

**Funktionale Charakterisierung der  
Glucosylceramid-Synthase aus Pflanzen und dem  
phytopathogenen Pilz *Ustilago maydis***

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie  
der Universität Hamburg**

**vorgelegt von  
Inga Hillig  
aus Heide**

**Hamburg, im Juni 2005**

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. E. HEINZ  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. W. SCHÄFER  
Tag der Disputation: 27. Juli 2005

Hamburg, den 12. Juli 2005



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Arno Frühwald".

Professor Dr. Arno Frühwald  
Dekan

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
aa	amino acids
abs.	absolut
A. dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
Amp <sup>r</sup>	Ampicillin-Resistenz
ATP	Adenintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
cis	auf der gleichen Seite der Bezugsebene
CoA	Coenzym A
DC	Dünnschichtchromatographie
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphat
DglyD	Diglycosyldiacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
E. C.	engl. <i>enzyme classification</i> = Enzymklassifizierung
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	engl. <i>expressed sequence tags</i> = exprimierte Sequenz
G	Guanin
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GalCer	Galactosylceramid
GC	Gaschromatographie
GCS	Glucosylceramid-Synthase
GIPC	Glycosyl-inositolphosphorylceramide
GlcCer	Glucosylceramid
GSL	Glycosphingolipide
h	engl. <i>hour(s)</i> = Stunde(n)
Hyg <sup>r</sup>	Hygromycin-Resistenz
Kan <sup>r</sup>	Kanamycin-Resistenz
konz.	konzentriert
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MgalD	Monogalactosyldiacylglycerol
MGlcD	Monoglucosyldiacylglycerol
MIPC	Mannosyl-inositolphosphorylceramide
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
NADH	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid (reduziert)
NADPH	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduziert)
NMR	engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei x Nanometern
ORF	engl. <i>open reading frame</i> = offener Leserahmen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	lat. <i>potentia hydrogenii</i> = Wasserstoffionenkonzentration

PM	Plasmamembran
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sn	stereospezifische Numerierung
T	Thymin
TAG	Triacylglycerin
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
U	Uracil
v/v	Volumen pro Volumen
VLCFA	engl. <i>very long chain fatty acids</i> = sehr langkettige Fettsäuren
w/v	engl. <i>weight per volume</i> = Gewicht per Volumen
WT	Wildtyp

### Aminosäuren:

A	Alanin	G	Glycin	P	Prolin
R	Arginin	H	Histidin	S	Serin
N	Asparagin	I	Isoleucin	T	Threonin
D	Asparaginsäure	L	Leucin	W	Tryptophan
C	Cystein	K	Lysin	Y	Tyrosin
Q	Glutamin	M	Methionin	V	Valin
E	Glutaminsäure	F	Phenylalanin		

Abkürzung von Genen und Genprodukten entsprechen den Vorschlägen des „*genetic nomenclature guide*“ (Stewart, 1995).

Beispiel:

Gene: Großbuchstaben, kursiv (Beispiel: *GCS*)

Genprodukte: nur der erste Buchstabe groß (Beispiel: *Gcs*)

mutiertes Gen: klein und kursiv (Beispiel: *gcs*)

Die Nomenklatur der Sphingobasen erfolgte in Anlehnung an die Empfehlung der IUPAC-IUB *Joint Commission on Biochemical Nomenclature* (JCNB) von 1997 (Chester, 1998).

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	1
1.1 Struktur der Sphingolipide	2
1.2 Vorkommen von Sphingolipiden in Pflanzen, Pilzen und Säugern	5
1.3 Biosynthese der Sphingolipide	9
1.4 Funktion der Sphingolipide in Säugern	11
1.5 Funktion der Sphingolipide in Pflanzen	12
1.6 Funktion der Sphingolipide in Pilzen	13
1.7 Inhibitoren der Glucosylceramid-Synthase	14
1.8 <i>Pichia pastoris</i> als Expressionsorganismus zur heterologen Expression von Glucosylceramid-Synthase-Genen	16
1.9 Der phytopathogene Pilz <i>Ustilago maydis</i>	17
1.10 Der phytopathogene Pilz <i>Magnaporthe grisea</i>	20
1.11 Problemstellung, Strategie und Ziel	21
<b>2. Material und Methoden</b>	22
2.1 Verwendete Geräte	22
2.2 Verbrauchsmaterialien und Laborchemikalien	23
2.2.1 Verbrauchsmaterialien	23
2.2.2 Kits	23
2.3 Organismen und Vektoren	24
2.3.1 Verwendete Organismen	24
2.3.2 Verwendete Vektoren	24
2.4 Methoden beim Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	25
2.4.1 Transformation von <i>E. coli</i>	25
2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	27
2.4.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA	27
2.4.2.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA	27
2.4.2.3 Fällung und Konzentrationsbestimmung von DNA	28
2.5 Polymerase-Kettenreaktion	28
2.5.1 <i>Overlap</i> -PCR	30
2.5.2 Kolonie-PCR	31
2.6 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	31
2.7 Elution von DNA aus Agarosegelen	32
2.8 Enzymatische Modifikation von DNA	32

2.8.1	DNA-Restriktion.....	32
2.8.2	Dephosphorylierung linearisierter Vektoren.....	33
2.8.3	Phosphorylierung von 5'-hydroxylierten DNA-Enden.....	33
2.8.4	Ligation.....	34
2.9	Sequenzierungen.....	34
2.9.1	Computer-gestützte Sequenzauswertung.....	34
2.10	Arbeiten mit <i>Pichia pastoris</i> .....	35
2.10.1	Transformation mittels Elektroporation.....	36
2.10.2	Mut <sup>+</sup> („Methanol utilization plus“)/Mut <sup>S</sup> („Methanol utilization slow“)-Screening.....	37
2.10.3	Isolierung genomischer DNA aus <i>P. pastoris</i> .....	37
2.10.4	Herstellung der <i>Augt51B1/Δgcs</i> -Doppelmutante von <i>P. pastoris</i> .....	38
2.10.5	Heterologe Expression in <i>P. pastoris</i> .....	39
2.11	Arbeiten mit <i>Ustilago maydis</i> .....	42
2.11.1	Deletionskonstrukt zur Zerstörung des Glucosylceramid-Synthase-Gens in <i>U. maydis</i>	42
2.11.2	Transformation von <i>U. maydis</i> .....	42
2.11.3	Test auf filamentöses Wachstum bei <i>U. maydis</i> .....	43
2.11.4	Test auf Pathogenität.....	44
2.11.5	Mikroskopische Analyse von durch <i>U. maydis</i> induzierten Pflanzentumoren.....	44
2.11.6	Keimungsversuche mit <i>U. maydis</i> -Teliosporen.....	44
2.12	Arbeiten mit <i>Magnaporthe grisea</i> .....	45
2.12.1	Deletions- und Komplementationskonstrukte der Glucosylceramid-Synthase für <i>M. grisea</i> .....	45
2.13	Arbeiten mit <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	46
2.13.1	Transformation elektrokompetenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen.....	46
2.13.2	Transformation von <i>A. thaliana</i> .....	47
2.13.3	Selektionierung potentiell transgener Samen.....	48
2.13.4	Konstrukt zur postranskriptionalen Gen-Regulierung der Glucosylceramid-Synthase aus <i>A. thaliana</i> .....	49
2.13.5	Promoter-Glucuronidase-Konstrukte zur Expressionsanalyse der Glucosylceramid-Synthase in <i>A. thaliana</i> .....	49
2.13.6	GUS-Färbung.....	50
2.13.7	Einbettung von GUS-gefärbten Pflanzenteilen.....	51
2.14	Lipidanalytik.....	51
2.14.1	Isolierung von Gesamtlipiden.....	51
2.14.2	Dünnschichtchromatographie.....	51
2.14.3	Aufreinigen von Lipidkomponenten .....	52
2.14.4	Präparative Reinigung von Lipidkomponenten .....	52
2.14.5	Acetylierung von Lipiden .....	53
2.14.6	Alkalische Hydrolyse von Lipiden mit Natrium-Methylat .....	53

2.14.7	NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie .....	54
2.15	Enzymtest zur Bestimmung der Gcs-Aktivität .....	54
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>56</b>
3.1	Funktionale Charakterisierung von Glucosylceramid-Synthasen aus Tieren, Pilzen, Pflanzen und Bakterien mittels heterologer Expression in <i>Pichia pastoris</i> .....	57
3.1.1	Herstellung einer Glucosylceramid-Synthase und Sterol-Glucosyltransferase Doppeldeletionsmutante von <i>P. pastoris</i> .....	57
3.1.2	Klonierung der ORFs von Glucosylceramid-Synthase-Genen.....	63
3.1.3	Expression unterschiedlicher Glucosylceramid-Synthasen in der $\Delta$ ugt51B1/ $\Delta$ gcs- Doppelmutante von <i>P. pastoris</i> .....	65
3.1.4	Glucosylceramid-Synthase-Enzymtest mit radioaktiv markiertem Substrat.....	69
3.1.5	Glucosylceramid-Synthase Enzymtest mit Verwendung eines Glucosylceramid-Synthase-Inhibitors .....	72
3.2	Versuche zur Herstellung einer Glucosylceramid-Synthase-Defektmutante der Pflanze <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	76
3.3	Herstellung einer Glucosylceramid-Synthase-Deletionsmutante des phytopathogenen Pilzes <i>Ustilago maydis</i> .....	77
3.3.1	Herstellung der Glucosylceramid-Synthase-Deletionsmutanten.....	77
3.3.2	Wachstumsverhalten der Glucosylceramid-Synthase-Deletionsmutanten von <i>U. maydis</i> .....	80
3.3.3	Infektion von <i>Zea mays</i> -Pflanzen mit der Glucosylceramid-Synthase-Mutante von <i>U. maydis</i> .....	82
3.3.4	Mikroskopische Analyse der an <i>Zea mays</i> induzierten Tumoren .....	87
3.4	Vorarbeiten zur Herstellung einer Glucosylceramid-Synthase-Deletionsmutante im phytopathogenen Pilz <i>Magnaporthe grisea</i> .....	92
3.5	$\beta$ -Glucuronidase-Expressionsanalysen unter Regulation des Glucosylceramid-Synthase-Promoters .....	93
3.6	Ausblick.....	96
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>97</b>
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>99</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>107</b>

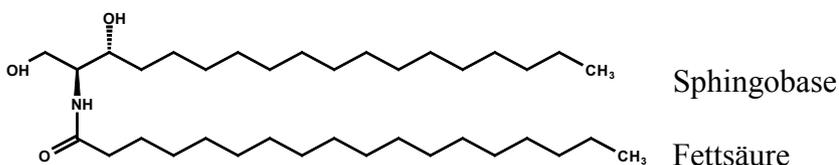
## 1. Einleitung

Zellen sind die Grundbausteine aller Organismen. Die Plasmamembran dient als äußere Begrenzung, die das Cytoplasma von der externen Umgebung abgrenzt. Sie erlaubt der Zelle einen selektiven Substrataustausch mit der Außenwelt durch verschiedene Transportproteine, die in die Plasmamembran eingebettet sind. Zudem dient die Membran als Strukturelement. Signale aus der Umwelt oder von benachbarten Zellen werden über die Plasmamembran erkannt und biochemisch transformiert, um so kaskadenartig bestimmte Folgereaktionen auszulösen. Auch spezialisierte innere Organellen der Zelle werden durch Membranen vom Cytosol abgegrenzt, die sich in ihrer Lipidzusammensetzung und im Proteingehalt unterscheiden. Eine weitere wichtige Funktion von Membranen ist die Herstellung eines Membranpotentials, das in allen lebenden Zellen durch asymmetrische Ionenverteilung zwischen den von einer Membran umgebenen Kompartimenten und ihrer Umgebung entsteht. Membranen sind aus drei unterschiedlichen Lipidklassen aufgebaut: den Glycerolipiden, Sterolen und Sphingolipiden. Die Glycerolipide unterteilen sich in die Glycoglycerolipide und Phosphoglycerolipide. Das Flüssig-Mosaik-Modell von Singer und Nicolson (1972) beschreibt eine Lipiddoppelschicht („*Bilayer*“) als Grundgerüst von biologischen Membranen, gebildet durch Glycerolipide. In die Lipiddoppelschicht sind integrale Membranproteine eingebettet, periphere Membranproteine sind adsorbiert. In Mikrodomänen sind bestimmte Lipide und Proteine zu funktionellen Einheiten zusammengefügt, wie z. B. in den „*Lipid rafts*“ (Edidin, 2003; Pike, 2004), in denen sich Sterole und Sphingolipide mit spezialisierten Proteinen zusammenlagern. Sterole verändern die biophysikalischen Eigenschaften der Membran, indem sie mit Glycerolipiden und Sphingolipiden in Wechselwirkung treten und so die Fluidität erniedrigt und die mechanische Festigkeit verstärkt wird (Demel und De Kruffyf, 1976). Sphingolipide sind ubiquitäre Membranlipide, die in allen Eukaryoten und in einigen wenigen Prokaryoten vorkommen (Warnecke und Heinz, 2003). Als Bestandteil der Plasmamembran dienen sie als Erkennungssignal der Zellen. Aufgebaut sind die Sphingolipide aus dem Grundbaustein Ceramid. Die  $\beta$ -glucosidische Bindung von Glucose an die C-1-OH-Gruppe des Ceramids führt zur Bildung von Glucosylceramid (GlcCer), der Vorstufe vieler weiteren Glycosphingolipide (GSL). Diese Reaktion wird

durch das Enzym Glucosylceramid-Synthase (Gcs, E.C. 2.4.1.80, UDP-Glucose: Ceramid-Glucosyltransferase) katalysiert. Bisher wurde das entsprechende Gen aus unterschiedlichen Organismen isoliert. 1996 wurde die *GCS* aus Mensch kloniert und charakterisiert (Ichikawa et al., 1996). 2001 gelang es Leipelt und Mitarbeitern, *GCS*-Gene aus dem niederen Tier *Caenorhabditis elegans*, der Pflanze *Gossypium arboreum* und den Pilzen *Candida albicans*, *Magnaporthe grisea* und *Pichia pastoris* zu klonieren. Kürzlich wurde auch die *GCS* aus *Drosophila melanogaster* isoliert (Kohyama-Koganeya et al., 2004). Die erste bakterielle *GCS* wurde aus *Agrobacterium tumefaciens* kloniert (Hölzl et al., 2005). Die Funktionalität der von Leipelt und Mitarbeitern (2001) klonierten Gene wurde durch heterologe Expression in einer GlcCer-freien *P. pastoris*-Mutante nachgewiesen. In den letzten Jahren haben Glucosylceramide und deren Abbauprodukt Ceramid zunehmend Bedeutung erlangt, da eine Reihe unterschiedlicher Funktionen entdeckt wurden. Daher gilt in dieser Arbeit die Aufmerksamkeit der Biosynthese der Glucosylceramide und speziell der Glucosylierung des Ceramids, die durch die Glucosylceramid-Synthase katalysiert wird.

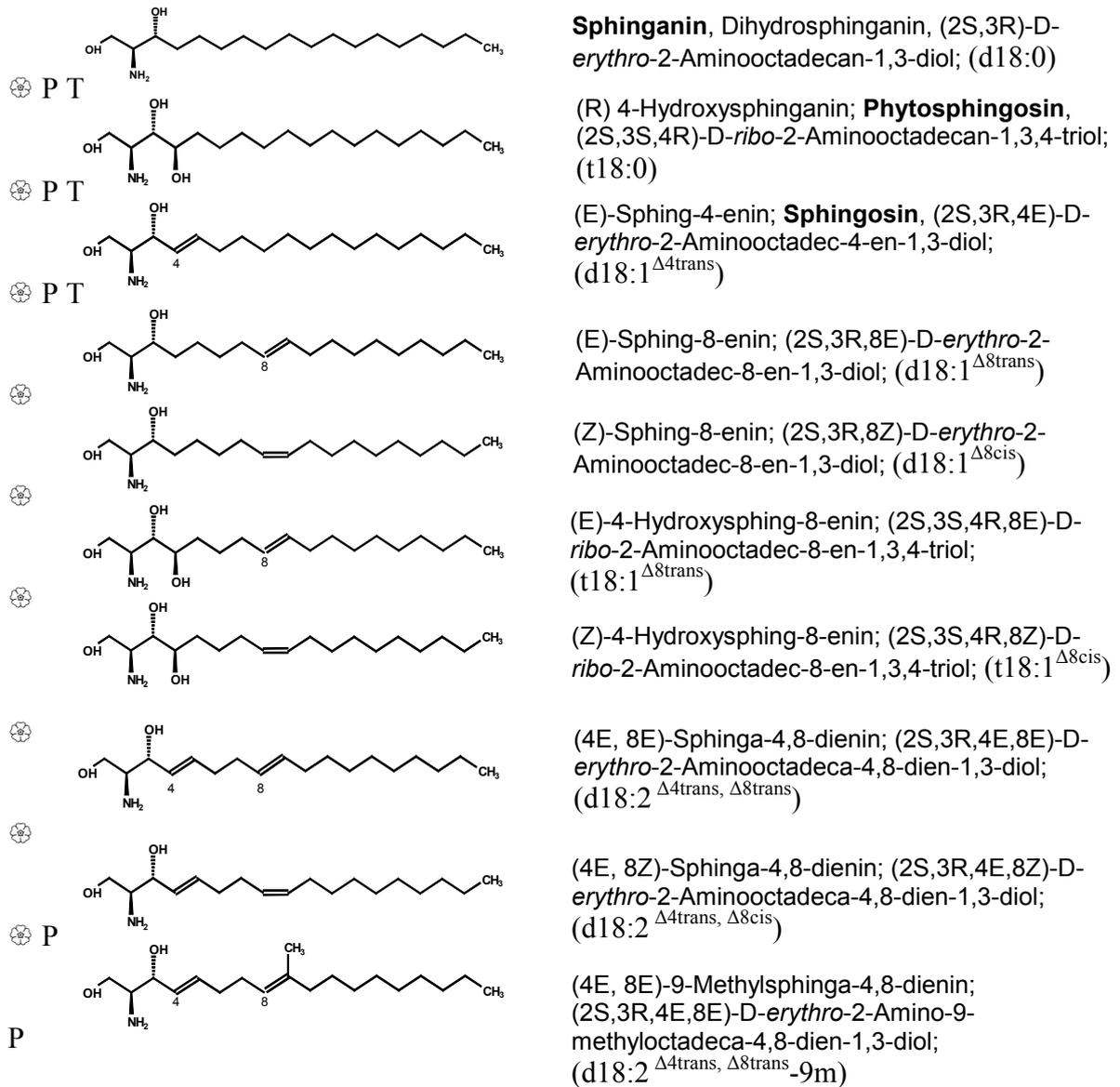
## 1.1 Struktur der Sphingolipide

Grundbestandteil aller Glycosylceramide ist das Ceramid. Hierbei handelt es sich um eine Sphingobase, die über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verbunden ist (s. Abb. 1.1). Die Struktur der Sphingobase sowie die der Fettsäure variiert abhängig vom Organismus und von äußeren Bedingungen (detailliert beschrieben in 1.2 und Abb. 1.2).



**Abbildung 1.1:** Struktur eines Ceramids mit Sphinganin und Stearinsäure

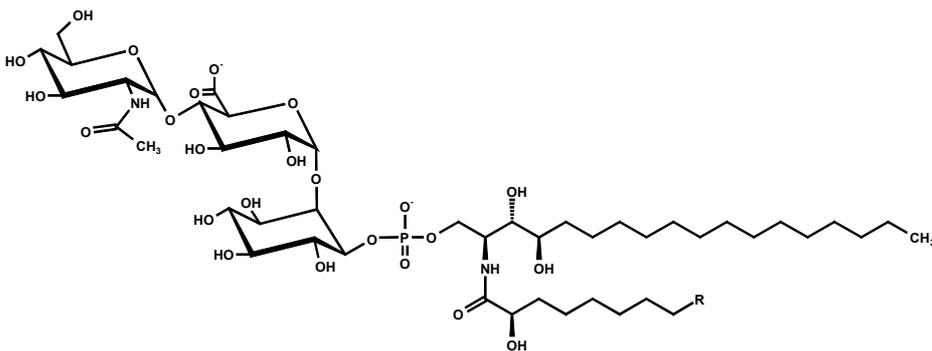
Durch glycosidische Verbindung eines Zuckerrestes an die C-1-OH-Gruppe des Ceramids entstehen die Glycosphingolipide, die abhängig vom Organismus sehr unterschiedlich sein können.



**Abbildung 1.2:** Struktur der Sphingobasen aus Pflanzen (⊗), Pilzen (P) und Tieren (T). Hier dargestellt sind C<sub>18</sub> Sphingobasen. Es ist aber anzumerken, dass in geringen Mengen auch Sphingobasen mit anderen Kettenlängen auftreten. In der Literatur verwendete Trivialnamen sind fett gedruckt.

Es wurden zwei große Glycosphingolipidklassen in eukaryoten Zellen ermittelt.

Ceramide, die mittels Phosphorylinositol mit Glycosylresten verbunden sind, werden Glycosyl-inositolphosphorylceramide (GIPCs) genannt (s. Abb. 1.3). GIPCs liegen als freie Membranlipide und in modifizierter Form als Membran-Anker für kovalent gebundene Proteine vor. GPI-Anker sind Lipidanker, die entweder Ceramid oder Diacylglycerol enthalten (Conzelmann et al., 1992).



**Abbildung 1.3:** Struktur eines Glycosyl-inositolphosphorylceramids aus *Nicotiana tabacum* (Tabak) mit einer Kopfgruppe bestehend aus N-Acetylglucosamin, Glukuronsäure und Phosphoinositol. (R = C17) (Hsieh et al., 1978)

Bei der zweiten großen Glycosphingolipidklasse handelt es sich um Glycosphingolipide, die meistens  $\beta$ -glycosidisch D-Glucose oder D-Galactose an die C-1-OH-Gruppe des Ceramids gebunden haben. Glucosylceramid ist in fast allen eukaryoten Organismen wie Pflanzen, Pilzen und Säugern vertreten. Als Ausnahme gilt die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, sie produziert im Gegensatz zu den meisten Pilzen, die bisher untersucht wurden, kein Glucosylceramid (Sakaki et al., 2001; Warnecke und Heinz, 2003).

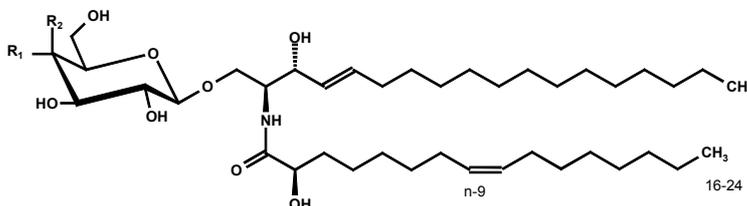
Glycosylceramid spielt eine bedeutende Rolle im menschlichen Sphingolipid-Metabolismus, da es ein biosynthetisches Intermediat zur Bildung von über 300 verschiedenen komplexen Sphingolipiden darstellt (Macher and Sweely, 1978; Hakamori, 1981). Die wichtigsten komplexen Sphingolipide sind Globoside (Glucosylceramid + Zucker); Ganglioside (Glucosylceramid + Zucker + Sialinsäure) und Sulfatide (Galactosylceramid + Sulfat). Die Bedeutung der Glucosylceramid-Synthase ist dadurch gekennzeichnet, dass sie an der Regulation des Ceramidgehalts

beteiligt ist, indem sie freies Ceramid glucosyliert. Dies ist wichtig, da Ceramid als „second messenger“ fungiert (Tilly und Kolesnick, 1999; Senchenkov et al., 2001).

## 1.2 Vorkommen von Sphingolipiden in Pflanzen, Pilzen und Säugern

Sphingolipide zeigen spezifische Strukturmerkmale bei verschiedenen Organismen. Hier werde ich die am häufigsten auftretenden Sphingolipide in Pflanzen, Pilzen und Säugern darstellen.

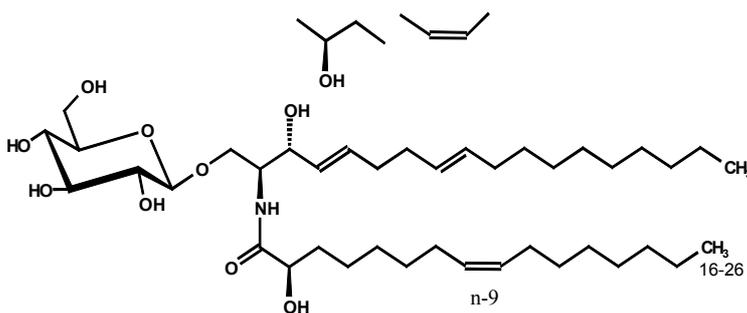
Humane Zellen enthalten am häufigsten Glucosyl- bzw. Galactosylceramid mit Sphingosin als Sphingobase, die in Pflanzen und Pilzen nur selten auftritt. Sphingosin kann auch durch 4-Hydroxysphinganin ersetzt sein. Die Fettsäure hat eine Länge von 16-24 Kohlenstoffatomen (s. Abb. 1.4). In manchen Geweben, z.B. der tierischen Epidermis, wurden auch  $\alpha$ -hydroxylierte oder  $\omega$ -hydroxylierte Fettsäuren mit bis zu 34 Kohlenstoffatomen detektiert (Wertz und Downing, 1983; Hamanaka et al., 1989; Doering et al., 1999).



**Abbildung 1.4:** Struktur der humanen Glycosylceramide. Charakteristisch ist die Sphingobase Sphingosin, die in Pflanzen und Pilzen nur sehr selten auftritt. Die  $\alpha$ -hydroxylierte Fettsäure hat eine Länge von 16-24 Kohlenstoffatomen. In der menschlichen Haut treten sowohl Fettsäuren mit bis zu 34 Kohlenstoffatomen als auch Ceramide mit 4-Hydroxysphinganin auf (nicht dargestellt). In den Ceramid-Monosacchariden ist Glucose (R1 = OH, R2 = H) oder Galactose (R1 = H, R2 = OH)  $\beta$ -glycosidisch mit dem Ceramid verbunden. Die n-9-Desaturierung der Fettsäure beschränkt sich auf VLCFA.

Pflanzen enthalten drei Formen der Glycosphingolipide: Glycosylceramide, Phytoglycolipide (GIPCs) und GIP-Anker von Plasmamembran-Proteinen.

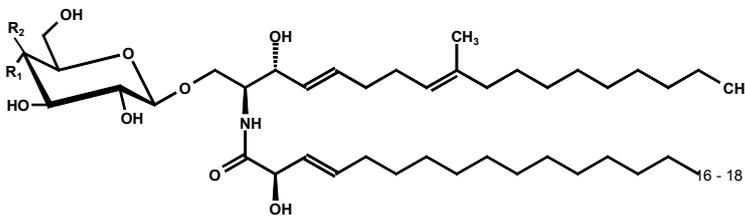
Pflanzliche GlcCers wurden detailliert analysiert (Lynch, 1993; Heinz, 1996; Sperling et al., 2004). Die Ceramidgrundgerüste von Pflanzen sind sehr variabel, sie bestehen aus sechs unterschiedlichen C<sub>18</sub>-Sphingobasen und mehr als zehn unterschiedlichen  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäuren. Die unterschiedlichen Sphingobasen sind Derivate des Sphinganins (d18:0), welche drei unterschiedliche Modifikationen aufweisen: die Hydroxylierung bzw. *trans*-Desaturierung bei Position C-4 und *cis*- oder *trans*-Desaturierungen bei Position C-8 (s. auch Abb. 1.2, ☉). Sphinganin und Sphingosin liegen nur in sehr geringen Mengen in Pflanzen vor. Auch 4-Hydroxysphinganin (t18:0) wurde nur in sehr geringen Mengen in vielen Pflanzen detektiert, aber in *Arabidopsis thaliana* wurde es als Hauptkomponente bestimmt (Uemura et al., 1995). Die am häufigsten vorkommenden Sphingobasen in pflanzlichen Cerebrosiden sind  $\Delta^8$  *cis/trans*-Isomere von d18:1 <sup>$\Delta^8$</sup> , t18:1 <sup>$\Delta^8$</sup>  und d18:2 <sup>$\Delta^4, \Delta^8$</sup> . Die Fettsäuren sind meistens  $\alpha$ -hydroxyliert und variieren in der Kettenlänge von 14-26 Kohlenstoffatomen, wobei C<sub>16</sub>, C<sub>20</sub>, C<sub>22</sub> und C<sub>24</sub> die häufigsten Komponenten darstellen (Lynch 1993; Whitaker 1996; Bohn et al., 2001). Die Zuckerkopfgruppe der Glycosphingolipide ist in Pflanzen üblicherweise D-Glucose, die  $\beta$ -glucosidisch mit der C-1-OH-Gruppe verbunden ist. Im Gegensatz zu Säugern und Pilzen enthalten Pflanzen keine D-Galactose als Zuckerkopfgruppe. In manchen Fällen kann Mannose mit dem Ceramidgrundgerüst verbunden sein, und auch höhere Homologe mit bis zu vier Zuckern kommen vor (Heinz, 1996).



**Abbildung 1.5:** Struktur pflanzlicher Glucosylceramide. Die Sphingobase kann an Position C-4 hydroxyliert oder *trans*-desaturiert sein, und/oder an Position C-8 *cis*- oder *trans*-desaturiert sein. Daraus ergeben sich eine Reihe unterschiedlicher Sphingobasen-Variationen (s. auch Abb. 1.2). Die Verbindung zu  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäuren, mit einer variablen Länge von 16-26 Kohlenstoffatomen und die n-9-Desaturierung, ist dargestellt.

Pilze enthalten drei Formen der Glycosphingolipide: Glycosylceramide, Mannosyl-inositolphosphorylceramide (MIPCs) und GIP-Anker von Plasmamembran-Proteinen (Dickson und Lester, 1999). Glycosylceramide enthalten hauptsächlich Glucose, aber auch Galactose wurde als Zuckerkopfgruppe nachgewiesen. Dieses Vorkommen wurde durch die Analyse unterschiedlicher Pilze bestätigt (Warnecke und Heinz, 2003). Interessanterweise haben diese beiden Glycosphingolipid-Typen unterschiedliche Ceramidgrundgerüste. Die Ceramide zur Bildung von GlcCer bzw. GalCer bestehen aus (4E, 8E)-9-Methylsphinga-4,8-dienin ( $d18:2^{\Delta 4trans, \Delta 8trans-9m}$ ) und einer Hydroxyfettsäure mit einer Kettenlänge von  $C_{16}$ – $C_{18}$ . Die Fettsäure kann in manchen Fällen an Position C-3 desaturiert sein. Dagegen enthalten Ceramide aus MIPCs 4-Hydroxysphinganin und sehr lange Hydroxyfettsäureketten (VLCFA: „*very long chain fatty acids*“) mit einer Kettenlänge von 24-26 Kohlenstoffatomen (Sakaki et al., 2001; Dickson und Lester, 1999; Toledo et al., 1999). Manche Studien zeigen zwar, dass 4-Hydroxysphinganin und eine  $C_{24}$ -Hydroxyfettsäure GlcCer bilden, da die Gcs in der Lage ist, beide Ceramidgrundgerüste als Substrat zu akzeptieren (Lester, 1974; Leipelt et al., 2001; Maciel et al., 2002). Es ist aber nicht untersucht worden, ob diese selten auftretenden Biosyntheseprodukte spezifische Funktionen übernehmen oder ob sie nur Nebenprodukte sind. Diese unterschiedlichen Ceramidgrundgerüste sind dadurch zu erklären, dass zwei unterschiedliche „Ceramid-Pools“ für die Biosynthese von GlcCer bzw. GalCer und MIPC vorliegen. Diese Trennung kann entweder auf die Selektivität der Gcs und der Inositolphosphorylceramid-Synthase liegen oder an der räumlichen Trennung dieser Enzyme in cytologisch separaten „Ceramid-Pool-Kompartimenten“.

Im Vergleich mit den pflanzlichen Ceramidgrundgerüsten der Glycosylceramide variieren die der Pilze nur gering. Die charakteristische Sphingobase der pilzlichen Glycosylceramide ist (4E, 8E)-9-Methylsphinga-4,8-dienin. In wenigen Fällen wurden aber auch komplexe Glycosylceramide mit größeren Zuckerkopfgruppen detektiert (Lester, 1974; Maciel et al., 2002).



**Abbildung 1.6:** Struktur der Glycosylceramide aus Pilzen. Charakteristisch für Pilze ist die Sphingobase (4E,8E)-9-Methylsphinga-4,8-dienin, verbunden mit einer  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäure mit einer variablen Länge von 16-18 Kohlenstoffatomen. In den Ceramid-Monosacchariden ist Glucose ( $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ) oder Galactose ( $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{OH}$ )  $\beta$ -glycosidisch mit dem Ceramid verbunden. Die Fettsäure kann in einigen Pilzen an Position C-3 desaturiert sein.

Die Entstehung von GlcCer-Spezies mit unterschiedlichen Ceramidgrundgerüsten konnte nach heterologer Expression der *GCS*-Gene verschiedener Organismen in der Hefe *P. pastoris* nachgewiesen werden. Die gebildeten GlcCer-Spezies bestehen zum einen aus Phytosphingosin (4-Hydroxysphinganin) und VLCFA, (24:0 (2-OH)-t18:0), dem typischen Ceramid der phosphoinositolhaltigen Sphingolipide, und zum anderen hauptsächlich aus dem für *P. pastoris* und anderen Pilzen üblichen Ceramid zur Bildung von GlcCer, dem (4E,8E)-9-Methylsphinga-4,8-dienin, welches mit C-2-hydroxylierter Stearinsäure verbunden ist (18:0 (2-OH)-d18:2<sup>A4,8</sup>9m) (Leipelt et al., 2001). Die native *Gcs* von *P. pastoris* synthetisiert unter natürlichen Bedingungen nur letztere Glucosylceramide. Nach homologer Expression des Gens unter Kontrolle eines starken Promoters in einer glucosylceramidfreien *P. pastoris*-Mutante erfolgte jedoch die zusätzliche Synthese von GlcCer mit VLCFA-Ceramid (Leipelt et al., 2001).

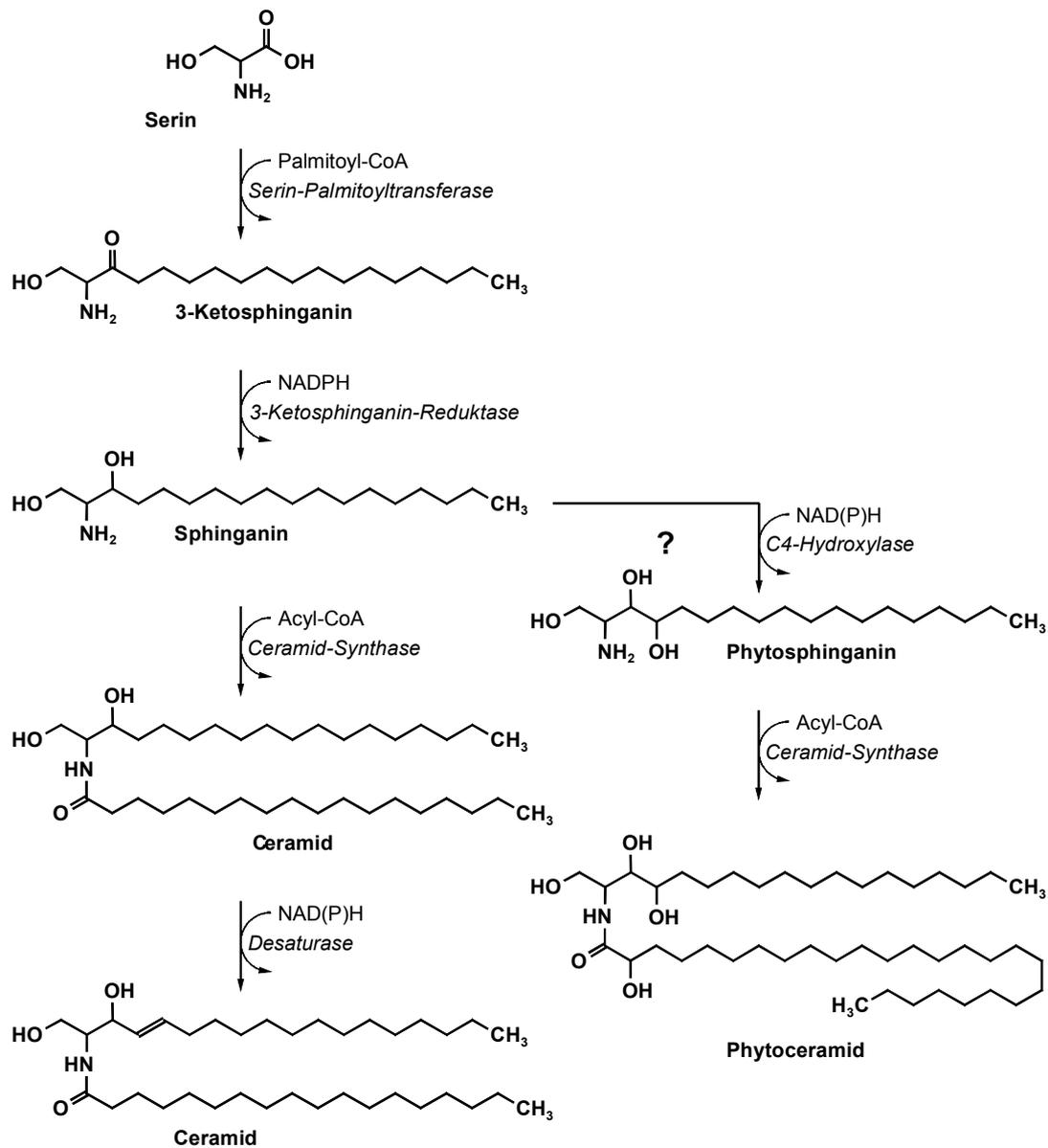
### 1.3 Biosynthese der Sphingolipide

Die Biosynthese von Sphingobasen und Ceramiden verläuft in allen Eukaryoten sehr ähnlich (Holthuis et al., 2001) (s. Abb. 1.7). Erst die Synthese komplexer Sphingolipide zeigt speziesspezifische und gewebespezifische Unterschiede. Der erste Schritt der Ceramidsynthese ist die Kondensation von Serin mit Palmitoyl-CoA zu 3-Ketosphingonin. Diese Reaktion wird von der Serin-Palmitoyltransferase mit Pyridoxalphosphat als Coenzym katalysiert. Anschließend wird 3-Ketosphingonin in einer NADPH-abhängigen Reaktion durch die 3-Ketosphingonin-Reduktase zu Sphingonin reduziert. In der nachfolgenden Reaktion acyliert die Ceramid-Synthase (Sphingonin-N-Acyltransferase) Sphingonin zu Ceramid mit der Sphingobase Sphingonin. Schließlich wird dieses Ceramid NAD(P)H-abhängig zum Ceramid mit der Sphingobase Sphingosin desaturiert. Die Ceramid-Synthase findet an der cytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) statt (Mandon et al., 1991; Holthuis et al., 2001). Phytosphinganine aus Hefen und Pilzen entstehen durch Hydroxylierung von Sphingonin an C-4. Es ist noch nicht bekannt, ob diese Hydroxylierung bereits bei den freien Sphingobasen oder erst bei den Ceramiden erfolgt (s. Abb. 1.7). Die Ceramidmoleküle werden nach der Biosynthese durch Vesikelfluß aus dem ER in den Golgi-Apparat transportiert. Erst dort erfolgt die Biosynthese komplexerer Sphingolipide durch die Verknüpfung unterschiedlicher, polarer Kopfgruppen (Zucker, Cholinphosphat bzw. Inositolphosphat) mit den Ceramiden.

