

Identifizierung und Charakterisierung
einer Familie von
Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen
mit Mitgliedern aus
Tieren, Pflanzen und Pilzen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt
von Philipp Ternes
am 5. März 2003

unter Anleitung von
Prof. Dr. Ernst Heinz

Institut für Allgemeine Botanik
Fachbereich Biologie
Universität Hamburg

Für Wiebke und meine Eltern

„Der Blick einer Sphinx ist was ganz und gar anderes, als der Blick irgendeines anderen Wesens. Wir beide und alle anderen, wir nehmen durch unseren Blick etwas auf. Wir sehen die Welt. Aber eine Sphinx sieht nichts, sie ist in gewissem Sinne blind. Dafür senden ihre Augen etwas aus. Und was ist das, was ihr Blick aussendet? Alle Rätsel der Welt. Deshalb schauen die beiden Sphinxen sich immerfort gegenseitig an. Denn den Blick einer Sphinx kann nur eine andere Sphinx ertragen.“

Michael Ende, Die unendliche Geschichte

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Struktur und Biosynthese der Sphingolipide	2
1.2	Modifikationen am Ceramid-Gerüst	8
1.3	Membrangebundene Desaturasen und Hydroxylasen	11
1.4	Signalübermittlung durch Sphingolipide	14
1.5	Identifizierung und biochemische Charakterisierung einer Familie putativer Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen	18
2	Experimentelle Durchführung	21
2.1	Materialien	21
2.2	Bioinformatik	23
2.3	Sequenzierung und Klonierung putativer Sphingolipid- Δ 4-Desatu- rasen	30
2.4	Kultur und Transformation von <i>E. coli</i>	39
2.5	Kultur und Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	43
2.6	Bedingungen für die Expression putativer Sphingolipid- Δ 4-Desa- turasen in <i>S. cerevisiae</i>	47
2.7	HPLC-Analyse der Sphingobasen von <i>S. cerevisiae</i>	49
2.8	NMR-Spektroskopie der Sphingobasen von <i>S. cerevisiae</i>	53
3	Ergebnisse	58
3.1	Identifizierung einer Familie putativer Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen	58
3.2	Einteilung der membrangebundenen Desaturasen und Hydroxyla- sen in Familien mit TRIBE-MCL	62
3.3	Graphische Darstellung der Familien mit BioLayout und LinkLay- out	64

3.4	Phylogenie der Desaturasen	66
3.5	Expression putativer Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen in <i>S. cerevisiae</i>	68
3.6	Optimierung der Expression der Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen . .	72
3.7	HPLC/MS- und ESI/MS/MS-Analyse der bei der Expression in <i>S. cerevisiae</i> gebildeten Δ 4-ungesättigten Sphingobasen	80
3.8	$^1\text{H-NMR}$ -Analyse der bei der Expression in <i>S. cerevisiae</i> gebildeten Δ 4-ungesättigten Sphingobasen	83
4	Diskussion	88
4.1	<i>In silico</i> -Identifizierung einer neuen Δ 4-Desaturase-/C4-Hydroxy- lase-Familie	89
4.2	Einordnung der neuen Δ 4-Desaturase-/C4-Hydroxylase-Familie . .	92
4.3	Evolution membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen . .	96
4.4	<i>In vivo</i> -Funktionen der Sphingolipid- Δ 4-Desaturase	110
4.5	Biosynthese und Signalübermittlung; Perspektiven	114
	Zusammenfassung	118
	Danksagung	120
	Literaturverzeichnis	121

Abbildungsverzeichnis

1.1	Strukturen von freien Sphingobasen und Ceramid	3
1.2	Beispiele für Sphingolipide aus Säugetieren	4
1.3	Beispiele für Sphingolipide aus Pflanzen	5
1.4	Beispiele für Sphingolipide aus Pilzen	6
3.1	<i>Alignment</i> der putativen Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen	61
3.2	Darstellung der Familien membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen mit BioLayout Java	65
3.3	HPLC-Chromatogramme der bei der Expression putativer Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen gebildeten Sphingobasen (DNP-derivatisiert)	69
3.4	MS/MS-Sekundärionenspektren DNP-derivatisierter Sphingobasen	81
3.5	$^1\text{H-NMR}$ -Spektren der bei der Expression von <i>C. albicans</i> Des1p gebildeten gesättigten und ungesättigten Sphingobasen (per- <i>N,O</i> -acetyliert)	84
4.1	Stammbaum membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen	93
4.2	Stammbaum der Familie der Δ 9-Desaturasen	100
4.3	Stammbaum der Familie der Δ 12- und Δ 15-Desaturasen	102
4.4	Stammbaum der Familie der „ <i>Front end</i> “-Desaturasen	105
4.5	Stammbaum der Familie der Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen	109

Tabellenverzeichnis

2.1	Sequenzierprimer	32
2.2	GenBank-Zugangsnummern putativer Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen	33
2.3	PCR-Primer	34
2.4	<i>Dropout-Powder</i> für die Herstellung von CM-Medium	44
3.1	Bezeichnungen der Mitglieder der DES-Familie	60
3.2	Einteilung der membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen in Familien mit TRIBE-MCL	63
3.3	Anteile an Sphingosin (d18:1) und Phytosphinganin (t18:0) bei der Expression putativer Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen	71
3.4	Kulturbedingungen: Inkubationszeiten	73
3.5	Kulturbedingungen: Medien	74
3.6	Kulturbedingungen: Hitzeschock	76
3.7	Pseudomolekülonen DNP-derivatisierter Sphingobasen	82
3.8	Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten des ^1H -NMR-Spektrums von per- <i>N,O</i> -acetyliertem Sphingosin	85

Abkürzungsverzeichnis

A_{260} , A_{280}	Absorption bei 260 bzw. 280 nm
ACP	<i>Acyl carrier protein</i> (Acylgruppen übertragendes Protein)
ANS	Anilinnaphthalinsulfonsäure, 0,2% (w/v) in Methanol
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserum-Albumin)
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (von einer RNA-Matrize <i>in vitro</i> synthetisierte DNA)
CoA	Coenzym A
$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY	$^1\text{H}, ^1\text{H}$ - <i>Correlated spectroscopy</i> ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -korrelierte Kernresonanz-Spektroskopie)
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DE	Diethylether
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Deoxyribonukleinsäure)
DNP-	2,4-Dinitrophenyl-
dNTP	Deoxynukleosid-Triphosphat
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Elektrosprüh-Ionisierung)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FDNB	1-Fluor-2,4-dinitrobenzol
g	Erdbeschleunigung $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
GIPC	Glykosylinositolphosphorylceramid
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie)

IPC	Inositolphosphorylceramid
MIPC	Mannosylinositolphosphorylceramid
M(IP) ₂ C	Mannosyl-(Inositolphosphoryl) ₂ -Ceramid
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (Botschafter-RNA)
MS	Massenspektrometrie
NADH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotidphosphat, reduzierte Form
<i>n. d.</i>	nicht detektiert
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglykol
ppm	<i>Parts per million</i> (Millionstel Teile)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>Revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
mol%	Mol-Prozent (Prozentangabe auf die Stoffmenge bezogen)
% (v/v)	Prozent <i>Volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
% (w/v)	Prozent <i>Weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen, 1 g entspricht dabei 1 ml)

Nomenklatur der Sphingobasen

Die Nomenklatur der Sphingobasen erfolgt in Anlehnung an die Empfehlungen der *IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature* (JCBN) von 1997 [15].

- Die einfachste Sphingobase, (2*S*, 3*R*)-2-Aminooctadecan-1,3-diol, wird mit dem Namen *Sphinganin* bezeichnet. Dabei wird, wenn nicht anders angegeben, stehts eine Kettenlänge von 18 C-Atomen und die Konfiguration (2*S*, 3*R*) impliziert.
- Von Sphinganin abgeleitete Sphingobasen werden im Text wie folgt bezeichnet:
 - Eine Sphingobase mit einer Doppelbindung wird mit dem Grundnamen *Sphingenin*, eine mit zwei Doppelbindungen mit dem Grundnamen *Sphingadienin* bezeichnet. Die Position der Doppelbindung wird der Silbe „en“ vorgestellt, also z.B. *Sphing-8-enin* für (2*S*, 3*R*)-2-Aminooctadec-8-en. Zur Bezeichnung der Konfiguration der Doppelbindung wird die *E/Z*-Nomenklatur verwendet, also (*E*)-*Sphing-8-enin* oder (4*E*, 8*Z*)-*Sphinga-4,8-dienin*.
 - Eine zusätzliche Hydroxygruppe wird mit dem Präfix „*Hydroxy*–“ bezeichnet, also z.B. *4-Hydroxysphinganin*. Die JCBN empfiehlt hierfür den vollen IUPAC-Namen, also in diesem Beispiel *2-Aminooctadecan-1,3,4-triol*.
- Die Konfiguration der chiralen C-Atome wird im Text meistens in Anlehnung an die Fischer-Nomenklatur für Kohlenhydrate angegeben. Folgende Bezeichnungen werden im Text für Sphingobasen mit zwei oder drei chiralen C-Atomen verwendet:

- *D-erythro* entspricht $(2S, 3R)$
- *L-threo* entspricht $(2S, 3S)$
- *D-ribo* entspricht $(2S, 3S, 4R)$
- Folgende Trivialnamen werden im Text verwendet:
 - *Sphingosin* für *D-erythro-(E)*-Sphing-4-enin.
 - *Phytosphinganin* für *D-ribo-4*-Hydroxysphinganin.

Die Konfiguration der Doppelbindungen und der chiralen C-Atome ist bei Verwendung der Trivialnamen implizit festgelegt.

- An einigen Stellen im Text wird eine Kurzform der Nomenklatur verwendet, z.B. $d18:0$, $t18:0$ oder $d18:1^{4E}$:
 - *d* steht für eine Sphingobase mit 2 Hydroxygruppen, *t* für eine mit drei Hydroxygruppen. Die Konfiguration der chiralen C-Atome entspricht der bei Sphinganin bzw. Phytosphinganin.
 - Die Zahl vor dem Doppelpunkt gibt die (unverzweigte) Länge der Kohlenwasserstoffkette in C-Atomen an.
 - Die Zahl hinter dem Doppelpunkt gibt die Anzahl der Doppelbindungen an. Die hochgestellte Zahl gibt die Position der Doppelbindung an, *E* oder *Z* die Konfiguration.

Nach diesen Regeln steht $d18:0$ für Sphinganin, $t18:0$ für Phytosphinganin und $d18:1^{4E}$ für Sphingosin.

1 Einleitung

Das Cytoplasma der lebenden Zellen ist von einer Membran umgeben, die aus Proteinen und Lipiden besteht. Die Lipide haben dabei nicht nur strukturelle Aufgaben, sie sind auch an der Kommunikation einer Zelle mit ihrer Umgebung beteiligt.

Signale von Nachbarzellen und aus der Umwelt erreichen zuerst die Plasmamembran. Sie werden von hier durch spezifische Mechanismen wahrgenommen und dann ins Innere der Zelle weitergeleitet. Die Zelle kann dann durch Anpassung ihres Stoffwechsels und Steuerung der Genexpression auf diese Reize reagieren. An der Aufnahme und Weiterleitung dieser Signale sind die Membranlipide sowohl aktiv als auch passiv beteiligt. Sie bestimmen die Struktur der Membran und steuern so die räumliche Anordnung und die gegenseitigen Interaktionen der in sie eingebetteten Proteine. Unter diesen Proteinen befinden sich Rezeptoren und Komponenten von Signalübermittlungswegen, aber auch Ionenkanäle und metabolische Enzyme. Die Membranlipide und besonders die Zwischenstufen ihrer Biosynthese und ihres Abbaus stellen auch selbst wichtige Botenstoffe dar, die Signale ins Innere der Zellen weiterleiten.

In eukaryoten Zellen gibt es drei große Klassen von Membranlipiden. Diese sind die Glycerolipide, die Sterole und die Sphingolipide. Sie unterscheiden sich durch ihre chemische Struktur. Glycerolipide haben als Rückgrat einen Glycerinrest, an den zwei Fettsäurereste und eine polare Kopfgruppe durch Esterbindungen geknüpft sind. Sterole haben eine völlig andere Struktur, die sich auf sechs Isopreneinheiten zurückführen lässt. Sie bestehen aus einem viergliedrigen aliphatischen Ringsystem mit einer kurzen Kohlenwasserstoffkette als „Schwanz“. Die Struktur der Sphingolipide ähnelt äußerlich derjenigen der Glycerolipide. Sie besitzen statt eines Glycerinrestes einen langkettigen Aminoalkohol, die Sphingobase, als Rückgrat. Sie ist über eine Amidbindung mit einer langkettigen Fettsäure

und über eine Ester- oder glykosidische Bindung mit einer polaren Kopfgruppe verknüpft. Die Sphingobase entsteht durch die Kondensation einer Fettsäure mit Serin. Die Struktur und die Biosynthese der Sphingolipide sind in Abschnitt 1.1 näher beschrieben.

Die Glycerolipide bilden die typische *Bilayer*-Struktur der Plasmamembran. Die Zwischenstufen ihrer Biosynthese und ihres Abbaus dienen als Signalmoleküle. Dies sind zum Beispiel Diacylglycerol, Inositol-1,4,5-Trisphosphat, Phosphatidsäure, Lysophosphatidsäure und freie Fettsäuren. Sterole modulieren die biophysikalischen Eigenschaften der Plasmamembran. Durch ihre kompakte, hydrophobe Struktur lagern sie sich zwischen die übrigen Lipidmoleküle und bewirken einen fließenden Übergang zwischen flüssig-kristalliner und fest-kristalliner Phase der Membran. Eine Reihe wichtiger Botenstoffe ist von den Sterolen abgeleitet.

Die Sphingolipide bilden mit Sterolen zusammen abgegrenzte Bereiche in der Plasmamembran, die sogenannten *Lipid rafts* [27, 82]. Diese Membranzentren bilden Organisationszentren, in denen viele Membranproteine auf engem Raum zusammengelagert sind. Sie tragen so zur räumlichen und funktionellen Integration der Signalübermittlungswege bei. Wie auch bei den Glycerolipiden dienen die Zwischenstufen der Biosynthese und des Abbaus von Sphingolipiden als Signalmoleküle. Diese sind zum Beispiel an der Regulation von Zellteilung und Apoptose, der Schließung der Spaltöffnungen von Pflanzen bei Wassermangel, der Reaktion auf Hitzestress bei Hefe, der Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und phytopathogenen Pilzen und der Steuerung des Entwicklungszyklus von Pilzen beteiligt. Diese Beispiele der Beteiligung von Sphingolipiden an der Signalübermittlung sind in Abschnitt 1.4 näher beschrieben.

1.1 Struktur und Biosynthese der Sphingolipide

Den Kern der Sphingolipide bildet das *Ceramid*. Es ist über zwei lange Kohlenwasserstoffketten in der Membran verankert. Das Ceramid besteht aus einem langkettigen Aminoalkohol, der *Sphingobase*, und einer langkettigen Fettsäure, die mit der Sphingobase über eine Amidbindung verknüpft ist. An die C1-Hydroxygruppe

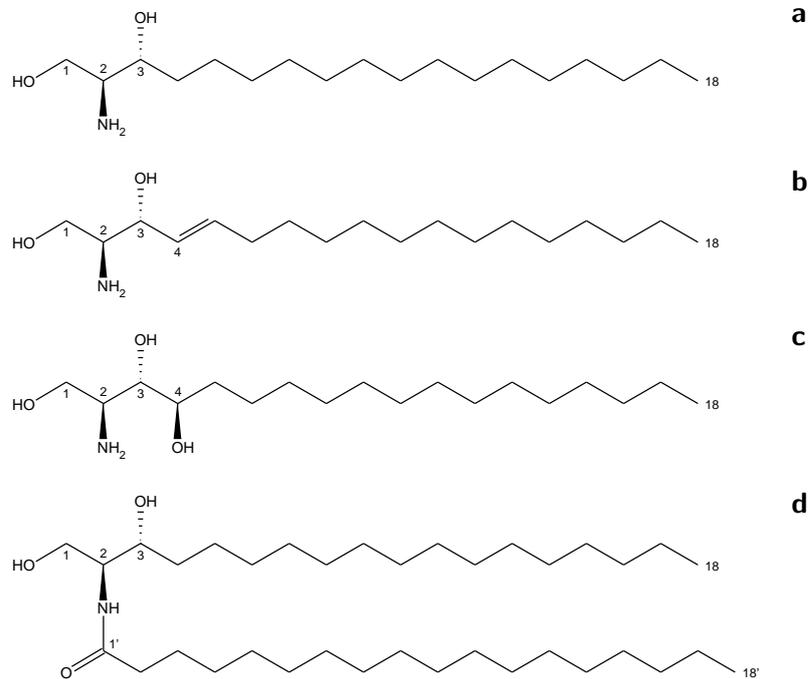


Abbildung 1.1: Strukturen von freien Sphingobasen und Ceramid. **a** *D-erythro*-Sphinganine, **b** *D-erythro*-Sphingosin (*D-erythro-(E)*-Sphing-4-enin), **c** *D-ribo*-Phytosphinganine (*D-ribo*-4-Hydroxysphinganine), **d** Ceramid mit Sphinganine als Sphingobase und Stearinsäure als Fettsäure („Dihydroceramid“)

des Ceramids ist bei komplexen Sphingolipiden eine polare Kopfgruppe geknüpft. Die Struktur des Ceramids und einiger Sphingobasen ist in Abbildung 1.1 gezeigt.

Die Sphingobase und die langkettige Fettsäure des Ceramids tragen verschiedene funktionelle Gruppen. Im einfachsten Fall trägt die Sphingobase eine Aminogruppe an ihrem C2-Atom und je eine Hydroxygruppe an ihrem C1- und C3-Atom. Die Aminogruppe am C2- und die Hydroxygruppe am C3-Atom liegen beide in der *D*-Konfiguration vor. Die Kohlenwasserstoffkette ist typischerweise 18 C-Atome lang. Diese einfachste Sphingobase heißt *Sphinganine* oder (2*S*, 3*R*)-2-Aminooctadecan-1,3-diol (siehe Abbildung 1.1a). Sie entsteht durch die Kondensation der aktivierten Fettsäure Palmitoyl-CoA (16:0-CoA) und der Aminosäure L-Serin. Diese Reaktion wird durch das Enzym *Serin-Palmitoyltransferase* katalysiert. Die dabei entstehende Ketoverbindung heißt *3-Ketosphinganine*. Sie

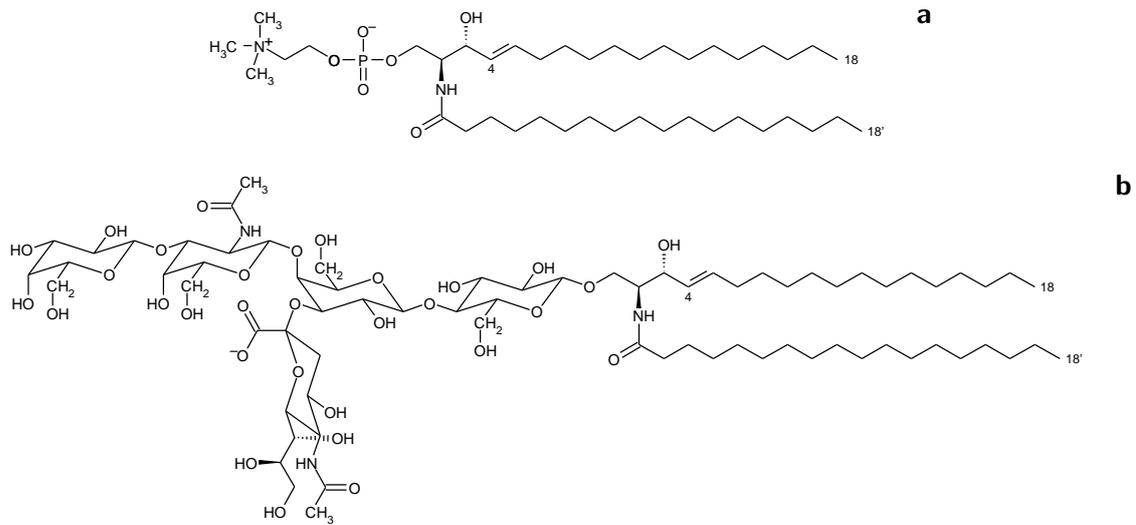


Abbildung 1.2: Beispiele für Sphingolipide aus Säugetieren. **a** Sphingomyelin aus Säugetieren mit Phosphocholin als Kopfgruppe, Sphingosin als Sphingobase und Stearinsäure als Fettsäure. **b** Gangliosid GM1 des Menschen mit einem Oligosaccharid bestehend aus Galaktose, Glukose, *N*-Acetylgalaktosamin und *N*-Acetylneuraminsäure. Der Ceramidrest hat Sphingosin als Sphingobase und Stearinsäure als Fettsäure. Die vollständige Bezeichnung ist 4-(β -D-Galaktosyl-(1 \rightarrow 3))- β -D-*N*-Acetylgalaktosamin)-3-(α -D-*N*-Acetylneuraminy)- β -D-Galaktosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glukosyl-(1 \rightarrow 1)-Ceramid [60].

wird vom Enzym *3-Ketosphingarin-Reduktase* unter Verbrauch eines NAD(P)H zum Sphingarin reduziert.

Die C1-Hydroxygruppe des Sphinganins entspricht der Hydroxygruppe des Serins. Die C2-Aminogruppe des Sphinganins entspricht der Aminogruppe des Serins. Die ursprüngliche Konfiguration dieser Aminogruppe wird bei der Synthese des Sphinganins beibehalten (nur die Bezeichnung ändert sich von L nach D). Die Carboxygruppe des Serins wird bei der Kondensation mit der Fettsäure abgespalten. Die C3-Hydroxygruppe des Sphinganins geht aus der Carboxygruppe der Fettsäure hervor. Bei der Reduktion des 3-Ketosphinganins zu Sphingarin entsteht an dieser Stelle ein neues chirales Zentrum.

Die C2-Aminogruppe des Sphinganins ist im Ceramid über eine Amidbindung mit einer langkettigen Fettsäure verknüpft (siehe Abbildung 1.1d). Die Ketten-

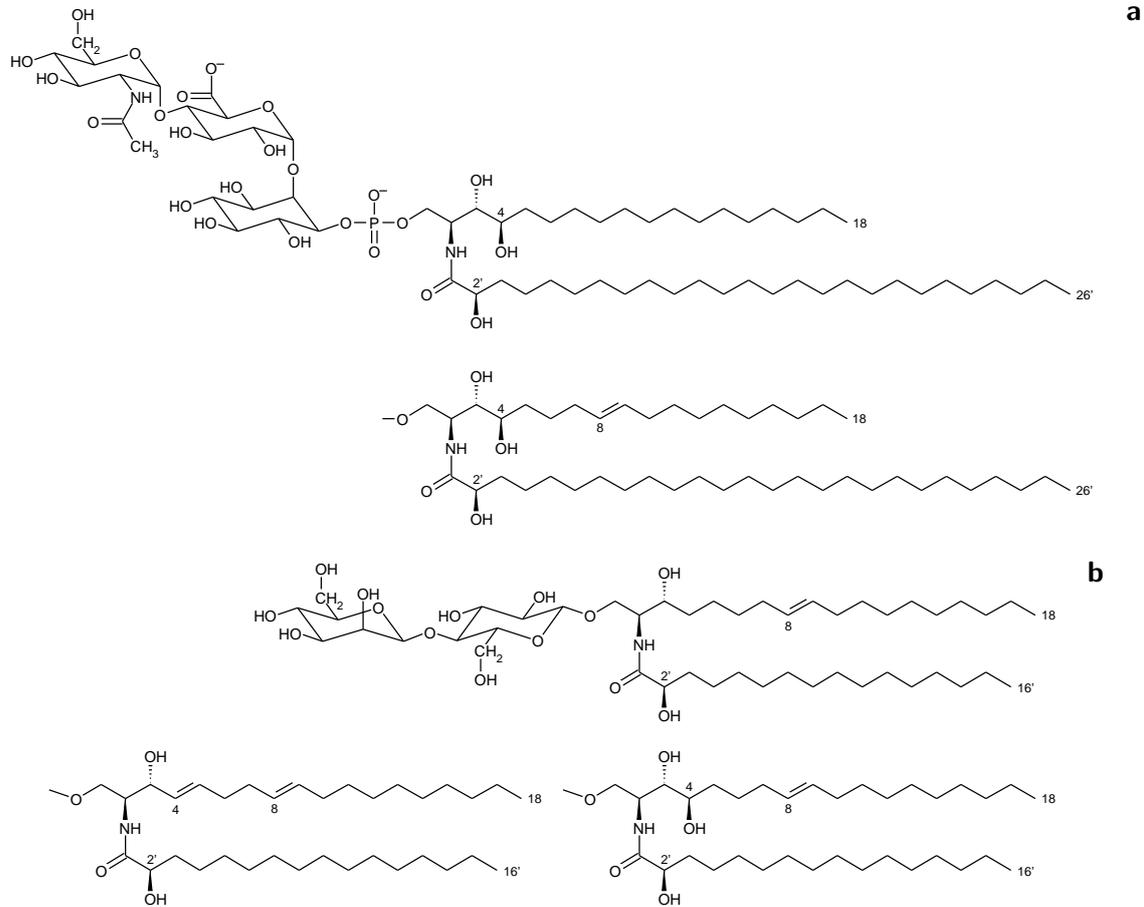


Abbildung 1.3: Beispiele für Sphingolipide aus Pflanzen. **a** Glykosylinositolphosphorylceramid (GIPC) aus *Nicotiana tabacum* (Tabak) mit einer Kopfgruppe bestehend aus *N*-Acetylglukosamin, Glukuronsäure und Phosphoinositol in *all*- α -Verknüpfung. Der Ceramidrest besteht aus Phytosphinganine als Sphingobase und 2-Hydroxyhexacosansäure als Fettsäure. Zusätzlich ist ein Ceramidrest mit 4-Hydroxysphing-8-enin als Sphingobase gezeigt. Die $\Delta 8$ -Doppelbindung kann sowohl in der (*E*)- als auch in der (*Z*)-Konfiguration vorliegen. Die vollständige Bezeichnung ist α -D-*N*-Acetylglukosamin-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glukuronosyl-(1 \rightarrow 2)-D-*myo*-Inositol-1-*O*-Phosphoceramid [40]. **b** Cerebrosid aus *Triticum aestiva* (Weizen) mit einer Kopfgruppe bestehend aus Mannose und Glukose in *all*- β -Verknüpfung. Der Ceramidrest besteht aus Sphing-8-enin als Sphingobase und 2-Hydroxyhexadecansäure als Fettsäure. Zusätzlich sind zwei Ceramidreste mit Sphinga-4,8-dienin bzw. 4-Hydroxysphing-8-enin als Sphingobasen gezeigt. Die $\Delta 4$ -Doppelbindung liegt immer in der (*E*)-Konfiguration vor, die $\Delta 8$ -Doppelbindung kann sowohl in der (*E*)- als auch in der (*Z*)-Konfiguration vorliegen. Die vollständige Bezeichnung ist β -D-Mannosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glukosyl-(1 \rightarrow 1)-Ceramid [32].

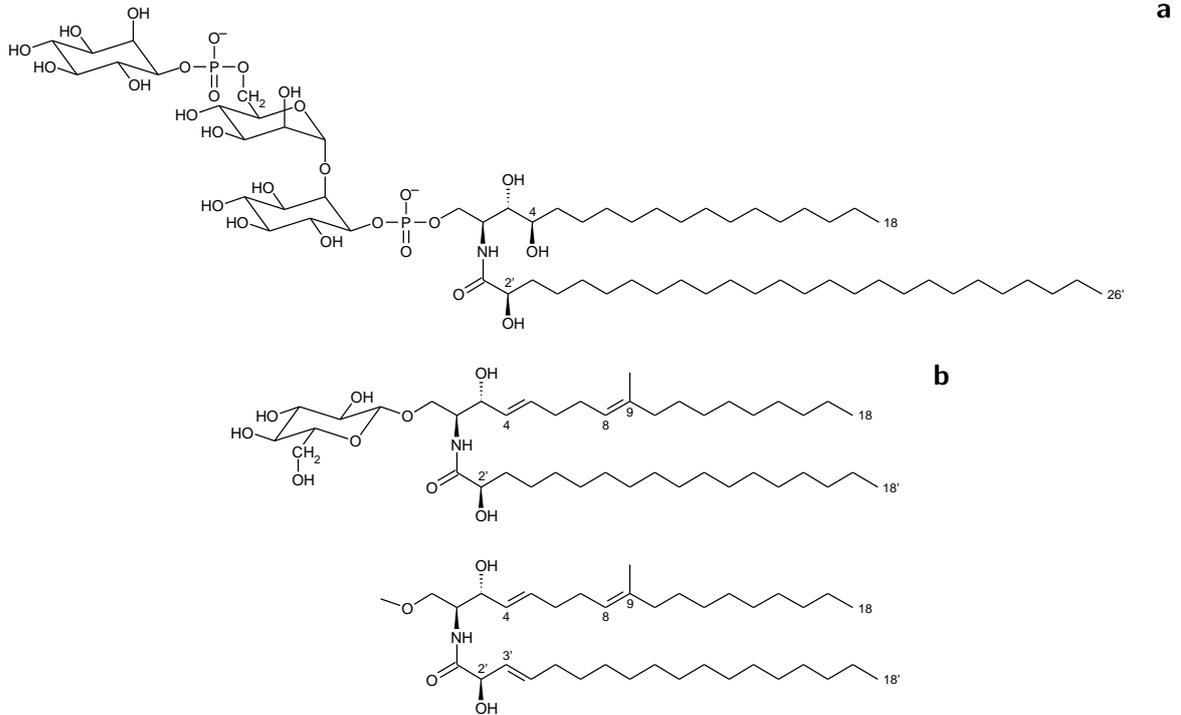


Abbildung 1.4: Beispiele für Sphingolipide aus Pilzen. **a** Mannosyl-(Inositolphosphoryl)₂-Ceramid (M(IP)₂C) aus der Hefe *S. cerevisiae*. Der Ceramidrest besteht aus Phytosphingamin als Sphingobase und 2-Hydroxyhexacosansäure als Fettsäure. Die vollständige Bezeichnung ist D-*myo*-Inositolphosphoryl-(1→6)- α -D-Mannosyl-(1→2)-D-*myo*-Inositol-1-O-Phosphoceramid [64]. **b** Cerebrosid des pathogenen Pilzes *Histoplasma capsulatum* mit Glukose als Kopfgruppe. Der Ceramidrest besteht aus (4*E*, 8*E*)-9-Methylsphing-4,8-dienin als Sphingobase und 2-Hydroxyoktadecansäure als Fettsäure. Zusätzlich ist ein Ceramidrest mit (*E*)-2-Hydroxyoktadek-3-ensäure als Fettsäure gezeigt. Die vollständige Bezeichnung ist β -D-Glukosyl-(1→1)-Ceramid [89, 113].

länge dieser Fettsäure beträgt typischerweise 24 oder 26 C-Atome. Ceramid kann auf zwei verschiedene Arten synthetisiert werden. Das Enzym *Ceramid-Synthase* bildet Ceramid in einer irreversiblen Reaktion aus Sphingamin und einer durch CoA aktivierten Fettsäure. Das Enzym *Ceramidase* bildet Ceramid aus Sphingamin und einer freien Fettsäure in einer reversiblen Reaktion. Die Ceramidase ist deshalb sowohl an der Biosynthese als auch am Abbau des Ceramids beteiligt.

In komplexen Sphingolipiden ist die C1-Hydroxygruppe des Ceramids mit einer polaren Kopfgruppe verknüpft. Diese kann zum Beispiel aus einem oder mehreren Zuckerresten bestehen. In diesem Fall bezeichnet man das komplexe Sphingolipid als *Cerebrosid*. Ein typisches Cerebrosid mit nur einem Zuckerrest ist das *Glukosylceramid* (siehe Abbildung 1.4b). Es wird vom Enzym *Glukosylceramid-Synthase* (*Ceramid-Glukosyltransferase*) aus einem Ceramid und UDP-Glukose gebildet. Der Glukoserest ist über eine β -(1 \rightarrow 1)-glykosidische Bindung mit der C1-Hydroxygruppe des Ceramids verknüpft. In komplexen Cerebrosiden sind verschieden Zuckerreste zu einem Oligosaccharid kombiniert (siehe Abbildung 1.3b). Dabei kommen auch Zuckerderivate wie *N*-Acetylglukosamin, *N*-Acetylgalaktosamin und Glukuronsäure vor. Cerebroside kommen bei Pflanzen, Pilzen und Tieren vor. Einer der wenigen eukaryoten Organismen, der keine Cerebroside enthält, ist die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Bei Tieren gibt es von den Cerebrosiden abgeleitete Varianten der komplexen Sphingolipide, die *Ganglioside* (siehe Abbildung 1.2b). Bei ihnen besteht die polare Kopfgruppe aus einem Oligosaccharid mit mindestens einem der sauren Zuckerderivate *N*-Acetylneuraminsäure oder *N*-Glykoylneuraminsäure.

Bei einer weiteren großen Gruppe der komplexen Sphingolipide ist die C1-Hydroxygruppe des Ceramids mit dem Phosphatrest von 1-Phospho-*myo*-Inositol über eine Esterbindung verknüpft. Diese Sphingolipide bezeichnet man als *Glykosylinositolphosphorylceramide* (GIPCs, auch *Phytoglykolipide* oder *Phytosphingolipide*, siehe Abbildung 1.3a und 1.4a). Sie kommen bei Pflanzen und Pilzen vor. Die Phosphoinositol-Einheit stammt von Phosphatidylinositol und wird bei Pilzen durch das Enzym *IPC-Synthase* (*Phosphatidylinositol:Ceramid-*

Phosphoinositoltransferase) auf die C1-Hydroxygruppe des Ceramids übertragen. An die C2-Hydroxygruppe des Phosphoinositols können Zuckerreste oder auch weitere Phosphoinositol-Einheiten angehängt werden. Bei Tieren gibt es eine andere Gruppe komplexer Sphingolipide, die einen Phosphatrest enthalten. Beim *Sphingomyelin* ist die C1-Hydroxygruppe des Ceramids über eine Esterbindung mit dem Phosphatrest von Phosphocholin verknüpft (siehe Abbildung 1.2a). Die Phosphocholin-Einheit stammt von Phosphatidylcholin und wird durch das Enzym *Sphingomyelin-Synthase* (*Phosphatidylcholin:Ceramid-Phosphocholintransferase*) auf die C1-Hydroxygruppe des Ceramids übertragen.

Die Biosynthese von Glykosylinositolphosphorylceramiden und Sphingomyelin führt zu einer interessanten Verknüpfung des Sphingolipid- und des Glycerolipid-Stoffwechsels. Bei der Übertragung einer Phosphoinositol-Einheit von Phosphatidylinositol auf Ceramid wird ein Molekül Phosphatidylinositol in Diacylglycerol umgewandelt. Bei der Sphingomyelin-Synthese wird durch die Übertragung einer Phosphocholin-Einheit von Phosphatidylcholin auf Ceramid ein Molekül Phosphatidylcholin ebenfalls in Diacylglycerol umgewandelt. Da sowohl Diacylglycerol als auch Ceramid als Signalübermittler wirken, bedeutet diese Verknüpfung des Stoffwechsels von Glycerolipiden und Sphingolipiden gleichzeitig eine Verknüpfung der entsprechenden Signalübermittlungswege.

Die Sphingolipid-Biosynthese wurde vor allem in Säugetieren [60] und in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* [19] aufgeklärt. Eine Übersicht über die Sphingolipid-Biosynthese in Pflanzen und in Pilzen findet sich in [69] und [120].

1.2 Modifikationen am Ceramid-Gerüst

Die Sphingobase und die langkettige Fettsäure des Ceramids sind häufig durch weitere funktionelle Gruppen modifiziert. Im Folgenden sind die typischen Modifikationen der Sphingobase zusammengefasst.

- Eine C4-Hydroxygruppe (bei Pflanzen, Pilzen und Tieren)
- Eine Δ^4 -(*E*)-Doppelbindung (bei Pflanzen, Pilzen und Tieren)

- Eine $\Delta 8$ -(*E*)- oder eine $\Delta 8$ -(*Z*)-Doppelbindung (bei Pflanzen und Pilzen)
- Eine C9-Methylverzweigung (bei Pilzen)

Typische Modifikationen der langkettigen Fettsäure sind:

- Eine C2-Hydroxygruppe (bei Pflanzen, Pilzen und Tieren)
- Eine $\Delta 3$ -(*E*)-Doppelbindung (bei einigen Pilzen)

Diese funktionellen Gruppen können in verschiedenen Kombinationen auftreten. Die Kombinationen sind bei Pflanzen und Pilzen spezifisch für die jeweilige Gruppe von Sphingolipiden. In den Cerebrosiden von Pflanzen treten als Sphingobasen hauptsächlich (*E/Z*)-Sphing-8-enin, (*E/Z*)-4-Hydroxysphing-8-enin und (*4E, 8E/Z*)-Sphinga-4,8-dienin auf [42, 50] (siehe Abbildung 1.3b). Dagegen sind in den pflanzlichen Glykosylinositolphosphorylceramiden hauptsächlich Phytosphinganin und (*E/Z*)-4-Hydroxysphing-8-enin zu finden [44, 49, 52] (siehe Abbildung 1.3a).

