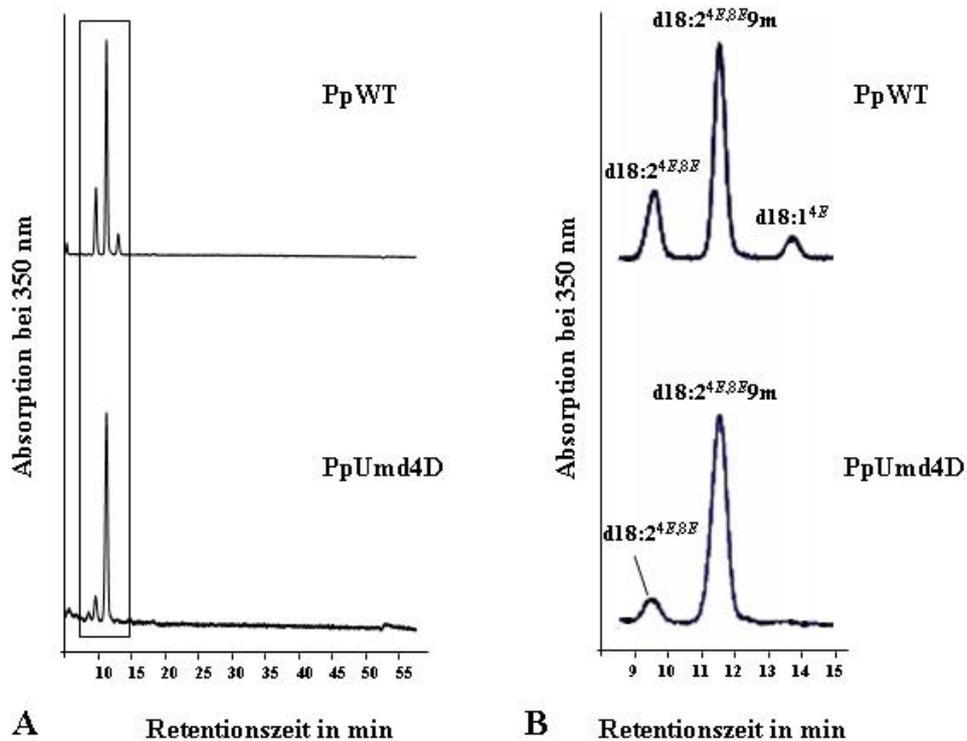
In einem ersten Versuch erfolgte die Transformation von Ppd4 $\Delta$  mit pPICUm $\Delta$ 4Des. Die Selektion der Transformanten erfolgte über die Histidin-Auxotrophie und Methanolmetabolisierung. Die positiven Klone (PpUmd4D) wurden in Flüssigkultur angezogen. Durch qualitative und semiquantitative Analyse der durch Chloroform/Methanol-Extraktion gewonnenen Lipide mittels DC, ermöglichte eine Einteilung in „bessere“ und „schlechtere Exprimierer“ (Abb. 30).



**Abb. 30** Dünnschichtchromatographische Analyse zur Identifizierung von „guten Exprimierern“ der *4Des* in PpUmd4D. Klone mit guter Expression der Sphingolipid- $\Delta$ 4-Desaturase sind durch eine stärkere GlcCer-Biosynthese gekennzeichnet. 1-17 = Ppd4DUmd4D-Klone 1-17, \* = gute Expression

Die Klone 16 und 17 wurden als „gute Exprimierer“ identifiziert und für die Analyse der Sphingolipide in Flüssigkultur mit PpWT als Kontrolle angezogen. Ppd4 $\Delta$  konnte nicht als Kontrolle verwendet werden, da dieser Stamm keine GlcCer bildet.

Die Lipide wurden aus den Zellen mit Chloroform/Methanol extrahiert und über SepPac-Säulen in Neutral-, Glyco- und Phospholipide fraktioniert. Aus der Glycolipidfraktion wurden die GlcCer durch präparative DC isoliert und mit Ba(OH)<sub>2</sub> hydrolysiert. Die DNP-derivatisierten Sphingobasen wurden mittels HPLC analysiert (Abb. 31).



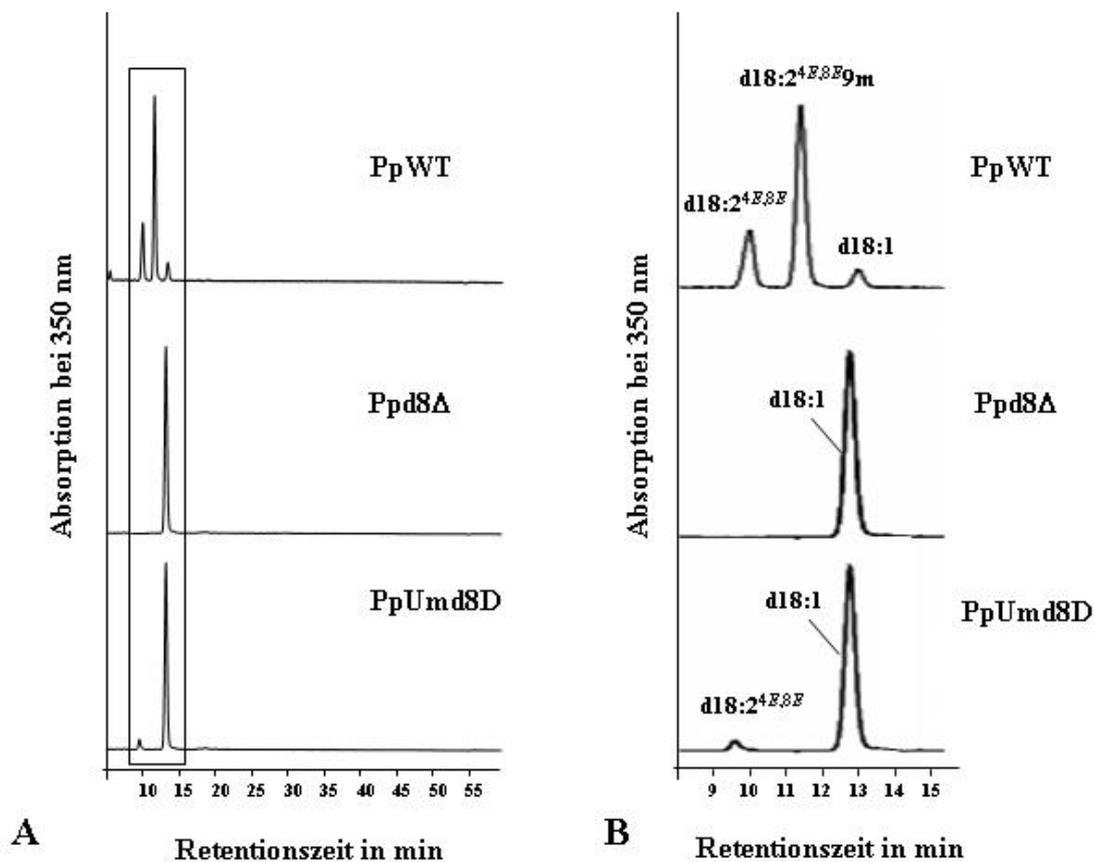
**Abb. 31 HPLC-Analyse der DNP-derivatisierten Sphingobasen aus den GlcCer von PpWT und PpUmd4D. A** zeigt die gesamten detektierten Sphingobasen. Zur besseren Veranschaulichung der für den Versuch entscheidenden Peaks wurde der in **A** markierte Ausschnitt in **B** vergrößert dargestellt.

Durch die Komplementation der *Pichia*-Deletionsmutante Ppd4 $\Delta$  mit der *44Des* aus *U. maydis* wurde die Biosynthese der GlcCer mit den für PpWT typischen Sphingobasen d18:2<sup>4E,8E</sup> und d18:2<sup>4E,8E</sup>9m wieder hergestellt. d18:1<sup>4E</sup> konnte nicht detektiert werden. Wahrscheinlich wurden die Produkte aus der  $\Delta$ 4-Desaturierung sofort umgesetzt, so dass eine Anreicherung und damit Detektion von d18:1<sup>4E</sup> nicht möglich war. Mit der Bereitstellung von d18:1<sup>4E</sup> als Substrat für die  $\Delta$ 8-Desaturase erfolgte die Biosynthese von d18:2<sup>4E,8E</sup>, die wiederum die Methylierung an der C9-Position ermöglichte (siehe dazu Abb. 20). Die sofortige Umsetzung der  $\Delta$ 4-desaturierten Sphingobasenreste deutet darauf hin, dass die  $\Delta$ 4-Desaturierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Biosynthese von d18:2<sup>4E,8E</sup> und d18:2<sup>4E,8E</sup>9m ist.

Wie bei der C4-Hydroxylase unterschied sich auch hier die Bayer-Sequenz von XM\_400266. Auch hier war der ORF von XM\_400266 wesentlich größer als die der Bayer-Sequenz. Wahrscheinlich war auch dies die Folge einer Leserahmenverschiebung, wodurch ein neues

Stopp-Codon das Ende des ORF markierte. Außerdem diente bei XM\_400266 ein ATG als Start-Codon, das 78 bp vor dem Start-Codon der Bayer-Sequenz zu finden ist. Die Expression der von der Bayer AG zur Verfügung gestellten *A4Des*-Sequenz (durch Sequenzierung bestätigt) führt in jedem Fall zur Biosynthese einer funktionstüchtigen Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase.

Die Transformation der *Pichia*-Deletionsmutante Ppd8 $\Delta$  erfolgte mit pPICUm $\Delta$ 8Des. Die positiven Klone (PpUmd8D) wurden durch Selektionen analog zu PpUmd4D identifiziert. Jedoch konnten „bessere und schlechtere Exprimerer“ nicht auf Ebene der Glycolipide voneinander unterschieden werden, da sowohl in Ppd8 $\Delta$  als auch in PpUmd8 $\Delta$  eine GlcCer-Biosynthese stattfindet. Deshalb wurden mehrere unabhängige Klone in Flüssigkultur angezogen. Die Chloroform/Methanol-extrahierten Lipide wurden in Neutral-, Glyco- und Phospholipide fraktioniert. Die GlcCer aus der Glycolipidfraktion wurden hydrolysiert, so dass die Sphingobasen mittels HPLC analysiert werden konnten (Abb. 32).



**Abb. 32 HPLC-Analyse der DNP-derivatisierten Sphingobasen aus den GlcCer von PpWT, Ppd8 $\Delta$  und PpUmd8D.** A zeigt die gesamten detektierten Sphingobasen. Zur besseren Veranschaulichung der für den Versuch entscheidenden Peaks wurde der in A markierte Ausschnitt in B vergrößert dargestellt.

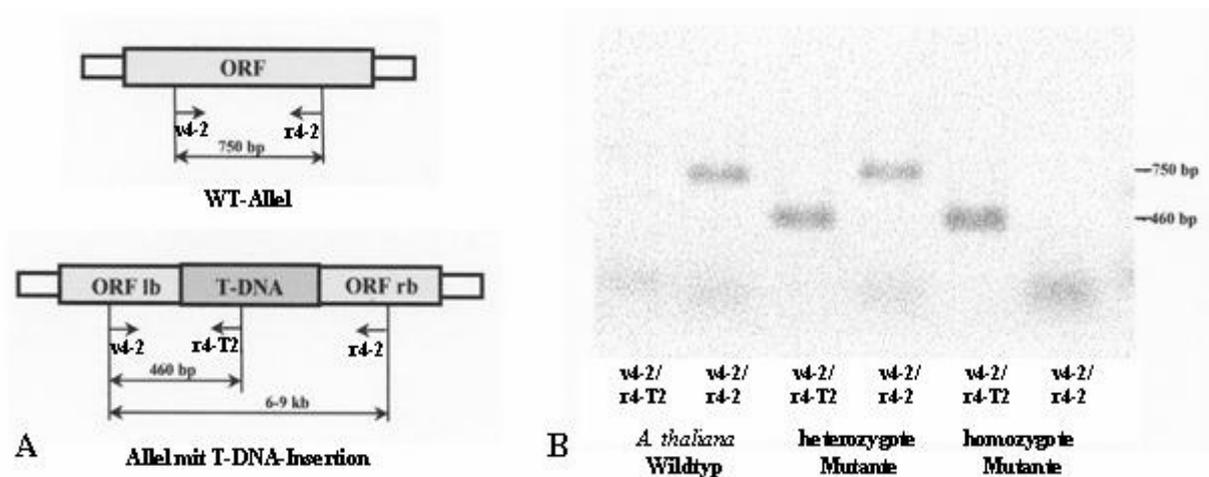
d18:2<sup>4E,8E</sup> konnte detektiert und das putative Gen damit als Sphingolipid- $\Delta$ 8-Desaturase identifiziert werden. Der Umsatz von d18:1<sup>4E</sup> bezogen auf die Kontrolle betrug jedoch nur ca. 2% (Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen), während die *Pichia*-eigene  $\Delta$ 8-Desaturase bei ausreichend zur Verfügung stehendem Substrat (d18:1<sup>4E</sup>) (wie in PpWT) mehr als 90% von d18:1<sup>4E</sup> in d18:2<sup>4E,8E</sup> umwandelt (Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen). Die Ursache für die geringe  $\Delta$ 8-Desaturase-Aktivität war wahrscheinlich die Expression des unvollständigen ORFs. Bei dem Vergleich der Bayer-Sequenz mit XM\_400113 wurden einige entscheidende Abweichungen festgestellt. Zum einen trat auch hier eine Verschiebung des Leserahmens durch zwei zusätzliche bp in der XM\_400113-Sequenz auf, die eine Verschiebung des theoretischen Stopp-Codons um 83 bp zur Folge hatte. Zum anderen diente bei XM\_400113 ein ATG als Start-Codon, das 788 bp vor dem Start-Codon der entsprechenden Sequenz der Bayer-AG zu finden ist. Bei Analyse der Proteinsequenzen, die sich aus diesen Bereichen ergeben, zeigten sich deutliche Unterschiede. Während XM\_400113 das Cyt *b*<sub>5</sub>-typische Sequenzmotif HPGG enthält, ist der dazu homologe Bereich der Bayer-Sequenz durch mehrere Stopp-Codons gekennzeichnet, die wahrscheinlich auf Sequenzierfehlern beruhen. Cytochrom *b*<sub>5</sub> wurde bisher bei allen charakterisierten Sphingolipid- $\Delta$ 8-Desaturasen als wesentlicher Bestandteil gefunden, der am N-terminalen Ende mit der Desaturase fusioniert ist. Deshalb ist es erstaunlich, dass die durch eine  $\Delta$ 8-Desaturase ohne Cyt *b*<sub>5</sub> katalysierte Reaktion zu einem Produkt geführt hat. Eine optimale Aktivität der Sphingolipid- $\Delta$ 8-Desaturase wird wahrscheinlich erreicht, wenn man jenen ORF exprimiert, der mit dem Start-Codon der XM\_400113 beginnt und dem Stopp-Codon der entsprechenden Sequenz der Bayer-AG endet, wobei ein Fusionsprotein bestehend aus Cyt *b*<sub>5</sub> und  $\Delta$ 8-Desaturase entsteht. Dieser Versuch konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

#### **3.4. Analyse von *A. thaliana* T-DNA-Mutanten zur Aufklärung des pflanzlichen Sphingolipidmetabolismus**

Zur Analyse der Funktion  $\Delta$ 8-desaturierter Sphingolipide in *A. thaliana* wurden T-DNA-Mutanten der beiden Sphingolipid- $\Delta$ 8-Desaturasen NM\_116023 (At3g61580) und NM\_130183 (At2g46210) aus den Sammlungen von NASC (N510384) bzw. Syngenta (893A12) bezogen, bei denen sich die T-DNA-Insertionen im Bereich der offenen

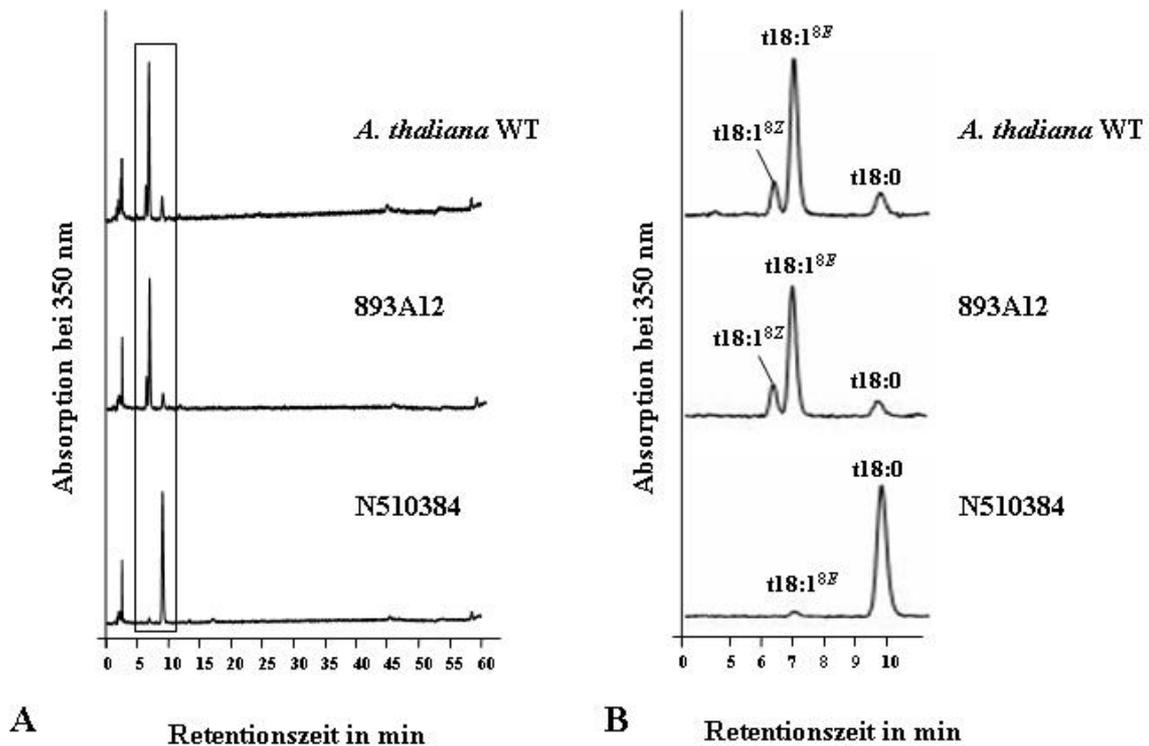
Leserahmen befinden. Die erhaltenen Samen waren eine Mischung aus T-DNA-Mutanten und Wildtyp-Pflanzen.