Die Enzymaktivität einer tierischen Glucosylceramid-Synthase wurde erstmals 1968 bestimmt (Basu et al., 1968). Seit dem wurden eine Reihe unterschiedlicher Enzymtests für tierische Gcs entwickelt (Ichikawa und Hirabayashi, 2000; Marks et al., 2000; Shayman und Abe, 2000).

Speziell für die pflanzliche Gcs postulierten Lynch et al. (1997), dass bei *in vitro*-Enzymtests mit Mikrosomen der Bohne *Phaseolus vulgaris* die Gcs Sterolglucosid (SG) als Substrat zur Glucosylierung von Ceramid verwendet. Diese SG-abhängige Gcs ist an der apoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert (Cantatore et al., 2000).

Nakayama et al. (1995) konnten einen *in vitro*-Enzymtest mit Mikrosomen des Hypokotyls von Rettich durchführen. Nur ein Prozent der eingesetzten Radioaktivität aus UDP-[<sup>3</sup>H]-Glucose wurde in den Glucosylceramiden nachgewiesen.



**Abbildung 1.7:** Die Ceramidbiosynthese verläuft bei allen Eukaryoten sehr ähnlich. Es ist noch unbekannt, ob bei der Biosynthese von Phytoceramid in Pilzen die C-4-Hydroxylierung des Sphinganins bei der freien Sphingobase oder erst auf der Stufe des Ceramids erfolgt. (nach Holthuis et al., 2001)

## 1.4 Funktion der Sphingolipide in Säugern

Die Bedeutung der Glycosphingolipide, insbesondere von Glucosylceramid, in tierischen Organismen wurde zum einen durch die Verwendung von mutierten Zell-Linien der Maus ermittelt, die in der Synthese oder im Abbau von GlcCer beeinflusst sind. Zum anderen waren es spezielle Mausmutanten (sogenannte KO-Mäuse), welche weitere Aufschlüsse über die GlcCer-Funktion in tierischen Organismen lieferten. Des Weiteren wurden auch Versuche mit spezifischen Gcs-Inhibitoren (s. 1.7) durchgeführt, um die Funktion von GlcCer zu ermitteln.

Die Mutanten bzw. Zell-Linien mit reduzierter Menge von GlcCer zeigen eine Veränderung im Gehalt der biosynthetischen Vorstufe Ceramid als auch Veränderungen im Gehalt der aus GlcCer gebildeten Produkte, den komplexen Glycosphingolipiden. Die Funktion der Gcs umfasst somit die Regulation der Ceramidmenge sowie die der Endproduktsynthese.

Zell-Linien der Maus, die kein GlcCer bilden, sind lebensfähig. GlcCer ist also nicht essentiell für Einzelzellen (Ichikawa et al., 1994). Andererseits führt die Disruption des *GCS*-Gens in Maus-Mutanten zum Tod während der Embryogenese (Yamashita et al., 1999). Dies deutet daraufhin, dass Glycosphingolipide eine bedeutende Rolle bei Zell-Differenzierung und Zell-Zell-Interaktionen vielzelliger Organismen und Gewebe spielen (Hakamori, 2000).

Ceramid dient in tierischen Organismen als Stress-Signal und löst Apoptose aus (Hannun et al., 1997). Es kann durch unterschiedliche Mechanismen in der Zelle angereichert werden, entweder durch *de novo*-Synthese (s. 1.3) oder durch Abspaltung der Kopfgruppe von Sphingolipiden (z. B. Sphingomyelin oder GlcCer).

Sphingosin-1-phosphat ist ein weiteres Signalmolekül in tierischen Organismen. Es wird durch Phosphorylierung von Sphingosin an der C-1-Hydroxygruppe gebildet. Diese Reaktion wird durch das Enzym Sphingosin-Kinase katalysiert. Sphingosin-1-phosphat stimuliert Zellteilung, Differenzierung und Bewegung, es stellt einen Antagonisten zu Ceramid dar (Spiegel und Milstien, 2002).

Melanoma-Zellen der Maus, die kein GlcCer bilden, können das Pigment Melanin nicht synthetisieren. Dieser Defekt wurde durch eine Beeinträchtigung des Transports des Schlüsselenzyms Tyrosinase vom Golgi-Apparat zu den Melanosomen erklärt (Sprong

et al., 2000). GlcCer ist also am Transport bestimmter Proteine in spezielle Organelle beteiligt. Dieser Defekt in der Melaninbiosynthese bei fehlendem GlcCer ist vor allem auch in Hinblick auf phytopathogene Pilze interessant, denn einige bilden wie *M. grisea* stark melanisierte Appressorien aus, die die Infektion der Pflanze ermöglichen.

Die Bedeutung von GlcCer ist auch interessant in Bezug auf Wirt/Pathogen-Wechselwirkungen. Untersuchungen mit dem human-pathogenen Bakterium *Helicobacter pylori* zeigten, dass *in vitro* eine Bindung des Bakteriums an Mono-hexosylceramide erfolgt (Abul-Mihl et al., 2001).

Eine weitere Funktion der Spingolipide ist die erhöhte Menge von GlcCer in „*multi drug resistant*“ (MDR) Krebszellen (Lavie et al., 1996; Lucci et al., 1998). Diese Zellen sind resistent gegen verschiedene Cytostatika der Krebstherapie. Ihre Resistenz kann durch Zugabe von speziellen Gcs-Inhibitoren aufgehoben werden, wodurch der Ceramidgehalt in den Zellen ansteigt (Liu et al., 1999; 2000; 2001; Grazide et al., 2004; Guerrero et al., 2003; Itoh et al., 2003; Klappe et al., 2004). In Bezug auf die Aufhebung der MDR in Krebszellen gibt es abhängig von den untersuchten Zell-Linien widersprüchliche Ergebnisse, da Gcs-Inhibitoren in manchen Fällen keinen Einfluss auf die Aufhebung der Resistenz von Krebszellen haben (Norris-Cervetto et al., 2004; Veldmann et al., 2004).

## 1.5 Funktion der Sphingolipide in Pflanzen

Die Bedeutung der Glucosylceramide und Ceramide ist in Pflanzen weniger untersucht worden als in tierischen Organismen.

Leipelt und Mitarbeiter konnten 2001 erstmals ein pflanzliches *GCS*-Gen aus Baumwolle isolieren und durch heterologe Expression in *P. pastoris* funktional charakterisieren.

Die Deletion eines Gens in *A. thaliana*, das für ein Sphingosin-Transferprotein kodiert, führt zu programmiertem Zelltod (Brodersen et al., 2002).

Für die Funktion der Schließzellen-Regulierung spielen Sphingolipide eine große Rolle. Sphingosin-1-phosphat steht in Zusammenhang mit der Signaltransduktion des Pflanzenhormons Abscisinsäure und somit mit der Regulierung der Spaltöffnungsbewegungen bei Stress (Ng et al., 2001). Das nach Hydrierung der C-4-

Doppelbindung resultierende Sphingarin-1-phosphat zeigt keine Funktion. Obwohl Sphingosin-1-phosphat in Pflanzen nur in sehr geringen Mengen auftritt, hat es eine signifikante Bedeutung. Das Enzym Sphingolipid- $\Delta^4$ -Desaturase, welches die Desaturierung der Sphingobase Sphingarin katalysiert, wurde kürzlich von Ternes et al. (2002) kloniert.

Weiterhin wird eine Beteiligung von GlcCer bei der Kältestressreaktion beschrieben. Die GlcCer-Gehalte in den Plasmamembranen von Pflanzen sinken im Verlauf einer Kältehärtung ab (Bohn et al., 1999; Lynch und Steponkus, 1987).

Sphingolipide sind auch an der Wechselwirkung zwischen Pflanzen und phytopathogenen Pilzen beteiligt. Bei der Pathogenabwehr fungieren Glucosylceramide möglicherweise als Elicitoren. Elicitoren führen bei der infizierten Pflanze zu einer Hypersensitivitätsreaktion, bei der Zellen in unmittelbarer Umgebung der Infektionsstelle schnell absterben. Damit entziehen sie den Pathogenen die Nährstoffe und verhindern ihre Ausbreitung. Zusätzlich erfolgt die Synthese von Phytoalexinen, welche eine starke antimikrobielle Wirkung haben (Koga et al., 1998; Umemura et al., 2000; 2002).

## 1.6 Funktion der Sphingolipide in Pilzen

Die Funktion der Glucosylceramide in Pilzen ist bisher kaum untersucht worden. Die charakteristische Sphingobase der Pilze ist (4E,8E)-9-Methylsphinga-4,8-dienin (s. 1.2). Möglicherweise hat diese spezifische Sphingobase spezielle Funktionen in Pilzen.

GlcCer mit dieser Sphingobase zeigt fruchtkörperinduzierende Wirkung bei dem Pilz *Schizophyllum commune* (Kawai et al., 1983). Untersuchungen von Mizushima und Mitarbeitern (1998) deuten darauf hin, dass GlcCer einen inhibitorischen Effekt auf die replikative DNA-Polymerase ausübt.

Des weiteren interagieren Defensine von Insekten und Pflanzen mit pilzlichen GlcCers (Thevissen et al., 2004). Defensine sind kleine Proteine, die antimikrobielle Wirkung haben. Daher werden sie auch als antimikrobielle Peptide (AMP) bezeichnet. RsAFP2, ein pflanzliches Defensin aus Rettichsamen, behindert das Wachstum der Pilze *C. albicans* und *P. pastoris*. Die *gcs*-Deletionsmutanten dieser Pilze sind resistent gegen

dieses Defensin. ELISA-Tests haben gezeigt, dass die Bindung des Defensins spezifisch an das GlcCer erfolgt (Thevissen et al., 2004). GlcCer steht also in direktem Zusammenhang mit der Defensin/Pilz-Wechselwirkung und dient der Pflanze als Target.

In diesem Zusammenhang sollen auch Untersuchungen zu inositolhaltigen Sphingolipiden in Pilzen erwähnt werden. Die *ipt1*-Mutante von *S. cerevisiae*, die kein Mannosyl-diinositolphosphorylceramid enthält, ist resistent gegenüber den antifungalen Wirkstoffen Syringomycin aus dem Bakterium *Pseudomonas syringe* (Stock et al., 2000) und einem pflanzlichen Defensin von *Dahlia merckii* (Thevissen et al., 2000).

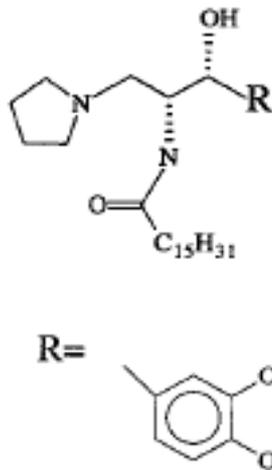
## 1.7 Inhibitoren der Glucosylceramid Synthase

Zur Analyse der Gcs-Funktionen können verschiedene Wege beschritten werden. Neben dem Deletieren oder der Überexpression des Gens gibt es auch die Möglichkeit, das Enzym durch Verwendung von spezifischen Inhibitoren gezielt zu hemmen.

Der spezifische Gcs-Hemmstoff *D-threo*-1-Phenyl-2-decanoyl-amino-3-morpholino-1-propanol (PDMP) (Radin, 1993) ist der Ausgangspunkt für die Synthese einer Serie strukturell ähnlicher Homologe, die verbesserte inhibitorische Eigenschaften aufweisen. Vor allem *D-threo*-1-(3',4'-Ethyldioxy)phenyl-2-palmitoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol (Ethyldioxy-P4; s. Abb. 1.8) ist in Säugerzellen ein hochsensitiver Hemmstoff mit einem  $IC_{50}$  von 100 nM (Lee et al., 1999). In geringen Konzentrationen eingesetzt, führt Ethyldioxy-P4 nicht zum Anstieg des Eduktes Ceramid, da die 1-O-Acylceramid-Synthase, die freies Ceramid acyliert und somit als Signalwirkstoff unwirksam macht, aktiv bleibt.

Weitere Gcs-Hemmstoffe sind Derivate von Deoxynojirimycin, z.B. das N-Butyldeoxynojirimycin (NB-DNJ) (Platt et al., 1994). Dieser Hemmstoff ist weniger aktiv und spezifisch als Ethyldioxy-P4. Er wird aber therapeutisch eingesetzt bei der Sphingolipidose Gaucher'sche Erkrankung (Cox et al., 2003). Unter diesen Umständen führt die Inhibition der Gcs zu reduzierter Akkumulation von komplexen Sphingolipiden. Diese Behandlung ist auch als "Substratreduktionstherapie" bekannt. OGT2378 ist ein weiterer Gcs-Hemmstoff, der mit NB-DNJ verwandt ist. Dieser

spezielle Hemmstoff inhibiert die Synthese von Gangliosiden in Krebs-Zell-Linien (Weiss et al., 2003). Die Aufhebung der Resistenz der MDR-Krebszellen gegenüber Cytostatika steht in Zusammenhang mit dem Einsatz von spezifischen Gcs-Hemmstoffen (s. auch 1.4).



**D-threo-1-(3',4'-Ethylendioxy)phenyl-2-palmitoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol (Ethylendioxy-P4)**

**Abbildung 1.8:** Strukturformel des spezifischen Gcs-Hemmstoffs Ethylendioxy-P4 (aus Lee et al., 1999)

Die Anwendung spezifischer Gcs-Hemmstoffe für nicht-humane Organismen (*Plasmodium falciparum*, *Aspergillus nidulans* und *Aspergillus fumigatus* sowie Insekten-Zell-Linien) wurde nur in wenigen Fällen beschrieben (Leverly et al., 2001; Couto et al., 2004 und Slavish et al., 2004). Intakte Zellen des Pilzes *A. nidulans* und *A. fumigatus* werden durch Zugabe von Ethylendioxy-P4 im Hyphenwachstum stark gehemmt (Leverly et al., 2001). Zusätzlich wird auch die Keimung der Zellen gehemmt. Bei *P. falciparum* wird durch Zugabe des Hemmstoffs D,L-threo-Phenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol (PPMP) die Glycosphingolipidbiosynthese inhibiert (Couto et al., 2004). Neu entwickelte spezifische Gcs-Hemmstoffe, abgeleitet vom Hemmstoff PDMP, beeinflussen das Wachstum von speziellen Zellen der Motte *Manduca sexta* (Slavish et al., 2004).

## 1.8 *Pichia pastoris* als Expressionsorganismus zur heterologen Expression von Glucosylceramid-Synthase-Genen

*P. pastoris* gehört zu den fakultativ methylotrophen Hefearten (Kurtzmann und Robnett, 1998). Die Metabolisierung von Methanol wird durch die Alkoholoxidase (*AOX*) katalysiert. Dabei wird Methanol mit atmosphärischem Sauerstoff zu Formaldehyd oxidiert. Das *AOX*-Gen unterliegt einer Induktion durch Methanol, wird jedoch durch Glucose reprimiert.

*P. pastoris* besitzt zwei Gene für Alkoholoxidasen (*AOXI* und *AOXII*), wobei sich die messbare Alkoholoxidaseaktivität auf das Produkt von *AOXI* zurückführen lässt. Bei der Transformation von *P. pastoris* mit Derivaten des Plasmides pPIC3.5 (Invitrogen) ist die Integration des Konstrukts in den *AOXI*-Genort gewünscht. Das zu exprimierende Gen wird am *AOXI*-Genort durch homologe Rekombination ins Genom integriert. Dadurch entsteht eine vollständige Deletion des *AOXI*-Gens und die Integration des Fremdgens unter Kontrolle des starken induzierbaren *AOXI*-Promoters. Bei Rekombination in den *AOXI*-Genort zeigen die Transformanten den Mut<sup>S</sup>-Phänotyp. Derartige Mutanten zeigen auf Festmedium, das ausschließlich Methanol als C-Quelle enthält, ein stark verlangsamtes Wachstum. Da die Alkoholoxidase I (bewirkt ca. 95 % der Alkoholoxidaseaktivität) deletiert wurde, ermöglicht lediglich *AOX II* den Zellen von *P. pastoris* einen geringen Umsatz von Methanol (Cregg et al., 1989).

*P. pastoris* hat zudem den Vorteil, dass das Expressionssystem im Vergleich mit herkömmlichen Hefesystemen die 10-100fache Proteinausbeute liefern kann (Clare et al., 1991) und somit auch industrielle Anwendung findet.

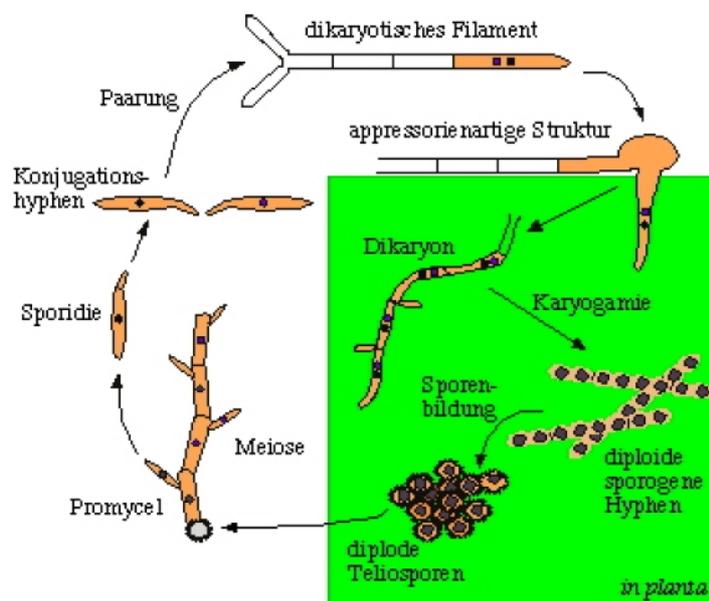
Bei den eingesetzten Vektoren handelt es sich meisst um integrative Vektoren, die stabil durch homologe Rekombination ins Genom integriert werden.

Da *P. pastoris* im Gegensatz zu *S. cerevisiae* GlcCer synthetisiert, eignet sich diese Hefeart besonders zur Analyse der Glucosylceramid-Synthase mittels heterologer Expression, da alle Substrate zur Synthese von GlcCer in den Zellen vorliegen. Zudem war es möglich, eine glycolipidfreie *P. pastoris*-Mutante zu erzeugen, die als Expressionssystem diene.

## 1.8 Der phytopathogene Pilz *Ustilago maydis*

*U. maydis* ist ein Vertreter der fakultativ biotrophen Basidiomyceten. Er wird der Familie der Brandpilze zugeordnet (Ordnung Ustilaginales, Klasse Heterobasidiomycetes). Sein enges Wirtsspektrum beschränkt sich auf *Zea mays* und *Euchlena mexicana* (Teosinte). *U. maydis* kann alle oberirdischen Organe der Wirtspflanzen befallen. Zunächst erfolgt dabei das Ausbleichen von chlorophyllhaltigem Gewebe (Chlorose) und zum Teil die Induktion der Anthocyan-Biosynthese. Daraufhin bildet sich ein Tumor. Der Krankheitsverlauf steht eng in Verbindung mit dem sexuellen Zyklus von *U. maydis* (Banuett und Herskowitz, 1996; Christensen, 1963). Haploide Sporidien sind nicht pathogen. Sie leben saprophytisch und vermehren sich hefeartig durch Knospung. Über Konjugationshyphen können die Sporidien fusionieren und ein filamentöses Dikaryon ausbilden (Rowell und DeVay, 1954; Snetselaar, 1993). Der morphologische Wechsel von Sporidien zu Dikaryon kann im Labor auf aktivkohlehaltigen Medien nachvollzogen werden (Day et al., 1971; Holliday, 1974). Unter natürlichen Bedingungen benötigt *U. maydis* den Kontakt mit der Wirtspflanze zur Bildung des pathogenen dikaryotischen Filaments. Auf der Pflanzenoberfläche proliferiert das filamentöse Dikaryon von *U. maydis* nicht. Es differenziert sich zu appressorienartigen Strukturen, aus denen Hyphen in den Wirt eindringen (Banuett und Herskowitz, 1996; Snetselaar und Mims, 1993). Die Hyphen dringen vermutlich in meristematisches Gewebe vor, wo sie die Vermehrung dieses Gewebes anregen. Nach etwa drei Tagen ist das Ausbleichen des infizierten chlorophyllhaltigen Gewebes sichtbar. Deutlich erkennbar wird die Infektion durch *U. maydis* etwa nach sieben Tagen mit der Ausbildung der Tumore. Assimilate der Pflanze werden in das Tumorgewebe transportiert, welches somit ein "sink-Organ" darstellt (Billet und Bournett, 1978). Die Hyphen von *U. maydis* verzweigen sich stark und differenzieren in diesem Stadium zu sporogenen Hyphen. Da die Hyphen in den infizierten Zellen ähnlich wie ein Sack voller Würmer aussehen, wird dieses Stadium auch als „worm-like“-Stadium bezeichnet (Banuett und Herskowitz, 1996). Daraufhin findet die Kernfusion statt, der sich eine massive Proliferation anschließt, so dass das infizierte pflanzliche Gewebe zerstört wird. Etwa zehn Tage nach der Infektion runden sich die sporogenen Hyphen ab und bilden Präsporen, die schließlich zu Teliosporen,

den diploiden Dauerformen reifen (Banuett und Herskowitz, 1996; Snetselaar und Mims, 1993). Der Tumor trocknet aus, so dass die Teliosporen verbreitet werden können. Bei geeigneten Umweltbedingungen keimen sie aus und beginnen eine neue Vegetationsphase. Dabei bildet sich zuerst ein Promycel, in das der diploide Kern einwandert. Es erfolgt eine meiotische Teilung, so dass ausgehend von diesem Promycel durch Abschnürung haploide Basidiosporen entstehen (s. Abb. 1.9, Sporidie). Daraufhin kann der Zyklus von neuem beginnen (Banuett und Herskowitz, 1996; Christensen, 1963).



**Abbildung 1.9:** Generationswechsel des phytopathogenen Pilzes *U. maydis* (nach Aichinger, 2001)

Die Fusion zum Dikaryon und das filamentöse Wachstum sowie die Pathogenität werden genetisch durch die zwei Inkompatibilitätsloci *a* und *b* kontrolliert (Puhalla, 1968; Rowell und DeVay, 1954). Der *a*-Locus ist biallelisch, mit den beiden Allelen *a1* und *a2*. Die Fusion von haploiden Zellen findet nur zwischen Zellen statt, die unterschiedliche *a*-Loci haben. Der *b*-Locus ist multiallelisch, es existieren mehr als 25 verschiedene *b*-Allele (Kahmann und Bölker, 1996). Zur Ausbildung eines stabilen pathogenen Dikaryons müssen haploide Sporidien unterschiedliche *a* und *b*-Allele tragen. Durch Untersuchungen an künstlichen diploiden Stämmen konnten den beiden

Paarungstyploci unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden (Holliday, 1961; Puhalla, 1969). Diploide Stämme mit unterschiedlichen *b*-Allelen aber identischem *a*-Allel wachsen nur hefeartig auf aktivkohlehaltigen Medien, sind aber in der Lage Pflanzen zu infizieren. Diploide Stämme mit gleichem *b*-Allel und unterschiedlichen *a*-Allelen wachsen ebenfalls nur hefeartig, sind aber nicht pathogen. Es konnte aber gezeigt werden, dass haploide Stämme mit gleichen *b*- aber unterschiedlichen *a*-Allelen zwar fusionieren, aber kein filamentöses Dikaryon ausbilden können (Trueheart und Herskowitz, 1992). Die Fusion haploider Sporidien wird also durch den *a*-Locus vermittelt. Für filamentöses Wachstum werden zwei unterschiedliche *a*- und *b*-Loci benötigt. Die pathogene Entwicklung hingegen wird ausschließlich vom *b*-Locus bestimmt (Banuett und Herskowitz, 1989; Day et al., 1971; Holliday, 1961; Puhalla, 1968).

Die Gesamtgenomsequenz von *U. maydis* ist seit kurzem öffentlich zugänglich ([www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago\\_maydis/](http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/)). Damit ist es möglich, pilzliche Gene gezielt über homologe Rekombination gegen modifizierte Gene auszutauschen und Insertionsmutanten herzustellen. Auch die Mutagenese durch insertionale oder Restriktionsenzym-vermittelte Integration (REMI) ermöglicht die Herstellung von Mutanten, die an der Wirt/Pathogen-Erkennung beteiligt sind (Maier und Schäfer, 1999).

### 1.10 Der phytopathogene Pilz *Magnaporthe grisea*

*M. grisea* zählt zu den filamentös wachsenden heterothallischen Ascomyceten. Er wird der Familie der Pyrenomyceten zugeordnet. Sein Wirtsspektrum umfasst die Familie der Süßgräser (*Poaceae*), am besten bekannt ist der Befall von Reis (*Oryza sativa*). Die durch den Pilz entstandenen Schäden vor allem beim Befall von Reis stellen weltweit ein ernstzunehmendes wirtschaftliches Problem dar (Zeidler et al., 1994). Die Penetration der Wirtspflanze erfolgt über die Ausbildung eines Appressoriums, welches stark melanisiert ist und dadurch einen hohen Turgordruck aufbauen kann, um so das Eindringen des Keimschlauches in die Epidermis der Wirtspflanze zu ermöglichen.

Die Gesamtgenomsequenz auch dieses Pilzes ist seit kurzem bekannt ([www.broad.mit.edu/annotation/fungi/magnaporthe\\_grisea/](http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/magnaporthe_grisea/)), und ermöglicht es, pilzliche Gene über homologe Rekombination gegen modifizierte Gene auszutauschen und Insertionsmutanten herzustellen.

Das *IPCI*-Gen aus *Cryptococcus neoformans*, welches die Inositolphosphorylceramid-Synthase kodiert, ist notwendig für die Melaninbiosynthese (Luberto et al., 2001). Auch GlcCer-defiziente Melanoma-Zellen der Maus können kein Melanin synthetisieren (s. 1.4). Die Bedeutung von Melanin in *M. grisea* und eine mögliche Verbindung zwischen Melanin- und Sphingolipidbiosynthese galt es zu untersuchen.

### 1.11 Problemstellung, Strategie und Ziel

Ziel dieser Arbeit war es, erstmals Funktionen der Glucosylceramid-Synthasen und ihrer Reaktionsprodukte in Pflanzen und phytopathogenen Pilzen zu beschreiben. Dabei sollten verschiedene Aspekte bearbeitet werden, die im Folgenden kurz skizziert sind:

Zur Analyse der Substratspezifität der pflanzlichen Gcs sollte eine *P. pastoris*-Mutante hergestellt werden, die weder GlcCer noch SG synthetisiert. Diese glycolipidfreie Mutante ist ideal für die Expression unterschiedlicher *GCS*-Gene, da die heterolog synthetisierten GlcCer-Spezies durch Dünnschichtchromatographie auf einfache Weise isoliert werden können.

Die Enzymaktivität der Gcs aus Pflanzen und Pilzen sollte *in vitro* mit radioaktiv markierten Substraten getestet werden, um auf diese Weise die Wirkung spezifischer Gcs-Hemmstoffe direkt analysieren zu können.

Zur Erkennung physiologischer Funktionen von GlcCer in Pflanzen sollte eine *gcs*-Deletionsmutante von *A. thaliana* aus öffentlich zugänglichen Mutantensammlungen isoliert und auf entsprechende Phänotypen hin untersucht werden.

Expressionsanalysen mit dem Reportergen  $\beta$ -Glucuronidase unter der Kontrolle des Gcs-Promoters sollten die gewebespezifische Expression des *GCS*-Gens in *A. thaliana* aufzeigen.

Schließlich sollten *gcs*-Deletionsmutanten der phytopathogenen Pilze *U. maydis* und *M. grisea* erzeugt werden, um eine eventuelle Beteiligung der GlcCer bei Wirt/Pathogen-Interaktionen erkennen zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Geräte

Brutschrank	(Binder)
Brutschrank	(Heraeus Instruments)
BAS-1000 BioImaging Analyser	(Raytest, Straubenhardt)
Cleanbench „DLF/BSS4“	(Clean Air)
Digitalkamera “Camedia 2500L”	(Olympus)
Digitalkamera “DC290 Zoom”	(Kodak)
Elektrischer Heizblock	(Eppendorf)
Elektroporator „5810“	(Eppendorf)
Gelkammer „Horizon 11-14”	(BRL)
Glasgeräte	(VWR)
Inkubations-Rotor „CMV-E“	(Fröbel Labortechnik)
Inkubations-Schüttler „Multitron“	(Infors)
Magnetrührer „IKAMAG RH“	(Jahnke & Kunkel)
Mikroliterspritzen	(Hamilton)
MultiImage <sup>TM</sup> LightCabinet	(Alpha Innotech Corporation)
PCR-Gerät „Primus“	(MWG-Biotech)
PCR-Gerät „TGRADIENT“	(Biometra)
pH-Meter „766 Calimatic“	(Knick)
Photometer „20 GENESYS <sup>TM</sup> “	(Spectronic)
UV-Photometer „GeneQuant II“	(Pharmacia Biotech)
Pipetten	(Eppendorf)
Rotationsverdampfer „Rotavapor RE 120”	(Büchi)
Transilluminator	(Herolab)
Zentrifugen:	
Kühlzentrifuge „5810R”	(Eppendorf)
Kühlzentrifuge „Centrikon H-401“	(Kontron) Rotoren: A6.14; A8.24;
Ultrazentrifuge „T-1075“	(Kontron) Rotoren: S4.13, SW60
Tischzentrifuge „Rotanta“	(Hettich)
Tischzentrifuge „Biofuge pico“	(Heraeus Instruments)

## 2.2 Verbrauchsmaterialien und Laborchemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien, Lösungsmittel, Nährmediengrundstoffe, Vitamine, Aminosäuren und Antibiotika von den Firmen AppliChem (Darmstadt), BD Bioscience (Heidelberg), Biomol (Hamburg), Carl Roth (Karlsruhe), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fluka (Neu-Ulm), VWR (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhof) bezogen.

DNA-modifizierende Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach/Taunus) und Roche (Mannheim) bezogen. Radiochemikalien wurden von Amersham Buchler (Braunschweig) geliefert.

### 2.2.1 Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Kieselgel-Platten Kieselgel 60	(VWR)
Sterilfilter „Stericup™“	(Millipore)
Sephadexsäulen „Strata SI-2 Silica“	(Phenomenex)
Elektroporationküvetten	(BioRad)
Whatman-Papier (3MM)	(Mainstone, England)

### 2.2.2 Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Plasmid Maxi Kit	(Machery und Nagel)
Plasmid Mini Kit	(Qiagen)
QIAquick Gel Extraktion	(Qiagen)
DNA-Extraktionskit	(Sigma)

## 2.3 Organismen und Vektoren

### 2.3.1 Verwendete Organismen

#### *Agrobacterium tumefaciens*

ATHV C58C1, ein Derivat des Stammes EHA 101 (Hood et al., 1986)

#### *Escherichia coli*

XL1-Blue MRF<sup>r</sup>Tet (Bullock et al., 1987)

$\Delta(mcrA)$  183,  $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$  173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*[F<sup>r</sup>*proAB*,*lacI<sup>q</sup>* $\Delta$ M15,*Tn10* (*tet<sup>r</sup>*)]

#### *Pichia pastoris*

NRRL-Y11403 (Lin Cereghino et al., 2001) *AOX1*

JC308 (Lin Cereghino et al., 2001) *AOX1*, *ade1*, *arg4*, *his4*, *ura3*

JC308  $\Delta$ *ugt51* (diese Arbeit) *AOX1*, *ade1*, *arg4*, *his4*,  $\Delta$ *ugt51::URA3*

JC308  $\Delta$ *ugt51*/ $\Delta$ *gcs* (diese Arbeit) *AOX1*, *ade1*, *arg4*, *his4*,  $\Delta$ *ugt51::URA3*,  $\Delta$ *gcs::Shble*

#### *Ustilago maydis*

FB1 *a1 b1* (Banuett et al., 1989)

FB2 *a2 b2* (Banuett et al., 1989)

$\Delta$ *gcs*-FB1 *a1 b1*  $\Delta$ *gcs* (diese Arbeit)

$\Delta$ *gcs*-FB2 *a2 b2*  $\Delta$ *gcs* (diese Arbeit)

### 2.3.2 Verwendete Vektoren

pBluescriptSKII <sup>-</sup>	(Amp <sup>r</sup> )	Stratagene
pBS-hhn	(Amp <sup>r</sup> )	(Kämper, 2004)
pUC18	(Amp <sup>r</sup> )	(Yanish-Perron et al. 1989)
pPIC3.5	(Amp <sup>r</sup> / <i>HIS4</i> )	Invitrogen
pCB1004	(Amp <sup>r</sup> )	(Carroll et al., 1994)
pCB1532 (Amp <sup>r</sup> /Sulfonylurea Resistenz)		(Sweigard et al., 1997)
pCAMBIA1391Z	(Kan <sup>r</sup> /Hyg <sup>r</sup> )	CAMBIA, Canberra, Australien
pCAMBIA2300	(Kan <sup>r</sup> / Kan <sup>r</sup> )	CAMBIA, Canberra, Australien
pBLURA	(Amp <sup>r</sup> )	(Lin Cereghino et al. 2001)
pGEM-T	(Amp <sup>r</sup> )	Promega

## 2.4 Methoden beim Arbeiten mit *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* in LB-Medium erfolgte in Erlenmeyerkolben bei 37°C unter Schütteln bei min. 180 upm oder in Petrischalen. Plasmidtragende Stämme wurden unter entsprechendem Selektionsdruck angezogen. Die Endkonzentration der verwendeten Antibiotika im Medium betrug bei Ampicillin 100 µg/ml, bei Kanamycin 50 µg/ml und bei Tetracyclin 25 µg/ml.

Zur Blau-Weiß-Selektion bei Vektoren mit dem LacZ-Gen wurden dem Festmedium neben dem Antibiotikum folgende Stoffe zugesetzt:

**IPTG:** 200 µM Isopropyl-β-thiogalactosid (IPTG) (100 mM Stammlösung in A. dest.)

**X-Gal:** 80 µg 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid (in 5 ml *N,N*-Dimethylformamid) pro Liter Medium

Die Dichte einer *E.coli*-Kultur wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Dabei wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 ein Wert von 1-2 x 10<sup>9</sup> Zellen/ml zugrunde gelegt. Dauerkulturen wurden mit Zellen angelegt, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Hierfür wurden die Kulturen mit dem gleichen Volumen von 70 % (v/v) Glycerin (steril) versetzt und bei -70°C gelagert.

**LB-Medium** (Sambrook et al., 1989):

1,0 % (w/v) Bacto-Trypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

1,0 % (w/v) NaCl

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt. Zur Herstellung von Agar-Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Bacto-Agar zugesetzt.

### 2.4.1 Transformation von *E. coli*

Die Herstellung der zur Transformation geeigneten kompetenten Zellen erfolgte nach der Methode von Inoue et al. (1990). Es wurden 100 ml SOB-Medium mit 1 ml Übernachtskultur von *E. coli* XL1 Blue MRF<sup>'</sup>tet angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bei 200 upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 10 min auf Eis gekühlt und mit 5000 x g bei 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellsediment vorsichtig in 40 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, 10

min auf Eis inkubiert und erneut unter den gleichen Bedingungen wie oben sedimentiert. Die Zellen wurden nun in 8 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, mit 0,56 ml DMSO (Endkonzentration 7 % (v/v)) versetzt und wiederum für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension kompetenter Zellen in 200 µl-Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Für die Transformation wurde ein Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen langsam auf Eis aufgetaut, mit einem Teil oder dem gesamten Ligationsansatz bzw. 0,3-0,5 µg Plasmid-DNA vermischt und 30 min auf Eis belassen. Daraufhin wurden die Zellen für 90 s einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und für 2 min auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration wurden die Zellen mit 500 µl SOB-Medium versetzt und für 60 min bei 37°C im Rotor inkubiert. Nach der Regenerationszeit wurden 50 µl bzw. 450 µl auf Selektivagar ausplattiert und bei 37°C über Nacht kultiviert.

**SOB-Medium:**

2 % (w/v)	Bacto-Pepton
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl <sub>2</sub> *
10 mM	MgSO <sub>4</sub> *

\*Lösungen nach dem Autoklavieren zugesetzt

**TB-Puffer:**

10 mM	PIPES, pH 6,7 (KOH); sterilfiltriert
55 mM	MnCl <sub>2</sub>
15 mM	CaCl <sub>2</sub>
250 mM	KCl

## 2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

### 2.4.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die analytische Präparation von Plasmid-DNA erfolgte modifiziert nach der Methode von Riggs & McLachlan (1986). Hierfür wurden 2 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in ein 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 200 µl BF-Puffer mit 1 mg/ml Lysozym resuspendiert und 1 min bei 100°C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden anschließend mit 13000 upm bei Raumtemperatur in der Tischzentrifuge für 30 min sedimentiert. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde mit 480 µl IS-Mix gefällt und mit 13000 upm bei RT für 20 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70 % (v/v) Ethanol (p.a.) gewaschen und für 5 min bei RT mit 13000upm zentrifugiert. Daraufhin wurde das DNA-Sediment getrocknet und in 100 µl A. dest. resuspendiert. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

#### **BF-Puffer:**

8 %	Sucrose
0,5 %	Triton X-100
50 mM	EDTA, pH 8,0
10 mM	Tris/HCl, pH 8,0

#### **IS-Mix:**

400 µl	Isopropanol
80 µl	5 M NH <sub>4</sub> -Acetat

Lysozym-Stammlösung: 20 mg/ml in A. dest. (sterilfiltriert)

### 2.4.2.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Die Maxipräparation von Plasmid-DNA wurde mit dem DNA-Extraktions-Kit NUKLEOBOND® AX 500 der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Die Präparation basierte hierbei auf einer selektiven Bindung der DNA an eine Matrix unter Hochsalzbedingungen und deren Elution unter Niedrigsalzbedingungen. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die eluierte, gefällte Plasmid-DNA wurde in 200-500 µl A. dest. aufgenommen. Die Konzentration wurde im Anschluss photometrisch und/oder über ein Agarosegel bestimmt (s. 2.6).