In Pilzen findet sich eine ähnliche Unterteilung. So sind die Sphingobasen der Glykosylinositolphosphorylceramide aus Pilzen in der Regel C4-hydroxyliert [89] (siehe Abbildung 1.4a), während die Sphingobasen der Cerebroside aus Pilzen meist eine $\Delta 4$ -(*E*)- und eine $\Delta 8$ -(*E*)-Doppelbindung sowie eine C9-Methylverzweigung haben [51, 85]. Die Ceramide einiger Pilze haben zusätzlich eine $\Delta 3$ -Doppelbindung am Fettsäurerest (siehe Abbildung 1.4b). Eine Übersicht über die Sphingolipidzusammensetzung von Pflanzen und Pilzen findet sich in [120].

Die Modifikation des Ceramidgerüsts durch zusätzliche funktionelle Gruppen ist in einigen Fällen mit einer spezifischen physiologischen Funktion korreliert. In Pilzen ist die langkettige Fettsäure der Cerebroside meistens C2-hydroxyliert, während das Auftreten der $\Delta 3$ -Doppelbindung bei einigen Pilzen den Übergang von der Hefe- in die Mycelform einleitet [112, 113]. Bei Pflanzen wurde gefunden, dass die Cerebroside vieler kälteresister Sorten mehr $\Delta 8$ -(*Z*)- als $\Delta 8$ -(*E*)-ungesättigte Sphingobasen haben, während das (*E/Z*)-Verhältnis von kälteempfindlichen Sorten sehr unterschiedlich sein kann [42, 50].

Bei Säugetieren ist die typische Sphingobase generell Sphingosin, in einigen Geweben kommt auch Phytosphingalin vor [17, 18].

Von den für die Einführung dieser zusätzlichen funktionellen Gruppen verantwortlichen Genen ist bereits ein großer Teil identifiziert worden:

- Die Sphingolipid C4-Hydroxylase aus Hefe [34, 36]
- Die Sphingolipid C4-Hydroxylase aus Pflanzen (zwei Isoenzyme) [101]
- Die Sphingolipid $\Delta 8$ -(*E/Z*)-Desaturase aus Pflanzen (zwei Isoenzyme) ([72, 97, 99, 103] und P. SPERLING, unveröffentlicht)
- Die Sphingolipid $\Delta 8$ -(*E*)-Desaturase aus Pilzen ([106] und P. SPERLING, unveröffentlicht)
- Die Fettsäure- α -Hydroxylase aus Hefe [24, 36, 77]
- Die Fettsäure- α -Hydroxylase aus Pflanzen [77]

Die folgenden für die Einführung zusätzlicher funktioneller Gruppen verantwortlichen Gene sind noch nicht identifiziert worden:

- Die Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase aus Pflanzen, Pilzen und Tieren
- Die Sphingolipid C4-Hydroxylase aus Tieren
- Die Fettsäure- α -Hydroxylase aus Tieren
- Die Fettsäure- $\Delta 3$ -Desaturase aus Pilzen
- Die Sphingolipid-C9-Methyltransferase aus Pilzen

Die Fettsäure- α -Hydroxylase ist bereits aus Pflanzen und Pilzen bekannt [24, 36, 77]. In Säugetieren gibt es ein hierzu homologes Protein (Sequenz 31 in Abbildung 4.1), dieses ist jedoch noch nicht funktionell charakterisiert worden. Die Sphingolipid-C4-Hydroxylase ist ebenfalls bereits aus Pflanzen und Pilzen bekannt [34, 36, 101], es gibt jedoch kein homologes Enzym in Tieren [101]. Es muss

daher angenommen werden, dass die Sphingolipid-C4-Hydroxylase-Aktivität in Tieren von einem Gen kodiert wird, das nicht zur Sphingolipid-C4-Hydroxylase aus Pflanzen und Pilzen homolog ist. Eine Sphingolipid-C4-Hydroxylase-Aktivität in Säugetieren ist bereits biochemisch nachgewiesen worden [18].

Die Sphingolipid- Δ 4-Desaturase, die Fettsäure- Δ 3-Desaturase und die Sphingolipid-C9-Methyltransferase sind bisher aus keinem Organismus bekannt. In dieser Arbeit möchte ich die Sphingolipid- Δ 4-Desaturase aus Pflanzen, Pilzen und Tieren identifizieren.

1.3 Membrangebundene Desaturasen und Hydroxylasen

Die in Abschnitt 1.2 beschriebenen zusätzlichen funktionellen Gruppen des Ceramid-Gerüsts werden, soweit bekannt, durch Enzyme aus der Familie der membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen eingeführt. Die einzige Ausnahme ist die (noch nicht identifizierte) C9-Methyltransferase, die wahrscheinlich zur Gruppe der *S*-Adenosylmethionin- (SAM) abhängigen Methyltransferasen gehört.

Es gibt zwei (auf Ebene der Primärsequenz) nicht miteinander verwandte Gruppen von Enzymen, die Membranlipide oder deren Vorläufer desaturieren [94, 102]. Dies sind zum einen die löslichen Acyl-ACP-Desaturasen, zum anderen die membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen. Während die Enzyme der ersten Gruppe nur *Acyl carrier protein*- (ACP) gebundene Acyl-Reste desaturieren, akzeptieren die Enzyme der zweiten Gruppe eine Vielzahl von Lipiden als Substrat, darunter Acyl-CoA, freie Sphingobasen, Glycerolipide, Sphingolipide und Sterole. Die Acyl-ACP-Desaturasen kommen nur bei Pflanzen vor und sind im Stroma der Plastiden lokalisiert. Interessanterweise sind bisher keine Acyl-ACP-Desaturasen aus Blaualgen bekannt. Membrangebundene Desaturasen und Hydroxylasen kommen bei allen Eukaryoten sowie bei Blaualgen und einigen Bakterien¹ vor. Die eukaryoten Enzyme sind im ER lokalisiert [25], bei Pflanzen

¹In dieser Arbeit werden Blaualgen getrennt von den übrigen Bakterien behandelt, da sie im Lipidstoffwechsel eine Sonderstellung einnehmen.

gibt es sowohl ER-gebundene als auch plastidäre Enzyme.

Beide Gruppen von Enzymen verwenden wahrscheinlich den selben Reaktionsmechanismus [94]. Den Kern des Reaktionszentrums bildet ein Zwei-Eisen-Zentrum, das zwischen vier verschiedenen Zuständen wechselt. Im reaktionsbereiten Zustand haben beide Eisenatome die Oxidationsstufe +4 und sind durch zwei Sauerstoffatome der Oxidationsstufe -2 verbunden (*bis- μ -oxo-di-ferryl-Zustand*). Bei der Desaturierung werden zwei Wasserstoffatome (einschließlich ihres jeweiligen Elektrons) von den beiden der zu desaturierenden Bindung benachbarten C-Atomen in einer *syn*-Eliminierung abgezogen und an eines der beiden Sauerstoffatome des Zwei-Eisen-Zentrums gebunden. Durch Abgabe von Wasser geht das Zwei-Eisen-Zentrum in den Ruhezustand (*μ -oxo-di-ferrri-Zustand*) über. In diesem Zustand haben beide Eisenatome die Oxidationsstufe +3 und sind durch ein Sauerstoffatom der Oxidationsstufe -2 verbunden. Bei der Hydroxylierung entsteht kein Wassermolekül, stattdessen wird eines der beiden Sauerstoffatome des Zwei-Eisen-Zentrums in die neu gebildete Hydroxygruppe integriert. Desaturierung und Hydroxylierung verlaufen also über den selben Reaktionsmechanismus. Neben Desaturierung und Hydroxylierung werden von Enzymen dieser Familien auch Epoxidierung, Acetylierung (Umwandlung einer Doppel- in eine Dreifachbindung) und die Einführung konjugierter Doppelbindungen vermittelt.

Nach Abschluss der Reaktion und Freisetzung des Produkts wird das Zwei-Eisen-Zentrum durch Übertragung zweier Elektronen auf die Oxidationsstufe +2 reduziert. Dabei wird unter Aufnahme zweier Protonen ein weiteres Molekül Wasser frei. Das Zwei-Eisen-Zentrum hat jetzt keinen Sauerstoff mehr gebunden (*di-ferrro-Zustand*). Als Elektronendonator für die beiden Elektronen dient NAD(P)H. Bei den im ER lokalisierten Enzymen werden die Elektronen über die NAD(P)H:Cytochrom b_5 -Oxidoreduktase und Cytochrom b_5 auf die Desaturase übertragen, bei den plastidären Enzymen und den Enzymen aus Cyanobakterien läuft der Elektronentransport über die Ferredoxin:NAD(P)H-Oxidoreduktase und Ferredoxin [94, 98, 102]. Im Anschluss an die Abgabe von Wasser geht das Zwei-Eisen-Zentrum durch Aufnahme eines Moleküls Sauerstoff in den *μ -peroxo-di-ferrri-Zustand* über, in dem die beiden Eisenatome der Oxi-

dationsstufe +3 durch eine Peroxo-Brücke der Oxidationsstufe -1 verbunden sind. Diese Peroxo-Brücke lagert sich spontan um, sodass wieder der aktivierte *bis- μ -oxo-di-ferryl*-Zustand entsteht, in dem die beiden Eisenatome der Oxidationsstufe +4 durch zwei Sauerstoffatome der Oxidationsstufe -2 verbunden sind. Dieser vierstufige Zyklus wird auch als „reinigen, laden, entschleunigen und schießen“ beschrieben.

Das Zwei-Eisen-Zentrum wird bei den Acyl-ACP-Desaturasen durch Asparat-, Glutamat- und Histidin-Seitenketten koordiniert, die in zwei charakteristischen Sequenzmotiven (D/E)XXH organisiert sind [94]. Bei den membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen wird das Zwei-Eisen-Zentrum dagegen von acht Histidin- bzw. Glutamin-Seitenketten koordiniert, die in den drei „Histidinboxen“ HXXX(X)H, HXX(X)HH und (H/Q)XX(X)HH angeordnet sind [95, 100]. Während für die Acyl-ACP-Desaturasen eine Kristallstruktur verfügbar ist [65], sind die strukturellen Informationen über die membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen auf Analysen der Membrantopologie mit computergestützten Methoden und durch Fusionsproteine beschränkt [21, 25, 95]. Dabei ist nicht vollständig klar, ob die membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen mit vier oder mit sechs transmembranen Helices in die Membran eingebettet sind. In Abbildung 4.1 ist eine Skizze der Membrantopologie gezeigt, die auf der Annahme von vier transmembranen Helices basiert. Die computergestützte Erstellung eines dreidimensionalen Modells der membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen durch Modellierung auf die Struktur der Acyl-ACP-Desaturase ist nicht möglich, da keine Ähnlichkeit in der Primärstruktur zwischen diesen beiden Familien erkennbar ist. Mit einer neuen computergestützten Methode ist zwar die *de novo*-Erstellung dreidimensionaler Modelle möglich, solche Modelle sind bisher jedoch nur für Proteine bis zu einer Länge von 150 Aminosäuren verfügbar [6].

Bei einigen membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen ist der Elektronendonator Cytochrom b_5 nicht mehr frei, sondern mit der Desaturase oder Hydroxylase fusioniert [98, 100]. Die ganze Familie der „*Front end*“-Desaturasen (siehe Abschnitt 4.3.3) besteht, bis auf die Sequenzen aus Blaualgen, aus *N*-terminalen Cytochrom b_5 -Fusionsproteinen (*N in Abbildung 4.4).

Die Acyl-CoA- $\Delta 9$ -Desaturasen aus Pilzen (siehe Abschnitt 4.3.1) sind dagegen C-terminale Cytochrom b_5 -Fusionsproteine, während die Acyl-CoA- $\Delta 9$ -Desaturasen aus Tieren und ihre Homologe aus Pflanzen keine Fusionsproteine sind (*C in Abbildung 4.2). In der Familie der Fettsäure- α -Hydroxylasen gibt es sowohl N-terminale Cytochrom b_5 -Fusionsproteine als auch nicht fusionierte Hydroxylasen (*N in Abbildung 4.1). Ein Blick auf den Stammbaum in Abbildung 4.1 zeigt, dass die Cytochrom b_5 -Fusionen in diesen drei Familien unabhängig voneinander entstanden sein müssen.

1.4 Signalübermittlung durch Sphingolipide

Sphingolipide sind in den letzten Jahren in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, da sich ihre Beteiligung an vielen wichtigen Signaltransduktionswegen abzeichnet. Beispiele sind die vor allem bei Säugetieren erforschte Kontrolle von Zellteilung und Apoptose und die Reaktion auf Hitzestress bei Hefe. Des Weiteren sind Sphingolipide an der Schließung der Spaltöffnungen in den Blättern von Pflanzen bei Wassermangel [79], an der Erkennung phytopathogener Pilze durch Pflanzen [58, 115, 116], an der Integration von Defensinen in die Plasmamembran von Pilzen [109, 110] und an der Steuerung des Entwicklungszyklus von Pilzen beteiligt sind [112, 113]. In diesem Abschnitt werden die Kontrolle von Zellteilung und Apoptose bei Säugetieren durch Sphingosin-1-phosphat und Ceramid sowie die mit der Bildung freier Sphingobasen verbundene Reaktion auf Hitzestress bei Hefe vorgestellt. Eine Diskussion der übrigen Beispiele findet sich in Abschnitt 4.5.

Die optimale Wachstumstemperatur für die Hefe *S. cerevisiae* beträgt 30°C. Wird die Temperatur auf 37–39°C erhöht, reagiert die Hefe auf diesen Hitzeschock mit einer vorübergehenden Einstellung des Wachstums. Der Zellzyklus der Hefe wird dabei spezifisch und reversibel in der G₁-Phase angehalten. Die Blockade des Zellzyklus ist mit einer geringeren Expression der G₁-Zykline Cln1p und Cln2p verbunden [88]. Diese Reaktion wird von einer schnellen und vorübergehenden Zunahme der Menge der freien Sphingobasen Sphinganin und Phytosphanin

begleitet, der eine langsamere und länger anhaltende Zunahme der Menge an Ceramid folgt [22, 46, 121]. Die Zunahme der Menge an freien Sphingobasen und Ceramid erfolgt dabei durch Neusynthese. Die freien Sphingobasen, vor allem Phytosphinganin, scheinen die eigentlichen Auslöser der Hitzeschockantwort zu sein [16, 45]. Einige Zeit nach der Einstellung des Wachstums wird der Zellzyklus wieder aufgenommen. Für die Wiederaufnahme des Wachstums sind die Sphingobasen-Kinasen Lcb4p und Lcb5p [45] sowie das G₁-Zyklus Cln3p und das S-Zyklus Clb5p [67] notwendig.

Ein bei Säugetieren sehr gut erforschtes Signalmolekül ist Sphingosin-1-phosphat. Sphingosin-1-phosphat wird vom Enzym *Sphingosin-Kinase* durch Phosphorylierung von Sphingosin an der C1-Hydroxygruppe gebildet. Für den Abbau von Sphingosin-1-phosphat stehen zwei alternative Wege zur Verfügung. Einmal kann Sphingosin-1-phosphat durch das Enzym *Sphingosin-1-phosphat-Phosphatase* dephosphoryliert werden. Hierbei wird zusammen mit anorganischem Phosphat Sphingosin frei, das bei Bedarf wieder von der Sphingosin-1-phosphat-Kinase phosphoryliert werden kann. Alternativ kann Sphingosin-1-phosphat durch das Enzym *Sphingosin-1-phosphat-Lyase* an seiner C-2—C-3-Bindung in Hexadecanal (Palmitaldehyd) und Phosphoethanolamin gespalten werden. Durch diese Spaltung wird das betreffende Molekül Sphingosin-1-phosphat dem Sphingolipidstoffwechsel entzogen. Dafür entsteht ein Molekül Phosphoethanolamin, das eine typische Zwischenstufe des Glycerolipid-Stoffwechsels ist. Phosphoethanolamin kann durch das Enzym *CTP:Phosphoethanolamin-Cytidyltransferase* aktiviert und durch die *CDP-Ethanolamin:Diacylglycerol-Ethanolaminphosphotransferase* auf Diacylglycerol übertragen werden. Dabei entsteht das Glycerolipid Phosphatidylethanolamin.

Eine Übersicht über den Stoffwechsel von Sphingosin-1-phosphat und seine Wirkung als Signalübermittler findet sich zum Beispiel in [84, 104]. Sphingosin-1-phosphat stimuliert generell Zellteilung, Differenzierung und Bewegung. Es ist damit ein Antagonist zu Ceramid (siehe unten). Es gibt Hinweise, dass Sphingosin-1-phosphat an der Signalübermittlung von Wachstumsfaktoren wie dem *Platelet-derived growth factor* (PDGF) [1, 39, 87], dem *Epidermal growth factor*

(EGF) [53] und dem *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) [108] beteiligt ist. Sphingosin-1-phosphat wird an der Plasmamembran von Rezeptoren der EDG-Familie registriert [56]. Diese Familie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren umfasst spezifische Rezeptoren für Sphingosin-1-phosphat und für das strukturell ähnliche Glycerolipid Lysophosphatidsäure [56]. Es ist umstritten, ob es auch intrazelluläre Rezeptoren für Sphingosin-1-phosphat gibt, die mit der Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Vorratsstätten gekoppelt sind [84, 104].

Der Gegenspieler von Sphingosin-1-phosphat in der Signalübermittlung bei Tieren ist Ceramid. Wenn in der Literatur über die Signalübermittlung bei Tieren von Ceramid die Rede ist, ist dabei immer $\Delta 4$ -ungesättigtes Ceramid gemeint. Gesättigtes Ceramid wird traditionell als *Dihydroceramid* bezeichnet. Dihydroceramid wird bei der Sphingolipid-Biosynthese vom Enzym *Ceramid-Synthase* durch *N*-Acylierung von Sphinganin gebildet (siehe Abschnitt 1.1). Ceramid im oben genannten Sinne wird durch $\Delta 4$ -Desaturierung von Dihydroceramid gebildet. Das dafür verantwortliche Enzym wird traditionell als *Dihydroceramid-Desaturase* bezeichnet.² Ceramid wird auch durch hydrolytische Abspaltung der Kopfgruppe von komplexen Sphingolipiden gebildet. Ein Beispiel hierfür ist die Hydrolyse von Sphingomyelin zu Phosphocholin und Ceramid durch das Enzym *Sphingomyelinase*. Die *Sphingomyelin-Synthase* kann durch Übertragung eines Phosphocholinrestes von Phosphatidylcholin das Ceramid wieder zu Sphingomyelin „recyclen“. Dies wird als *Sphingomyelin-Zyklus* bezeichnet.

Ceramid kann durch das Enzym *Ceramidase* reversibel in eine freie Sphingobase und eine freie Fettsäure gespalten werden. Ein alternatives Enzym zur Ceramidase ist die *Ceramid-N-Deacylase*, die neben Ceramid auch komplexe Sphingolipide deacyliert. Die Spaltung von Ceramid durch die Ceramidase oder die Ceramid-*N*-Deacylase ist der einzige Weg, auf dem bei Säugetieren freies

²Die Desaturierung auf Ebene der Ceramide ist bisher nur bei Säugetieren gezeigt worden [74]. Da bei anderen Organismen wie Pflanzen oder Pilzen auch freie Sphingobasen oder komplexe Sphingolipide als Substrat dienen könnten, wird in dieser Arbeit die allgemeinere Bezeichnung *Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase* verwendet.

Sphingosin entsteht, da die Dihydroceramid-Desaturase keine freien Sphingobasen für die Δ^4 -Desaturierung akzeptiert [74]. Das freie Sphingosin kann durch die Sphingosin-Kinase (siehe oben) zu Sphingosin-1-phosphat phosphoryliert werden oder durch die Ceramid-Synthase wieder zum Ceramid „recycelt“ werden.

Die Signalübermittlung durch Ceramid ist sehr ausführlich in [37, 38, 70] beschrieben. Ceramid dient im allgemeinen als Stresssignal. Je nach Zelltyp und physiologischem Zustand der Zelle kann es einen Wachstumsstopp durch Anhalten des Zellzyklus in der G_0/G_1 -Phase oder die Einleitung der Apoptose bewirken. Ceramid interagiert mit einer Reihe wichtiger Signalübermittlungswege. Vier Beispiele sind die Signalübermittlung über die *Mitogen-aktivierte Protein-Kinase* (MAPK), über das *Retinoblastoma*-Genprodukt (Rb), über die *c-Jun-N-terminale Kinase* (JNK) und über die Aktivierung von Caspasen. Die beiden letzteren Beispiele führen zur Einleitung der Apoptose. Die Aktivierung der MAPK bewirkt eine entzündliche Reaktion, während die Aktivierung des Retinoblastoma-Genprodukts zur Blockade des Zellzyklus in der G_0/G_1 -Phase führt. An der Blockade des Zellzyklus sind Zyklin A und $p21^{Cip1/Waf1}$ beteiligt [105]. Direkt durch Ceramid aktivierte Ziele sind die *Ceramid-aktivierte Protein-Kinase* (CAPK), die *Protein-Kinase C ζ* und die *Ceramid-aktivierte Protein-Phosphatase* (CAPP). Die Protein-Kinase C ζ ist ein Isoenzym der Protein-Kinase C, die durch Diacylglycerol aktiviert wird. Diacylglycerol und Ceramid sind sich strukturell sehr ähnlich. Die Ceramid-aktivierte Protein-Phosphatase ist eine Serin/Threonin-Phosphatase aus der *Protein-Phosphatase 2A-* (PP2A) Familie.

Die experimentelle Untersuchung der physiologischen Effekte von Sphingosin-1-phosphat, freien Sphingobasen und Ceramid ist sehr schwierig. Diese drei Signalmoleküle werden durch die Enzyme Ceramid-Synthase, Ceramidase, Ceramid-*N*-Deacylase, Sphingosin-Kinase und Sphingosin-1-phosphat-Phosphatase laufend ineinander umgewandelt. Dabei liegt das Gleichgewicht je nach Zelltyp und physiologischem Zustand der Zelle mal mehr auf der einen und mal mehr auf der anderen Seite. Es ist nicht immer leicht zu sagen, auf welches Signalmolekül ein beobachteter Effekt tatsächlich zurückgeht.

1.5 Identifizierung und biochemische Charakterisierung einer Familie putativer Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen

In Abschnitt 1.2 sind drei Enzyme aufgezählt, die bisher aus keinem Organismus bekannt sind. Von diesen ist die Sphingolipid- Δ 4-Desaturase besonders interessant. Δ 4-ungesättigte Sphingolipide gibt es in fast allen Tieren, Pflanzen und Pilzen. In Säugetieren sind Δ 4-ungesättigte Sphingolipide so typisch, dass sich die Trivialnamen *Sphingosin* und *Ceramid* darauf beziehen, während die entsprechenden gesättigten Verbindungen mit den abgeleiteten Namen *Dihydrosphingosin* und *Dihydroceramid* bezeichnet werden.³ Einer der wenigen eukaryoten Organismen ohne Δ 4-ungesättigte Sphingolipide ist *S. cerevisiae*.

Viele Studien bei Säugetieren haben gezeigt, dass die Δ 4-Doppelbindung des Ceramids für seine physiologische Aktivität als Signalmolekül erforderlich ist. Dihydroceramid ist dagegen unwirksam [5, 105]. Diese Beobachtung macht das Enzym Sphingolipid- Δ 4-Desaturase zu einem der meistgesuchten Enzyme des Sphingolipid-Stoffwechsels. Ich möchte daher in dieser Arbeit das für die Sphingolipid- Δ 4-Desaturase kodierende Gen identifizieren.

Aus der Hefe *S. cerevisiae* ist bereits seit längerem die Sphingolipid-C4-Hydroxylase Sur2p bekannt [34, 36]. Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, ist der Reaktionsmechanismus von Desaturasen und Hydroxylasen mit einem Zwei-Eisen-Zentrum sehr ähnlich. Mit der Fettsäure- Δ 12-Desaturase aus *Arabidopsis thaliana* [81], der Fettsäure-C12-Hydroxylase aus *Ricinus communis* [68] und der bifunktionalen Fettsäure- Δ 12-Desaturase/C12-Hydroxylase aus *Lesquerella fendleri* [10] war bereits ein Beispiel für eine Familie mit Desaturasen und Hydroxylasen bekannt, die sich auf Sequenzebene sehr ähnlich sind (siehe Abbildung 4.3). Damit lag die Vermutung nahe, dass die gesuchte Sphingolipid- Δ 4-Desaturase der Sphingolipid-C4-Hydroxylase Sur2p aus *S. cerevisiae* ähnlich sein könnte.

A. thaliana besitzt zwei Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit zu Sur2p. Bei

³In dieser Arbeit werde ich die Bezeichnung *Sphingarin* für von Dihydrosphingosin und *Sphingolipid- Δ 4-Desaturase* für Dihydroceramid-Desaturase verwenden. Die Bezeichnung *Ceramid* verwende ich sowohl für gesättigte als auch für ungesättigte Ceramide.

ihrer funktionellen Charakterisierung stellte sich heraus, dass es sich bei beiden Enzymen ebenfalls um Sphingolipid-C4-Hydroxylasen handelte [101]. Darüber hinaus fehlten Sequenzen mit Ähnlichkeit zu Sur2p in Säugetieren, obwohl $\Delta 4$ -desaturierte Sphingolipide gerade für Säugetiere besonders typisch sind. Dies führte zu dem Schluss, dass die gesuchten Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen zu einer Enzymfamilie gehören, die nicht mit Sur2p verwandt ist.

Aufgrund von biochemischen Untersuchungen konnte jedoch als sicher angesehen werden, dass die Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen zur Gruppe der membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen (siehe Abschnitt 1.3) gehören. Indizien hierfür waren die für die Desaturase-Aktivität nötigen Kofaktoren NAD(P)H, Cytochrom b_5 und O_2 sowie die intrazelluläre Lokalisierung der Desaturase-Aktivität in der ER-Membran oder im Golgi-Apparat [14, 33, 59, 73, 74, 75].

In dieser Arbeit wird eine neue, computergestützte Strategie zur Identifizierung der Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen entwickelt. Die einzige Annahme dabei ist, dass es sich bei den Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen um membrangebundene Desaturasen handelt. Die membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen sind auf Sequenzebene durch die in Abschnitt 1.3 beschriebenen drei Histidinbox-Motive gekennzeichnet. Die Strategie besteht aus drei Stufen:

- Erstellen einer möglichst umfassenden Sammlung von Sequenzen membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen.
- Einteilen dieser Sequenzen in einzelne Familien.
- Identifizierung einer Familie mit Kandidaten für die $\Delta 4$ -Desaturase.

Für die Erstellung der Sammlung membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen wird das Programm PSI-Blast [2] verwendet. PSI-Blast ist wie Blast [2] ein Programm zur Identifizierung ähnlicher Sequenzen in einer Datenbank. PSI-Blast ist beim Identifizieren entfernter Ähnlichkeiten jedoch sehr viel empfindlicher als Blast.

Für die Einteilung der mit PSI-Blast gefundenen Sequenzen in Familien werden zwei verschiedene Methoden getestet. Einmal wird die Einteilung weitgehend

manuell anhand von mit ClustalX [111] erstellten *Alignments* und phylogenetischen Stammbäumen vorgenommen. Außerdem werden die gefundenen Sequenzen mit Hilfe des Programms TRIBE-MCL [30] automatisch in Familien eingeteilt. Das Programm BioLayout [31] wird dabei zur graphischen Darstellung der Ergebnisse verwendet. Die Ergebnisse dieser beiden Methoden werden miteinander verglichen.

Für die Identifizierung einer Familie putativer Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen werden Kenntnisse über das Vorkommen von Δ 4-desaturierten Sphingolipiden in verschiedenen Organismen genutzt. Δ 4-desaturierte Sphingolipide kommen in Tieren, Pflanzen und Pilzen vor. Einer der wenigen eukaryoten Organismen ohne Δ 4-desaturierte Sphingolipide ist die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Hieraus wurden Kriterien zur Identifizierung einer Familie mit putativen Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen entwickelt. Diese sind in Abschnitt 3.1 aufgeführt.

Aus der auf diese Weise identifizierten Familie putativer Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen werden mehrere Sequenzen durch heterologe Expression im *S. cerevisiae*-Stamm TDY2037-*sur2* Δ [36] biochemisch charakterisiert. In diesem Hefestamm ist die hefeeigene Sphingolipid-C4-Hydroxylase Sur2p inaktiviert, sodass Sphingolipide mit den unmodifizierten Sphingobasen Sphinganin und C₂₀-Sphinganin als Substrat für eine Desaturierung zur Verfügung stehen. Die Sphingobasenzusammensetzung der die putativen Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen exprimierenden Hefe wird nach Bariumhydroxydhydrolyse und Dinitrophenyl-(DNP) Derivatisierung per HPLC analysiert. Die Identität der in der HPLC-Analyse gefundenen Sphingobasen wird in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Stephan Franke (Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg) und Herrn Prof. Dr. Ulrich Zähringer (Forschungszentrum Borstel) per Massen- und NMR-Spektroskopie bestätigt.

2 Experimentelle Durchführung

2.1 Materialien

Brutschrank	(Binder)
Brutschrank	(Heraeus Instruments)
Cleanbench „DLF/BSS4“	(Clean Air)
Elektrischer Heizblock „Dri-Block DB-3“	(Techne)
Elektrischer Heizblock	(Liebisch)
Gelkammer „Horizon 11-14“	(BRL)
Glasgeräte	(Merck-Eurolab)
Inkubations-Rotor „CMV-E“	(Fröbel Labortechnik)
Inkubations-Schüttler „Multitron“	(Infors)
Magnetrührer „IKAMAG RH“	(Janke & Kunkel)
Mikroliterspritzen	(Hamilton)
Mikrozentrifuge „Mikrofuge E“	(Beckman)
Mikrozentrifuge „Biofuge pico“	(Heraeus Instruments)
PCR-Gerät „TRIO-Thermoblock TB-1“	(Biometra)
PCR-Gerät „Primus“	(MWG-Biotech)
PCR-Gerät „TGRADIENT“	(Biometra)
pH-Meter „761 Calimatic“	(Knick)
Photometer „Genequant II“	(Pharmacia)
Pipetten „Finnpipette“	(Labsystems)
Pipetten	(Eppendorf)

Pipettierhilfe „Pipetus-Akku“	(Hirschmann Laborgeräte)
Rotationsverdampfer „Rotavapor RE 120“	(Büchi)
UV-Transilluminator	(Herolab)
Video-Printer „429K“	(Herolab)
Vortex „Paramix II“	(Julabo Labortechnik)
Zentrifuge „Centrifuge 5810R“	(Eppendorf)
Zentrifuge „Centrikon H-401“	(Kontron)
Zentrifuge „Rotanta“	(Hettich)

Chemikalien wurden, soweit nicht explizit angegeben, von den Firmen Biomol (Hamburg), Biozym (Hessisch Oldendorf), Carl Roth (Karlsruhe), Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe), Klüber & Schulz (Schenefeld), Lancaster Synthesis (Mühlheim a.M.), Merck Eurolab (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen) bezogen.

Die Sphingobasen-Standards Sphinganin (DL-*erythro*-Dihydrosphingosin, synthetisch, 99%), Sphingosin (D-Sphingosin aus Rinderhirn-Sphingomyelin, 99%) und Phytosphinganin (D-Phytosphingosin-Hydrochlorid aus Hefe, 97%) wurden von Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen) geliefert. CDCl_3 (99.96%) stammt von Cambridge Isotope Laboratories (Andover, Massachusetts, U.S.A.).

Enzyme, DNA-Längenstandards und andere Reagenzien für die molekularbiologischen Arbeiten wurden von Boehringer Mannheim (Mannheim), Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus) und Promega (Mannheim) bezogen. *Kits* für die Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA stammen von QIAGEN (Hilden), SIGMA-ARK (Steinheim) und Machery-Nagel (Düren). Die PCR-Primer wurden von SIGMA-ARK (Steinheim) synthetisiert.

Der Hefe-Expressionsvektor pYES2 wurde von Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe), der *E. coli*-Stamm XL1 blue MRF' von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) bezogen. Der *S. cerevisiae*-Stamm TDY2037-*sur2* Δ [36] wurde freund-

licherweise von Frau Prof. Dr. Teresa Dunn (Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, Maryland, U.S.A.) zur Verfügung gestellt.

Zutaten für die Herstellung von Kulturmedien für *E. coli* und *S. cerevisiae* stammen von Difco Laboratories (Augsburg), Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande) und Invitrogen Life Technologies (Karsruhe), Sterilfilter von Millipore (Eschborn).

2.2 Bioinformatik

2.2.1 Identifizierung einer Familie putativer Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen

PSI-Blast

Mit Hilfe von PSI-Blast [2] wurde eine möglichst umfangreiche Sammlung von Sequenzen bekannter und putativer membrangebundender Desaturasen und Hydroxylasen erstellt. Dazu wurden drei Suchläufe mit den Aminosäuresequenzen der putativen Δ 9-Acyl-CoA-Desaturase aus *A. thaliana* (SWISS-PROT O65797), der Sphingolipid-C4-Hydroxylase Sur2p aus *S. cerevisiae* (SWISS-PROT P38992) und der Fettsäure- α -Hydroxylase Scs7p aus *S. cerevisiae* (SWISS-PROT Q03529) als Eingabesequenz in der *GenBank-nr*-Proteindatenbank durchgeführt. Bei Scs7p wurden die ersten 100 Aminosäuren abgeschnitten, um die Cytochrom b_5 -Domäne zu entfernen.

Bei jeder Iteration wurden alle neu gefundenen Sequenzen manuell auf das Vorhandensein der drei Histidinbox-Motive überprüft. Nur Sequenzen mit drei vollständigen Histidinbox-Motiven wurden zur Berechnung der positionsspezifischen Substitutionsmatrix für die nächste Iteration verwendet. Die Suche wurde nach 10 Iterationen (Δ 9-Desaturase), 11 Iterationen (Sur2p) bzw. 3 Iterationen (Scs7p) abgebrochen, da keine neuen Sequenzen mehr hinzugekommen waren.

Die Suche mit der Δ 9-Desaturase als Eingabesequenz ergab 312 Sequenzen, die mit Sur2p ergab 85 Sequenzen und die mit Scs7 ergab 8 Sequenzen (jeweils inklusive der Eingabesequenz). Die im Suchlauf mit Scs7p gefundenen Sequenzen

wurden alle auch im Suchlauf mit Sur2p gefunden. Es ergab sich damit insgesamt ein Anzahl von 397 Sequenzen.

Einteilung in Familien

Von den mit der $\Delta 9$ -Desaturase und mit Sur2p als Eingabesequenz gefundenen Sequenzen wurden mit ClustalX [111] zwei getrennte phylogenetische Stammbäume erstellt. Anhand dieser Stammbäume wurden die in der PSI-Blast-Suche gefundenen Sequenzen manuell in Familien eingeteilt. Für die Einteilung in Familien wurden Sequenzen bekannter biochemischer Funktion (z.B. $\Delta 9$ -Desaturasen, $\Delta 12$ -Desaturasen, $\Delta 15$ -Desaturasen, Sterol-Desaturasen/Hydroxylasen etc.) als Anhaltspunkt genommen. Nach den in Abschnitt 3.1 aufgeführten Kriterien wurde eine Familie putativer Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen identifiziert.

2.2.2 Einteilung in Familien mit TRIBE-MCL

Die in Abschnitt 2.2.1 erstellte Sammlung membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen wurde mit TRIBE-MCL [30] in Familien eingeteilt, um die Eignung von TRIBE-MCL für diesen Zweck zu testen.

Die 397 in der PSI-Blast-Suche gefundenen Sequenzen wurden in einer einzigen Datei vereinigt. Die Sequenzen wurden mit Blast (blastp) [2] paarweise miteinander verglichen. Als obere Grenze für den Blast-*e*-Wert wurden 10^{-4} , 10^{-8} und 10^{-16} verwendet. Die Ergebnisse des Blast-Vergleichs dienten direkt als Eingabe für TRIBE-MCL.

Die Größe der mit TRIBE-MCL ermittelten Familien wird durch einen einzigen Parameter *I* mit einem Wertebereich von 1 bis 5 gesteuert. Kleine Werte für *I* ergeben größere Familien, große Werte für *I* ergeben engere Familien. Es wurden Läufe mit $I = 1,2$, $I = 1,5$, $I = 2$, $I = 2,5$, $I = 3$ und $I = 3,5$ durchgeführt.

Die mit TRIBE-MCL ermittelten Familien wurden mit BioLayout Java [31] visualisiert. Dabei wurde jede Familie in einer unterschiedlichen Farbe dargestellt. Näheres hierzu ist in Abschnitt 3.3 beschrieben.

Für die Arbeit mit TRIBE-MCL und BioLayout wurden mehrere Hilfsprogramme in der Programmiersprache Python geschrieben:

IDSet: Liest eine oder mehrere Dateien mit einer Liste von Datenbank-Zugangsnummern und vereinigt sie zu einer einzigen Datei, in der jede Datenbank-Zugangsnummer nur einmal vorhanden ist.

FastaSet: Liest eine oder mehrere Dateien mit Sequenzen im Fasta-Format und vereinigt sie zu einer einzigen Datei, in der jede Sequenz nur einmal vorhanden ist.

CountEntries: Liest eine oder mehrere Dateien mit Datenbank-Zugangsnummern oder mit Sequenzen im Fasta-Format und zählt die Einträge.

LabelClusters: Ergänzt die in der Ausgabe von TRIBE-MCL angegebenen Datenbank-Zugangsnummern der einzelnen Sequenzen durch eine ausführlichere Beschreibung.

Clusters2Fasta: Liest die Ergebnisse von TRIBE-MCL und schreibt die Sequenzen nach Familien geordnet im Fasta-Format in einzelne Dateien, sodass sie weiter analysiert werden können.