Um zu überprüfen, ob sich in der Samenmischung homozygote Disruptionsmutanten befanden, wurden die Samen, wie unter 2.2.5. angegeben, angezogen. Mit Hilfe der PCR wurde die genomische DNA der Pflanzen auf das Vorhandensein der beschriebenen T-DNA-Insertion sowie die Zygotie in Bezug auf diese Insertion untersucht. In Abb. 33 sind beispielhaft Ergebnisse für diese Untersuchungen dargestellt.



**Abb. 33** Selektion homozygoter T-DNA-Mutanten von *A. thaliana* am Beispiel des Pools von 893A12. **A** stellt schematisch dar, wie die spezifischen Primer abgeleitet wurden und welche Fragment-Größen sich daraus ergeben. ORF = offener Leserahmen, lb = linker flankierender Bereich, rb = rechter flankierender Bereich, WT = Wildtyp. **B** zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte aus den PCRs mit den genspezifischen Primern v4-2 und r4-2 sowie dem T-DNA-spezifischen Primer r4-T2 in den Kombinationen v4-2/r4-T2 und v4-2/r4-2 (Tab. 4-Anhang).

Da die gelieferten Samen Mischungen aus heterozygoten Disruptionsmutanten und Wildtyp-Pflanzen enthielten, wurden die nach Selbstung erhaltenen Samen zweier heterozygoter Pflanzen erneut herangezogen und mittels PCR auf T-DNA-Insertion und Zygotie untersucht. In dieser Folgegeneration traten heterozygote und homozygote Disruptionsmutanten sowie Wildtyp-Pflanzen auf. Weder die heterozygoten noch die homozygoten Pflanzen zeigten unter den gegebenen Wachstumsbedingungen einen äußerlich erkennbaren Phänotyp. Von beiden Mutanten wurde eine Sphingobasenanalyse von Blattmaterial durchgeführt (Abb. 34).



**Abb. 34 HPLC-Analyse der DNP-derivatisierten Sphingobasen aus den Gesamtsphingolipiden der Blätter von *A. thaliana* Columbia (Wildtyp) und den T-DNA-Mutanten 893A12 und N510384. A zeigt die gesamten detektierten Sphingobasen. Zur besseren Veranschaulichung der für den Versuch entscheidenden Peaks wurde der in A markierte Ausschnitt in B vergrößert dargestellt.**

Die Disruption des Gens At2g46210 (Disruptionsmutante 893A12) zeigte keine erkennbare Auswirkung auf das Sphingobasenmuster. Dagegen führte der Verlust der Sphingolipid- $\Delta 8$ -Desaturase, die durch At3g61580 codiert wird (Disruptionsmutante N510384), zu einem beinahe kompletten Verlust  $\Delta 8$ -desaturierter Sphingolipide. Die Analyse der Proben mittels HPLC-MS ergab, dass der Anteil der  $\Delta 8$ -desaturierten Hydroxysphingobasen ( $t18:1^{8E/8Z}$ ) an den gesamten Hydroxysphingobasen ( $t18:1^{8E/8Z} + t18:0$ ) in den Blättern der Wildtyppflanzen ca. 86% betrug. In der Mutante N510384 waren dagegen ca. 96% der gesamten Hydroxysphingobasen ( $t18:1^{8E/8Z} + t18:0$ ) nicht desaturiert. Nur ca. 4%  $t18:1^{8E/8Z}$  konnten noch nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die beiden Sphingolipid- $\Delta 8$ -Desaturasen nicht gleich stark an der Desaturierung von Hydroxysphingobasen beteiligt sind. Der Hauptanteil an  $t18:1$  entsteht aus der Reaktion, die durch das Enzym katalysiert wird, das durch At3g61580 codiert wird. Durch die Kreuzung der beiden homozygoten Disruptionsmutanten sollten nun Pflanzen hergestellt werden, die

keine  $\Delta 8$ -Desaturase-Aktivität mehr besitzen. Erst am Ende dieser Arbeit lagen die Samen der F2-Generation vor, die ein Gemisch verschiedener Mutanten enthielten. Die Selektionen mittels BASTA und Kanamycin und die Isolierung der Doppelmутanten entsprechend der Aufspaltung nach den Mendel'schen Regeln (vergleiche Abb. 2-Anhang) wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.

#### **3.5. Ist die Deletion der Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase in *A. thaliana* letal?**

Durch heterologe Expression in Ppd4 $\Delta$  sollte die putative Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase aus *A. thaliana* identifiziert werden. Die Klonierung des ORF in pPIC3.5 blieb jedoch zunächst erfolglos und musste aufgrund des zeitlich begrenzten Rahmens dieser Arbeit abgebrochen werden. Diese Klonierung und die daran anschließende Expression sollen in einer weiterführenden Arbeit erfolgen.

Zur Analyse der Funktion  $\Delta 4$ -desaturierter Sphingolipide in *A. thaliana* wurde eine T-DNA-Insertionsmutante (N607761) der putativen Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase von NASC untersucht. Um homozygote Disruptionsmutanten zu erhalten, wurden die Samen, wie unter 2.2.5. angegeben, angezogen. Mit Hilfe der PCR wurde die genomische DNA der Pflanzen auf T-DNA-Insertion und Zygote untersucht (vergleiche Abb. 33). In der Mischung der gelieferten Samen konnten nur heterozygote und Wildtyp-Pflanzen nachgewiesen werden. Ein Teil der Samen von zwei heterozygoten Pflanzen wurden erneut herangezogen und mittels PCR untersucht. Auch in der Folgegeneration konnten nur heterozygote und Wildtyp-Pflanzen nachgewiesen werden. Nach den Mendel'schen Regeln sollte die Kreuzung zweier Pflanzen, die sich nur in einem Merkmal unterscheiden, in der F2-Generation die folgende statistische Verteilung der Genotypen aufweisen (vergleiche Abb. 1-Anhang): AA : Aa : aa = 1 : 2 : 1. Demzufolge sollte ein Viertel der entstandenen Samen aus der Kreuzung zweier heterozygoter Pflanzen in Bezug auf das Mutanten-Allel homozygot sein. Die Ergebnisse und die Tatsache, dass die *Arabidopsis*-Knockdown-Mutanten der Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase eine deutliche Beeinträchtigung des Wachstums aufweisen (Napier et al., persönliche Mitteilung), deuten darauf hin, dass der Verlust der Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase möglicherweise letal ist. Dem  $\Delta 4$ -desaturierten Sphingolipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) konnten in der Pflanze bereits wichtige Funktionen in der Signaltransduktion und bei der Regulation des Spaltöffnungsapparates zugeschrieben werden [137,157-161]. Es ist daher

wahrscheinlich, dass das Fehlen von S1P starke Auswirkungen auf die durch S1P regulierten Mechanismen in der gesamten Pflanze hat, die nicht durch andere Sphingolipide kompensiert werden können. Ein interessanter Versuch wäre die Analyse der Spaltöffnungsapparate bei Knockdown-Pflanzen. Es ist anzunehmen, dass deren Funktionen durch die Herabsetzung der S1P-Konzentration in den Zellen beeinträchtigt wird und ein optimaler Gasaustausch zwischen Pflanze und Umgebung nicht mehr möglich ist. Da die Aufnahme von CO<sub>2</sub> über die Spaltöffnungen erfolgt, könnte die Funktionsstörung dieser Zellen eine Unterversorgung mit CO<sub>2</sub> sowie eine Beeinträchtigung der Transpiration mit sich bringen. Dies könnte eine Ursache für den beobachteten Zwergwuchs bei den  $\Delta 4$ -Desaturase-Knockdown-Mutanten sein. Zu überprüfen wäre außerdem, ob keimfähige homozygote Samen aus der Kreuzung von heterozygoten Pflanzen hervorgehen oder ob das Fehlen  $\Delta 4$ -desaturierter Sphingolipide bereits Auswirkungen auf die Samenbildung bzw. Keimung hat. Dazu müssten die Samen auf Agarplatten angezogen werden, anhand derer die genaue Zahl gekeimter und nichtgekeimter Samen erfasst werden kann. Die Funktionen  $\Delta 4$ -desaturierter Sphingolipide lassen sich erst dann erschließen, wenn die gezielte Steuerung ihrer Synthese *in vivo* möglich ist.

#### **3.6. Führt die Modifizierung der Sphingolipide in *M. grisea* zu einer Reduktion der virulenten Eigenschaften dieses Pilzes?**

Bezugnehmend auf die Tatsache, dass die GlcCer-defiziente Maus-Melanoma-Zelllinie von Sprong et al. kein Melanin mehr synthetisieren kann [109], sollte überprüft werden, ob die Veränderung der molekularen GlcCer-Spezies eine Auswirkung auf die Melaninbiosynthese und damit die Virulenz von *M. grisea* hat. Die Herstellung der Klone und deren Analyse sollte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von N. J. Talbot (University of Exeter, U.K.) erfolgen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Konstrukt zur Deletion der Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase in *M. grisea* hergestellt. Das Konstrukt bestand aus einer Hygromycin-Resistenzkassette, die von ca. 1300 bp großen Bereichen (homolog zu den Bereichen *up-* bzw. *downstream* der genomischen  $\Delta 4$ -Desaturase-Sequenz) flankiert wurde. Durch homologe Rekombination sollte der ORF der Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase durch das Deletionskonstrukt ersetzt werden. Die Transformation und Selektionierung der Klone wurde von Talbot et al. durchgeführt. Derzeitig stehen noch keine positiven Klone zur Verfügung, so dass die Lipid- und Virulenzanalysen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich waren.

#### 3.7. Perspektiven

Die in dieser Arbeit hergestellten *P. pastoris*-Deletionsmutanten bieten eine Grundlage für weiterführende Experimente zur Aufklärung des Sphingolipidmetabolismus sowie der Funktionen von Sphingolipiden. Ein Schwerpunkt der Arbeit lag in der Untersuchung der Interaktion zwischen dem pflanzlichen Defensin Rs-AFP2 und den GlcCer von *P. pastoris*. Die Ergebnisse bestätigen, dass die Wirksamkeit des Defensins von dem Vorhandensein von GlcCer im Pilz abhängt [116] und dass die Bindung des Defensins an GlcCer nur möglich ist, wenn bestimmte strukturelle Motive vorliegen. Die Annahme, dass die C9-Methylverzweigung essentiell für die Bindung des Defensins an GlcCer ist, wurde hier widerlegt. Da ohne Rs-AFP2-Bindung an GlcCer keine Defensinaktivität nachgewiesen werden konnte, lassen die Ergebnisse vermuten, dass Bindung und Aktivität unmittelbar zusammenhängen. Bisher konnte der genaue Zusammenhang zwischen Defensinbindung und Mechanismus der Defensinwirkung nicht geklärt werden. Zur Beantwortung dieser Frage bieten die Deletionsmutanten neue Möglichkeiten.

Durch die Analyse der GlcCer aus verschiedenen *P. pastoris*-Deletionsmutanten mit Hilfe der Oberflächen-Plasmonresonanz (BIAcore) könnten z. B. die Affinitäten der Defensine zu verschiedenen GlcCer-Spezies bestimmt und die Kinetik ihrer Interaktion ermittelt werden.

Die Aktivität von Rs-AFP2 könnte weiterhin mittels *black lipid membranes* untersucht werden. Dabei würden Lipiddoppelschichten, die den Plasmamembranen der *P. pastoris*-Mutanten entsprechen, zwei Kammern mit wässrigen Lösungen trennen und einen Ionenaustausch zwischen den beiden Kompartimenten verhindern. Ein Stromfluss entstünde nur dann, wenn in der Membran Poren gebildet würden. Auf diese Weise könnte die Porenbildung durch Rs-AFP2 charakterisiert werden.

Zudem wird diskutiert, ob pflanzliche Defensine auch intrazelluläre Interaktionspartner besitzen. Durch die Analyse der Bindung cytosolischer Proteine des Pilzes an immobilisiertes Rs-AFP2, z. B. durch Affinitätschromatographie und/oder BIAcore, könnten mögliche intrazelluläre Interaktionspartner identifiziert und charakterisiert werden.

Eine bisher ungeklärte Frage ist, in wie weit Glucose als Glycosylceramid-Kopfgruppe essentiell für die Bindung von Rs-AFP2 ist. Mit der Identifizierung einer Ceramidgalactosyl- und/oder Ceramidmannosyltransferase könnten in den vorliegenden *Pichia*-Mutanten neue Glycosylceramide hergestellt und analysiert werden. Die entsprechenden

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Expressionsmutanten könnten dann, wie oben beschrieben, analysiert und charakterisiert werden.

Im Zusammenhang mit der Bindung von Rs-AFP2 an pilzliche GlcCer wird weiterhin eine Modulation der Interaktion durch Sterole der Pilzmembran diskutiert. ELISA-Versuche mit verschiedenen Ergosterol-Konzentrationen bei konstanter GlcCer-Konzentration bzw. umgekehrt könnten Aussagen zur Rolle des Sterols liefern. Durch die Herstellung künstlicher Membransysteme mit verschiedenen Sterol/GlcCer-Verhältnissen wäre es möglich, den Mechanismus der Defensinwirkung im Detail zu studieren.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Analyse der Sphingolipid-Biosynthese. Durch die in dieser Arbeit hergestellten Deletionsmutanten war es möglich, die sequenzielle Modifizierung des Ceramidgerüsts aufzuklären, die wahrscheinlich für Pilze mit vergleichbarer GlcCer-Ausstattung allgemein gültig ist. Dabei wurde eine räumliche Trennung zwischen verschiedenen Enzymen und ihren Substraten postuliert, die nur durch  $\Delta 4$ -desaturierte Sphingolipide überwunden werden kann. Da sowohl die GCS als auch die Sphingolipid- $\Delta 8$ -Desaturase im *Pichia*-Wildtyp nur  $\Delta 4$ -desaturierte Substrate umsetzen, ist anzunehmen, dass diese beiden Enzyme räumlich getrennt von der  $\Delta 4$ -Desaturase lokalisiert sind. In Form von GFP-Fusionsproteinen könnten diese Enzyme mittels Immunogold-Lokalisation elektronenmikroskopisch den entsprechenden Membransystemen zugeordnet werden. Die Fütterung der Deletionsmutanten mit markierten Substraten und die Analyse der zellulären Bestandteile bezüglich ihrer Sphingolipidzusammensetzung, würden zusätzliche Informationen zu den Transportvorgängen liefern.

Mit Hilfe der *microarray*-Technik können die Expressionsmuster der Mutanten analysiert werden. Durch den Vergleich mit dem Expressionsmuster von Wildtyp-Zellen können so Aussagen über die Auswirkung der einzelnen Deletionen auf den gesamten Stoffwechsel der Zelle getroffen werden.