### 2.4.2.3 Fällung und Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Fällung der gereinigten DNA diente meistens deren Konzentrierung, sie erfolgte mit der Ethanol-fällung. Durch Zusatz von 1/10 Volumen 3 M Kaliumacetat (pH 4,8) und dem 2,5fachen Volumen eiskaltem Ethanol wurde die DNA für 30 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gefällt. Das entstandene Präzipitat wurde durch Zentrifugation (15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ , 13000 upm) sedimentiert und nach Verwerfen des Überstandes mit 500  $\mu\text{l}$  70 % kaltem Ethanol gewaschen (5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ , 13000 upm). Nach dem Trocknen wurde die DNA entsprechend der gewünschten Konzentration in A. dest. bzw. TE aufgenommen.

Die Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge entspricht der Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA bzw. 33  $\mu\text{g/ml}$  ssDNA (Sambrook et al., 1989). Verunreinigungen der Nukleinsäuren mit Proteinen wurden anhand des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm (dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren) und bei 280 nm (dem Absorptionsmaximum der Proteine) bestimmt. Dieses Verhältnis sollte bei sauberen DNA-Lösungen 1,8-1,9 betragen.

## 2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Mullis et al., 1986) ist eine Technik, mit der es mittels Hilfe einzelsträngiger Starteroligonukleotide (Primer) und einer thermostabilen Polymerase möglich ist, DNA-Fragmente zu vervielfältigen. Das Prinzip beruht dabei auf der zyklischen Wiederholung eines Temperaturprogrammes, das abwechselnd Denaturierung, das Binden der Primer (Annealing) sowie die DNA-Synthese ermöglicht. Die Primer bestimmen den zu amplifizierenden DNA-Bereich, sie sind jeweils zu einem Strang der Ziel-DNA komplementär und gleichzeitig gegenläufig konstruiert. In einem gepuffertem Reaktionsansatz in Gegenwart von dNTPs kann der zwischen den Primerbindungsstellen liegende Bereich der Ziel-DNA amplifiziert werden. Durch Zugabe von 0,5 % DMSO kann die Spezifität der Primerbindung beeinflusst werden. Für das Gelingen einer PCR ist vor allem die geeignete Wahl der Primer Voraussetzung, hierfür können z. T. computergestützte Programme verwendet werden (Primer3: [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). Außerdem

benötigt jede Reaktion ein spezifisches Temperaturprogramm, das in einem Thermocycler beliebig verändert werden kann (verwendete Thermocycler: „Primus“(MWG-Biotech) und „TGRADIENT“(Biometra)). Die PCR diente zum einem der Synthese von DNA-Fragmenten für die Ligation mit Vektoren und zum anderen dem Nachweis spezifischer Rekombinationsereignisse in *P. pastoris* und *U. maydis*. Durch zusätzliche Nukleotide an den Primer-Enden war es möglich, DNA-Fragmente mit spezifischen Nukleotidsequenzen am 5'- bzw. 3'-Ende zu erzeugen, die Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen darstellten. Die Erzeugung zusätzlicher Restriktionsschnittstellen erleichterte die Ligation mit verschiedenen Vektoren.

Die Amplifizierung erfolgte entweder mit der DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) oder mit der über eine „*proof-reading*“-Aktivität verfügende DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-Polymerase). Die *Pfu*-Polymerase weist gegenüber der *Taq*-Polymerase eine 10fach höhere Genauigkeit auf, daher ist sie vor allem zur Amplifikation von offenen Leserahmen geeignet. Die geringere Fehlerrate der *Pfu*-Polymerase hat allerdings auch eine geringere Synthesegeschwindigkeit und eine geringere Ausbeute zur Folge. Die *Taq*-Polymerase weist eine terminale Transferaseaktivität auf, dadurch entsteht am Ende jedes amplifizierten DNA-Stranges ein Adenosinüberhang. TA-Klonierungsvektoren, z.B. pGEM-T<sup>®</sup> (Promega), verfügen über einen komplementären 3'-Desoxythymidinüberhang und ermöglichen so eine effiziente Klonierung von PCR-Fragmenten mit Adenosinüberhängen. Im Gegensatz dazu bildet die *Pfu*-Polymerase keine Adenosinüberhänge, sondern „glatte“ Enden (*blunt ends*).

Die Berechnung der Primer-Hybridisierungstemperatur erfolgte nach der Formel:

$$T_M = 2^\circ\text{C} \Sigma(\text{dA} + \text{dT}) + 4^\circ\text{C} \Sigma(\text{dG} + \text{dC}).$$

**Standard-PCR-Ansatz:**

10-100 ng	genomische DNA
5 $\mu$ l	10 x PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
4 $\mu$ l	25 $\mu$ M dNTPs je Nukleotid
100 pmol	Primer 1
100 pmol	Primer 2
5 U	<i>Taq</i> -Polymerase bzw. <i>Pfu</i> -Polymerase
ad 50 $\mu$ l A. dest.	

Standardmäßig wurde die PCR mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

	96°C	3 min (Denaturierung)
30 Zyklen	96°C	30 sec (Denaturierung)
		T <sub>M</sub> -5
	72°C	1 min/Synthese von 1kb DNA ( <i>Taq</i> -Polymerase)
		2 min/Synthese von 1kb DNA ( <i>Pfu</i> -Polymerase)
	72°C	10 min

Anschließend wurde die PCR gelelektrophoretisch überprüft.

**2.5.1 Overlap-PCR**

Bei der *Overlap*-PCR zur Herstellung eines chimären Konstrukts aus zwei DNA-Fragmenten wurden zunächst die zu fusionierenden Fragmente durch eine PCR mit der *Pfu*-Polymerase amplifiziert. Dabei wurden die Primer so konstruiert, dass das 3'-Ende des vorderen DNA-Fragments eine 25 bp lange Sequenzübereinstimmung mit dem 5'-Ende des hinteren DNA-Fragments, und das 5'-Ende des hinteren Fragmentes eine 25 bp lange Übereinstimmung mit dem 3'-Ende des vorderen Fragmentes aufwies. Anschließend wurde jeweils 1  $\mu$ l der ungereinigten PCR-Ansätze als Matrize in einer weiteren PCR eingesetzt, bei der die ersten 10 PCR-Zyklen ohne Primer abliefen. Dies sollte die Hybridisierung der komplementären Überhänge und die Synthese der fehlenden Sequenz des jeweiligen Fragmentes durch die *Pfu*-Polymerase erlauben. Nach

den 10 Zyklen wurde das Primerpaar zur Amplifikation des fusionierten Fragmentes hinzugefügt und die PCR-Reaktion für weitere 30 Zyklen fortgesetzt.

### **2.5.2 Kolonie-PCR**

Bei der Kolonie-PCR wurden als DNA-Template intakte Bakterien- bzw. Pilzzellen verwendet. Diese Methode wurde eingesetzt, um transformierte Organismen auf Anwesenheit der entsprechenden Konstrukte schnell und ohne vorherige DNA-Extraktion zu überprüfen. Im Prinzip funktioniert die Methode wie eine Standard-PCR-Reaktion. Der Unterschied liegt darin, dass die beginnende Denaturierungsphase auf 10 min verlängert wurde, um die als DNA-Template eingesetzten intakten Zellen zu zerstören und deren DNA zu denaturieren.

## **2.6 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten**

Die Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten wurde nach der Methode von Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Abhängig von der erwarteten Fragmentgröße der DNA wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 0,75-1,5 % (w/v) hergestellt. Die Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer aufgekocht und in eine Flachbettkammer gegossen. Bei Verwendung von Ethidiumbromid wurde dem Gel dieses in einer Endkonzentration von 0,01 µg/ml zugesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 0,2 Volumen DNA-Probenpuffer gemischt und nach dem Aushärten des Gels in die Geltaschen pipettiert. Bei Verwendung von „SYBR<sup>®</sup> Green I“ (Molecular Probes, Leiden) enthielt das Agarosegel keine Zusätze; die DNA-Proben wurden vor dem Auftrennen 10 min im Dunkeln mit „SYBR<sup>®</sup> Green I“ inkubiert. Es wurde eine 100fache Stammlösung des „SYBR<sup>®</sup> Green I“ 1/6 in 5 x DNA-Probenpuffer verdünnt und 1/5 Volumen dieses Probenpuffers mit den DNA-Proben vermischt.

Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 70-100 V mit 1 x TBE-Puffer durchgeführt. Nach dem Auftrennen wurden die DNA-Banden auf dem Transilluminator (Herolab) mit UV-Licht (304 nm) sichtbar gemacht. Abbildungen der

gelelektrophoretisch getrennten DNA wurden mit einer digitalen Kamera (DC290 Zoom™(Kodak)) und dem MultiImage™LightCabinet (Alpha Innotech Corporation) hergestellt. Die Agarose-Gelelektrophorese diente vor allem der Kontrolle von PCR, Restriktionen, DNA-Präparationen und DNA-Elutionen.

**10x TBE-Puffer (pH 8,3):**

89 mM Tris  
89 mM Borsäure  
20 mM EDTA, pH 8,3

**DNA-Probenpuffer:**

0,25 M EDTA, pH 8,0  
10 % (w/v) Ficoll  
0,25 % (w/v) Bromphenolblau  
0,25 % (w/v) Xylencyanol

Ethidiumbromid-Färbelösung: 1 mg/ml Ethidiumbromid in A. dest.

DNA-Längenstandard 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas):

10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bp

## 2.7 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem „*QIAquick GelExtraktion-Kit*“ (Qiagen). Dieses Verfahren beruht auf der selektiven Bindung von DNA an die Kieselgel-Partikel auf einer speziell entwickelten Membran in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Die Elution der DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das „*QIAquick GelExtraktion-Kit*“ wurde außerdem zur direkten Aufreinigung von PCR-Fragmenten und zur Aufreinigung von Restriktionsansätzen verwendet.

## 2.8 Enzymatische Modifikation von DNA

### 2.8.1 DNA-Restriktion

Restriktionsendonukleasen der Klasse II sind prokaryotische Enzyme, die palindromische Sequenzabschnitte auf der DNA erkennen und an diesen Stellen die DNA spalten. Die sequenzspezifische Spaltung von DNA mit

Restriktionsendonukleasen erfolgte unter den vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlenen Bedingungen in dem jeweils dazugehörigen Reaktionspuffer. Die Spaltung der DNA erfolgt so, dass entweder 5'- oder 3'-Überhänge oder glatte Enden (*blunt ends*) entstehen. Für die Reaktion wurden die Enzyme in 5-10fachem Überschuss eingesetzt. Definiert ist, dass 1 Unit Enzym 1 µg DNA in einer Stunde bei 37°C zu 100 % verdaut. Zur DNA-Analyse wurden die Reaktionsansätze für 1 h bei 37°C inkubiert. Präparative Restriktionen wurden für 2-4 h bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente gelelektrophoretisch getrennt.

### **2.8.2 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren**

Um in einer Ligasereaktion eine Rezirkularisierung einfachrestringierter Vektor-DNA zu verhindern, wurde deren endständige 5'-Phosphat-Gruppe mittels einer alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) entfernt. Nach der Restriktion wurde dem Reaktionsansatz 1 Unit CIP zugefügt, und es erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37°C. Die Aufreinigung der dephosphorylierten Fragmente erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung im Agarosegel.

### **2.8.3 Phosphorylierung von 5'-hydroxylierten DNA-Enden**

Durch PCR amplifizierte DNA-Fragmente enthalten hydroxylierte 5'-Enden, denn die synthetischen Oligonukleotide sind 5'-hydroxyliert. Dadurch ist eine Ligasereaktion mit dephosphorylierten Vektoren nicht möglich. Daher erfolgt eine Phosphorylierung des PCR-Produktes mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase. Als Reaktionspuffer wurde T4-DNA-Ligationspuffer verwendet, welcher für die Reaktion wichtiges ATP enthält. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert; daraufhin wurde durch 20minütiges Inkubieren bei 65°C die T4-Polynukleotidkinase hitzedenaturiert und somit die Reaktion beendet. Für die Ligation des PCR-Produktes in einen dephosphorylierten Vektor war keine weitere Aufreinigung notwendig.

### 2.8.4 Ligation

Die Ligation wurde mit Hilfe der T4 DNA-Ligase durchgeführt. Zur Ligation wurde das mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen vorbereitete DNA-Fragment und der entsprechend vorbereitete Vektor in einem Verhältnis 2/1 bis 3/1 in einem Reaktionsvolumen von 10 µl mit 1x Reaktionspuffer und 1 Unit T4 DNA-Ligase zusammengegeben. Daraufhin erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 16°C oder für 1 h bei Raumtemperatur. Der gesamte Ligationsansatz wurde dann für die Transformation von *E. coli* verwendet.

## 2.9 Sequenzierungen

Die Sequenzierung der DNA wurde nach einer veränderten Didesoxy-Methode nach Sanger et al. (1977) durchgeführt. Die Didesoxynucleotide (ddNTPs) sind mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Sie beruht auf dem statistisch verteilten Abbruch einer PCR aufgrund von eingebauten Didesoxynucleotiden. Diese besitzen keine 3'-OH-Gruppe, so dass keine Phosphodiester-Brücke mit weiteren Nucleotiden ausgebildet werden kann. Die Sequenzierungen erfolgten durch die Firma AGOWA (Berlin).

### 2.9.1 Computer-gestützte Sequenzauswertung

Zum Auswerten der Sequenzdaten wurden folgende Programme verwendet:

CHROMAS 1.4.3	( <a href="http://trishil.sci.gu.edu.au/conor/chromas.html">http://trishil.sci.gu.edu.au/conor/chromas.html</a> )
CLUSTAL	(Higgins und Sharp, 1988)
BLAST	(Altschul et al., 1990)
CLONE	(Clone Manager for Windows, Version 4.1, 1995-1996, Scientific & Educational Software)

Die Sequenzdaten wurden zunächst mit dem Programm Chromas ausgewertet. Das farbige „Peakmuster“ der Chromatogramme wurde mit den erhaltenen Sequenzdaten verglichen und letztere gegebenenfalls verändert. Sequenzvergleiche erfolgten mit dem Programm Clustal. Sequenzvergleiche mit Datenbanken aus dem Internet, z. B.

„Genbank“ des NCBI („*National Center for Biotechnology Information*“), erfolgten mit dem Programm Blast („*Basic Local Alignment Search Tool*“; Altschul et al., 1990). Klonierungen und Restriktionsanalysen wurden zunächst virtuell am Computer mit dem Programm Clone Manager durchgeführt.

## 2.10 Arbeiten mit *Pichia pastoris*

*P. pastoris* gehört zu den fakultativ methylotrophen Hefearten (Kurtzman und Robnett, 1998). Die Wachstumstemperatur für *P. pastoris* beträgt 30°C. Die Inkubation in YPD-Vollmedium oder in Minimalmedium erfolgte unter Schütteln mit 200 upm oder auf festen Medien im Brutschrank. Die Herstellung von Dauerkulturen erfolgte wie bei Dauerkulturen von *E. coli*-Stämmen.

### Vollmedium YPD:

2 % (w/v)	Bacto Pepton
1 % (w/v)	Hefeextrakt
2 % (v/v)	Glucose

### Minimalmedium (MD) +/- Histidin bzw. +/- Uracil :

846 ml      A. dest.

Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von

100 ml	YNB Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids 134 g/l, sterilfiltriert (Difco)
2 ml	0,02 % (w/v) Biotin, sterilfiltriert
2 ml	2 % (w/v) Histidin bzw. Uracil, sterilfiltriert
50 ml	40 % Glucose, sterilfiltriert

Für die Verwendung von Transformationen, bei denen bezüglich des Histidins bzw. des Uracils ein Selektionsdruck ausgeübt werden sollte, wurde auf die Zugabe von Histidin bzw. Uracil verzichtet.

Die Zusammensetzung von Minimalmethanolmedium (MM) +/- Histidin ist identisch mit MD mit der Ausnahme, dass statt Glucose 0,5 % Methanol als Kohlenstoffquelle verwendet wird.

Bei Verwendung der Stammes JC 308 erfolgte zusätzlich die Zugabe von 0,004 % (w/v) Arginin, 0,002 % (w/v) Adenin, und 0,004 % (w/v) Uracil.

Zur Herstellung von Agar-Platten wurde dem jeweiligen Medium vor dem Autoklavieren 2 % (w/v) Bacto-Agar zugesetzt. Bei Verwendung von Zeocin wurde dieses in einer Konzentration von 100 µg/ml nach Abkühlen des Mediums auf 60°C zugesetzt.

### 2.10.1 Transformation mittels Elektroporation

Beim Elektroporationsverfahren werden die Zellmembranen der in Suspension befindlichen Empfängerzellen durch kurze elektrische Pulse (10 µs) hoher Feldstärke (ca. 12,5 kV/cm) für die Fremd-DNA durchlässig gemacht.

100 ml YPD-Medium wurden mit höchstens 0,1 ml einer Übernachtskultur des jeweiligen *P. pastoris*-Stammes beimpft und unter Schütteln bei 30 °C und 200 upm bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 1,3-1,5 inkubiert. Die Zellkultur wurde abzentrifugiert (5 min, 1500 upm, 4°C), das Sediment in 500 ml eiskaltem sterilem A. dest. vorsichtig resuspendiert und die Zentrifugation wiederholt. Nach Aufnahme des Sediments in 50 ml eiskaltem, sterilem A. dest. wurde ein weiteres Mal zentrifugiert und in 10 ml eiskaltem sterilem 1 M Sorbitol aufgenommen. Anschließend wurde erneut zentrifugiert, und die kompetenten Zellen wurden in 200 µl eiskaltem, sterilem 1 M Sorbitol resuspendiert. 80 µl kompetente Zellen wurden dann in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand, Biorad) mit bis zu 10 µg (höchstens 10 µl) linearisierter, salzfreier Plasmid-DNA gemischt. Nach einer 5minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Elektroporation mit dem Elektroporator „5810“ (Eppendorf) bei 1500 V transformiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz sofort mit 1 ml 1 M Sorbitol gemischt und für 2 h bei 30°C inkubiert. Daraufhin erfolgte die Ausplattierung der Zellen auf Selektivagar (MD +/- Histidin bzw. +/- Uracil oder YPD + Zeocin), wobei höchstens 100 µl Zellen/Platte verwendet wurden. Das Wachstum der transgenen *P. pastoris*-Stämme betrug etwa 3-4 Tage.

### 2.10.2 Mut<sup>+</sup> („Methanol utilization plus“)/Mut<sup>S</sup> („Methanol utilization slow“)-Screening

Bei der Transformation von *P. pastoris* mit Derivaten des Plasmides pPIC3.5 (Invitrogen) können unerwünschte Rekombinationen stattfinden. pPIC3.5 ist ein integrativer Vektor, das heißt, dass Teile des Vektors ins Genom der Hefe integrieren. Ist die Integration des Konstrukts in den *AOXI*-Genort gewünscht, kann dieses Ereignis durch Restriktion des Vektors mit *BglII* erreicht werden. Es kann aber auch eine andere Rekombination stattfinden: zum einen am *AOXI*-Genort mit vollständiger Deletion des *AOXI*-Gens und gleichzeitiger Integration des Fremdgens und zum anderen die Rekombination des intakten *HIS4*-Selektionsmarkers mit dem defekten Gen der Hefe. Im letzten Fall bekommt die Hefe einen His<sup>+</sup>-Phänotyp, enthält allerdings keine Expressionskassette. Bei bis zu 98 % aller Histidin-prototrophen Transformanten findet diese unerwünschte Rekombination statt (Sreekrishna et al., 1997). Bei Rekombination in den *AOXI*-Genort zeigen die Transformanten den Mut<sup>S</sup>-Phänotyp. Derartige Mutanten zeigen auf Festmedium, das ausschließlich Methanol als C-Quelle enthält (MM), ein stark verlangsamtes Wachstum. Da die Alkoholoxidase I (bewirkt ca. 95 % der Alkoholoxidaseaktivität) deletiert wurde, ermöglicht lediglich *AOXII* den Zellen von *P. pastoris* einen geringen Umsatz von Methanol (Cregg et al., 1989). Eine Unterscheidung der Rekombinationsereignisse erfolgte durch Replattierung der erhaltenen His<sup>+</sup>-positiven Transformanten auf MM- und MD-Platten. Für dieses Mut<sup>+</sup>/Mut<sup>S</sup>-Screening wurden 100-200 Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und nacheinander dünn auf MM- und dann MD-Platten ausgestrichen. Nach 24 h Inkubation bei 30°C wurden die Kolonien auf ihr Wachstumsverhalten überprüft. Kolonien mit Mut<sup>S</sup>-Phänotyp waren wegen ihres geringeren Wachstums auf MM-Platten leicht zu identifizieren.

### 2.10.3 Isolierung genomischer DNA aus *P. pastoris*

Genomische DNA aus *P. pastoris* wurde nach einer modifizierten Methode von Ausubel et al. (1995) isoliert. Zellen aus einer 15 ml-Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, RT, 2000 upm, Eppendorf „5810R“). Nach dem

Abgießen des Überstandes wurde das Sediment in 15 ml A. dest. gewaschen und erneut zentrifugiert. Daraufhin wurden die Zellen in 1 ml Breaking-Puffer resuspendiert, mit Glasperlen (Durchmesser 0,45 mm) und 1 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) versetzt und für 4 min bei maximaler Geschwindigkeit gevortext. Die Lösung wurde dann mit 1 ml TE-Puffer versetzt und 10 min bei RT mit 3500 upm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in Portionen von 600 µl auf 2,0 ml-Eppendorfreaktionsgefäße verteilt, erneut mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) versetzt, gemischt und wie beim ersten Schritt zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis sich keine Protein-Interphase mehr bildete. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt (s. o. 2.4.2.3), gewaschen und das getrocknete Pellet im gewünschten Volumen A. dest. bzw. TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert.

**Breaking-Puffer:**

2 % (v/v)	Triton X-100	
1 % (v/v)	Natriumdodecylsulfat (SDS)	
100 mM	NaCl	
10 mM	Tris-HCl, pH 8,0	
1 mM	EDTA, pH 8,0	die Lösung muss frisch angesetzt werden

**2.10.4 Herstellung der *Augt51B1/Agcs*-Doppelmutante von *Pichia pastoris***

Zur Funktionsanalyse von Gcs-Proteinen aus unterschiedlichen Organismen diente *P. pastoris* als Expressionssystem. Durch die Verwendung des extrem starken, induzierbaren *AOX1*-Promoters kann eine hohe Proteinausbeute erreicht werden (Cregg und Madden, 1988). Außerdem ist die Möglichkeit der heterologen Rekombination gegeben, da es sich bei dem verwendeten Expressionsvektor pPIC3.5 (Invitrogen) um einen integrativen Vektor handelt. Da *P. pastoris* GlcCer produziert, war es notwendig, eine GlcCer-freie *Agcs*-Mutante zu erzeugen, um die Funktion der Gcs anderer Organismen bei der heterologen Expression zu überprüfen. Manche Gcs synthetisieren unterschiedliche GlcCer-Spezies bei heterologer Expression, die bei dünnschichtchromatographischer Auftrennung auf Höhe von SG laufen. Die Bildung

von SG wird durch die Sterol-Glucosyltransferase katalysiert (*UGT51B1*; Warnecke et al., 1999). Daher erfolgte die Herstellung einer *Δugt51B1/Δgcs*-Doppelmutante.

Zur Herstellung der *Δugt51B1/Δgcs*-Doppelmutante wurde der Stamm JC308 (Lin Cereghino et al., 2001) verwendet. Dieser weist Adenin-, Arginin-, Histidin- und Uracil-Auxotrophien auf. Zunächst wurde ein *Δugt51B1*-Stamm erzeugt. Zur Herstellung des *Δugt51B1*-Gendisruptionskonstrukts pGURASGT diente ein *P. pastoris*-Gen als Selektionsmarker, das die Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase (Uracilkassette) kodiert, welche zur Synthese von Uracil notwendig ist. Mittels PCR wurde mit den Primern UraSanDIs und UraBamHIas mit pBLURA (Lin Cereghino et al., 2001) als Template die Uracilkassette mit Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen *SanDI* am 5'-Ende und *BamHI* am 3'-Ende amplifiziert und in pGEM-T (Promega) kloniert. So entstand der Vektor pGURA. Dieser wurde mit *SanDI* und *BamHI* restringiert, so dass die Uracilkassette isoliert werden konnte und mittels *SanDI/BamHI* mit pUGT51B1g (*SanDI/BamHI*) (Warnecke et al., 1999) ligiert wurde. Dadurch wurde ein 3507 bp großes Fragment des im Vektor enthaltenen Ugt51B1 offenen Leserahmens (ORF) durch die Uracilkassette ersetzt. So entstand das Konstrukt pGURASGT, das die Uracilkassette, flankiert von 0,8- und 2,4 kb großen Regionen homolog zu Ugt51B1 5'- und 3'-nicht-kodierenden Bereichen, enthält. Das mit *BspMI* linearisierte pGURASGT-Konstrukt wurde für die Elektroporation des *P. pastoris*-Stamm JC308 verwendet. Die erhaltenen Transformanten wurden auf Uracil-Prototrophie auf MD-Agar + Uracil überprüft. Da der *P. pastoris*-Stamm JC308 Adenin-, Arginin- und Histidin-Auxotrophien aufweist, mussten dem MD-Medium 0,004 % (w/v) Arginin, 0,002 % (w/v) Adenin und 0,002 % (w/v) Histidin zugesetzt werden. Um die *Δugt51B1/Δgcs*-Doppelmutante herzustellen, wurde der *Δugt51B1*-Deletionsstamm mit dem *gcs*-Deletionskonstrukt pML4 (Leipelt et al., 2001) transformiert.

### 2.10.5 Heterologe Expression in *P. pastoris*

Zur heterologen Expression von Gcs-ORFs unterschiedlicher Organismen wurde das pPIC3.5-Expressionssystem (Invitrogen) verwendet. Durch homologe Rekombination wurde der *AOXI*-Genort durch das zu exprimierende Gen ersetzt, so dass der stark induzierbare *AOXI*-Promoter das zu exprimierende Gen regulierte. Tabelle 2.1 zeigt,

aus welchen Organismen Gcs-ORFs in der *P. pastoris*  $\Delta$ ugt51B1/ $\Delta$ gcs-Doppelmutante exprimiert wurde.

Tabelle 2.1: Verwendete Gcs-Expressionskonstrukte

Gcs-Spenderorganismus	Expressionsvektor
<i>Homo sapiens</i>	pPHs (Leipelt et al., 2001)
<i>Gossypium arboreum</i>	pPGa (Leipelt et al., 2001)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	pPCe
<i>Ustilago maydis</i>	pPUM
<i>Aspergillus nidulans</i>	pPAn
<i>Candida albicans</i>	pPCa (Leipelt et al., 2001)
<i>Pichia pastoris</i>	pPPp (Leipelt et al., 2001)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pPAt (Hölzl et al., 2005)

Zur Herstellung des Expressionsvektors pPCe wurde die Sequenz des Gcs-ORFs von *C. elegans* aus dem Vektor pYCe2 (Leipelt et al., 2001) mit den Restriktionsendonukleasen *PvuII* und *NotI* ausgeschnitten und in den mit *SnaBI* und *NotI* behandelten Vektor pPIC3.5 (Invitrogen) ligiert.

Zur Herstellung des Expressionsvektors pPUM wurde die Sequenz des Gcs-ORFs aus *U. maydis* mittels PCR mit genomischer DNA als Template amplifiziert. Durch Sequenzvergleiche mit bekannten pilzlichen Gcs-Sequenzen wurde in der *U. maydis*-Datenbank ([http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago\\_maydis/](http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/)) eine putative Gcs-Sequenz ermittelt. Das unbekannte Gen auf Contig 1.159 mit einer Länge von 1710 bp kodiert ein Polypeptid von 570 aa und enthält die Accession-Nummer XM\_402111. Als Primer wurden Um\_s und Um\_as verwendet. Das enthaltene PCR-Produkt wurde in den mit *SnaBI* restringierten und dephosphorylierten Vektor pPIC3.5 ligiert.

Zur Herstellung des Expressionsvektors pPAn wurde die Sequenz des Gcs-ORFs aus *A. nidulans* mittels PCR mit genomischer DNA als Template amplifiziert. Die durch Sequenzvergleiche mit anderen pilzlichen Gcs-Sequenzen aus der *A. nidulans*-

Datenbank (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>) erhaltene Gcs-Sequenz mit der Nummer CDS AN8806.2 hat eine Länge von 1854 bp und kodierte ein Polypeptid von 618 aa. Zur Expression des Gens wurde jedoch ein am N-terminalen Ende um 65 aa verkürztes Polypeptid verwendet (Erklärung s. 3.1.2). Die genomische DNA enthielt ein Intron. Mittels *Overlap*-PCR (s. 2.5.1) wurde aus den 2 Exons ein Fusionsprodukt amplifiziert (Primer: An\_s, An\_Exon1Üas, AnExon2Üs, An\_as). An den Enden des PCR-Fusionsfragments wurde 5' eine *EcoRI* und 3' eine *NotI* Restriktionsschnittstelle eingeführt. Das erhaltene PCR-Fragment wurde in den mit *EcoRI/NotI* restringierten Vektor pPIC 3.5 ligiert.

Nach Linearisierung der erhaltenen Expressionsvektoren mit *BglIII* (bzw. mit *NdeI* und *AatII* im Fall von pPAn) wurde die *Augt51B1/Agcs*-Doppelmutante mittels Elektroporation transformiert. Nach Durchführung eines Mut<sup>+</sup>/Mut<sup>S</sup>-Screenings wurden die sehr langsam wachsenden Mut<sup>S</sup>-Transformanten mittels Lipidanalytik überprüft. Hierfür wurde eine 50 ml-YPD-Kultur für 2 Tage bei 30°C und 200 upm geschüttelt; daraufhin wurden die Zellen für 24 h mit Methanol als einziger Kohlenstoffquelle weiter kultiviert, um den *AOX1*-Promoter zu induzieren. Wichtig dabei war, dass die Zellen gewaschen wurden und keine Glucosereste den *AOX1*-Promoter reprimierten. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der erhaltenen Lipide zeigte, ob die Gcs exprimiert wurden, so dass GlcCer gebildet wurden.

## 2.11 Arbeiten mit *Ustilago maydis*

Zellen von *U. maydis* wurden bei einer optimalen Temperatur von 28°C in Potatodextrose-Medium (PD, Difco) bzw. YEPS-Medium kultiviert. Die Flüssigkulturen wurden bei 200 upm geschüttelt.

### YEPS-Medium:

- 1 % Hefeextrakt
- 2 % Bacto Pepton
- 2 % Saccharose

### 2.11.1 Deletionskonstrukt zur Zerstörung des Glucosylceramid-Synthase-Gens in *U. maydis*

Zur Herstellung des *Agcs*-Gendeletionskonstrukts für *U. maydis* wurde eine Teilsequenz der *Gcs*-Sequenz aus genomischer DNA von *U. maydis* amplifiziert (Primer: Um\_F; Um\_R). Das PCR-Fragment wurde mit pUC18 (*Sma*I) ligiert und ergab „pUC UM GCS“. Mit *Bsa*AI wurden 135 bp aus der Mitte des ORFs in „pUC UM GCS“ eliminiert und das offene Plasmid mit der Hygromycin-Selektionskassette aus pBS-hhn (*Stu*I) ligiert. Das entstandene Deletionskonstrukt pUCUmKO enthält einen 5'-homologen Bereich von 704 bp und einen 3'-homologen Bereich von 785 bp zur *Gcs*-Sequenz aus *U. maydis*. Für die Transformation der *U. maydis*-Stämme FB1 bzw. FB2 wurde das Plasmid mit *Pvu*II linearisiert.

### 2.11.2 Transformation von *U. maydis*

Die Transformation von *U. maydis* wurde nach der Methode von Schulz et al. (1990) durchgeführt. Von einer auf Festmedium wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPS-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1/300 in 50 ml frischem YEPS-Medium verdünnt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von  $1-2 \times 10^7$  Zellen/ml (bis maximal  $OD_{600} = 1,0$ ) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugation (3200 upm, 10 min, 4°C, Eppendorf „5810R“) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2

ml SCS mit 12,5 mg/ml Novozym (NovoBiolabs) resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur erfolgende Protoplastierung konnte mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form annahmen. Nach vollständiger Protoplastierung (10-25 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10minütige Zentrifugation bei 2300 upm (4°C, Eppendorf „5810R“) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang noch dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten konnten 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden. Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1-5 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG (STC mit Zugabe von 40 % (w/w) PEG3350) folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz vorher mit Top-Agar überschichteten Potatodextrose-Hygromycin-Agarplatte ausgestrichen. Die Hygromycinkonzentration der Platten betrug 200 µg/ml. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf hygromycinhaltigen (200 µg/ml) PD-Platten vereinzelt.

**SCS-Puffer:**

20 mM Natriumcitrat  
1,0 M Sorbit, pH 5,8

**STC-Puffer:**

10 mM Tris/HCl (pH 7,5)  
1,0 M Sorbit  
100 mM CaCl<sub>2</sub>

**2.11.3 Test auf filamentöses Wachstum bei *U. maydis***

Der Test auf filamentöses Wachstum bei *U. maydis* wurde nach der Methode von Puhalla (1968) durchgeführt. Es wurden logarithmisch wachsende *U. maydis*-Kulturen in PD-Medium verwendet. 1-4 µl dieser Kulturen wurden auf PD-Aktivkohle-Platten (1 % Aktivkohle) getropft. Sollten Kreuzungen auf filamentöses Wachstum untersucht werden, wurde zuerst die optische Dichte der zu kreuzenden Kulturen bestimmt,

einander angeglichen und gleiche Volumina miteinander gemischt, bevor die Kulturen auf Aktivkohleplatten getropft wurden. Die Platten wurden bei 28°C inkubiert. Nach 24 - 48 h ist der *Fuz*<sup>+</sup>-Phänotyp filamentös wachsender Stämme gut zu erkennen und vom glatten *Fuz*<sup>-</sup>-Phänotyp nicht-filamentös wachsender Stämme klar zu unterscheiden.

#### **2.11.4 Test auf Pathogenität**

Der Test auf Pathogenität von *U. maydis* wurde nach der Methode von Gillissen et al. (1992) durchgeführt. Die *U. maydis*-Stämme wurden in Flüssigkultur über Nacht angezogenen und anschließend in A. dest. gewaschene Zellen wurden zur Inokulation von 14-15 Tage alten Maispflanzen (Varietät „Gaspar Flint“) benutzt. Die Maispflanzen wurden im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen (15 h bei 28°C, 9 h bei 10°C, 60 % Luftfeuchtigkeit und min. 20000 Lux) kultiviert.

#### **2.11.5 Mikroskopische Analyse von durch *U. maydis* induzierten Pflanzentumoren**

Von den durch Infektion mit *U. maydis* gebildeten Pflanzentumoren wurden in unterschiedlichen Wachstumsstadien mittels freihändiger Schnitte mit einer scharfen Rasierklinge Querschnitt- bzw. Quetschpräparate hergestellt. Die Pilzhypen konnten durch den Fluoreszenzfarbstoff „Fungi-Fluor<sup>®</sup>“ (Polyscience, Eppelheim) angefärbt werden, so dass sie bei einer Wellenlänge von 340-380 nm blau fluoreszierten. Die Präparate wurden mikroskopisch analysiert und fotografisch dokumentiert.

#### **2.11.6 Keimungsversuche mit *U. maydis*-Teliosporen**

Um die Keimfähigkeit der Teliosporen zu ermitteln, wurden die getrocknete Teliosporen oberflächensterilisiert und auf 0,2 % H<sub>2</sub>O-Agar gegeben. Die Sterilisierung erfolgte durch Resuspendierung der Teliosporen in gesättigter Tetracyclinlösung für 1 h mit zwischenzeitigem Durchmischen des Ansatzes. Daraufhin wurden die Sporen auf Objektträger mit 0,2 % H<sub>2</sub>O-Agar gegeben und für ca. 24 h inkubiert. Der Keimungszustand der Teliosporen konnte mikroskopisch ermittelt werden.

## 2.12 Arbeiten mit *Magnaporthe grisea*

*M. grisea* ist ein reispathogener Pilz. Die Arbeiten mit diesem Pilz werden in einem hierfür spezialisierten Labor in England bei N.J. Talbot durchgeführt.

### 2.12.1 Deletions- und Komplementationskonstrukte der Glucosylceramid-Synthase für *M. grisea*

Zur Herstellung des  $\Delta gcs$ -Gendeletionskonstrukts für *M. grisea* wurden die 5'-homologen und 3'-homologen Bereiche mittels PCR amplifiziert. Durch die PCR wurde dem 5'-homologen Fragment 5' eine *NotI*-Erkennungssequenz und 3' eine *MluI*-Erkennungssequenz zugefügt (Primer: Mg KO 5s; Mg KO 5as), dem 3'-homologen Fragment 5' eine *MluI*- und eine *BglII*-Erkennungssequenz (Primer: Mg KO 3s; Mg KO 3as). Beide Fragmente wurden mit dem mit *EcoRV* linearisierten und dephosphorylierten Vektor pBIKSII (Stratagene) ligiert, so dass pBIMg5' und pBIMg3' entstanden. Mittels *NotI* und *MluI* wurde der 5'-homologe Bereich in pBIMg3' (*NotI/MluI*) umklont und so pB15'/3' erhalten. Die zur Selektion dienende Hygromycin-Selektionskassette wurde mit dem Template pCB1004, 5' mit einer *MluI*-Erkennungsstelle und 3' mit einer *BglII*-Erkennungsstelle, amplifiziert (Primer: Hyg\_s; Hyg\_as). Das erhaltene PCR-Fragment wurde mit *MluI* und *BglII* restringiert und über *MluI* und *BglII* mit pB15'/3' ligiert. Das so entstandene  $\Delta gcs$ -Deletionskonstrukt für *M. grisea* pBIMgKO enthielt einen 5'-homologen Bereich von 1029 bp und einen 3'-homologen Bereich von 1028 bp zur Gcs-Sequenz aus *M. grisea*.