Blast2Biolayout: Liest die Ergebnisse des Blast-Vergleichs einer Menge von Sequenzen und erstellt eine Eingabedatei für BioLayout.

Clusters2BioLayout: Liest die Ergebnisse von TRIBE-MCL und erstellt eine Tabelle, mit deren Hilfe BioLayout die einzelnen Familien farblich markieren kann.

2.2.3 LinkLayout: Analyse der Vernetzungsstruktur eines Graphs

Bei der Darstellung von Sequenzfamilien mit BioLayout werden die Ähnlichkeitsbeziehungen zwischen den einzelnen Sequenzen normalerweise mit dem negativen Logarithmus des Blast- e -Wertes gewichtet. Eine Veröffentlichung über eine einfache Methode zur Analyse der Vernetzungsstruktur von Internetseiten [26] führte

zu der Idee, eine ähnliche Methode zur Analyse der Ähnlichkeitsbeziehungen zwischen Proteinsequenzen zu entwickeln.

In der Arbeit über die Verknüpfungsstruktur von Internetseiten wird die „Krümmung“ einer Internetseite definiert. Die Krümmung ist ein Maß für die Einbindung dieser Internetseite in ein Netzwerk gegenseitig miteinander verbundener Seiten. Die Verknüpfungsstruktur des Internet wird dazu in Dreiecke zerlegt.

Die Krümmung einer Internetseite ist definiert als die Zahl der Dreiecke, die diese Internetseite als Eckpunkt haben, geteilt durch die maximal mögliche Zahl an Dreiecken. Damit lässt sich die Krümmung c_n einer Internetseite n mathematisch ausdrücken als:

$$c_n = \frac{2t_n}{v_n(v_n - 1)}$$

Dabei ist t_n die Zahl der Dreiecke, die die Internetseite n als Eckpunkt haben und v_n die Zahl der mit der Internetseite n direkt verbundenen Seiten.

Diese Definition lässt sich direkt auf die Ähnlichkeitsbeziehungen zwischen Sequenzen in Proteinfamilien übertragen. Eine Proteinsequenz entspricht dabei einer Internetseite und eine Ähnlichkeitsbeziehung zwischen zwei Proteinsequenzen entspricht einer Verknüpfung zwischen zwei Internetseiten. Eine Proteinsequenz ist ein Eckpunkt eines Dreiecks genau dann, wenn sie ähnlich zu zwei anderen Proteinsequenzen ist, die ihrerseits zueinander ähnlich sind. Die maximal mögliche Zahl an Dreiecken, in die eine Proteinsequenz eingebunden sein kann, wird erreicht, wenn alle mit ihr direkt verbundenen Proteinsequenzen ihrerseits auch eine direkte Verbindung zwischen sich haben. Damit lässt sich die Krümmung einer Proteinsequenz in gleicher Weise wie die Krümmung einer Internetseite berechnen.

Darüber hinaus lässt sich die Idee der Zerlegung einer Verknüpfungsstruktur in Dreiecke nutzen, um eine neue Gewichtungsfunktion für die Ähnlichkeitsbeziehungen zwischen den Sequenzen zu entwickeln. Eine Verbindung zwischen zwei Sequenzen ist genau dann die Seite eines Dreiecks, wenn die durch sie verbundenen Sequenzen beide eine direkte Verbindung zu ein und derselben dritten Sequenz

haben. Eine Ähnlichkeitsbeziehung zwischen zwei Sequenzen lässt sich mit der Zahl der Dreiecke gewichten, von denen sie eine Seite bildet.

Beide Ideen wurden in dem in der Programmiersprache Python geschriebenen Programm LinkLayout implementiert. LinkLayout liest eine beliebige Eingabedatei für BioLayout und erstellt daraus eine neue Eingabedatei, die die Informationen über die Krümmung der Sequenzen und die Gewichtung der Ähnlichkeitsbeziehungen enthält. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgt mit BioLayout Java. Dabei wird die Krümmung der Sequenzen durch die Größe der die Sequenzen repräsentierenden Punkte dargestellt. Die Gewichtung der Ähnlichkeitsbeziehungen beeinflusst den Abstand zwischen den Punkten und lässt sich zusätzlich durch die Farbe der Verbindungslinien darstellen.

Die Verknüpfungsstruktur der Ähnlichkeitsbeziehungen zwischen den Proteinsequenzen lässt sich sehr einfach durch die objektorientierte Struktur der Programmiersprache Python modellieren. Die Proteinsequenzen und die Ähnlichkeitsbeziehungen zwischen ihnen werden durch je eine Objektklasse repräsentiert. Dabei enthält jedes Ähnlichkeits-Objekt Verweise auf die beiden Protein-Objekte, die die Ähnlichkeitsbeziehungen verbindet. Jedes Protein-Objekt enthält Verweise auf die mit ihm durch eine Ähnlichkeitsbeziehung direkt verbundenen Nachbarproteine. Auf diese Weise lässt sich sehr einfach die Zahl der Dreiecke ermitteln, an denen eine Proteinsequenz bzw. eine Ähnlichkeitsbeziehung beteiligt ist.

Die Krümmung jeder Proteinsequenz wird nach der oben angegebenen Formel berechnet. Die Fläche jedes Punktes in der Darstellung mit BioLayout Java ist proportional zur Krümmung der entsprechenden Proteinsequenz. Die Gewichtung jeder Ähnlichkeitsbeziehung entspricht dem Logarithmus der Zahl der Dreiecke, von denen diese Ähnlichkeitsbeziehung eine Seite bildet.

Im Folgenden ist der Programmcode für die Knoten- und die Verknüpfungsobjekte gezeigt:

Definition einer Klasse für Knotenobjekte:

```
class Node:
    def __init__(self):
        self.linkednodes = {}

    def add_linked_node(self, node):
        i = id(node)
        self.linkednodes[i] = node

    def has_linked_node(self, node):
        i = id(node)
        if i in self.linkednodes:
            return 1
        else:
            return 0

# Ein Knoten n ist Teil eines Dreiecks, wenn zwischen zwei
# verschiedenen mit n verknüpften Knoten n1 und n2 eine
# Verknüpfung existiert. Die Zahl der Dreiecke, an denen n
# beteiligt ist, ist gleich der Hälfte der Zahl der geordneten
# Paare (n1, n2), die diese Bedingung erfüllen.

    def get_number_triangles(self):
        linkedpairs = 0
        for i in self.linkednodes:
            for j in self.linkednodes:
                if self.linkednodes[i].has_linked_node(self.linkednodes[j]):
                    linkedpairs = linkedpairs + 1
        return linkedpairs / 2
```

```
def get_curvature(self):
    numbertriangles = self.get_number_triangles()
    numberlinks = len(self.linkednodes)
    if numberlinks > 1:
        curvature = 2.0 * numbertriangles /
                    (numberlinks * (numberlinks - 1))
    else:
        curvature = 0.0
    return curvature
```

Definition einer Klasse für Verknüpfungsobjekte:

```
class Link:
```

```
    def __init__(self, n1, n2):
        self.node1 = n1
        self.node2 = n2
```

```
# Ein Link l zwischen zwei Knoten n und m ist Teil eines Dreiecks,
# wenn es einen Knoten k != n, m gibt, sodass es sowohl von m als
# auch von n ein Link zu k gibt. Die Anzahl der Dreiecke, an denen
# Link l beteiligt ist, ist gleich der Zahl der Knoten k, die
# diese Bedingung erfüllen.
```

```
    def get_number_triangles(self):
        linkednodes1 = self.node1.linkednodes
        numbertriangles = 0
        for i in linkednodes1:
            if linkednodes1[i].has_linked_node(self.node2):
                numbertriangles = numbertriangles + 1
        return numbertriangles
```

2.2.4 Phylogenie der Desaturasen

Die Proteinsequenzen für die Erstellung der Stammbäume einzelner Desaturase-Familien wurden aus der SWISS-PROT/TrEMBL-Datenbank heruntergeladen. Von den Sequenzen wurde mit T-COFFEE [80] ein *Alignment* erstellt. Zur Berechnung der Stammbäume wurden die Stammbaumfunktion von ClustalX [111] sowie die reinen Phylogenetik-Programme Phylip (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>), TREE-PUZZLE [93] und MRBAYES [41] verwendet.

Zur Erleichterung der Arbeit mit der Phylogenetik-Software wurden zwei Hilfsprogramme in der Programmiersprache Python geschrieben:

ConvertALN: Konvertiert Alignments zwischen den Formaten Clustal, Fasta und Phylip.

LabelTree: Ergänzt die in den Stammbäumen angegebenen Datenbank-Zugangsnummern der einzelnen Sequenzen durch eine ausführlichere Beschreibung.

Zur Vorhersage der transmembranen Helices membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen wurde TMHMM [61] benutzt.

2.3 Sequenzierung und Klonierung putativer Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen

2.3.1 Allgemein verwendete Puffer

⇒ SAMBROOK *et al.* (1989), *Molecular Cloning* (Literatur [90])

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

TBE-Puffer: 45 mM Tris
45 mM Borsäure
1 mM EDTA

2.3.2 Sequenzierung von cDNA-Klonen

Die in Abschnitt 3.1 identifizierten cDNA-Klone, die putative Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen kodieren, wurden doppelsträngig sequenziert. Die verwendeten Sequenzierprimer sind in Tabelle 2.1 angegeben.

Die Sequenzen der cDNAs sowie die davon abgeleiteten Proteinsequenzen wurden in der GenBank/EBI-Datenbank hinterlegt. Die Zugangsnummern sind in Tabelle 2.2 angegeben.

Der ein DES2-Homolog aus *Homo sapiens* kodierende cDNA-Klon I.M.A.G.E. 2109176 enthielt einen offenen Leserahmen, bei dem ein längeres Stück in der Mitte fehlte. Diese Sequenz wurde daher nicht in GenBank/EBI-Datenbank hinterlegt und nicht weiter experimentell untersucht.

Die cDNA-Klone des I.M.A.G.E.-Konsortiums (Lawrence Livermore National Laboratory) wurden über das Deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, Berlin) bezogen, der *Drosophila melanogaster*-cDNA-Klon LP11871 des Berkeley Drosophila Genome Project über Research Genetics (Huntsville, Alabama, U.S.A.) und der *Lycopersicon esculentum*-cDNA-Klon cLET2D1 vom Clemson University Genomics Institute (Clemson, South Carolina, U.S.A.).

2.3.3 PCR-Amplifikation der offenen Leseraster

Die vollständigen offenen Leseraster der putativen Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen wurden durch PCR mit spezifischen Primern amplifiziert. Die Primer-Sequenzen sind in der Tabelle 2.3 angegeben. Zur Klonierung in den Hefe-Expressionsvektor pYES2 (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe) wurden an das 5'-Ende der PCR-Primer Adaptersequenzen mit den Restriktionsschnittstellen *Bam*HI (*Vorwärts-Primer*) bzw. *Xba*I (*Rückwärts-Primer*) angehängt (unterstrichen in Tabelle 2.3, der Pfeil gibt die Position des Schnitts an). Um den direkten Restriktionsverdau der PCR-Produkte zu ermöglichen, wurden die Nukleotide ‚CGC‘ bzw. ‚GC‘ vor die Restriktionsschnittstellen gesetzt. Die Schmelztemperatur T_m wurde nach der Formel $T_m [^\circ\text{C}] = 2 \cdot N_{\text{AT}} + 4 \cdot N_{\text{GC}} + 4$ abgeschätzt. Dabei ist N_{AT} die Zahl der A- oder T-Nukleotide und N_{GC} die Zahl der G- oder C-Nukleotide.

cDNA-Klon	Vektor	Sequenzierprimer
I.M.A.G.E. 2123522 (DES1 <i>M. musculus</i>)	pME18S-FL3	<i>vorwärts</i> : CTT CTG CTC TAA AAG CTG CG <i>rückwärts</i> : CGA CCT GCA GCT CGA GCA C
I.M.A.G.E. 2578328 (DES1 <i>H. sapiens</i>)	pCMV-SPORT6	<i>vorwärts</i> : SP6 <i>rückwärts</i> : T7 (*)
I.M.A.G.E. 920524 (DES2 <i>M. musculus</i>), I.M.A.G.E. 2109176 (DES2-Homolog <i>H. sapiens</i>)	pT7T3D-Pac	<i>vorwärts</i> : T7 <i>rückwärts</i> : T3
LP11871 (DES-1 <i>D. melanogaster</i>)	pOT2a	<i>vorwärts</i> : T7 <i>rückwärts</i> : CGT TAG AAC GCG GCT ACA AT
cLET2D1 (DES-Homolog <i>L. esculentum</i>)	pBlueScript SK(-)	<i>vorwärts</i> : T3 <i>rückwärts</i> : T7 (*)

Tabelle 2.1: Sequenzierung der putative Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen kodierenden cDNA-Klone. Die mit den angegebenen Sequenzierprimern begonnenen Sequenzen wurden durch *Primer walking* verlängert, bis der offene Leserahmen vollständig erfasst war. In einigen Fällen (*) konnte die Sequenz des Rückwärts-Stranges hinter dem Poly-A-Schwanz nicht mehr ausgewertet werden. Hier wurden für die Sequenzierung des Rückwärts-Stranges spezielle Sequenzierprimer komplementär zum 3'-Ende der cDNA abgeleitet. Die Sequenzierung wurde von AGOWA (Berlin) durchgeführt.

Produkt	Clone ID	Nukleotid	Protein
DES1 <i>M. musculus</i>	I.M.A.G.E. 2123522	AF466376	AAM12532
DES1 <i>H. sapiens</i>	I.M.A.G.E. 2578328	AF466375	AAM12531
DES2 <i>M. musculus</i>	I.M.A.G.E. 920524	AF466377	AAM12533
DES2-Homolog <i>H. sapiens</i>	I.M.A.G.E. 2109176	—	—
DES-Homolog <i>L. esculentum</i>	cLET2D1	AF466378	AAM12534
DES-1 <i>D. melanogaster</i>	LP11871	AF466379	AAM12535

Tabelle 2.2: GenBank-Zugangsnummern der Sequenzen der putative Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen kodierenden cDNA-Klone.

Die PCR wurde mit *Pfu Turbo*-DNA-Polymerase (Stratagene, Amsterdam, Niederlande), einer hitzestabilen DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion, unter Verwendung von Plasmid-DNA (in Abschnitt 2.3.2 aufgeführte cDNA-Klone) bzw. genomischer DNA (*Candida albicans*) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das PCR-Programm hatte eine Denaturierungs-, Binde- und Synthese-Zeit von je 1 min. Die Binde-Temperatur betrug $T_m - 5^\circ\text{C}$. Die Plasmid-DNA wurde wie in Abschnitt 2.3.6 beschrieben präpariert. Die genomische DNA von *C. albicans* (Stamm CAI4) wurde freundlicherweise von Frau Dr. Martina Leipelt (Institut für Allgemeine Botanik, Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt.

2.3.4 Klonierung in den *S. cerevisiae*-Expressionsvektor pYES2

Die PCR-Produkte wurden quantitativ auf einem 1% igen (w/v) Agarose-TBE-Gel gereinigt, wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben aus dem Gel extrahiert und mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xba*I geschnitten. Die geschnittenen PCR-Produkte wurden quantitativ auf einem 1% igen (w/v) Agarose-TBE-Gel gereinigt und wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben aus dem Gel extrahiert.

DNA des Hefe Expressionsvektors pYES2 wurde wie in Abschnitt 2.3.6 be-

Produkt	Primer-Sequenz
DES1 <i>M. musculus</i> (pMausDES1)	<p>vorwärts: CGC <u>GGA TCC</u> ATG GGT AGC CGC GTG TCC $T_m = 64^\circ\text{C}$</p> <p>rückwärts: GC <u>TCT AGA</u> TTA CTC CAG AAT CTC GTT CC $T_m = 62^\circ\text{C}$</p>
DES1 <i>H. sapiens</i> (pMenschDES1)	<p>vorwärts: CGC <u>GGA TCC</u> ATG GGG AGC CGC GTC TCG $T_m = 66^\circ\text{C}$</p> <p>rückwärts: GC <u>TCT AGA</u> TTA CTC CAG CAC CAT CTC TC $T_m = 64^\circ\text{C}$</p>
DES2 <i>M. musculus</i> (pMausDES2)	<p>vorwärts: CGC <u>GGA TCC</u> ATG GGT AAT AGC CGC GCC C $T_m = 66^\circ\text{C}$</p> <p>rückwärts: GC <u>TCT AGA</u> TCA CAG GTG GTC CTT CGC C $T_m = 66^\circ\text{C}$</p>
DES-1 <i>D. melanogaster</i> (pDroDES)	<p>vorwärts: CGC <u>GGA TCC</u> ATG GGA CAG AAA GTT TCG CG $T_m = 64^\circ\text{C}$</p> <p>rückwärts: GC <u>TCT AGA</u> TTA GGA GGC CAG GCC GCG $T_m = 66^\circ\text{C}$</p>
DES-Homolog <i>L. esculentum</i> (pTomDES)	<p>vorwärts: CGC <u>GGA TCC</u> ATG GGA TTT GAA GGG GAA AA $T_m = 60^\circ\text{C}$</p> <p>rückwärts: GC <u>TCT AGA</u> CTA TTC GGA CTT GTT TGC TT $T_m = 60^\circ\text{C}$</p>
Des1p <i>C. albicans</i> (pCaDES)	<p>vorwärts: CGC <u>GGA TCC</u> ATG GAC GCT GAA ATC AAG CA $T_m = 62^\circ\text{C}$</p> <p>rückwärts: GC <u>TCT AGA</u> TTA GTT CTC GTC TAA CCT ATT A $T_m = 62^\circ\text{C}$</p>

Tabelle 2.3: PCR-Primer für die Amplifikation der DES1 *H. sapiens*, DES1 *M. musculus*, DES2 *M. musculus*, das DES-Homolog aus *L. esculentum*, DES-1 *D. melanogaster* und Des1p *C. albicans* kodierenden offenen Leseraster. In Klammern sind die Bezeichnungen der in den Expressionsvektor pYES2 ligierten offenen Leseraster angegeben.

schrieben präpariert und mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xba*I geschnitten. Gleichzeitig mit dem Restriktionsverdau wurde der Vektor mit alkalischer Phosphatase behandelt („*gecippt*“), um die endständigen 5'-Phosphatgruppen zu entfernen. Der geschnittene und mit alkalischer Phosphatase behandelte Vektor wurde auf einem 0,7% igen (w/v) Agarose-TBE-Gel gereinigt und wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben aus dem Gel extrahiert.

Die mit *Bam*HI und *Xba*I geschnittenen PCR-Produkte wurden mit T4-DNA-Ligase in den mit *Bam*HI und *Xba*I geschnittenen und mit alkalischer Phosphatase behandelten pYES2-Vektor ligiert und wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben in kompetente *E. coli*-Zellen (Stamm XL1 blue MRF') transformiert. Die Bezeichnungen der fertigen Konstrukte sind in Tabelle 2.3 angegeben.

Einige der transformierten Kolonien wurden in LB-Medium mit Ampicillin angeimpft. Aus diesen Kulturen wurde Plasmid-DNA isoliert (siehe Abschnitt 2.3.6), mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xba*I geschnitten und auf einem 1% igen Agarose-TBE-Gel analysiert.

Bei dem in pYES2 ligierten offenen Leserahmen für DES2 *Mus musculus* war ein Nachweis der korrekten Ligation durch einen Restriktionsverdau nicht möglich, da sich die *Xba*I-Schnittstelle mit einer Dam-Methylierungsstelle überschneidet. Statt dessen wurde die korrekte Klonierung über PCR mit den in Abschnitt 2.3.3 angegebenen Primern nachgewiesen.

Die Konstrukte pTomDES und pCaDES wurden zusätzlich durch einzelsträngige Sequenzierung überprüft. Die Sequenzen wurden mit dem pYES2-spezifischen Sequenzierprimer ATT GTT AAT ATA CCT CTA TAC begonnen und durch *Primer walking* bis zum Ende des offenen Leserahmens verlängert. Die Sequenzierungen wurde bei AGOWA durchgeführt.

Die Sequenz des offenen Leserasters in pTomDES ist identisch mit der Sequenz des cDNA-Klons cLET2D1. Die Sequenz des offenen Leserasters in pCaDES unterscheidet sich in einer Position (G statt C in Position 585) von der Sequenz aus dem *C. albicans*-Genom-Projekt. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die abgeleitete Aminosäure-Sequenz. Für das *C. albicans*-Genom-Projekt wurde ein anderer *C. albicans*-Stamm (SC5314) verwendet als für diese Arbeit (CAI4).

2.3.5 Extraktion von DNA aus einem Agarose-Gel

Protokoll 1:

In den Deckel eines 2 ml-Eppendorf-Gefäßes wurde ein kleines Loch gebohrt und eine mit Glaswolle gestopfte 1000 μ l-Pipettenspitze hineingesteckt. Die zu extrahierende Bande wurde aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und in die mit Glaswolle gestopfte Pipettenspitze überführt. Dieser Aufbau wurde mit dem Eppendorf-Gefäß nach unten in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen gestellt und 5 min bei 3220 g zentrifugiert.

Die im Eppendorf-Gefäß angesammelte Flüssigkeit wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und einmal mit dem einfachen Volumen Phenol/Chloroform 1:1 ausgeschüttelt. Die Probe wurde 5 min bei höchster Geschwindigkeit in der Mikrozentrifuge zentrifugiert, und der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurde die Probe ein- bis zweimal auf die gleiche Weise mit Chloroform ausgeschüttelt, um Phenolreste zu entfernen.

Die DNA wurde durch Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,3) und dem zweifachen Volumen absolutem Ethanol gefällt, ≥ 30 min auf Eis oder bei -20°C inkubiert und 15 min bei höchster Geschwindigkeit in der Mikrozentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 500 μ l 70% igem (v/v) Ethanol gewaschen und 5 min bei höchster Geschwindigkeit in der Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet an der Luft getrocknet.

Die DNA wurde in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Protokoll 2:

⇒ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)

Die zu extrahierende Bande wurde aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) nach den Angaben des Herstellers aus dem Gel extrahiert, mit 10 mM Tris/HCl pH 8,5 von

der QIAquick-Membran eluiert und bei -20°C gelagert.

2.3.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Protokoll 1 (Mini-Präparation):

⇒ MCLACHLAN & RIGGS (1986), *Biotechniques* 4, 310–313 (Literatur [71])

BF-Puffer: 8% (w/v) Saccharose
 0,5% (w/v) Triton X-100
 50 mM EDTA
 10 mM Tris/HCl pH 8,0

IS-Mix: 5 Teile 2-Propanol
 1 Teil 5 M Natriumacetat pH 5,2
 frisch angesetzt

Lysozym-Stammlösung: 20 mg/ml, Lagerung bei -20°C

RNase A-Stammlösung: 10 mg/ml, Lagerung bei -20°C

Mit einem Plasmid transformierte *E. coli*-Kulturen wurden über Nacht (ca. 16 h) in 2–5 ml LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum bei 37°C unter Schütteln angezogen.

Die Zellen wurden in 2 ml-Eppendorf-Gefäßen überführt und 2 min bei 6000 rpm in der Mikrozentrifuge pelletiert. Die Überstände wurden abgenommen und die *E. coli*-Zellen in $220\ \mu\text{l}$ BF-Puffer mit 1 mg/ml Lysozym resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden 90 s bei 95°C im elektrischen Heizblock aufgebrochen, dann wurden die Zelltrümmer 30 min bei höchster Geschwindigkeit in der Mikrozentrifuge sedimentiert.

$200\ \mu\text{l}$ des Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurden $480\ \mu\text{l}$ IS-Mix zugegeben und die Probe wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die gefällte DNA wurde 20 min bei

höchster Geschwindigkeit in der Mikrozentrifuge pelletiert und der Überstand entfernt. Das DNA-Pellet wurde mit 500 μ l 70% igem (v/v) Ethanol gewaschen und 5 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet an der Luft getrocknet.

Die DNA wurde in 100 μ l 10 mM Tris/HCl pH 8,0 mit 0,3 mg/ml RNase A aufgenommen und 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

Protokoll 2: (Mini-Präparation)

⇒ GenElute Plasmid Mini Kit (Sigma-ARK)

Die *E. coli*-Kulturen wurden über Nacht (ca. 16 h) in 2–5 ml LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum bei 37°C unter Schütteln angezogen.

Die Zellen wurden in 2 ml-Eppendorf-Gefäße überführt und durch 2 min Zentrifugieren bei 6000 rpm in der Mikrozentrifuge pelletiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte mit Hilfe des GenElute Plasmid Mini Kits (Sigma-ARK, Steinheim).

Die DNA wurde mit 10 mM Tris/HCl pH 8,0 von der Membran eluiert und bei -20°C gelagert.

Protokoll 3: (Maxi-Präparation)

⇒ Nucleobond AX Kit (Machery-Nagel)

200 ml LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum wurden 1:1000 von einer *E. coli*-Vorkultur angeimpft und über Nacht (ca. 16 h) bei 37°C unter Schütteln angezogen.

Die Zellen wurden durch 5 min Zentrifugieren bei 4000 g pelletiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte mit Hilfe des Nucleobond AX Kits (Machery-Nagel, Düren) mit einer AX 500-Säule.

Die DNA wurde nach der Fällung in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.4 Kultur und Transformation von *E. coli*

2.4.1 Medien für die Kultur von *E. coli*

LB-Medium:

Das LB-Medium ist ein komplexes Vollmedium, das flüssig oder in Form von Agarplatten als Standardmedium für die Kultur von *E. coli* verwendet wurde:

10 g Trypton
5 g Hefe-Extrakt
5 g NaCl
15 g Agar (nur für Agarplatten)
ad 1000 ml H₂O

Das Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert, Antibiotika wurden nach dem Abkühlen zugegeben.

Zur Verwendung als Selektionsmedium wurden die Antibiotika Ampicillin oder Chloramphenicol eingesetzt. Die unten angegebenen Stammlösungen wurden in einer Verdünnung von 1 ml auf 1000 ml Medium zugegeben:

Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml Ampicillin (sterilfiltriert)
Endkonzentration im Medium: 100 µg/ml

Chloramphenicol-Stammlösung: 30 mg/ml Chloramphenicol (sterilfiltriert)
Endkonzentration im Medium: 30 µg/ml

SOB-Medium:

Das SOB-Medium wurde für die Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet:

10 g Bacto-Pepton (Difco)
2,5 g Hefe-Extrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂ (erst nach dem Autoklavieren zugegeben)
10 mM MgSO₄ (erst nach dem Autoklavieren zugegeben)
ad 500 ml H₂O

Das Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert, die beiden Magnesiumsalze wurden erst nach dem Abkühlen hinzugefügt. Alle Salze wurden in Form von Stammlösungen zugegeben:

1 M NaCl (autoklaviert)
2,5 M KCl (autoklaviert)
1 M MgCl₂ (sterilfiltriert)
1 M MgSO₄ (sterilfiltriert)

2.4.2 Kompetente *E. coli*-Zellen

Protokoll 1:

⇒ INOUE *et al.* (1990), *Gene* **96**, 23–28 (Literatur [43])

TB: 10 mM PIPES/KOH pH 6,7
250 mM KCl
15 mM CaCl₂
55 mM MnCl₂
in H₂O, unter sterilen Bedingungen frisch angesetzt

Der TB-Puffer wurde für jede Verwendung aus den folgenden Stammlösungen unter sterilen Bedingungen frisch angesetzt:

0,1 M PIPES in H₂O (sterilfiltriert)

pH 6,7 eingestellt mit KOH

2,5 M KCl in H₂O (autoklaviert)

1 M CaCl₂ (sterilfiltriert)

1 M MgCl₂ (sterilfiltriert)

100 ml SOB-Medium wurden mit 1 ml Übernachtskultur des *E.-coli*-Stammes XL1 blue MRF' angeimpft und bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Kultur wurde auf 50 ml-Falcon-Tubes aufgeteilt, 10 min auf Eis abgekühlt und 10 min bei 3220 g und 4°C pelletiert. Die Zellen wurden in 40 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und dann erneut 10 min bei 3220 g und 4°C pelletiert. Die Pellets wurden in 4 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und dabei in einem Falcon-Tube vereinigt. 560 µl DMSO (7% (v/v) Endkonzentration) wurden zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 200 µl-Aliquots in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert.

Protokoll 2:

⇒ QIAGEN (2000), *The QIAexpressionist* 01/2000

TFB1: 100 mM RbCl

50 mM MnCl₂

30 mM Kaliumacetat

10 mM CaCl₂

15% Glycerin

pH 5,8, sterilfiltriert

TFB2: 10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂
15% Glycerin
pH 6,8 eingestellt mit KOH, sterilfiltriert

100 ml auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,4 erreicht war. Die Kultur wurde in 50 ml-Falcons aufgeteilt, 5 min auf Eis abgekühlt und 5 min bei 3220 g und 4°C pelletiert. Die Zellen wurden in 30 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert, 90 min auf Eis inkubiert und dann erneut 5 min bei 3220 g und 4°C pelletiert. Die Pellets wurden in 4 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 200 µl-Aliquots in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei –80°C gelagert.

2.4.3 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

⇒ SAMBROOK *et al.* (1989), *Molecular Cloning* (Literatur [90])

Die bei –80°C eingefrorenen kompetenten Zellen wurden auf Eis 10–15 min vollständig aufgetaut. 50 ng Plasmid-DNA wurden zu den kompetenten Zellen zugegeben ($\leq \frac{1}{10}$ des Volumens) und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 s bei 42°C im Wasserbad einem Hitzeschock unterworfen und 1–2 min auf Eis abgekühlt. 800 µl SOB-Medium wurden zugegeben und 45 min bei 37°C inkubiert.

Die Zellen wurden auf LB-Agar-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert. In der Regel ergaben bereits 100 µl des Transformationsansatzes eine ausreichende Zahl transformierter Kolonien.

Die Platten wurden über Nacht (ca. 16 h) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Transformationsrate lag in der Größenordnung von $1\text{--}2 \times 10^7$ transformierten Zellen pro µg eingesetzter Vektor-DNA.

2.5 Kultur und Transformation von *S. cerevisiae*

2.5.1 Medien für die Kultur von *S. cerevisiae*

YPD-Medium

YPD-Medium ist ein nicht selektives Vollmedium für die Kultur von *S. cerevisiae*:

- 10 g Hefeextrakt
- 20 g Bacto-Pepton (Difco)
- 20 g Bacto-Agar (Difco)
- 1 NaOH-Plätzchen (nur für Agarplatten)
- 2% (w/v) D-Glukose (erst nach dem Autoklavieren zugegeben)
- ad* 1000 ml H₂O

Das Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert. Die Glukose wurde nach dem Abkühlen in Form einer 20% igen oder 40% igen (w/v) sterilfiltrierten oder autoklavierten Stammlösung zugegeben.

CM-Medium

⇒ TRECO & LUNDBLAD (1993), in *Current Protocols in Molecular Biology* (Literatur [114])

Das CM- (*Complete Minimal*) Medium ist ein synthetisches Medium für die Kultur von *S. cerevisiae*. Es dient zur Selektion unter Ausnutzung von Aminosäure-, Adenin- oder Uracil-Auxotrophien der verwendeten Hefestämme. Das Medium enthält alle in Tabelle 2.4 aufgeführten Bestandteile außer denjenigen, die zur Selektion genutzt werden sollen (daher der Name *Complete Minimal*). In dieser Arbeit wurde Uracil-Selektion in Verbindung mit dem pYES2-Vektor und Leucin-Selektion in Verbindung mit dem pVT-Leu-Vektor eingesetzt.

Als Kohlenstoffquelle wurden Raffinose oder Glukose verwendet. Das Medium wird entsprechend als CM-Raffinose- oder CM-Glukose-Medium bezeichnet. Für die Expression eines unter der Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors

Endkonzentration im Medium	Menge im <i>Dropout-Powder</i>	Konzentration der Stamm- lösung	Bestandteil
40 $\mu\text{g/ml}$	2,5 g	—	Adenin (Hemisulfat)
20 $\mu\text{g/ml}$	1,2 g	—	L-Arginin (Chlorid)
100 $\mu\text{g/ml}$	6,0 g	—	L-Aspartat (Na-Salz)
100 $\mu\text{g/ml}$	6,0 g	—	L-Glutamat (Na-Salz)
20 $\mu\text{g/ml}$	—	10 mg/ml	L-Histidin
60 $\mu\text{g/ml}$	—	10 mg/ml	L-Leucin
30 $\mu\text{g/ml}$	1,8 g	—	L-Lysin (Chlorid)
20 $\mu\text{g/ml}$	1,2 g	—	L-Methionin
50 $\mu\text{g/ml}$	3,0 g	—	L-Phenylalanin
375 $\mu\text{g/ml}$	22,5 g	—	L-Serin
200 $\mu\text{g/ml}$	12,0 g	—	L-Threonin
40 $\mu\text{g/ml}$	—	10 mg/ml	L-Tryptophan
30 $\mu\text{g/ml}$	1,8 g	—	L-Tyrosin
150 $\mu\text{g/ml}$	9,0 g	—	L-Valin
20 $\mu\text{g/ml}$	—	2 mg/ml	Uracil

Tabelle 2.4: Aminosäuren, Adenin und Uracil für die Herstellung von CM-Medium. Das *Dropout-Powder* stellt die meisten Aminosäuren und Adenin bereit. Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil werden häufig zur Selektion verwendet. Sie sind deshalb nicht Bestandteil des *Dropout-Powder*, sondern werden bei Bedarf aus Stammlösungen zugegeben. Alle Stammlösungen werden sterilfiltriert. Tabelle in Anlehnung an [114].

befindlichen offenen Leserasters wurde CM-Raffinose-Medium verwendet, da Glukose diesen Promotor reprimiert. Zur Induktion des *GAL1*-Promotors wurde dem CM-Raffinose-Medium Galaktose *ad* 2% (v/v) aus einer sterilfiltrierten 20%igen Stammlösung zugefügt. CM-Glukose-Medium wurden verwendet, wenn eine Expression nicht benötigt oder nicht gewünscht wurde.

20 g Bacto-Agar (Difco Laboratories, Augsburg) (nur für Agarplatten)
1 NaOH-Plätzchen (nur für Agarplatten)
1,16 g *Dropout-Powder* (siehe Tabelle 2.4)
1× Yeast Nitrogen Base (Difco Laboratories, Augsburg)
(sterilfiltriert, erst nach dem Autoklavieren zugegeben)
2% (w/v) Raffinose oder Glukose
(sterilfiltriert, erst nach dem Autoklavieren zugegeben)
Leucin-, Histidin-, Tryptophan- oder Uracil-Stammlösung
(sterilfiltriert, erst nach dem Autoklavieren zugegeben)
ad 1000 ml H₂O

Das Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert. Glukose bzw. Raffinose, Yeast Nitrogen Base sowie Histidin, Leucin, Tryptophan oder Uracil wurden nach dem Abkühlen in Form von Stammlösungen zugegeben. Die Raffinose-Stammlösung war 20% ig, die Glukose-Stammlösung 20- oder 40% ig und die Yeast-Nitrogen-Base-Stammlösung 10 fach konzentriert. Die Konzentration der Aminosäure- und Uracil-Stammlösungen sind in Tabelle 2.4 angegeben. Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert, die Glukose-Stammlösung kann alternativ auch autoklaviert werden.

2.5.2 Kompetente *S. cerevisiae*-Zellen

⇒ DOHMEN *et al.* (1991), *Yeast* **7**, 691–692 (Literatur [23]), modifiziert von MICHAEL VON PEIN, Dissertation (1992)

- Lösung A: 1 M Sorbit
10 mM Tricin/NaOH pH 8,35
3% (v/v) Ethylenglykol
autoklaviert, Lagerung bei 4–8°C
- Histaminlösung: 1 M Histamin
sterilfiltriert, Lagerung bei –20°C
- Heringssperma-DNA: 10 mg/ml einzelsträngige Heringssperma-DNA
in 10 mM TE-Puffer, per Ultraschall auf eine Fragmentgröße von 2–15 kb zerkleinert und hitzedenaturiert
Lagerung bei –20°C
⇒ BECKER & LUNDBLAD (1993), in *Current Protocols in Molecular Biology* (Literatur [4])

100 ml YPD-Medium wurden mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und 4 h bei 30°C im Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde auf 50 ml-Falcon-Tubes aufgeteilt und 5 min bei 3220 g pelletiert. Die Zellen wurden einmal in 20 ml Lösung A gewaschen, anschließend in 4 ml Lösung A resuspendiert und dabei in einem Falcon-Tube vereinigt. 100 µl 1 M Histaminlösung und 100 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) wurden zupipettiert und durch Schwenken des Falcon-Tubes mit der Hand vermischt. Die Zellen wurden in 200 µl-Aliquots in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäßen aufgeteilt und bei –80°C eingefroren (kein Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff). Die Zellen blieben vor der ersten Verwendung mindestens 2 h eingefroren, da sie erst hierdurch ihre vollständige Kompetenz erlangen.

2.5.3 Transformation kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

⇒ DOHMEN *et al.* (1991), *Yeast* **7**, 691–692 (Literatur [23]), modifiziert von MICHAEL VON PEIN, Dissertation (1992)

- Lösung B: 40% (w/v) PEG 3350
200 mM Tricin/NaOH pH 8,35
autoklaviert, Lagerung bei 4–8°C

Lösung C: 0,15 mM NaCl
10 mM Tricin/NaOH pH 8,35
autoklaviert, Lagerung bei 4–8°C

1–5 μg Plasmid-DNA wurden direkt auf die noch gefrorenen kompetenten Zellen gegeben. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert (Hitzeschock), dann wurden 1,2 ml Lösung B zugeben und durch mehrmaliges Umdrehen des Eppendorf-Gefäßes vorsichtig vermischt. Anschließend wurde 60 min bei 30°C ohne Schütteln inkubiert.