Mit der Identifizierung Sphingolipid-modifizierender Enzyme in *U. maydis* und *M. grisea* sowie der Herstellung der zugehörigen Deletionsmutanten wird es möglich, die Beteiligung von Sphingolipiden an der Melaninbiosynthese zu überprüfen. Da einerseits ein Zusammenhang zwischen Melanin und der Virulenz phytopathogener Pilze postuliert [228,240,241,243] und andererseits die Beteiligung von GlcCer am Transport der Tyrosinase nachgewiesen wurde [109], könnten die Deletionsmutanten zur Identifizierung der für diese

### 3. Ergebnisse und Diskussion

---

Prozesse essentiellen GlcCer-Spezies beitragen. I. Hillig hat einen GCS-defizienten *U. maydis*-Stamm hergestellt, bei dem jedoch keine Auswirkung auf die Melaninbiosynthese beobachtet wurde. Andererseits lassen sich die Folgen der Deletion anderer Sphingolipid-modifizierender Enzyme nicht voraussagen. Da diese Deletionen nicht nur in die Biosynthese von GlcCer eingreifen, sondern auch wichtige Signalmoleküle wie z. B. Sphingosin-1-Phosphat betreffen, können für die entsprechenden Mutanten Phänotypen an unerwarteter Stelle im Lebenszyklus des jeweiligen phytopathogenen Pilzes erwartet werden.

Die Analyse der *Arabidopsis*-T-DNA-Mutanten ergab zunächst keine sichtbaren Phänotypen. Die Herstellung einer  $\Delta 8$ -Desaturase-Doppelmutante durch Kreuzung der beiden einzelnen homozygoten  $\Delta 8$ -Desaturase-Disruptionsmutanten wird wahrscheinlich einen 100%igen Verlust der Desaturase-Aktivität zur Folge haben. Unter optimalen Wachstumsbedingungen scheinen  $\Delta 8$ -desaturierte Sphingolipide für die Pflanzen nicht essentiell zu sein. Stival da Silva et al. hatten bereits gezeigt, dass sich Maispflanzen mit unterschiedlicher  $\Delta 8$ -Desaturase-Aktivität in ihrer Aluminiumresistenz unterscheiden [259]. Mit der  $\Delta 8$ -Desaturase-Doppelmutante in *Arabidopsis* kann dieser Zusammenhang überprüft werden.

Die Deletion der Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase in *Arabidopsis* scheint letal zu sein, was auf das Fehlen des Signalmoleküls S1P zurückgeführt werden kann. S1P ist an der Kontrolle verschiedener Stoffwechselprozesse in der Pflanze beteiligt, so z. B. auch an der Regulation des Spaltöffnungsapparates. Die Herabsetzung der S1P-Konzentration in diesen Zellen stört den Gasaustausch zwischen Pflanze und Umgebung und damit die Versorgung der Pflanze mit CO<sub>2</sub>. Durch die Herstellung entsprechender Mutanten zur gezielten Steuerung der Synthese  $\Delta 4$ -desaturierter Produkte wäre es möglich, die Funktionen  $\Delta 4$ -desaturierter Sphingolipide in Abhängigkeit von ihrer Konzentration in der Pflanze zu analysieren.

### 4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten mittels gentechnologischer Manipulation des Sphingolipidmetabolismus in Pilzen und Pflanzen Aussagen über Sphingolipidfunktionen in diesen Organismen erhalten werden. Daher war eine primäre Aufgabe die Herstellung und Analyse von Pilz- und Pflanzen-Mutanten, die durch die Deletion Sphingolipid-modifizierender Enzyme gekennzeichnet sind. Mit Hilfe dieser Analysen sollten zum einen Aussagen bezüglich des Ablaufs der Glucosylceramidbiosynthese in Pilzen getroffen werden, und zum anderen bestand die Hoffnung, dass die Phänotypen dieser Mutanten Hinweise auf bisher unbekannte Sphingolipidfunktionen ermöglichen. Da Sphingolipide eine entscheidende Rolle als Strukturkomponenten von Membranen sowie bei der Signaltransduktion spielen, musste damit gerechnet werden, dass diese Mutanten unerwartete Phänotypen aufweisen.

Zunächst wurden *P. pastoris* Deletionsmutanten der Sphingolipid- $\Delta 4$ - und - $\Delta 8$ -Desaturase sowie der Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylase hergestellt. Die Glycolipidanalysen der  $\Delta 4$ -Desaturase- und der Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylase-Deletionsmutante zeigten einen durch die Gendeletion verursachten Verlust der gesamten GlcCer, während sich das Glycolipidmuster der  $\Delta 8$ -Desaturase-Deletionsmutante qualitativ nicht verändert hatte. Die Sphingobasenanalysen der GlcCer aus der  $\Delta 8$ -Desaturase-Deletionsmutante sowie der  $\Delta 4$ -Desaturase-Deletionsmutante, in der die *Pichia*-eigene GCS überexprimiert wurde, ermöglichten die Aufstellung eines allgemein gültigen Schemas, das die sequenzielle Modifizierung der in GlcCer vorhandenen Sphingobasen in Pilzen beschreibt. Danach stellt die  $\Delta 4$ -Desaturierung den ersten Schritt in der Modifizierung dar, an den sich die  $\Delta 8$ -Desaturierung anschließt. Abschließend erfolgt die Methylverzweigung an der C9-Position. P. Ternes hatte bereits gezeigt, dass die  $\Delta 8$ -Desaturase auch nichtmodifizierte Sphingobasen als Substrate akzeptiert und dass die C9-Methyltransferase nur  $\Delta 8$ -desaturierte Substrate umsetzt [79]. Daraus lässt sich ableiten, dass die GCS und die  $\Delta 8$ -Desaturase von der  $\Delta 4$ -Desaturase-Aktivität räumlich getrennt sind. Dies würde bedeuten, dass eine vollständige Modifizierung und die Synthese von GlcCer von verschiedenen Transportprozessen abhängig sind.

Die Desaturase- und Methyltransferase-Deletionsmutanten wurden durch die Arbeitsgruppe von K. Thevissen (Katholieke Universiteit Leuven, Belgien) auf ihre Defensin-Sensitivität hin untersucht. Dieser Versuch zeigte, dass die GlcCer-defizienten Stämme resistent gegen Rs-APF2 sind. Die Sensitivität der GlcCer-produzierenden Stämme nahm in der Reihenfolge

PpWT > Ppd8 $\Delta$  > PpC9M ab. Dies führte zu der Vermutung, dass die Stärke der Rs-AFP2-Aktivität von der Stärke der Bindung an die verschiedenen GlcCer-Spezies abhängt. Zur Überprüfung dieser Aussage wurden die GlcCer der Sphingolipid- $\Delta$ 8-Desaturase- und -C9-Methyltransferase-Deletionsmutante sowie aus PpWT und der Sphingolipid- $\Delta$ 4-Desaturase-Deletionsmutante, die die PGCS überexprimiert, isoliert und von Thevissen et al. in einem ELISA-Testsystem analysiert. Dabei ergab sich eindeutig, dass die Stärke der Rs-AFP2-Bindung von der molekularen Struktur der jeweiligen GlcCer-Spezies abhängt. Schlussfolgernd lässt sich damit sagen, dass die Bindungsstärke von Rs-AFP2 an die verschiedenen GlcCer-Spezies proportional zu der *in vivo* beobachteten Hemmung des Wachstums der entsprechenden Mutanten durch das Defensin ist.

Mit der Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylase-Deletionsmutante konnte untersucht werden, ob hydroxylierte Fettsäurereste essentiell für die Bindung des Defensins Dm-AMP1 an eine andere Gruppe von Sphingolipiden (IPC) sind. Dies wurde durch Thevissen et al. in einem zu Rs-AFP2 analogen Wachstumstest mit PpWT als Kontrolle überprüft. Die Ergebnisse zeigten keinen Unterschied in der Sensitivität der Mutante gegenüber der Kontrolle, woraus geschlossen werden kann, dass die Hydroxylierung nicht essentiell für die Bindung von Dm-AMP1 an pilzliche IPCs ist.

Zur Erzeugung analoger Deletionsmutanten in *U. maydis* wurden die putativen Desaturase- bzw. Hydroxylase-Gene aus *U. maydis* in *S. cerevisiae* bzw. *P. pastoris* heterolog exprimiert. Dies führte zur Identifizierung einer Sphingolipid- $\Delta$ 4-Desaturase und - $\Delta$ 8-Desaturase sowie einer -C4-Hydroxylase. Außerdem wurde das Konstrukt zur Herstellung einer Sphingolipid- $\Delta$ 4-Desaturase-Deletionsmutante in *M. grisea* kloniert und der Arbeitsgruppe von N. J. Talbot für die Transformation zur Verfügung gestellt. Die entsprechende Deletionsmutante soll klären, ob Sphingolipide bei der Virulenz phytopathogener Pilze eine Rolle spielen.

Der letzte Abschnitt der Arbeit war den Sphingolipid-Desaturasen von Pflanzen gewidmet. *A. thaliana* besitzt zwei Gene für die  $\Delta$ 8-Desaturase und ein Gen für die  $\Delta$ 4-Desaturase. Zunächst wurden die beiden Sphingolipid- $\Delta$ 8-Desaturase-Disruptionsmutanten untersucht. Die Phänotypen der homozygoten Einzelmutanten zeigten keine Auffälligkeiten. Deshalb wurde eine Doppel-Disruptionsmutante durch Kreuzung der beiden Einzelmutanten hergestellt. Die noch nicht abgeschlossene Isolierung und Analyse dieser Doppelmutante wird zu einer Aussage über die Funktion  $\Delta$ 8-desaturierter Sphingolipide in Pflanzen führen. Im Gegensatz zur  $\Delta$ 8-Desaturase enthält das Genom von *A. thaliana* nur ein einziges Gen für die

$\Delta$ 4-Desaturase. Die vergeblichen Versuche zur Erzeugung der entsprechenden homozygoten Disruptionsmutante führten zu dem Schluss, dass  $\Delta$ 4-desaturierte Sphingolipide essentiell für das Überleben von Pflanzen sind.

---

## 5. Literaturverzeichnis

- [1] Chester M. A.: IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) – Nomenclature of glycolipids. Recommendations 1997. *Eur. J. Biochem.* **257**, 293-298 (1998)
- [2] Simons K., Ikonen E.: Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572 (1997)
- [3] Slotte J. P.: Sphingomyelin-cholesterol interactions in biological and model membranes. *Chem. Phys. Lipids* **102**, 13-27 (1999)
- [4] Hirabayashi Y., Osuga S.: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/glycolipid/GLD01E.html>
- [5] Kusumi A., Sako Y.: Cell surface organization by the membrane skeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 566-574 (1996)
- [6] Morrow M. R., Singh D., Lu D., Grant C. W.: Glycosphingolipid fatty acid arrangement in phospholipid bilayers: cholesterol effects. *Biophys. J.* **68**, 179-186 (1995)
- [7] Brown D., Rose J.: Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-544 (1992)
- [8] Parton R. G.: Caveolae and caveolines. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 542-548 (1996)
- [9] Skibbens J. E., Roth M. G., Matlin K. S.: Differential extractability of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and nonpolar fibroblasts. *J. Cell Biol.* **108**, 821-832 (1989)
- [10] Sargiacomo M., Sudol M., Tang Z., Lisanti M. P.: Signal transducing molecules and GPI-linked proteins from a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J. Cell. Biol.* **122**, 789-807 (1993)
- [11] Mongrand S., Morel J., Laroche J., Claverol S., Carde J.-P., Hartmann M.-A., Bonneau M., Simon-Plas F., Lessire R., Bessoule J.-J.: Lipid rafts in higher plant cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 36277-36286 (2004)
- [12] Hakomori S.: Chemistry of glycosphingolipids. Handbook of lipid research (Hanahan D. J., ed.), New York: Plenum Press, pp. 1-165 (1983)
- [13] Karlsson K. A.: Sphingolipid long-chain bases. *Lipids* **5**, 878-891 (1970)
- [14] Karlsson K. A.: On the chemistry and occurrence of sphingolipid long-chain bases. *Chem. Phys. Lipids* **5**, 6-43 (1970)
- [15] Hanada K.: Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1632**, 16-30 (2003)
- [16] Lynch D. V.: Enzymes of sphingolipid metabolism in plants. *Methods Enzymol.* **311**, 130-149 (2000)
- [17] Pinto W. J., Srinivasan B., Shepherd S., Schmidt A., Dickson R. C., Lester R. L.: Sphingolipid long-chain-base auxotrophs of *Saccharomyces cerevisiae*: genetics, physiology, and a method for their selection. *J. Bacteriol.* **174**, 2565-2574 (1992)
- [18] Buede R., Rinker-Schaffer C., Pinto W. J., Lester R. L., Dickson R. C.: Cloning and characterization of *LCB1*, a *Saccharomyces* gene required for biosynthesis of the long-chain base component of sphingolipids. *J. Bacteriol.* **173**, 4325-4332 (1991)
- [19] Nagiec M. M., Baltisberger J. A., Wells G. B., Lester R. L., Dickson R. C.: The *LCB2* gene of *Saccharomyces* and the related *LCB1* gene encode subunits of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 7899-7902 (1994)

- [20] Weiss B., Stoffel W.: Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase – cloning, expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis. *Eur. J. Biochem.* **249**, 239-247 (1997)
- [21] Hanada K., Hara T., Nishijima M., Kuge O., Dickson R. C., Nagiec M. M.: A mammalian homolog of the yeast *LCB1* encodes a component of serine palmitoyltransferase, the enzyme catalyzing the first step in sphingolipid synthesis. *J. Biol. Chem.* **272**, 32108-32114 (1997)
- [22] Gable K., Slife H., Bacikova D., Monaghan E., Dunn T. M.: Tsc3p is an 80-amino acid protein associated with serine palmitoyltransferase and required for optimal enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **275**, 7597-7603 (2000)
- [23] Monaghan E., Gable K., Dunn T.: Mutations in the Lcb2p subunit of serine palmitoyltransferase eliminate the requirement for the *TSC3* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2002**, 659-670 (2002)
- [24] Krisnangkura K., Sweeley C. C.: Studies on the mechanism of 3-ketosphinganine synthetase. *J. Biol. Chem.* **251**, 1597-1602 (1976)
- [25] Beeler T., Bacikova D., Gable K., Hopkins L., Johnson C., Slife H., Dunn T.: The *Saccharomyces cerevisiae* *TSC10/YBR265w* gene encoding 3-ketosphinganine reductase is identified in a screen for temperature-sensitive suppressors of the Ca<sup>2+</sup>-sensitive *csg2Δ* mutant. *J. Biol. Chem.* **273**, 30688-30694 (1998)
- [26] Mandon E. C., Ehses I., Rother J., van Echten G., Sandhoff K.: Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine *N*-acyltransferase in mouse liver. *J. Biol. Chem.* **267**, 11144-11148 (1992)
- [27] Sperling P., Heinz E.: Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes, and functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1632**, 1-15 (2003)
- [28] Lynch D. V., Dunn T. M.: An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytol.* **161**, 677-702 (2004)
- [29] Dickson R. C., Lester R. L., Nagiec M. M.: Serine palmitoyltransferase. *Methods Enzymol.* **311**, 3-9 (2000)
- [30] Leipelt M., Warnecke D., Zähringer U., Ott C., Müller F., Hube B., Heinz E.: Glucosylceramide synthases, a gene family responsible for the biosynthesis of glucosphingolipids in animals, plants, and fungi. *J. Biol. Chem.* **276**, 33621-33629 (2001)
- [31] Haak D., Gable K., Beeler T., Dunn T.: Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p. *J. Biol. Chem.* **272**, 29704-29710 (1997)
- [32] Grilley M. M., Stock S. D., Dickson R. C., Lester R. L., Takemoto J. Y.: Syringomycin action gene *SYR2* is essential for sphingolipid 4-hydroxylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 11062-11068 (1998)
- [33] Schorling S., Vallee B., Barz W. P., Riezman H., Oesterhelt D.: Lag1p and Lac1p are essential for the acyl-CoA-dependent ceramide synthase reaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **12**, 3417-3427 (2001)
- [34] Guillas I., Kirchman P.A., Chuard R., Pfefferli M., Jiang J. C., Jazwinski S. M., Conzelmann A.: C26-CoA-dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* is operated by Lag1p and Lac1p. *EMBO J.* **20**, 2655-2665 (2001)
- [35] Vallée B., Riezman H.: Lip1p: a novel subunit of acyl-CoA ceramide synthase. *EMBO J.* **24**, 730-741 (2005)
- [36] Mao C., Xu R., Bielawska A., Szulc Z. M., Obeid L. M.: Cloning and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* alkaline ceramidase with specificity for dihydroceramide. *J. Biol. Chem.* **275**, 31369-31378 (2000)
- [37] Mao C., Xu R., Bielawska A., Obeid L. M.: Cloning of an alkaline ceramidase from *Saccharomyces cerevisiae*: an enzyme with reverse (CoA-independent) ceramide synthase activity. *J. Biol. Chem.* **275**, 6876-6884 (2000)