Zur späteren Komplementation der  $\Delta gcs$ -Mutante wurde ein Gcs-Komplementationskonstrukt für *M. grisea* hergestellt. Als Selektionsmarker wurde Sulfonylurea-Resistenz verwendet. Mit genomischer DNA als Template wurde ein ca. 3000 bp großes Gcs-Fragment amplifiziert, welches Promoter-, ORF- und Terminator-Sequenz beinhaltet (Primer: Mg\_s; Mg\_as). Dieses wurde mit dem mit *EcoRV* linearisierten und dephosphorylierten Vektor pCB1532 ligiert. So entstand das Gcs-Komplementationskonstrukt pCBMgGcs.

## 2.13 Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana*

Getrocknete Samen von *A. thaliana* L. (Varietät: Columbia 24) wurden auf Einheitserde ausgesät und nach 3 Wochen je 4 Keimlinge in einzelne Töpfe pikiert. Das Wachstum erfolgte in einer Klimakammer bei 23°C Tagestemperatur und einer Belichtungszeit von 8 h (Kurztag). Die Temperatur der Dunkelperiode betrug 18°C. Die Lichtstärke betrug  $55 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$  (Weißlicht, Philips TL, 65W/25).

### 2.13.1 Transformation elektrokompenter *A. tumefaciens*-Zellen

Die Transformation von Pflanzen erfolgte durch Übertragung der T-DNA der *A. tumefaciens*-Zellen, womit eine stabile Integration von DNA-Sequenzen ins pflanzliche Genom erreicht werden konnte.

*A. tumefaciens*-Zellen des Stammes ATHV C58C1, einem Derivat des Stammes EHA 101 (Hood et al., 1986; bereitgestellt von Dr. J. Dettendorfer, KWS, Einbeck) wurden auf festem Medium oder unter Schütteln bei 200 upm in flüssigem YEP-Medium mit Rifampicin (80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Endkonzentration) kultiviert.

Zur Herstellung elektrokompenter *A. tumefaciens*-Zellen des Stammes ATHV C58C1 wurde eine Hauptkultur (500 ml) bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5–0,7 kultiviert. Daraufhin erfolgte eine Inkubation auf Eis für 15 min. Die weitere Prozedur erfolgte bei 4°C. Die Zellen wurden bei 4000 x g für 15 min sedimentiert, das Pellet in 400 ml sterilem A. dest. resuspendiert und wiederum 15 min auf Eis inkubiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt, daraufhin wurde das Pellet in 0,75 ml sterilem Glycerol (10 %) aufgenommen, und Aliquots von 40  $\mu\text{l}$  wurden bei -70°C gelagert. Die Zellen konnten mit den entsprechenden Plasmiden folgendermaßen transformiert werden: 40  $\mu\text{l}$  elektrokompente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit ca. 100 ng (höchstens 5  $\mu\text{l}$ ) des Plasmids versetzt. Die Plasmid-Lösung musste völlig salzfrei sein. Nach Überführung in eine Elektroporationsküvette (2 mm, BioRad) wurde mittels des Elektroporators (Elektroporator Eppendorf 2510) ein Spannungspuls von 1,5 kV für maximal 4,0 ms gegeben. Die Küvette wurde sofort auf Eis gestellt und der Inhalt mit 2 ml YEB-Medium versetzt und nach 2 min in ein steriles Reagenzglas überführt. Daraufhin erfolgte die Inkubation der transformierten Agrobakterien unter starkem

Schütteln für 2 h bei 28°C und das Ausplattieren auf YEB-Agar. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde dem Nährmedium Kanamycin (50 µg/ml Endkonzentration) zugesetzt. Die Agrobakterien wuchsen in ca. 2 Tagen bei 28°C zu Kolonien heran. Zur Überprüfung der transgenen *A. tumefaciens*-Zellen wurde Kolonie-PCR durchgeführt.

**YEB-Medium:**

0,5 %	Trypton
0,5 %	Hefeextrakt
50 mM	NaCl
1,5 %	Micro-Agar für Platten

der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,8 eingestellt

**2.13.2 Transformation von *A. thaliana***

Die Transformation der Pflanzen erfolgte durch Infektion mit modifizierten *A. tumefaciens*-Zellen. Sie wurde nach einer veränderten „*Floral dip*“-Methode (Clough et al., 1998) durchgeführt. Hierbei werden die Inluoreszenzen der Pflanze in eine Lösung getaucht, die neben den *A. tumefaciens*-Zellen nur noch Sucrose und das Benetzungsmittel „Silwet L-77“ enthielten (Infiltrationsmedium). Für die Transformation wurden *A. tumefaciens*-Zellen, die das gewünschte Konstrukt enthielten, in 25 ml YEB-Medium mit Kanamycin (50 µg/ml Endkonzentration) bei 28°C über Nacht kultiviert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (5 min bei 2500 upm in der GS-15R Zentrifuge, Beckmann) und in 2 ml Infiltrationsmedium resuspendiert. Es wurden circa 4 Wochen alte Pflanzen verwendet. Diesen wurde der primäre Spross entfernt, um eine Ausbildung mehrerer sekundärer Sprosse zu erhalten und damit eine höhere Ausbeute an Samen. In die Pflanzenrossette wurde mit Hilfe eines Pinsels das Infiltrationsmedium mit *A. tumefaciens*-Zellen durch grobes Betupfen aufgetragen. Nach einer Woche wurde diese Prozedur an den gleichen Pflanzen wiederholt, jedoch ohne die Sprosse zu entfernen; hierbei wurden vor allem die Blütenstände betupft. Nach dem Betupfen wurden die Pflanzen für 2-3 Tage mit einer Haube bedeckt, um die lokale Luftfeuchtigkeit zu erhöhen. Die Pflanzen wurden bis zur Samenreife in der Klimakammer kultiviert.

**Infiltrationsmedium:**

5 % Sucrose

0,05 % Silwet L-77 (OSi Specialties, Inc., Danbury, CT, USA)

**2.13.3 Selektionierung potentiell transgener Samen**

Nachdem die transformierten Pflanzen Schoten ausgebildet hatten und diese vollständig ausgereift waren, wurden die Samen geerntet. Die Selektion transgener Pflanzen erfolgte nach Sterilisierung der Samen und Verteilen auf MS-Agarplatten, die mit Selektionsantibiotikum komplementiert (Hygromycin, 25 µg/ml Endkonzentration) waren.

Zur Sterilisierung wurden ca. 40 mg Samen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und zunächst für 1 min mit 98 % Ethanol und dann für 7 min in einer Lösung aus 6 % Hypochlorit und 0,4 % Triton X 100 inkubiert. Das Hypochlorit wurde durch Waschen mit sterilem A. dest. (mindestens 5x) entfernt. Die Aufbewahrung der sterilen Samen erfolgte für längstens eine Woche in sterilem A. dest. bei 4°C oder trocken auf sterilem Filterpapier (Whatmann, 3MM). Im trockenen Zustand war eine langfristige Lagerung der sterilen Samen bei 4°C möglich. Für die Kultivierung wurden die Petrischalen mit Klebeband (Micropore, 3M) verschlossen und in der Klimakammer inkubiert.

Die Hygromycin-resistenten, transgenen Pflanzen bildeten nach 2-3 Wochen eine lange Wurzel und chlorophyllhaltige Primärblätter aus. Nicht-resistente Pflanzen bildeten zwar Kotyledonen aus, waren aber nicht in der Lage, Wurzeln oder Primärblätter auszubilden. Transgene Pflanzen wurden möglichst unverletzt mit dem Agarblock ausgeschnitten, in feuchte Erde übertragen und mit Plastikfolie abgedeckt, um sie gegen Austrocknung zu schützen.

**MS-Agar:**4,4 g/l MS (Murashige und Skoog) Gamborg b<sub>5</sub>-Vitamine

0,5 g/l MES-Puffer pH 5,8

0,8 % Plant-Agar

#### 2.13.4 Konstrukt zur postranskriptionalen Gen-Regulierung der Glucosylceramid-Synthase aus *A.thaliana*

Das Konstrukt zur postranskriptionalen Gen-Inaktivierung der *GCS* von *A. thaliana* bestand aus einem 212 bp großem genomischen DNA-Fragment homolog zur Gcs-ORF-Sequenz (Exon), das einmal in *sense*- und *antisense*-Orientierung kloniert und durch eine Gen-eigene Intron-Sequenz getrennt wurde. Dieses Fusionskonstrukt wurde unter der Kontrolle des stark konstitutiven 35S-Promoters reguliert. Zunächst wurde die 212 bp Exon-Sequenz, amplifiziert mit den Primern 5'hp und Hp\_Exon, in *antisense*-Orientierung *SmaI* in den restringierten und dephosphorylierten p19-35S-Vektor eingefügt, resultierend in p19-35S-Exon\_as. In diesen Vektor wurde über *NaeI* die Exon-Intron-Sequenz, amplifiziert mit den Primern 5'hp und 3'hp, in *sense*-Orientierung kloniert. Das entstandene Promoter-Exon\_s-Intron-Exon\_as-Konstrukt p19-35S-EIE wurde *EcoRI/HindIII* in den restringierten binären Pflanzentransformationsvektor pCAMBIA2300 kloniert, resultieren in pCAMBIA-35S-EIE, um mit diesem *gcs-hairpin-antisense*-Konstrukt eine Transformation von *A. thaliana* durchzuführen.

#### 2.13.5 Promoter-Glucuronidase-Konstrukte zur Expressionsanalyse der Glucosylceramid-Synthase in *A. thaliana*

Zur Expressionsanalyse der Glucosylceramid-Synthase *in vivo* diente das  $\beta$ -Glucuronidase-Gen (GUS). Das Gen wurde unter Regulation des Gcs-Promoters in *A. thaliana* exprimiert. Durch Zugabe des Substrates X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronid) zum transgenen Pflanzenmaterial erfolgte die Bildung eines blauen, stabilen Farbstoffes (s. 2.13.6). Dadurch war es möglich zu zeigen, in welchem Gewebe bzw. Organ der Pflanze das Gen exprimiert wurde, da nach Zugabe des Substrates eine blaue Färbung auftrat. Zur Herstellung der Promoter-GUS-Konstrukte wurde der binäre Pflanzenvektor pCAMBIA1391Z (CAMBIA, Canberra, Australien) verwendet, da dieser die  $\beta$ -Glucuronidase-Sequenz enthielt. Anhand von Sequenzauswertungen wurde ein ca. 2000 bp und ein 1500 bp langer Promoter-Bereich ermittelt. Dabei handelte es sich um Bereiche, die 5' im Genom von *A. thaliana* vor

dem Gcs-ORF lagen und die für kein Gen kodierten. Diese zwei unterschiedlichen Promoterbereiche wurden mittels PCR mit genomischer DNA als Template amplifiziert (Primer: P1500\_s/P1500\_as; P2000\_s/P2000\_as). Die PCR-Fragmente wurden über TA-Klonierung mit dem Vektor pGEM-T (Promega) ligiert. Daraufhin erfolgte die Ligierung der unterschiedlich langen Promoter-Sequenzen über *PstI/NcoI* in pCAMBIA1391Z. Der *A. tumefaciens*-Stamm ATHV C58C1 wurde mit den so entstandenen binären Vektoren pCAMBIA\_P1500 und pCAMBIA\_P2000 mittels Elektroporation transformiert. Die transformierten *A. tumefaciens*-Stämme dienten zur Transformation von *A. thaliana* mit dem binären Vektor.

### 2.13.6 GUS-Färbung

Die GUS-Färbung erfolgte in Eppendorfreaktionsgefäßen. Diese wurden mit der X-Gluc-Färbelösung befüllt, und gesamte *A. thaliana*-Pflanzen oder Pflanzenteile wurden in die Lösung gegeben. Um ein Eindringen der Lösung in die Pflanze zu ermöglichen, wurde kurz ein Vakuum angelegt. Zusätzlich war es wichtig, dass die Pflanze komplett mit Lösung umgeben war. Daraufhin erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 4 h. Um die Pflanze zu fixieren, wurde die Färbelösung durch 3/1 Ethanol/Eisessig (v/v) ersetzt und bei 65°C inkubiert, bis die Pflanze nicht mehr grün war. Daraufhin wurde die GUS-gefärbte Pflanze in 70 % (v/v) Ethanol bei 4°C gelagert und fotografisch dokumentiert.

#### **X-Gluc-Färbepuffer:**

50 mM	Na-Phosphat-Puffer, pH 7
0,5 mM	K-Ferrocyanid
0,5 mM	K-Ferricyanid
10 mM	EDTA
0,1 %	Triton X-100

Die Lösung wurde steril filtriert und bei -20°C gelagert. Bei Gebrauch erfolgte die Zugabe von 100 mg X-Gluc in 1 ml DMF (Dimethylformamid) auf 200 ml.

### 2.13.7 Einbettung von GUS-gefärbten Pflanzenteilen

Die Einbettung von GUS-gefärbten Spross- und Blattsegmenten in LR (*London resin*)-White Kunstharz sowie die Herstellung ca. 5 µm dicker mikroskopischer Schnitte wurde von Frau I. Wachholz (AG Prof. Dr. H. Quarder, Universität Hamburg) nach dem Protokoll von Newman und Hobot (1987) durchgeführt.

## 2.14 Lipidanalytik

### 2.14.1 Isolierung von Gesamtlipiden

Das gesammelte Zellmaterial wurde in 0,45 % (w/v) NaCl aufgenommen und für 10 min im kochenden Wasserbad auf 100°C erhitzt, abzentrifugiert (4000 g, 5 min, RT), mit Chloroform/Methanol 1/1 (v/v) versetzt und für mindestens 4 h bei 8°C geschüttelt. Anschließend wurde der Extrakt zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Zellen wurden im 2. Extraktionsschritt für mindestens 12 h mit Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) geschüttelt und erneut abzentrifugiert. Die beiden Lipidextrakte wurden vereinigt, in einem Rotationsverdampfer getrocknet und in Chloroform/Methanol 2/1 (v/v) aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung mit 0,45 % (w/v) NaCl versetzt, so dass ein Verhältnis von 2/1/1 von Chloroform/Methanol/0,45 % NaCl gegeben war, und ausgeschüttelt. Die untere Lösungsmittelphase wurde über einen Wattefilter (gestopfte Pasteurpipette) zur Entfernung von Zellresten in ein neues Gefäß überführt. Der erhaltene Lipidextrakt wurde unter Argonstrom eingeengt und daraufhin in einem definierten Volumen Chloroform/Methanol 2/1 (v/v) (100-200 µl) aufgenommen. Die Lipide wurden dann einer dünnschichtchromatographischen Analyse unterzogen.

### 2.14.2 Dünnschichtchromatographie

Zur chromatographischen Auftrennung der Lipidgemische diente die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten (Kieselgel 60, Merck) mit einer Schichtdicke von 0,25 mm. Die zu untersuchenden Lipidgemische wurden strichförmig

auf die Startlinie der Platte (2 cm vom unteren Ende) mit Hilfe einer Mikroliterspritze (Hamilton) aufgetragen.

Als Laufmittelgemisch zur Trennung von Glycolipiden diente Chloroform/Methanol 85/15 (v/v). Die polareren Phospholipide blieben ungetrennt nahe des Starts und die unpolaren Neutrallipide liefen nahe der Laufmittelfront. Glycolipide trennten sich auf der Mitte der Kieselgelplatte.

#### **Sprühreagenzien:**

**ANS:** 0,2 % (w/v) Anilinnaphthalinsulfonsäure in Methanol (führt zur Fluoreszenz aller hydrophoben Komponenten unter UV-Licht (366 nm))

**$\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure:** 8 g  $\alpha$ -Naphthol in 250 ml Methanol

20 ml A. dest.

30 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> unter Rühren im Eisbad zugeben

Mit  $\alpha$ -Naphthol lassen sich Kohlenhydratstrukturen anhand ihrer blauen bis roten Färbung nachweisen. Die getrocknete DC-Platte wurde mit der  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure-Lösung angesprüht und daraufhin für 5-10 min bei ca. 150°C erhitzt.

### **2.14.3 Aufreinigen von Lipidkomponenten**

Kieselgelsäulen „Strata SI-2 Silica“ (Phenomenex) dienen zur Auftrennung der Gesamtlipide in Phospho-, Glyco- und Neutrallipide. Die Säulen wurden zunächst mit 100 % CHCl<sub>3</sub> equilibriert, daraufhin wurde der Gesamtlipidextrakt, aufgenommen in 100 % CHCl<sub>3</sub>, auf die Säule gegeben. Durch Zugabe von ca. 10 ml CHCl<sub>3</sub> wurden die Neutrallipide eluiert, anschließend erfolgte die Elution der Glycolipide durch Zugabe von ca. 10 ml Aceton/2-Propanol 9/1 (v/v). Die Phospholipide wurden dann mit ca. 10 ml Methanol eluiert. Die drei Eluate wurden unter Argonstrom eingeeengt und der dünnschichtchromatographischen Analyse auf Kieselgelplatten unterzogen.

### **2.14.4 Präparative Reinigung von Lipidkomponenten**

Größere Lipidmengen konnten nach Trennung in Phospho-, Glyco- und Neutrallipide mit einer Kieselgelsäule weiter mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie aufgetrennt werden. Hierfür wurden die Lipide auf der gesamten Breite der

Kieselgelplatte aufgetragen. Nach Entwicklung der Platte wurde diese mit ANS besprüht und unter UV-Licht die gewünschte Lipidbande mit einem Bleistift markiert. Diese Bande wurde mit Hilfe eines Spatels abgekratzt. Das isolierte Kieselgel wurde in Chloroform/Methanol 2/1 (v/v) aufgenommen und 5 min im Ultraschall-Wasserbad beschallt. Daraufhin wurde der Extrakt mit 0,75 Volumen 0,45 % NaCl (w/v) gewaschen und die lipidhaltige Unterphase durch einen Wattefilter überführt. Nach dem Entfernen der Lösungsmittel unter Argonstrom wurde das gereinigte Lipid in einem kleinen Volumen (ca. 100 µl) Chloroform/Methanol 2/1 (v/v) aufgenommen, und zur Überprüfung der Reinheit wurde ein Aliquot der Probe chromatographiert.

#### **2.14.5 Acetylierung von Lipiden**

Isolierte Glycolipide wurden für die NMR- (und MS)-Analyse acetyliert. Bei der Acetylierung werden alle freien Hydroxylgruppen der eingesetzten Substanz mit Essigsäureresten verestert. Der Reaktionsansatz muss wasserfrei sein, um eine Hydrolyse des acetylierenden Agens Essigsäureanhydrid zu verhindern. Die zu acetylierende Substanz wurde im Argonstrom bis zur Trocknung eingeengt und in 500 µl Pyridin gelöst. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 200 µl Essigsäureanhydrid. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Dunkeln. Anschließend wurden die Ansätze durch mehrmaliges Einengen am Rotationsverdampfer unter Zugabe von 2-Propanol von Pyridin- und Essigsäureanhydridresten befreit. Daraufhin wurde die Probe im Laufmittel 100 % Diethylether chromatographiert und das acetylierte Glycolipid aus dem Kieselgel extrahiert (s.2.14.4).

#### **2.14.6 Alkalische Hydrolyse von Lipiden mit Natrium-Methylat**

Um zu überprüfen, ob es sich bei einem Glycolipid um ein GlcCer handelte war, die alkalische Hydrolyse durch Natrium-Methylat ein Hinweis darauf, ob eine O-Esterbindung oder eine resistente Amidesterbindung vorliegt. Die O-Esterbindungen werden im Gegensatz zu den Amidesterbindungen, die bei Glucosylceramiden vorliegen, durch Natrium-Methylat alkalisch hydrolysiert. Hierfür wurde das zu untersuchende Lipid in 500 µl CHCl<sub>3</sub> und dem gleichen Volumen 0,5 M Natrium-

Methylat in Methanol aufgenommen und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit  $\text{CHCl}_3$  und 0,45 % (w/v) NaCl versetzt, so dass ein Verhältnis von 2/1/1 von Chloroform/Methanol/0,45 % NaCl gegeben war, und ausgeschüttelt. Die lipidhaltige Unterphase wurde durch einen Wattefilter überführt, unter Argonstrom eingengt und chromatographiert.

#### **2.14.7 NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie**

Die Identifizierung der isolierten Lipide erfolgte durch Prof. Dr. U. Zähringer und PD Dr. B. Lindner im Forschungszentrum Borstel mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie.

### **2.15 Enzymtest zur Bestimmung der Glucosylceramid-Synthase-Aktivität**

Zur Bestimmung der Gcs-Aktivität der in der *Augt51B1/Agcs*-Doppelmutante von *P. pastoris* exprimierten Gcs-ORFs erfolgte ein Enzymtest mit radioaktiv markierter UDP-[U- $^{14}\text{C}$ ]-Glucose. Hierfür wurden Zellen von *P. pastoris* in 50 ml YPD-Medium 2 Tage bei 30°C und 200 upm angezogen, gewaschen und daraufhin für 24 h mit Methanol induziert. Die induzierten Zellen wurden bei 4°C und 1500 upm abzentrifugiert und in 2 ml eiskaltem Enzymtestpuffer (pH 7,7) aufgenommen. Zusätzlich wurden dem Ansatz 300 mg Glaskügelchen beigefügt. Durch 5minütiges Vortexen und Behandlung mit dem Ultraschallstab erfolgte die Zerstörung der Zellen. Um die Zelltrümmer zu entfernen, wurde der Ansatz für 30 s bei 13000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 4°C und 100000 x g für 30 min zentrifugiert (Ultrazentrifuge „T-1075“, Kontron), um die Membranfraktionen zu erhalten, da die Gcs ein membrangebundenes Protein ist. Die Membranfraktion wurde in 200  $\mu\text{l}$  Enzymtestpuffer (pH 7,7) resuspendiert. Der Enzymtest wurde in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  durchgeführt: davon waren 30  $\mu\text{l}$  Proteinextrakt (0,5-1,0 mg Protein), 500000 dpm UDP-[U- $^{14}\text{C}$ ]-Glucose (spezifische Aktivität 10 GBq/mmol, finale Konzentration 8  $\mu\text{M}$ ) in 10  $\mu\text{l}$  und 60  $\mu\text{l}$  Enzymtestpuffer (pH 8,2). Der Ansatz wurde für 1 h bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 3 ml Chloroform/Methanol/0,45 % NaCl

(2/1/1) beendet. Im Anschluss wurde eine Lipidextraktion durchgeführt. Die erhaltenen Lipidextrakte wurden dünnschichtchromatographisch getrennt, und die Radioaktivität auf der Kieselgelplatte wurde durch „*radioscanning*“ mit dem BAS-1000 BioImaging Analyser (Raytest, Straubenhardt) detektiert.

**Enzymtestpuffer:**

100 mM                    Tris/HCl, pH 7,7 für 4°C bzw. pH 8,3 für 30°C

15 %                      Glycerin

Der Puffer wurde autoklaviert.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die weitere funktionale Charakterisierung der Glucosylceramid-Synthase aus Pflanzen und Pilzen. Die menschliche Gcs ist seit längerem Objekt der Forschung, da Glucosylceramide die Grundstruktur bei der Bildung von höher glycosylierten Sphingolipiden darstellen und sie bei einer Reihe von physiologischen Funktionen beteiligt sind.

Zunächst erfolgte die Herstellung einer glycolipidfreien Mutante von *P. pastoris*, die als Expressionssystem diente. In dieser Mutante wurde die heterologe Expression von *GCS*-Genen unterschiedlicher Organismen durchgeführt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Gcs-Enzymaktivität durch *in vitro*-Enzymtests mit radioaktiv markiertem Substrat.

Zur Analyse der physiologischen Funktion von Gcs-Enzymen erfolgte die Herstellung von *gcs*-Deletionsstämmen des phytopathogenen Pilzes *U. maydis* und Vorversuche zur Herstellung von *gcs*-Deletionsstämmen der Pflanze *A. thaliana* und des phytopathogenen Pilzes *M. grisea*.

Des Weiteren wurde eine Gcs-Promoter-Expressionsanalyse mit dem Reportergen  $\beta$ -Glucuronidase in der Pflanze *A. thaliana* durchgeführt, um die gewebespezifische Expression des *GCS*-Gens in dieser Pflanze zu ermitteln.

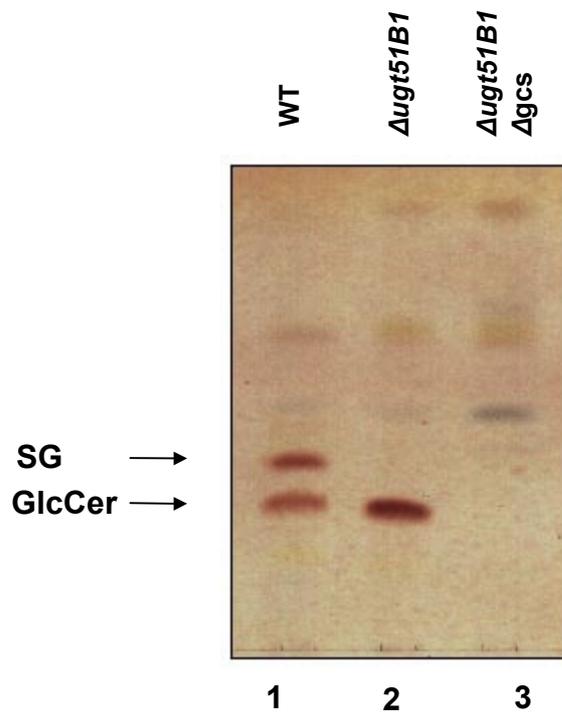
### **3.1 Funktionale Charakterisierung von Glucosylceramid-Synthasen aus Tieren, Pilzen, Pflanzen und Bakterien mittels heterologer Expression in *Pichia pastoris***

Als Expressionssystem für die verschiedenen *GCS*-Gene diente die methylotrophe Hefe *P. pastoris*. Diese Hefe synthetisiert sowohl GlcCer als auch SG in nachweisbaren Mengen (Sakaki et al., 2001). Die *Gcs*-ORFs aus *H. sapiens*, *G. arboreum*, *M. grisea*, *C. albicans* und *P. pastoris* wurden bereits in einer GlcCer-freien Mutante von *P. pastoris* exprimiert (Leipelt et al., 2001). Diese Mutante synthetisierte aber auch das Glycolipid SG. Um die Funktionalität der zu exprimierenden Gene detaillierter zu überprüfen, musste zunächst eine glycolipidfreie *P. pastoris*-Mutante erzeugt werden, die weder GlcCer noch SG synthetisiert. Dies stellte sicher, dass die nach der heterologen Expression gebildeten Glycolipide auf das exprimierte Gen zurückzuführen waren und es sich nicht um *P. pastoris*-eigene Glycolipide handelte. Die Herstellung dieses glycolipidfreien Stammes war wichtig, da das SG bei dünnenschichtchromatographischer Auftrennung von Lipidextrakten oberhalb des GlcCers lief und so die Aufreinigung der gebildeten GlcCer-Spezies erschwerte. Außerdem störte es bei der Funktionsanalyse der pflanzlichen *Gcs*, denn Lynch et al. (1999) postulierten, dass für dieses *Gcs*-Enzym SG als Glucosedonor zur Glycosylierung fungierte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das pflanzliche *GCS*-Gen in der GlcCer- und SG-freien Mutante von *P. pastoris* exprimiert. Durch Lipidanalysen der Transformanten konnten die GlcCer-Spezies, die durch die unterschiedlichen *Gcs*-Enzyme synthetisiert wurden, identifiziert werden.

Mit einem *in vitro*-Enzymtest der heterolog exprimierten Gene unter Verwendung von radioaktiv markierter UDP-[<sup>14</sup>C]-Glucose als Substrat konnte zusätzlich die Funktionalität der unterschiedlichen *Gcs* gezeigt werden.

### 3.1.1 Herstellung einer Glucosylceramid-Synthase- und Sterol-Glucosyltransferase-Doppeldeletionsmutante von *P. pastoris*

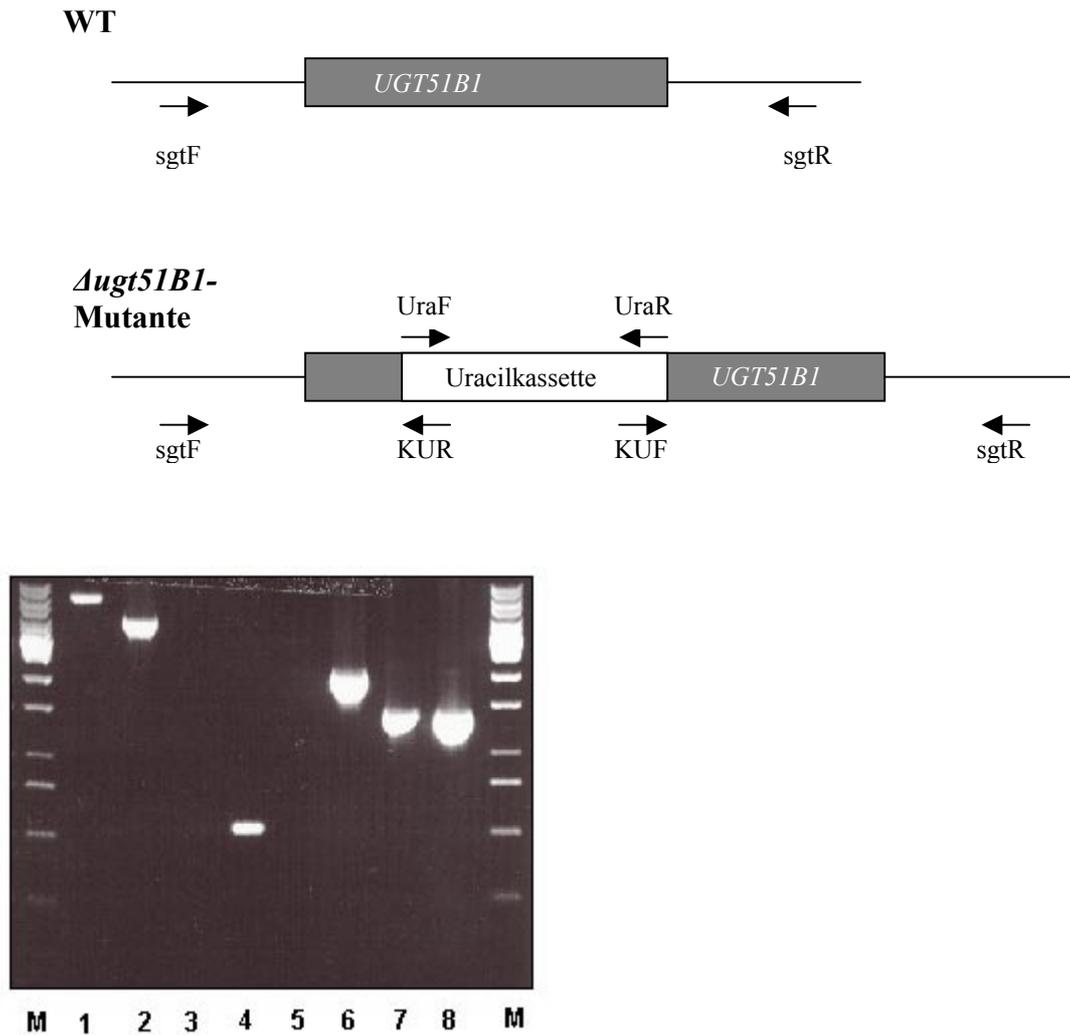
Zur Herstellung der Glucosylceramid-Synthase- und Sterol-Glucosyltransferase-Doppeldeletionsmutante von *P. pastoris* ( $\Deltaugt51B1/\Delta gcs$ -Doppelmutante) diente der Stamm JC308, da dieser Auxotrophien für Adenin, Arginin, Histidin und Uracil aufweist, und die dazugehörigen Expressionsvektoren mit den entsprechenden Selektionsmarkern zur Verfügung standen (Lin Cereghino et al., 2001). Zunächst erfolgte die Deletion der Sterol-Glucosyltransferase (*UGT51B1*, Warnecke et al., 1999). Die Herstellung des  $\Deltaugt51B1$ -Stammes von *P. pastoris* erfolgte durch Transformation des Stammes JC308 mit dem linearisierten Deletionsvektor pGURASGT (s. 2.10.4). Die enthaltene Uracil-Selektionskassette wurde von zwei zum *UGT51B1*-Gen homologen Bereichen flankiert, welche der homologen Rekombination mit der genomischen DNA von *P. pastoris* dienen. Positive Klone wuchsen unter selektivem Druck (ohne Uracil) auf Agarplatten und wurden durch Lipidanalytik identifiziert. Im erhaltenen  $\Deltaugt51B1$ -Stamm wurde daraufhin zusätzlich das *GCS*-Gen deletiert. Die Herstellung der  $\Deltaugt51B1/\Delta gcs$ -Doppelmutante erfolgte unter Verwendung des Deletionskonstrukts pML4 wie bei Leipelt et al. (2001) beschrieben. Lipidextrakte der  $\Deltaugt51B1$ -Mutante und der  $\Deltaugt51B1/\Delta gcs$ -Doppelmutante wurden dünnschichtchromatographisch getrennt (s. Abb. 3.1). Die Auftrennung zeigte, dass *P. pastoris* nach Deletion des *UGT51B1*-Gens kein SG mehr synthetisierte. Nach zusätzlicher Deletion der *GCS*-Gens wurde weder SG noch GlcCer synthetisiert. Dieser glycolipidfreie *P. pastoris*-Stamm diente zur heterologen Expression von Gcs-Sequenzen der unterschiedlichen Organismen (s. 3.1.3).



**Abbildung 3.1:** Dünnschichtchromatographische Auftrennung von *P. pastoris*-Glycolipidextrakten des WT JC308 (Spur 1), der  $\Deltaugt51B1$ -Mutante (Spur 2) und der  $\Deltaugt51B1/\Delta gcs$ -Doppelmutante (Spur 3).

Die Auftrennung erfolgte in Chloroform/Methanol 85/15 (v/v). Glycolipide wurden durch  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure und anschließendes Erhitzen detektiert. GlcCer: Glucosylceramid; SG: Sterolglucosid

Zur Überprüfung der jeweiligen Deletionsmutanten dienten spezifische PCR-Analysen, um die Integration der Selektionskassette in den zu deletierenden Genort zu überprüfen. Im Fall der  $\Deltaugt51B1$ -Deletion wurden die Primer sgtF und sgtR vom 5' und 3'-Ende außerhalb des offenen Leserahmens (ORF) abgeleitet. Zusätzlich wurden Primer verwendet, die die Uracilkassette amplifizieren (UraF und UraR) und solche, die ausgehend von der Selektionskassette, ins Genom amplifizieren (KUF und KUR). Mit unterschiedlichen Primerkombinationen konnte dann die Insertion der Selektionskassette nachgewiesen werden. Die Lokalisation der Primer ist in Abbildung 3.2 dargestellt.



**Abbildung 3.2:** PCR-Test zur Überprüfung der  $\Delta$ ugt51B1-Mutante von *P.pastoris*. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch getrennt und mit UV-Licht detektiert.

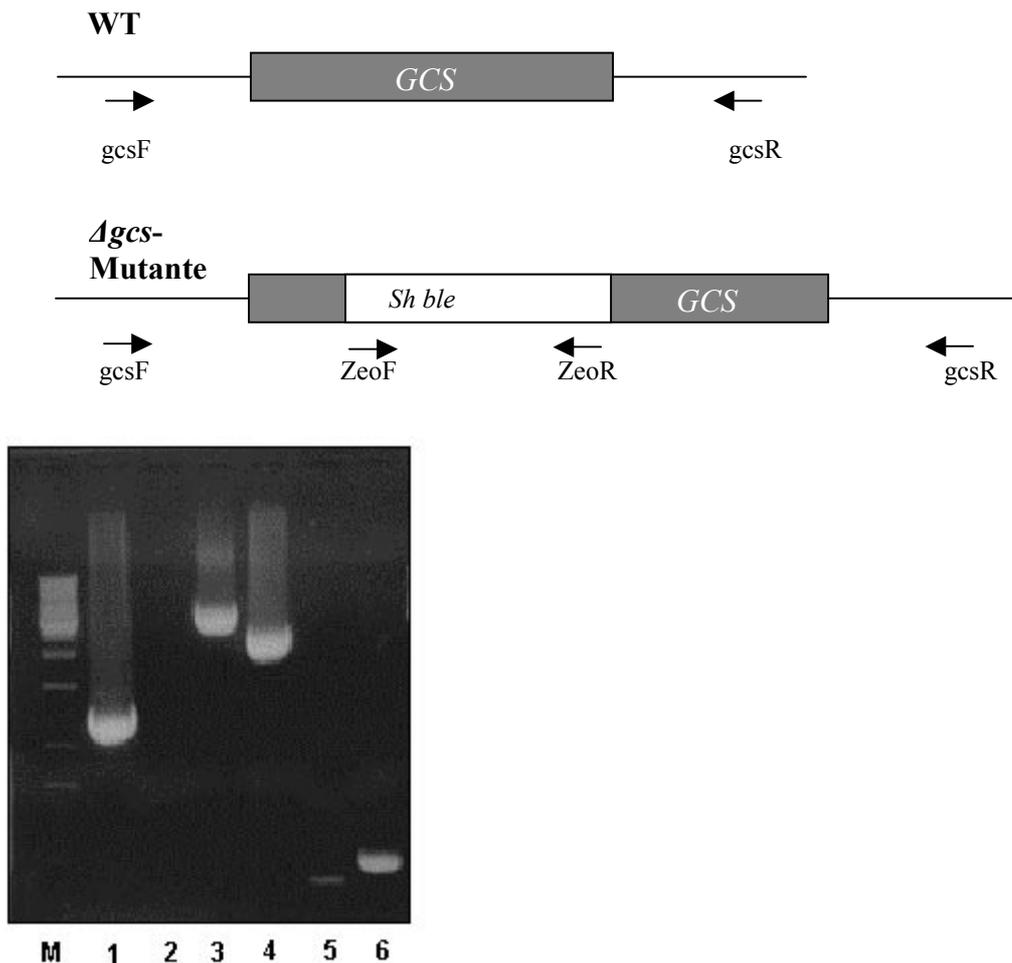
Spur 1: WT, sgtF und sgtR  
 Spur 2:  $\Delta$ ugt51B1, sgtF und sgtR  
 Spur 3: WT, sgt F und KUR  
 Spur 4:  $\Delta$ ugt51B1, sgtF und KUR  
 Spur 5: WT, KUF und sgtR  
 Spur 6:  $\Delta$ ugt51B1, KUF und sgtR  
 Spur 7: WT, UraF und UraR  
 Spur 8:  $\Delta$ ugt51B1, UraF und UraR  
 M : 1kb-DNA-Marker

Der PCR-Test zeigte, dass bei Amplifikation mit sgtF- und sgtR-Primern das genomische Fragment der  $\Delta$ ugt51B1-Mutante um 1458 bp kleiner war als das des Wildtyps. Das zeigte die Deletion des *UGT51B1*-Gens durch die Integration der

Uracilkassette nach homologer Rekombination an (s. Abb. 3.2, Spuren 1 und 2). Die PCR mit der Primerkombination KUR/sgtF bzw. KUF/sgtR zeigte, dass bei Vorhandensein der Uracilkassette im *UGT51B1*-Genort am 5'-Ende ein PCR-Produkt mit einer Größe von 775 bp und am 3' Ende ein Produkt mit einer Größe von 2386 bp entstand (s. Abb. 3.2, Spuren 4 und 6). Die PCR-Produkte konnten nur entstehen, da eine Integration der Uracilkassette in den *UGT51B1*-Genort erfolgte. PCR, durchgeführt mit den gleichen Primerkombinationen mit WT-DNA als Template, ergaben wie erwartet kein Produkt (s. Abb. 3.2, Spuren 3 und 5). In einem weiteren PCR-Experiment wurde die Uracilkassette unter Verwendung der Primer UraF und UraR nachgewiesen. Sowohl in der  $\Deltaugt51B1$ -Mutante als auch im WT konnte das Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase-Gen mit einer Größe von ca. 2,0 kb nachgewiesen werden. Der WT-Stamm JC308 zeigt eine Uracil-Auxotrophie, die durch Punktmutation erzeugt wurde (Lin Cereghino et al., 2001). Das Gen war dadurch nicht mehr funktionsfähig, aber die genomische DNA ist bis auf die Mutation unverändert und diente als Template zur Amplifikation. Es konnte durch die PCR-Analyse gezeigt werden, dass durch eine homologe Rekombination die Integration der Uracilkassette in den Genort des *UGT51B1*-Gens erfolgte.