Die Zellen wurden 1 min bei 6000 rpm in der Mikrozentrifuge pelletiert, der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Die Zellen wurden 2 mal mit 1 ml Lösung C gewaschen, um das PEG zu entfernen, und in 1 ml Lösung C resuspendiert.

Die Zellen wurden auf CM-Glukose-Platten zur Selektion auf Aminosäure- oder Uracil-Auxotrophie ausplattiert. In der Regel ergaben bereits 100 μl des Transformationsansatzes eine ausreichende Zahl transformierter Kolonien.

Die Platten wurden 2–3 Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Die Transformationsrate lag in der Größenordnung von $1\text{--}8 \times 10^3$ transformierter Zellen pro μg eingesetzter Vektor-DNA.

2.6 Bedingungen für die Expression putativer Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen in *S. cerevisiae*

Die Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen liegen auf dem Hefe-Expressionsvektor pYES2 (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe) vor. Ihre Expression steht unter der Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors. Als Hefestamm wird TDY2037-*sur2* Δ (*MAT α lys2 ura3-52 trp1* Δ *leu2* Δ *sur2::TRP1*) [36] verwendet. Dieser Hefestamm wurde freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Teresa Dunn (Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, Maryland, U.S.A.) zur Verfügung gestellt.

Zur Expression der Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen in *S. cerevisiae* wurde CM-Medium ohne Uracil verwendet. Dabei wurden für Vor- und Hauptkultu-

ren verschiedene Kombinationen von Glukose und Raffinose als Kohlenstoffquelle verwendet. Die Induktion des *GAL1*-Promotors erfolgte durch Zugabe von Galaktose *ad* 2% (v/v) aus einer sterilfiltrierten 20%igen Stammlösung entweder sofort oder 24 h nach dem Animpfen der Hauptkultur. Erfolgte die Anzucht der Hefe zunächst in CM-Glukose-Medium, wurde spätestens zum Zeitpunkt der Induktion das Medium gegen CM-Raffinose-Medium gewechselt, da Glukose den *GAL1*-Promotor reprimert.

Die Hauptkulturen wurden von über 3 Tage angezogenen Vorkulturen auf eine berechnete OD₆₀₀ von 0,020 in Erlenmeyerkolben angeimpft und bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Das Volumen der Erlenmeyerkolben betrug das 5–10 fache des Kulturvolumens. Die Ernte erfolgte 48 h nach dem Animpfen der Hauptkulturen. Für die HPLC-Analyse der Sphingobasen wurde ein Kulturvolumen von 50 ml, für die NMR-Analyse ein Kulturvolumen von 2,4 l verwendet.

Bei einigen Versuchen wurden die Hauptkulturen mit Hitzeschock behandelt. Dies führt nach mehreren Studien zu einem erhöhten Anteil von freiem Ceramid [22, 46]. Dieser Effekt wurde ausgenutzt, um die Bildung von $\Delta 4$ -ungesättigten Sphingolipiden bei der Expression zu erleichtern. Die Hitzeschockbehandlung erfolgte für 1 h oder 1,5 h bei 37°C.

Die bei der Ernte der Hauptkulturen erreichte OD₆₀₀ hing von den Anzuchtbedingungen, manchmal auch von weiteren nicht näher bekannten Faktoren ab. Bei den hier beschriebenen optimierten Bedingungen wurde in der Regel eine OD₆₀₀ von 2–3 erreicht. Die Kontrolle der Anzucht erfolgte immer nach der Inkubationszeit, nicht nach der erreichten OD₆₀₀.

Die Anzuchtbedingungen wurden wie in Abschnitt 3.6 beschrieben optimiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden zur Expression der Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase die folgenden optimierten Bedingungen verwendet:

- Anzucht der Vorkulturen in CM-Glukose-Medium.
- Animpfen der Hauptkulturen in CM-Raffinose-Medium mit sofortiger Induktion des *GAL1*-Promotors durch Zugabe von Galaktose.

- Bei Anzucht ohne Hitzeschock Inkubation für 48 h bei 30°C.
- Bei Anzucht mit Hitzeschock Inkubation für 70 h bei 25°C gefolgt von 1,5 h Hitzeschock bei 37°C.

Für die Koexpression der Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen mit der Glukosylceramid-Synthase aus *H. sapiens* wurde CM-Medium ohne Uracil und Leucin verwendet. Die Glukosylceramid-Synthase liegt auf dem Hefeexpressionsvektor pVT-Leu vor und wurde freundlicher Weise von Frau Dr. Martina Leipelt, Institut für Allgemeine Botanik, Universität Hamburg, zur Verfügung gestellt. Ihre Expression steht unter der Kontrolle des konstitutiven *ADH*-Promotors.

2.7 HPLC-Analyse der Sphingobasen von *S. cerevisiae*

Die hier beschriebene Methode zur HPLC-Analyse der Sphingbasen wurde von P. SPERLING *et al.* (1998) [103] basierend auf der Ba(OH)₂-Hydrolyse nach MORRISON & HAY (1970) [78]) und der DNP-Derivatisierung nach KARLSSON (1970) [48] entwickelt. Die Methode wurde in dieser Arbeit leicht modifiziert, was zu einer verbesserten Ausbeute und Reinheit der Proben führte.

2.7.1 Ba(OH)₂-Hydrolyse der Hefezellen

⇒ MORRISON & HAY (1970), *Biochim. Biophys. Acta* **202**, 460–467 (Literatur [78])

0,1–0,5 g Hefezellen wurden in ein Sovirel-Gläschen überführt und in 1,5 ml H₂O resuspendiert. 1,5 ml 1,4-Dioxan und 300 mg Ba(OH)₂ · H₂O (entspricht 20% (w/v) im H₂O-Anteil) wurden zugegeben und die Proben im verschlossenen Gläschen 20 h bei 110°C im elektrischen Heizblock erhitzt.

Nach dem Abkühlen wurden 2,5 ml H₂O und 4 ml CHCl₃ zugegeben, sodass sich ein Verhältnis CHCl₃/Dioxan/H₂O von 8 : 3 : 8 einstellte. Die hydrolysierten Lipide wurden durch Schütteln in die CHCl₃-Phase extrahiert.

Durch kurzes Zentrifugieren bei 1300 g wurde eine Phasentrennung herbeigeführt. Die CHCl₃-Phase wurde in ein 20 ml-Schliffgläschen überführt. Die wässrige

Phase wurde einmal mit 4 ml CHCl_3 nachextrahiert.

Die vereinigte CHCl_3 -Phase wurden zweimal mit 8 ml 0,1 M KOH+0,5 M KCL gewaschen. Die gewaschene CHCl_3 -Phase wurde in ein neues Sovirel-Gläschen überführt. Das CHCl_3 wurde nach Zugabe einiger Tropfen 2-Propanol unter Argon vollständig abgedampft.

2.7.2 DNP-Derivatisierung der freien Sphingobasen

⇒ KARLSSON (1970), *Chem. Phys. Lipids* **5**, 6–43 (Literatur [48])

FDNB-Lösung: 0,5% (v/v) 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (FDNB) in Methanol, frisch angesetzt

Boratpuffer: 2 M Borsäure/KOH pH 10,5

Die hydrolysierten Lipide wurden in 0,2 ml FDNB-Lösung gelöst. Unter Mischen wurden 0,8 ml Boratpuffer langsam zugegeben. Die Probe wurde im verschlossenen Gläschen 30 min bei 60°C erhitzt.

Nach dem Abkühlen wurde durch Zugabe von 1,2 ml H_2O , 1,8 ml Methanol und 4 ml CHCl_3 ein Verhältnis von CHCl_3 /Methanol/ H_2O 2 : 2 : 1 eingestellt. Die DNP-derivatisierten Sphingobasen wurden durch kräftiges Schütteln in die CHCl_3 -Phase extrahiert.

Durch kurzes Zentrifugieren bei 1300 g wurde eine Phasentrennung herbeigeführt. Die CHCl_3 -Phase wurde in ein 10 ml-Schliffgläschen überführt. Die wässrige Phase wurde einmal mit 4 ml CHCl_3 nachextrahiert. Das CHCl_3 wurde nach Zugabe einiger Tropfen 2-Propanol unter Argon vollständig abgedampft.

2.7.3 DC-Reinigung der DNP-derivatisierten Sphingobasen

⇒ KARLSSON (1970), *Chem. Phys. Lipids* **5**, 6–43 (Literatur [48])

Die DNP-derivatisierten Sphingobasen wurden in einer geringen Menge CHCl_3 /Methanol 2:1 gelöst und 6,5 cm breit auf eine Kieselgel 60-DC-Platte aufgetragen. Als Referenz wurde eine Mischung DNP-derivatisierter Standards

von Phytosphinginin (t18:0), Sphingosin (d18:1^{4E}) und Sphinginin (d18:0) aufgetragen.

Die DCs wurden in CHCl₃/Methanol 9:1 entwickelt. Die Lipidbanden wurden unter UV-Licht mit Bleistift markiert. Die DNP-Derivate der Sphingobasen erschienen unter UV-Licht blau-schwarz.

Das Kieselgel wurde in dem Bereich, in dem die DNP-derivatisierten Sphingobasen liefen, nach Besprühen mit H₂O weiträumig abgekratzt und in ein 20 ml-Schliffgläschen überführt. Es wurden 9 ml CHCl₃/Methanol 2:1 zugegeben. Die Probe wurde gemischt und anschließend 5–10 min im Ultraschallbad inkubiert.

Nach nochmaligem Mischen wurden 3 ml 0,1 M KOH zugegeben. Die DNP-derivatisierten Sphingobasen wurden durch Schütteln in die CHCl₃-Phase extrahiert. Durch kurzes Zentrifugieren bei 1300 g wurde eine Phasentrennung herbeigeführt.

Die CHCl₃-Phase wurde durch eine mit Watte gestopfte Pasteurpipette in ein 10 ml-Schliffgläschen filtriert. Die wässrige Phase wurde mit 6 ml CHCl₃ einmal nachextrahiert. Die neue CHCl₃-Phase wurde ebenfalls filtriert und mit der ersten vereinigt. Das CHCl₃ wurde nach Zugabe einiger Tropfen 2-Propanol unter Argon vollständig abgedampft. Die DNP-derivatisierten Sphingobasen wurden in einem geeigneten Volumen Methanol (in der Regel 500 µl) gelöst und in Autosampler-Gläschen überführt.

2.7.4 DNP-derivatisierte Sphingobasen-Standards

1–5 mg freie Sphingobasen-Standards (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) wurden in ein Sovirel-Gläschen überführt und wie in Abschnitt 2.7.2 beschrieben mit FDNB derivatisiert. Die weitere Präparation der DNP-derivatisierten Sphingobasen-Standards erfolgte wie die der Proben.

2.7.5 HPLC-Analyse

⇒ SPERLING *et al.* (1998), *J. Biol. Chem.* **273**, 28590–28596 (Literatur [103]), optimiert von C. OTT (unpubliziert) und in dieser Arbeit

HPLC-System:

Pumpen:	SpektraSYSTEM P4000
Autosampler:	SpektraSYSTEM AS3000
Entgaser:	SpektraSYSTEM SCM1000
UV-Detektor:	SpektraSYSTEM UV6000LP
Software:	ChromQuest Version 2.51 für Windows NT
Hersteller:	ThermoQuest, San Jose, California, U.S.A.

Laufbedingungen:

Säule:	Multospher RP18-5, 250 × 4 mm (CS-Chromatographie, Langerwehe) temperiert auf 30°C
Laufmittel A:	H ₂ O
Laufmittel B:	Methanol/Acetonitril/2-Propanol 10 : 3 : 1
Programm:	Detektorwellenlänge: 350 nm Einspritzvolumen: 5–20 µl Fluss: 0,8 ml/min Lauf: konkaver Gradient von 84 auf 100% B in 55 min, 15 min isokratisch bei 100% B

2.7.6 HPLC/MS- und ESI/MS/MS-Analyse

Die HPLC/MS- und ESI/MS/MS-Analyse wurde auf einem MAT 95XL-Trap-Massenspektrometer (Thermoquest, San Jose, California, U.S.A.) durchgeführt. Das Gerät verfügte über ein Einspritzsystem mit *Electrospray*-Ionisation (ESI), einen hochauflösenden Quadrupol und eine nachgeschaltete Ionenfalle. Alle Messungen wurden im negativen Ionen-Modus durchgeführt.

Die DNP-derivatisierten Sphingobasen wurden über ein HPLC-System (Hitachi, Düsseldorf) aufgetrennt und über ein Splitventil in das Massenspektrometer eingespritzt. Während des HPLC-Laufs wurden in Echtzeit das Massenspektrum im Bereich $m/z = 300$ bis 1200 sowie der Gesamtionenstrom bestimmt. Die

HPLC-Säule und die Laufbedingungen waren identisch mit denen in Abschnitt 2.7.5. Als Referenzsubstanzen wurden DNP-derivatisiertes Sphinganin (d18:0), Sphingosin (d18:1^{4E}) und Phytosphinganin (t18:0) verwendet.

Für die Durchführung der HPLC/MS- und ESI/MS/MS-Analyse und die Interpretation der Daten danke ich Herrn Dr. Stephan Franke (Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg).

2.8 NMR-Spektroskopie der Sphingobasen von *S. cerevisiae*

Die hier beschriebene Methode zur Herstellung per-*N,O*-acetylierter Sphingobasen für die NMR-Spektroskopie wurde von P. SPERLING *et al.* (1998) [103] basierend auf der Ba(OH)₂-Hydrolyse nach MORRISON & HAY (1970) [78]) und der Acetylierung mit *N,N*-Dimethyl-4-aminopyridin nach GUPTA *et al.* (1977) [35] entwickelt. Die Methode wurde in dieser Arbeit leicht modifiziert.

2.8.1 Ba(OH)₂-Hydrolyse der Hefezellen

⇒ MORRISON & HAY (1970), *Biochim. Biophys. Acta* **202**, 460–467 (Literatur [78])

Die hier beschriebene Ba(OH)₂-Hydrolyse unterscheidet sich von dem in Abschnitt 2.7.1 angegebenen Protokoll hauptsächlich durch den größeren Maßstab der Präparation. Die Ba(OH)₂-Hydrolyse der Hefezellen erfolgte wegen der großen Menge der eingesetzten Hefe in zwei Durchgängen. Insgesamt wurden 12 g Hefezellen für die Aufarbeitung eingesetzt. Die folgenden Angaben gelten für jeweils einen Durchgang.

5–7 g Hefezellen wurden mit 60 ml H₂O in einen 100 ml-Zweihalskolben übergeführt. 60 ml 1,4-Dioxan und 12 g Ba(OH)₂ · H₂O (entspricht 20% (w/v) im H₂O-Anteil) wurden zugegeben. Der Ansatz wurde 24 h bei ständigen Rühren unter Rückfluss erhitzt.

Nach dem Abkühlen wurde der gesamte Hydrolyseansatz mit 360 ml CHCl₃ und 300 ml H₂O in einen 1000 ml-Scheidetrichter transferiert, sodass sich im Scheidetrichter ein Verhältnis CHCl₃/Dioxan/H₂O von 6 : 1 : 6 einstellte.

Die hydrolysierten Lipide wurden durch kräftiges Schütteln in die CHCl_3 -Phase extrahiert. Die CHCl_3 -Phase wurde abgelassen und in einem 1000-ml-Rundkolben aufgefangen. Die wässrige Phase wurde einmal mit 360 ml CHCl_3 nachextrahiert.

Die CHCl_3 -Phase (720 ml) wurde auf zwei 1000-ml-Scheidetrichter aufgeteilt und durch Ausschütteln mit dem gleichen Volumen 0,1 M KOH + 0,5 M NaCl gewaschen.¹ Bei einem der beiden Durchgänge wurde die CHCl_3 -Phase zusätzlich durch einen Papierfilter filtriert. Die Probe wurde dadurch sehr schön klar. Zusätzliche Versuche ergaben, dass durch das Filtrieren kurzkettige Sphingobasen (14 C-Atome) verloren gehen, während die Ausbeute von Sphingobasen normaler Kettenlänge (16–18 C-Atome) nicht beeinträchtigt wird.

Das CHCl_3 wurde nach Zugabe einiger Milliliter 2-Propanol am Rotationsverdampfer abgedampft. Die hydrolysierten Lipide wurden mit einigen Millilitern CHCl_3 /Methanol 2 : 1 in ein 10-ml-Schliffgläschen übergeführt. Das Lösungsmittel wurde nach Zugabe einiger Tropfen 2-Propanol unter Argon vollständig abgedampft.

Ab hier erfolgte die Verarbeitung der Proben aus beiden Durchgängen wieder gemeinsam.

2.8.2 DC-Reinigung der freien Sphingobasen

Die hydrolysierten Lipide wurden in einer geringen Menge CHCl_3 /Methanol 2 : 1 gelöst und auf vier Kieselgel-60-DC-Platten je 15 cm breit aufgetragen. Die DC-Platten wurden in CHCl_3 /Methanol/25% NH_3 40 : 20 : 3 entwickelt.² Nach dem

¹ $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ist zu einem geringen Teil in Chloroform löslich. Durch das Waschen werden Reste von $\text{Ba}(\text{OH})_2$ aus der CHCl_3 -Phase entfernt, die sonst bei der nachfolgenden DC-Reinigung der freien Sphingobasen das Laufverhalten verändern. Die Entfernung des $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ist nicht quantitativ, und die Phasentrennung stellt sich recht langsam ein. Inzwischen wird 0,1 M KOH + 0,5 M KCl statt 0,1 M KOH + 0,5 M NaCl verwendet.

²Bei den Versuchen zur Optimierung dieses Laufmittels wurde auch ein Laufmittel auf Basis von Aceton getestet. Aceton/25% NH_3 100 : 1 trennt sehr gut Sphingamin und Phytosphingamin. Es ist jedoch nicht zur Trennung von gesättigten und ungesättigten Sphingobasen geeignet.

Abdampfen des Laufmittels wurden die DC-Platten mit ANS besprüht und die Lipidbanden unter UV-Licht mit Bleistift markiert. Das Kieselgel im Bereich der gesättigten und ungesättigten Sphingobasen wurde getrennt abgekratzt und in 40 ml-Schliffgläschen überführt.

Die freien Sphingobasen wurden mit 8 ml Methanol/25% NH₃ 10:1 aus dem Kieselgel extrahiert (15–20 min im Ultraschallbad, Schütteln über Nacht bei 8°C). Die Probe wurde einige Minuten bei 1300 g zentrifugiert, der Überstand wurde durch eine mit Watte gestopfte Pasteurpipette in ein 40 ml-Schliffgläschen filtriert. Die Kieselgel-Reste wurden einmal mit 8 ml Methanol/25% NH₃ 10:1 nachextrahiert (2 h Schütteln bei 8°C).

Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgedampft, die Lipide wurden in einigen Millilitern 2-Propanol wieder gelöst und erneut abgedampft. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die Probe vollständig trocken war.

2.8.3 Per-*N,O*-Acetylierung der freien Sphingobasen

⇒ GUPTA *et al.* (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 4315-4319 (Literatur [35])

Acetylierungs-Mix: 10 Teile getrocknetes Pyridin
2 Teile 3,7% (w/v) *N,N*-Dimethyl-4-aminopyridin
in getrocknetem Pyridin
1 Teil Essigsäureanhydrid
frisch angesetzt

Die freien Sphingobasen wurden in 6 ml Acetylierungs-Mix gelöst. Die Proben wurden über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Nach dem Ende der Inkubationszeit war der Acetylierungsansatz durch Nebenprodukte der Reaktion dunkelbraun gefärbt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgedampft, die Probe wurde in 2-Propanol/H₂O 1:1 wieder gelöst und erneut abgedampft. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die Probe vollständig trocken und kein Pyridin mehr zu riechen war. Beim letzten Abdampfen wurde reines 2-Propanol verwendet.

2.8.4 DC-Reinigung der acetylierten Sphingobasen

Die acetylierten Sphingobasen wurden in einer geringen Menge CHCl_3 /Methanol 2:1 gelöst und 15 cm breit auf Kieselgel-60-DC-Platten aufgetragen. Die DC-Platten wurden in CHCl_3 /Methanol 20:1 entwickelt. Nach dem Abdampfen des Laufmittels wurden die DC-Platten mit ANS besprüht und die Lipidbanden unter UV-Licht mit dem Bleistift markiert.³ Das Kieselgel im Bereich der Banden der acetylierten Sphingobasen wurde abgekratzt und in 20 ml-Schliffgläschen überführt. Die acetylierten Sphingobasen wurden mit 6 ml CHCl_3 /Methanol 2:1 aus dem Kieselgel extrahiert (10–20 min im Ultraschallbad, Schütteln über Nacht bei 8°C). Es wurden 2 ml 0,1 M KOH+0,5 M NaCl zugegeben, sodass sich ein Verhältnis CHCl_3 /Methanol/ H_2O 2:1:1 einstellt. Die acetylierten Sphingobasen wurden durch Schütteln in die CHCl_3 -Phase extrahiert.

Durch kurzes Zentrifugieren bei 1300 g wurde eine Phasentrennung herbeigeführt. Die CHCl_3 -Phase wurde durch eine mit Watte gestopfte Pasteurpipette in ein 10 ml-Schliffgläschen filtriert. Die wässrige Phase wurde einmal mit 4 ml CHCl_3 nachextrahiert.

Das Lösungsmittel wurde unter Argon abgedampft. Die acetylierten Sphingobasen wurden mit einer geringen Menge CHCl_3 /Methanol 2:1 in ein Bördelkapengläschen überführt und unter Argon vollständig abgedampft.

³Es waren sehr viele Banden von bei Acetylierung entstandenen Nebenprodukten zu erkennen. Dieses Problem könnte auf folgende Weise vermindert werden:

- Einsatz einer geringeren Menge Acetylierungsmix, z.B. 1 ml.
- Extraktion aus dem Acetylierungsansatz mit einer Phasentrennung. Hierbei ergibt sich jedoch die Gefahr von Ausbeuteverlusten.
- Verwendung eines DC-Laufmittels, das eine bessere Trennung von acetylierten Sphingobasen und Nebenprodukten ergibt, z.B. reiner Diethylether.

2.8.5 Acetylierte Sphingobasen-Standards

1–5 mg freie Sphingobasen-Standards (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) wurden in einen 25 ml-Spitzkolben überführt. Die freien Sphingobasen wurden in 1 ml Acetylierungs-Mix gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die weitere Präparation der per-*N,O*-derivatisierten Sphingobasen-Standards erfolgte wie die der Proben.

2.8.6 ^1H -NMR-Spektroskopie

Die ^1H -NMR-Spektroskopie wurde auf einem AVANCE DRX-600-Spektrometer (Bruker, Rheinstetten) bei 600 MHz durchgeführt. Die Spektren wurden bei einer Temperatur von 300 K in CDCl_3 mit den CHCl_3 -Verunreinigungen des CDCl_3 als internem Standard ($\delta_{\text{H}} = 7, 24$) aufgenommen.

Von den in Abschnitt 2.8.1–2.8.4 erhaltenen per-*N,O*-acetylierten Sphingobasen wurden eindimensionale ^1H - und zweidimensionale $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektren aufgenommen. Als Referenzsubstanz wurde per-*N,O*-acetyliertes Sphingosin ($\text{d}18:1^{4E}$) verwendet.

Für die Aufnahme und Interpretation der ^1H -NMR-Spektren danke ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Zähringer (Forschungszentrum Borstel).

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde in einer computergestützten Suche in öffentlich zugänglichen Sequenzdatenbanken eine Familie putativer Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen identifiziert. Einige Mitglieder dieser Familie aus dem Menschen (*Homo sapiens*), der Maus (*Mus musculus*), der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), der Hefe *Candida albicans* und der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) wurden anschließend experimentell durch heterologe Expression in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* biochemisch charakterisiert.

3.1 Identifizierung einer Familie putativer Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen

Wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, wurde mit PSI-Blast [2] eine Sammlung von 397 bekannten und putativen membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen erstellt. Die Sequenzen wurden mit Hilfe von mit ClustalX [111] berechneten Stammbäumen manuell in Familien eingeteilt. Jeder Familie wurde, soweit möglich, anhand von Sequenzen mit bekannter Funktion eine biochemische Funktion zugeordnet.

Es wurde angenommen, dass eine Familie putativer Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen drei Kriterien erfüllen müsste:

- Die Familie sollte keine Enzyme mit bekannter biochemischer Funktion enthalten.
- Die Familie sollte Sequenzen aus Pflanzen, Pilzen und Tieren enthalten, da in allen drei eukaryoten Reichen Δ 4-desaturierte Sphingolipide nachgewiesen wurden.

- Es sollte keine Sequenz aus *S. cerevisiae* vorkommen, da in *S. cerevisiae* keine $\Delta 4$ -desaturierten Sphingolipide nachweisbar sind.

Es wurde genau eine Familie mit sieben Sequenzen gefunden, die diesen drei Kriterien entsprach. Sie enthielt Sequenzen aus *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* (zwei Sequenzen), *Arabidopsis thaliana* und *Schizosaccharomyces pombe*. Drei dieser Sequenzen waren bereits mit molekularbiologischen Methoden untersucht worden, ihre biochemische Funktion war jedoch noch nicht bekannt [12, 28, 29].

Um weitere Sequenzen aus dieser Familie zu finden, wurden die TIGR Gene Indices (<http://www.tigr.org/tdb>) per Blast (tblastn) [2] durchsucht. Neben *Tentative consensus*-Sequenzen, die den per PSI-Blast gefundenen Sequenzen aus *H. sapiens*, *M. musculus* und *D. melanogaster* entsprachen, wurden auch Sequenzen von weiteren Familienmitgliedern aus *H. sapiens*, *M. musculus* und *Lycopersicon esculentum* (Tomate) gefunden. Die entsprechenden cDNA-Klone wurden sequenziert und die Sequenzen in der GenBank/EBI-Datenbank hinterlegt (siehe Abschnitt 2.3.2).

Um weitere Sequenzen aus Pilzen zu finden, wurden die genomischen Sequenzen der Hefen *Candida albicans* (Stanford Genome Technology Center, <http://sequence-www.stanford.edu/group/candida>) und *Neurospora crassa* (Neurospora Genome Project, <http://mips.gsf.de/proj/neurospora>) per Blast (tblastn) durchsucht. In beiden Organismen wurde je eine Sequenz gefunden, die ein neues Familienmitglied kodiert.

In Tabelle 3.1 sind die in diesem Abschnitt identifizierten Mitglieder der DES-Familie zusammengefasst. In Abbildung 3.1 ist ein *Alignment* der Sequenzen gezeigt, die in dieser Arbeit experimentell untersucht wurden (siehe Abschnitt 3.5).

Die drei schon zuvor in molekularbiologischen Studien untersuchten Familienmitglieder sind DES-1 aus *D. melanogaster* [28], MDES aus *M. musculus* [29] und MLD aus *H. sapiens* [12]. Um die Nomenklatur zu vereinfachen, wird in dieser Arbeit die neu gefundene Familie als DES-Familie bezeichnet. MDES und MLD werden beide als DES1 bezeichnet, das zweite Familienmitglied aus *M. musculus*

Bezeichnung	Organismus	Quelle
DES1 (*) (Mdes) [29]	<i>M. musculus</i>	cDNA-Klon I.M.A.G.E. 2123522 GenBank NP_031879
DES1 (*) (MLD) [12]	<i>H. sapiens</i>	cDNA-Klon I.M.A.G.E. 2578328 GenBank NP_003667
DES2 (*)	<i>M. musculus</i>	cDNA-Klon I.M.A.G.E. 920524
DES2-Homolog	<i>H. sapiens</i>	cDNA-Klon I.M.A.G.E. 2109176
DES-1 (*) [28]	<i>D. melanogaster</i>	cDNA-Klon LP11871 GenBank CAA63889
DES-Homolog 1	<i>C. elegans</i>	GenBank NP_493549
DES-Homolog 2	<i>C. elegans</i>	GenBank NP_501256
DES-Homolog	<i>A. thaliana</i>	GenBank AAD17340
DES-Homolog	<i>L. esculentum</i>	cDNA-Klon cLET2D1
Des1p (*)	<i>C. albicans</i>	Basen 7499–8611, Contig 6-2340
Des1p-Homolog	<i>N. crassa</i>	Basen 17916–16535, Contig 9a58
Des1p-Homolog	<i>S. pombe</i>	GenBank T40333

Tabelle 3.1: Bezeichnungen und Quellenangaben der in Abschnitt 3.1 identifizierten Mitglieder der DES-Familie. Die mit einem Sternchen (*) gekennzeichneten Sequenzen wurden in dieser Arbeit biochemisch als Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen charakterisiert. Bei den drei durch molekularbiologische Arbeiten zuvor charakterisierten Sequenzen ist in eckigen Klammern die Literaturreferenz angegeben. Bei *M. musculus* DES1 und *H. sapiens* DES1 ist in runden Klammern zudem die in diesen Arbeiten verwendete ursprüngliche Bezeichnung angegeben. Für nähere Angaben zu den cDNA-Klonen siehe Abschnitt 2.3.2.

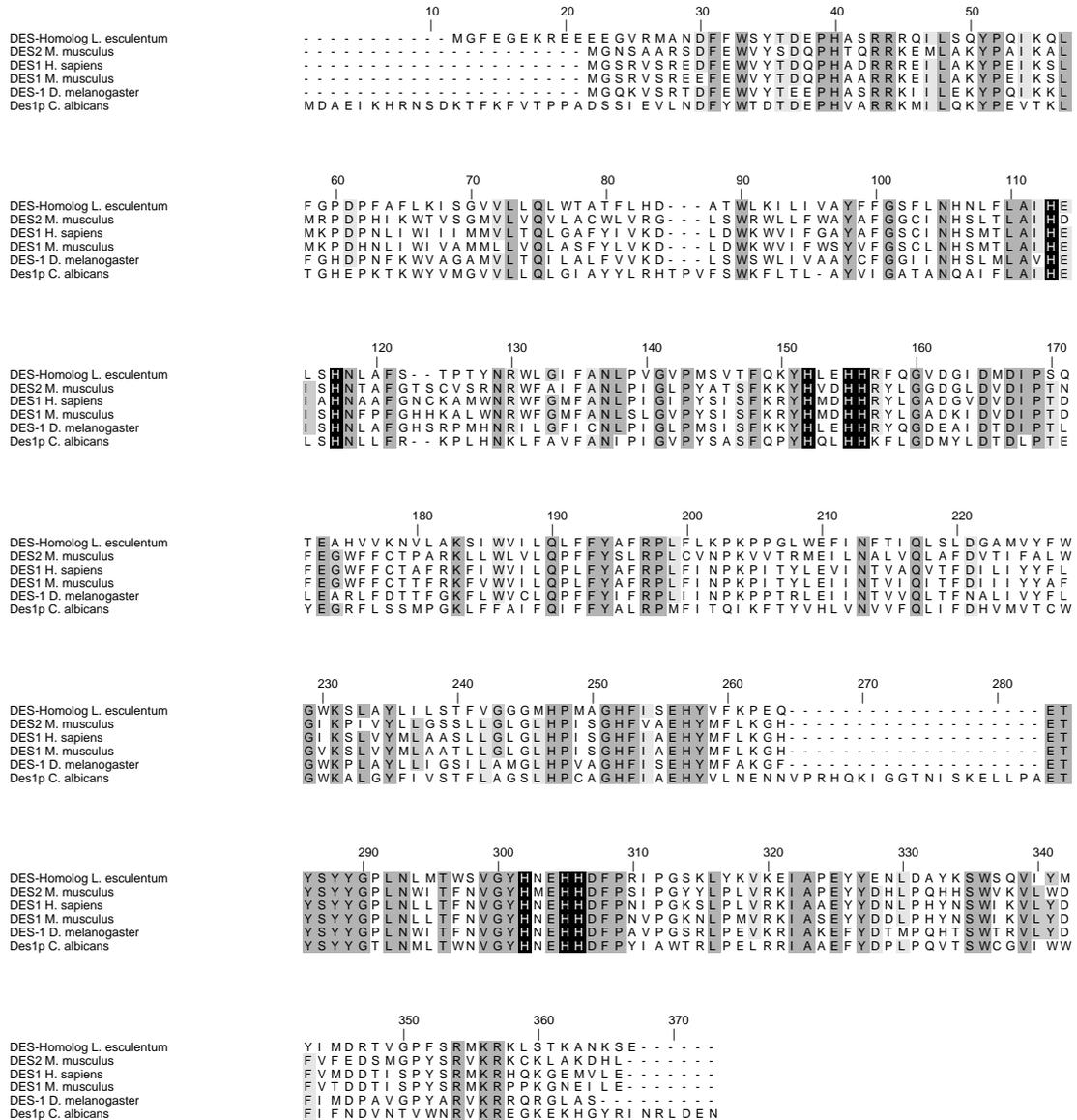


Abbildung 3.1: *Alignment* der in dieser Arbeit untersuchten putativen Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen. Das *Alignment* wurde mit T-Coffee [80] und Jalview erstellt. Konservierte Bereiche sind grau hinterlegt, die drei Histidinboxen sind durch einen schwarzen Hintergrund hervorgehoben.

als DES2 und das Familienmitglied aus *C. albicans* als Des1p. Familienmitglieder, deren biochemische Funktion in dieser Arbeit nicht nachgewiesen wurde, werden allgemein als „DES-Homologe“ bezeichnet.

Es gibt auch ein DES2-Homolog aus *H. sapiens*. Dieses wurde aber nicht weiter untersucht, da die entsprechende cDNA eine Deletion in der Mitte des offenen Leserahmens aufwies. Es sei darauf hingewiesen, dass nur bei DES1 und DES2 aus *M. musculus* und *H. sapiens* die Zahl in der Bezeichnung eine direkte Homologie impliziert. Des1p aus *C. albicans* ist zum Beispiel in gleichem Maße mit DES1 wie mit DES2 aus *M. musculus* verwandt (siehe Abbildung 4.5).

3.2 Einteilung der membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen in Familien mit TRIBE-MCL

Die in Abschnitt 3.1 beschriebene manuelle Einteilung der membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen in Familien anhand von Stammbäumen hat zur erfolgreichen Identifizierung einer neuen Familie membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen geführt. Die Methode war aber zu einem hohen Grade subjektiv und wegen der großen Zahl der in der PSI-Blast-Suche gefundenen Sequenzen technisch problematisch. Nach Abschluss der experimentellen Arbeiten wurde mit TRIBE-MCL [30] eine alternative Methode zur automatischen Einteilung beliebiger Sequenzen in Familien veröffentlicht. Um die Eignung dieser Methode für zukünftige Studien zu testen, wurden die 397 in Abschnitt 3.1 per PSI-Blast identifizierten Sequenzen mit TRIBE-MCL erneut analysiert.

Die 397 Sequenzen wurden wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben zunächst per Blast paarweise miteinander verglichen. Die Ergebnisse des Blast-Vergleichs dienten direkt als Eingabe für TRIBE-MCL. Dabei wurden verschiedene Werte für den Blast- e -Wert und für den Inflationsparameter I von TRIBE-MCL getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Die mit TRIBE-MCL erzielte Einteilung der membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen entspricht sehr gut den Familien, die sich durch die biochemische Funktion der Sequenzen definieren lassen (siehe Tabelle 3.2). Durch

Familie	Farbe	Sequenzen	Beschreibung
1		113	Δ 12- und Δ 15-Desaturasen Pflanzen, Pilze, <i>C. elegans</i> , Blaualgen, (Bakterien)
2		99	Δ 9-Desaturasen alle Eukaryoten, Blaualgen, Bakterien
3		51	Δ 5-, Δ 6- und Δ 8- („ <i>Front end</i> “-) Desaturasen alle Eukaryoten, Blaualgen, Bakterien
4		42	Sterol-Desaturasen und -Hydroxylasen, Sphingolipid-C4-Hydroxylasen alle Eukaryoten, (Blaualgen, Bakterien)
5		25	Xylol-, <i>p</i> -Cymol- und Alkan-Hydroxylasen Bakterien
6		18	Carotinoid-Hydroxylasen Pflanzen, Bakterien
7		17	Hydroxylasen der Wachs-Biosynthese Pflanzen, (Blaualgen, Bakterien)
8		11	Carotinoid-Ketolasen Blaualgen, Bakterien
9		8	Fettsäure- α -Hydroxylasen Pflanzen, Tiere, Pilze
10		7	Sphingolipid- Δ 4-Desaturase Pflanzen, Tiere, Pilze
11		3	unbekannte Funktion Bakterien
12		3	unbekannte Funktion <i>D. melanogaster</i>

Tabelle 3.2: Einteilung der 397 in Abschnitt 3.1 identifizierten membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen in Familien mit TRIBE-MCL [30]. Die Parameter waren ein e -Wert von $e \leq 10^{-4}$ für den paarweisen Blast-Vergleich und ein Inflationsparameter von $I = 1,5$ für TRIBE-MCL. Die Farbe bezieht sich auf die farbliche Kennzeichnung der Familien in Abbildung 3.2. Bei der phylogenetischen Verteilung der einzelnen Familien sind die Blaualgen getrennt von den übrigen Bakterien aufgeführt, da sie im Lipidstoffwechsel eine Sonderstellung einnehmen. Die Bakterien und Blaualgen sind in Klammern gesetzt, wenn die angegebene biochemische Funktion bei ihnen nicht zutrifft.

Variation des Parameters I ließ sich eine feinere oder gröbere Einteilung erreichen, die aber immer gut mit der biologischen Funktion der Familienmitglieder übereinstimmte.