- [38] Becker G. W., Lester R. L.: Biosynthesis of phosphoinositol-containing sphingolipids from phosphatidylinositol by a membrane preparation from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **142**, 747-754 (1980)
- [39] Ko J., Cheah S., Fischl A. S.: Regulation of phosphatidylinositol:ceramide phosphoinositol transferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **176**, 5181-583 (1994)
- [40] Fischl A. S., Lu Y., Browdy A., Cremesti A. E.: Inositolphosphoryl ceramide synthase from yeast. *Methods Enzymol.* **311**, 123-130 (2000)
- [41] Mao C., Wadleigh M., Jenkins G. M., Hannun Y. A., Obeid L. M.: Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatase. *J. Biol. Chem.* **272**, 28690-28694 (1997)
- [42] Mandala S. M., Thornton R., Tu Z., Kurtz M. B., Nickels J., Broach J., Menzeleev R., Spiegel S.: Sphingoid base-1-phosphate phosphatase: a key regulator of sphingolipid metabolism and stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 150-155 (1998)
- [43] Nagiec M. M., Skrzypek M., Nagiec E. E., Lester R. L., Dickson R. C.: The *LCB4* (*YOR171c*) and *LCB5* (*YLR260w*) genes of *Saccharomyces* encode sphingoid long chain base kinases. *J. Biol. Chem.* **273**, 19437-19442 (1998)
- [44] Saba D. J., Nara F., Bielawska A., Garrett S., Hannun Y. A.: The *BST1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is the sphingosine-1-phosphate lyase. *J. Biol. Chem.* **272**, 26087-26090 (1997)
- [45] Sugiura M., Kono K., Liu H., Shimizugawa T., Minekura H., Spiegel S., Kohama T.: Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization. *J. Biol. Chem.* **277**, 23294-23300 (2002)
- [46] Brandwagt B. F., Mesbah L. A., Takken F. L., Laurent P. L., Kneppers T. J., Hille J., Nijkamp H. J.: A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lysopersici* toxins and fumonisin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 4961-4966 (2000)
- [47] Lynch D. V.: Lipid metabolism in plants. (Moore T. S., ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 285-308 (1993)
- [48] Ichikawa S., Sakiyama H., Suzuki G., Hidari K. I., Hirabayashi Y.: Expression cloning of a cDNA for human ceramide glucosyltransferase that catalyzes the first glycosylation step of glycosphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 4638-4643 (1996)
- [49] Campbell J. A., Davies G. J., Bulone V., Henrissat B.: A classification of nucleotide-diphospho-sugar glucosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **326**, 929-939 (1997)
- [50] Marks D. L., Wu K., Paul P., Kamisaka Y., Watanabe R., Pagano R. E.: Oligomerization and topology of the Golgi membrane protein glucosylceramide synthase. *J. Biol. Chem.* **274**, 451-456 (1999)
- [51] Futerman A. H., Pagano R. E.: Determination of the intracellular sites and topology of glucosylceramide synthesis in rat liver. *Biochem J.* **280**, 295-302 (1991)
- [52] Jeckel D., Karrenbauer A., Burger K. N., van Meer G., Wieland F.: Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions. *J. Cell Biol.* **117**, 259-267 (1992)
- [53] Warnecke D., Heinz E.: Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 919-941 (2003)
- [54] Bromley P. E., Li Y. O., Murphy S. M., Sumner C. M., Lynch D. V.: Complex sphingolipid synthesis in plants: characterization of inositolphosphorylceramide synthase activity in bean microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **417**, 219-226 (2003)

- [55] Nagiec M. M., Nagiec E. E., Baltisberger J. A., Wells G. B., Lester R. L., Dickson R. C.: Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by the *AUR1* gene. *J. Biol. Chem.* **272**, 9809-9817 (1997)
- [56] Lester R. L., Dickson R. C.: Sphingolipids with inositolphosphate-containing headgroups. *Adv. Lipid Res.* **26**, 253-274 (1993)
- [57] Tan R. X., Chen J. H.: The cerebrosides. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 509-534 (2003)
- [58] Oxley D., Basic A.: Structures of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **96**, 14246-14251 (1999)
- [59] Thompson Jr. G. A., Okuyama H.: Lipid-linked proteins of plants. *Prog. Lipid Res.* **39**, 19-39 (2000)
- [60] Kaul K., Lester R. L.: Characterization of inositol-containing phosphosphingolipids from tobacco leaves. *Plant Physiol.* **55**, 120-129 (1975)
- [61] Kaul K., Lester R. L.: Isolation of six novel phosphoinositol-containing sphingolipids from tobacco leaves. *Biochemistry* **17**, 3569-3575 (1978)
- [62] Hsieh T. C. Y., Kaul K., Laine R. A., Lester R. L.: Structure of a major glycoposphoceramide from tobacco leaves, PSL-I: 2-deoxy-2-acetamido-D-glucopyranosyl( $\alpha$ 1-4)-D-glucuronopyranosyl( $\alpha$ 1-2)myoinositol-1-O-phosphoceramide. *Biochemistry* **17**, 3575-3581 (1978)
- [63] Ternes P., Franke S., Zähringer U., Sperling P., Heinz E.: Identification and characterization of a sphingolipid  $\Delta$ 4-desaturase family. *J. Biol. Chem.* **277**, 25512-25518 (2002)
- [64] Garton S., Michaelson L. V., Beaudoin F., Beale M. H., Napier J. A.: The dihydroceramide desaturase is not essential for cell viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.* **538**, 192-196 (2003)
- [65] Merrill Jr. A. H., Wang E.: Biosynthesis of long-chain (sphingoid) bases from serine by LM cells. Evidence for introduction of the 4-*trans*-double bond after *de novo* biosynthesis of *N*-acyl-sphinganine(s). *J. Biol. Chem.* **261**, 3764-3769 (1986)
- [66] Rother J., van Echten G., Schwarzmann G., Sandhoff K.: Biosynthesis of sphingolipids: dihydroceramide and not sphinganine is desaturated by cultured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 14-20 (1992)
- [67] Michel C., van Echten-Deckert G.: Conversion of dihydroceramide to ceramide occurs at the cytosolic face of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **416**, 153-155 (1997)
- [68] Kok J. W., Nikolova-Karakashian M., Klappe K., Alexander C., Merrill Jr. A. H.: Dihydroceramide biology. Structure-specific metabolism and intracellular localization. *J. Biol. Chem.* **272**, 21128-21136 (1997)
- [69] Geeraert L., Mannaerts G. P., van Veldhoven P. P.: Conversion of dihydroceramide into ceramide: involvement of a desaturase. *Biochem. J.* **327**, 125-132 (1997)
- [70] Causeret C., Geeraert L., van der Hoeven G., Mannaerts G. P., van Veldhoven P. P.: Further characterization of rat dihydroceramide desaturase: tissue distribution, subcellular localization, and substrate specificity. *Lipids* **35**, 1117-1125 (2000)
- [71] Shanklin J., Whittle E., Fox B. G.: Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* **33**, 12787-12794 (1994)
- [72] Shanklin J., Cahoon E. B.: Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 611-641 (1998)
- [73] Sperling P., Heinz E.: Desaturases fused to their electron donor. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **103**, 158-180 (2001)

- [74] Sperling P., Schmidt H., Heinz E.: A cytochrome-*b*<sub>5</sub>-containing fusion protein similar to plant acyl lipid desaturases. *Eur. J. Biochem.* **232**, 798-805 (1995)
- [75] Sperling P., Ternes P., Zank T. K., Heinz E.: The evolution of desaturases. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **68**, 73-95 (2003)
- [76] Sakaki T., Zähringer U., Warnecke D. C., Fahl A., Knogge W., Heinz E.: Sterol glycosides and cerebroside accumulate in *Pichia pastoris*, *Rhynchosporium secalis* and other fungi under normal conditions or under heat shock and ethanol stress. *Yeast* **18**, 679-695 (2001)
- [77] Batrakov S. G., Konova I. V., Sheichenko V. I., Esipov S. E., Galanina L. A., Istratova L. N.: Unusual fatty acid composition of cerebroside from the filamentous soil fungus *Mortierella alpina*. *Chem. Phys. Lipids* **117**, 45-51 (2002)
- [78] Takakuwa N., Kinoshita M., Oda Y., Ohnishi M.: Isolation and characterization of the genes encoding  $\Delta^8$ -sphingolipid desaturase from *Saccharomyces kluyveri* and *Kluyveromyces lactis*. *Curr. Microbiol.* **45**, 459-461 (2002)
- [79] Ternes P., Sperling P., Albrecht, S., Franke S., Cregg J. M., Warnecke D., Heinz E.: Identification of fungal sphingolipid C9-methyltransferases by phylogenetic profiling. zur Veröffentlichung eingereicht
- [80] Sperling P., Zähringer U., Heinz E.: A sphingolipid desaturase from higher plants: Identification of a new cytochrome *b*<sub>5</sub> fusion protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 28590-28596 (1998)
- [81] Sperling P., Blume A., Zähringer U., Heinz E.: Further characterization of  $\Delta^8$ -sphingolipid desaturases from higher plants. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 638-641 (2000)
- [82] Sperling P., Libisch B., Zähringer U., Napier J. A., Heinz E.: Functional identification of a  $\Delta^8$ -sphingolipid desaturase from *Borago officinalis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **388**, 293-298 (2001)
- [84] Michaelson L. V., Longman A. J., Sayanova O., Stobart A. K., Napier J. A.: Isolation and characterization of a cDNA encoding  $\Delta^8$  sphingolipid desaturase from *Aquilegia vulgaris*. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 1073-1075 (2002)
- [85] Ternes P.: Identifizierung und Charakterisierung einer Familie von Sphingolipid- $\Delta^4$ -Desaturasen. *Dissertation* (2003)
- [86] Beckmann C., Rattke J., Sperling P., Heinz E., Boland W.: Stereochemistry of a bifunctional dihydroceramide  $\Delta^4$ -desaturase/hydroxylase from *Candida albicans*; a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Org. Biomol. Chem.* **1**, 2448-2454 (2003)
- [87] Sperling P., Ternes P., Moll H., Franke S., Zähringer U., Heinz E.: Functional characterization of sphingolipid C4-hydroxylase genes from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **494**, 90-94 (2001)
- [88] Imai H., Ohnishi M., Hotsubo K., Kojima M., Ito S.: Sphingoid base composition of cerebroside from plant leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 351-353 (1997)
- [89] Dickson R. C., Nagiec E. E., Skrzypek M., Tillmann P., Wells G. B., Lester R. L.: Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*. *J. Biol. Chem.* **272**, 30196-30200 (1997)
- [90] Jenkins G. M., Richards A., Wahl T., Mao C. G., Obeid L., Hannun Y.: Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272**, 32566-32572 (1997)
- [91] Scheuermann T. H., Lolis E., Hodsdon M. E.: Tertiary structure of thiopurine methyltransferase from *Pseudomonas syringae*, a bacterial orthologue of a polymorphic, drug-metabolizing enzyme. *J. Mol. Biol.* **333**, 573-585 (2003)
- [92] Martin J. L., McMillan F. M.: SAM (dependent) I AM: the *S*-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 783-793 (2002)

- [93] Schubert H. L., Blumenthal R. M., Cheng X.: Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 329-335 (2003)
- [94] Dixon M. M.: The structure of the C-terminal domain of methionine synthase: presenting S-adenosylmethionine for reductive methylation of B<sub>12</sub>. *Structure* **4**, 1263-1275 (1996)
- [95] Mitchell A. G., Martin C. E.: Fahlp, a *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *b*<sub>5</sub> fusion protein, and its *Arabidopsis thaliana* homolog that lacks the cytochrome *b*<sub>5</sub> domain both function in the alpha-hydroxylation of sphingolipid-associated very long chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* **272**, 28281-28288 (1997)
- [96] Dunn T. M., Haak D., Monaghan E., Beeler T. J.: Synthesis of monohydroxylated inositolphosphorylceramide (IPC-C) in *Saccharomyces cerevisiae* requires Scs7p, a protein with both a cytochrome *b*<sub>5</sub>-like domain and a hydroxylase/desaturase domain. *Yeast* **14**, 311-321 (1998)
- [97] Kaya K., Ramesha C. S., Thompson Jr. G. A.: On the formation of  $\alpha$ -hydroxy fatty acids: evidence for a direct hydroxylation of nonhydroxy fatty acid-containing sphingolipids. *J. Biol. Chem.* **259**, 3548-3553 (1984)
- [98] Dunn T. M., Lynch D. V., Michaelson L. V., Napier J. A.: A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* **93**, 483-497 (2004)
- [99] Kawai G., Ikeda Y.: Chemistry and functional moiety of a fruiting-inducing cerebroside in *Schizophyllum commune*. *Biochim. Biophys. Acta* **754**, 243-248 (1983)
- [100] Kawai G., Ikeda Y.: Structure of biologically active and inactive cerebrosides prepared from *Schizophyllum commune*. *J. Lipid Res.* **26**, 338-343 (1985)
- [101] Kawai G.: Molecular species of cerebrosides in fruiting bodies of *Lentinus edodes* and their biological activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1001**, 185-190 (1989)
- [102] Kawai G., Ohnishi M., Fujino Y., Ikeda Y.: Stimulatory effect of certain plant sphingolipids on fruiting of *Schizophyllum commune*. *J. Biol. Chem.* **261**, 779-784 (1986)
- [103] Mizushina Y., Hanashima L., Yamaguchi T., Takemura M., Sugawara F., Saneyoshi M., Matsukage A., Yoshida S., Sakaguchi K.: A mushroom fruiting body-inducing substance inhibits activities of replicative DNA polymerases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 17-22 (1998)
- [104] Lavery S., Momany M., Lindsey R., Toledo M., Shayman J., Fuller M., Brooks K., Doong R. L., Straus A. H., Takahashi H. K.: Disruption of the glucosylceramide biosynthetic pathway in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus* by inhibitors of UDP-Glc:ceramide glucosyltransferase strongly affects spore germination, cell cycle, and hyphal growth. *FEBS Lett.* **525**, 59-64 (2002)
- [105] Brade L., Vielhaber G., Heinz E., Brade H.: *In vitro* characterization of anti-glucosylceramide rabbit antisera. *Glycobiology* **10**, 629-636 (2000)
- [106] Rodrigues M. L., Travassos L. R., Miranda K. R., Franzen A. J., Rozental S., de Souza W., Alviano C. S., Barreto-Bergter E.: Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibit cell budding and fungal growth. *Infect. Immun.* **68**, 7049-7060 (2000)
- [107] Toledo M. S., Suzuki E., Lavery S. B., Straus A. H., Takahashi H. K.: Characterization of monoclonal antibody MEST-2 specific to glucosylceramide of fungi and plants. *Glycobiology* **11**, 105-112 (2001)
- [108] Pinto M. R., Rodrigues M. L., Travassos L. R., Haido R. M., Wait R., Barreto-Bergter E.: Characterization of glucosylceramides in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation. *Glycobiology* **12**, 251-260 (2002)
- [109] Sprong H., Degroote S., Claessens T., van Drunen J., Oorschot V., Westerink B. H. C., Hirabayashi Y., Klumperman J., van der Sluijs P., van Meer G.: Glycosphingolipids are required for sorting melanosomal proteins in the Golgi complex. *J. Cell Biol.* **155**, 369-379 (2001)