Zur PCR-Analyse der  $\Deltaugt51B1/\Delta gcs$ -Doppelmutante aus *P. pastoris* wurden die Primer ZeoF und ZeoR zur Amplifikation des *Sh ble*-Gens, das zur Zeocinresistenz führte, abgeleitet. Zusätzlich wurden die Primer gcsF und gcsR vom 5' und 3'-Ende außerhalb des offenen Leserahmens abgeleitet (Abbildung 3.3 zeigt schematisch die Lage der Primer).

Im Fall der Deletion des *GCS*-Gens wurde mittels PCR nachgewiesen, dass mit DNA der Doppeldeletionsmutante im Gegensatz zum Wildtyp eine Amplifikation des *Sh ble*-Gens bei Verwendung des ZeoF/ZeoR-Primerpaares erfolgte (s. Abb. 3.3, Spuren 1 und 2). Des weiteren wurde der *Gcs*-Bereich mit dem Primerpaar gcsF/gcsR amplifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass das amplifizierte PCR-Fragment mit DNA der  $\Deltaugt51B1/\Delta gcs$ -Doppelmutante als Template um ca. 1,5 kb größer war als das PCR-Produkt bei Verwendung von WT-DNA (s. Abb. 3.3, Spuren 3 und 4). Das zeigte, dass eine Integration des *Sh ble*-Gens in das *GCS*-Gen erfolgte und somit das Gen zerstört wurde.



**Abbildung 3.3:** PCR-Test zur Überprüfung der  $\Delta ugt51B1/\Delta gcs$ -Doppelmutante von *P. pastoris*. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch getrennt und mit UV-Licht detektiert.

Spur 1:  $\Delta ugt51B1/\Delta gcs$ , *ZeoF* und *ZeoR*  
 Spur 2: WT, *ZeoF* und *ZeoR*  
 Spur 3:  $\Delta ugt51B1/\Delta gcs$ , *gcsF* und *gcsR*  
 Spur 4: WT, *gcsF* und *gcsR*  
 Spur 5: Kontrolle, *ZeoF* und *ZeoR*  
 Spur 6: Kontrolle, *gcsF* und *gcsR*  
 M : 1kb-DNA-Marker

Die  $\Delta ugt51B1/\Delta gcs$ -Doppelmutante von *P. pastoris* konnte ohne GlcCer und SG wachsen, sie war vital und zeigte keinen physiologischen Phänotyp, doch die Lipidanalyse der Zellen dieses Stammes zeigten, dass keine Glycolipide mehr synthetisiert wurden. Der Doppeldelentionsstamm wies ein verlangsamtes Wachstum auf, doch diese Wachstumsbeeinträchtigung konnte nicht auf die Deletion der beiden Gene zurückgeführt werden, denn der Ausgangsstamm JC308 wies durch die Mutation

des *ADEI*-Gens (dieses Gen kodiert für die PR-Aminoimidazolsuccinocarboxamid-Synthase) ein verlangsamtes Wachstum auf. Außerdem wies dieser Ausgangsstamm durch die Mutation des *ADEI*-Gens eine Rotfärbung der Kolonien auf (Lin Cereghino et al., 2001).

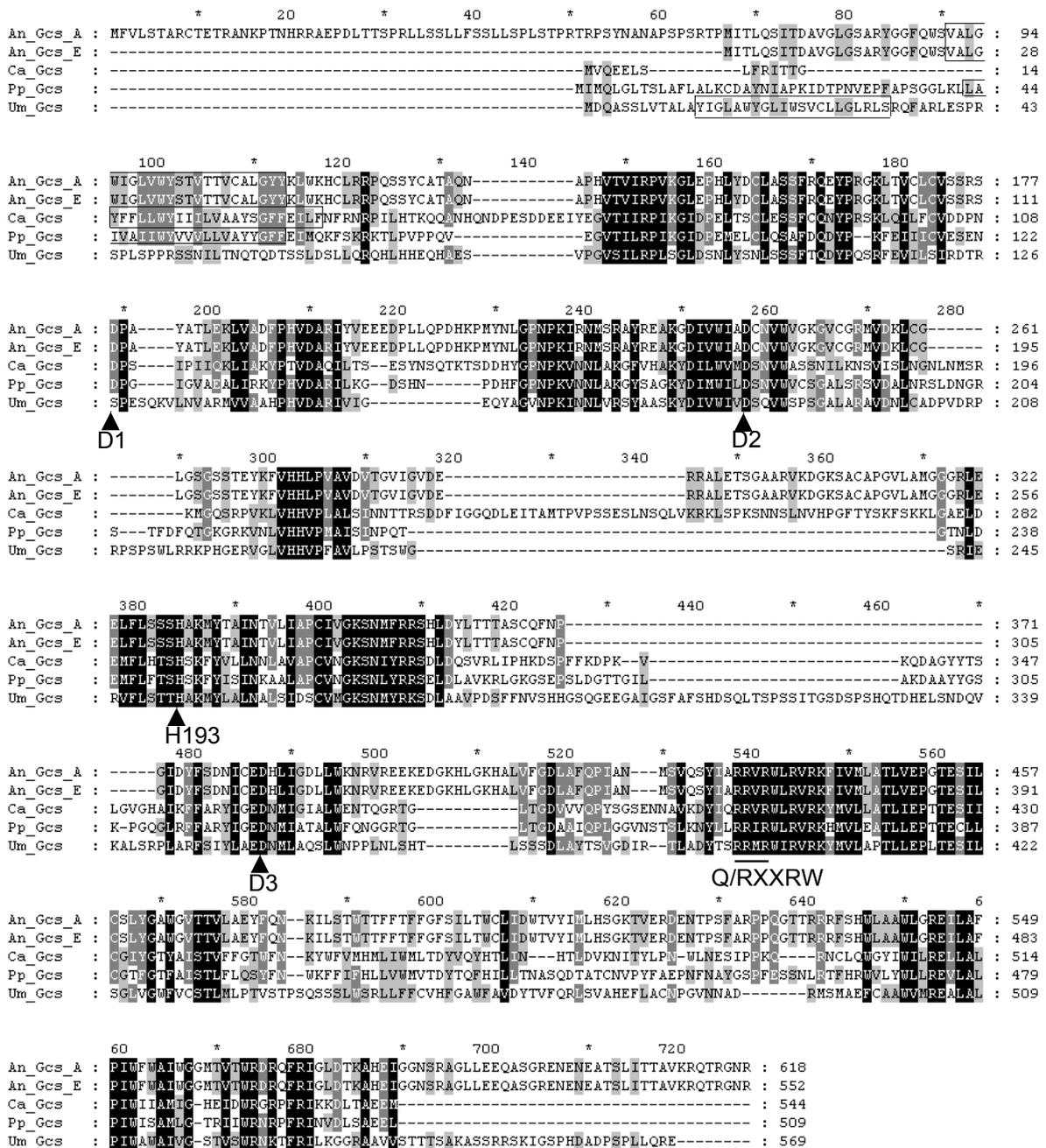
### 3.1.2 Klonierung der ORFs von Glucosylceramid-Synthase-Genen

Die Gcs-ORFs der Organismen *H. sapiens*, der Pflanze *G. arboreum*, dem Nematoden *C. elegans*, den Pilzen *U. maydis*, *A. nidulans*, *C. albicans* und *P. Pastoris* und dem Bakterium *A. tumefaciens* wurden in den Expressionsvektor pPIC3.5 (Invitrogen) ligiert, so dass die ORFs unter Kontrolle des starken und induzierbaren *AOXI*-Promoters exprimiert werden konnten. In Abschnitt 2.10.5 in Tabelle 2.1 sind die unterschiedlichen Gcs-Expressionskonstrukte zusammengestellt.

Die Gcs-ORFs der Organismen *H. sapiens*, *G. arboreum*, *C. elegans*, *C. albicans* und *P. pastoris* wurden von Leipelt et al. (2001) kloniert, der Gcs-ORF aus *A. tumefaciens* von Hölzl et al. (2005).

Die Gcs-Proteinsequenz aus *U. maydis* wurde mittels Sequenzhomologien zu anderen pilzlichen Gcs-Sequenzen ermittelt. Der Gcs-ORF von *U. maydis* hat eine Größe von 1710 bp und kodiert ein Protein von 570 aa. Die Accession-Nummer in der NCBI-Datenbank lautet XM\_402111 (s. 2.10.5).

Die Gcs-Proteinsequenz aus *A. nidulans* wurde ebenfalls mittels Sequenzhomologien ermittelt. Der erhaltene ORF mit einer Größe von 1659 bp kodiert für ein Protein von 553 aa. Dieser ORF wurde für die Expressionsversuche eingesetzt. In der *A. nidulans*-Datenbank wurde eine Gcs-mRNA-Sequenz mit einer Größe von 1854 bp vorausgesagt, welche für ein 618 aa-Protein kodiert (Accession-Nummer: XM\_412943). Diese nicht experimentell ermittelte Sequenz ist möglicherweise fehlerhaft, denn das Programm ermittelte wahrscheinlich nicht das korrekte Startmethionin. Nach der berechneten Sequenz würde das Gen schon nach 6 bp ein Intron aufweisen. Zudem enthält dieses Protein einen ca. 50 aa längeren N-Terminus als die übrigen untersuchten pilzlichen Gcs-Proteine. Üblicherweise ist gleich am Anfang des N-Terminus eine Transmembran-Region enthalten, diese findet sich bei dem in der Datenbank annotierten Gcs-Protein aber erst nach 90 aa. Die von mir exprimierte Gcs-Sequenz weist diese wie auch die anderen untersuchten Gcs-Proteine schon nach 13-42 aa auf (s. Abb. 3.4).



**Abbildung 3.4:** Protein-Alignment unterschiedlicher pilzlicher Gcs-Proteine aus *U. maydis* (Um\_Gcs), *P. pastoris* (Pp\_Gcs), *C. albicans* (Ca\_Gcs) und *A. nidulans* (An\_Gcs\_E und An\_Gcs\_A). Bei An\_Gcs\_E handelt es sich um das von mir exprimierte Gcs-Protein, An\_Gcs\_A stellt das in der Datenbank annotierte Protein dar. Die Pfeile und der Balken weisen auf die charakteristischen konservierten Aminosäuren der Glycosyltransferasefamilie 2 hin. Die Umrahmung zeigt die erste Transmembran-Domäne. Die Bestimmung der Transmembran-Domänen erfolgte mit dem Programm TMHMM ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)).

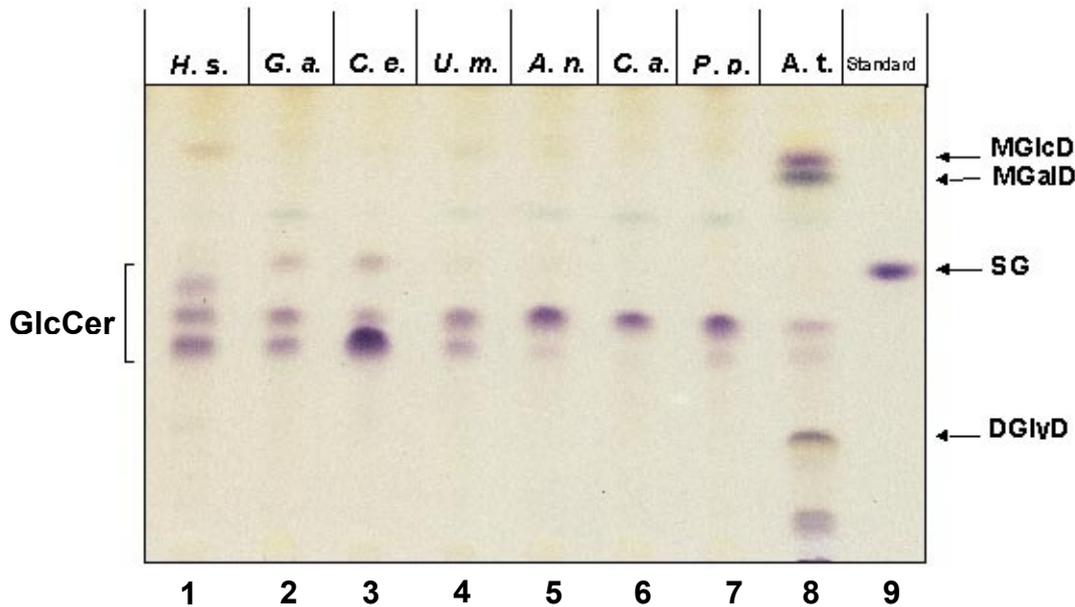
Alle identifizierten Gcs-Proteine gehören zur Familie 21 von Nukleosid-diphosphat-Zucker-Hexosyltransferasen (Campbell et al., 1997; Coutinho et al., 1999) (Carbohydrate-Active Enzyme Server, verfügbar unter <http://www.afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>).

Diese Familie enthält wenige, aber signifikante Ähnlichkeiten zur Glycosyltransferasefamilie 2. Diese werden als das D1-, D2-, D3-, Q/RXXRW-Motiv beschrieben (Marks et al., 2001; Leipelt et al., 2001, s. auch Alignment Abb. 3.4).

### ***3.1.3 Expression unterschiedlicher Glucosylceramid-Synthasen in der $\Delta$ ugt51B1/ $\Delta$ gcs-Doppelmutante von *P. pastoris****

Zur Analyse der GCS-Gene erfolgte die heterologe Expression der unterschiedlichen Gcs-ORFs in der glycolipidfreien Doppeldeletionsmutante von *P. pastoris*. Hierfür wurden die ORFs der unterschiedlichen Organismen mittels der hergestellten Expressionskonstrukte pPHs, pPGa, pPCe, pPUm, pPAn, pPCa, pPPp und pPAt (s. Tabelle 2.1) durch homologe Rekombination ins Genom von *P. pastoris* integriert. Nach Selektion auf His<sup>-</sup>-Minimalmedium und anschließender Durchführung eines Mut<sup>+</sup>/Mut<sup>S</sup>-Screenings (s. 2.10.2) wurden die sehr langsam wachsenden Mut<sup>S</sup>-Transformanten, bei denen die Integration des zu exprimierenden Gens in den *AOXI*-Genort erfolgte, mittels Lipidanalytik überprüft. Die Glycolipidfraktionen der Transformanten wurden im Laufmittel Chloroform/Methanol (85/15) (v/v) dünnschichtchromatographisch getrennt (s. Abb. 3.5).

Alle untersuchten Gcs-Proteine waren in der Lage, durch heterologe Expression GlcCer zu produzieren. Bei den gebildeten Glucosylceramiden handelte es sich um unterschiedliche Spezies, die in der Zusammensetzung der Sphingobase und der Fettsäure variierten.



**Abbildung 3.5:** Expression der Gcs-ORFs aus unterschiedlichen Organismen in der *Augt51B1/Δgcs*-Doppelmutante von *P. pastoris*.

Dargestellt ist die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Glycolipidextrakte aus den unterschiedlichen Expressionsmutanten von *P. pastoris* im Laufmittel Chloroform/Methanol (85/15) (v/v). Glycolipide wurden durch  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure und anschließendes Erhitzen detektiert.

Spur 1: pPHs (Gcs aus *H. sapiens*)  
 Spur 2: pPGa (Gcs aus *G. arboreum*)  
 Spur 3: pPCe (Gcs aus *C. elegans*)  
 Spur 4: pPUm (Gcs aus *U. maydis*)  
 Spur 5: pPAn (Gcs aus *A. nidulans*)  
 Spur 6: pPCa (Gcs aus *C. albicans*)  
 Spur 7: pPPp (Gcs aus *P. pastoris*)  
 Spur 8: pPAt (Gcs aus *A. tumefaciens*)

Spur 9: Standard: SG (Sterolglucosid isoliert aus *P. pastoris*)

GlcCer: Glucosylceramid; MGlcD: Monoglucosyldiacylglycerol; MgalD: Monogalactosyldiacylglycerol; DgLyD: Diglycosyldiacylglycerol

Das humane Gcs-Protein synthetisiert in der *Augt51B1/Δgcs*-Doppelmutante eine Reihe von verschiedenen GlcCer-Spezies, die nicht im Detail analysiert wurden, da davon ausgegangen wurde, dass es sich um die 10 verschiedenen GlcCer-Spezies handelte, die durch Leipelt et al. (2001) beschrieben wurden. Zusätzlich synthetisierte das humane

Gcs-Protein Monoglucosyldiacylglycerol (s. Abb. 3.5, Spur 1). Diese unspezifische Glycosylierung könnte mit der strukturellen Ähnlichkeit von Ceramid und 1,2-Diacyl-*sn*-glycerol in Verbindung stehen (Leipelt et al., 2001; Jorasch et al., 2000).

Das Gcs-Protein aus *G. arboreum* bildet hauptsächlich 3 unterschiedliche GlcCer-Spezies und zusätzlich SG (s. Abb. 3.5, Spur 2). Die mittels MS und NMR-Spektroskopie strukturell von Herrn Prof. Dr. U. Zähringer im Forschungszentrum Borstel analysierten GlcCer-Spezies sind in der Tabelle 3.1 zusammengefasst. Hauptsächlich wurden die GlcCer-Spezies GlcCer1 und GlcCer2 gebildet. GlcCer1 enthält die Sphingobase 4-Hydroxysphingamin und C<sub>2</sub>-hydroxylierte VLCFA mit 24 bzw. 26 Kohlenstoffatomen. GlcCer2 war ein Gemisch aus vielen unterschiedlichen GlcCer-Spezies, in denen die Sphingobase (4E,8E)-9-Methylsphinga-4,8-dienin und 2-Hydroxystearinsäure (18:0 (2-OH)- d18:2<sup>Δ4,8</sup> 9m) dominierte. GlcCer3 enthielt (4E,8E)-Sphinga-4,8-dienin und Stearinsäure (18:0- d18:2<sup>Δ4,8</sup>). Die Synthese von SG ist eine besondere Funktion des pflanzlichen Gcs-Proteins, da alle anderen untersuchten Gcs nicht zur SG-Synthese befähigt sind.

**Tabelle 3.1:** Glucosylceramid-Spezies aus der *Δugt51B1/Δgcs*-Doppelmutante von *P. pastoris*, die den Gcs-ORF aus *G. arboreum* heterolog exprimiert. GlcCer 1 und 2 stellen Gemische aus unterschiedlichen GlcCer-Spezies dar (Die Nummerierung erfolgte vom Start bis zur Lauffront der DC-Platte).

DC Bande	Molekulare Spezies	Systematischer Name
<b>GlcCer 1</b>	24:0 (2-OH)- t18:0	N-2'-Hydroxytetracosanoyl-1-O-β-D-glucopyranosyl-4-hydroxysphingamin
	26:0 (2-OH)- t18:0	N-2'-Hydroxyhexacosanoyl-1-O-β-D-glucopyranosyl-4-hydroxysphingamin
<b>GlcCer 2</b>	16:0 (2-OH)- d18:1 <sup>Δ4</sup>	N-2'-Hydroxypalmitoyl-1-O-β-D-glucopyranosyl-sphing-4-enin
	16:0 (2-OH)- d18:2 <sup>Δ4,8</sup>	N-2'-Hydroxypalmitoyl-1-O-β-D-glucopyranosyl-sphinga-4,8-dienin
	16:0 (2-OH)- d18:2 <sup>Δ4,8</sup> 9m	N-2'-Hydroxypalmitoyl-1-O-β-D-glucopyranosyl-9-methylsphinga-4,8-dienin
	18:0 (2-OH)- d18:1 <sup>Δ4</sup>	N-2'-Hydroxystearoyl-1-O-β-D-glucopyranosyl-sphing-4-enin
	18:0 (2-OH)- d18:2 <sup>Δ4,8</sup>	N-2'-Hydroxystearoyl-1-O-β-D-glucopyranosyl-sphinga-4,8-dienin
<b>GlcCer 3</b>	18:0 (2-OH)- d18:2 <sup>Δ4,8</sup> 9m	N-2'-Hydroxystearoyl-1-O-β-D-glucopyranosyl-9-methylsphinga-4,8-dienin
	18:0	N-2'-Stearoyl-1-O-β-D-glucopyranosyl-sphinga-4,8-dienin
	- d18:2 <sup>Δ4,8</sup>	

Das Gcs-Protein aus *C. elegans* synthetisierte 3 unterschiedliche GlcCer-Spezies, wobei es sich bei dem Glycolipid, das mit dem gleichen Rf-Wert wie SG läuft, nicht um SG handelt, sondern um GlcCer3 (s. Tabelle 3.1). Die Strukturanalyse dieses Lipids wurde von PD Dr. B. Lindner im Forschungszentrum Borstel durchgeführt.

Die heterologe Expression des Gcs-ORFs aus *U. maydis* zeigte die Synthese von zwei unterschiedlichen GlcCer-Spezies, die nur aufgrund ihres Laufverhaltens und im weiteren mittels radioaktiver Enzymtests analysiert wurden. Das gleiche galt auch für die bei der Expression der Gcs-ORFs aus *A. nidulans* und *C. albicans* gebildeten GlcCer-Spezies. Aufgrund der Rf-Werte der gebildeten Glycolipide handelte es sich wahrscheinlich um GlcCer 1 und 2 wie in Tabelle 3.1 beschrieben.

Das bestätigten auch die Untersuchungen von Leipelt et al. (2001), die zeigten, dass bei heterologer Expression des Gcs-ORFs aus *C. albicans* in der GlcCer-freien Mutante auch 2 GlcCer-Spezies gebildet wurden.

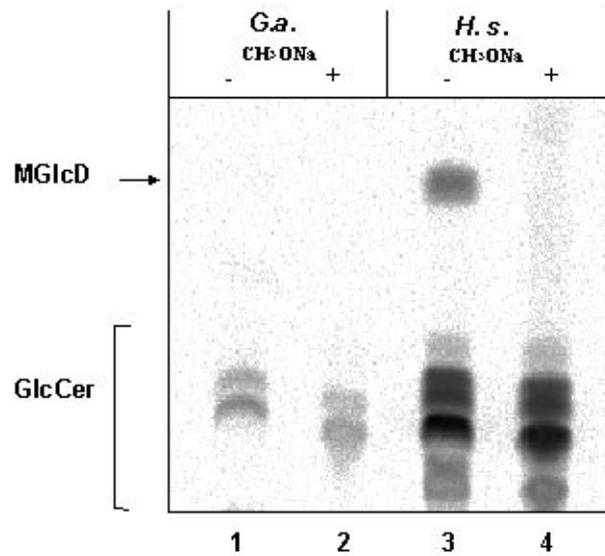
Die homologe Expression des *P. pastoris*-eigenen Gcs-ORFs in der *Augt51B1/Δgcs*-Doppelmutante führte zur Bildung von zwei unterschiedlichen GlcCer-Spezies. Sie enthielten zum einen 4-Hydroxysphingamin und VLCFA (24:0 (2-OH)-t18:0), typisch für Ceramide der phosphoinositolhaltigen Sphingolipide, und zum anderen hauptsächlich das für Glycosphingolipide aller Pilze übliche Ceramid aus (4E,8E)-9-Methylsphinga-4,8-dienin und 2-Hydroxystearinsäure (18:0 (2-OH)-d18:2<sup>Δ4,8,9m</sup>) (Leipelt et al., 2001). Die Gcs von *P. pastoris* synthetisierte unter nativen Bedingungen nur letztere GlcCer-Spezie. Bei homologer Expression in der *Augt51B1/Δgcs*-Doppelmutante erfolgte die zusätzliche Synthese von GlcCer mit 4-Hydroxysphingamin und VLCFA (VLCFA-Ceramid). Dieser Unterschied könnte darin begründet sein, dass durch die starke Expression des *GCS*-Gens durch die Regulation des *AOXI*-Promoters die Zellen mit Gcs-Proteinen „überflutet“ werden. Dadurch könnte die Aufnahmekapazität der Golgi/ER-Membran, der wahrscheinlich natürlichen Lokalisation *in vivo*, begrenzt sein. Somit würden Gcs-Proteine auch in andere Kompartemente der Zelle gelangen, wo sie die Möglichkeit hätten, auch VLCFA-Ceramide als Substrat zu nutzen. Die Bildung von GlcCer mit VLCFA-Ceramid tritt nach Expression aller untersuchten *GCS*-Gene der unterschiedlichen Organismen auf und erklärt die große Anzahl unterschiedlicher GlcCer-Spezies, die synthetisiert wurden.

Die Gcs aus dem Bakterium *A. tumefaciens* synthetisiert eine große Anzahl von Lipiden, nicht nur GlcCer, sondern auch Monoglucosyldiacylglycerol, Monogalactosyldiacylglycerol und Diglycosyldiacylglycerol (s. Abb. 3.5). Dies zeigte, wie unspezifisch die bakterielle Gcs sowohl Ceramid als auch 1,2-Diacyl-*sn*-glycerol glycosylierte. Die bakterielle Gcs nutzte im Unterschied zur humanen auch andere Zuckernukleotide wie UDP-Galactose, die sogar prozessiv an eine Glucose-Zuckerkopfgruppe angelagert wurde (Hölzl et al., 2005).

#### 3.1.4 Glucosylceramid-Synthase-Enzymtest mit radioaktiv markiertem Substrat

Bisher war es nur in wenigen Fällen möglich, die Enzymaktivität der pflanzlichen Gcs *in vitro* zu messen. Das liegt wahrscheinlich daran, dass es sich bei der Gcs um ein membrangebundenes Protein handelt, das zudem noch schwach exprimiert wird. Daher wurde in dieser Arbeit versucht die Enzymaktivität der Gcs aus Baumwolle nach heterologer Expression in der *Augt51B1/Δgcs*-Doppelmutante von *P. pastoris* zu messen. Der Enzymtest erfolgte unter Verwendung von Membranfraktionen der exprimierenden Hefe. Als Substrat diente UDP-[<sup>14</sup>C]-Glucose. Freies Ceramid wurde nicht gesondert hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 1 h wurden die Lipide extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Nicht markiertes GlcCer diente als Standard, um anhand des Rf-Wertes die erhaltenen Lipide zu identifizieren. Es zeigte sich, dass die pflanzliche Gcs *in vitro* mit UDP-[<sup>14</sup>C]-Glucose als Substrat GlcCer produzieren kann (s. Abb. 3.6, Spuren 1 und 2). Zur zusätzlichen Kontrolle der erhaltenen Produkte wurde eine alkalische Hydrolyse mit Natrium-Methylat durchgeführt (s. 2.14.6). Die Amidbindung sowie die glucosidische Bindung der GlcCer-Strukturen werden durch die alkalische Hydrolyse nicht zerstört. Die Esterbindungen von Glycoglycerolipiden wie z.B. Monoglucosyldiacylglycerol (MGlcD) werden jedoch hydrolysiert. Die Abbildung 3.6 zeigt, dass MGlcD, synthetisiert durch die humane Gcs, im Gegensatz zu GlcCer nach alkalischer Hydrolyse hydrolysiert wurde. Das war ein Hinweis darauf, dass es sich bei den gebildeten Lipiden der pflanzlichen Gcs um GlcCer handelte. Im Gegensatz zur Lipidanalyse nach heterologer Expression konnte bei dem *in vitro*-Enzymtest des pflanzlichen Gcs-Enzyms kein SG detektiert werden.

Die umgesetzte Radioaktivitätsmenge ist jedoch relativ gering. Von eingesetzten 100000 dpm wurden ca. 1000 dpm in GlcCer eingebaut. Trotz des stark exprimierenden *AOXI*-Promoters ist die Enzymaktivität relativ gering.



**Abbildung 3.6:** Dünnschichtchromatographische Auftrennung der lipophilen Produkte aus Enzymstests der Gcs-Proteine aus *H. sapiens* und *G. arboreum* exprimiert in der *Δugt51B1/Δgcs*-Doppelmutante von *P. pastoris*. Als Substrat diente UDP-[C<sup>14</sup>]-Glucose. Als Laufmittel diente Chloroform/Methanol 85/15 (v/v). Die Lipide wurden mit dem BAS-1000 BioImaging Analyser detektiert. Jeweils Aliquots der Reaktionsansätze wurden mittels CH<sub>3</sub>ONa alkalisch hydrolysiert. GlcCer: Glucosylceramid; MGlcD: Monoglucosyldiacylglycerol; SG: Sterolglucosid

Spur 1: *G. arboreum* - CH<sub>3</sub>ONa  
 Spur 2: *G. arboreum* + CH<sub>3</sub>ONa  
 Spur 3: *H. sapiens* - CH<sub>3</sub>ONa  
 Spur 4: *H. sapiens* + CH<sub>3</sub>ONa

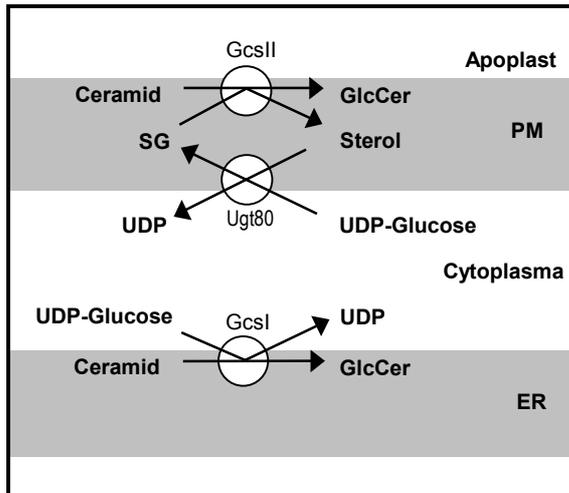
Der *in vitro*-Enzymtest zeigte, dass das pflanzliche Gcs-Enzym UDP-Glucose als Donor zur Glucosylierung verwendet. Das entsprach der Zuordnung der pflanzlichen Gcs zur Glycosyltransferase-Familie 21 (Leipelt et al., 2001; Campbell et al., 1997; Coutinho et al., 1999). Bei Lynch et al. (1997) wurde beschrieben, dass die Gcs bei *in vitro*-Enzymtests mit Mikrosomen der Bohne *Phaseolus vulgaris* SG als Donor zur

Glucosylierung von Ceramid verwendet. Diese SG-abhängige Gcs ist an der apoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert (Cantatore et al., 2000).

Das humane Gcs-Enzym ist an der cytosolischen Seite der Golgimembran lokalisiert (Marks et al., 1999; Futerman und Pagano, 1991). Experimente mit einem Gcs-GFP (*green fluorescent protein*)-Fusionsprotein der Gcs aus *G. arboreum* und dessen Expression in Zwiebelzellen zeigten eine Lokalisierung der pflanzlichen Gcs im ER (O. Kusmakow und E. Heinz, unveröffentlicht).

Möglicherweise handelt es sich bei den beiden beschriebenen pflanzlichen Glucosylceramid-Synthasen um verschiedene Enzyme. Im Genom von *A. thaliana* wurde nur eine Gcs-Sequenz gefunden, die hohe Ähnlichkeit zur Gcs-Sequenz aus *G. arboreum* aufweist. Die Sequenz der SG-abhängigen Gcs wurde bisher nicht beschrieben.

Abbildung 3.7 zeigt ein hypothetisches Modell, das die Lokalisierung der beiden unterschiedlichen Gcs-Enzyme und deren spezifische Zucker-Donatoren zur Glucosylierung von Ceramiden in Pflanzen darstellt. Durch die heterologe Expression des pflanzlichen *GCS*-Gens in der glycolipidfreien *Augt51B1/Δgcs*-Doppelmutante von *P. pastoris* war es möglich, einen Enzymtest dieses Gcs-Proteins *in vitro* durchzuführen. Dadurch wurden neue Erkenntnisse zur Funktion, nämlich zur Verwendung des Zucker-Donors ermittelt. Zusätzlich konnte die besondere Funktion der pflanzlichen Gcs bestimmt werden, auch freies Sterol zu glucosylieren (s. 3.1.3). Das gebildete SG könnte theoretisch auch als Glucose-Donor zur Glucosylierung von Ceramid zur Verfügung stehen, doch da die von Cantatore et al. (2001) postulierte GcsII an der apoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert ist, müsste das entstandene SG aber über einen Transportmechanismus zur apoplasmatischen Seite der Plasmamembran transportiert werden.



**Abbildung 3.7:** Hypothetisches Modell zur alternativen GlcCer-Bildung in Pflanzen. Die UDP-Glucose-abhängige Gcs ist möglicherweise auf der cytosolischen Seite im ER lokalisiert (GcsI). Des Weiteren wird eine SG-abhängige Gcs-Aktivität, die an der apoplastmatischen Seite der Plasmamembran (PM) lokalisiert ist, beschrieben (GcsII). Ugt80: UDP-Glucose: Sterol-Glucosyltransferase (Ullmann et al., 1993).

### 3.1.5 Glucosylceramid-Synthase-Enzymtest mit Verwendung eines Glucosylceramid-Synthase-Inhibitors

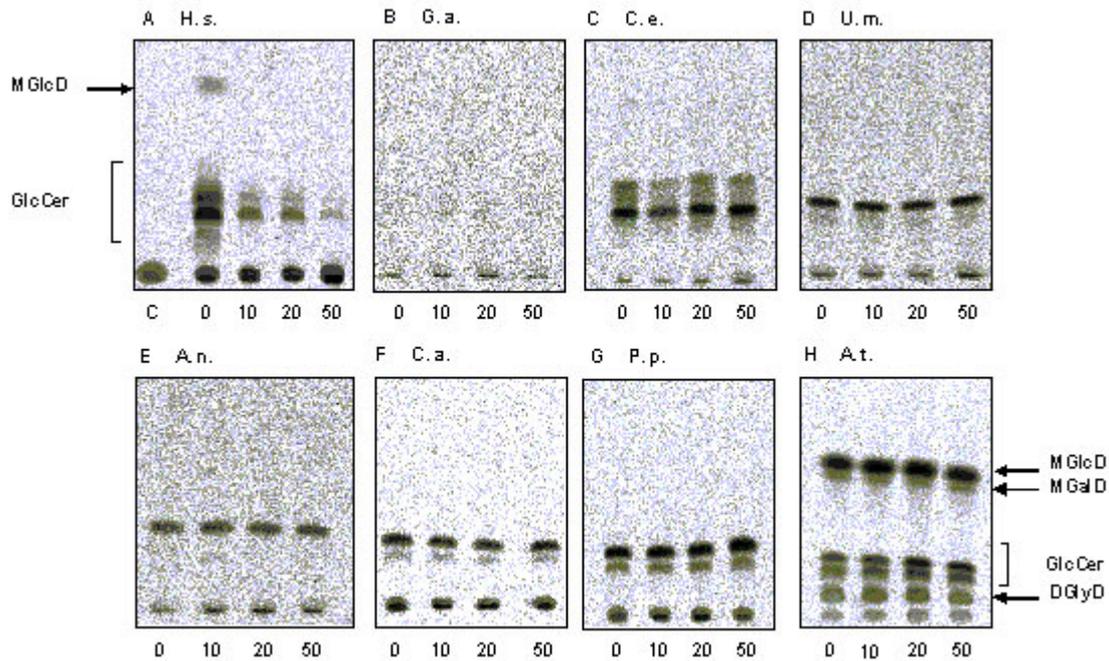
Der Gcs-Hemmstoff Ethylendioxy-P4 wurde mit Säuger-Zellkulturen auf seine Wirksamkeit hin untersucht (Lee et al., 1999). Die Anwendung säugerspezifischer Gcs-Hemmstoffe für nicht Säuger-Organismen (*Plasmodium falciparum*, *Aspergillus nidulans* und *Aspergillus fumigatus* sowie Insekten-Zell-Linien) wurde nur in wenigen Fällen beschrieben (Leverly et al., 2001; Couto et al., 2004; Slavish et al., 2004). Daher sollte in diesem Versuch die Wirkung des Gcs-Hemmstoffs auch auf die Gcs-Enzyme von anderen niederen Organismen ermittelt werden.

Dies erfolgte mit Hilfe des neu etablierten *in vitro*-Enzymtests. Der Enzymtest wurde wie in 2.15 beschrieben durchgeführt, jedoch zusätzlich mit unterschiedlichen Konzentrationen des Hemmstoffs Ethylendioxy-P4 versetzt. Da der Hemmstoff in 2-Propanol aufgenommen wurde, wurde eine Kontrollreaktion mit der gleichen Menge 2-Propanol versetzt, um unspezifische Effekte des Lösungsmittels auszuschließen.