Die mit TRIBE-MCL ermittelten Familien waren jedoch nicht immer im strengen Sinne monophyletisch. So bildeten z.B. bei einem Inflationsparameter von $I \geq 2,0$ die pflanzlichen ERG3-Homologe eine eigene Gruppe, die sich von den übrigen Sterol-Desaturasen und -Hydroxylasen sowie der Sphingolipid-C4-Hydroxylase SUR2 abgespalten hat. Während die Gruppe der pflanzlichen ERG3-Homologe immer noch monophyletisch war, war die Gruppe mit den übrigen Sterol-Desaturasen und -Hydroxylasen jetzt paraphyletisch.

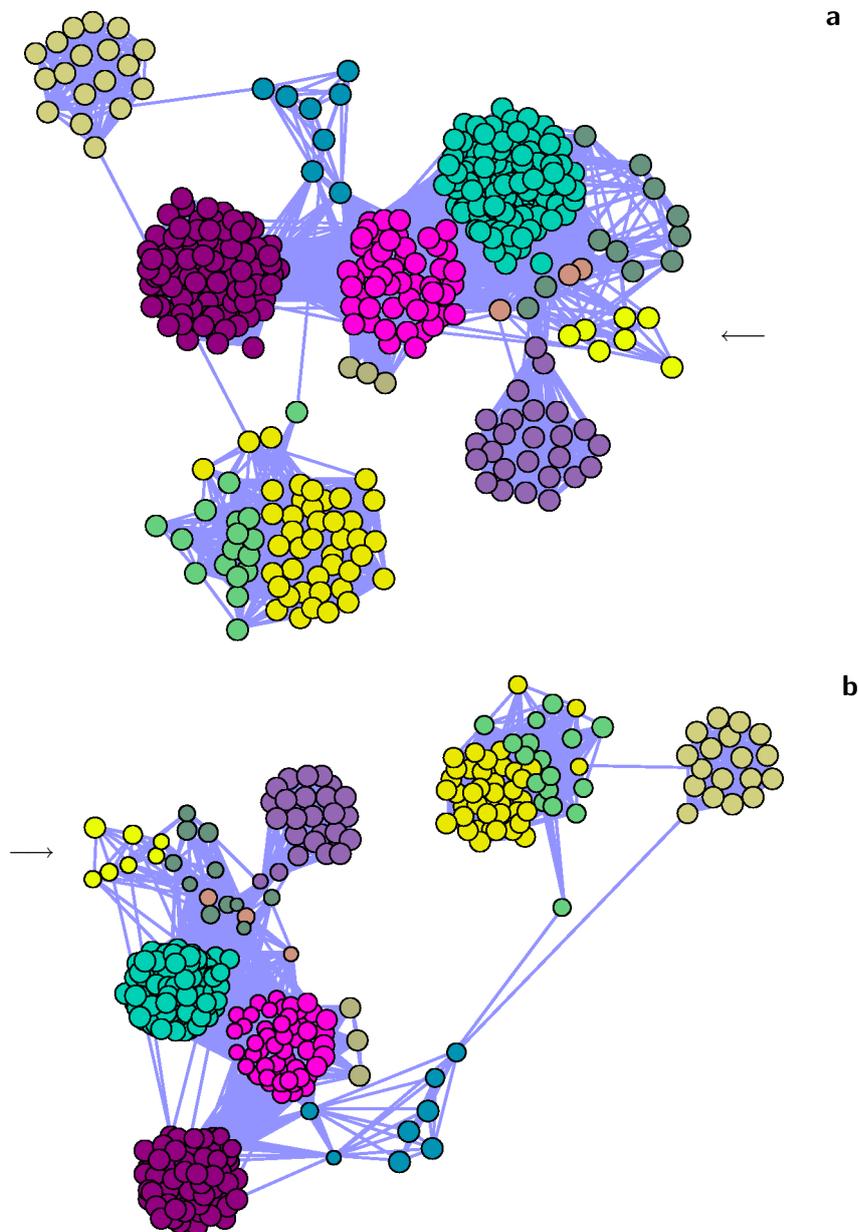
Die Familie der Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen bildete über einen weiten Bereich des Inflationsparameters $1,5 \leq I \leq 3,5$ eine eigene Gruppe. Sie ließ sich also mit Hilfe von TRIBE-MCL sehr leicht als eine neue Familie membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen mit unbekannter Funktion identifizieren. Dies zeigt, dass für zukünftige Studien TRIBE-MCL eine hervorragend geeignete Methode darstellt.

3.3 Graphische Darstellung der Familien mit BioLayout und LinkLayout

Die mit TRIBE-MCL ermittelten Familien lassen sich mit BioLayout [31] visualisieren. Dabei werden die Sequenzen durch Punkte symbolisiert, die in einer Ebene angeordnet werden. Jede Familie wird in einer anderen Farbe dargestellt. Die Verbindungslinien zwischen den Sequenzen stellen die im paarweisen Blast-Vergleich gefundenen Ähnlichkeitsbeziehungen dar. Sie halten benachbarte Punkte zusammen und lassen sich mit einem beliebigen Zahlenwert gewichten.

Für die Darstellung von Proteinsequenzen bietet es sich an, die Verbindungslinien zwischen zwei Sequenzen mit dem negativen Logarithmus des Blast- e -Wertes zu gewichten. Dieser stellt eine ungefähre Abschätzung der Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen dar. Diese Darstellungsweise ist in Abbildung 3.2a gezeigt.

Die Farben der Punkte in Abbildung 3.2 entsprechen der mit TRIBE-MCL



■ Δ 12-, Δ 15-Desaturasen, ■ Δ 9-Desaturasen, ■ Δ 5-, Δ 6-, Δ 8-Desaturasen,
■ Sterol-Desaturasen, Sphingolipid-C4-Hydroxylasen, ■ Xylol-, *p*-Cymol-, Alkan-
 Hydroxylasen, ■ Carotinoid-Hydroxylasen, ■ Hydroxylasen der Wachs-Biosyn-
 these, ■ Carotinoid-Ketolasen, ■ Fettsäure- α -Hydroxylasen, ■ Sphingolipid-
 Δ 4-Desaturasen (mit \rightarrow gekennzeichnet), ■ unbekannt, ■ unbekannt

Abbildung 3.2: Darstellung der Familien membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen mit BioLayout Java [31]. **a** Die Ähnlichkeitsbeziehungen wurden mit dem negativen Logarithmus des Blast-*e*-Wertes gewichtet. **b** Die Gewichtung der Ähnlichkeitsbeziehungen sowie die Punktgrößen wurden mit LinkLayout (siehe Abschnitt 2.2.3) berechnet. Die farbliche Markierung entspricht Tabelle 3.2.

ermittelten Einteilung in Familien (siehe Tabelle 3.2). Die farbliche Markierung stimmt gut mit der anhand der Anordnung der Punkte erkennbaren Gruppen überein. In einem Fall (dunkelgelb und türkisgrün) besteht jedoch eine Gruppe aus zwei Farben. Dies zeigt, dass die Einteilung in Familien mit TRIBE-MCL feiner ist als die in der Darstellung mit BioLayout erkennbaren Gruppierungen.

Kürzlich wurde eine einfache Methode zur Analyse der Vernetzungsstruktur des Internet veröffentlicht [26]. Das Vernetzungsmuster des Internet wird dabei in Dreiecke zerlegt, deren Eckpunkte von Internetseiten und deren Seiten von Verknüpfungen zwischen den Internetseiten gebildet werden. Der Vernetzungsgrad ist um so höher, je stärker eine Internetseite in solche Dreiecke eingebunden ist.

Ich habe daraufhin den Algorithmus LinkLayout implementiert, der in gleicher Weise die Verknüpfungsstruktur der Sequenzfamilien analysiert (siehe Abschnitt 2.2.3). Die Ergebnisse lassen sich mit BioLayout darstellen. Dabei wird die Zahl der Dreiecke, in die eine Ähnlichkeitsbeziehung zwischen zwei Sequenzen eingebunden ist, als Maß für die Gewichtung dieser Ähnlichkeitsbeziehung genommen. Die in Abschnitt 2.2.3 beschriebene „Krümmung“ einer Proteinsequenz dient als Maß für die Größe des entsprechenden Punktes.

Die Ergebnisse von LinkLayout sind in Abbildung 3.2b dargestellt. Die mit LinkLayout erzeugten Gruppen haben eine etwas rundere Form als die Gruppen in der „normalen“ Darstellung mit BioLayout. Insgesamt unterscheiden sich die beiden Darstellungsweisen jedoch nicht stark voneinander. Die verschiedenen Punktgrößen zeigen, wie eindeutig sich die Punkte den einzelnen Gruppen zuordnen lassen. Während die in runden, scharf abgegrenzten Gruppen liegenden Punkte sehr groß sind, sind die zwischen zwei Gruppen liegenden Punkte kleiner. Die Punktgröße eignet sich also als Maß der „Vertrauenswürdigkeit“ der mit BioLayout ermittelten Zuordnung eines Punktes zu einer Gruppe.

3.4 Phylogenie der Desaturasen

Mit T-Coffee [80] wurden ein *Alignment* und ein Stammbaum einer Sammlung repräsentativer Sequenzen membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen

erstellt. Dabei sind von jeder der 12 mit TRIBE-MCL ermittelten Familien (siehe Abschnitt 3.2) mindestens zwei Sequenzen vertreten. Der Stammbaum ist in Abbildung 4.1 gezeigt. Eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse findet sich aus Gründen der Übersichtlichkeit zusammen mit der Diskussion in Abschnitt 4.2.

Mit TMHMM [61] wurde eine mögliche Membrantopologie einiger der in Abbildung 4.1 gezeigten membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen vorhergesagt. Die Zahl der ermittelten Helices reicht von drei bis sechs. Ein Vergleich der Position der vorhergesagten Helices in den einzelnen Sequenzen ergab, dass eine Membrantopologie mit vier transmembranen Helices insgesamt am wahrscheinlichsten ist. Dabei wurde berücksichtigt, dass die drei Histidinbox-Motive wahrscheinlich auf der cytoplasmatischen Seite der Membran liegen [21, 95]. Ferner wurde angenommen, dass alle membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen unabhängig von der Zahl der mit TMHMM vorhergesagten Helices in Wirklichkeit dieselbe Membrantopologie haben. Eine Skizze dieser Topologie ist in Abbildung 4.1 gezeigt. Die hier dargestellte Topologie membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen stimmt mit der [95] vorgeschlagenen Topologie überein. Sie steht im Gegensatz zu der in [21] ermittelten Topologie der Fettsäure- $\Delta 5$ -Desaturase des Bakteriums *Bacillus subtilis*.

Bei der Analyse des dem in Abbildung 4.1 gezeigten Stammbaum zugrundeliegenden *Alignments* fiel auf, dass sich die membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen in zwei große Gruppen einteilen lassen, die sich durch einen unterschiedlichen Abstand zwischen den Histidinbox-Motiven und den transmembranen Helices unterscheiden. Diese beiden Gruppen sind in Abbildung 4.1 durch einen verschiedenfarbigen Hintergrund markiert. Außerdem sind die unterschiedlich langen Segmente in den beiden Skizzen der Membrantopologie farbig hervorgehoben.

Von mehreren Familien membrangebundener Desaturasen wurden detailliertere phylogenetische Untersuchungen durchgeführt. Diese Familien sind:

- Die Acyl-CoA- $\Delta 9$ -Desaturasen
- Die „*Front end*“-Desaturasen

- Die Fettsäure- $\Delta 12$ - und - $\Delta 15$ -Desaturasen
- Die in Abschnitt 3.1 identifizierte Familie (putativer) Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen

Die Stammbäume dieser Familien sind in den Abbildungen 4.2 bis 4.5 dargestellt. Die Ergebnisse werden aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abschnitt 4.3 beschrieben und gleichzeitig diskutiert. Die für die phylogenetischen Untersuchungen verwendete Software ist in Abschnitt 2.2.4 aufgeführt.

3.5 Expression putativer Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen in *S. cerevisiae*

Die offenen Leserahmen der in Abschnitt 3.1 identifizierten putativen Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen wurden sequenziert, über PCR mit spezifischen Primern amplifiziert und in den Hefe-Expressionsvektor pYES2 kloniert (siehe Abschnitte 2.3.2 bis 2.3.4).

Zur Expression in *S. cerevisiae* wurde der Hefestamm TDY2037-*sur2* Δ [36] mit den Konstrukten pMenschDES1, pMausDES1, pMausDES2, pTomDES, pDroDES, und pCaDES transformiert (siehe Abschnitt 2.5.3). Im Hefestamm TDY2037-*sur2* Δ ist das die Sphinganin-C4-Hydroxylase Sur2p kodierende Gen ausgeschaltet, sodass die Sphingolipide dieses Stammes Sphinganin und C₂₀-Sphinganin als einzige Sphingobase enthalten. Es wurde erwartet, dass diese Sphingolipide ein geeignetes Substrat für die $\Delta 4$ -Desaturierung darstellen.

Die Expression erfolgte unter der Kontrolle des durch Zugabe von Galaktose zum Kulturmedium induzierbaren *GAL1*-Promotors. Die Kulturbedingungen hatten einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg der Expression. Die hier beschriebenen Ergebnisse wurden mit den in Abschnitt 2.6 angegebenen optimierten Bedingungen mit Hitzeschockbehandlung erzielt. Eine detaillierte Beschreibung des Einflusses der einzelnen Parameter findet sich in Abschnitt 3.6.

Die Sphingobasenzusammensetzung der die putativen Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen exprimierenden Hefe wurde nach Ba(OH)₂-Hydrolyse und Dinitrophenyl-

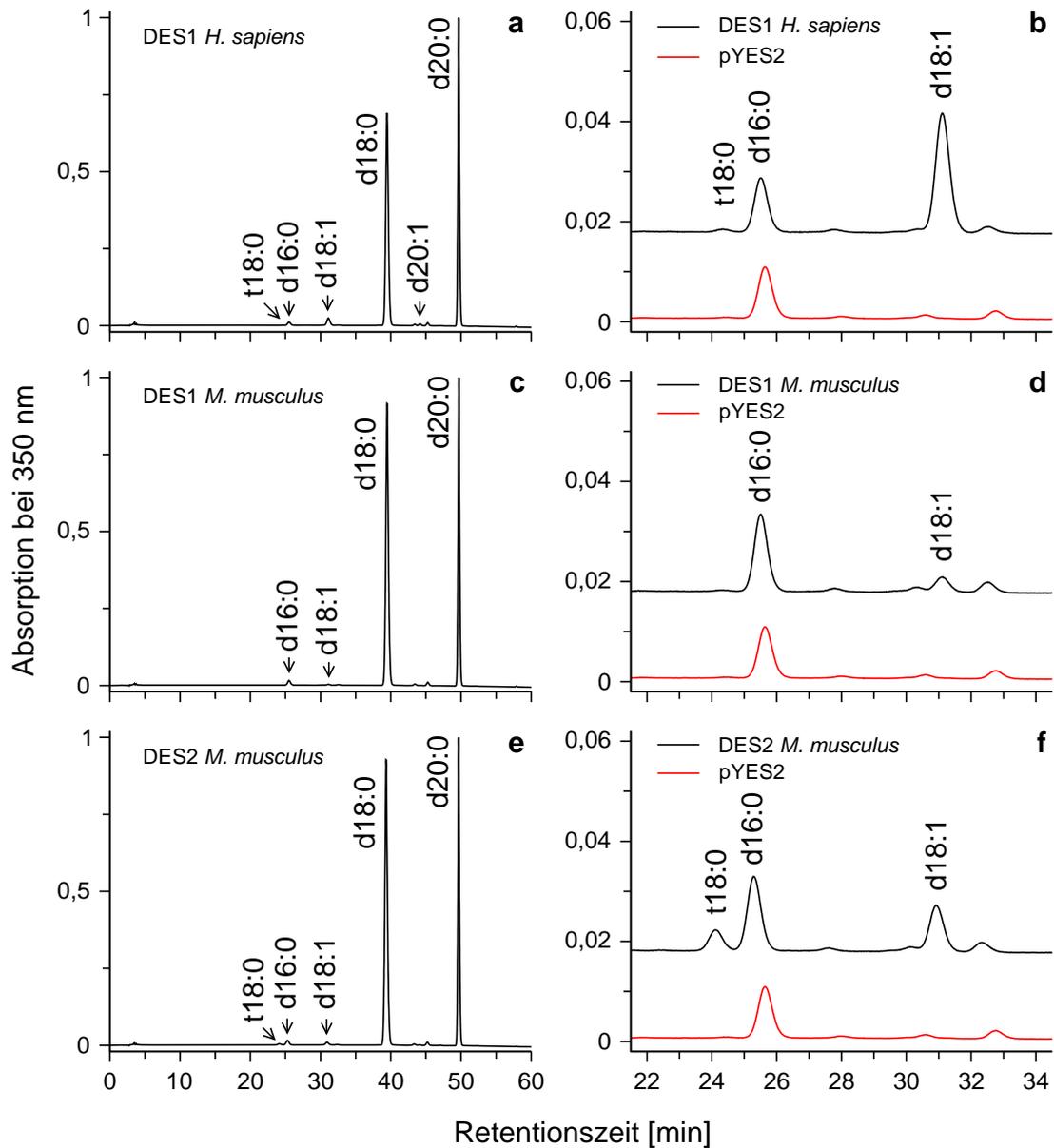


Abbildung 3.3: Expression putativer Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen im *S. cerevisiae*-Stamm TDY2037-*sur2* Δ . **a, b** DES1 *H. sapiens*, **c, d** DES1 *M. musculus*, **e, f** DES2 *M. musculus*. Die Teilbilder in der linken Spalte zeigen das gesamte Chromatogramm, die in der rechten Spalte zeigen einen vergrößerten Ausschnitt im Bereich von d16:0, d18:1 und t18:0, dem das Chromatogramm des pYES2-Leervektors als Kontrolle hinterlegt ist. Die HPLC-Chromatogramme der DNP-derivatisierten Sphingobasen zeigen die Bildung von Sphingosin (d18:1) und/oder Phytosphingalin (t18:0).

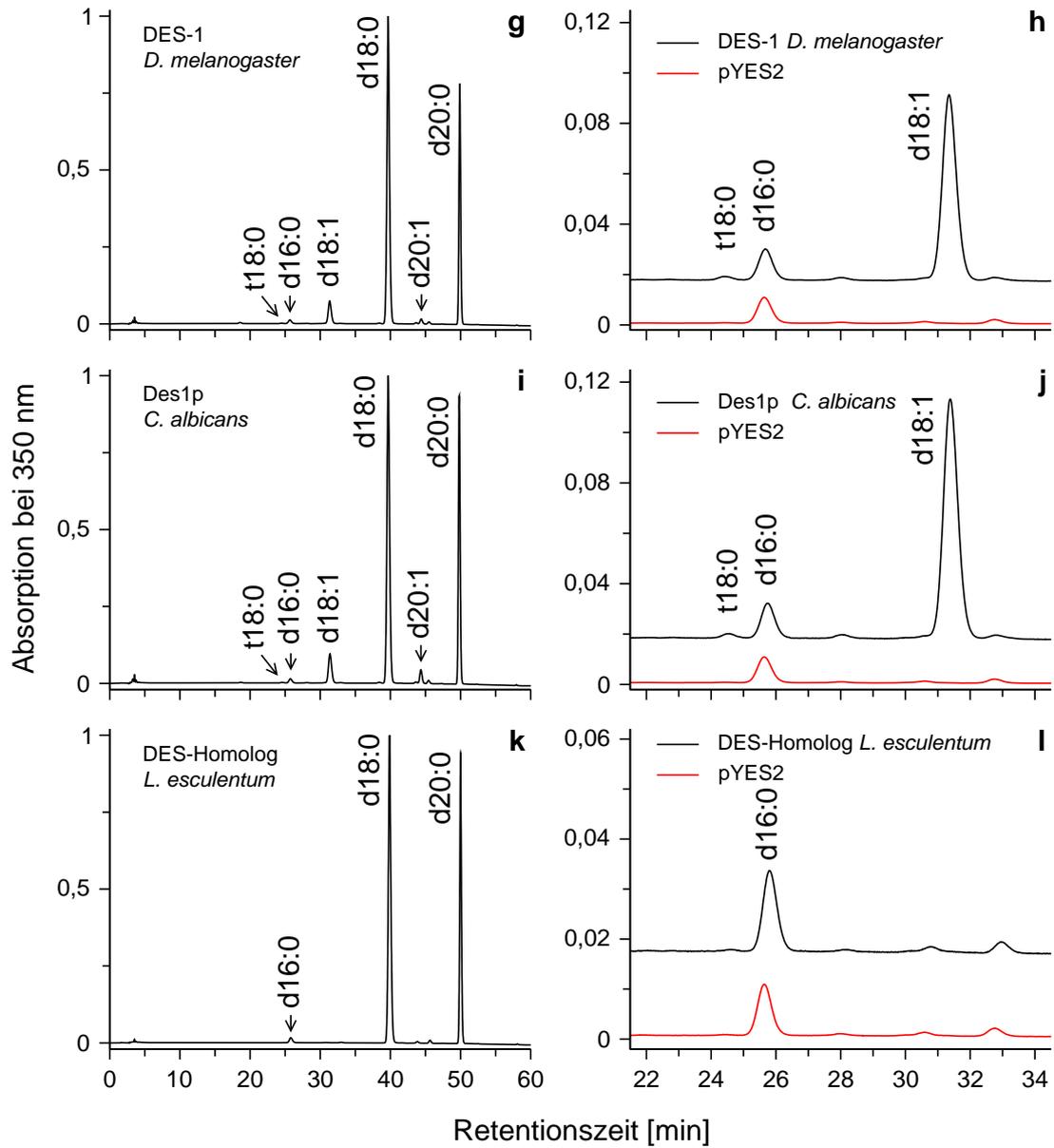


Abbildung 3.3 (Fortsetzung): g, h DES-1 *D. melanogaster*, i, j Des1p *C. albicans*, k, l DES-Homolog *L. esculentum*. Beim DES-Homolog aus *L. esculentum* ist keine Desaturase- oder Hydroxylase-Aktivität zu erkennen. Die Absorption bei 350 nm ist in Einheiten relativ zur Höhe der höchsten Peaks angegeben.

Expression	d18:1 [mol-%]	t18:0 [mol-%]	t18:0/d18:1
DES1 <i>H. sapiens</i>	2,1	< 0,1	0,01
DES1 <i>M. musculus</i>	0,2	<i>n.d.</i>	0
DES2 <i>M. musculus</i>	0,7	0,3	0,4
DES-1 <i>D. melanogaster</i>	5,4	< 0,1	0,02
Des1p <i>C. albicans</i>	6,3	< 0,1	0,01
DES-Homolog <i>L. esculentum</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	—

Tabelle 3.3: Bei der Expression putativer Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen im *S. cerevisiae*-Stamm TDY2037-*sur2* Δ erzielte Anteile an Sphingosin (d18:1) und Phytosphingamin (t18:0) an den Gesamt-Sphingobasen. In der dritten Spalte ist das molare Verhältnis von Phytosphingamin zu Sphingosin angegeben. Bei der Expression des DES-Homologs aus *L. esculentum* konnte weder Sphingosin noch Phytosphingamin nachgewiesen werden. *n.d.*: nicht detektiert.

(DNP) Derivatisierung per HPLC analysiert (siehe Abschnitt 2.7). Bei der Expression von DES1 *H. sapiens*, DES1 und DES2 *M. musculus*, DES-1 *D. melanogaster* und Des1p *C. albicans* konnten Δ 4-desaturierte Sphingolipide mit den Sphingobasen Sphingosin (d18:1) und C₂₀-Sphingosin (d20:1) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.3 und Tabelle 3.3). Die Expression des DES-Homologs aus *L. esculentum* führte dagegen nicht zur Bildung Δ 4-ungesättigter oder anderer neuer Sphingobasen.

Bei der Expression von DES2 *M. musculus* konnte zusätzlich zu Δ 4-desaturierten Sphingolipiden die Bildung von C4-hydroxylierten Sphingolipiden mit der Sphingobase Phytosphingamin nachgewiesen werden. Der Anteil an Phytosphingamin (t18:0) war mit einem t18:0/d18:1-Verhältnis von 1:2,5 knapp halb so hoch wie der Anteil an Sphingosin (d18:1). Bei der Expression von DES1 *H. sapiens*, DES-1 *D. melanogaster* und Des1p *C. albicans* konnte ebenfalls die Bildung von Phytosphingamin nachgewiesen werden, allerdings nur in Spuren mit einem t18:0/d18:1-Verhältnis von 1:60 bis 1:70. Bei der mit dem pYES2-Leervektor

transformierten Kontrolle konnten weder $\Delta 4$ -ungesättigte noch C4-hydroxylierte Sphingolipide nachgewiesen werden.

3.6 Optimierung der Expression der Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen

Bei den ersten Versuchen zur Expression der putativen Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen im *S. cerevisiae*-Stamm TDY2037-*sur2* Δ stellte sich heraus, dass der Erfolg der Expression sehr stark von den gewählten Kulturbedingungen abhing. Aus diesem Grunde wurden die Kulturbedingungen für eine maximale Ausbeute an $\Delta 4$ -ungesättigten Sphingobasen optimiert. Dies war um so wichtiger, da die Ausbeute an $\Delta 4$ -ungesättigten Sphingobasen bei den ersten Versuchen nur bei ca. 2 mol% lag (Des1p *C. albicans*). Eine $\Delta 4$ -Desaturase-Aktivität der DES-Homologe aus *M. musculus* und *H. sapiens* konnte erst nach Optimierung der Anzuchtbedingungen nachgewiesen werden. Die in Abschnitt 3.5 gezeigten Ergebnisse sind bereits unter optimierten Bedingungen erzielt worden. Die optimierten Bedingungen sind in Abschnitt 2.6 zusammengefasst.

3.6.1 Wahl des Mediums und Zeitpunkt der Induktion und der Ernte

Die Wahl des Kulturmediums und der Zeitpunkt der Induktion des *GAL1*-Promotors und der Ernte der Kulturen hatten einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbeute an $\Delta 4$ -ungesättigten Sphingobasen. Die Ausbeute an Sphingosin (d18:1) und C₂₀-Sphingosin (d20:1) in zu verschiedenen Zeiten nach dem Animpfen geernteten Kulturen ist in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Die Auswirkungen der Wahl des Kulturmediums für die Vor- und Hauptkultur und des Zeitpunkts der Induktion des *GAL1*-Promotors sind in Tabelle 3.5 gezeigt.

Die Ergebnisse in Tabelle 3.4 zeigen deutlich, dass bei Verwendung von CM-Raffinose-Medium für Vor- und Hauptkultur bei einer sehr kurzen Inkubationszeit von 18 h die Ausbeute an Sphingosin (d18:1) mit 3,9 mol% am höchsten war. Die Summe der Anteile an Sphingosin (d18:1) und C₂₀-Sphingosin (d20:1) betrug bei dieser Inkubationszeit 5,0 mol%. Bei einer Inkubationszeit von 24 h

Zeitpunkt der Ernte	d18:1 mol%	d20:1 mol%	Summe mol%
18 h	3,9	1,1	5,0
24 h	2,9	1,0	3,9
30 h	2,4	0,5	2,9
141 h	2,8	2,6	5,4

Tabelle 3.4: Ausbeute an Sphingosin (d18:1) und C₂₀-Sphingosin (d20:1) in zu verschiedenen Zeiten nach dem Animpfen geernteten Kulturen. Eine Vorkultur *C. albicans* Des1p exprimierender Hefe des Stammes TDY2037-*sur2*Δ wurde in CM-Raffinose-Medium (siehe Abschnitt 2.5.1) angezogen. Von dieser Vorkultur wurden gleichzeitig vier Hauptkulturen in je 100 ml CM-Raffinose-Medium mit 2% (w/v) Galaktose zur Induktion des *GAL1*-Promotors angeimpft und zu den angegebenen Zeiten geerntet. Die Analyse der Sphingobasenzusammensetzung ist in Abschnitt 2.7 beschrieben.

und 30 h waren die Anteile an Sphingosin (d18:1) und C₂₀-Sphingosin (d20:1) deutlich geringer als bei einer Inkubationszeit von 18 h. Bei der sehr langen Inkubationszeit von 141 h (ca. 6 Tage) war die Ausbeute an Sphingosin (d18:1) wieder leicht angestiegen. Außerdem wurde mit 2,6 mol% ein viel höherer Anteil an C₂₀-Sphingosin (d20:1) als bei den kürzeren Inkubationszeiten erreicht. Dies ist vor allem auf den insgesamt höheren Anteil an C₂₀-Sphingobasen bei dieser Inkubationszeit zurückzuführen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Neben der Inkubationszeit haben auch die Wahl des Kulturmediums für die Vor- und Hauptkultur und der Zeitpunkt der Induktion des *GAL1*-Promotors durch Zugabe von Galaktose einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbeute an Δ4-ungesättigten Sphingobasen. In Tabelle 3.5 ist zu erkennen, dass eine Anzucht der Vorkultur in CM-Glukose-Medium zu einer höheren Ausbeute an Δ4-ungesättigten Sphingobasen führt als eine Anzucht der Vorkultur in CM-Raffinose-Medium. Ebenso bewirkt eine sofortige Induktion des *GAL1*-Promotors eine deutlich höhere Ausbeute als eine Induktion 24 h nach dem Animpfen der Hauptkultur. Eine Induktion des *GAL1*-Promotors 24 h nach dem Animpfen mit gleichzeitigem Wechsel CM-Glukose-Mediums gegen CM-Raffinose-

Medium für die		Zeitpunkt der Induktion	d18:1	d20:1	Summe
Vorkultur	Hauptkultur		mol%	mol%	mol%
CM-Raffinose	CM-Raffinose	sofort	5,0	4,3	9,3
CM-Raffinose	CM-Raffinose	nach 24 h	1,2	1,5	2,7
CM-Glukose	CM-Raffinose	sofort	6,0	4,2	10,2
CM-Glukose	CM-Raffinose	nach 24 h	4,0	2,9	6,9
CM-Glukose	CM-Glukose	nach 24 h	5,8	2,9	8,8

Tabelle 3.5: Ausbeute an Sphingosin (d18:1) und C₂₀-Sphingosin (d20:1) bei verschiedenen Anzuchtbedingungen. Je eine Vorkultur von *C. albicans* Des1p exprimierender Hefe des Stammes TDY2037-*sur2*Δ wurde in 100 ml CM-Raffinose- und CM-Glukose-Medium (siehe Abschnitt 2.5.1) angeimpft. Von diesen Vorkulturen wurden vier Hauptkulturen in CM-Raffinose- und eine Hauptkultur in CM-Glukose-Medium angeimpft. Die Induktion des *GAL1*-Promotors durch Zugabe von Galaktose *ad* 2% (w/v) erfolgte entweder sofort oder 24 h nach dem Animpfen. Bei der in CM-Glukose-Medium angeimpften Hauptkultur wurde zum Zeitpunkt der Induktion das Medium gegen CM-Raffinose-Medium ausgetauscht, da Glukose den *GAL1*-Promotor reprimiert. Die Ernte der Kulturen erfolgte 48 h nach dem Animpfen. Die Analyse der Sphingobasenzusammensetzung ist in Abschnitt 2.7 beschrieben.

Medium bringt eine geringere Ausbeute an Δ4-ungesättigten Sphingobasen als eine Induktion sofort nach dem Animpfen der Hauptkultur.

Der Wechsel des Mediums von CM-Glukose-Medium bei der Vorkultur zu CM-Raffinose-Medium bei der Hauptkultur führte zu einem interessanten Effekt: Während bei einer Anzucht der Vorkultur in CM-Raffinose-Medium die Hauptkultur sofort weiterwuchs, kam es bei einer Anzucht der Vorkultur in CM-Glukose-Medium nach dem Animpfen der Hauptkultur in CM-Raffinose-Medium zu einer deutlichen Verzögerung des Wachstums. Während der ersten 24 h wuchsen diese Kulturen nur minimal, holten ihren Rückstand jedoch in den zweiten 24 h wieder vollständig auf.

Nach den Ergebnissen aus Tabelle 3.5 sind die optimalen Bedingungen eine Anzucht der Vorkultur in CM-Glukose-Medium, eine Anzucht der Hauptkultur in

CM-Raffinose-Medium und eine Induktion des *GAL1*-Promotors sofort nach dem Animpfen der Hauptkultur. Nach Tabelle 3.4 wäre die optimale Inkubationszeit 18 h. Da es jedoch bei Anzucht der Vorkultur in CM-Glukose-Medium innerhalb der ersten 24 h zu einer Wachstumsverzögerung kam, wurde als Inkubationszeit für alle weiteren Versuche 48 h gewählt.

3.6.2 Anzucht mit Hitzeschock

Nach mehreren Studien führt eine Hitzeschockbehandlung von *S. cerevisiae* zur Bildung eines erhöhten Anteils an freiem Ceramid [22, 46]. Zumindest für die Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase aus Säugetieren stellt freies Ceramid das direkte Substrat dar [74]. Deswegen lag die Vermutung nahe, dass sich durch eine Hitzeschockbehandlung während der Expression von *M. musculus* DES2 die Ausbeute an Sphingosin (d18:0) oder Phytosphingalin (t18:0) erhöhen ließe.

In Tabelle 3.6 ist zu erkennen, dass sich durch eine Hitzeschockbehandlung direkt vor der Ernte der Kulturen die Ausbeute an Sphingosin (d18:1) und Phytosphingalin (t18:0) auf ungefähr das Doppelte der Ausbeute ohne Hitzeschock steigern ließ. Eine Hitzeschockbehandlung in der Mitte der Inkubationszeit war weniger effektiv, und eine Hitzeschockbehandlung am Anfang der Inkubationszeit führte sogar zu einer leichten Abnahme des Anteils an Sphingosin (d18:1) und Phytosphingalin (t18:0). Eine Anzucht bei dauernd erhöhter Temperatur führte zu einem sehr schlechten Wachstum der Hefe, sodass sich der Anteil an Sphingosin (d18:1) und Phytosphingalin (t18:0) nur schwer bestimmen ließ. Es war aber nicht höher als bei der Anzucht ohne Hitzeschock.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Ausbeute an Sphingosin (d18:1) und Phytosphingalin (t18:0) durch eine Hitzeschockbehandlung direkt vor der Ernte deutlich erhöhen ließ. Für die in Abschnitt 3.5 gezeigten Ergebnisse wurde deshalb eine Hitzeschockbehandlung verwendet. Dies war vor allem deshalb wichtig, da selbst mit Hitzeschock die Ausbeute an Sphingosin und Phytosphingalin unter einem Prozent lag.

Zeitpunkt des Hitzeschocks	Anzuchtbedingungen		d18:1	t18:0	t18:0/d18:1
	vorher	nachher	mol%	mol%	
ohne	48 h bei 30°C		0,16	0,19	1,19
am Anfang	—	47 h bei 30°C	0,14	0,16	1,14
in der Mitte	48 h bei 25°C	23 h bei 30°C	0,25	0,36	1,44
am Ende	71 h bei 25°C	—	0,31	0,48	1,55
dauernd	48 h bei 37°C		<i>n.d.</i>	0,14	—

Tabelle 3.6: Ausbeute an Sphingosin (d18:1) und Phytosphinganin (t18:0) in zu verschiedenen Zeiten mit Hitzeschock (37°C) behandelten Kulturen. Eine Vorkultur *M. musculus* DES2 exprimierender Hefe des Stammes TDY2037-*sur2*Δ wurde in CM-Glukose-Medium angeimpft (siehe Abschnitt 2.5.1). Von dieser Vorkultur wurden fünf Hauptkulturen in 100 ml CM-Raffinose-Medium mit 2% (w/v) Galaktose zur Induktion des *GAL1*-Promotors angeimpft. Die Anzuchtbedingungen vor und nach der Hitzeschockbehandlung sind in der Tabelle angegeben. Die Hitzeschockbehandlung erfolgte bei den mit „am Anfang“, „in der Mitte“ und „am Ende“ bezeichneten Kulturen für 1 h bei 37°C. Die Anzucht vor der Hitzeschockbehandlung erfolgte bei 25°C, um eine ausreichende Temperaturdifferenz zu gewährleisten. Nach der Hitzeschockbehandlung erfolgte die Anzucht bei der optimalen Temperatur von 30°C. Die mit „ohne“ bezeichnete Kultur wurde nicht mit einem Hitzeschock behandelt, die mit „dauernd“ bezeichnete Kultur wurde bei dauernd erhöhter Temperatur angezogen. Die Analyse der Sphingobasenzusammensetzung ist in Abschnitt 2.7 beschrieben. *n.d.*: nicht detektiert.

3.6.3 Hemmung der IPC-Synthase mit Aureobasidin A

Neben der Hitzeschockbehandlung ist eine andere mögliche Strategie zur Erhöhung der Ceramidkonzentration die pharmakologische Hemmung der Inositolphosphorylceramid- (IPC) Synthase durch Aureobasidin A. Dies wurde wie auch die Hitzeschockbehandlung am Beispiel der bifunktionalen Sphingolipid- Δ 4-Desaturase/C4-Hydroxylase DES2 aus *M. musculus* überprüft.

Je eine Kultur *M. musculus* DES2 exprimierender Hefe des Stammes TDY2037-*sur2* Δ wurde mit 0, 50, 100 und 200 μ g/l Aureobasidin A wie in Abschnitt 2.6 beschrieben ohne Hitzeschock angezogen. Das Aureobasidin A wurde beim Animpfen der Hauptkulturen aus einer Stammlösung (0,2 mg/ml in 2-Propanol) zugegeben. Die Sphingobasenzusammensetzung wurde wie in Abschnitt 2.7 beschrieben analysiert.