- [110] Nosanchuk J. D., van Duin D., Mandal P., Aisen P., Legendre A. M., Casadevall A.: *Blastomyces dermatitidis* produces melanin *in vitro* and during infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **239**, 187-193 (2004)
- [111] Wheeler M. H., Bruton B. D., Puckhaber L. S., Zhang J., Stipanovic R. D.: Identification of 1,8-dihydroxynaphthalene melanin in *Monosporascus cannonballus* and the analysis of hexaketide and pentaketide compounds produced by wild-type and pigmented isolates of the fungus. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4113-4120 (2004)
- [112] Talbot N. J.: On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 177-202 (2003)
- [113] Money N. P., Howard R. J.: Confirmation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure, and pathogenicity using a new method of turgor measurement. *Fungal Genet. Biol.* **20**, 217-227 (1996)
- [114] Bölker M.: *Ustilago maydis* – a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**, 1395-1401 (2001)
- [115] Thevissen K., Warnecke D., Francois I. E., Leipelt M., Heinz E., Ott C., Zähringer U., Thomma B. P., Ferket K. K., Cammue B. P.: Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J. Biol. Chem.* **279**, 3900-3905 (2004)
- [116] Thevissen K., Cammue B. P., Lemaire K., Winderickx J., Dickson R. C., Lester R. L., Ferket K. K., van Even F., Parret A. H., Broekaert W. F.: A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 9531-9536 (2000)
- [117] Dickson R. C., Nagiec E. E., Wells G. B., Nagiec M. M., Lester R. L.: Synthesis of mannose-(inositol-P)<sub>2</sub>-ceramide, the major sphingolipid in *Saccharomyces cerevisiae*, requires the *IPT1 (YDR072c)* gene. *J. Biol. Chem.* **272**, 29620-29625 (1997)
- [118] Thevissen K., Francois I. E., Takemoto J. Y., Ferket K. K., Meert E. M., Cammue B. P.: DmAMP1, an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*), interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **226**, 169-173 (2003)
- [119] Stock S. D., Hama H., Radding J. A., Young D. A., Takemoto J. Y.: Syringomycin E inhibition of *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for biosynthesis of sphingolipids with very-long-chain fatty acids and mannose- and phosphoinositol-containing head groups. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1174-1180 (2000)
- [120] Luberto C., Toffaletti D. L., Wills E. A., Tucker S. C., Casadevall A., Perfect J. R., Hannun Y. A., del Poeta M. M.: Roles for inositol-phosphoryl ceramide synthase 1 (IPC1) in pathogenesis of *C. neoformans*. *Genes Dev.* **15**, 201-212 (2001)
- [121] Cheng J., Park T. S., Fischl A. S., Ye X. S.: Cell cycle progression and cell polarity require sphingolipid biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell Biol.* **21**, 6198-6209 (2001)
- [122] Dickson R. C., Wells G. B., Schmidt A., Lester R. L.: Isolation of mutant *Saccharomyces cerevisiae* strains that survive without sphingolipids. *Mol. Cell Biol.* **10**, 2176-2181 (1990)
- [123] Skrzypek M. S., Nagiec M. M., Lester R. L., Dickson R. C.: Analysis of phosphorylated sphingolipid long-chain bases reveals potential roles in heat stress and growth control in *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.* **181**, 1134-1140 (1999)
- [124] Wells G. B., Dickson R. C., Lester R. L.: Heat-induced elevation of ceramide in *Saccharomyces cerevisiae* via *de novo* synthesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 7235-7243 (1998)
- [125] Johnston G. C., Singer R. A.: Ribosomal precursor RNA metabolism and cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **178**, 357-360 (1980)

- [126] Jenkins G. M., Hannun Y.A.: Role for *de novo* sphingoid base biosynthesis in the heat-induced transient cell cycle arrest of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**, 8574-8581 (2001)
- [127] Dickson R. C., Lester R. L.: Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1583**, 13-25 (2002)
- [128] Chung N., Jenkins G., Hannun Y. A., Heitman J., Obeid L. M.: Sphingolipids signal heat stress-induced ubiquitin-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* **275**, 17229-17232 (2000)
- [129] Friant S., Lombardi R., Schmelzle T., Hall M. N., Riezman H.: Sphingoid base signaling via Pkh kinases is required for endocytosis in yeast. *EMBO J.* **20**, 6783-6792 (2001)
- [130] Shaw J. D., Cummings K. B., Huyer G., Michaelis S., Wendland B.: Yeast as a model system for studying endocytosis. *Exp. Cell Res.* **271**, 1-9 (2001)
- [131] Duncan M. C., Cope M. J., Goode B. L., Wendland B., Drubin D. G.: Yeast Eps15-like endocytic protein, Pan1p, activates the Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* **3**, 687-690 (2001)
- [132] Grote E., Vlacich G., Pypaert M., Novick P. J.: A *snc1* endocytosis mutant: phenotypic analysis and suppression by overproduction of dihydrosphingosine phosphate lyase. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4051-4065 (2000)
- [133] Jiang J. C., Kirchman P. A., Allen M., Jazwinski S. M.: Suppressor analysis points to the subtle role of the *LAG1* ceramide synthase gene in determining yeast longevity. *Exp. Gerontol.* **39**, 999-1009 (2004)
- [134] Horvath A., Sütterlin C., Manning-Krieg U., Movva N. R., Riezman H.: Ceramide synthesis enhances transport of GPI-anchored proteins to the Golgi apparatus in yeast. *EMBO J.* **13**, 3687-3695 (1994)
- [135] Skrzypek M., Lester R. L., Dickson R. C.: Suppressor gene analysis reveals an essential role for sphingolipids in transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**, 1513-1520 (1997)
- [136] Sütterlin C., Doering T. L., Schimmöller F., Schröder S., Riezman H.: Specific requirements for the ER to Golgi transport of GPI-anchored proteins in yeast. *J. Cell Sci.* **110**, 2703-2714 (1997)
- [137] Spiegel S., Milstien S.: Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 397-407 (2003)
- [138] Haschke H., Kaiser G., Martinoia E., Hammer U., Teucher T., Dorne A. J., Heinz E.: Lipid profiles of leaf tonoplasts from plants with different CO<sub>2</sub> fixation mechanisms. *Bot. Acta* **103** (1990)
- [139] Tavernier E., le Quoc D., le Quoc K.: Lipid composition of the vacuolar membrane of *Acer pseudoplatanus* cultured cells. *Biochim. Biophys. Acta* **167**, 242-247 (1993)
- [140] Yoshida S., Uemura M.: Lipid composition of plasma membranes and tonoplasts isolated from etiolated seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiol.* **82**, 807-812 (1986)
- [141] Karlsson K.-A.: Glycosphingolipids and surface membranes. Biological membranes. (Chapman D., ed.), New York, NY, U.S.A.: Academic Press, 1-74 (1982)
- [142] Lynch D. V., Caffrey M., Hogan J. L., Steponkus J. L.: Calorimetric and X-ray diffraction studies of rye glucocerebroside mesomorphism. *Biophys. J.* **61**, 1289-1300 (1992)
- [143] Lynch D. V., Cahoon E. B., Fairfield S. R., Tannishtha: Glycosphingolipids of plant membranes. Plant lipid biochemistry, structure and utilization (Quinn P. J., Harwood J. L., eds.), London, UK: Portland Press, 47-52 (1990)
- [144] Norberg P., Nilsson R., Nyireddy S., Liljenberg C.: Glucosylceramides of oat root plasma membranes – physicochemical behavior in natural and in model systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1299**, 80-86 (1996)

- [145] Boggs J.: Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. *Biochim Biophys. Acta* **906**, 353-404 (1987)
- [146] Spassieva S., Hille J.: Plant sphingolipids today – are they still enigmatic? *Plant Biol.* **5**, 125-136 (2003)
- [147] Steponkus P. L., Lynch D. V.: Freeze/thaw-induced destabilization of the plasma membrane and the effects of cold acclimation. *J. Bioenerg. Biomembr.* **21**, 21-41 (1989)
- [148] Uemura M., Steponkus P. L.: A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiol.* **104**, 479-496 (1994)
- [149] Uemura M., Joseph R. A., Steponkus P. L.: Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. *Plant Physiol.* **109**, 15-30 (1995)
- [150] Lynch D. V., Steponkus P. L.: Plasma-membrane lipid alterations associated with cold-acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiol.* **83**, 761-767 (1987)
- [151] Bohn M.: Der Einfluß einer Kältehärtung im Vergleich zu einer Hormonbehandlung (Abscisinsäure) auf das Lipidmuster von Plasma- und Chloroplastenmembranen des Winterweizens (*Triticum aestivum* L.). Doktorarbeit an der Universität Hamburg, Hamburg (1999)
- [152] Imai H.: Glucocerebrosides containing unsaturated hydroxy fatty acids in *Arabidopsis thaliana*. Advances in plant lipid research. (Sanchez J., Cerda-Olmedo E., Martinez-Force E., eds.), Seville, Spain: University of Seville Publications, 38-40 (1998)
- [153] Imai H., Ohnishi M., Kinoshita M., Kojima M., Ito S.: Structure and distribution of cerebroside containing unsaturated hydroxy fatty acids in plant leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1309-1313 (1995)
- [154] Kawaguchi M., Imai H., Naoe M., Yasui Y., Ohnishi M.: Cerebrosides in grapevine leaves: distinct composition of sphingoid bases among the grapevine species having different tolerances to freezing temperature. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1271-1273 (2000)
- [155] Koga J., Yamauchi T., Shimura M., Ogawa N., Oshima K., Umemura K., Kikuchi M., Ogasawara N.: Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *J. Biol. Chem.* **273**, 31985-31991 (1998)
- [156] Umemura K., Ogawa N., Koga J., Iwata M., Usami H.: Elicitor activity of cerebroside, a sphingolipid elicitor, in cell suspension cultures of rice. *Plant Cell Physiol.* **43**, 778-784 (2002)
- [157] Spiegel S., Milstien S.: Exogenous and intracellularly generated sphingosine 1-phosphate can regulate cellular processes by divergent pathways. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1216-1219 (2003)
- [158] Hait N. C., Sarkar S., Le Stunff H., Mikami A., Maceyka M., Milstien S., Spiegel S.: Role of sphingosine kinase 2 in cell migration towards epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* (2005), im Druck
- [159] Pyne S., Pyne N. J.: Sphingosine 1-phosphate signalling and termination at lipid phosphate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1582**, 121-131 (2002)
- [160] Hla T., Lee M.-J., Ancellin N., Paik J. H., Kluck M. J.: Lysophospholipids – receptor revelations. *Science* **294**, 1875-1878 (2001)
- [161] Coursol S., Fan L.-M., le Stunff H., Spiegel S., Gilroy S., Assmann S. M.: Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature* **423**, 651-654 (2003)
- [162] Ng C. K., Carr K., McAinsh M. R., Powell B., Hetherington A. M.: Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine 1-phosphate. *Nature* **410**, 596-599 (2001)
- [163] Worrall D., Ng C., Hetherington A. M.: Sphingolipids, new players in plant signalling. *Trends Plant Sci.* **8**, 317-320 (2003)

- [164] Hannun Y. A., Obeid L. M.: The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: Stress encounters of the lipid kind. *J. Biol. Chem.* **277**, 25847-25850 (2002)
- [165] Greenberg J. T., Silverman F. P., Liang H.: Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defence-related responses from disease resistance in the *Arabidopsis* mutant *acd5*. *Genetics* **156**, 341-350 (2000)
- [166] Liang H., Yao N., Song J. T., Luo S., Lu H., Greenberg J. T.: Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev.* **17**, 2636-2641 (2003)
- [167] Morita N., Nakazato H., Okuyama H., Kim Y., Thompson Jr. G. A.: Evidence for a glycosylinositolphospholipid-anchored alkaline phosphatase in the aquatic plant *Spirodela oligorrhiza*. *Biochim. Biophys. Acta* **1290**, 53-62 (1996)
- [168] Sherrier D. J., Prime T. A., Dupree P.: Glycosylphosphatidylinositol-anchored cell-surface proteins from *Arabidopsis*. *Electrophoresis* **20**, 2027-2035 (1999)
- [169] Svetek J., Yadav M. P., Nothnagel E. A.: Presence of a glycosylphosphatidylinositol lipid anchor on rose arabinogalactan proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 14724-14733 (1999)
- [170] Thompson Jr. G. A., Okuyama H.: Lipid-linked proteins of plants. *Prog. Lipid Res.* **39**, 19-39 (2000)
- [171] van Meer G., Lisman Q.: Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J. Biol. Chem.* **277**, 25855-25858 (2002)
- [172] Matsunaga T., Rahman A.: What brought the adaptive immune system to vertebrates? – The jaw hypothesis and the seahorse. *Immunol. Rev.* **166**, 177-186 (1998)
- [173] Boman H. G.: Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 61-92 (1995)
- [174] Thomma B. P. H. J., Cammue B. P. A., Thevissen K.: Plant defensins. *Planta* **216**, 193-202 (2002)
- [175] Thomma B. P. H. J., Penninckx I. A., Broekaert W. F., Cammue B. P.: The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 63-68 (2001)
- [176] Colilla F. J., Rocher A., Mendez E.: gamma-Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett.* **270**, 191-194 (1990)
- [177] Mendez E., Moreno A., Colilla F., Pelaez F., Limas G. G., Mendez R., Soriano F., Salinas M., de Haro C.: Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hordothionin, from barley endosperm. *Eur. J. Biochem.* **194**, 533-539 (1990)
- [178] Bruix M., Jimenez M. A., Santoro J., Gonzalez C., Colilla F. J., Mendez E., Rico M.: Solution structure of gamma 1-H and gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by 1H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry* **32**, 715-724 (1993)
- [179] Terras F. R., Eggermont K., Kovaleva V., Raikhel N. V., Osborn R. W., Kester A., Rees S. B., Torrekens S., van Leuven F., Vanderleyden J.: Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell* **7**, 573-588 (1995)
- [180] Cornet B., Bonmatin J. M., Hetru C., Hoffmann J. A., Ptak M., Vovelle F.: Refine three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure* **3**, 435-448 (1995)
- [181] Bonmatin J. M., Bonnat J. L., Gallet X., Vovelle F., Ptak M., Reichhart J. M., Hoffmann J. A., Keppi E., Legrain M., Achstetter T.: Two-dimensional 1H-NMR study of recombinant insect defensin A in water: resonance assignments, secondary structure and global folding. *J. Biomol. NMR* **2**, 235-256 (1992)
- [182] Landon C., Sodano P., Hetru C., Hoffmann J., Ptak M.: Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects. *Protein Sci.* **6**, 1878-1884 (1997)

- [183] Landon C., Pajon A., Vovelle F., Sodano P.: The active site of drosomycin, a small insect antifungal protein, delineated by comparison with the modeled structure of Rs-AFP2, a plant antifungal protein. *J. Pept. Res.* **56**, 231-238 (2000)
- [184] Lamberty M., Caille A., Landon C., Tassin-Moindrot S., Hetru C., Bulet P., Vovelle F.: Solution structures of the antifungal heliomicin and a selected variant with both antibacterial and antifungal activities. *Biochemistry* **40**, 11995-12003 (2001)
- [185] Mitta G., Vandenbulcke F., Hubert F., Salzet M., Roch P.: Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J. Biol. Chem.* **275**, 12954-12962 (2000)
- [186] Charlet M., Chernysh S., Philippe H., Hetru C., Hoffmann J. A., Bulet P.: Innate Immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* **271**, 21808-21813 (1996)
- [187] Hubert F., Noel T., Roch P.: A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Eur. J. Biochem.* **240**, 302-306 (1996)
- [188] Tang Y. Q., Yuan J., Osapay G., Osapay K., Tran D., Miller C. J., Ouellette A. J., Selsted M. E.: A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* **286**, 498-502 (1999)
- [189] Trabi M., Schirra H. J., Craik D. J.: Three-dimensional structure of RTD-1, a cyclic antimicrobial defensin from *Rhesus macaque* leukocytes. *Biochemistry* **40**, 4211-4221 (2001)
- [190] Lehrer R. I., Lichtenstein A. K., Ganz T.: Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 105-128 (1993)
- [191] Selsted M. E., Tang Y. Q., Morris W. L., McGuire P. A., Novotny M. J., Smith W., Henschen A. H., Cullor J. S.: Purification, primary structures, and antibacterial activities of  $\beta$ -defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* **268**, 6641-6648 (1993)
- [192] Hill C. P., Yee J., Selsted M. E., Eisenberg D.: Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science* **251**, 1481-1485 (1991)
- [193] Pardi A., Zhang X. L., Selsted M. E., Skalicky J. J., Yip P. F.: NMR studies of defensin antimicrobial peptides. 2. Three-dimensional structures of rabbit NP-2 and human HNP-1. *Biochemistry* **31**, 11357-11364 (1992)
- [194] Hoover D. M., Rajashankar K. R., Blumenthal R., Puri A., Oppenheim J. J., Chertov O., Lubkowski J.: The structure of human  $\beta$ -defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J. Biol. Chem.* **275**, 32911-32918 (2000)
- [195] Hoover D. M., Chertov O., Lubkowski J.: The structure of human  $\beta$ -defensin-1. New insights into structural properties of  $\beta$ -defensins. *J. Biol. Chem.* **276**, 39021-39026 (2001)
- [196] Sawai M. V., Jia H. P., Liu L., Aseyev V., Wiencek J. M., McCray P. B. Jr., Ganz T., Kearney W. R., Tack B. F.: The NMR structure of human  $\beta$ -defensin-2 reveals a novel alpha-helical segment. *Biochemistry* **40**, 3810-3816 (2001)
- [197] Osborn R. W., de Samblanx G. W., Thevissen K., Goderis I., Torrekens S., van Leuven F., Attenborough S., Rees S. B., Broekaert W. F.: Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Hippocastanaceae* and *Saxifragaceae*. *FEBS Lett.* **368**, 257-262 (1995)
- [198] Broekaert W. F., Terras F. R., Cammue B. P., Osborn R. W.: Plant defensins: noval antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* **108**, 1353-1358 (1995)
- [199] Broekaert W. F., Cammue B. P. A., de Bolle M. F. C., Thevissen K., de Samblanx G. W., Osborn R. W.: Antimicrobial peptides in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **16**, 297-323 (1997)