Zunächst wurde der Enzymtest mit allen untersuchten Gcs-Enzymen aus den unterschiedlichen Organismen durchgeführt. In allen Fällen konnte gezeigt werden, dass die Gcs radioaktiv markiertes GlcCer synthetisiert.

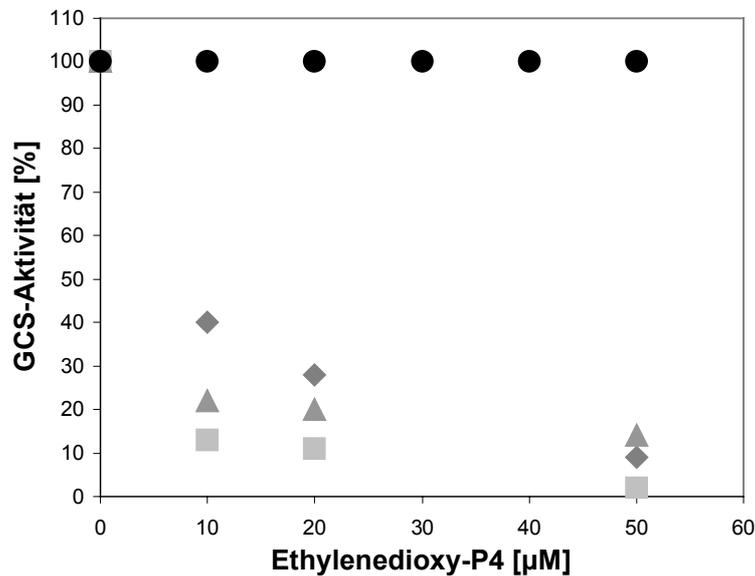
Durch Zugabe des Hemmstoffs Ethylendioxy-P4 in den unterschiedlichen Konzentrationen von 10, 20 und 50  $\mu\text{M}$  zeigte sich, dass das humane Gcs-Enzym gehemmt wurde, da mit zunehmender Hemmstoffkonzentration weniger GlcCer gebildet wurde (s. Abb. 3.8, Bild A und Abb. 3.9).

Alle anderen untersuchten Gcs-Enzyme zeigten keine Unterschiede in der Gcs-Aktivität. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis zeigten Levery et al. (2001), dass bei intakten Zellen des Pilzes *A. nidulans* durch Zugabe von Ethylendioxy-P4 das Wachstum der Hyphen stark gehemmt wurde. Der Hemmstoff beeinträchtigte wahrscheinlich nicht direkt das Gcs-Enzym, sondern möglicherweise ein anderes Target. Versuche, das filamentöse Wachstum der pathogenen Pilze *C. albicans* und *U. maydis* zu hemmen, zeigten, dass der Hemmstoff Ethylendioxy-P4 auch in hohen Konzentrationen (bis zu 1 mM) keinen Einfluss auf das Wachstum dieser Pilze hatte (A. Felk, persönliche Mitteilung). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der Hemmstoff die Gcs-Enzyme von *C. albicans* und *U. maydis* nicht beeinträchtigt. Möglicherweise aktivieren diese pilzlichen Zellen aber auch andere Mechanismen, wie z. B. ABC-Transporter, die den Hemmstoff aktiv aus der Zelle transportieren, so dass die entsprechenden Enzyme nicht gehemmt werden. Da filamentöses Wachstum des Pilzes *U. maydis in vitro* auf aktivkohlehaltigem Medium erfolgte, ist jedoch auch zu bedenken, dass es möglich wäre, dass die Aktivkohle den Hemmstoff adsorbiert und daher keine Hemmung des Hyphenwachstums erfolgte.



**Abbildung 3.8:** Dünnschichtchromatographische Auftrennung der lipophilen Produkte aus einem *in vitro*-Enzymtest der Gcs aus *H. sapiens* (A), *G. arboreum* (B), *C. elegans* (C), *U. maydis* (D), *A. nidulans* (E), *C. albicans* (F), *P. pastoris* (G) und *A. tumefaciens* (H) exprimiert in der  $\Deltaugt51B1/\Delta gcs$ -Doppelmutante von *P. pastoris*. Als Substrat diente radioaktiv markierte UDP-[ $C^{14}$ ]-Glucose. Als Laufmittel diente Chloroform/Methanol 85/15 (v/v). Die Lipide wurden mit dem BAS-1000 BioImaging Analyser detektiert. Die Enzymtests wurden jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen (10, 20 und 50  $\mu$ M) des Gcs-Hemmstoffs Ethylendioxy-P4 versetzt. MGlCD: Monoglucosyldiacylglycerol; MGalD: Monogalactosyldiacylglycerol; DglyD: Diglycosyldiacylglycerol GlcCer: Glucosylceramid

Der Gcs-Enzymtest mit Zugabe von Ethylendioxy-P4 wurde jeweils dreimal durchgeführt. Der ermittelte  $IC_{50}$ -Wert, der die Inhibitorkonzentration beschreibt, bei der der Inhibitor die Enzymaktivität um 50 % hemmt, lag für die Hemmung der humanen Gcs mit Ethylendioxy-P4 zwischen 5 und 10  $\mu$ M (s. Abb. 3.9). Lee et al. (1999) beschreiben einen  $IC_{50}$ -Wert von ca. 0,1  $\mu$ M. Diese Differenz ist möglicherweise auf die anderen Versuchsbedingungen bei dem von mir durchgeführten Enzymtest zurückzuführen.



**Abbildung 3.9:** Gcs-Aktivität nach Zugabe von Ethylenedioxy-P4. Die grauen eckigen Symbole zeigen die Aktivität der humanen Gcs (3 unterschiedliche Messungen). Die schwarzen runden Symbole zeigen die Aktivität der Gcs-Enzyme aus *G. arboreum*, *C. elegans*, *U. maydis*, *A. nidulans*, *C. albicans*, *P. pastoris* und *A. tumefaciens*.

Durch diesen Versuch konnte die Spezifität des Hemmstoffs Ethylenedioxy-P4 untersucht werden. Es wurde gezeigt, dass das humane Gcs-Enzym spezifisch gehemmt wird. Die Gcs-Aktivität der getesteten Enzyme der anderen Organismen (niederes Tier, Pflanze, Pilze und Bakterium) wurde durch die Hemmstoffzugabe nicht beeinflusst. Es wäre interessant einen Hemmstoff zu entwickeln, der nicht die humane Gcs, sondern spezifisch pilzliche Gcs-Enzyme hemmt, um so möglicherweise das Wachstum pathogener Pilze zu hemmen. Ein solcher Hemmstoff könnte therapeutisch als Fungizid Verwendung finden.

### **3.2 Versuche zur Herstellung einer Glucosylceramid-Synthase-Defektmutante der Pflanze *Arabidopsis thaliana***

Ein Ziel der Arbeit war die funktionale Charakterisierung des pflanzlichen *GCS*-Gens. Eine Deletion des Gens in *A. thaliana* sollten weitere Rückschlüsse auf die Funktion des Gens erbringen. Zur Herstellung der Gendeletion des *GCS*-Gens in *A. thaliana* wurden zwei Versuchsansätze in Angriff genommen.

Es wurde zunächst eine T-DNA-Insertionsbank (<http://signalsalk.edu>) mittels Sequenzvergleichen nach T-DNA-Insertionen im *GCS*-Gen durchsucht. Eine der gefundenen Mutanten enthielt zwar eine T-DNA-Insertion im *GCS*-Gen, diese befand sich jedoch am 3'-untranslatierten Bereich des Gens. Die heterozygoten T-DNA-Insertionsmutanten wurden rückgekreuzt, um homozygote Mutanten zu erhalten. Diese Mutanten waren aber in der Lage GlcCer zu synthetisieren und zeigten keinen erkennbaren Phänotyp.

Des weitern wurde ein *gcs-hairpin-antisense*-Konstrukt entwickelt (s. 2.13.4), um in *A. thaliana* die Expression des *GCS*-Gens posttranskriptional zu hemmen. Das binäre Pflanzentransformations-Konstrukt pCAMBIA-35S-EIE bestand aus einem ca. 200 bp großen Fragment, das homolog zur *Gcs*-ORF-Sequenz war, zusätzlich enthielt es ein geneingenes Intron. In *antisense*-Orientierung wurde das vorher beschriebene homologe Fragment an das Intron ligiert. Diese Fusions-Sequenz stand unter Kontrolle des konstitutiv exprimierenden 35S-Promoters. Nach Transformation von *A. tumefaciens* mit dem Konstrukt wurde *A. thaliana* mit diesen Bakterien transformiert und 20 erhaltene Transformanten analysiert. Lipidanalysen zeigten, dass die *gcs-hairpin-antisense*-Pflanzen weiterhin GlcCer produzierten. Mittels RT-PCR konnte auch die *Gcs*-mRNA nachgewiesen werden. Dies bedeutete, dass das *gcs-hairpin-antisense*-Konstrukt nicht zur Hemmung der Expression führte (Daten nicht gezeigt).

### 3.3 Herstellung einer Glucosylceramid-Synthase-Deletionsmutante des phytopathogenen Pilzes *Ustilago maydis*

Zur Ermittlung der physiologischen Funktion der Glucosylceramid-Synthase aus *U. maydis* wurde durch homologe Rekombination das *GCS*-Gen dieses Pilzes deletiert.

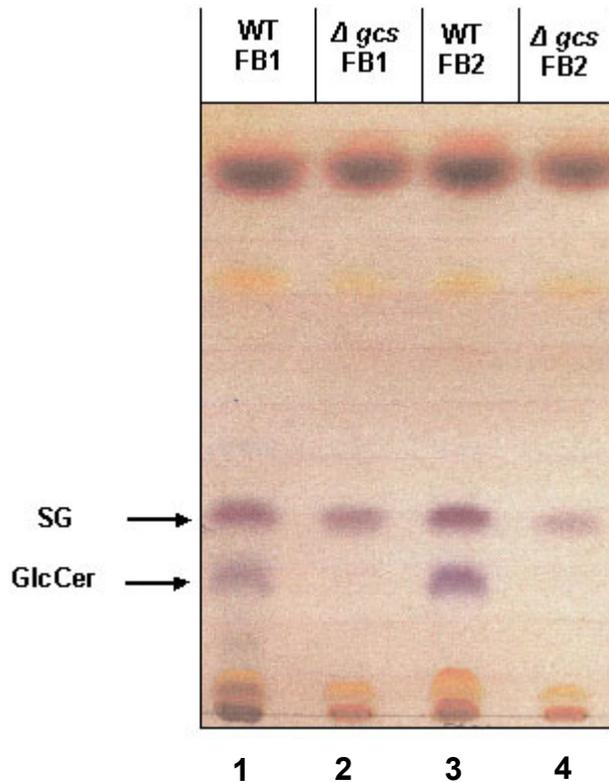
#### 3.3.1 Herstellung der Glucosylceramid-Synthase-Deletionsmutanten

Durch den Vergleich mit bereits bekannten pilzlichen *Gcs*-Sequenzen konnte eine ähnliche Sequenz in der *U. maydis*-Datenbank identifiziert werden (s. 2.10.5). Das entsprechende DNA-Fragment wurde durch funktionale Expression in der *Augt51b1/Δgcs*-Doppelmutante von *P. pastoris* und durch einen *Gcs*-Enzymtest mit radioaktiv markiertem Substrat analysiert. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass der exprimierte *Gcs*-ORF aus *U. maydis* für ein funktional aktives *Gcs*-Protein kodierte (s. 3.1.3 und 3.1.5).

Die Sequenzinformation ermöglichte die Herstellung eines *Δgcs*-Konstrukts, das zur Deletion von Teilsequenzen des ORF des *GCS*-Gens aus *U. maydis* diene. Das entstandene Konstrukt pUCUmKO ist in Abschnitt 2.11.1 beschrieben. Die Integration des *Δgcs*-Konstrukts erfolgte mittels homologer Rekombination, die zu einer stabilen Integration der Hygromycin-Selektionskassette in das *U. maydis*-Genom führte.

Nach der Transformation von Protoplasten (s. 2.11.2) der haploiden *U. maydis*-Stämme FB1 und FB2 mit dem Deletionskonstrukt pUCUmKO wurden die hygromycinresistenten *Δgcs*-Mutanten von *U. maydis* mittels Lipidanalytik identifiziert. Hierfür wurden aus den Zellen von 50 ml-Übernachtskulturen die Lipide mit Chloroform/Methanol 1/1 (v/v) extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (s. Abb. 3.10). In der Abbildung ist je eine der deletierten *Δgcs*-Mutanten der Stämme FB1 und FB2 dargestellt. Insgesamt konnten 4 unterschiedliche Mutanten des Stammes FB1 (*Δgcs*-FB1-1, *Δgcs*-FB1-2, *Δgcs*-FB1-3, *Δgcs*-FB1-4), und 2 unabhängige Mutanten des Stammes FB2 (*Δgcs*-FB2-1, *Δgcs*-FB2-2) identifiziert werden. Die *Δgcs*-Mutanten enthielten wie erwartet kein GlcCer, was darauf schließen

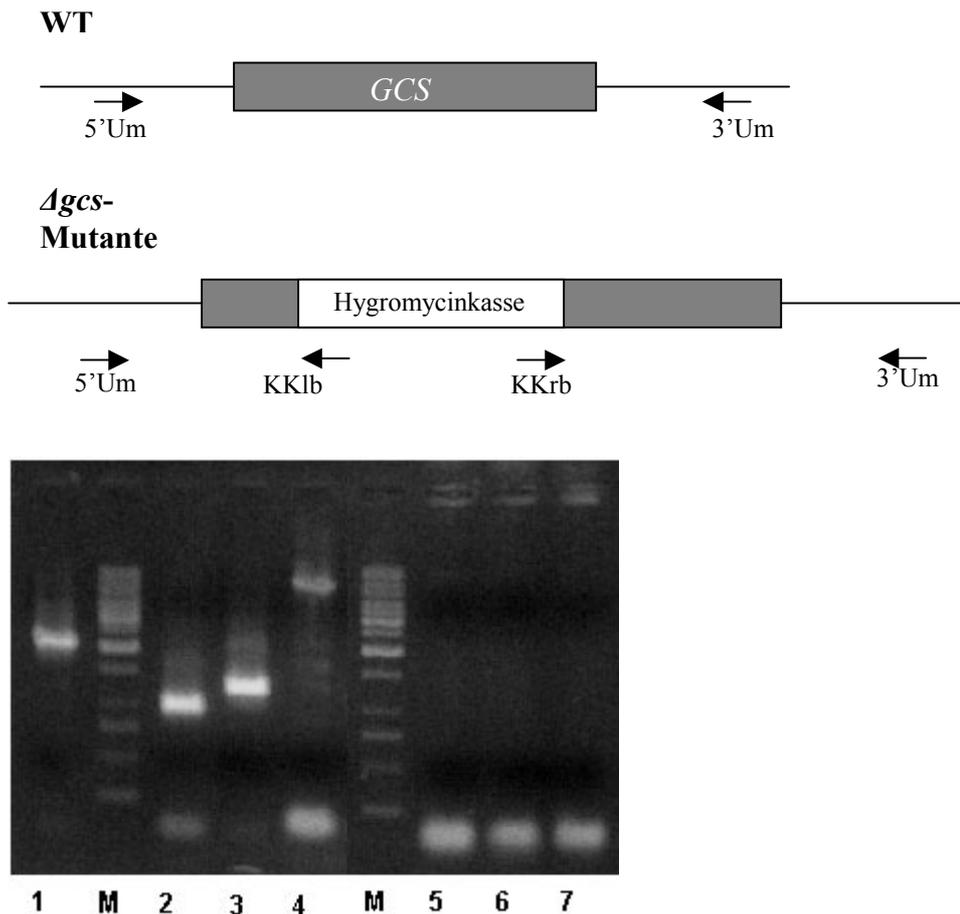
ließ, dass die Integration der Hygromycinkassette in den ORF des *GCS*-Gens stabil erfolgt war und ein Teil des ORFs deletiert wurde.



**Abbildung 3.10:** Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipidextrakte von *U. maydis* des WT FB1 (Spur 1), einer FB1- $\Delta gcs$ -Mutante ( $\Delta gcs$ -FB1-1, Spur 2), des WT FB2 (Spur 3) und einer FB2- $\Delta gcs$ -Mutante ( $\Delta gcs$ -FB2-1, Spur 4). Die Auftrennung erfolgte in Chloroform/Methanol 85/15 (v/v). Glycolipide wurden durch  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure und anschließendes Erhitzen detektiert. Die  $\Delta gcs$ -Mutanten synthetisieren kein Glucosylceramid (Spur 2 und 4). GlcCer: Glucosylceramid; SG: Sterolglucosid

Die Integration der Hygromycinkassette in den *GCS*-Genort von *U. maydis* wurde durch PCR überprüft. Dazu wurden Oligonukleotide verwendet (5'Um und 3'Um), die einen Teilbereich des *GCS*-Gens amplifizierten. Da bei den  $\Delta gcs$ -Mutanten die Hygromycinkassette ins *GCS*-Gen integriert wurde, musste beim PCR-Test mit Verwendung von DNA der  $\Delta gcs$ -Mutante ein PCR-Produkt resultieren, das um ca. 1749 bp größer ist als das entsprechende PCR-Produkt mit WT-DNA als Template. Der PCR-Test mit DNA der  $\Delta gcs$ -Mutante musste auch dann ein positives PCR-Ergebnis

aufweisen, wenn ein *Gcs*-genspezifischer (5'Um und 3'Um) mit einem Hygromycinkassetten-spezifischen Primer (KKlb und KKrb) kombiniert wurde. Es müsste bei der Primerkombinationen KKlb/5'Um ein 874 bp großes Fragment entstehen und bei der Kombination KKrb/3'Um ein 1123 bp großes PCR-Fragment. Die Lokalisation der für den PCR-Test verwendeten Primer ist in Abbildung 3.11 schematisch dargestellt.



**Abbildung 3.11:** PCR-Analyse der *Δgcs*-Mutante (*Δgcs*-FB1-1) von *U. maydis*. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch getrennt und mit UV-Licht detektiert.

Spur 1: WT FB1, 5'Um und 3'Um  
 Spur 2: *Δgcs*-FB1, KKrb und 3'Um  
 Spur 3: *Δgcs*-FB1, KKlb und 5'Um  
 Spur 4: *Δgcs*-FB1, 5'Um und 3'Um  
 Spur 5: Kontrolle, 5'Um und 3'Um  
 Spur 6: Kontrolle, KKlb und 5'Um  
 Spur 7: Kontrolle, KKrb und 3'Um  
 M : 1kb-Leiter DNA-Marker

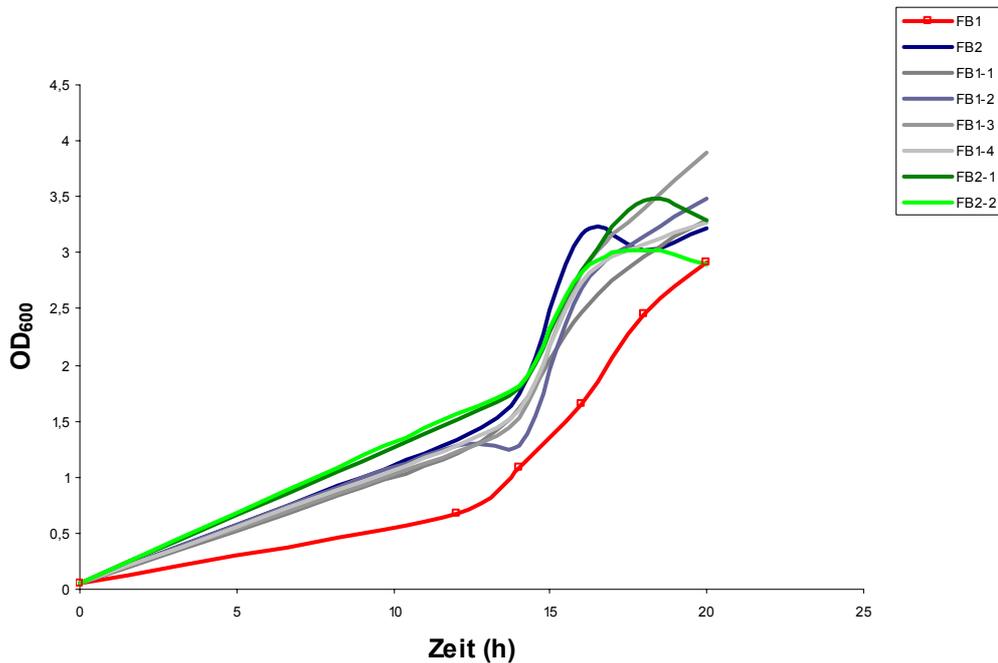
Das PCR-Produkt war bei Verwendung der Primerkombination 5'Um und 3'Um mit genomischer DNA des *Δgcs*-Stammes um 1749 bp größer als bei der Reaktion mit WT-DNA (s. Abb. 3.11, Spuren 1 und 4). Da zusätzlich mit den Primerkombinationen KKlb/5'Um und KKrb/3'Um mit DNA der *Δgcs*-Mutante ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe entstehen konnte (s. Abb. 3.11, Spuren 2 und 3), kann gefolgert werden, dass eine rekombinante Integration in den *GCS*-Genort von *U. maydis* erfolgte. Der PCR-Test mit den Primerkombinationen KKlb/5'Um und KKrb/3' mit WT-DNA als Template führte wie erwartet zu keinem PCR-Produkt (nicht dargestellt). Die Kontroll-PCR-Tests wurden auch für alle übrigen *Δgcs*-Mutanten der Stämme FB1 und FB2 durchgeführt. Das Ergebnis war identisch zu dem in Abbildung 3.11 dargestellten des *Δgcs*-FB1 Stammes.

Der PCR-Test bewies, dass durch homologe Rekombination eine stabile Integration der Hygromycinkassette in den *GCS*-Genort von *U. maydis* erfolgte. Dies entsprach den Ergebnissen der Lipidanalysen der *Δgcs*-Mutanten von *U. maydis*, die alle kein GlcCer mehr synthetisierten.

### **3.3.2 Wachstumsverhalten der Glucosylceramid-Synthase-Deletionsmutanten von *U. maydis***

Zur weiteren Analyse der *Δgcs*-Mutanten von *U. maydis* erfolgten Wachstumsversuche, um deren Vitalität zu überprüfen.

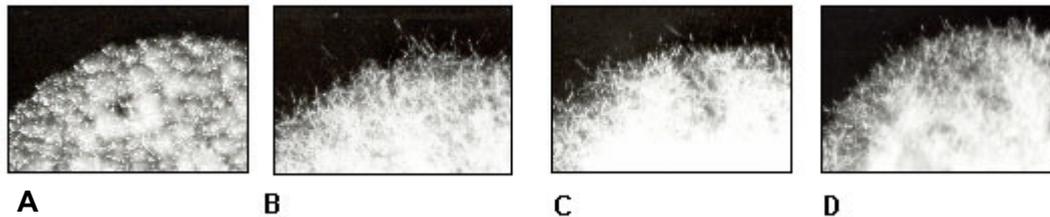
Die *Δgcs*-Mutanten von *U. maydis* sind lebensfähig. Die Herstellung der Mutanten zeigte, dass das *GCS*-Gen und die GlcCer-Produktion nicht essentiell für haploide Zellen von *U. maydis* ist. Ein Wachstumsversuch mit den unterschiedlichen *Δgcs*-Mutanten zeigte keine signifikanten Unterschiede zum Wachstum der WT-Stämme FB1 und FB2 (s. Abb. 3.12). Das verlangsamte Wachstum des WT-Stammes FB1 ist durch Verklumpung der Einzelzellen dieses Stammes zu erklären. Daher war es schwierig die optische Dichte zu bestimmen.



**Abbildung 3.12:** Wachstumsverhalten unterschiedlicher Kulturen von *U. maydis*. WT FB1 (rot), WT FB2 (blau),  $\Delta gcs$ -Mutanten  $\Delta gcs$ -FB1-1– $\Delta gcs$ -FB1-4 (verschiedene Graustufen) und  $\Delta gcs$ -Mutanten  $\Delta gcs$ -FB2-1 und  $\Delta gcs$ -FB2-2 (hell- und dunkelgrün).

Daraufhin wurde getestet, ob die  $\Delta gcs$ -Mutanten in der Lage sind, filamentös zu wachsen. Dikaryotische Zellen von *U. maydis* können *in vitro* auf aktivkohlehaltigem Medium filamentöses Wachstum vollziehen (s. 2.11.3). Es wurden 1–4  $\mu$ l einer logarithmisch wachsenden Kultur (in PD-Medium) auf PD-Aktivkohle-Platten getropft und dabei je zwei komplementäre haploide Stämme vereinigt. Die Platten wurden bei 28°C inkubiert. Nach 24–48 h war der *Fuz*<sup>+</sup>-Phänotyp filamentös wachsender, dikaryotischer Stämme gut zu erkennen und vom glatten *Fuz*<sup>-</sup>-Phänotyp nicht filamentös wachsender Stämme klar zu unterscheiden. Abbildung 3.13 (Bild C und D) zeigt, dass die  $\Delta gcs$ -Mutanten filamentös wuchsen, wobei das filamentöse Wachstum der  $\Delta gcs$ -Mutanten etwas schwächer ausgeprägt war (s. Abb. 3.13, D).

Durch die Deletion des *GCS*-Gens und die dadurch fehlende GlcCer-Synthese haben die  $\Delta gcs$ -Stämme die Fähigkeit zu filamentösem Wachstum nicht verloren.



**Abbildung 3.13** Test auf filamentöses Wachstum unterschiedlicher Stämme von *U. maydis*. Der haploide Stamm zeigte kein filamentöses Wachstum (Bild A). Die untersuchten dikaryoten Stämme wiesen filamentöses Wachstum auf. Das filamentöse Wachstum des dikaryoten  $\Delta gcs$ -Stammes war etwas schwächer ausgeprägt (Bild D).

A: WT haploid (FB1)		<i>Fuz</i> <sup>-</sup> -Phänotyp
B: WT FB1	WT FB2	<i>Fuz</i> <sup>+</sup> -Phänotyp
C: WT FB1	$\Delta gcs$ -FB2-1	<i>Fuz</i> <sup>+</sup> -Phänotyp
D: $\Delta gcs$ -FB1-2	$\Delta gcs$ -FB2-1	<i>Fuz</i> <sup>+</sup> -Phänotyp

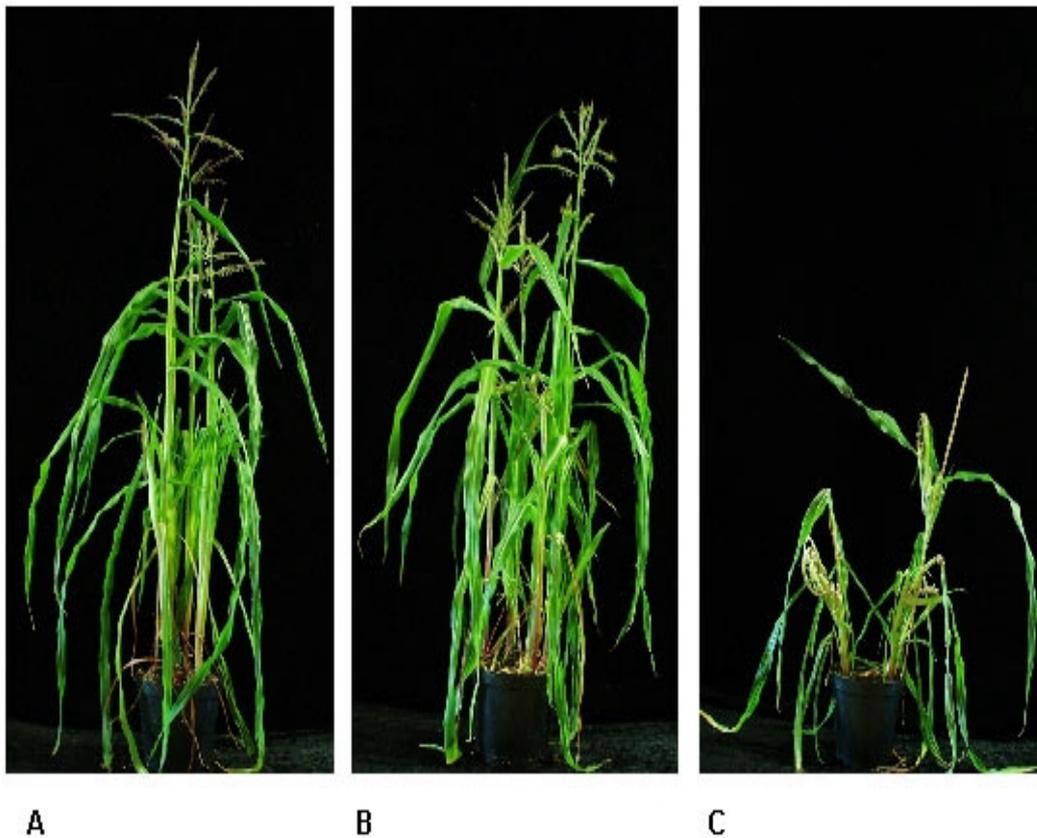
### 3.3.3 Infektion von *Zea mays*-Pflanzen mit der Glucosylceramid-Synthase-Deletionsmutante von *U. maydis*

Um die physiologische Funktion der  $\Delta gcs$ -Mutanten von *U. maydis* zu überprüfen, sollte untersucht werden, ob die Mutanten pathogen sind und einen vollständigen Entwicklungszyklus durchführen können. Hierfür wurden Infektionsversuche mit Maispflanzen durchgeführt. Diese erfolgten zum Teil in den Gewächshäusern von BayerCropScience (Monheim) in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. P. Schreier und Dr. R. Sülmann. Hierfür wurden Übernacht-Flüssigkulturen der unterschiedlichen Stämme von *U. maydis* verwendet. Diese wurden in Aqua dest. gewaschen und jeweils zwei komplementäre Stämme im Reagenzglas vereinigt. Mit diesen Mischungen erfolgte die Infektion der Maispflanzen (s. 2.11.4).

Während bei der Infektion mit dem Wildtyp von *U. maydis* (FB1/FB2) alle infizierten Pflanzen nach 10 Tagen große Tumore aufwiesen (19 von 19 Pflanzen), waren 50 % der mit der  $\Delta gcs$ -Mutante ( $\Delta gcs$ -FB1-2/ $\Delta gcs$ -FB2-1) infizierten Pflanzen symptomfrei (29 von 58 Pflanzen). Die  $\Delta gcs$ -Mutante war also zu 50 % weniger infektiös.

In einem zweiten Infektionsversuch wurde der Verlauf der Tumorentwicklung untersucht.

Die mit dem WT von *U. maydis* (FB1/FB2) befallenen Pflanzen zeigten eine starke Beeinträchtigung des Wachstums, wobei insbesondere die Blütenentwicklung betroffen war (Abb. 3.14, Bild C und 3.15 unten). Tumore befanden sich an Blättern und an den Blüten. Nach ca. 10 Tagen ließen sich melanisierte Teliosporen in den Tumoren nachweisen. Anschließend trocknete das Tumorgewebe aus, und die Teliosporen wurden aus dem trocknenden Material freigesetzt (s. Abb. 3.16). Im Gegensatz dazu wuchsen die mit der  $\Delta gcs$ -Mutante von *U. maydis* ( $\Delta gcs$ -FB1-2/ $\Delta gcs$ -FB2-1) infizierten Pflanzen deutlich besser (vergleichbar mit nicht infizierten Pflanzen) und waren in der Lage, männliche und weibliche Blüten zu bilden (s. Abb. 3.14 B und Abb. 3.15 oben). Die Tumore waren kleiner als die an Wildtyp-infizierten Pflanzen und waren auf männliche Blüten beschränkt (s. Abb. 3.15 oben). Es wurden zudem weniger Tumore gebildet. Sie bestanden aus grünem turgeszentem pflanzlichem Gewebe, das während des Entwicklungszyklus des Pilzes nicht austrocknete. Das lag möglicherweise daran, dass weniger *U. maydis*-Zellen in den Tumoren vorhanden waren. Zunächst wurde keine Teliosporenbildung in den durch die  $\Delta gcs$ -Mutanten von *U. maydis* erzeugten Tumoren detektiert.



**Abbildung 3.14:** Habitus unterschiedlicher Maispflanzen:

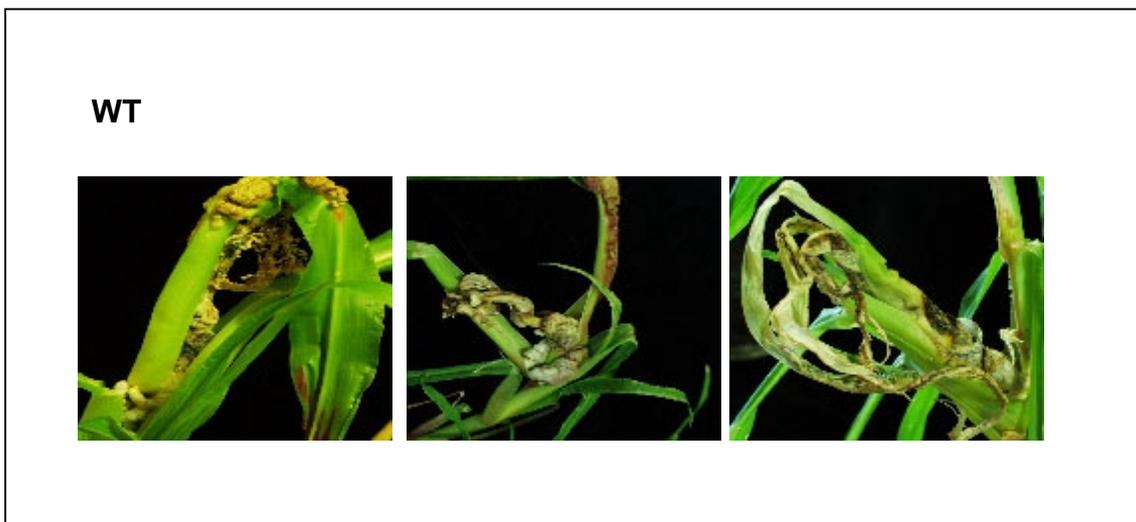
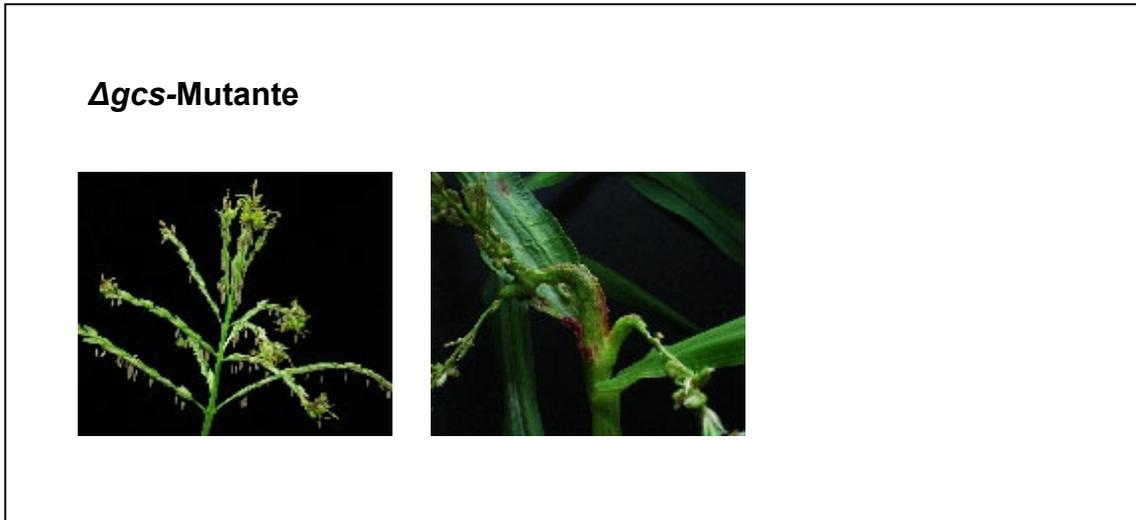
**A:** nicht infiziert

**B:** infiziert mit dem  $\Delta gcs$ -Stamm von *U. maydis* ( $\Delta gcs$ -FB1-2/ $\Delta gcs$ -FB2-1)

**C:** infiziert mit dem WT-Stamm von *U. maydis* (FB1/FB2)

Die Aufnahme erfolgte 20 Tage nach der Infektion.

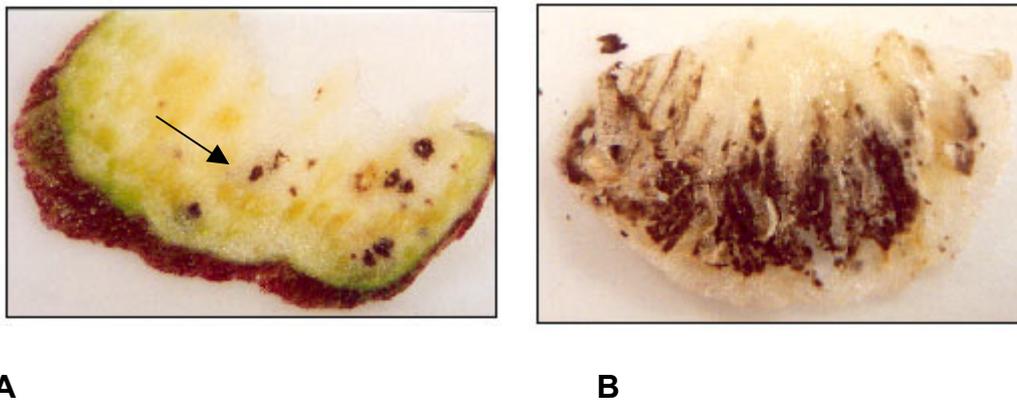
Abbildung 3.14 zeigt deutlich den unterschiedlichen Habitus der mit dem  $\Delta gcs$ -Stamm von *U. maydis* und der mit dem WT-Stamm infizierten Pflanzen. Die Deletion des *GCS*-Gens führte also zu einer stark veränderten Infektionsreaktion.



**Abbildung 3.15:** Durch *U. maydis* verursachte Tumorbildung an Maispflanzen.  
 Oben: Tumorbildung durch die  $\Delta gcs$ -Mutante von *U. maydis* ( $\Delta gcs$ -FB1-2/ $\Delta gcs$ -FB2-1)  
 Unten: Tumorbildung durch den WT-Stamm von *U. maydis* (FB1/FB2).