Bei 100 und 200 μ g/l Aureobasidin A ergab sich eine geringe Steigerung der Ausbeute an Sphingosin (d18:1) und Phytosphinganin (t18:0) gegenüber den Konzentrationen 0 und 50 μ g/l. Die Steigerung der Ausbeute wurde nicht genau quantifiziert, war aber zu gering, um für die Expression von putativen Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen von praktischem Nutzen zu sein. Bei einer Konzentration von 200 μ g/l Aureobasidin A war eine erhebliche Wachstumshemmung der Hefe zu beobachten. Die Qualität der vorliegenden Daten ist nicht ausreichend, um Rückschlüsse auf die physiologische Wirkung von Aureobasidin A zu ziehen. Hierfür müsste das Experiment wiederholt werden.

3.6.4 Koexpression mit der menschlichen Glucosylceramid-Synthase

Während die meisten eukaryoten Organismen mit Cerebrosiden und Glykosylinositolphosphorylceramiden zwei Klassen von Sphingolipiden produzieren, fehlen der Hefe *S. cerevisiae* die Cerebroside. Die Sphingobasenzusammensetzung dieser beiden Lipidklassen ist unterschiedlich. Δ 4-desaturierte Sphingobasen sind eher in den Cerebrosiden anzutreffen, C4-hydroxylierte Sphingobasen dagegen eher in den Glykosylinositolphosphorylceramiden. Um zu testen, ob das Fehlen der Cerebroside in Hefe Auswirkungen auf die Expression einer Sphingolipid-

$\Delta 4$ -Desaturase hat, wurden verschiedene Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen gleichzeitig mit der Glucosylceramid-Synthase aus *H. sapiens* [62] exprimiert.

Kompetente Zellen des Hefestammes TDY2037-*sur2* Δ wurden wie in Abschnitt 2.5.3 beschrieben mit dem in den Hefe-Expressionsvektor pVT-Leu klonierten offenen Leserahmen der Glucosylceramid-Synthase aus *H. sapiens* transformiert. Aus dem so erhaltenen Hefestamm wurden wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben kompetente Zellen hergestellt und mit den Konstrukten pCaDES, pMausDES1 und pMausDES2 (siehe Abschnitt 2.3.4) sowie dem pYES2-Leervektor transformiert.

Die auf diese Weise erhaltenen Hefestämme exprimieren die Glucosylceramid-Synthase aus *H. sapiens* zusammen mit je einer Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase bzw. dem pYES2-Leervektor (als Kontrolle). Die Expression der Glucosylceramid-Synthase steht dabei unter der Kontrolle des konstitutiven *ADH*-Promotors der Alkohol-Dehydrogenase.

Kulturen dieser vier Hefestämme wurden wie in Abschnitt 2.6 beschrieben angezogen. Die Sphingobasenzusammensetzung wurde wie in Abschnitt 2.7 beschrieben analysiert. Die Sphingobasenzusammensetzung der Kulturen unterscheidet sich nicht signifikant von zuvor durchgeführten Expressionen ohne Glucosylceramid-Synthase. Eine quantitative Auswertung wurde jedoch nicht durchgeführt.

3.6.5 Fütterung mit der synthetischen Fettsäure 16:1^{6E}

Die Expression des DES-Homologs aus *L. esculentum* im *S. cerevisiae*-Stamm TDY2037-*sur2* Δ war bisher erfolglos geblieben. Pflanzen bilden normalerweise nur sehr geringe Mengen an Sphingosin (d18:1), dafür aber erhebliche Mengen an Sphinga-4,8-dienin. Die $\Delta 8$ -Doppelbindung kann dabei sowohl in der (*E*)- oder in der (*Z*)-Konfiguration vorliegen. Eine mögliche Erklärung für die mangelnde Aktivität des DES-Homologs aus *L. esculentum* bei der Expression in *S. cerevisiae* war daher, dass bei der Biosynthese von Sphinga-4,8-dienin in Pflanzen zuerst die $\Delta 8$ und dann die $\Delta 4$ -Doppelbindung eingefügt würde. Das DES-Homolog aus *L. escu-*

lentum könnte für seine Aktivität auf das Vorhandensein der $\Delta 8$ -Doppelbindung angewiesen sein.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das DES-Homolog aus *L. esculentum* in Gegenwart von $\Delta 8$ -desaturierten Sphingolipiden exprimiert. Da *S. cerevisiae* normalerweise keine $\Delta 8$ -desaturierten Sphingolipide bildet und Sphing-8-enin nicht käuflich zu erwerben ist, wurden die $\Delta 8$ -desaturierten Sphingobasen auf einem anderen Weg bereitgestellt: Die Hefekultur wurde mit der synthetisch hergestellten Fettsäure (*E*)-Hexadeca-6-ensäure (16:1^{6E}) gefüttert. Gleichzeitig wurde die hefeeigene Fettsäuresynthese durch Zugabe von Cerulenin gehemmt. Die Serin-Palmitoyltransferase sollte jetzt statt Palmitinsäure die synthetische $\Delta 6$ -ungesättigte Fettsäure als Substrat akzeptieren. Da die Kondensation von Serin und einer Fettsäure mit einer Kettenverlängerung um zwei C-Atome verbunden ist, würde aus (*E*)-Hexadeca-6-ensäure (16:1^{6E}) Sphing-8-enin (d18:1^{8E}) gebildet werden.

Je eine Kultur mit pTomDES, pCaDES und pYES2-Leervektor (Bezeichnungen siehe Abschnitt 2.3.4) transformierter Hefe wurde mit (*E*)-Hexadeca-6-ensäure (d16:1^{6E}) *ad* 250 μM , Cerulenin *ad* 25 μM und 1% (v/v) Tergitol (zur Erleichterung der Aufnahme der Fettsäure) wie in Abschnitt 2.6 beschrieben ohne Hitzeschock angezogen. Die Sphingobasenzusammensetzung wurde wie in Abschnitt 2.7 beschrieben analysiert.

Die Fütterung mit (*E*)-Hexadeca-6-ensäure (d16:1^{6E}) führte wie erwartet zur Bildung von (*E*)-Sphing-8-enin. Da die hefeeigene Fettsäuresynthese durch das Cerulenin nicht vollständig gehemmt wurde, konnten zusätzlich die für den Stamm TDY2037-*sur2* Δ typischen Sphingobasen Sphinganin, C₁₆-Sphinganin und C₂₀-Sphinganin nachgewiesen werden. Die Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase Des1p aus *C. albicans* akzeptierte neben Sphinganin auch das durch die Fütterung entstandene (*E*)-Sphing-8-enin als Substrat. Dies führte zur Bildung von (4*E*,8*E*)-Sphinga-4,8-dienin. Bei der Expression des DES-Homologs aus *L. esculentum* konnten dagegen im Vergleich zur Kontrolle (pYES2-Leervektor) keine neuen Sphingobasen nachgewiesen werden.

3.7 HPLC/MS- und ESI/MS/MS-Analyse der bei der Expression in *S. cerevisiae* gebildeten $\Delta 4$ -ungesättigten Sphingobasen

Die Identität der in den Chromatogrammen in Abbildung 3.3 nachgewiesenen Sphingobasen wurde durch eine HPLC/ESI/MS- und ESI/MS/MS-Analyse überprüft (siehe Abschnitt 2.7.6). Bei der HPLC/MS-Analyse wurden während eines HPLC-Laufs in Echtzeit Massenspektren im Bereich von $m/z = 300$ bis 1200 aufgenommen. Die Auswertung der Daten erfolgte nach zwei verschiedenen Strategien:

- Der Gesamtionenstrom wurde über die Dauer des HPLC-Laufs verfolgt. Von allen im Gesamtionenstrom erkennbaren Peaks wurden die Massenspektren analysiert, um die Peaks einer bestimmten DNP-derivatisierten Sphingobase zuzuordnen. Peaks, deren Massenspektrum nicht auf eine DNP-derivatisierte Sphingobase zurückführbar war, wurden als Verunreinigungen angesehen. Alle größeren und die meisten kleineren der in Abbildung 3.3 erkennbaren Peaks ließen sich bekannten Sphingobasen zuordnen.
- Der Ionenstrom für die Molmassen aller bekannten Sphingobasen (siehe Tabelle 3.7) wurde einzeln und in verschiedenen Kombinationen über die Dauer des HPLC-Laufs verfolgt. Auf diese Weise wurde das Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Sphingobasen überprüft.

Die Massenspektren bestätigen die in Abschnitt 3.5 aufgeführten Ergebnisse:

- Die Identität aller beschrifteten Peaks in Abbildung 3.3 wurde bestätigt.
- Das Fehlen von Sphingosin (d18:1) und Phytosphinganin (t18:0) in der mit dem pYES2-Leervektor transformierten Kontrolle wurde bestätigt.
- Das Fehlen von Sphingosin (d18:1) und Phytosphinganin (t18:0) bei Expression des DES-Homologs aus *L. esculentum* wurde bestätigt. Es wurden auch keine anderen Unterschiede in der Sphingobasenzusammensetzung zwischen der Expression des DES-Homologs aus *L. esculentum* und der mit dem pYES2-Leervektor transformierten Kontrolle gefunden.

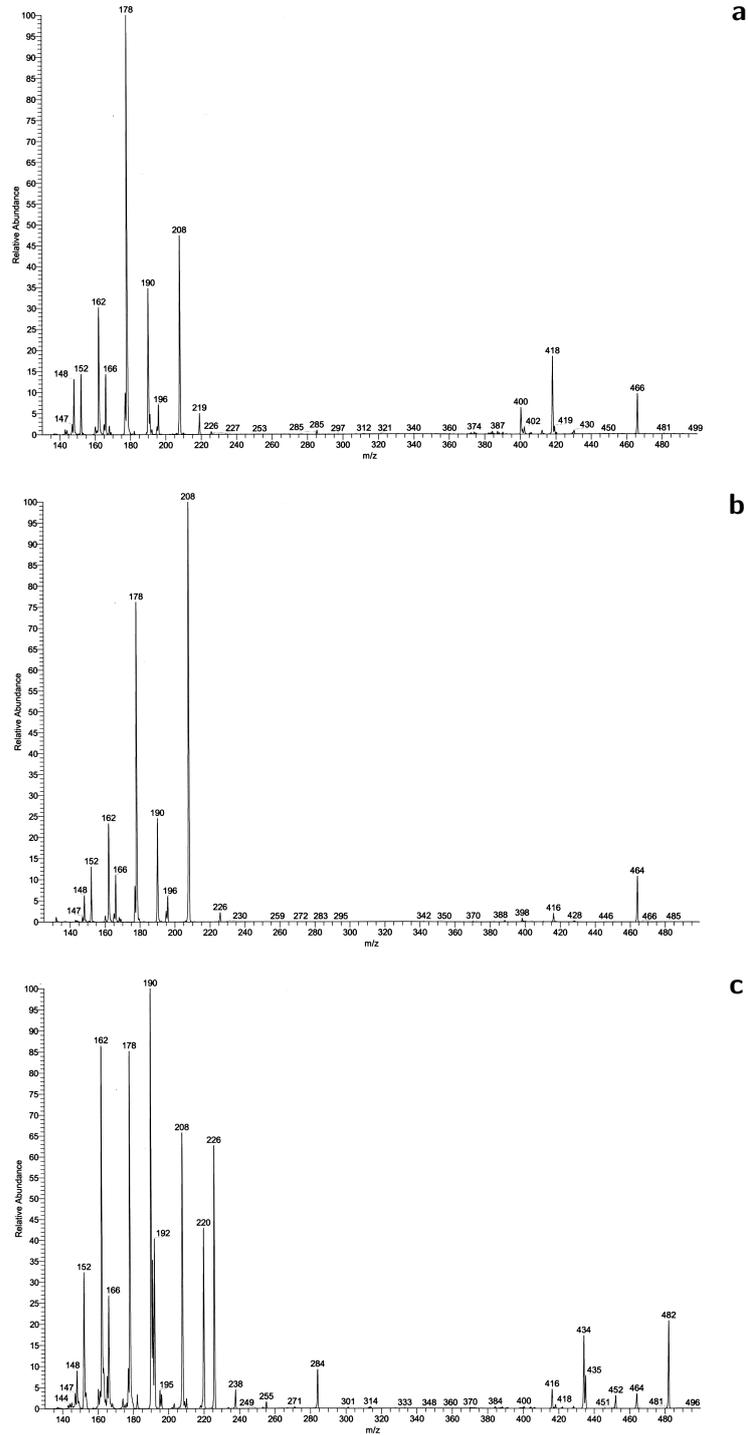


Abbildung 3.4: MS/MS-Sekundärionenspektren DNP-derivatisierter Sphingobasen. **a** Sphinganine (Primärion mit $m/z = 466$), **b** Sphingosin (Primärion mit $m/z = 464$), **c** Phytosphinganine (Primärion mit $m/z = 482$)

	$n = 16$	$n = 17$	$n = 18$	$n = 19$	$n = 20$
$dn:0$	438	452	466	480	494
$dn:1$	436	450	464	478	492
$dn:2$	434	448	462	476	490
$tn:0$	454	468	482	496	510
$tn:1$	452	466	480	494	508

Tabelle 3.7: Im negativen Ionen-Modus sichtbare Massen ($m/z = M_r - 1$) der DNP-derivatisierten Sphingobasen. Die hier angegebenen Massen sind um eine Einheit geringer als die tatsächliche Molekülmasse M_r , da die im ESI-Spektrum gemessenen negativen Pseudomolekülonen durch Verlust eines Protons entstehen. Weitere im Spektrum sichtbare negative Pseudomolekülonen entstehen durch Anlagerung von Chlorid ($m/z = M_r + 35$) oder Formiat ($m/z = M_r + 45$) an die DNP-derivatisierten Sphingobasen oder durch Zusammenlagerung zweier DNP-derivatisierter Sphingobasen-Moleküle unter Verlust eines Protons ($m/z = 2M_r - 1$). Die Spalten der Tabelle sind nach der Anzahl n der Kohlenstoffatome des Sphingobasenrestes geordnet. Bei der Beschriftung der Zeilen ist für n die jeweilige Anzahl an Kohlenstoffatomen einzusetzen. $dn:0$ entspricht also $d18:0$ für $n = 18$.

Darüber hinaus wurde die Identität der Sphingobasen Sphinganin ($d18:0$), Sphingosin ($d18:1$) und Phytosphinganin ($t18:0$) durch Vergleich der ESI/MS/MS-Sekundärionenspektren mit denen von DNP-derivatisierten Referenzsubstanzen (siehe Abschnitt 2.7.4) bestätigt. Die Sekundärionenspektren von Sphinganin, Sphingosin und Phytosphinganin sind in Abbildung 3.4 gezeigt.

Für die Durchführung der HPLC/MS- und ESI/MS/MS-Analyse und die Interpretation der Daten danke ich Herrn Dr. Stephan Franke (Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg).

3.8 ^1H -NMR-Analyse der bei der Expression in *S. cerevisiae* gebildeten $\Delta 4$ -ungesättigten Sphingobasen

Die Struktur der bei der Expression von Des1p *C. albicans* gebildeten Sphingobasen wurde durch ^1H -NMR-Spektroskopie bestimmt (siehe Abschnitt 2.8.6). Die ^1H -NMR-Spektren der gesättigten und ungesättigten per-*N,O*-acetylierten Sphingobasen aus Des1p *C. albicans* exprimierender Hefe (siehe Abschnitt 2.8.1–2.8.4) wurden mit dem Spektrum von per-*N,O*-acetyliertem D-*erythro*-Sphingosin (d18:1^{4E}) als Referenzsubstanz (siehe Abschnitt 2.8.5) sowie mit Daten aus der Literatur für per-*N,O*-acetyliertes D-*erythro*- und L-*threo*-Sphingosin [55] verglichen. Die ^1H -NMR-Spektren der gesättigten und der ungesättigten per-*N,O*-acetylierten Sphingobasen aus Des1p *C. albicans* exprimierender Hefe sowie der per-*N,O*-acetylierter D-*erythro*-Sphingosin-Referenzsubstanz sind in Abbildung 3.5 gezeigt. In Tabelle 3.8 werden die chemischen Verschiebungen δ und die Kopplungskonstanten J der per-*N,O*-acetylierten D-*erythro*-Sphingosin-Referenzsubstanz mit den Literaturwerten für D-*erythro*- und L-*threo*-Sphingosin [55] verglichen. Die konstante Differenz von $\approx -0,020$ bei H-1b bis H-5 zwischen der eigenen Messung und den Literaturwerten für D-*erythro*-Sphingosin ist auf eine unterschiedliche Eichung zurückzuführen und hat keinen Einfluss auf die Interpretation des Ergebnisses.

Das ^1H -NMR-Spektrum der $\Delta 4$ -ungesättigten D-*erythro*-Sphingosin-Referenzsubstanz (Abbildung 3.5a) unterscheidet sich vom Spektrum der gesättigten per-*N,O*-acetylierten Sphingobasen aus Des1p *C. albicans* exprimierender Hefe (Abbildung 3.5b) in erster Linie durch die diagnostischen Resonanzen der olefinischen Protonen bei 5,372 ppm (H-4) und 5,772 ppm (H-5) mit einer Kopplungskonstante von $J_{4,5} = 15,2$ Hz. Diese starke Kopplung bestätigt die *E*-Konfiguration der Doppelbindung. Bei einer *Z*-Konfiguration würde man eine etwas schwächere Kopplung im Bereich von 6–12 Hz erwarten. Des Weiteren sind die Resonanzen des Wasserstoff-Atoms am C-3 (H-3) und des Amino-Wasserstoffs (NH) deutlich gegenüber den entsprechenden Resonanzen bei den gesättigten Sphingobasen verschoben. Die Spin-Spin-Aufspaltung des H-3 zeigt bei der D-*erythro*-Sphingosin-

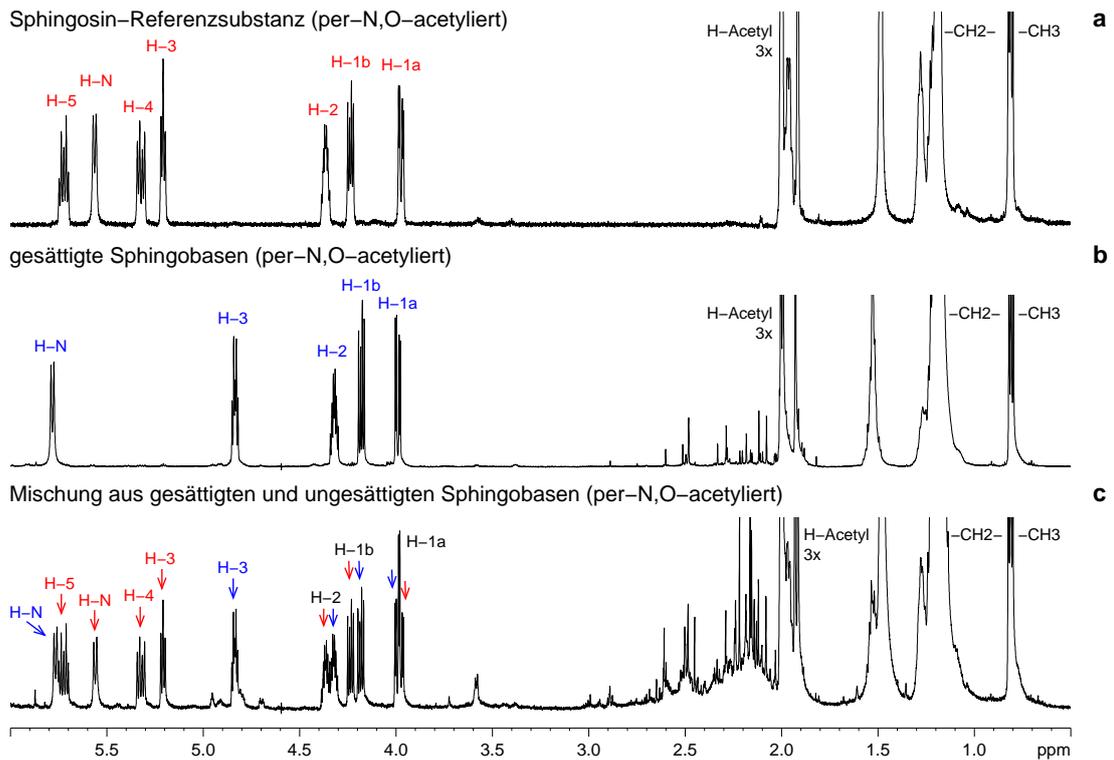


Abbildung 3.5: ^1H -NMR-Spektren von **a** per-*N,O*-acetyliertem *D-erythro*-Sphingosin, **b** per-*N,O*-acetylierten gesättigten Sphingobasen aus Des1p *C. albicans* exprimierender Hefe und **c** einer Mischung aus per-*N,O*-acetylierten gesättigten und ungesättigten Sphingobasen aus Des1p *C. albicans* exprimierender Hefe. Die roten und blauen Pfeile in **c** ordnen die Signale den in **a** und **b** gezeigten ungesättigten bzw. gesättigten Sphingobasen zu. Die Spektren wurden in CDCl_3 bei 600 MHz und 300 K mit CHCl_3 als internem Standard aufgenommen.

a) Chemische Verschiebung δ :

	Messung	D- <i>erythro</i>		L- <i>threo</i>	
	δ [ppm]	δ [ppm]	$\Delta\delta$ [ppm]	δ [ppm]	$\Delta\delta$ [ppm]
H-1a	4,041	4,042	-0,001	4,063	-0,022
H-1b	4,284	4,304	-0,020	4,093	0,191
H-2	4,414	4,433	-0,019	4,398	0,016
H-3	5,257	5,277	-0,020	5,407	-0,150
H-4	5,372	5,391	-0,019	5,380	-0,008
H-5	5,772	5,792	-0,020	5,773	-0,001
H-6a	2,04	2,04	0,00	2,02	0,02
H-6b	2,04	2,05	-0,01	2,03	0,01
NH	5,609	5,63	-0,02	5,63	-0,02

b) Kopplungskonstanten J :

	Messung	D- <i>erythro</i>		L- <i>threo</i>	
	J [Hz]	J [Hz]	ΔJ [Hz]	J [Hz]	ΔJ [Hz]
$J_{1a,1b}$	11,5	11,6	-0,1	11,4	0,1
$J_{1a,2}$	3,9	3,9	0,0	5,6	-1,7
$J_{1b,2}$	6,1	6,0	0,1	5,5	0,6
$J_{2,3}$	6,3	6,0	0,3	5,2	1,1
$J_{2,NH}$	9,2	9,3	-0,1	9,4	-0,2
$J_{3,4}$	7,2	7,5	-0,3	7,2	0,0
$J_{4,5}$	15,2	15,3	-0,1	15,4	-0,2
$J_{5,6a}$	6,8	6,8	0,0	6,8	0,0
$J_{5,6b}$	6,8	6,8	0,0	6,8	0,0

Tabelle 3.8: Vergleich der chemischen Verschiebung δ (a) und der Kopplungskonstanten J (b) von diagnostischen Signalen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der per-*N,O*-acetylierten D-*erythro*-Sphingosin-Referenzsubstanz (Spalte „Messung“) mit den Literaturwerten für D-*erythro*- und L-*threo*-Sphingosin [55] (Spalten „D-*erythro*“ und „L-*threo*“). Dabei sind $\Delta\delta = \delta_{\text{Messung}} - \delta_{\text{Literatur}}$ und $\Delta J = J_{\text{Messung}} - J_{\text{Literatur}}$. Die Daten in der Spalte „Messung“ wurden bei 600 MHz und 300 K in CDCl_3 , die Literaturdaten bei 500 MHz und 25°C in CDCl_3 mit $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ als internem Standard aufgenommen.

Referenzsubstanz ein Triplett mit dem Signalverhältnis 1:2:1, was durch je ein Wasserstoffatom an C-2 und C-4 mit $J_{2,3} \approx J_{3,4}$ zu erklären ist. Dies ist konsistent mit einer Doppelbindung zwischen C-4 und C-5. Die Spin-Spin-Aufspaltung des H-3 zeigt dagegen bei den ungesättigten Sphingobasen ein Quartett mit dem Signalverhältnis 1:3:3:1, was durch ein Wasserstoffatom an C-2 und zwei Wasserstoffatome an C-4 mit $J_{2,3} \approx J_{3,4a} \approx J_{3,4b}$ zu erklären ist. Die feine Aufspaltung der Resonanzen an C-3 in weitere kleine Multipletts zeigt, dass es sich bei dieser Abschätzung um eine grobe Näherung handelt.

In Abbildung 3.5c ist zu erkennen, dass dieses Spektrum eine Überlagerung der Spektren aus Abbildung 3.5a und b darstellt. Diese Probe enthält eine Mischung aus ungesättigten und gesättigten Sphingobasen. Dies zeigt, dass die DC-Reinigung der freien (siehe Abschnitt 2.8.2) und der acetylierten Sphingobasen (siehe Abschnitt 2.8.4) die ungesättigten Sphingobasen nur anreichern, aber nicht vollständig von den gesättigten Basen trennen konnte. Die Resonanzen in Abbildung 3.5c sind entsprechend ihrer Zuordnung zu den Spektren in Abbildung 3.5a oder b durch rote und blaue Pfeile markiert. Es ist eindeutig zu erkennen, dass das Spektrum der mit roten Pfeilen markierten Substanz mit dem der *D-erythro*-Sphingosin-Referenzsubstanz identisch ist.

In Tabelle 3.8 werden die chemischen Verschiebungen δ und die Kopplungskonstanten J der mit roten Pfeilen markierten Resonanzen in Abbildung 3.5c den Daten für *D-erythro*- und *L-threo*-Sphingosin (d18:0^{4E}) aus der Literatur [55] gegenübergestellt. Es zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung mit den Werten für *D-erythro*-Sphingosin, aber nicht mit *L-threo*-Sphingosin. Die Unterschiede zwischen den *D-erythro*- und *L-threo*-Isomeren sind am deutlichsten bei den chemischen Verschiebungen δ_{1b} , δ_3 ($\Delta\delta > 0,1$ ppm) sowie bei der Kopplungskonstanten $J_{1a,2}$ ($\Delta J > 1$ Hz).

Diese Daten zeigen zusammengenommen, dass bei der Expression von *Des1p C. albicans* im Hefe-Stamm TDY2037-*sur2* Δ *D-erythro*-Sphingosin (d18:0^{4E}) gebildet wurde. Bei den Messungen wurde nicht zwischen den Stereoisomeren *D-erythro* und *L-erythro* unterschieden. Da die Biosynthese aller Sphingobasen in *S. cerevisiae* aber über *D-erythro*-Sphingamin (d18:0) verläuft, nehme ich auch für

das bei der Expression von Des1p *C. albicans* gebildete Sphingosin die D-*erythro*-Konfiguration an.

Für die Aufnahme und Interpretation der ^1H -NMR-Spektren danke ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Zähringer (Forschungszentrum Borstel).

4 Diskussion

In einer *in silico*-Suche wurde eine neue Proteinfamilie mit Ähnlichkeit zu membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen identifiziert. Die Familie enthält Mitglieder aus Pflanzen, Pilzen und Tieren, deren biochemische Funktion unbekannt war. Die Vermutung lag nahe, dass die Sequenzen dieser Familie die gesuchten Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen sein könnten.

Die Expression einiger dieser Proteine in *S. cerevisiae* zeigte, dass es sich tatsächlich um Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen handelt. Eine Sphingolipid- Δ 4-Desaturase-Aktivität konnte für *Homo sapiens* DES1, *Mus musculus* DES1 und DES2, *Drosophila melanogaster* DES-1 und *Candida albicans* Des1p nachgewiesen werden. *M. musculus* DES2 hatte neben der Desaturase- auch eine Hydroxylase-Aktivität. Dieses Enzym ist also eine bifunktionale Sphingolipid- Δ 4-Desaturase/C4-Hydroxylase. Das DES-Homolog aus *L. esculentum* zeigte weder Desaturase- noch Hydroxylase-Aktivität.

Drei der neu charakterisierten Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen waren bereits zuvor in molekularbiologischen Studien charakterisiert worden, ohne dass ihre biochemische Funktion bekannt war. Es handelt sich hierbei um *D. melanogaster* DES-1 [28], *M. musculus* DES1 (MDES) [29] und *H. sapiens* DES1 (MLD) [12].

In der folgenden Diskussion werde ich zunächst die computergestützte Identifizierung dieser neuen Proteinfamilie behandeln, anschließend werde ich die phylogenetische Einordnung der neuen Familie sowie die Evolution der membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen diskutieren, und zuletzt werde ich auf die Signalübermittlung durch Sphingolipide eingehen.

4.1 *In silico*-Identifizierung einer neuen Δ 4-Desaturase-/C4-Hydroxylase-Familie

In dieser Arbeit wurde eine neue Strategie zur computergestützten (*in silico*-) Identifizierung einer Familie mit putativen Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen entwickelt. Ein wichtiges Ziel bei ihrer Entwicklung war, dass sie nur ein Minimum an Informationen über die zu suchende Proteinfamilie benötigt. Ein Überblick über diese aus drei Stufen bestehende Strategie ist in Abschnitt 1.5 gegeben.

Für die erste Stufe, die Erstellung einer möglichst umfassenden Sammlung membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen, wurde in dieser Arbeit PSI-Blast [2] verwendet. Suchläufe mit nur zwei Ausgangssequenzen¹ waren ausreichend, um die gesamte Superfamilie zu erfassen. Die Verwendung von PSI-Blast war entscheidend, da es mit einer „normalen“ Blast-Suche [2] wegen deren niedrigerer Empfindlichkeit sehr schwierig gewesen wäre, eine vollständige Sammlung membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen zu erstellen.

Als Alternative zu PSI-Blast wurde die Verwendung von INTERPRO [3] getestet. In der INTERPRO-Datenbank sind Sequenzmotive gespeichert, die für bestimmte Funktionen charakteristisch sind. Es ist möglich, alle Proteinsequenzen abzurufen, die ein bestimmtes INTERPRO-Sequenzmotiv enthalten. Es zeigte sich aber, dass die in INTERPRO vordefinierten Sequenzmotive nicht die gesamte Superfamilie der membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen abdecken. Es ist anzunehmen, dass mit zukünftigen Verbesserungen von INTERPRO oder ähnlicher Datenbanken eine vollständige Abdeckung erreicht werden wird.

Eine weitere mögliche Methode zur Erstellung einer umfassenden Sammlung membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen ist die direkte Suche nach dem Histidinbox-Sequenzmotiv. Die einfache Suche nach dem Muster (H/Q)XXX(X)H wäre nicht geeignet, da die Zahl falsch positiver Treffer durch

¹Die Suchläufe wurden im Januar 2001 durchgeführt. Da inzwischen die verwendete Datenbank (GenBank-*nr*-Proteinsequenzen) stark gewachsen ist und die Empfindlichkeit von Blast und PSI-Blast mit zunehmender Datenbankgröße abnimmt, wären heute mehr Suchläufe erforderlich.

zufälliges Auftreten dieses Motivs zu groß wäre. Es ist daher ein spezieller Algorithmus erforderlich, der die Anzahl der (H/Q)XXX(X)H-Muster in einer Sequenz und den Abstand zwischen ihnen berücksichtigt. Dies wurde in dieser Arbeit nicht getestet.

Für die zweite Stufe, die Einteilung der Sequenzen in einzelne Familien, wurde das *Multiple alignment*-Programm ClustalX benutzt. Dieser Ansatz war erfolgreich, hat aber trotzdem einige Schwächen:

- Die Sequenzähnlichkeit der am weitesten entfernten Mitglieder der Superfamilie liegt unter 10%. Bei einer so geringen Ähnlichkeit ist die Qualität eines *Alignments* der Proteinsequenzen sehr schlecht.
- Die Erstellung eines *Alignments* mit mehreren hundert Sequenzen ist mit ClustalX zwar möglich, beansprucht aber eine erhebliche Rechenzeit auf einem Standard-PC.
- Die manuelle Einteilung in Familien anhand von phylogenetischen Stammbäumen ist relativ willkürlich und erfordert „spicken“ auf die Annotierung der Sequenzen. Die Situation wird durch die schlechte Qualität der *Alignments* und Stammbäume weiter erschwert.

Die in *Alignments* und Stammbäumen enthaltene detaillierte Information ist für die Einteilung in Familien nicht unbedingt erforderlich. Wünschenswert wäre ein Algorithmus, der anhand eines einfach zu bestimmenden Ähnlichkeitsmaßes eine Einteilung der Sequenzen in Familien weitgehend automatisch vornimmt.

Kürzlich wurde das Programm TRIBE-MCL veröffentlicht [30], das explizit für diesen Zweck entwickelt wurde. TRIBE-MCL ist ein sehr neues Programm und stand deshalb für die Identifizierung der Δ^4 -Desaturasen noch nicht zur Verfügung. Um die Eignung dieses Programms für zukünftige Arbeiten zu testen, wurden die Originaldaten aus Abschnitt 3.1 mit TRIBE-MCL erneut analysiert (siehe Abschnitt 3.2). Die mit TRIBE-MCL ermittelten Familien wurden mit BioLayout [31] visualisiert (siehe Abschnitt 3.3).

Es zeigte sich, dass die Einteilung der membrangebundenen Desaturasen in Familien mit TRIBE-MCL sehr einfach ist. Die Einteilung entspricht sehr gut den Familien, die sich über die biochemische Funktion der Sequenzen definieren lassen. Die Ergebnisse werden von nur zwei Parametern beeinflusst, dem maximalen e -Wert des paarweisen Blast-Vergleichs und dem Inflationsparameter I des MCL-Algorithmus. Es ergeben sich über einen weiten Bereich beider Parameter sinnvolle und leicht interpretierbare Ergebnisse.

Insbesondere zeigte sich, dass die Identifizierung der Familie putativer Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen mit TRIBE-MCL einfach und sicher gewesen wäre. TRIBE-MCL bietet sich deshalb in Zukunft für ähnliche Aufgabenstellungen an.

Die dritte Stufe, die Identifizierung der gesuchten Familie, erfordert die Einbeziehung externer Information, d.h. von Information, die nicht implizit in den betrachteten Sequenzen enthalten ist. Solche Information kann zum Beispiel die Kenntnis sein, in welchen Organismengruppen die gesuchte biochemische Aktivität vorkommt. In dieser Arbeit wurden die drei in Abschnitt 3.1 beschriebenen Kriterien zur Identifizierung einer Familie putativer Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen angewandt.

Es wurde genau eine Familie gefunden, die allen drei Kriterien entsprach. Die Expression mehrerer Mitglieder dieser Familie (*H. sapiens* *DES1*, *M. musculus* *Des1* und *Des2*, *D. melanogaster* *des-1* und *C. albicans* *DES1*) zeigte, dass es sich tatsächlich um die Familie der Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen handelte. Lediglich die Expression der einzigen untersuchten pflanzlichen Sequenz (*DES*-Homolog *L. esculentum*) brachte aus bisher unbekanntem Gründen ein negatives Ergebnis.

Diese dreistufige Strategie lässt sich prinzipiell auf jedes beliebige Problem dieser Art anwenden. Dabei können die ersten beiden Stufen direkt übernommen werden, während die dritte Stufe anhand der für die gesuchte Familie vorhandenen externen Information anzupassen ist. Es ist geplant, diese Strategie z.B. für die Identifizierung der Sphingolipid-C9-Methyltransferasen zu verwenden.

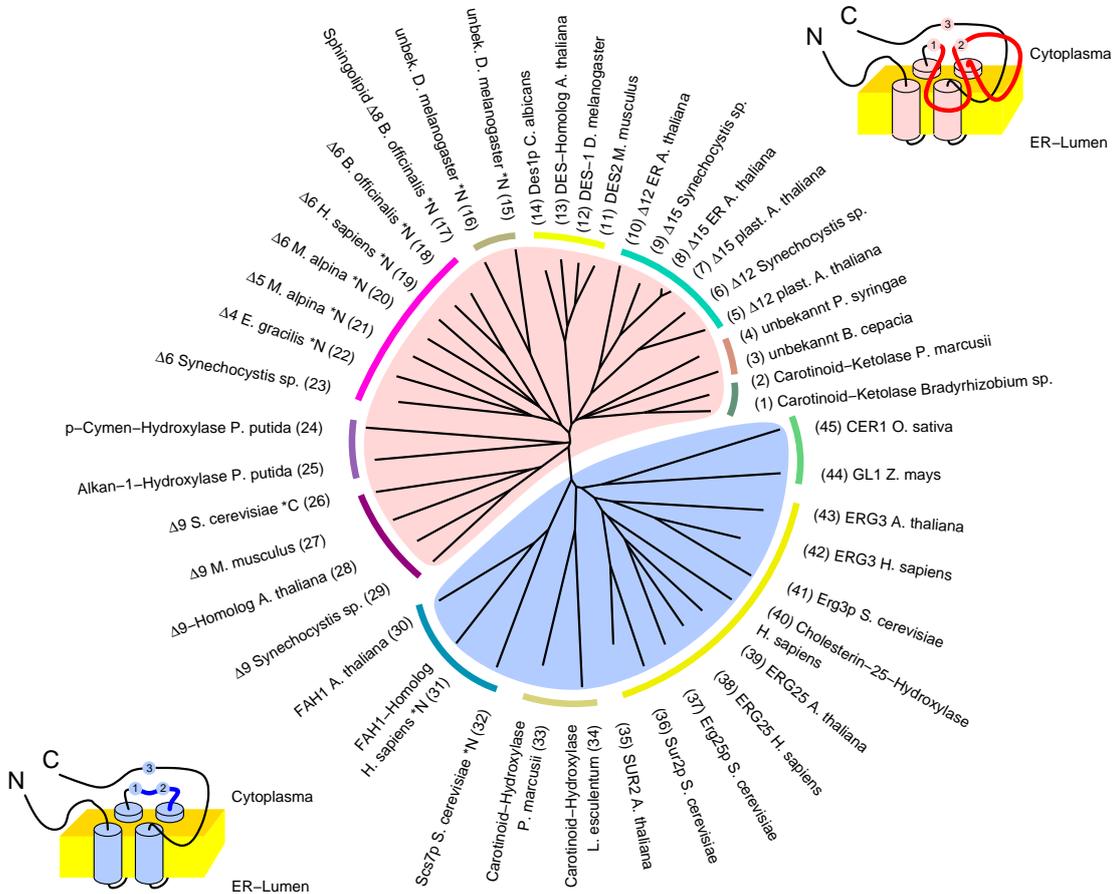
4.2 Einordnung der neuen $\Delta 4$ -Desaturase-/C4-Hydroxylase-Familie

Die Einordnung der neuen Desaturase-Familie in die Phylogenie der membrangebundenen Desaturasen bringt mehrere Überraschungen mit sich. Zur Illustration ist in Abbildung 4.1 ein Stammbaum einer repräsentativen Auswahl membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen zu sehen.