- [200] Segura A., Moreno M., Molina A., Garcia-Olmedo F.: Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Lett.* **435**, 159-162 (1998)
- [201] Bloch C. Jr., Richardson M.: A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect alpha-amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat gamma purothionins. *FEBS Lett.* **279**, 101-104 (1991)
- [202] Shade R. E., Schroeder H. E., Pueyo J. J., Table L. M., Murdock L. L., Higgins T. J. V., Chrispeels M. J.: Transgenic pea seeds expressing the alpha-amylase inhibitor of the common bean are resistant to burchid beetles. *Bio-Technology* **12**, 793-796 (1994)
- [203] Terras F. R., Schoofs H. M., de Bolle M. F., van Leuven F., Rees S. B., Vanderleyden J., Cammue B. P., Broekaert W. F.: Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* **267**, 15301-15309 (1992)
- [204] Terras F. R., Torrekens S., van Leuven F., Osborn R. W., Vanderleyden J., Cammue B. P., Broekaert W. F.: A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from *Brassicaceae* species. *FEBS Lett.* **36**, 233-240 (1993)
- [205] Cociancich S., Ghazi A., Hetru C., Hoffmann J. A., Letellier L.: Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* **268**, 19239-19245 (1993)
- [206] Kagan B. L., Selsted M. E., Ganz T., Lehrer R. I.: Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 210-214 (1990)
- [207] Wimley W. C., Selsted M. E., White S. H.: Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci.* **3**, 1362-1373 (1994)
- [208] Hristova K., Selsted M. E., White S. H.: Interactions of monomeric rabbit neutrophil defensins with bilayers: comparison with dimeric human defensin HNP-2. *Biochemistry* **35**, 11888-11894 (1996)
- [209] Maget-Dana R., Ptak M.: Penetration of the insect defensin A into phospholipid monolayers and formation of defensin A-lipid complexes. *Biophys. J.* **73**, 2527-2533 (1997)
- [210] Oren Z., Shai Y.: Mode of action of linear amphiphatic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **47**, 451-463 (1998)
- [211] Shai Y.: Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1462**, 55-70 (1999)
- [212] Wu M., Maier E., Benz R., Hancock R. E.: Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**, 7235-7242 (1999)
- [213] Xiong Y. Q., Yeaman M. R., Bayer A. S.: *In vitro* antibacterial activities of platelet microbicidal protein and neutrophil defensin against *Staphylococcus aureus* are influenced by antibiotics differing in mechanism of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1111-1117 (1999)
- [214] Thevissen K., Ghazi A., de Samblanx G. W., Brownlee C., Osborn R. W., Broekaert W. F.: Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J. Biol. Chem.* **271**, 15018-15025 (1996)
- [215] Thevissen K., Terras F. R., Broekaert W. F.: Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5451-5458 (1999)
- [216] de Samblanx G. W., Goderis I. J., Thevissen K., Raemaekers R., Fant F., Borremans F., Acland D. P., Osborn R. W., Patel S., Broekaert W. F.: Mutational analysis of a plant defensin from radish (*Raphanus sativus* L.) reveals two adjacent sites important for antifungal activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 1171-1179 (1997)

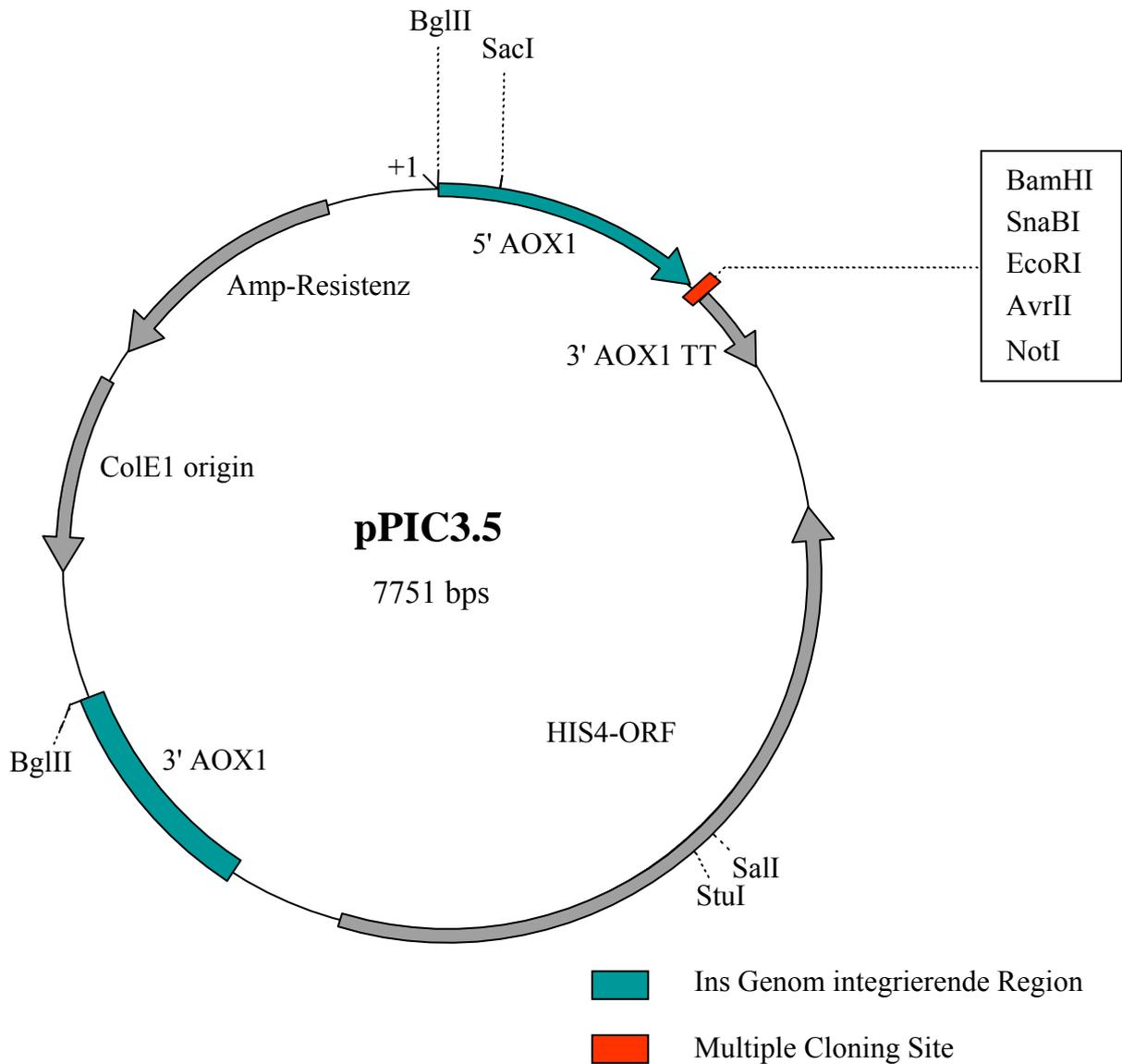
- [217] Thevissen K., Osborn R. W., Acland D. P., Broekaert W. F.: Specific, high affinity binding sites for an antifungal plant defensin on *Neurospora crassa* hyphae and microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* **272**, 32176-32181 (1997)
- [218] Thevissen K., Osborn R. W., Acland D. P., Broekaert W. F.: Specific binding sites for an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 54-61 (2000)
- [219] Caaveiro J. M., Molina A., Gonzalez-Manas J. M., Rodriguez-Palenzuela P., Garcia-Olmedo F., Goni F. M.: Differential effects of five types of antipathogenic plant peptides on model membranes. *FEBS Lett.* **410**, 338-342 (1997)
- [220] Hamer J. E., Talbot N. J.: Infection-related development in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 693-697 (1998)
- [221] Baker B., Zambryski P., Staskawicz B., Dinesh-Kumar S.P.: Signaling in plant-microbe interactions. *Science* **276**, 726-733 (1997)
- [222] Ekwamu A.: Influence of head blast infection on seed germination and yield components of finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn). *Trop. Pest Manag.* **37**, 122-123 (1991)
- [223] Igarashi S., Utiamada C. M., Igarashi L. C., Kazuma A. H., Lopes R. S.: *Pyricularia* in wheat. 1. Occurrence of *Pyricularia* sp. in Paran state. *Fitopatol. Bras.* **11**, 351-352 (1986)
- [224] Talbot N. J., Foster A. J.: Genetics and genomics of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: developing an experimental model for understanding fungal diseases of cereals. *Adv. Bot. Res.* **34**, 263-287 (2001)
- [225] Thinlay X., Finckh M. R., Bordeos A. C., Zeigler R. S.: Effects and possible causes of an unprecedented rice blast epidemic on the traditional farming system of Bhutan. *Agric. Ecosyst. Environ.* **78**, 237-248 (2000)
- [226] Valent B., Chumley F. G.: Molecular genetic analysis of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **29**, 443-467 (1991)
- [227] Hamer J. E., Howard R. J., Chumley F. G., Valent B.: A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science* **239**, 288-290 (1988)
- [228] Bourett T. M., Howard R. J.: *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Can. J. Bot.* **68**, 329-342 (1990)
- [229] Dean R. A.: Signal pathways and appressorium morphogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**, 211-234 (1997)
- [230] Adachi K., Hamer J. E.: Divergent cAMP signaling pathways regulate growth and pathogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **10**, 1361-1373 (1998)
- [231] Choi W., Dean R. A.: The adenylate cyclase gene *MAC1* of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development. *Plant Cell* **9**, 1973-1983 (1997)
- [232] Kronstad J. W.: Virulence and cAMP in smuts, blast, and blight. *Trends Plant Sci.* **2**, 193-199 (1997)
- [233] Lee Y. H., Dean R. A.: cAMP regulates infection structure formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **5**, 693-700 (1993)
- [234] Talbot N. J., Ebbole D. J., Hamer J. E.: Identification and characterisation of *MPGI*, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **5**, 1575-1590 (1993)
- [235] Talbot N. J., Kershaw M. J., Wakley G. E., de Vries O. M. H., Wessels J. G. H., Hamer J. E.: *MPGI* encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development of *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **8**, 985-999 (1996)

- [236] Lau G. W., Hamer J. E.: Regulatory genes controlling *MPG1* expression and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **8**, 771-781 (1996)
- [237] Soanes D. M., Cooley R. N., Kershaw M. J., Foster S. J., Talbot N. J.: Regulation of the *MPG1* hydrophobin gene from *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**, 1253-1267 (2002)
- [238] DeZwaan T. M., Carroll A. M., Valent B., Sweigard J. A.: *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive surface cues. *Plant Cell* **11**, 2013-2030 (1999)
- [239] Sweigard J. A., Carroll A. M., Farrall L., Chumley F. G., Valent B.: *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**, 404-412 (1998)
- [240] Henson J. M., Butler M. J., Day A. W.: The dark side of the mycelium: melanins in phytopathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**, 447-471 (1999)
- [241] Tucker S. L., Talbot N. J.: Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**, 385-417 (2001)
- [242] Bechinger C., Giebel K.-F., Schnell M., Leiderer P., Deising H. B., Bastmeyer M.: Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* **285**, 1896-1899 (1999)
- [243] Howard R. J., Ferrari M. A., Roach D. H., Money N. P.: Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 11281-11284 (1991)
- [244] Bölker M., Urban M., Kahmann R.: The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450 (1992)
- [245] Spellig T., Bölker M., Lottspeich F., Frank R. W., Kahmann R.: Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **13**, 1620-1627 (1994)
- [246] Snetselaar K. M., Bölker M., Kahmann R.: *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genet. Biol.* **20**, 299-312 (1996)
- [247] Regenfelder E., Spellig T., Hartmann A., Lauenstein S., Bölker M., Kahmann R.: G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? *EMBO J.* **16**, 1934-1942 (1997)
- [248] Garcia-Muse T., Steinberg G., Perez-Martin J.: Pheromone-induced G<sub>2</sub> arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryot. Cell* **2**, 494-500 (2003)
- [249] Kahmann R., Bölker M.: Self/nonself recognition in fungi: old mysteries and simple solutions. *Cell* **85**, 145-148 (1996)
- [250] Kämper J., Reichmann M., Romeis T., Bölker M., Kahmann R.: Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83 (1995)
- [251] Bent A. F.: *Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol.* **124**, 1540-1547 (2000)
- [252] Hooykaas P. J. J., Schilperoort R. A.: *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.* **19**, 15-38 (1992)
- [253] Tzfira T., Citovsky V.: Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends Cell Biol.* **12**, 121-129 (2002)
- [254] Valentine L.: *Agrobacterium tumefaciens* and the plant: The David and Goliath of modern genetics. *Plant Physiol.* **133**, 948-955 (2003)

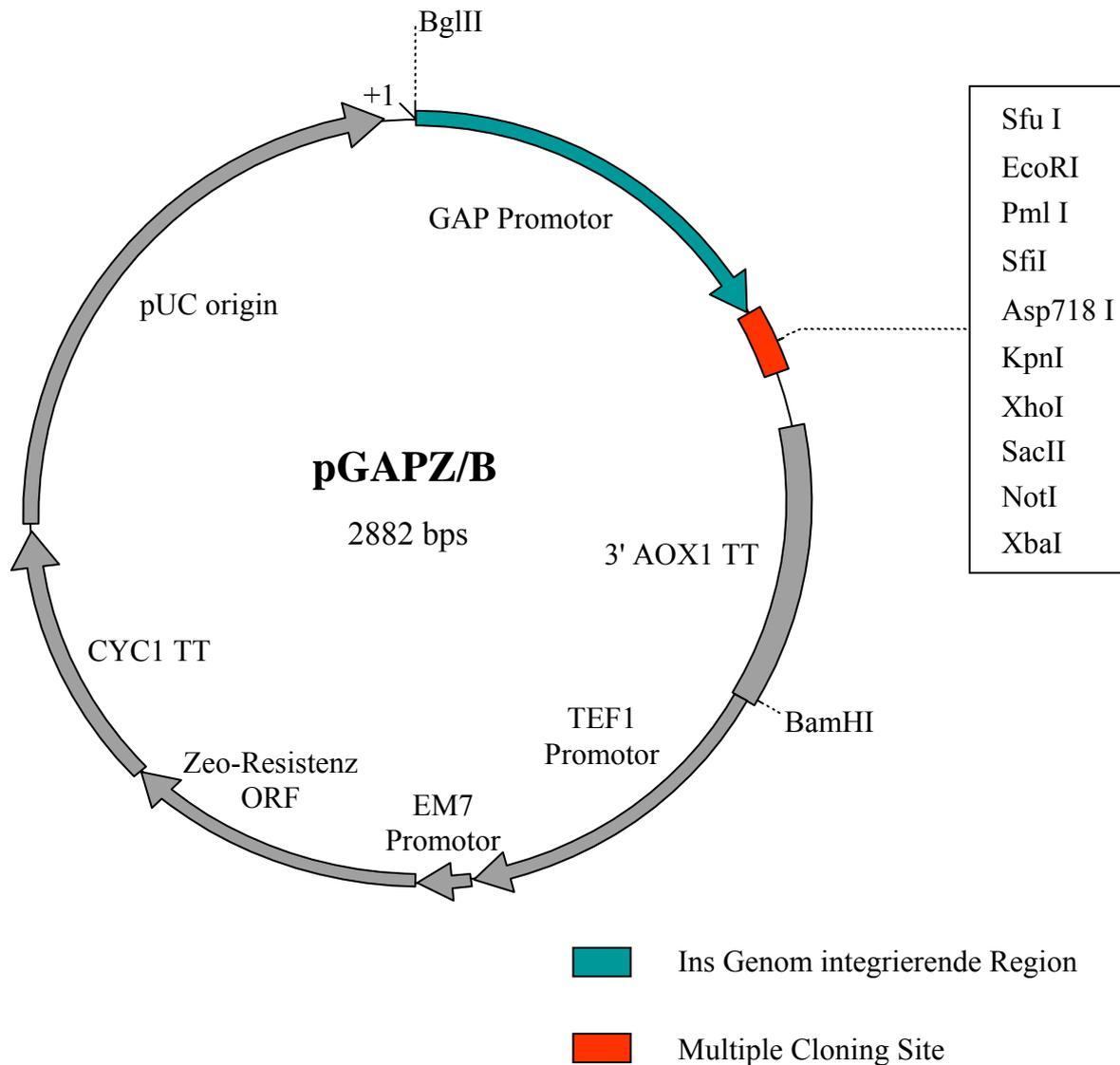
- [255] Ecker J. R.: A sequence-indexed library of insertion mutations in the *Arabidopsis* genome. The Salk Institute for Biological Studies.
- [256] Stival da Silva A. L., Sperling P., Horst W., Franke S., Ott C., Becker D., Staß A., Lörz H., Heinz E.: A possible role of sphingolipids in the aluminium resistance of yeast and maize. *J. Plant Phys.* **162** (2005), im Druck
- [257] Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Press, New York, zweite Auflage (1989)
- [258] Inoue H., Nojima H., Okayama H.: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28 (1990)
- [259] McLachlan A., Riggs M. G.: A simplified screening procedure for large numbers of plasmid minipreparations. *Biotechniques* **4**, 310-313 (1986)
- [260] Dohmen R. J., Strasser A. W. M., Höner C. B., Hollenberg C. P.: An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**, 691-692 (1991)
- [261] Hillig I., Leipelt M., Ott C., Zähringer U., Warnecke D., Heinz E.: Formation of glucosylceramide and sterol glucoside by a UDP-glucose-dependent glucosylceramide synthase from cotton in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* **553**, 365-369 (2003)
- [262] Morrison W. R., Hay J. D.: Polar lipids in bovine milk. II. Longchain bases, normal and 2-hydroxy fatty acids, and isomeric *cis* and *trans* monoenoic fatty acids in sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta* **202**, 460-467 (1970)
- [263] Sperling P., Warnecke D., Heinz E.: Plant sphingolipids. Topics in current genetics: Lipid metabolism and membrane biogenesis. (Daum G., ed.), Berlin-Heidelberg, Deutschland: Springer Verlag, 337-381 (2004)
- [264] Toledo M. S., Levery S. B., Straus A. H., Suzuki E., Momany M., Glushka J., Moulton J. M., Takahashi H. K.: Characterization of sphingolipids from mycopathogens: Factors correlating with expression of 2-hydroxy fatty acyl (*E*)- $\Delta^3$ -unsaturation in cerebrosides of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Aspergillus fumigatus*. *Biochemistry* **38**, 7294-7306 (1999)
- [265] Shiao Y. H., Resau J. H., Nagashima K., Anderson L. M., Ramakrishna G.: The von Hippel-Lindau tumor suppressor targets to mitochondria. *Cancer Res.* **60**, 2816-2819 (2000)
- [266] Paupard M. C., Miller A., Grant B., Hirsh D., Hall D. H.: Immuno-EM localization of GFP-tagged yolk proteins in *C. elegans* using microwave fixation. *J. Histochem. Cytochem.* **49**, 949-956 (2001)
- [267] Ward B. M., Moss B.: Visualization of intracellular movement of vaccinia virus virions containing a green fluorescent protein-B5R membrane protein chimera. *J. Virol.* **75**, 4802-4813 (2001)
- [268] Thomsen P., Roepstorff K., Stahlhut M., van Deurs B.: Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol. Biol. Cell* **13**, 238-250 (2002)