Abbildung 3.15 zeigt die Unterschiede der Infektion in Bezug auf die Tumorgröße und die Zusammensetzung der Tumore. Die durch den  $\Delta gcs$ -Stamm induzierten Tumore bestanden aus pflanzlichem Gewebe, dessen Form stabil blieb. Die mit dem WT-Pilz befallenen Pflanzen enthielten deutlich größere Tumore, deren Gewebe nach ca. 2 Wochen kollabierte und daraufhin abtrocknete. Dies ist auf die Bildung einer großen Anzahl von Teliosporen zurückzuführen.

Durch Präparation einzelner Tumore waren auch in den durch den  $\Delta gcs$ -Stamm von *U. maydis* induzierten Tumoren Teliosporen sichtbar. Sie traten jedoch nur in geringer Menge auf. Die Bildung erfolgte in einzelnen „Nestern“ (s. Abb. 3.16, A), und ihre Menge war etwa um den Faktor 1000 geringer als in den mit dem WT-Pilz infizierten Pflanzen. Die Tumore bestanden aus intaktem pflanzlichem Gewebe, das während der gesamten Untersuchungsphase (bis 4 Wochen nach der Infektion) nicht austrocknete und die Teliosporen nicht freigab (s. Abb. 3.16, A).



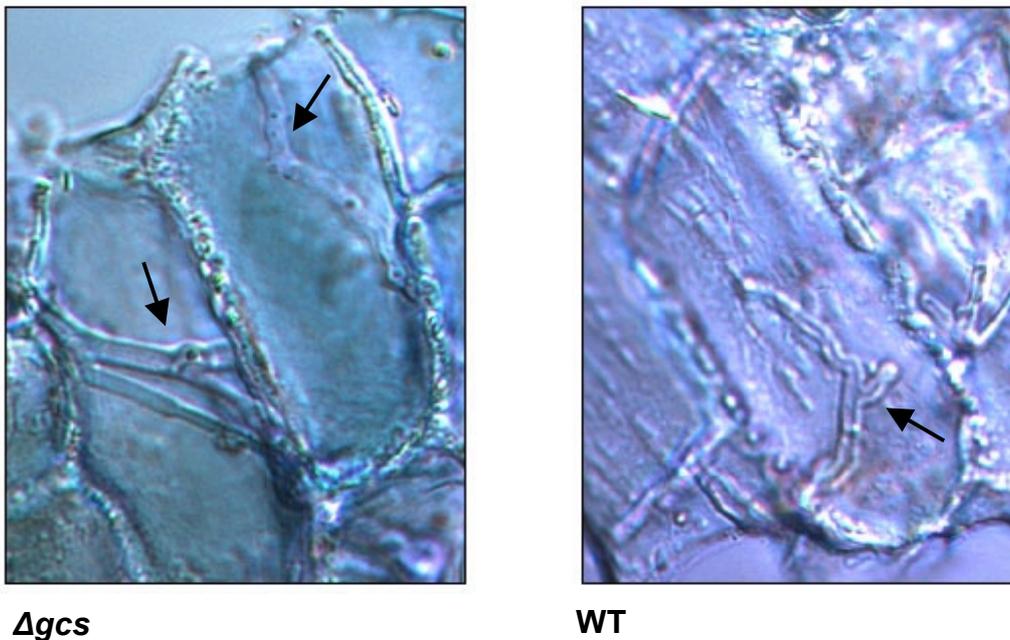
**Abbildung 3.16:** Querschnitte von Mais-Tumoren, die durch den  $\Delta gcs$ -Stamm von *U. maydis* ( $\Delta gcs$ -FB1-2/ $\Delta gcs$ -FB2-1, **A**) sowie durch den WT-Stamm (FB1/FB2, **B**) induziert wurden.

Die Präparation der Querschnitte erfolgte 30 Tage nach der Infektion. Der Pfeil in Bild A zeigt auf ein „Teliosporennest“.

Die Tumorbildung durch die  $\Delta gcs$ -Mutante von *U. maydis* war deutlich beeinträchtigt, vor allem die Bildung und Ausbreitung der Teliosporen. Dies führte zu einer stark eingeschränkten Pathogenität.

### 3.3.4 Mikroskopische Analyse der an *Zea mays* induzierten Tumoren

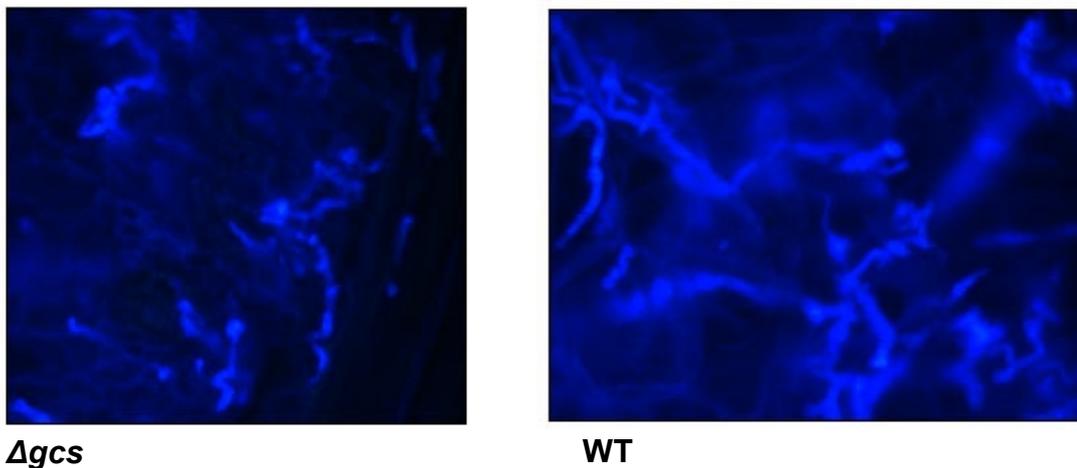
Um weitere Unterschiede der Tumorinduktion des  $\Delta gcs$ -Stammes von *U. maydis* und des WT-Stammes zu erkennen, wurden detailliertere Analysen mittels Mikroskopie von Freihandschnitten der Tumore durchgeführt. Die Tumorbildung zeigte in den ersten Stadien nur wenig Unterschiede. Es war sowohl in den mit dem WT- als auch in den mit dem  $\Delta gcs$ -Stamm von *U. maydis* infizierten Pflanzen-Zellen deutlich Hyphenwachstum erkennbar (s. Abb. 3.17). Die Anzahl der Hyphen in den durch den  $\Delta gcs$ -Stamm von *U. maydis* infizierten Zellen war deutlich geringer.



**Abbildung 3.17:** Mikroskopische Darstellung der Hyphen von *U. maydis* nach Infektion von *Zea mays*. Die Aufnahmen entstanden nach Präparation von Epidermisstreifen von Blättern, infiziert durch den  $\Delta gcs$ -Stamm (links) bzw. dem WT-Stamm (rechts) von *U. maydis*. Die Pfeile zeigen auf die Hyphen. Die Aufnahmen erfolgte 4 Tage nach der Infektion.

Abbildung 3.18 zeigt, dass durch Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff „Fungi-Fluor<sup>®</sup>“ (Polyscience, Eppelheim) die Hyphen nach Aktivierung mit kurzweiligem Licht eine blaue Fluoreszenz aufwiesen.

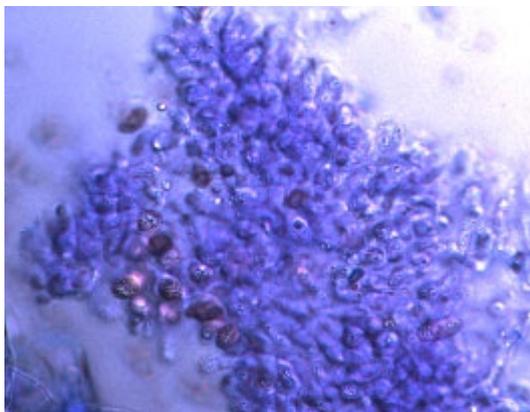
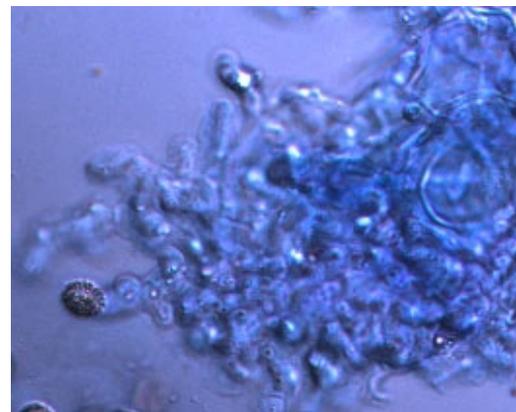
Hierbei handelt es sich um Quetschpräparate, die durch Zerquetschen von ca. 6 Tage alten Tumorfragmenten des Tumors induziert durch den WT-Stamm und 9 Tage alten Fragmenten des Tumors induziert durch den  $\Delta gcs$ -Stamm von *U. maydis* entstanden. Auch hier ist sowohl im durch den  $\Delta gcs$ -Stamm als auch durch den WT-Stamm von *U. maydis* induzierten Zellen Hyphenwachstum erkennbar. Zusätzlich war auch das sich verzweigende Wachstum der Hyphen, wie bei Banuett und Herskowitz (1996) beschrieben, erkennbar.



**Abbildung 3.18:** Mikroskopische Darstellung der sich verzweigenden *U. maydis*-Hyphen nach Infektion von *Zea mays*. Die Präparation entstand durch Quetschen freihandgeschnittener Tumore induziert durch den  $\Delta gcs$ -Stamm (links) bzw. durch den WT-Stamm (rechts) von *U. maydis*. Die Hyphen wurden unter UV-Licht durch Anfärbung mit „Fungi-Fluor<sup>®</sup>“ (Polyscience, Eppelheim) hellblau angefärbt.

Acht Tage alte Tumorzellen induziert durch den WT-Stamm sowie 11 Tage alte Tumorzellen induziert durch den  $\Delta gcs$ -Stamm wiesen das charakteristische „worm-like“-Stadium der Hyphen auf. Die sich immer stärker verzweigenden Hyphen waren von einer „Mucilaginous“-Schleimschicht umgeben (Banuett und Herskowitz, 1996).

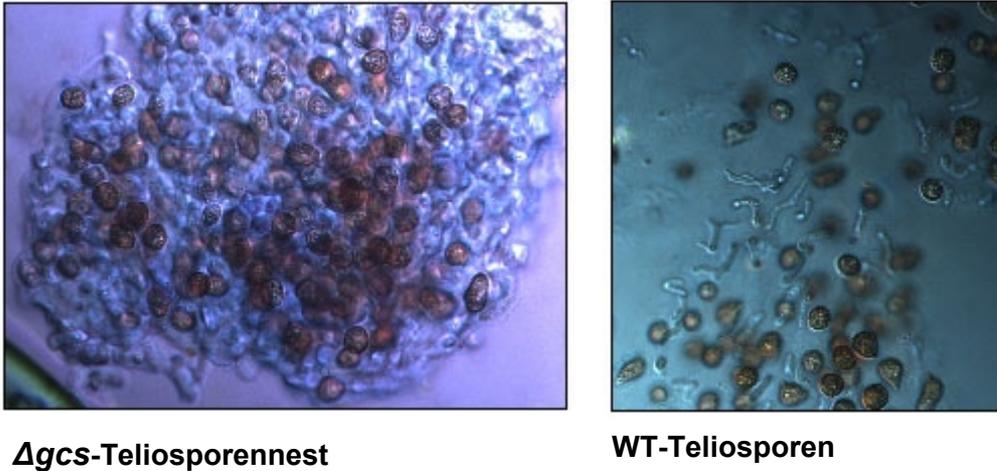
Die Darstellung dieses Stadiums erfolgte auch durch Herstellung von Quetschpräparaten. Auffällig war, dass die Hyphen des „worm-like“-Stadiums des WT-Pilzes sich vereinzeln. Im Gegensatz dazu lagen die „worm-like“-Stadium-Hyphen des  $\Delta gcs$ -Stammes akkumuliert in dem infizierten Gewebe vor (s. Abb. 3.19). Dies ist möglicherweise auch die Erklärung dafür, dass sich die aus den „worm-like“-Stadium-Hyphen entwickelnden Teliosporen der  $\Delta gcs$ -Mutante in „Nestern“ anordneten, was auch in der Abbildung 3.20 gut zu erkennen ist.

 $\Delta gcs$ 

WT

**Abbildung 3.19:** Das „worm-like“-Stadium der Hyphen des  $\Delta gcs$ -Stammes (links) bzw. des WT-Stammes (rechts) von *U. maydis* mit umgebender „Mucilaginous“-Schleimschicht.

Die gebildeten Teliosporen von *U. maydis* sind in Abbildung 3.20 dargestellt. Die Präparation der sich bildenden Teliosporen des WT-Pilzes erfolgte 10 Tage nach der Infektion, die der Mutante 14 Tage nach der Infektion. Wie bereits beschrieben, waren die Teliosporen des  $\Delta gcs$ -Stammes in Nestern akkumuliert. Die Anzahl der Teliosporen war um ein Vielfaches geringer und die Bildung und Ausbreitung somit stark beeinträchtigt. Die Bildung der melanisierten Teliosporen war möglich, obwohl die Melaninbiosynthese bei Melanoma-Zellen der Maus, die kein GlcCer bilden können, behindert ist. Dieses Ergebnis wurde durch den beeinträchtigten Transport des Schlüsselenzyms, Tyrosinase, vom Golgi-Apparat zu den Melanosomen erklärt (Sprong et al., 2001). Ähnliche Versuche wurden bisher bei *U. maydis* nicht durchgeführt.



**Abbildung 3.20:** Präparierte Teliosporen der  $\Delta gcs$ -Mutante (links) und des WT-Pilzes von *U. maydis* (rechts) nach Infektion von *Zea mays*.

Aus dem durch den  $\Delta gcs$ -Stamm induzierten Tumor herauspräparierte Teliosporen wurden auf Ihre Keimungsfähigkeit getestet. Die Teliosporen waren in der Lage, innerhalb von ca. 24 h auszukeimen. Die Ausbildung der Keimungshyphe ist in Abbildung 3.21 dargestellt. Zudem waren die gebildeten Sporidien zu filamentösem Wachstum befähigt. Dies wurde durch Ausplattieren auf aktivkohlehaltigem Medium überprüft.



**Abbildung 3.21:** Auf Agar auskeimende Teliosporen des  $\Delta gcs$ -Stammes von *U. maydis*.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *Δgcs*-Mutante von *U. maydis* im Vergleich zum WT um 50 % weniger infektiös war. Die Entwicklung der Tumore war im Verhältnis zum WT-Pilz entwicklungsverzögert, und die Telioporenbildung war stark reduziert. Glucosylceramid hat also einen großen Einfluss auf die Tumor- und Teliosporenbildung des Pilzes *U. maydis*. Andererseits konnten die gebildeten Teliosporen keimen und filamentös wachsen. Unter natürlichen Bedingungen wären die Teliosporen wahrscheinlich kaum in der Lage sich zu verbreiten, da sie akkumuliert in kleinen Nestern in den entstandenen Tumoren gebildet wurden, die nicht abtrockneten und die Sporen daher nicht freigaben. Das pflanzliche Tumorgewebe blieb auch nach einem Untersuchungszeitraum von 4 Wochen stabil. Nur durch Präparation und anschließendes Trocknen der Teliosporen konnte die Keimungsfähigkeit dieser Sporen getestet werden. Dagegen trockneten die durch den Wildtyp-Pilz gebildeten Tumore nach ca. 14 Tagen vollständig ab und gaben eine Vielzahl von Teliosporen an die Außenwelt ab.

### **3.4 Vorarbeiten zur Herstellung einer Glucosylceramid-Synthase-Deletionsmutante im phytopathogenen Pilz *Magnaporthe grisea***

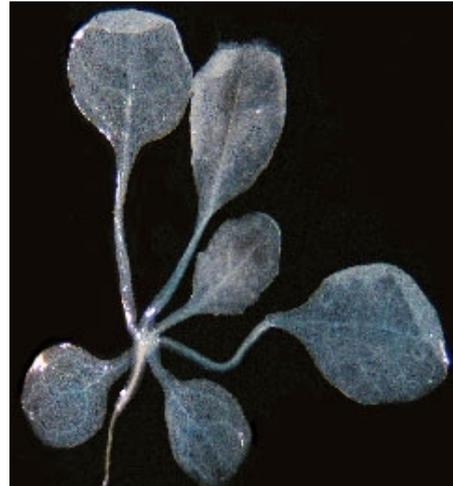
Der phytopathogene Pilz *M. grisea* verursacht weltweit erhebliche Schäden und hat daher eine große wirtschaftliche Bedeutung. Da *M. grisea* möglicherweise durch die Deletion der GlcCer-Synthese seine Pathogenität verlieren könnte, sollte auch von diesem Pilz eine *gcs*-Deletionsmutante erzeugt werden. *M. grisea* bildet zur Infektion seiner Wirtspflanze Reis ein stark melanisiertes Appressorium aus. Sprong et al. (2001) haben beschrieben, dass die Melaninbiosynthese in Glycosphingolipid defizienten GM95 Zellen gestört ist. Es wäre interessant zu untersuchen, ob auch die Melaninbiosynthese von *M. grisea* gestört werden würde, und damit die Ausbildung eines funktionsfähigen Appressoriums nicht mehr stattfinden würde. Dann wäre dieser *gcs*-Deletionsstamm von *M. grisea* möglicherweise nicht mehr pathogen.

Die Herstellung von *gcs*-Deletionsmutanten des Pilzes *M. grisea* wird in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe N. J. Talbot (England) erfolgen. Die Herstellung des  $\Delta gcs$ -Deletionskonstrukts pBIMgKO sowie die Herstellung eines Komplementationskonstrukts pCBMgGcs wurde von mir durchgeführt (s. 2.12.1). Leider ist die Herstellung dieser Mutanten und somit deren Komplementation noch nicht abgeschlossen.

### 3.5 $\beta$ -Glucuronidase-Expressionsanalysen unter der Kontrolle des Glucosylceramid-Synthase-Promoters

Zur Analyse der gewebepezifischen Expression der Gcs in *A. thaliana* wurden Gcs-Promoter-Expressionsanalysen mit dem Reporter-gen  $\beta$ -Glucuronidase durchgeführt.

Zur  $\beta$ -Glucuronidase-Expressionsanalyse des GCS-Gens *in vivo* in *A. thaliana* wurden die binären Vektoren pCAMBIA\_P1500 und pCAMBIA\_P2000, die die Sequenz des  $\beta$ -Glucuronidase-Gens unter Regulation des Gcs-spezifischen Promoters enthielten, verwendet (s. 2.14.5). Dazu wurden zwei unterschiedlich lange Promoterbereiche von 1500 und 2000 bp gewählt. Zunächst erfolgte die Transformation von *A. tumefaciens* mit den binären Vektoren, die als Selektionsmarker eine Hygromycinkassette enthielten. Daraufhin wurden *A. thaliana*-Pflanzen mit den erhaltenen Agrobakterien transformiert und nach anschließender Selektion auf hygromycinhaltigem Medium (25  $\mu$ g/ml) wurden je zwei transgene Pflanzen identifiziert. Sekundärblätter dieser Pflanzen wurden für den  $\beta$ -Glucuronidase-Test mit X-Gluc als Substrat verwendet (GUS-Färbung, s. 2.13.6). Die Blätter dieser vier Pflanzen wiesen im Gegensatz zu WT-Kontrollpflanzen alle Blaufärbung auf. Die Pflanzen wurden als P1500\_GUS1 bzw. 2 oder P2000\_GUS1 bzw. 2, abhängig vom verwendeten Gcs-Promoter, bezeichnet. Auffällig war aber, dass die Intensität der Blaufärbung bei Expression mit dem 2000 bp langen Gcs-Promoter sichtbar schwächer war (s. Abb. 3.22, B). Die untersuchten Pflanzen wurden dann bis zur Samenreife kultiviert. Die erhaltenen Samen wurden ausgesät, um ausreichend Pflanzenmaterial zum Anfärben zu produzieren. Die Abbildung 3.22 A zeigt eine ca. 16 Tage alte Pflanze, die das  $\beta$ -Glucuronidase-Gen unter Kontrolle des kürzeren (1500 bp) Gcs-Promoters exprimiert, Abbildung 3.22 B eine ca. 10 Tage alte Pflanze, die das  $\beta$ -Glucuronidase-Gen unter Kontrolle des längeren (2000 bp) Gcs-Promoters exprimiert. Es war deutlich zu erkennen, dass der Spross sowie die Blattadern blau angefärbt waren. Aber auch die Wurzel sowie die Blüten waren schwach blau gefärbt.

**A****B**

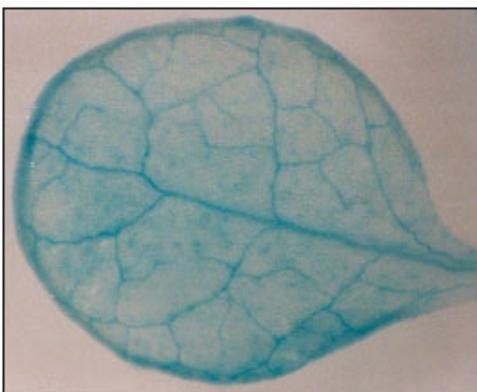
**Abbildung 3.22:** GUS-gefärbte *A.thaliana* Pflanzen

**A:** GUS-gefärbte Pflanze P1500\_GUS (ca. 16 Tage alt)

**B:** GUS-gefärbte Pflanze P2000\_GUS (ca. 10 Tage alt)

Im Weiteren wurden nur die angefärbten P1500\_GUS-Pflanzen detaillierter untersucht, da die schwache Blaufärbung der P2000\_GUS-Pflanzen nur schwer zu detektieren war (s. Abb. 3.22, B).

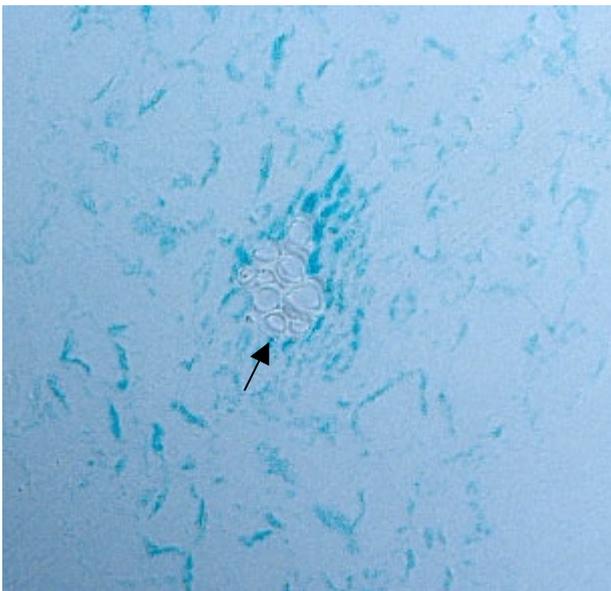
Detailliertere Analysen mittels mikroskopischen Aufnahmen ließen darauf schließen, dass vor allem in den Leitgeweben der Pflanzen eine Blaufärbung und somit eine Expression des  $\beta$ -Glucuronidase-Gens unter Regulation des Gcs-Promoters erfolgte (s. Abb. 3.23).

**A****B**

**Abbildung 3.23:** GUS-Färbung eines P1500\_GUS-Blattes (A) und eines WT-Blattes (B) von *A. thaliana*.

Zur genaueren Lokalisierung der spezifischen  $\beta$ -Glucuronidase-Expression wurden Sprosse der angefärbten P1500\_GUS-Pflanze in Kunstharz (LR-White) eingebettet (s. 2.13.7). Dadurch war es möglich, ca. 5  $\mu\text{m}$  dünne Sprossquerschnitte des Pflanzengewebes herzustellen. Die Einbettung sowie die Herstellung der Sprossquerschnitte wurde von I. Wachholz (AG Prof. Dr. H. Quarder, Universität Hamburg) durchgeführt.

Die Analyse der erhaltenen Querschnitte zeigte, dass in jeder Zelle GUS-Färbung erkennbar war. Es wurde auch deutlich, warum vor allem die Blattadern und der Spross stark blau angefärbt wurden. Dies lag wahrscheinlich daran, dass die das Leitgewebe umgebenden Zellen nur schwach vakuolisiert sind. Daher schienen diese Zellen nach GUS-Färbung verstärkt blau im Gegensatz zu den übrigen Zellen, die eine große Vakuole enthalten und in denen nur ein dünner Cytoplasmabereich blau schimmerte. Abbildung 3.24 zeigt einen ca. 5  $\mu\text{m}$  dünnen Sprossquerschnitt durch einen GUS-gefärbten P1500\_GUS-Spross von *A. thaliana*.



**Abbildung 3.24:** Darstellung eines GUS-gefärbten Sprossquerschnittes von *A. thaliana*-P1500\_GUS. Der Pfeil zeigt auf das Leitbündel. Alle dargestellten Zellen weisen Blaufärbung auf.

Auf Grund dieser Versuche muss geschlossen werden, dass der Gcs-Promoter in allen Organen, Geweben und Zellen von *A. thaliana* aktiv ist und somit in all diesen Zellen auch Glucosylceramide synthetisiert werden.

### 3.6 Ausblick

Interessante Systeme zur Erkennung von Funktionen des *GCS*-Gens in Pflanzen wären homozygote Deletionsmutanten. In den zur Zeit verfügbaren Mutantenkollektionen konnten bisher allerdings keine entsprechenden Mutanten identifiziert werden, so dass diese Recherchen mit der Ausweitung dieser Kollektionen kontinuierlich fortgeführt werden müssen. Andererseits könnte das Fehlen einer solchen Mutante auch der Letalität der entsprechenden Mutation zuzuschreiben sein, obwohl dies für den heterozygoten Zustand unwahrscheinlich ist. In einem solchen Fall muss auf Techniken des postranskriptionalen „*gene silencing*“ zurückgegriffen werden.

Für die Thematik der Phytopathogenität von Pilzen wäre die Herstellung einer *gcs*-Deletionsmutante von *M. grisea* von besonderer Relevanz. Dieser Pilz bildet zur Infektion der Wirtspflanze ein stark melanisiertes Appressorium aus. Andererseits ist von GlcCer-defizienten Melanoma-Zellen der Maus bekannt, dass ihre Melaninbiosynthese defekt ist. Daher wäre es interessant zu untersuchen, ob die Deletion des *GCS*-Gens bei *M. grisea* mit der Ausbildung des Appressoriums interferiert und auf diese Weise die Pathogenität des Pilzes beeinträchtigt. Eine entsprechende Versuchsserie wurde gerade in Kooperation mit einem anderen Labor gestartet.

Zur Abrundung der Versuche mit *U. maydis* wäre es notwendig, die Deletionsmutante durch Transformation mit einem entsprechenden *Gcs*-Konstrukt zu komplementieren und auf diese Weise die Pathogenitätsreduktion wieder aufzuheben.

## 4. Zusammenfassung

Die Klonierung der ersten Glucosylceramid-Synthasen aus Pflanzen und Pilzen durch Leipelt et al. (2001) hatte die Möglichkeit eröffnet, Funktionen dieser Enzyme und ihrer Reaktionsprodukte bei diesen Organismen zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit sollte diese Zielsetzung vor allem mit molekularbiologischen Methoden bearbeitet werden.

Dazu wurde zunächst eine glycolipidfreie *Pichia pastoris*-Mutante hergestellt, die als Expressionssystem für die Glucosylceramid-Synthasen geeignet war. Auf diese Weise konnte erstmals die bisher kontrovers diskutierte Substratspezifität der pflanzlichen Glucosylceramid-Synthase bestimmt werden. Die Expression des Gens aus *Gossypium arboreum* in dieser Mutante zeigte, dass offenbar UDP-Glucose und nicht Sterolglucosid als Zucker-Donor für die Glucosylierung des Ceramids benutzt wird. Zudem konnte ein Enzymtest etabliert werden, mit dem *in vitro* die Aktivität der in *Pichia pastoris* exprimierten Glucosylceramid-Synthasen bestimmbar ist. Hierfür wurden isolierte Membranfraktionen aus entsprechenden Transformanten mit radioaktiv markierter UDP-Glucose inkubiert und die radioaktiv markierten Produkte analysiert. Dieser Enzymtest bestätigte, dass die pflanzliche Gcs UDP-Glucose als Zucker-Donor nutzt. Eine besondere Eigenschaft der pflanzlichen Glucosylceramid-Synthase besteht darin, dass sie in geringem Umfang auch Sterole glucosylieren kann.

Weiterhin wurden in der glycolipidfreien Mutante die Glucosylceramid-Synthase-Gene aus folgenden Organismen exprimiert: *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans*, *Ustilago maydis*, *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris* und *Agrobacterium tumefaciens*. Die meisten dieser Sequenzen waren bereits zuvor kloniert worden, und nur die aus *U. maydis* und *A. nidulans* wurden zusätzlich in dieser Arbeit isoliert. Mit den Glucosylceramid-Synthase-Sequenzen aller dieser Organismen wurden Konstrukte für die Expression in der glycolipidfreien *Pichia pastoris*-Mutante hergestellt. Lipidanalysen zeigten, dass die exprimierten Glucosylceramid-Synthasen aus all den untersuchten Organismen funktional aktive Enzyme kodierten.

Mit dem *in vitro*-Glucosylceramid-Synthase-Enzymtest konnte die direkte Wirkung eines säugerspezifischen Glucosylceramid-Synthase-Hemmstoffs [D-threo-1-(3',4'-Ethyldioxy)phenyl-2-palmitoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol = Ethyldioxy-P4]

auf die Glucosylceramid-Synthase-Aktivität anderer Organismen untersucht werden. Der Test zeigte, dass nur die humane Glucosylceramid-Synthase durch den Hemmstoff inhibiert wurde, während die Aktivität der Glucosylceramid-Synthasen aus *C. elegans*, *G. arboreum*, *U. maydis*, *A. nidulans*, *C. albicans*, *P. pastoris* und *A. tumefaciens* durch Ethylendioxy-P4 nicht gehemmt wurde. Eine Konsequenz dieses Ergebnisses ist daher die Möglichkeit, dass auch die umgekehrte Situation vorstellbar ist, bei der ein entsprechender Hemmstoff für die Glucosylceramid-Synthase humanpathogener Pilze verfügbar wird, der gegenüber der humanen Glucosylceramid-Synthase unwirksam ist und somit eventuell als Antimycotikum einsetzbar wird.

Zur Lokalisation der Glucosylceramid-Synthase-Expression in Pflanzen wurde eine  $\beta$ -Glucuronidase-Expressionsanalyse unter der Kontrolle des Glucosylceramid-Synthase-Promoters in *A. thaliana* durchgeführt. Sie zeigte, dass der Glucosylceramid-Synthase-Promoter konstitutiv und ubiquitär in allen Zellen aktiv ist.

Zur Erkennung von Glucosylceramid-Synthase-Funktionen bei phytopathogenen Pilzen wurden Methoden der reversen Genetik genutzt. Zu diesem Zweck wurde das Glucosylceramid-Synthase-Gen von *U. maydis* durch homologe Rekombination zerstört und die entsprechende Deletionsmutante zur Mais-Infektion eingesetzt. Die Mutante zeigte eine stark reduzierte Infektiosität, und die in wesentlich geringerer Zahl induzierten Tumore waren im Vergleich zum Wildtyp erheblich verändert. Die Tumore entwickelten sich deutlich verzögert, enthielten weniger Pilz-Hyphen, waren kleiner und bestanden aus grünem, turgeszentem pflanzlichem Gewebe. Die Teliosporenbildung erfolgte zwar auch bei der Mutante, die Sporen waren aber innerhalb des Tumors in wenigen Nestern konzentriert und konnten nicht an die Umgebung abgegeben werden. Glucosylceramide spielen somit eine bedeutende Rolle im Lebenszyklus von *U. maydis*. Auch bei *Magnaporthe grisea* wurde mit der Herstellung eines transformationsfähigen Glucosylceramid-Synthase-Deletionskonstrukts der erste Schritt zur Analyse der Glucosylceramid-Synthase-Funktion bei diesem Pilz getan. Entsprechende Transformations- und Infektionsversuche sind in dem Labor eines Kooperationspartners gerade angelaufen.

## 5. Literaturverzeichnis

**Abul-Milh M., Foster D.B. and Lindwood C.A.** (2001) In vitro binding of *Helicobacter pylori* to monohexosyl-ceramides. *Glycoconj. J.* **18**, 253-260.

**Aichinger C.** (2001) Identifizierung pflanzenabhängig-regulierter Gene in *Ustilago maydis*. Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Fachbereich Biologie.

**Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.

**Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K.** (1995) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.

**Banuett F. and Herskowitz I.** (1989) Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 5878-5882.

**Banuett F. and Herskowitz I.** (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-76.

**Basu S., Kaufman B. and Roseman S.** (1968) Enzymatic synthesis of ceramide-glucose and ceramide-lactose by glycosyltransferases from embryonic chicken brain. *J. Biol. Chem.* **243**, 5802-4

**Billett E.E. and Bournett J.H.** (1978) The host-parasite physiology of the maize smut fungus *Ustilago maydis*: II Transmission of <sup>14</sup>C labeled assimilates in smutted maize plants. *Phys. Plant Path.* **12**, 103-112.

**Bohn M., Heinz E. and Lühje S.** (2001) Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots. *Arch. Biochem. Biophys.* **387**, 35-40.

**Bohn M.** (1999) Der Einfluß einer Kältehärtung im Vergleich zu einer Hormonbehandlung (Abscisinsäure) auf das Lipidmuster von Plasma- und Chloroplastenmembranen des Winterweizens (*Triticum aestivum* L.). Dissertation an der Universität Hamburg, Fachbereich Biologie.

**Brodersen P., Petersen M., Pike H.M., Olszak B., Skov S., Odum N., Bolt Jørgensen L., Brown R.E. and Mundy J.** (2002) Knockout of *Arabidopsis* accelerated-cell-death11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev.* **16**, 490-502.

**Bullock W.O., Fernandez J.M. and Short J.M.** (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-glucosidase selection. *Biotechnology* **5**, 376-378.

**Campbell J.A., Davies G.J., Bulone V. and Henrissat B.** (1997) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **326**, 929-939.

**Cantatore J.L., Murphy S.M. and Lynch D.V.** (2000) Compartmentation and topology of glucosylceramide synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 748-750.

**Carroll A.M., Sweigard J.A. and Valent B.** (1994) Improved vectors for selecting resistance to hygromycin. *fungus genet. Newsl.* (<http://www.fgsc.net/fgn41/carroll.html>).

**Chester M.A.** (1998) IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCNB)-Nomenclature of glycolipids. Recommendations 1997. *Eur. J. Biochem.* **257**, 293-298.

**Conzelmann A., Puito A., Lester R.L. and Desponds C.** (1992) Two different types of lipid moieties are present in glycosphosphoinositol-anchored membrane proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **11**, 457-466.

**Coutinho P.M. and Henrissat B.** (1999) in *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering* (Gilbert H.J., Davies G., Henrissat B., and Svensson B., eds.) The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 3-12.

**Couto A.S., Caffaro C., Uhrig M.L., Kimura E., Peres V.J., Merino E.F., Katzin A.M., Nishioka M., Nonami H. and Erra-Balsells R.** (2004) Glycosphingolipids in *Plasmodium falciparum*. Presence of an active glucosylceramide synthase. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2204-2214.

**Cox T.M., Aerts J.M., Andria G., Beck M., Belmatoug N., Bembi B., Chertkoff R., Vom Dahl S., Elstein D., Erikson A., Giralto M., Heitner R., Hollak C., Hrebicek M., Lewis S., Mehta A., Pastores G.M., Rolfs A., Miranda M.C. and Zimran A.** (2003) The role of the iminosugar N-butyldeoxynojirimycin (miglustat) in the management of type I (non-neuronopathic) Gaucher disease: a position statement. *J. Inherit. Metab. Dis.* **26**, 513-526.

**Clare J.J., Rayment F.B., Ballantine S.P., Sreekrishna K. and Romanos M.A.** (1991) High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology* **9**, 284-290.

**Clough S.J. and Bent A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.

**Cregg J.M. and Madden K.R.** (1988) Development of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. *Developments in industrial Microbiology* **29**, 33-41.

**Cregg J.M., Madden K.R., Barringer K.J., Thill G.P. and Stillmann C.A.** (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell Biol.* **9**, 1316-1323.

**Christensen J.J.** (1963) Corn smut caused by *Ustilago maydis*. *Am. Phytopathol. Soc. Monogram* **2**.

**Day P.R., Anagnostakis S.L. and Puhalla J.E.** (1971) Pathogenicity resulting from mutation at the b locus of *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **68**, 533-5.

**Demel R.A. and De Kruffyff B.** (1976) The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **457**, 109-132.

**Dickson R.C. and Lester R.L.** (1999) Yeast sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 347-357.

**Dickson R.C. and Lester R.L.** (2002) Shingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1583**, 13-25.

**Doering T., Proia R.L. and Sandhoff K.** (1999) Accumulation of protein-bound epidermal glucosylceramides in  $\beta$ -gluco-cerebrosidase deficient type 2 Gaucher mice. *FEBS Lett.* **447**, 167-170.

**Eddidin M.** (2003) The state of lipid rafts: From model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 257-283.

**Futerman A.H. and Pagano R.E.** (1991) Determination of the intracellular sites and topology of glucosylceramide synthesis in rat liver. *Biochem. J.* **280**, 295-302.

**Gillissen B., Bergemann J., Sandmann C., Schröer B., Bölker M. and Kahmann R** (1992) A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-57.