Als erstes fällt die phylogenetische Eigenständigkeit der neuen Desaturasefamilie auf. Die Familie der Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen bildet einen eigenen Ast im in Abbildung 4.1 gezeigten Stammbaum (Sequenzen 11–14), eine eigene Gruppe bei der Einteilung der membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen in Familien mit TRIBE-MCL (siehe Tabelle 3.2) und bei deren graphischer Darstellung mit BioLayout (siehe Abbildung 3.2). Die Familie enthält Homologe aus allen drei eukaryoten Reichen, aus Pflanzen, Pilzen und Tieren. Dies deutet darauf hin, dass es sich um eine phylogenetisch sehr alte Familie handelt, die schon bei den ersten Eukaryoten vorhanden war. In dieser Hinsicht ist sie vergleichbar mit den Familien der Fettsäure- $\Delta 9$ -Desaturasen (Sequenzen 26–29), der Fettsäure- $\Delta 12/\Delta 15$ -Desaturasen (Sequenzen 5–10) und mit den „*Front end*“-Desaturasen (Sequenzen 17–23).

Die Familie der Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen ist eine von drei Familien membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen, die Sphingobasen modifizieren. Sie ist die einzige Familie, die (soweit bekannt) ausschließlich Sphingolipid-modifizierende Enzyme enthält. Die anderen beiden Familien sind die „*Front end*“-Desaturasen (Sequenzen 17–23) mit der Sphingolipid- $\Delta 8$ -Desaturase (Sequenz 17) und die Sterol-Desaturasen und -Hydroxylasen (Sequenzen 35–43) mit der Sphingolipid-C4-Hydroxylase SUR2 (Sequenzen 35 und 36). In den beiden letztgenannten Familien stellen die Sphingolipid-modifizierenden Enzyme eine abgeleitete Unterfamilie dar. Sowohl die Sphingolipid- $\Delta 8$ -Desaturasen als auch die Sphingolipid-C4-Hydroxylasen kommen nur in Pflanzen und Pilzen, aber nicht in Tieren vor.

Der Vergleich der Familie der Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen mit der Sphingolipid-C4-Hydroxylase SUR2 bringt eine Überraschung mit sich. Die Familie der Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen enthält die bifunktionale Sphingolipid-



■ Δ 12, Δ 15-Desaturasen,
 ■ Δ 9-Desaturasen,
 ■ Δ 5, Δ 6, Δ 8-Desaturasen,
 ■ Sterol-Desaturasen, Spingolipid-C4-Hydroxylasen,
 ■ Xylol-, *p*-Cymol-, Alkan-Hydroxylasen,
 ■ Carotinoid-Hydroxylasen,
 ■ Hydroxylasen der Wachs-Biosynthese,
 ■ Carotinoid-Ketolasen,
 ■ Fettsäure- α -Hydroxylasen,
 ■ Spingolipid- Δ 4-Desaturasen,
 ■ unbekannt,
 ■ unbekannt

Abbildung 4.1: Stammbaum einer repräsentativen Auswahl membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen. Der Stammbaum wurde anhand paarweiser Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen mit T-COFFEE [80] und TreeView erstellt. Die farbigen Markierungen am Rand entsprechen den mit TRIBE-MCL ermittelten Familien (siehe Tabelle 3.2 und Abbildung 3.2). (Fortsetzung nächste Seite)

Abbildung 4.1 (Fortsetzung): Der rosa und hellblaue Hintergrund markiert zwei übergeordnete Gruppen von Desaturase- und Hydroxylase-Sequenzen, die sich durch einen unterschiedlichen Abstand (in der Primärstruktur) zwischen der ersten und der zweiten Histidinbox und zwischen der zweiten Histidinbox und der dritten transmembranen Helix unterscheiden. Die kleinen Bilder illustrieren diese Unterschiede. Dabei werden eine Integration der Enzyme in die ER-Membran mit vier transmembranen Helices (rote bzw. blaue Zylinder) und ein durch die drei Histidinboxen (rote bzw. blaue Kugeln) gebildetes aktives Zentrum auf der cytoplasmatischen Seite der Membran angenommen. Die unterschiedlich langen Sequenzabschnitte (länger in den Sequenzen mit rosa Hintergrund, kürzer in den Sequenzen mit hellblauem Hintergrund) sind in braun bzw. blau hervorgehoben. Die Membrantopologie der membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen wurde mit TMHMM [61] vorhergesagt (siehe Abschnitt 3.4). SWISS-PROT/TrEMBL-Zugangsnummern der Sequenzen sind: (1) Q9KIX0, (2) Q9RLH7, (3) Q9ZGQ3, (4) Q52580, (5) P46312, (6) P20388, (7) P46310, (8) P48623, (9) Q55240, (10) P46313, (11) Q8R2F2, (12) Q94515, (13) Q9ZPH4, (14) Basen 7499–8611 des *Contig* 6-2340, (15) Q9VJI1, (16) Q9VJI2, (17) Q9FR82, (18) O04353, (19) O95864, (20) Q8X174, (21) O74212, (22) A. MEYER, zur Veröffentlichung eingereicht, (23) Q08871, (24) O33456, (25) Q9WWW6, (26) P21147, (27) P13516, (28) O65797, (29) Q55406, (30) O48916, (31) Q96DK1, (32) Q03529, (33) Q9RLH6, (34) Q9S6Y1, (35) Q9M9T3, (36) P38992, (37) P53045, (38) Q15800, (39) Q8VWZ8, (40) O95992, (41) P32353, (42) O75845, (43) Q9SWU4, (44) O24555, (45) Q9XH51

Δ 4-Desaturase/C4-Hydroxylase DES2 aus *M. musculus*. Damit hat sich in beiden Familien die Sphingolipid-C4-Hydroxylase-Aktivität unabhängig voneinander entwickelt. Eine Sphingolipid-C4-Hydroxylase-Aktivität in Säugetieren war biochemisch schon lange bekannt [18]. Es war jedoch unklar, welches Gen für diese Aktivität verantwortlich ist, da die bisher bekannten Sphingolipid-C4-Hydroxylasen nur in Pflanzen und Pilzen vorkommen [101]. Die Identifizierung der bifunktionalen Sphingolipid- Δ 4-Desaturase/C4-Hydroxylase DES2 aus *M. musculus* zeigt jetzt, dass Pflanzen und Pilze auf der einen und Tiere auf der anderen Seite in verschiedenen Familien der membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen eine Sphingolipid-C4-Hydroxylase-Aktivität entwickelt haben.

Die bifunktionale Sphingolipid- Δ 4-Desaturase/C4-Hydroxylase DES2 aus *M. musculus* ist nicht das einzige Enzym mit bifunktionaler Desaturase/Hydroxylase-Aktivität. In der Familie der Δ 12/ Δ 15-Desaturasen gibt es sowohl eine reine Δ 12-Desaturase aus *A. thaliana* [81], eine bifunktionale Δ 12-Desaturase/Hydroxylase aus *Lesquerella fendleri* [10] und eine reine C12-Hydroxylase aus *Ricinus communis* [68]. In beiden Familien scheinen sogar die „reinen“ Desaturasen meist auch eine geringe Hydroxylase-Aktivität zu haben ([8] und diese Arbeit). Es ist sogar möglich, durch Austausch weniger Aminosäuren eine Δ 12-Desaturase in eine C12-Hydroxylase umzuwandeln und umgekehrt [8, 11]. Dies zeigt, wie einfach es auch in der Evolution der membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen sein muss, beide Reaktionstypen ineinander umzuwandeln. Im Stammbaum in Abbildung 4.3 ist eine durch gerichtete Mutagenese erzeugte bifunktionale Δ 12-Desaturase/C12-Hydroxylase mit eingezeichnet (Sequenz 11). Der Unterschied dieses bifunktionalen Enzyms zur Ausgangssequenz (einer reinen Desaturase, Sequenz 10) ist so gering, dass er im Stammbaum fast nicht zu erkennen ist.

In mehreren Publikationen wurde angenommen, dass die phylogenetische Einordnung membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen mit ihrer Regioselektivität korreliert [94, 98] ist. Substratspezifität und Reaktionstyp (Desaturase, Hydroxylase oder „exotische“ Modifikationen) spielen nach dieser Auffassung eine untergeordnete Rolle. Beispiele, die dies zu bestätigen scheinen, sind die bereits

diskutierte Ähnlichkeit zwischen Desaturasen und Hydroxylasen sowie die enge Verwandtschaft der Sphingolipid- Δ 8-Desaturasen mit den pflanzlichen Fettsäure- Δ 6-Desaturasen (Sequenzen 17 und 18 in Abbildung 4.1). Verschiebungen der Regioselektivität um mehrere C-Atome innerhalb einer Familie sind dabei möglich (siehe Abschnitt 4.3).

Mit der Identifizierung der Sphingolipid- Δ 4-Desaturase sind jetzt jedoch drei nicht miteinander verwandte Familien von Desaturasen und Hydroxylasen mit Δ 4- bzw. C4-Regioselektivität bekannt. Dies sind neben den Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen (Sequenzen 11–14) die Sphingolipid-C4-Hydroxylasen (Sequenzen 35 und 36) und die Fettsäure- Δ 4-Desaturase (Sequenz 22). Die Vermutung eines Zusammenhangs zwischen der Regioselektivität einer membrangebundenen Desaturase oder Hydroxylase und ihrer phylogenetischen Einordnung muss daher neu formuliert werden:

- Die Enzyme innerhalb einer Familie membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen haben ähnliche Regioselektivität. Die Regioselektivität einzelner Familienmitglieder kann um mehrere C-Atome von „Standard“-Regioselektivität der Familie abweichen.
- In nicht miteinander verwandten Familien kann es jedoch mehrfach unabhängig voneinander zur Entwicklung derselben Regioselektivität kommen.

4.3 Evolution membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen

Nachdem in Abschnitt 4.2 die Einordnung der neuen Familie der Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen in die Phylogenie der membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen diskutiert wurde, bietet es sich an, einen Blick auf die Evolution der gesamten Superfamilie zu werfen. Hierbei sind die entscheidenden Fragen:

- In welcher Organismengruppe liegt der Ursprung der membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen?
- Welche Substratspezifität und Regioselektivität hatten die ersten membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen?

Wenn man die in Tabelle 3.2 für die einzelnen Familien angegebenen Organismengruppen betrachtet, fällt auf, dass es in fast allen Familien Homologe aus Bakterien und Blaualgen gibt.² Die membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen können also keine eukaryote „Erfindung“ sein. Die meisten Familien müssen schon vor den ersten eukaryoten Zellen entstanden sein. Die beiden einzigen funktionell charakterisierten Familien in Tabelle 3.2, in denen keine prokaryoten Vertreter gefunden wurden, sind die Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen und die Fettsäure- α -Hydroxylasen. Beide Familien sind an der Sphingolipid-Biosynthese beteiligt. Obwohl Sphingolipide auch in einigen Bakterien vorkommen, scheinen die Desaturierung und die Hydroxylierung des Ceramid-Gerüsts ein typisch eukaryotes Merkmal zu sein.

Von den Prokaryoten haben die Blaualgen die größte Vielfalt an membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen. Neben einem kompletten Satz an Fettsäure-Desaturasen (Δ 6, Δ 9, Δ 12- und Δ 15-Desaturase, Sequenzen 23, 29, 9 und 6 in Abbildung 4.1) haben sie auch Homologe in der Familie der Sterol-Desaturasen und -Hydroxylasen und Sphingolipid-C4-Hydroxylasen (siehe Tabelle 3.2). Da Blaualgen weder Sterole noch Sphingolipide haben, müssen diese Enzyme eine andere Funktion erfüllen als ihre eukaryoten Homologe.

Die meisten übrigen Bakterien stellen ungesättigte Fettsäuren über einen völlig anderen Biosyntheseweg her als Blaualgen und Eukaryoten und besitzen daher keine Fettsäure-Desaturasen. Trotzdem sind in fast allen der in Tabelle 3.2 aufgeführten Familien bakterielle Vertreter vorhanden. Ihre Funktion ist in den meisten Fällen unbekannt. Die einzigen biochemisch charakterisierten bakteriellen Vertreter in Abbildung 4.1 sind die Carotinoid-Hydroxylase aus *Paracoccus marcusii* (Sequenz 33), die Carotinoid-Ketolasen aus *Paracoccus marcusii* und *Bradyrhizobium* sp. (Sequenzen 1 und 2) und die *p*-Cymol- und die Alkan-1-Hydroxylase aus *Pseudomonas putida* (Sequenzen 24 und 25). Es ist durchaus möglich, dass

²Wie in Tabelle 3.2 werden auch in dieser Diskussion Blaualgen immer getrennt von den übrigen Bakterien behandelt, da die Blaualgen im Lipidstoffwechsel eine Sonderstellung einnehmen.

die ersten membrangebundenen Desaturasen und Hydroxylasen eine Funktion im bakteriellen „Sekundärstoffwechsel“ hatten. Erst später hätte sich dann ihre Funktion in der Biosynthese von Membranlipiden bei Blaualgen und Eukaryoten entwickelt.

In Abbildung 4.1 sind zwei große Gruppen membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen durch einen rosa bzw. hellblauen Hintergrund farblich hervorgehoben. Die beiden Gruppen unterscheiden sich durch den Abstand (in der Primärstruktur) zwischen der ersten und zweiten Histidinbox und zwischen der zweiten Histidinbox und dritten transmembranen Helix. Beide Abschnitte sind in den Sequenzen mit dem rosa Hintergrund länger. Die unterschiedliche Länge dieser Sequenzabschnitte sowie eine mögliche Topologie der Enzyme bei ihrer Insertion in die ER-Membran sind in den beiden kleinen Bildchen dargestellt. Die beiden Sequenzabschnitte, die in den Sequenzen mit dem rosa Hintergrund länger sind, enthalten hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren. Sie könnten damit den Kern einer möglichen globulären Struktur auf der cytoplasmatischen Seite der Membran oder eine hydrophobe Lipidbindestelle bilden.

Ein Blick auf die Verteilung der Familien membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen auf die beiden Gruppen mit rosa bzw. hellblauem Hintergrund zeigt, dass es sich dabei um eine sehr alte Verzweigung handeln muss. Dabei fällt auf, dass sich alle Fettsäure-Desaturasen in der rosa Hälfte, die Sterol-Desaturasen und -Hydroxylasen dagegen in der blauen Hälfte des Stammbaums befinden. Damit befinden sich die Enzyme der Biosynthese dieser beiden wichtigen Gruppen eukaryoter Membranlipide jeweils in ihrer eigenen Hälfte des Stammbaums. Die Sphingolipid-Desaturasen und -Hydroxylasen sowie die Enzyme der Carotinoid-Biosynthese sind dagegen über beide Hälften verteilt. Es lässt sich nicht sagen, welche Hälfte des Stammbaums durch eine Insertion oder Deletion von der anderen abgeleitet ist.

In den Abschnitten 4.3.1 bis 4.3.4 möchte ich näher auf die Evolution einiger Desaturase-Familien eingehen.

4.3.1 $\Delta 9$ -Desaturasen

Die Enzyme aus der Familie der $\Delta 9$ -Desaturasen fügen die erste Doppelbindung in ein gesättigtes Substrat ein. Die Enzyme aus Tieren und Pilzen nutzen Acyl-CoA als Substrat, während die Enzyme aus Blaualgen nur lipidgebundene Acylreste akzeptieren. Der sehr übersichtliche Stammbaum dieser Familie ist in Abbildung 4.2 gezeigt.

Es sind drei große Gruppen von Sequenzen zu erkennen. Die erste Gruppe (Sequenzen 1–5) enthält Sequenzen aus Tieren, die zweite (Sequenzen 6–9) aus Pilzen und die dritte (Sequenzen 10–13) aus Pflanzen und Blaualgen. Die Sequenzen aus Pilzen haben eine C-terminale Cytochrom b_5 -Fusion, die wahrscheinlich an der Basis dieser Gruppe ein einziges Mal entstanden ist.

Innerhalb der tierischen Sequenzen fällt die (*E*)- $\Delta 11$ -Desaturase der Motte *Trichoplusia ni* auf (Sequenz 3). Sie ist an der Pheromon-Biosynthese beteiligt [63]. Hier hat eine Verlagerung der Regioselektivität um zwei C-Atome sowie eine Änderung der Stereoselektivität von (*Z*) nach (*E*) stattgefunden.

Die Pflanzen (jedoch nicht die Blaualgen) synthetisieren $\Delta 9$ -ungesättigte Fettsäuren mit Hilfe der löslichen Acyl-ACP-Desaturase. Trotzdem enthält der Stammbaum der membrangebundenen $\Delta 9$ -Desaturasen mehrere Vertreter aus höheren Pflanzen (Sequenzen 10–12). Die Enzyme aus *Picea glauca* und *Limnanthes douglasii* verwenden jedoch anders als die der Blaualgen wahrscheinlich Acyl-CoA als Substrat. Bei der Desaturase aus *Limnanthes douglasii* hat zudem ein Wechsel der Regioselektivität von $\Delta 9$ nach $\Delta 5$ stattgefunden. Die Sequenz aus *A. thaliana* ist noch nicht funktionell charakterisiert.

4.3.2 $\Delta 12/\Delta 15$ -Desaturasen

Die Familie der $\Delta 12$ - und $\Delta 15$ -Desaturasen enthält Enzyme, die die zweite bzw. dritte Doppelbindung in die Fettsäurereste von Membranlipiden einfügen. Sie sind darauf angewiesen, dass das Substrat bereits eine Doppelbindung in der $\Delta 9$ -Position hat und fügen die zusätzlichen Doppelbindungen zwischen der bereits bestehenden Doppelbindung und dem Methylen des Fettsäurerestes ein. Ein

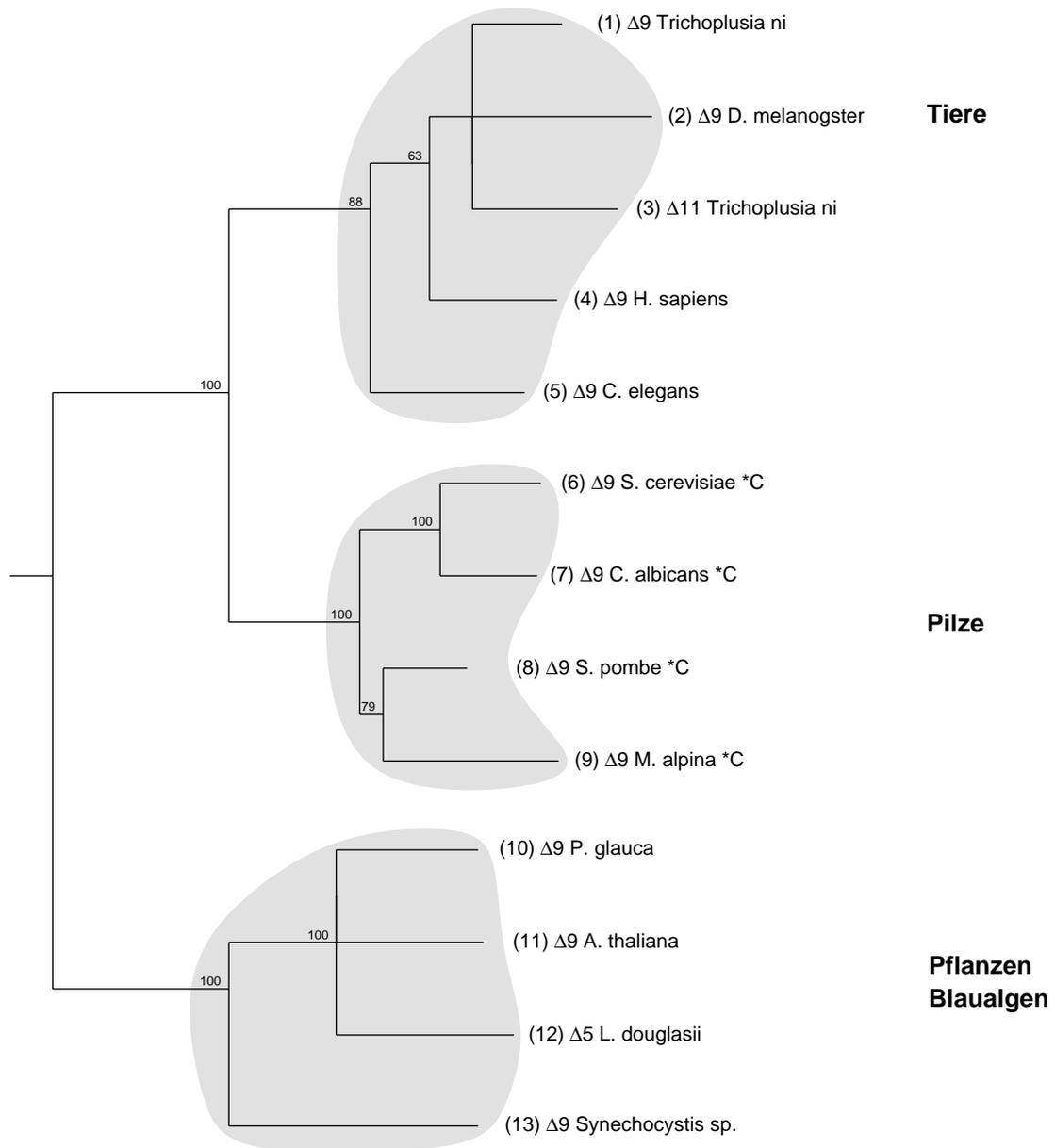


Abbildung 4.2: Stammbaum der Familie der $\Delta 9$ -Desaturasen. Drei Gruppen von Sequenzen sind durch einen grauen Hintergrund hervorgehoben. Diese sind die Acyl-CoA- $\Delta 9$ -Desaturasen aus Tieren einschließlich der $\Delta 11$ -Desaturase aus der Pheromonbiosynthese der Motte *Trichoplusia ni* (Sequenzen 1–5), die Acyl-CoA- $\Delta 9$ -Desaturasen aus Pilzen (Sequenzen 6–9) und die Lipid- $\Delta 9$ -Desaturase der Blaualge *Synechocystis* sp. zusammen mit drei pflanzlichen Vertretern (Sequenzen 10–13). Die Sequenzen aus Pilzen sind C-terminale Cytochrom b_5 -Fusionsproteine (C*). (Fortsetzung nächste Seite)

Abbildung 4.2 (Fortsetzung): Der *Maximum likelihood*-Stammbaum wurde mit TREE-PUZZLE [93] und ATV aus einem mit T-Coffee [80] berechneten *Alignment* der vollständigen Aminosäuresequenzen erstellt. Die Nummern an den internen Verzweigungen geben die Verlässlichkeit der Verzweigungen auf einer Skala von 0 bis 100 an. Die Wurzel des Stammbaums wurde aus Abbildung 4.1 abgeleitet. Die SWISS-PROT/TrEMBL-Zugangsnummern der Sequenzen sind: (1) O44428, (2) Q9VTD4, (3) O44390, (4) O00767, (5) O16918, (6) P21147, (7) O94036, (8) O94523, (9) Q9UVW5, (10) Q8s4Q3, (11) O65797, (12) Q9FV68, (13) Q55406

Stammbaum der $\Delta 12$ - und $\Delta 15$ -Desaturasen ist in Abbildung 4.3 gezeigt.

Die Familie der $\Delta 12$ - und $\Delta 15$ -Desaturasen lässt sich phänotypisch auf zwei verschiedene Arten unterteilen. Zum einen lässt sie sich in Desaturasen mit $\Delta 12$ - oder $\Delta 15$ -Regioselektivität unterteilen, zum anderen in Enzyme, die im ER oder in Plastiden lokalisiert sind. Ein Blick auf den Stammbaum zeigt, dass in der Evolution dieser Familie mehrfach ein Wechsel sowohl der Regioselektivität als auch der intrazellulären Lokalisation stattgefunden haben muss.

Die Annahme liegt nahe, dass die erste Desaturase dieser Familie eine $\Delta 12$ -Regioselektivität hatte, da die $\Delta 15$ -Desaturase für ihre Aktivität auf das Vorhandensein einer $\Delta 12$ -Doppelbindung angewiesen ist. Da die Blaualgen bereits sowohl über eine $\Delta 12$ - als auch eine $\Delta 15$ -Desaturase verfügen und bakterielle Homologe (mit Ausnahme einer nicht funktionell charakterisierten Sequenz aus *Bacillus subtilis*) fehlen, kann man den phylogenetischen Ursprung dieser Familie bei den Blaualgen vermuten.

Innerhalb der Eukaryoten sind $\Delta 12$ - und $\Delta 15$ -Desaturasen nur aus Pflanzen, einigen Pilzen und *C. elegans* bekannt. Insekten bilden auch $\Delta 12$ -desaturierte Fettsäuren, die dafür verantwortlichen Enzyme wurden jedoch noch nicht identifiziert. Die $\Delta 12$ - und $\Delta 15$ -Desaturasen gehörten damit nicht zur phylogenetischen Grundausstattung eukaryoter Zellen, sondern könnten von den Blaualgen durch horizontalen oder endosymbiontischen Gentransfer auf Pflanzen, Pilze, *C. elegans* und eventuell Insekten übertragen worden sein. *C. elegans* ernährt sich von im Boden lebenden Mikroorganismen und könnte daher seine $\Delta 12$ - und $\Delta 15$ -Desaturase

Abbildung 4.3 (Fortsetzung): Der bayesische Stammbaum wurde mit MRBAYES [41] und ATV aus einem mit T-Coffee [80] berechneten *Alignment* der vollständigen Aminosäuresequenzen erstellt. Die Nummern an den internen Verzweigungen geben die Verlässlichkeit der Verzweigungen auf einer Skala von 0 bis 100 an. Die Wurzel des Stammbaums wurde aus Abbildung 4.1 abgeleitet. Die SWISS-PROT/TrEMBL- bzw. GenBank- (*) Zugangsnummern der Sequenzen sind: (1) P46310, (2) P48623, (3) Q55240, (4) T. ZANK, unpubliziert, (5) Q9XUB8, (6) Q21056, (7) T. ZANK, unpubliziert, (8) Q9Y8H5, (9) Q9UVR3, (10) P46313, (11) Literatur [8], (12) O81094, (13) O65772, (14) CAD24671 (*), (15) Q41131, (16) Q9SP61, (17) CAD24672 (*), (18) Q9SP62, (19) O81931, (20) O65771, (21) Q9FPP8, (22) Q9FPP7, (23) P20388, (24) P46312

von mit der Nahrung aufgenommenen Blaualgen durch horizontalen Gentransfer erhalten haben.

Bei den Pflanzen kann man eine Herkunft der plastidären $\Delta 12$ - und $\Delta 15$ -Desaturase durch endosymbiontischen Gentransfer von den Blaualgen als sicher ansehen. Die enge Verwandtschaft zwischen der $\Delta 12$ -Desaturase aus *Synechocystis* sp. und der plastidären $\Delta 12$ -Desaturase aus *A. thaliana* (Sequenzen 23 und 24) und zwischen der $\Delta 15$ -Desaturase aus *Synechocystis* sp. und der plastidären $\Delta 15$ -Desaturase aus *A. thaliana* (Sequenzen 1 und 3) zeigt dies deutlich. Die im ER lokalisierte $\Delta 15$ -Desaturase aus *A. thaliana* (Sequenz 2) wäre dann von der plastidären $\Delta 15$ -Desaturase (Sequenz 1) abgeleitet.

Wie die pflanzlichen $\Delta 15$ -Desaturasen ist auch die $\Delta 15$ -Desaturase aus dem Pilz *Phytophthora infestans* sehr eng mit der $\Delta 15$ -Desaturase aus *Synechocystis* sp. verwandt (Sequenzen 3 und 4). Auch hier kann eine Herkunft der $\Delta 15$ -Desaturase aus *P. infestans* durch horizontalen Gentransfer von einer Blaualge angenommen werden. Die $\Delta 15$ -Desaturase aus *P. infestans* scheint enger mit der $\Delta 15$ -Desaturase aus *Synechocystis* sp. als mit den pflanzlichen $\Delta 15$ -Desaturasen (Sequenzen 1 und 2) verwandt zu sein, wenn auch die Verlässlichkeit dieser Verzweigung mit einem Wert von 79 nicht sehr gut ist. Dies würde bedeuten, dass *P. infestans* seine $\Delta 15$ -Desaturase unabhängig von den Pflanzen erhalten hat.

Die im ER lokalisierten $\Delta 12$ -Desaturasen aus Pflanzen, Pilzen und *C. elegans* (Sequenzen 5–22) sind näher mit den $\Delta 15$ -Desaturasen (Sequenzen 1–4) als mit den $\Delta 12$ -Desaturasen aus Plastiden und Blaualgen (Sequenzen 23 und 24) verwandt. Auch hier kann man annehmen, dass unabhängig von der Endosymbiose, die zur Entstehung der Plastiden führte, eine $\Delta 12$ -Desaturase durch horizontalen Gentransfer in einige frühe eukaryote Linien übertragen wurde. Aus dieser wären dann die im ER lokalisierten $\Delta 12$ -Desaturasen aus Pflanzen, Pilzen und *C. elegans* entstanden. Es bleibt dabei offen, ob diese Übertragung einmal oder in Pflanzen, Pilzen und *C. elegans* getrennt stattgefunden hat. In *C. elegans* muss man annehmen, dass die $\Delta 15$ -Desaturase durch Genduplikation mit anschließendem Wechsel der Regioselektivität aus der $\Delta 12$ -Desaturase entstanden ist. Ein weiteres Beispiel für eine Genduplikation mit anschließendem Wechsel der Regioselektivität in *C. elegans* findet sich bei den „*Front end*“-Desaturasen (Sequenzen 2 und 3 in Abbildung 4.4).

Innerhalb der im ER lokalisierten pflanzlichen $\Delta 12$ -Desaturasen hat sich eine beachtliche Vielfalt an Reaktionstypen entwickelt, die der Synthese von pflanzlichen Speicherfetten dienen. Neben reinen $\Delta 12$ -Desaturasen (Sequenzen 10, 13 und 14) gibt es eine C12-Hydroxylase (Sequenz 15), eine bifunktionelle $\Delta 12$ -Desaturase/C12-Hydroxylase (Sequenz 12), eine $\Delta 12$ -Acetylenase (Sequenz 19), eine $\Delta 12$ -Expoxidase (Sequenz 20) und $\Delta 12$ -Konjugasen (Sequenzen 16–18). Bei der Ringelblume *Calendula officinalis* gibt es zwei $\Delta 9$ -Konjugasen, die trotz einer Verschiebung der Regioselektivität eindeutig in die Gruppe der $\Delta 12$ -Desaturasen gehören (Sequenzen 21 und 22). Diese „exotischen“ Fettsäuremodifikationen machen die Samen der Pflanzen für pflanzenfressende Tiere weniger verträglich.

4.3.3 „*Front end*“-Desaturasen

In der Familie der „*Front end*“-Desaturasen finden sich Enzyme, die eine neue Doppelbindung zwischen einer schon vorhandenen Doppelbindung und der Carboxylgruppe des Fettsäurerestes von Membranlipiden einfügen. Eine Ausnah-

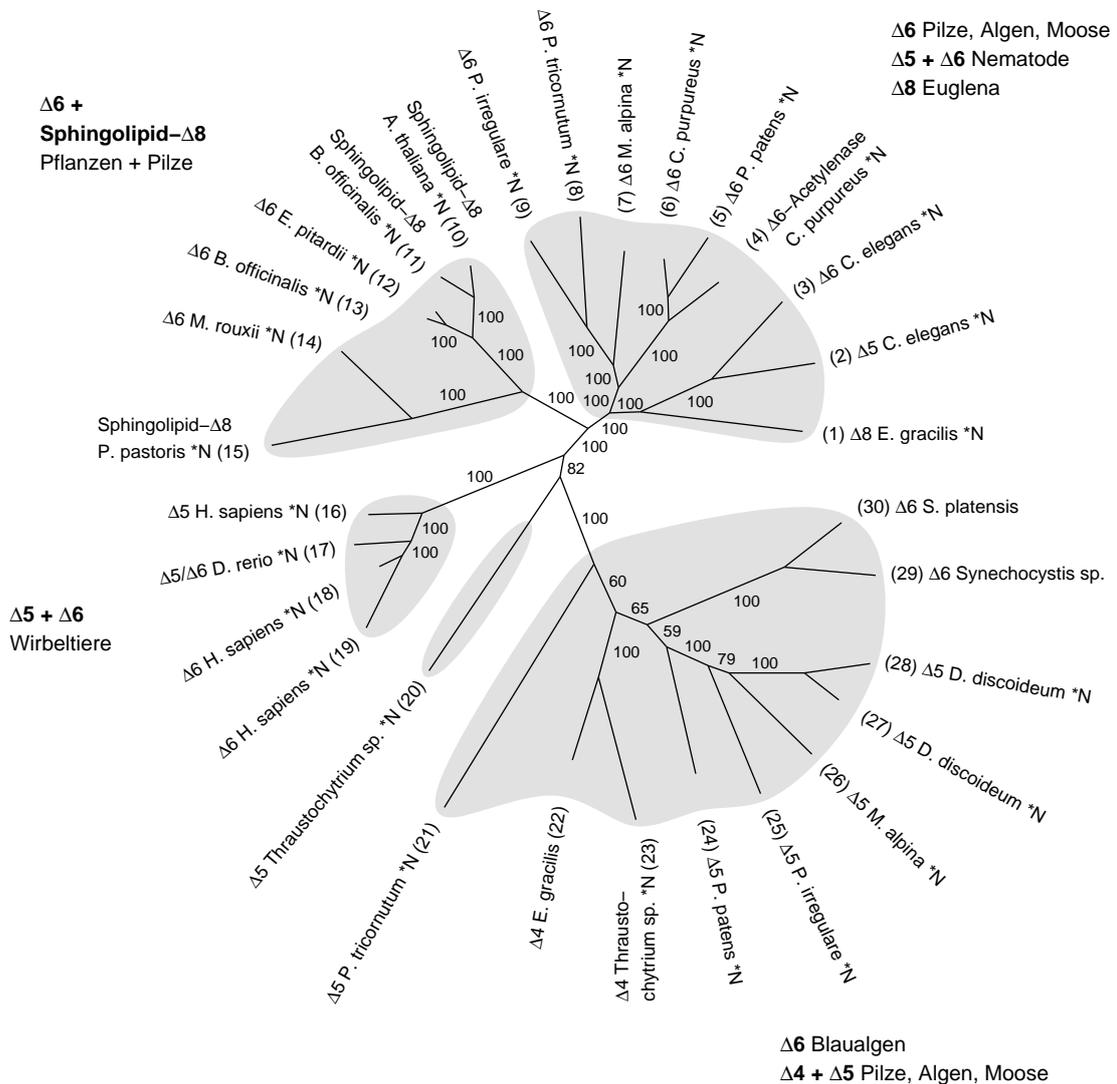


Abbildung 4.4: Stammbaum der Familie der „Front end“-Desaturasen. Fünf Gruppen von Sequenzen sind durch einen grauen Hintergrund hervorgehoben. Diese sind die $\Delta 6$ -Desaturasen aus Moosen, Algen und Pilzen zusammen mit der $\Delta 5$ - und $\Delta 6$ -Desaturase aus *C. elegans* und der $\Delta 8$ -Desaturase aus *Euglena gracilis* (Sequenzen 1–9) die $\Delta 6$ - und Sphingolipid- $\Delta 8$ -Desaturasen aus Pflanzen und Pilzen (Sequenzen 10–15), die $\Delta 5$ - und $\Delta 6$ -Desaturasen aus Säugetieren (Sequenzen 16–19), die $\Delta 5$ -Desaturase der Alge *Thraustochytrium* sp. (Sequenz 20), und die $\Delta 4$ - und $\Delta 5$ -Desaturasen aus Moosen, Algen und Pilzen zusammen mit den $\Delta 6$ -Desaturasen aus Blaualgen (Sequenzen 21–30). Alle Sequenzen bis auf die $\Delta 6$ -Desaturasen aus Blaualgen (Sequenzen 29 und 30) sind N-terminale Cytochrom b_5 -Fusionsproteine (*N). (Fortsetzung nächste Seite)

Abbildung 4.4 (Fortsetzung): Der bayesische Stammbaum wurde mit MRBAYES [41] und TreeView aus einem mit T-Coffee [80] berechneten *Alignment* der vollständigen Aminosäuresequenzen erstellt. Die Nummern an den internen Verzweigungen geben die Verlässlichkeit der Verzweigungen auf einer Skala von 0 bis 100 an. Die Wurzel des Stammbaums wurde aus Abbildung 4.1 abgeleitet. Die SWISS-PROT/TrEMBL-Zugangsnummern der Sequenzen sind: (1) Q9SWQ9, (2) Q9XTB7, (3) O61388, (4) Q9LEN0, (5) Q9ZNW2, (6) Q9LEM9, (7) Q8X174, (8) Q8RXB0, (9) Q944W4, (10) Q9ZRP7, (11) Q9FR82, (12) Q8VZZ1, (13) O04353, (14) Q9HDG8, (15) P. SPERLING, unpubliziert, (16) Q9NRP8, (17) Q9DEX7, (18) O95864, (19) Q9Y5Q0, (20) Q8S3C1, (21) Q8RXB1, (22) A. MEYER, zur Publikation eingereicht, (23) Q8S3C0, (24) Literatur [96], (25) Q944W3, (26) O74212, (27) Q9Y1W0, (28) O96099, (29) Q08871, (30) Q54795

me von dieser Regel sind die Sphingolipid- $\Delta 8$ -Desaturasen. Bis auf die Vertreter aus Blaualgen sind alle Enzyme dieser Familie *N*-terminale Cytochrom b_5 -Fusionsproteine. Ein Stammbaum dieser Familie ist in Abbildung 4.4 gezeigt.