## 6. Anhang

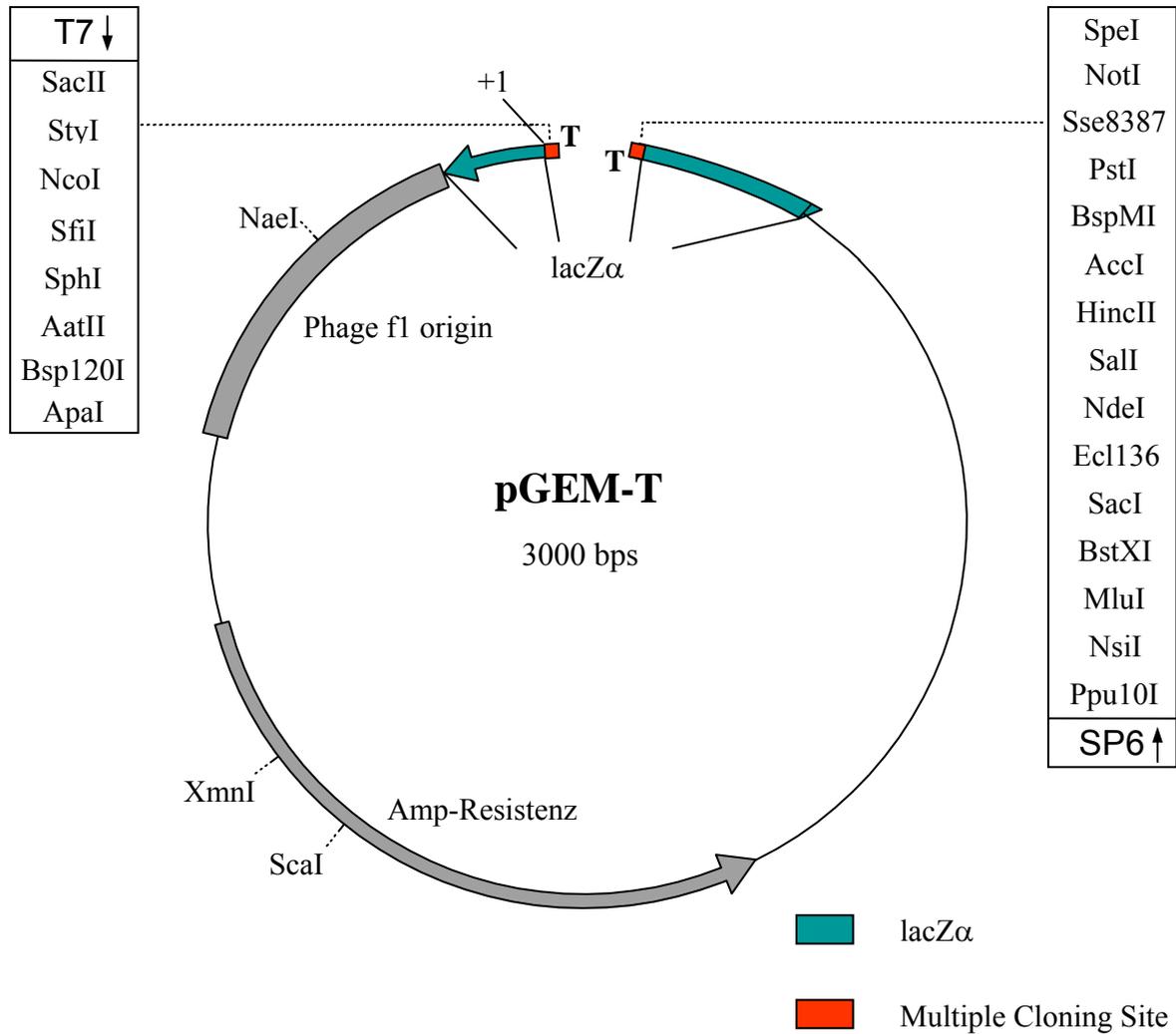
Anlage 1: Karten der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren



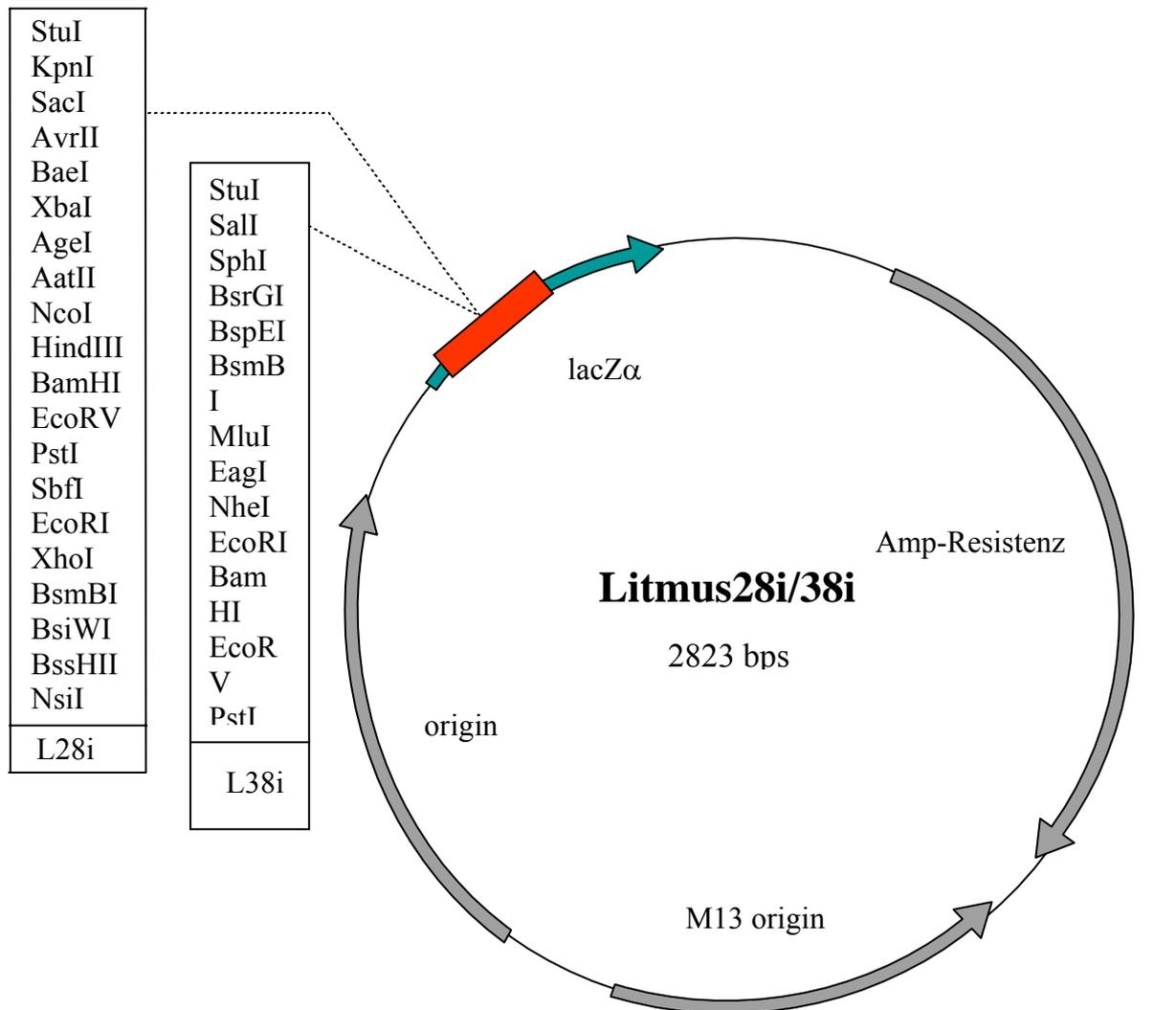
5' AOX1-Promotor-Fragment:	1-937 bp
Multiple Cloning Site:	938-968 bp
3' AOX1-Transkriptions-Terminations-Fragment:	981-1314 bp
HIS4-ORF:	4242-1708 bp
3' AOX1-Fragment:	4598-5354 bp
ColE1 origin:	6436-5764 bp
Ampicillin-Resistenzgen:	7442-6582 bp



GAP-Promotor-Region:	1-483 bp
Multiple Cloning Site:	484-563 bp
3' AOX1-Transkriptions-Terminations-Region:	630-970 bp
Fragment mit TEF1 Promotor:	971-1381 bp
EM7-Promotor:	1382-1449 bp
Sh ble ORF (Zeocin-Resistenz):	1450-1824 bp
CYC1 Transkriptions-Terminations-Region:	1825-2142 bp
pUC origin:	2153-2826 bp



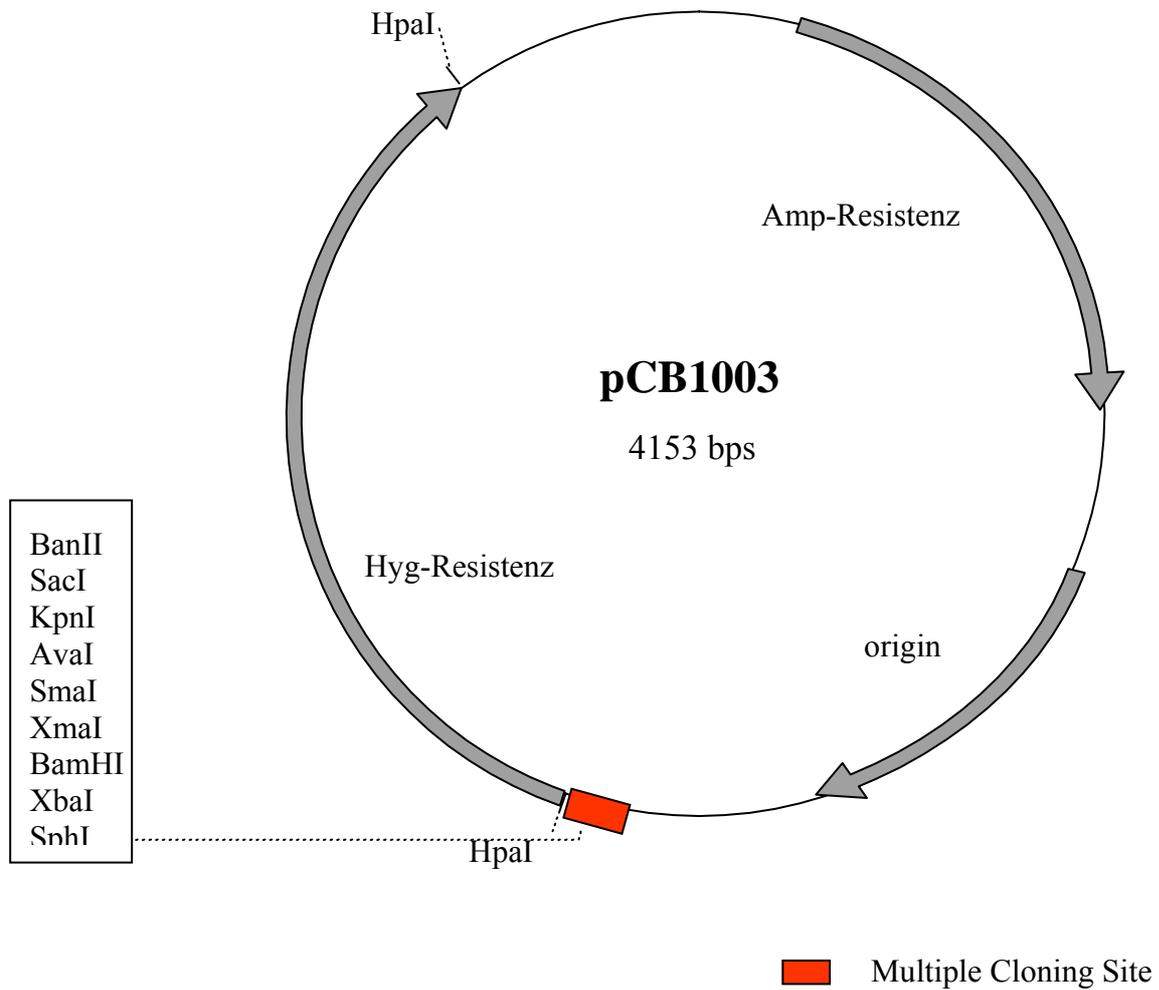
T7 RNA Polymerase-Promotor:	2984-3 bp
SP6 RNA Polymerase-Promotor:	143-124 bp
Multiple Cloning Site:	10-113 bp
lac-Operon:	380-151, 2981-2821 bp
Phage f1-Region:	2365-2820 bp
Ampicillin-Resistenzgen:	2131-1271 bp