- Grazide S., Terrisse A.D., Lerouge S., Laurent G. and Jaffrezou J.P.** (2004) Cytoprotective effect of glucosylceramide synthase inhibition against daunorubicin-induced apoptosis in human leukemic cell lines. *J. Biol. Chem.* **279**, 18256-18261.
- Guerrera M. and Ladisch S.** (2003) N-butyldeoxynojirimycin inhibits murine melanoma cell ganglioside metabolism and delays tumor onset. *Cancer Lett.* **201**, 31-40.
- Hakamori S.** (1981) Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 733-764.
- Hakamori S.** (2000) Cell adhesion/recognition and signal transduction through glycosphingolipid microdomain. *Glycoconjugate J.* **17**, 143-151.
- Hamanaka S., Asagami C., Suzuki M., Inagaki F. and Suzuki A.** (1989) Structure determination of glucosyl  $\beta$ 1-N-(omega-O-linoleoyl)-acylsphingosines of human epidermis. *J. Biochem. (Tokyo)* **105**, 684-690.
- Hannun Y.A. and Obeid L.M.** (1995) Ceramide: An intracellular signal for apoptosis. *TIBS* **20**, 73-77.
- Heinz E.** (1996) Plant glycolipids: structure, isolation and analysis. In Christie, W. W. (ed.), *Advances in Lipid Methodology-Three*, The Oily Press, Dundee, 211-332.
- Higgins D.G. and Sharp P.M.** (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73**, 237-244.
- Hillig I., Leipelt M., Ott C., Zähringer U., Warnecke D. and Heinz E.** (2003) Formation of glucosylceramide and sterol glucoside by a UDP-glucose-dependent glucosylceramide synthase from cotton expressed in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett* **553**, 365-369.
- Hölzl G., Leipelt M., Zähringer U., Lindner B., Ott C., Warnecke D. and Heinz E.** (2005) Processive lipid galactosyl/glucosyltransferases from *Agrobacterium tumefaciens* and *Mesorhizobium loti* display multiple specificities. *Glycobiology*, in press.
- Holliday, R.** (1961) The genetics of *U. maydis*. *Genet.Res.Comb.* **2**, 204-230.
- Holthuis J.C.M., Pomorski T., Raggars R.J., Sprong H. and van Meer G.** (2001) The Organizing Potential of Sphingolipids in Intracellular Membrane Transport. *Physiological reviews* **81**, 1690-1713.
- Hood E.E., Helmer G.L., Fraley R.T. and Chilton M.D.** (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* **168**, 1291-1301.
- Hsieh T., Kaul K., Laine R.A. and Lester R.L.** (1978) Structure of a major glycoposphoceramide from tobacco leaves, PSL-1: 2-deoxy-2-acetamido-D-glucopyranosyl( $\alpha$ 1-4)-D-glucuronopyranosyl( $\alpha$ 1-2)myoinositol-1-O-phosphoceramide. *Biochemistry* **17**, 3575-3581.
- Ichikawa S. and Hirabayashi Y.** (2000) Genetic approaches for studies of glycolipid synthetic enzymes. *Methods Enzymol.* **311**, 303-18.
- Ichikawa S., Nakajo N., Sakiyama H. and Hirabayashi Y.** (1994) A mouse B16 melanoma mutant deficient in glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 2703-2707.
- Ichikawa S., Sakiyama H., Suzuki G., Hidari K.I. and Hirabayashi Y.** (1996) Expression cloning of a cDNA for human ceramide glucosyltransferase that catalyzes the first glycosylation step of glycosphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 12654.
- Inoue H., Nojima H., and Okayama H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.

**Itoh M., Kitano T., Watanabe M., Kondo T., Yabu T., Taguchi Y., Iwai K., Tashima M., Uchiyama T. and Okazaki T.** (2003) Possible role of ceramide as an indicator of chemoresistance: decrease of the ceramide content via activation of glucosylceramide synthase and sphingomyelin synthase in chemoresistant leukemia. *Clin. Cancer Res.* **9**, 415-423.

**Jorasch P., Warnecke D.C., Lindner B., Zähringer U. and Heinz E** (2000) Novel processive and nonprocessive glycosyltransferases from *Staphylococcus aureus* and *Arabidopsis thaliana* synthesize glycolipids, glycosphingolipids, glycosphingolipids and glycosylsterols. *Eur. J. Biochem.* **267**, 3770-3783.

**Kämper J.** (2004) A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genomics* **271**, 103-110.

**Kahmann R. and Bölker M.** (1996) Self/nonsel recognition in fungi: old mysteries and simple solutions. *Cell* **85**, 145-148.

**Kawai G., Ohnishi M., Fujino Y. and Ikeda Y.** (1986) Stimulatory effect of certain plant sphingolipids on fruiting of *Schizophyllum commune*. *J. Biol. Chem.* **261**, 779-784.

**Klappe K., Hinrichs J.W., Kroesen B.J., Sietsma H. and Kok J.W.** (2004) MRP1 and glucosylceramide are coordinately over expressed and enriched in rafts during multidrug resistance acquisition in colon cancer cells. *Int. J. Cancer* **110**, 511-522.

**Koga J., Yamauchi T., Shimura M., Ogawa N., Oshima K., Umemura K., Kikuchi M. and Ogasawara N.** (1998) Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *J. Biol. Chem.* **273**, 31985-31991.

**Kohyama-Koganeya A., Sasamura T., Oshima E., Suzuki E., Nishihara S., Ueda R. and Hirabayashi Y.** (2004) *Drosophila* glucosylceramide synthase: a negative regulator of cell death mediated by proapoptotic factors. *J. Biol. Chem.* **279**, 35995-36002.

**Kurtzmann C.P. and Robnett C.J.** (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**, 331-371.

**Lavie Y., Cao H., Bursten S.L., Giuliano A.E. and Cabot M.C.** (1996). Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 19530-6.

**Lee L., Abe A. and Shayman J.A.** (1999) Improved inhibitors of glucosylceramide synthase, *J. Biol. Chem.* **274**, 14662-14669.

**Leipelt M., Warnecke D., Zähringer U., Ott C., Müller F., Hube B. and Heinz E.** (2001) Glucosylceramide synthases, a gene family responsible for the biosynthesis of glucosphingolipids in animals, plants, and fungi. *J. Biol. Chem.* **276**, 33621-33629.

**Leverly S.B., Momany M., Lindsey R., Toledo M.S., Shayman J.A., Fuller M., Brooks K., Doong R.L., Straus A.H. and Takahashi H.K.** (2002) 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.

**Lester R.L., Smith S.W., Wells G.B., Rees D.C. and Angus W.W.** (1974) The isolation and partial characterisation of novel sphingolipids from *Neurospora crassa*: di(inositolphosphoryl)ceramide and [(gal)<sub>3</sub>glu]ceramide. *J. Biol. Chem.* **249**, 3388-3394.

**Lin Cereghino G.P., Lin Cereghino J., Sunga A.J., Johnson M.A., Lim M., Gleeson M.A. and Cregg J.M.** (2001) New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. *Gene* **263**, 159-69.

- Liu Y.Y., Han T.Y., Giuliano A.E. and Cabot M.C.** (1999) Expression of glucosylceramide synthase, converting ceramide to glucosylceramide, confers adriamycin resistance in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 1140-6.
- Liu Y.Y., Han T.Y., Giuliano A.E. and Cabot M.C.** (2001) Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *Faseb J.* **15**, 719-30.
- Liu Y.Y., Han T.Y., Giuliano A.E., Hansen N. and Cabot M.C.** (2000) Uncoupling ceramide glycosylation by transfection of glucosylceramide synthase antisense reverses adriamycin resistance. *J. Biol. Chem.* **275**, 7138-43.
- Luberto C., Toffaletti D.L., Wills E.A., Tucker S.C., Casadevall A. and Perfect J.R.** (2001) Roles for inositol-phosphoryl ceramide synthase 1 (IPC1) in pathogenesis of *C. neoformans*. *Genes Dev.* **15**, 201-212.
- Lucci A., Cho W.I., Han T.Y., Giuliano A.E., Morton D.L. and Cabot M.C.** (1998) Glucosylceramide: a marker for multiple-drug resistant cancers. *Anticancer Res.* **18**, 475-80.
- Lynch D.V.** (1993) Sphingolipids. In Moore, T.S., Jr (ed.), *Lipid Metabolism in Plants*, CRC Press, Boca Raton, 285-308.
- Lynch D.V., Criss A.K., Lehoczy J.L. and Bui V.T.** (1997) Ceramide glycosylation in bean hypocotyl microsomes: evidence that steryl glucoside serves as glucose donor. *Arch. Biochem. Biophys.* **340**, 311-316.
- Lynch D.V. and Steponkus P.L.** (1987) Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiol.* **83**, 761-767.
- Macher B.A. and Sweely C.C.** (1978) Glycosphingolipids: structure, biological source, and properties. *Methods Enzymol.* **50**, 236-251.
- Maciel D.M., Rodrigues M.L., Wait R., Villas Boas M.H., Tischler C.A. and Barreto Bergter E.** (2002) Glycosphingolipids from *Magnaporthe grisea* cells: expression of a ceramide dihexoside presenting phytosphingosine as the long chain base. *Arch. Biochem. Biophys.* **405**, 205-213.
- Maier F. J. and Schäfer W.** (1999) Mutagenesis via insertional-or restriction enzyme-mediated-integration (REMI) as a tool to tag pathogenicity related genes in plant pathogenic fungi. *Biological Chemistry* **380**, 855-64.
- Mandon E.C., van Echten G., Birk R., Schmidt R.R. and Sandhoff K.** (1991) Sphingolipid biosynthesis in cultured neurons. Down-regulation of serine palmitoyltransferase by sphingoid bases. *Eur. J. Biochem.* **198**, 667-74.
- Marks D.L., Dominguez M., Wu K. and Pagano R.E.** (2001) Identification of active site residues in glucosylceramide synthase: a nucleotide-binding catalytic motif coserved with processive  $\beta$ -glucosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **276**, 26492-26498.
- Marks D.L., Paul P., Kamisaka Y. and Pagano R.E.** (2000) Methods for studying glucosylceramide synthase. *Methods Enzymol.* **311**, 50-9.
- Mizushina Y., Hanashima L., Yamaguchi T., Takemura M., Sugawara F., Saneyoshi M., Matsukage A., Yoshida S. and Sakaguchi K.** (1998) A mushroom fruiting body-inducing substance inhibits activities of replicative DNA polymerases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 17-22.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., and Erlich H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**, 263-273.

**Nakayama M., Kojima M., Ohnishi M. and Ito S.** (1995) Enzymatic formation of plant cerebroside: properties of UDP-glucose:ceramide glucosyltransferase in radish seedlings. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1882-1886.

**Newman G.R. and Hobot J.A.** (1987) Modern acrylics for post-embedding immunostaining techniques. *J. Histochem. Cytochem.* **35**, 971-981.

**Ng C.K., Carr K., McAinsh M.R., Powell B. and Hetherington A.M.** (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* **410**, 596-599.

**Norris-Cervetto E., Callaghan R., Platt F.M., Dwek R.A. and Butters T.D.** (2004) Inhibition of glucosylceramide synthase does not reverse drug resistance in cancer cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 40412-40418.

**Pike L.J.** (2004) Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem. J.* **378**, 281-292.

**Platt F.M., Neises G.R., Dwek R.A. and Butters T.D.** (1994) N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **269**, 8362-5.

**Puhalla J.E.** (1968) Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics* **60**, 461-74.

**Puhalla J.E.** (1969) The formation of diploids of *Ustilago maydis* on agar medium. *Phytopathology* **59**, 1771-2.

**Radin N.S., Shayman J.A. and Inokuchi J.** (1993) Metabolic effects of inhibiting glucosylceramide synthesis with PDMP and other substances. *Adv. Lipid Res.* **26**, 183-213.

**Riggs K.G. and McLachlan A.** (1986) A simplified screening procedure for large number of minipreparation. *Biotechnique* **4**, 310-313.

**Rowell J.B. and DeVay J. E.** (1954) Genetics of *Ustilago zaeae* in relation to basic problems of its pathogenicity. *Phytopathology* **44**, 356-362.

**Sakaki T., Zähringer U., Warnecke D.C., Fahl A., Knogge W. and Heinz H.** (2001) 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.

**Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T.** (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R.** (1977) DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463-5467.

**Schulz B., Banuett F., Dahl M., Schlesinger R., Schäfer W., Martin T., Herskowitz I. and Kahmann R.** (1990) The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.

**Senchenkov A., Litvak D.A. and Cabot M.C.** (2001) Targeting ceramide metabolism- a strategy for overcoming drug resistance. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 347-357.

**Shayman J.A. and Abe A.** (2000) Glucosylceramide synthase: assay and properties. *Methods Enzymol.* **311**, 42-9.

**Singer S.J. and Nicolson G.L.** (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731.

**Slavish J.P., Friel D.K., Oland L.A. and Polt R.** (2004) New PDMP analogues inhibit process outgrowth in an insect cell line. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 1487-1490.

**Snetselaar K.M.** (1993) Microscopic observation of *Ustilago maydis* mating interactions. *Exp. Mycol.* **17**, 345-355.

**Snetselaar K.M. and Mims C.W.** (1993) Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol. Res.* **98**, 347-355.

**Spiegel S. and Milstien S.** (2002) Sphingosin 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J. Biol. Chem.* **277**, 25851-25854.

**Sprong H., Degroote S., Claessens T., van Drunen J., Oorschot V., Westerink B.H., Hirabayashi Y., Klumperman J., van der Sluijs P. and van Meer G.** (2001) Glycosphingolipids are required for sorting melanosomal proteins in the Golgi complex, *J Cell Biol* **155**, 369-380.

**Stewart A.** (1995) Genetic Nomenclature Guide. *Trends Genet.* (supplement)

**Stock S.D., Hama H., Radding J.A., Young D.A. and Takemoto J.Y.** (2000) Syringomycin E inhibition of *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for biosynthesis of sphingolipids with very-long-chain fatty acids and mannose- and phosphoinositol-containing head groups. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1174-1180.

**Sreekrishna K., Brankamp R.G., Kropp K. E., Blankenship D.T., Tsay J., Smith P.L., Wierschke J.D., Subramaniam A. and Birkenberger L.A.** (1997) Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **190**, 55-62.

**Sweigard J., Chumley F., Carroll A., Farrall L. and Valent B.** (1997) A series of vectors for fungal transformation. *Fungal genet. Newsl.* (<http://www.fgsc.net/fgn44/sweig.html>).

**Ternes P., Franke S., Zähringer U., Sperling P. and Heinz E.** (2002) Identification and characterisation of a sphingolipid  $\Delta^4$ -desaturase family. *J. Biol. Chem.* **277**, 25512-25518.

**Thevissen K., Cammue B.P., Lemaire K., Winderickx J., Dickson R.C., Lester R.L., Ferket K.K., Van Even F., Parret A.H. and Broekaert W.F.** (2000) 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.* **97**, 9531-9536.

**Thevissen K., Warnecke D.C., Francois I.E.J.A., Leipelt M., Heinz E., Ott C., Zähringer U., Thomma B.P.H.J., Ferket K.K.A. and Cammue B.P.A.** (2004) Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J. Biol. Chem.* **279**, 3900-3905.

**Tilly J.L. and Kolesnick R.N.** (1999) Sphingolipid signaling in gonadal development and function. *Chem. Phys. Lipids* **102**, 149-155.

**Toledo M.S., Levery S.B., Straus A.H., Suzuki E., Momany M., Glushka J., Moulton J.M. and Takahashi H.K.** (1999) 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.

**Trueheart J. and Herskowitz I.** (1992) The *a* locus governs cytoduction in *Ustilago maydis*. *J. Bact.* **174**, 7831-3.

**Uemura M., Joseph R.A. and Steponkus P.L.** (1995) Cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **109**, 15-30.

**Uemura K., Ogawa A., Koga J., Iwata M. and Usami H.** (2002) Elicitor activity of cerebroside, a sphingolipid elicitor, in cell suspension cultures of rice. *Plant Cell Physiol.* **43**, 778-784.

- Uemura K., Ogawa N., Yamauchi T., Iwata M., Shimura M. and Koga J.** (2000) Cerebroside elicitors found in diverse phytopathogens activate defense responses in rice plants. *Plant Cell Physiol.* **41**, 676-683.
- Ullmann P., Ury A., Rimmel D., Benveniste P. and Bouvier-Nave P.** (1993) UDP-glucose sterol beta-D-glucosyltransferase, a plasma membrane-bound enzyme of plants: enzymatic properties and lipid dependence. *Biochimie* **75**, 713-23.
- Veldman R.J., Mita A., Cuvillier O., Garcia V., Klappe K., Medin J.A., Campbell J.D., Carpentier S., Kok J.W. and Levade T.** (2003) The absence of functional glucosylceramide synthase does not sensitize melanoma cells for anticancer drugs. *Faseb J.* **17**, 1144-1146.
- Warnecke D., Erdmann R., Fahl A., Hube B., Müller F., Zank T., Zähringer U. and Heinz E.** (1999) Cloning and functional expression of UGT genes encoding sterol glucosyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*, and *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **274**, 13048-13059.
- Warnecke D. and Heinz E.** (2003) Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 919-941.
- Weiss M., Hettmer S., Smith P. and Ladisch S.** (2003) Inhibition of melanoma tumor growth by a novel inhibitor of glucosylceramide synthase. *Cancer Res.* **63**, 3654-3658.
- Wertz P.W. and Downing D.T.** (1983) Glucosylceramides of pig epidermis: structure determination. *J. Lipid Res.* **24**, 1135-1139.
- Whitaker B.D.** (1996) Cerebroside in mature-green and red-ripe bell pepper and tomato fruits. *Phytochemistry* **42**, 627-632.
- Yamashita T., Wada R., Sasaki T., Deng C., Bierfreund U. and Sandhoff K.** (1999) A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 9142-9147.
- Yanish-Perron C., Vieira J., and Porath J.** (1989). Improved M13 cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of M13mp18 and pU19 vectors. *Gene* **33**, 103-109.
- Yuan W., Stromhaug P. E. And Dunn W.A. Jr.** (1999) Glucose-induced autophagy of peroxisomes in *Pichia pastoris* requires a unique E1-like protein. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1353-1366.
- Zeidler R.S., Leong S. and Teng P. S.** (1994) Rice blast disease. CAB International, Wallingford, UK, 626.

## 6. Anhang

### Anlage1:

Auflistung der Oligonuklidsequenzen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit bei PCR-Experimenten verwendet wurden. Nicht hybridisierende Bereiche sind unterstrichen.

Um_F	5' CGC AAT TCG TGA CTG TGA GT 3'
Um_R	5' ACG CAA AAG AAC AGC AGT CGA 3'
Um_s	5' ATG GAT CAA GCA TCC TCA CTC G 3'
Um_as	5' TCA TTG TCG TTG CAA AAG AGG A 3'
5'Um	5' ATA CTG GCC CCA AAG TCA GA 3'
3'Um	5' GAG GAC TAG GGT CTG CAT CG 3'
KKrb	5' GTG GTA ACT ACC AGC GAG TT 3'
KKlb	5' ACT AGA TCC GAT GAT AAG CTG 3'
Mg KO 5s	5' <u>TAG CGG CCG CAA</u> TGC GAT CGC TCA GAT ACC 3'
Mg KO 5as	5' <u>GAC GCG TCT</u> GTT GAA TGT GGT GTC GTC 3'
Mg KO 3s	5' <u>GAC GCG TCG GAA GAT CTC</u> ATT GAG GTA ATTCTCTTTTGAGGGGTGG 3'
Mg KO 3as	5' AAC GAC TGT TGG CAG GAT TT 3'
Hyg_s	5' <u>CGA CGC GTG</u> GAG GTC AAC ACA TCA ATG
Hyg_as	5' <u>GAA GAT CTC</u> TCT ATT CCT TTG CCC TCG 3'
Mg_s	5' TGG GAG AGT GAA CCA TGA CA 3'
Mg_as	5' AGA TGA AGT GGC GAG GAT TG 3'
P1500_s	5' TTT TAA AAA GTCGAG TAT GAG 3'
P1500_as	5' TCG TCT CTT TTC TTT TCC TGT 3'
P2000_s	5' GGC CAT ATG TTT TAA CAC CAA 3'
P2000_as	5' TTT CGT CTC TTT TCT TTT CCT T 3'
UraSanDis	5' <u>GGG TCC CCT</u> GCA GAA ATG GGG AGA TAA 3'
UraBamHlas	5' <u>GGA TCC ACT</u> AGT GGT TTT CTG GGG GTA 3'
UraF	5' <u>GGG TCC CCT</u> GCA GAA ATG GGG AGA TAA 3'
UraR	5' <u>GGA TCC ACT</u> AGT GGT TTT CTG GGG GTA 3'
KUR	5' AGG CTG CAT CAA CAA GTG TG 3'
KUF	5' AAG ATA GTT TAG ACT TCT CA 3'
sgtF	5' AGA TGT TCA AAA CAG CAC TG 3'
sgtR	5' CGA CGT TGT AGA TCC AGT AA 3'
ZeoF	5' GAT CCC CCA CAC ACC ATA 3'
ZeoR	5' AAC GCC AGC AAC GCG GCC 3'
An_s	5' <u>GGA ATT CCA</u> TGA TAA CGC TTC AAT CGA TTA CG 3'
An_Exon1Üas	5' <u>GGC GTC TAA GACAGTGCTTCCATAATTTGTAATATCCCAAAGCAAC</u> 3'
AnExon2Üs	5' <u>TGT GCT TTG GGA TAT TAC AAA TTA</u> TGG AAG CAC TGT CTTAGCGCC3'
An_as	5' <u>ATA AGA ATG CGG CCG CTC</u> ACC GAT TCC CCC GTG TCT GTC GT 3'
5'hp	5' ATA CTG GAA CTA CTT GAG 3'
3'hp	5' AAG TCC CCA GTT GTA AGT TGC 3'
Hp-Exon	5' CAG AAG CAG AGG TCG TGT 3'

## Anlage 2

**Konstrukt: pGURASGT**zur Deletion der Sterol-Glucosyltransferase in *P. pastoris***Merkmale:**

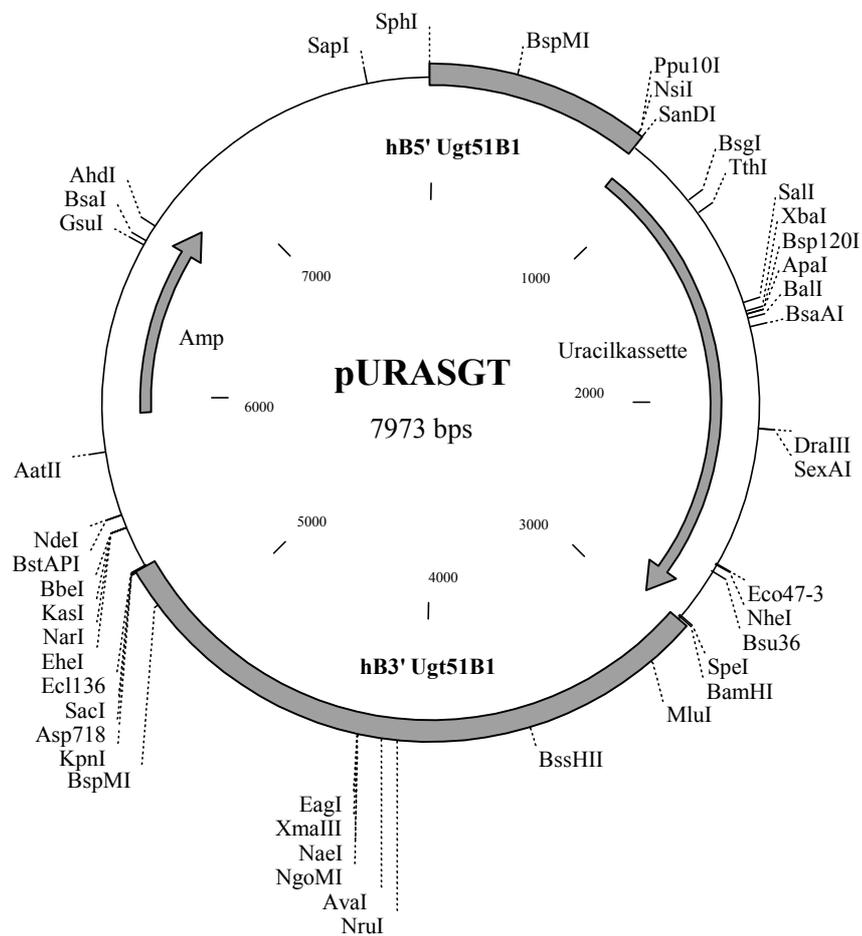
hB5'Ugt51B1

hB3'Ugt51B1

Amp

**Beschreibung:**5'-homologer Bereich des *UGT51B1*-Gens aus *P. pastoris*3'-homologer Bereich des *UGT51B1*-Gens aus *P. pastoris*

Ampicillin-Resistenz



## Anlage 3

**Konstrukt: pUCUmKO**zur Deletion der Glucosylceramid-Synthase in *U. maydis***Merkmale:**

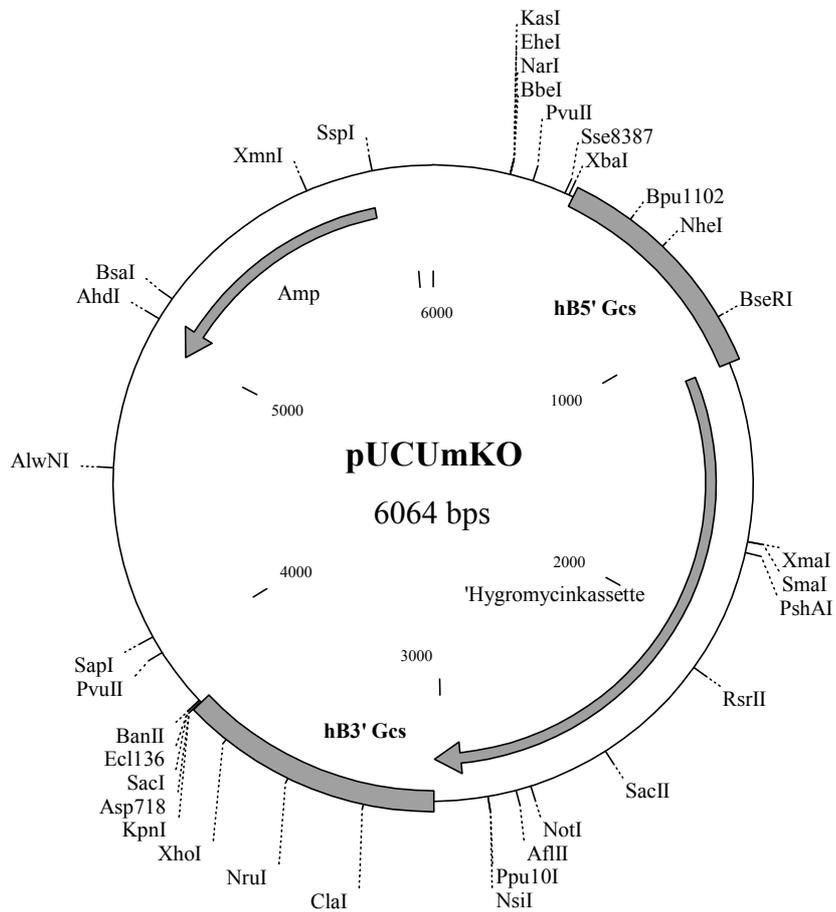
hB5'Gcs

hB3'Gcs

Amp

**Beschreibung:**5'-homologer Bereich des *GCS*-Gens aus *U. maydis*3'-homologer Bereich des *GCS*-Gens aus *U. maydis*

Ampicillin-Resistenz



## Anlage 4

**Konstrukt: pBlMgKO**zur Deletion der Glucosylceramid-Synthase in *M. grisea***Merkmale:**

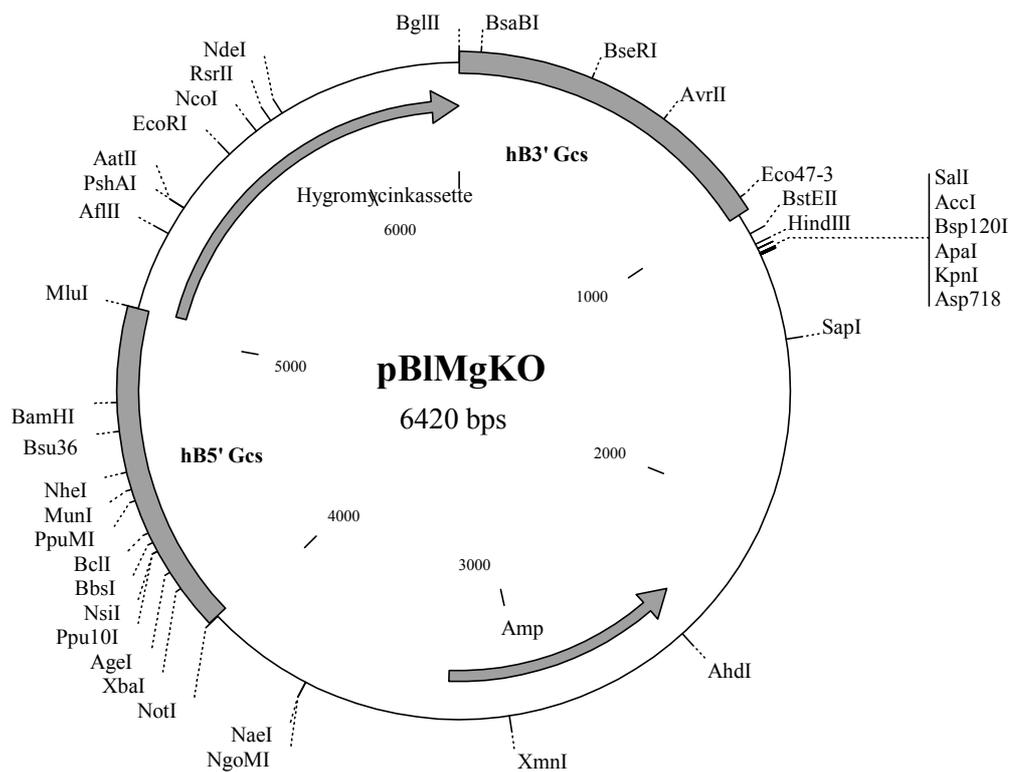
hB5'Gcs

hB3'Gcs

Amp

**Beschreibung:**5'-homologer Bereich des *GCS*-Gens aus *M. grisea*3'-homologer Bereich des *GCS*-Gens aus *M. grisea*

Ampicillin-Resistenz





## Anlage 6

**Konstrukte: pCAMBIA-35S-EIE**

zur posttranskriptionalen Gen-Inaktivierung des Glucosylceramid-Synthase-Gens von *A. thaliana*

**Merkmale:**

pVS1 REP

Hyg

Kan

LB

RB

pBR322

35S-P

Exon s bzw. as

Vektorgrundgerüst: pCAMBIA 2300 (CAMBIA)

**Beschreibung:**Replikationsursprung für *A. tumefaciens*

Hygromycin-Resistenz

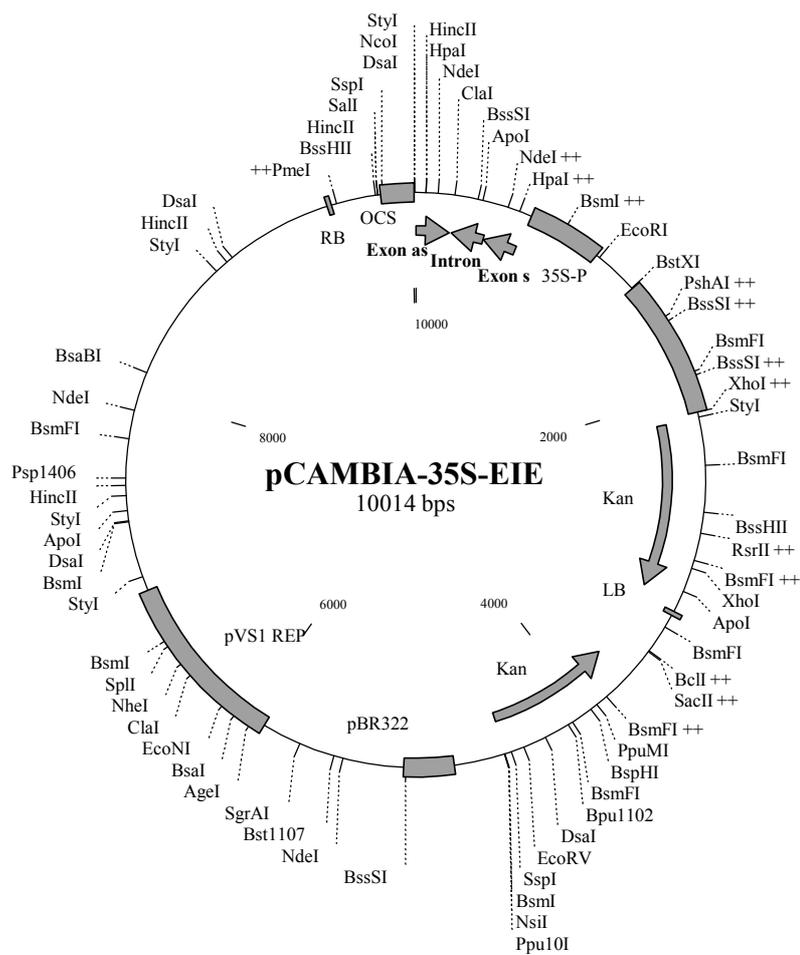
Kanamycin-Resistenz

Left Border

Right Border

Replikationsursprung für *E. Coli*

35S-Promoter

Gcs-Exon in *sense*- bzw. *antisense*-Orientierung

## Anlage 7

## Expressionsvektor pPIC3.5 (Invitrogen)

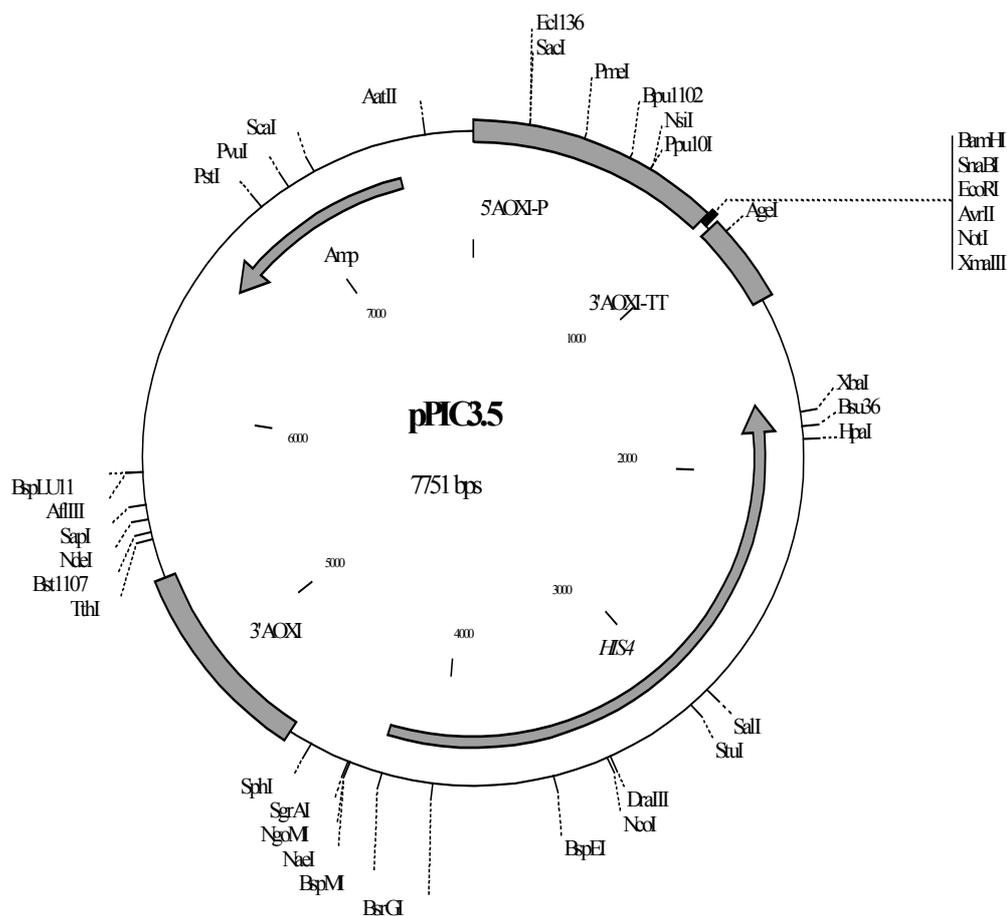
zur Expression der untersuchten Glucosylceramid-Synthase-Gene in *P. pastoris*

## Merkmale:

## Beschreibung:

5' AOXI-P  
 3' AOXI TT  
 3' AOXI  
 Amp  
 HIS4

Alkoholoxidase-Promoter  
 Alkoholoxidase-Terminator  
 Alkoholoxidase-3' homologer Bereich  
 Ampicillin-Resistenz  
 Histidin-Selektionskassette



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2001 bis Juni 2005 in der physiologischen Abteilung im Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten der Universität Hamburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Ernst Heinz durchgeführt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ernst Heinz für die interessante Themenstellung, für sein reges Interesse an der Arbeit, sowie seine intensive Betreuung und seine anregende Diskussions- und Hilfsbereitschaft, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Bei Herrn Dr. Dirk Warnecke bedanke ich mich für die intensive Betreuung. Seine Vorschläge sowie die sehr gute Kooperation und die Diskussionsbereitschaft waren unerlässlich für die Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Schäfer danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. U. Zähringer und PD Dr. B. Lindner bedanke ich mich für die Strukturaufklärungen der in dieser Arbeit gereinigten Lipide.

Herrn Prof. Dr. Peter Schreier und Herrn Dr. Rüdiger Sülmann von BayerCropScience danke ich für die Unterstützung bei der Infektion von *Zea mays* mit dem phytopathogenen Pilz *Ustilago maydis*.

Bei Frau Gisliind Bräcker möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bei der fotografischen Dokumentation der infizierten Maispflanzen bedanken.

Herrn Prof. Dr. H. Quader und Frau I. Wachholz danke ich für die Einbettung und die Herstellung der Sprossquerschnitte von *A. thaliana* sowie für die Hilfestellung bei der Analyse des gefärbten Gewebes.

Darüber hinaus danke ich allen Labormitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Heinz für das angenehme freundschaftliche Arbeitsklima sowie für die Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, alle wörtlich und inhaltlich aus anderen Quellen entnommenen Stellen kenntlich gemacht sowie die Inanspruchnahme persönlicher Hilfen namentlich ausgeführt habe.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren zu eröffnen.

Hamburg, den

Inga Hillig

Teile dieser Dissertation sind in der folgenden Publikation erschienen:

**Hillig I., Leipelt M., Ott C., Zähringer U., Warnecke D. and Heinz E. (2003)**  
Formation of glucosylceramide and sterol glucoside by a UDP-glucose-dependent glucosylceramide synthase from cotton expressed in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett* **553**, 365-369.