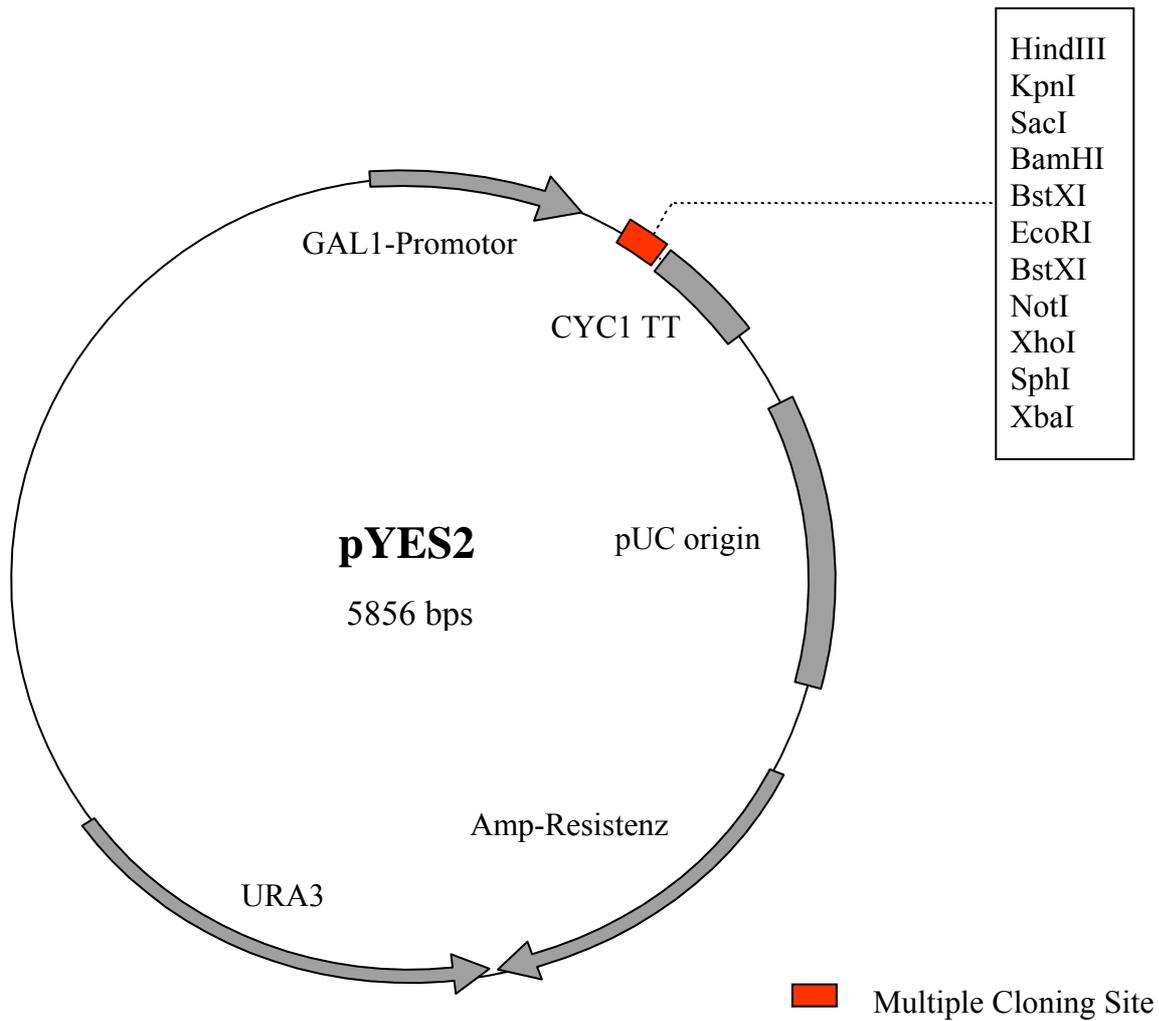
Ampicillin-Resistenzgen:	143-1003 bp
M13 origin:	1045-1554 bp
Multiple Cloning Site:	2470-2589 bp
lacZ $\alpha$ :	2424-2795 bp
origin:	1665-2253 bp

 lacZ $\alpha$

 Multiple Cloning Site



Ampicillin-Resistenzgen:	196-1056 bp
Hygromycin-Resistenzgen:	2292-3747 bp
Multiple Cloning Site:	2235-2280 bp
origin:	1227-1815 bp



<i>GAL1</i> -Promotor:	1-451 bp
T7-Promotor:	475-494 bp
Multiple Cloning Site:	501-600 bp
<i>CYC1</i> Transkriptions-Terminator:	608-856 bp
pUC origin:	1038-1711 bp
Ampicillin-Resistenzgen:	1856-2716 bp
<i>URA3</i> -Gen:	2734-3841 bp
2 micron origin:	3845-5316 bp
f1 origin:	5384-5839 bp

Anlage 2: In dieser Arbeit verwendete Primer

**Tab. 1-Anhang PCR-Primer zur Amplifikation der Fragmente für die Deletionskonstrukte.** In runden Klammern sind die Bezeichnungen der Deletionskonstrukte, in eckigen Klammern die Restriktionsschnittstellen.

Produkt	Primer-Sequenz
Sphingolipid- $\Delta$ 4-Desaturase aus <i>P. pastoris</i> mit flank. Bereichen – Pp $\Delta$ 4Des (L38iPp $\Delta$ 4desZeo)	<i>vI-1</i> : <u>GG/A ATT CCA</u> GTT CAG ATC TTA GAT ACA CAT G $T_m = 66^\circ\text{C}$ [EcoRI] <i>rI-1</i> : CCA TGG <u>GA/A GCT TGT</u> ACA CTC TTC ACC ATA CTG CCC $T_m = 72^\circ\text{C}$ [HindIII]
Sphingolipid- $\Delta$ 8-Desaturase aus <i>P. pastoris</i> mit flank. Bereichen – Pp $\Delta$ 8Des (L28iPp $\Delta$ 8desZeo)	<i>vI-2</i> : <u>CGG/ GAT CCA</u> AGT GGG TTA GCA ACG AAA AGC $T_m = 68^\circ\text{C}$ [BamHI] <i>rI-2</i> : GGG <u>GTA C/CA</u> TTG TAA TTT GGT GTT GGG AGA C $T_m = 68^\circ\text{C}$ [KpnI]
Flankierende Bereiche der Sphingolipid- $\Delta$ 4-Desaturase aus <i>M. grisea</i> – Mg $\Delta$ 4Deslb, Mg $\Delta$ 4Desrb (L28iMg $\Delta$ 4desHph)	<i>vI-3</i> : <u>GGT AC/C</u> GCT TCA CTC GAC TGC TTT CTG $T_m = 68^\circ\text{C}$ [KpnI] <i>rI-3</i> : <u>A/CG CGT</u> ACC GTC CCA AGA AGC GGT AC $T_m = 68^\circ\text{C}$ [MluI] <i>vI-4</i> : <u>GTT/ AAC</u> TTG TCG GCA GCT CTG GGA AG $T_m = 68^\circ\text{C}$ [HpaI] <i>rI-4</i> : <u>A/AG CTT</u> GTC GAT GCA AAC AAG GCC AAG $T_m = 68^\circ\text{C}$ [HindIII]
Zeocin-Resistenzkassette – Zeo1  Zeo2	<i>vI-5</i> : <u>GCT/ CTA GAC</u> ACA CAC CAT AGC TTC AAA ATG $T_m = 66^\circ\text{C}$ [XbaI] <i>rI-5</i> : <u>GAA CA/A ATT CCC</u> AGC TTG CAA ATT AAA GCC TTC $T_m = 70^\circ\text{C}$ [XmnI] <i>vI-6</i> : CCA TGG <u>GA/A GCT TCA</u> CAC ACC ATA GCT TCA AAA TG $T_m = 66^\circ\text{C}$ [HindIII] <i>rI-6</i> : <u>GCT/ CTA GAC</u> CAG CTT GCA AAT TAA AGC CTT C $T_m = 70^\circ\text{C}$ [XbaI]
Hygromycin-Resistenzkassette - Hph	<i>vI-7</i> : <u>A/CG CGT</u> GGA GGT CAA CAC ATC AAT GC $T_m = 64^\circ\text{C}$ [MluI] <i>rI-7</i> : <u>GTT/ AAC</u> CTC TAT TCC TTT GCC CTC GG $T_m = 66^\circ\text{C}$ [HpaI]

**Tab. 2-Anhang PCR-Primer zur Amplifikation der ORFs zur Herstellung der Expressionskonstrukte.** In runden Klammern sind die Bezeichnungen für die späteren Expressionskonstrukte und in eckigen Klammern die angehängten Restriktionsschnittstellen aufgeführt.

Produkt	Primer-Sequenz
Sphingolipid- $\Delta$ 4-Desaturase aus <i>U. maydis</i> - Um $\Delta$ 4DesORF (pYES2Um $\Delta$ 4Des)	v2-1: CGC <u>GGA TCC ATG</u> ATG CTT TCT GGT AGT AC T <sub>m</sub> = 60°C [BamHI] r2-1: GCT <u>CTA GAC</u> TAG CCG TCG CGA TTA GGT C T <sub>m</sub> = 68°C [XbaI]
Sphingolipid- $\Delta$ 4-Desaturase aus <i>U. maydis</i> - Um $\Delta$ 4DesORF (pPICUm $\Delta$ 4Des)	v2-2: CGC <u>G/GA T CC</u> ATG CTA TCT CAG ATT GCC TCG T <sub>m</sub> = 66°C [BamHI] r2-2: AAG GAA AAA <u>AGC GGC CGC</u> CTA GCC GTC GCG ATT AGG GTC T <sub>m</sub> = 72°C [NotI]
Sphingolipid- $\Delta$ 8-Desaturase aus <i>U. maydis</i> - Um $\Delta$ 8DesORF (pPICUm $\Delta$ 8Des)	v2-3: GAG CTC <u>ACC TAG GAT</u> GGT CAC ACA CGT CGC AAG C T <sub>m</sub> = 70°C [AvrII] r2-3: AAG GAA AAA <u>AGC GGC CGC</u> TCA ATA CAC GGC CAT TAC CTT TG T <sub>m</sub> = 70°C [NotI]
Sphingolipid-C4-Hydroxylase aus <i>U. maydis</i> - UmC4HydORF (pYES2UmC4Hyd)	v2-4: CCA TGG TGA <u>AGC TTA</u> TGA TCG CAT TTG CCA ACG C T <sub>m</sub> = 64°C [HindIII] r2-4: GCT <u>CTA GAC</u> TAG TCG TCC GTG GAC GAA C T <sub>m</sub> = 68°C [XbaI]

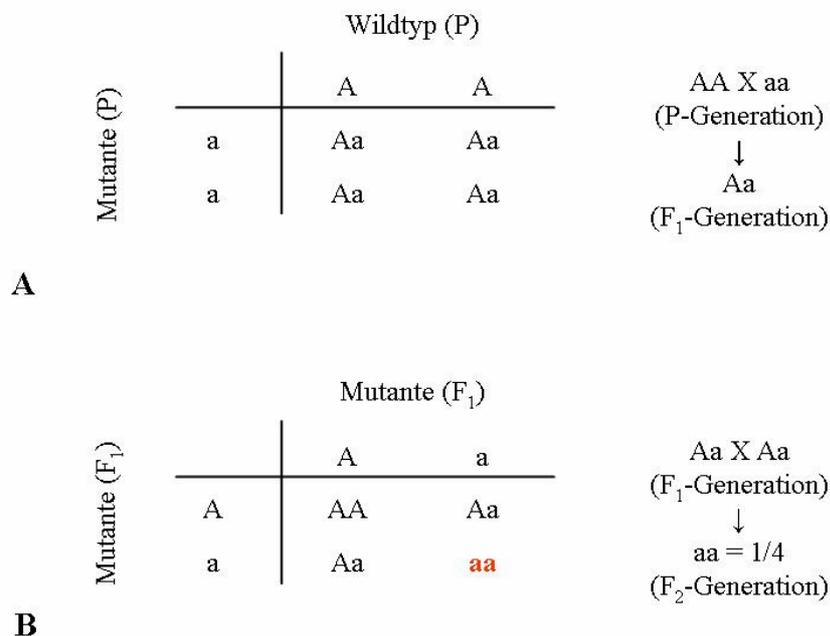
**Tab. 3-Anhang Primer-Sequenzen zur Überprüfung der Deletionsmutanten von *P. pastoris***

Transformant	Primer-Sequenz
Ppd4 $\Delta$	v3-1: ATC TCC TGC GAC GTC TTA ATG T <sub>m</sub> = 66°C r3-Z: ATG CCG ATA TAC TAT GCC G T <sub>m</sub> = 60°C v3-Z: CGG CAT AGT ATA TCG GCA T T <sub>m</sub> = 60°C r3-1: GTC GCC TTT GGT AAC CTG AAG T <sub>m</sub> = 68°C
Ppd8 $\Delta$	v3-2: GAG TTT CGA GGG ATC CGA TG T <sub>m</sub> = 66°C r3-Z: ATG CCG ATA TAC TAT GCC G T <sub>m</sub> = 60°C v3-Z: CGG CAT AGT ATA TCG GCA T T <sub>m</sub> = 60°C r3-2: CAC CGG TCA ACA GCT ATG TC T <sub>m</sub> = 66°C
PpGscs7, PpMscs7	v3-3: GAT TCA TTC CCC ACA GGT TG T <sub>m</sub> = 64°C r3-Z: ATG CCG ATA TAC TAT GCC G T <sub>m</sub> = 60°C v3-Z: CGG CAT AGT ATA TCG GCA T T <sub>m</sub> = 60°C r3-3: GGT TTC GAG GCT TTG TCT TC T <sub>m</sub> = 64°C

Tab. 4-Anhang PCR-Primer zur Überprüfung der T-DNA-getaggen Arabidopsis-Mutanten.

Stamm	Primer-Sequenz	
N510384	<i>v4-1</i> : CCG ATT CCA GAT CCA TTC CTG	$T_m = 68^\circ\text{C}$
	<i>r4-T1</i> : TGG TTC ACG TAG TGG GCC ATC G	$T_m = 74^\circ\text{C}$
	<i>r4-1</i> : GGA GAT GGC AAC GAG GTA AGC	$T_m = 70^\circ\text{C}$
893A12	<i>v4-2</i> : TGG AGA TTT ATG GAT TTC GAT TC	$T_m = 66^\circ\text{C}$
	<i>r4-T2</i> : GCT TCC TAT TAT ATC TTC CCA AAT TAC CAA TAC A	$T_m = 94^\circ\text{C}$
	<i>r4-2</i> : AAT GTC CAG TGT TGG TAG CTG	$T_m = 66^\circ\text{C}$
N607761	<i>v4-3</i> : GAG GAG ACG TCA GAT TCT GTC	$T_m = 68^\circ\text{C}$
	<i>r4-T1</i> : TGG TTC ACG TAG TGG GCC ATC G	$T_m = 74^\circ\text{C}$
	<i>r4-3</i> : CCA TGT CAA TAC CAT CTA CTC C	$T_m = 68^\circ\text{C}$

Anlage 3: Statistische Verteilung der auftretenden Genotypen bei Pflanzenkreuzungen



**Abb. 1-Anhang** Statistische Verteilung der Genotypen bei der Kreuzung zweier Pflanzen, die sich in einem Merkmal unterscheiden. Die Verteilung der Genotypen erfolgt nach den Mendel'schen Regeln. In **A** ist die Kreuzung der Parental-Generation (P-Generation) dargestellt, in **B** die Kreuzung zweier Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation. A entspricht dabei dem Wildtyp-Allel, a dem Mutanten-Allel.

		Wildtyp (P)		
		Ab	Ab	
Mutante (P)	aB	AaBb	AaBb	AA bb X aa BB (P-Generation) ↓ Aa Bb (F <sub>1</sub> -Generation)
	aB	AaBb	AaBb	

**A**

		Mutante (F <sub>1</sub> )				
		AB	Ab	aB	ab	
Mutante (F <sub>1</sub> )	AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb	Aa Bb X Aa Bb (F <sub>1</sub> -Generation) ↓ aabb = 1/16 (F <sub>2</sub> -Generation)
	Ab	AABb	AA bb	Aa Bb	Aa bb	
	aB	Aa BB	Aa Bb	aa BB	aa Bb	
	ab	Aa Bb	Aa bb	aa Bb	<b>aabb</b>	

**B**

**Abb. 2-Anhang** Statistische Verteilung der Genotypen bei der Kreuzung zweier Pflanzen, die sich in zwei Merkmalen unterscheiden. Die Verteilung der Genotypen erfolgt nach den Mendel'schen Regeln. In **A** ist die Kreuzung der Parental-Generation (P-Generation) dargestellt, in **B** die Kreuzung zweier Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation. A und B entsprechen dabei den Wildtyp-Allelen, a und b den Mutanten-Allelen.

## Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben. Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. Ernst Heinz und Herrn Dr. Dirk Warnecke für die interessante Themenstellung, die vielen, wertvollen Diskussionen und die intensive Betreuung. Bei Herrn Prof. Dr. Günther Daum bedanke ich mich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Stephan Franke (Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg) für die Durchführung der HPLC-MS- und ESI-MS-Analysen, Herrn Dr. Ulrich Zähringer sowie Herrn Dr. Buko Lindner (beide Forschungszentrum Borstel) für die Aufnahme und Auswertung der GC-MS- bzw. MS-Spektren.

Für die Durchführung und Interpretation der zahlreichen, interessanten Untersuchungen mit dem Defensin Rs-AFP2 möchte ich mich recht herzlich bei Frau Dr. Karin Thevissen (Katholieke Universiteit Leuven, Belgien) und den Mitarbeitern ihrer Arbeitsgruppe bedanken.

Frau Claudia Ott danke ich für die Einführung in die Mysterien der HPLC und die ständige Hilfsbereitschaft für alle Eventualitäten. Für die hilfreichen Diskussionen und die Unterstützung an der HPLC-Anlage möchte ich mich bei Herrn Philipp Ternes bedanken.

Für die Bereitstellung der *U. maydis*-Sequenzen bedanke ich mich bei der Bayer-AG.

Herrn Dr. Nicholas J. Talbot (University of Exeter, Großbritannien) danke ich für die Bereitstellung des Materials zur Herstellung des *M. grisea*-Deletionskonstrukts und Frau Dr. Petra Sperling für die Bereitstellung der Informationen und des Materials zur Herstellung der *P. pastoris* -Mutanten.

Mein besonderer Dank gilt auch allen Mitgliedern der ehemaligen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ernst Heinz für die gute und kameradschaftliche Zusammenarbeit.

Schließlich möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinem Freund bedanken, die mir zu jeder Zeit den Rücken gestärkt und mich auf Durststrecken aufgebaut haben.