Für die *N*-terminale Cytochrom b_5 -Domäne und die *C*-terminale Desaturase-Domäne getrennt berechnete Stammbäume zeigen innerhalb der gegebenen statistischen Genauigkeit die selbe Topologie wie der Stammbaum der vollständigen Sequenzen. Dies deutet darauf hin, dass die *N*-terminale Cytochrom b_5 -Fusion nur ein einziges Mal an der Basis dieses Stammbaums entstanden ist. Die membran-gebundenen Desaturasen der Cyanobakterien nutzen als Elektronendonator statt Cytochrom b_5 Ferredoxin. Das Fehlen einer Cytochrom b_5 -Fusion in den $\Delta 6$ -Desaturasen der Blaualgen (Sequenzen 29 und 30) ist also funktionell sinnvoll.

Die Familie der „*Front end*“-Desaturasen zeigt eine sehr große Organismenvielfalt. Es sind neben Blaualgen Vertreter aller eukaryoter Linien vorhanden. Neben Tieren und höheren Pflanzen sind Moose und Algen sowie viele Klassen der Pilze vertreten. Bei einigen eukaryoten Organismen wie dem „Schleimpilz“ *Dictyostelium discoideum* ist die phylogenetische Einordnung ungeklärt. Es scheint sich also um eine Familie zu handeln, die bereits zur genetischen Grundausstattung der ersten eukaryoten Zellen gehört hat. Entsprechend früh in der Evolution muss

demnach auch die *N*-terminale Cytochrom *b*₅-Fusion entstanden sein.

In Abbildung 4.4 sind einige Gruppen von zusammengehörigen Sequenzen durch einen grauen Hintergrund hervorgehoben. Statistische Unsicherheiten im gezeigten Stammbaum und mangelnde Kenntnis über die Phylogenie der ersten Eukaryoten erlauben es jedoch nicht, Schlüsse auf die Verwandtschaftsbeziehungen dieser Gruppen untereinander zu ziehen.

Innerhalb dieser Gruppen ist vor allem die enge Verwandtschaft zwischen $\Delta 6$ -Desaturasen und Sphingolipid- $\Delta 8$ -Desaturasen interessant (Sequenzen 10–15). Fettsäure- $\Delta 6$ - (Sequenzen 12–14) und Sphingolipid- $\Delta 8$ -Desaturasen (Sequenzen 10, 11 und 15) gibt es sowohl bei Pflanzen als auch bei Pilzen. Die Sphingolipid- $\Delta 8$ -Desaturase ist bei Pflanzen und Pilzen nahezu ubiquitär, während die Fettsäure- $\Delta 6$ -Desaturase nicht in allen Pflanzenfamilien vorkommt.

Auf den ersten Blick bietet sich daher die Annahme an, dass die erste Desaturase dieser Gruppe eine Sphingolipid- $\Delta 8$ -Desaturase war und die Fettsäure- $\Delta 6$ -Desaturase von dieser abgeleitet ist. Die Pflanzenfamilien mit $\Delta 6$ -ungesättigten Fettsäuren sind jedoch phylogenetisch weit sowohl über die Mono- als auch Dikotyledonen verteilt. Es ist denkbar, dass es innerhalb der Evolution der höheren Pflanzen mehrfach zum Verlust der $\Delta 6$ -Desaturase-Aktivität gekommen ist. Die phylogenetische Herkunft der pflanzlichen $\Delta 6$ -Desaturase kann demnach noch nicht mit Sicherheit geklärt werden.

Die Familie der „*Front end*“-Desaturasen bietet mehrere Beispiele für einen Wechsel der Regioselektivität zwischen nahe verwandten Sequenzen. Bei den Wirbeltieren gibt es sowohl $\Delta 6$ - als auch $\Delta 5$ -Desaturasen (Sequenzen 16–19). Der Zebrafisch *Danio rerio* bietet mit seiner bifunktionalen $\Delta 5/\Delta 6$ -Desaturase (Sequenz 17) ein gutes Beispiel. Die $\Delta 5$ und die $\Delta 6$ -Desaturase aus *C. elegans* (Sequenzen 2 und 3) sind anscheinend ebenfalls durch Wechsel der Regioselektivität aus einer einzigen Sequenz hervorgegangen. Da diese beiden Sequenzen aus *C. elegans* nicht denen aus den übrigen Tieren homolog sind, muss hier auch wie bei den $\Delta 12$ - und $\Delta 15$ -Desaturasen (Sequenzen 5 und 6 in Abbildung 4.3) horizontaler Gentransfer von mit der Nahrung aufgenommenen Mikroorganismen angenommen werden (siehe Abschnitt 4.3.2).

4.3.4 Sphingolipid- Δ 4-Desaturasasen

Die Familie der Sphingolipid- Δ 4-Desaturasasen wird in dieser Arbeit als DES-Familie bezeichnet. Die Enzyme aus Tieren und Pilzen akzeptieren gesättigte Sphingolipide als Substrat und fügen die erste Doppelbindung in der Δ 4-Position der Sphingobase ein. Bei Säugetieren konnte gezeigt werden, dass die Desaturierung auf Ebene der Ceramide stattfindet [74]. Bisher konnte leider noch keines der pflanzlichen Homologe erfolgreich charakterisiert werden. Ein Stammbaum der DES-Familie ist in Abbildung 4.5 gezeigt.

Die DES-Familie enthält Sequenzen aus Pflanzen, Pilzen und Tieren. Δ 4-desaturierte Sphingolipide sind mit wenigen Ausnahmen bei den meisten eukaryoten Organismen nachgewiesen worden. Die DES-Familie gehört damit wie auch die Familien der Δ 9 und der „*Front end*“-Desaturasasen vermutlich zur genetischen Grundausstattung eukaryoter Zellen. Interessanterweise fehlen in der DES-Familie wie auch in der Familie der Fettsäure- α -Hydroxylasen (Sequenzen 30–32 in Abbildung 4.1) Sequenzen aus Bakterien oder Blaualgen (siehe Tabelle 3.2). Die Fettsäure- α -Hydroxylasen hydroxylieren die langkettige Fettsäure des Ceramids an ihrem C2-Atom. Die Desaturierung und Hydroxylierung des Ceramid-Gerüsts scheinen also typische eukaryote Eigenschaften zu sein.

M. musculus besitzt zwei Sequenzen aus der DES-Familie. Während *M. musculus* DES1 (Sequenz 9) eine reine Sphingolipid- Δ 4-Desaturase ist, handelt es sich bei *M. musculus* DES2 (Sequenz 11) um eine bifunktionale Sphingolipid- Δ 4-Desaturase/C4-Hydroxylase. *M. musculus* DES1 ist näher mit *H. sapiens* DES1 und dem DES1-Homolog aus *Rattus norvegicus* (Sequenzen 8 und 10) verwandt als mit *M. musculus* DES2. Dies deutet darauf hin, dass Säugetiere generell zwei DES-Homologe haben könnten. In dieser Arbeit wurde ein für ein DES2-Homolog aus *H. sapiens* kodierender cDNA-Klon untersucht, dieser war jedoch unvollständig (siehe Abschnitt 2.3).

Wie *M. musculus* besitzt auch *C. elegans* zwei DES-Homologe (Sequenzen 6 und 7). Der Stammbaum zeigt eindeutig, dass die beiden Duplikate in *C. elegans* und in *M. musculus* unabhängig voneinander entstanden sind. Interessant ist die

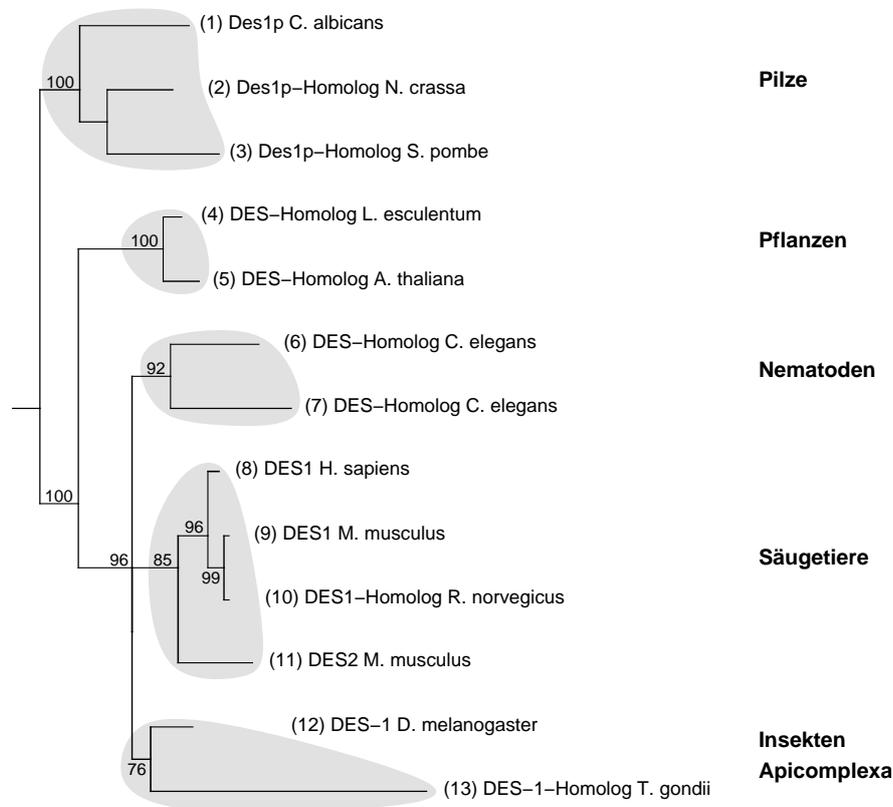


Abbildung 4.5: Stammbaum der Familie der Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen. Fünf Gruppen von Sequenzen sind durch einen grauen Hintergrund hervorgehoben. Diese sind Sequenzen aus Pilzen (Sequenzen 1–3), Pflanzen (Sequenzen 4 und 5), *C. elegans* (Sequenzen 6 und 7), Säugetieren (Sequenzen 8–11) sowie eine Gruppe mit je einer Sequenz aus *D. melanogaster* und dem intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* (Sequenzen 12 und 13). Der *Maximum likelihood*-Stammbaum wurde mit TREE-PUZZLE [93] und ATV aus einem mit T-Coffee [80] berechneten *Alignment* der vollständigen Aminosäuresequenzen erstellt. Die Nummern an den internen Verzweigungen geben die Verlässlichkeit der Verzweigungen auf einer Skala von 0 bis 100 an. Die Wurzel des Stammbaums wurde aus Abbildung 4.1 abgeleitet. Die SWISS-PROT/TrEMBL-Zugangsnummern der Sequenzen sind: (1) Basen 7499–8611 des *Contig* 6-2340, (2) Basen 17916–16535 des *Contig* 9a58, (3) O59715, (4) Q8S459, (5) Q9ZPH4, (6) Q9XWK1, (7) O44186, (8) O15121, (9) Q8R4H3, (10) Q91XI6, (11) Q8R2F2, (12) Q94515, (13) Q968Z3

Einordnung des DES-Homologs aus *Toxoplasma gondii* (Sequenz 13) als Schwestersequenz zu DES-1 aus *D. melanogaster* (Sequenz 12). Eine solche Einordnung ist nur durch horizontalen Gentransfer zu erklären. *Toxoplasma gondii* gehört wie auch die Malaria-Erreger der Gattung *Plasmodium* zur Gruppe der Apicomplexa. Die Apicomplexa sind obligate Endoparasiten mit zwei- oder dreiphasigem Generationswechsel, deren Lebenszyklus sich in mehreren End- und Zwischenwirten abspielt. Die Untergruppe der Coccidia, zu der sowohl *Toxoplasma gondii* als auch *Plasmodium* gehören, ist dabei durch das Auftreten von intrazellulären Entwicklungsstadien gekennzeichnet. Es ist daher ohne weiteres vorstellbar, dass *Toxoplasma gondii* sein DES-1-Homolog durch horizontalen Gentransfer von einem zu den Insekten gehörenden Wirt erhalten hat.

4.4 *In vivo*-Funktionen der Sphingolipid- Δ 4-Desaturase

Drei Mitglieder der DES-Familie sind bereits mit molekularbiologischen Methoden untersucht worden, ohne dass ihre biochemische Funktion bekannt war. Dies sind das *des*-Gen aus *D. melanogaster* [28], *DES1* (*Mdes*) aus *M. musculus* [29] und das DES1-Protein (MLD) aus *H. sapiens* [12].

Das *des*-Gen aus *D. melanogaster* ist durch eine Mutation inaktiviert worden, die bei Männchen zu einem Defekt in der Spermatogenese führt [28]. Der Zellzyklus der primären Spermatocyten ist am G₂/M-Übergang der Meiose I blockiert, in einem Stadium direkt bevor bei Wildtyp-Männchen die Kondensation der Chromosomen eingeleitet wird. Der Phänotyp der Mutante kann durch eine funktionelle Kopie des *des*-Gens komplementiert werden. Neben der Sterilität der Männchen führt die Inaktivierung des *des*-Gens zu einer 20–50%igen Letalität während der Embryonalentwicklung sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen. Angesichts der vielfältigen Funktionen der Sphingolipide in Signalübermittlung und Membranstruktur ist es erstaunlich, dass die *des*-Mutante überhaupt lebensfähig ist. Im Drosophila-Genom gibt es jedoch kein zweites *des*-homologes Gen, das die Mutation komplementieren könnte.

Die Fruchtbarkeit der Weibchen ist in der *des*-Mutante nicht beeinträchtigt,

obwohl bei der Entwicklung der Eizelle auch eine Meiose stattfindet. Allerdings ist der zeitliche Ablauf der Entwicklung von Spermien und Eizellen völlig anders. Während Spermien im erwachsenen Männchen laufend neu gebildet werden, findet die Bildung der Eizellen schon früh während der Entwicklung des Weibchens statt. Anschließend gelangen die Eizellen in einen Ruhezustand. Man könnte spekulieren, dass die Funktion des *des*-Gens zur Aufrechterhaltung der Bildung von Spermien im erwachsenen Tier notwendig ist. Interessanterweise gibt es auch beim Menschen eine Form von männlicher Sterilität, bei der der Zellzyklus der Spermatogenese in einem ähnlichen Stadium am G₂/M-Übergang blockiert ist [66]. Eine nähere Untersuchung der Rolle des *des*-Gens bei der Steuerung der Meiose könnte also auch von medizinischem Interesse sein.

Der Phänotyp der *des*-Mutante ist dem von vier anderen *D. melanogaster*-Mutanten sehr ähnlich. In den Mutanten *always early* (*aly*), *cannonball* (*can*), *meiosis I arrest* (*mia*) und *spermatocyte arrest* (*sa*) ist der Zellzyklus ebenfalls am G₂/M-Übergang der Meiose blockiert [66]. In den Mutanten *aly*, *can*, *mia* und *sa* sowie bei *des* ist nicht nur der Zellzyklus, sondern auch die Differenzierung der Spermatiden blockiert. Hierin unterscheiden sie sich von Mutationen in Kernkomponenten des Zellzyklus wie *cdc2* oder *twine*, bei denen zwar der Zellzyklus blockiert ist, die Differenzierung der Spermatiden aber trotzdem weiterläuft [66]. Hieraus lässt sich schließen, dass das DES-1-Protein sowie die Proteine ALY, CAN, MIA und SA an einem übergeordneten Signaltransduktionsweg beteiligt sind, der sowohl den Eintritt in die Meiose als auch die Differenzierung der Spermatiden steuert [66].

Der einzige sichtbare Unterschied zwischen der *des*-Mutante und *aly*, *can*, *mia* und *sa* ist, dass in *des* der Zellzyklus direkt vor der Kondensation der Chromosomen zum Stillstand kommt, während in *aly*, *can*, *mia* und *sa* die Chromosomen noch teilweise kondensieren. Der Zellzyklus in der *des*-Mutante ist also in einem geringfügig früheren Stadium als bei *aly*, *can*, *mia* und *sa* blockiert. Die Identifizierung des DES-1-Proteins als Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase legt nahe, dass das Signal zum Eintritt in die Meiose durch $\Delta 4$ -desaturierte Sphingolipide übermittelt wird. In diesem Zusammenhang wäre es wichtig zu prüfen, ob sich die Funktion

des DES-1-Proteins selbst von der Funktion der $\Delta 4$ -desaturierten Sphingolipide trennen lässt. Dies wäre zum Beispiel möglich, indem man durch gerichtete Mutagenese eine katalytisch inaktive Mutante des DES-1-Proteins erstellt, die aber wie der Wildtyp an Protein-Protein-Wechselwirkungen teilnehmen kann. Hierfür würde sich besonders ein Austausch der katalytisch essenziellen Histidin-Positionen [95] anbieten.

C. elegans besitzt zwei DES-Homologe (GenBank-Zugangsnummern NP_493549 und NP_501256), die in dieser Arbeit nicht biochemisch charakterisiert wurden. In einer Studie, in der über 80% der *C. elegans*-Gene durch RNAi inaktiviert wurden, führte die Inaktivierung von keinem dieser beiden Gene zu einem Phänotyp [47]. Es ist denkbar, dass sich die beiden Gene in ihrer Funktion gegenseitig komplementieren können. In diesem Fall müsste man beide Gene gleichzeitig durch RNAi inaktivieren. In einer anderen Studie mit *C. elegans* wurden 552 unter den verschiedensten Wachstumsbedingungen durchgeführte *Microarray*-Experimente gemeinsam analysiert [54]. Die untersuchten Gene wurden nach ihren Expressionsmustern in verschiedene Gruppen eingeteilt. Eines der beiden DES-Homologe (NP_493549) hat ein ähnliches Expressionsmuster wie die meisten Gene des Lipidstoffwechsels. Das andere DES-Homolog (NP_501256) gehört dagegen zu einer Gruppe von Genen, die besonders stark in der Keimbahn exprimiert werden.

Das Expressionsmuster des *M. musculus des1*-Gens im Hodengewebe der Maus ähnelt dem des *des-1*-Transskripts in *D. melanogaster* [29]. Dieses Ergebnis sowie die in *C. elegans* legen die Vermutung nahe, dass neben *D. melanogaster* auch in anderen Organismen DES-Homologe an der Regulation der Keimzellbildung beteiligt sein könnten. Entsprechende Untersuchungen wären auch in Pflanzen interessant, da hier anders als in Tieren Meiose und Keimzellbildung durch ein haploides Stadium getrennt sind. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die Aktivität eines DES-Homologs in der diploiden Generation, dem Sporophyten, oder in der haploiden Generation, dem Gametophyten, erforderlich ist. Nur einige Algen wie die Diatomeen und die Braunalge *Fucus* sind reine Diplonten, bei denen wie bei den Tieren die Meiose direkt zur Gametenbildung führt.

Die menschliche Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase DES1 wurde zuvor bereits in einem völlig anderen Zusammenhang untersucht. Das DES1-Protein (MLD) interagiert in einem *Yeast two-hybrid screen* physikalisch mit dem *Epidermal growth factor*- (EGF) Rezeptor [12]. In der gleichen Studie wurde DES1 (MLD) in 293 EBNA-Zellen überexprimiert. Diese Überexpression verminderte die Expression des EGF-Rezeptors durch einen post-transkriptionellen Mechanismus. Der EGF-Rezeptor ist eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die bei Bindung des EGF dimerisiert und in den aktiven Zustand übergeht [92]. Der *Epidermal growth factor* (EGF) gehört wie auch der *Transforming growth factor- β* (TGF- β), der *Platelet-derived growth factor* (PDGF) und der *Vasculur endothelial growth factor* (VEGF) zu einer Gruppe von kleinen Polypeptiden, die bei Säugetieren die Zellteilung in unterschiedlichen Gewebetypen regulieren, aber auch bei der Entstehung von Krebs eine wichtige Rolle spielen [7].

Es gibt Hinweise, dass der $\Delta 4$ -desaturierte Sphingolipid-*Messenger* Sphingosin-1-phosphat bzw. seine G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an der Signalübermittlung des EGF-Rezeptors [53], des PDGF-Rezeptors [1, 39, 87] und des VEGF-Rezeptors [108] beteiligt sind. Die Ergebnisse hierzu sind jedoch nicht eindeutig [57]. Sphingosin-1-phosphat bindet an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der EDG-Familie [56]. Von den acht bekannten Mitgliedern der EDG-Familie sind fünf spezifisch für Sphingosin-1-phosphat (S1P₁/EDG1, S1P₂/EDG5, S1P₃/EDG3, S1P₄/EDG6 und S1P₅/EDG8), während die anderen drei spezifisch für Lyso-phosphatidsäure sind (LPA₁/EDG2, LPA₂/EDG4 und LPA₃/EDG7) [56].

Es ist interessant, inwieweit die $\Delta 4$ -Doppelbindung von Sphingosin-1-phosphat für die Bindung an seine Rezeptoren nötig ist. Die Affinität für Sphinganin-1-phosphat (ohne $\Delta 4$ -Doppelbindung) ist 20fach niedriger als die Affinität für Sphingosin-1-phosphat (mit $\Delta 4$ -Doppelbindung) bei der Bindung an S1P₂/EDG5, aber nur 3fach niedriger bei S1P₁/EDG1, S1P₃/EDG3 und S1P₄/EDG6 [107]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Phytosphinganin-1-phosphat (mit C4-Hydroxygruppe) mit sehr hoher Affinität an S1P₄/EDG6 bindet [13]. Eine mögliche Struktur des Sphingosin-1-phosphat-Rezeptors S1P₄/EDG6 ist *in silico* vorhergesagt worden [117]. In dieser Studie sind Ami-

nosäurepositionen identifiziert worden, die für die Spezifität von S1P₄/EDG6 für Sphingosin-1-phosphat wichtig sein könnten. Eine unterschiedliche Affinität der einzelnen Rezeptoren für Sphingosin-1-phosphat, Sphinganin-1-phosphat und Phytosphinganin-1-phosphat ist für die Untersuchung einer möglichen physiologischen Funktion der Sphingolipid- Δ 4-Desaturase und besonders der bifunktionalen Sphingolipid- Δ 4-Desaturase/C4-Hydroxylase DES2 aus *M. musculus* wichtig.

4.5 Biosynthese und Signalübermittlung: Perspektiven

Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden die Grundlage für eine Reihe weiterer Untersuchungen über die Biosynthese der Sphingolipide und ihre Beteiligung an der Signalübermittlung. An erster Stelle steht hierbei die Aufklärung der biochemischen Funktion des DES-Homologs aus *L. esculentum*, das bei der Expression in *S. cerevisiae* keine Aktivität zeigte. Das DES-Homolog aus *A. thaliana* zeigte bei der Expression in *S. cerevisiae* ebenfalls keine Aktivität (J. NAPIER, persönliche Mitteilung). Es wäre denkbar, dass die pflanzlichen DES-Homologe Anforderungen an Substrat oder Kofaktoren stellen, die in *S. cerevisiae* nicht erfüllt werden. Gleiches könnte auch die Ursache für die schwache Aktivität von DES1 und DES2 aus *H. sapiens* und *M. musculus* sein. Hier würde sich der Einsatz eines besser an die Erfordernisse dieser Enzyme angepassten Expressionssystems anbieten.

Weitere offene Fragen betreffen das Zusammenspiel der verschiedenen Sphingolipid-modifizierenden Enzyme aus Pflanzen. Pflanzen verfügen über zwei Sphingolipid-C4-Hydroxylasen [101], zwei Sphingolipid- Δ 8-Desaturasen ([103] und P. SPERLING, unveröffentlicht) und ein DES-Homolog. In welcher Reihenfolge führen diese Enzyme ihre Sphingolipid-Modifikationen durch? Die Δ 8-Desaturasen aus *A. thaliana* bevorzugen beide bei der Expression in *S. cerevisiae* Phytosphinganin gegenüber Sphinganin als Substrat ([103] und P. SPERLING, unveröffentlicht). Welche Unterschiede gibt es zwischen den Isoenzymen? Werden die Isoenzyme in verschiedenen Geweben oder Entwicklungsstufen exprimiert?

Eine wichtige Frage ist auch die Substratspezifität der Sphingolipid-

modifizierenden Enzyme. In Säugetieren konnte gezeigt werden, dass die $\Delta 4$ -Desaturierung auf Ceramid-Ebene stattfindet [74]. Die C4-Hydroxylierung in *S. cerevisiae* scheint dagegen auf der Ebene der freien Sphingobasen zu erfolgen [22, 46, 122]. Eine weitere denkbare Variante wäre eine Spezifität für Cerebroside oder Glykosylinositolphosphorylceramide. Eine systematische Analyse der verschiedenen Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturasen, - $\Delta 8$ -Desaturasen und -C4-Hydroxylasen aus Pflanzen, Pilzen und Tieren wäre hier hilfreich.

Ein sehr interessantes Gebiet ist die Signalübermittlung durch Sphingolipide. Sphingolipide sind an grundlegenden Funktionen wie der Kontrolle der Zellteilung, der Zellerkennung und der Stressantwort beteiligt. Daneben spielen sie eine strukturelle Rolle bei der Bildung von Membranmikrodomänen, in denen sich eine große Zahl von Proteinen selektiv auf engem Raum zusammenlagern. Viele dieser Proteine sind an der Signalübermittlung beteiligt, sodass die Mikrodomänen mit „Relaisstationen“ verglichen werden können. Interessanterweise sind viele der zellulären Funktionen der Sphingolipide wie die Kontrolle der Zellteilung wichtig für die Organisation vielzelliger eukaryoter Organismen. Hieraus könnten sich auch medizinische Anwendungen ergeben, zum Beispiel bei der Kontrolle des Wachstums von Krebszellen.

Bei der Signalübermittlung durch Sphingolipide hat sich durch die Entdeckung ein neuer Ansatzpunkt aufgetan, dass das DES-1-Protein in *D. melanogaster* eine Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase-Aktivität hat. Das DES-1-Protein ist bei der Spermatogenese in *D. melanogaster* für den Eintritt des Zellzyklus in die Meiose notwendig [28]. Hier wäre es wichtig zu untersuchen, inwieweit sich die Funktion des DES-1-Proteins von denen der $\Delta 4$ -desaturierten Sphingolipide trennen lässt. Es ist bereits seit längerem bekannt, dass Sphingolipid-Signalmoleküle an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind [70, 84]. Jedoch handelt es sich dabei um die Kontrolle des G₁/S-Übergangs bei der Mitose, während das DES-1-Protein den G₂/M-Übergang bei der Spermatogenese in *D. melanogaster* kontrolliert.

Es wäre sehr interessant zu untersuchen, ob die Funktion des DES-1-Proteins bei der Kontrolle des G₂/M-Übergangs in anderen Organismen konserviert ist. Dies gilt vor allem für Pflanzen und Säugetiere. Hier bieten sich eine Untersu-

chung des Expressionsmusters in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstufen sowie *Knockout*-Experimente an. Eine weitere Alternative ist die Auswertung von *Microarray*-Daten, die unter verschiedenen Bedingungen aufgenommen wurden.

Bei Pflanzen ist vor kurzem eine Beteiligung von Sphingosin-1-phosphat an der Schließung der Spaltöffnungen bei Wassermangel gefunden worden [79]. Die Schließung der Spaltöffnungen ist ein komplexer Prozess, der durch das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) vermittelt wird. An der Signalübermittlung durch ABA sind außerdem die α -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine (*A. thaliana* besitzt nur eine α -Untereinheit) [119], die Phospholipase $D\alpha$ [91], cytosolisches Kalzium [79] und durch die Nitrat-Reduktase produziertes Stickstoffmonoxyd (NO) beteiligt [20]. Die Beteiligung der Phospholipase $D\alpha$ zeigt, dass bei der Schließung der Spaltöffnungen sowohl von Glycero- als auch von Sphingolipiden abgeleitete Signalmoleküle beteiligt sind. Noch nicht identifiziert ist der pflanzliche Sphingosin-1-phosphat-Rezeptor. Pflanzen besitzen keine Rezeptoren der EDG-Familie, die in Säugetieren Sphingosin-1-phosphat wahrnehmen.

Das Phytohormon Abscisinsäure vermittelt nicht nur die Schließung von Spaltöffnungen, sondern ist auch für die Einleitung von Ruhezuständen, z.B. bei der Samenreife, verantwortlich. ABA induziert die Expression des Proteins ICK1 [118]. ICK1 interagiert mit der zyklinabhängigen Kinase Cdc2a und dem Zyklin CycD3 und greift damit direkt in die Regulation des Zellzyklus ein [118]. Es wäre interessant, ob Sphingolipide auch an dem Signalübermittlungsweg beteiligt sind, der zur Induktion von ICK1 führt. Eine sehr gute Übersicht über den pflanzlichen Zellzyklus findet sich in [76].

Des Weiteren spielen Sphingolipide eine Rolle bei der Erkennung phytopathogener Pilze durch Pflanzen. Pilzliche Cerebroside wirken als Elizitoren und führen zur Einleitung pflanzlicher Abwehrreaktionen wie der hypersensitiven Reaktion und der Bildung von Phytoalexinen [58, 115, 116]. Ein entscheidendes Merkmal, das der Pflanze die Erkennung „fremder“ Sphingolipide ermöglicht, ist eine C9-Methylverzweigung. Diese ist für die Cerebroside vieler Pilze typisch, kommt aber bei Pflanzen und Tieren nicht vor. Cerebroside humanpathogener Pilze bewirken auch bei Säugetieren die Einleitung einer Immunabwehr [83, 86].

Pflanzen bilden eine Klasse von Peptiden mit fungizider Wirkung, die Defensine. Die Defensine integrieren in die Plasmamembran phytopathogener Pilze und machen sie für kleine Moleküle durchlässig [9]. Es gibt Hinweise, dass bei der Integration der Defensine in die Plasmamembran Sphingolipide beteiligt sind [109, 110].

Sphingolipide sind auch an der Steuerung des Entwicklungszyklus von Pilzen beteiligt. Der Übergang von der Hefe- in die Mycelform einiger Pilze wird durch die Bildung von Cerebrosiden mit einer Δ^3 -Doppelbindung in der langkettigen Fettsäure eingeleitet [112, 113].

Die Identifizierung der Sphingolipid-C9-Methyltransferase und der Fettsäure- Δ^3 -Desaturase wären eine wichtige Voraussetzung für die weitere Untersuchung der Rolle von Sphingolipiden bei den Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und phytopathogenen Pilzen und bei der Steuerung des Entwicklungszyklus der Pilze. Für die Identifizierung dieser beiden Enzyme bietet sich die in dieser Arbeit entwickelte Bioinformatik-Strategie an.

Im Anschluss an diese Dissertation möchte ich mich mit der Identifizierung der Sphingolipid-C9-Methyltransferase und der Fettsäure- Δ^3 -Desaturase beschäftigen.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde in einer computergestützten Strategie eine neue Familie von Proteinsequenzen identifiziert, die anschließend durch heterologe Expression im *Saccharomyces cerevisiae* biochemisch als Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen charakterisiert wurden.

Die computergestützte Strategie zur Identifizierung der neuen Proteinfamilie bestand aus drei Stufen. Die erste Stufe war die Erstellung einer möglichst umfassenden Sammlung membrangebundener Desaturasen und Hydroxylasen mit Hilfe des Datenbank-Suchprogramms PSI-Blast. Die zweite Stufe war die Einteilung der mit PSI-Blast erstellten Sammlung an Sequenzen in Familien. Diese Einteilung wurde zunächst manuell anhand von phylogenetischen Stammbäumen vorgenommen. Später wurde zusätzlich eine automatische Einteilung mit Hilfe des Programmes TRIBE-MCL durchgeführt, die zu sehr guten Ergebnissen führte. In der dritten Stufe wurde eine Familie von Proteinsequenzen identifiziert, die als putative Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen angesehen werden konnten.

Die heterologe Expression im *S. cerevisiae*-Stamm TDY2037-*sur2* Δ zeigte, dass es sich tatsächlich um eine Familie von Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen handelte. Eine Sphingolipid- Δ 4-Desaturase-Aktivität konnte für die Familienmitglieder aus dem Menschen (*Homo sapiens*), der Maus (*Mus musculus*), der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) und der Hefe *Candida albicans* nachgewiesen werden. Einzig die Sequenz aus der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) zeigte keine Aktivität. Eines der beiden untersuchten Enzyme aus *M. musculus* zeigte zusätzlich eine Sphingolipid-C4-Hydroxylase-Aktivität. Es handelt sich bei diesem Enzym also um eine bifunktionale Sphingolipid- Δ 4-Desaturase/C4-Hydroxylase.

Drei der in dieser Arbeit als Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen charakterisierten Proteine waren bereits zuvor mit molekularbiologischen Methoden untersucht worden, ohne dass ihre biochemische Aktivität bekannt war. Dies waren *H. sa-*

piens DES1 (MLD), *M. musculus* Des1 (Mdes) und *D. melanogaster* DES-1. Die Aktivität von DES-1 ist für einen normalen Ablauf der Spermatogenese in *D. melanogaster* nötig. In der *des*-Mutante ist das Fortschreiten des Zellzyklus und die Differenzierung der Spermatiden am Beginn der ersten meiotischen Teilung blockiert (K. ENDO, T. AKIYAMA, S. KOBAYASHI und M. OKADA (1996) *Mol. Gen. Genet.* 253, 157–165). Die Charakterisierung des DES-1-Proteins als Sphingolipid- Δ^4 -Desaturase zeigt, dass es eine bisher unbekannte Verknüpfung zwischen Δ^4 -ungesättigten Sphingolipiden oder den Enzymen ihrer Biosynthese und der Steuerung der Spermatogenese gibt.

Danksagung

Ich möchte allen danken, die mich während der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben. Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. Ernst Heinz und Frau Dr. Petra Sperling für die interessante Themenstellung und die intensive Betreuung, die einen wertvollen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat. Bei Herrn Prof. Dr. Ivo Feussner (Universität Göttingen) bedanke ich mich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Des Weiteren danke ich meinen Kooperationspartnern für die sorgfältige Arbeit und viele Mühe. Herrn Dr. Stephan Franke (Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg) danke ich für die Durchführung der HPLC/MS- und ESI/MS/MS-Analyse und die Interpretation der Daten und Herrn Prof. Dr. Ulrich Zähringer (Forschungszentrum Borstel) für die Aufnahme und Interpretation der NMR-Spektren. Herrn Dr. Christoph Beckmann und Herrn Prof. Dr. Wilhelm Boland (MPI für Chemische Ökologie, Jena) danke ich für die Synthese der (*E*)-Hexadeca-6-ensäure. Frau Dr. Martina Leipelt danke ich für die menschliche Glukosylceramid-Synthase und die genomische DNA von *Candida albicans*. Frau Prof. Dr. Teresa Dunn (Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, Maryland, U.S.A.) danke ich für den Hefestamm TDY2037-*sur2*Δ.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Dirk Warnecke für viele wertvolle Ratschläge und Diskussionen sowie allen übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ernst Heinz für die gute und kameradschaftliche Zusammenarbeit. Nicht zuletzt gilt mein Dank Herrn Nils Kruse für seine Arbeit als studentische Hilfskraft und Herrn Daniel Novak und Herrn Philipp Lange für die im Praktikum erzielten guten Ergebnisse.

Literaturverzeichnis

- [1] ALDERTON F., S. RAKHIT, K. C. KONG, T. PALMER, B. SAMBI, S. PYNE und N. J. PYNE: Tethering of the platelet-derived growth factor β receptor to G-protein-coupled receptors. A novel platform for integrative signaling by these receptor classes in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 28578–28585 (2001)
- [2] ALTSCHUL S. F., T. L. MADDEN, A. A. SCHÄFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER und D. J. LIPMAN: Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3389–3402 (1997)
- [3] APWEILER R., T. K. ATTWOOD, A. BAIROCH, A. BATEMAN, E. BIRNEY, M. BISWAS, P. BUCHER, L. CERUTTI, F. CORPET, M. D. R. CRONING, R. DURBIN, L. FALQUET, W. FLEISCHMANN, J. GOUZY, H. HERMJAKOB, N. HULO, I. JONASSEN, D. KAHN, A. KANAPIN, Y. KARAVIDOPOULOU, R. LOPEZ, B. MARX, N. J. MULDER, T. M. OINN, M. PAGNI, F. SERVANT, C. J. A. SIGRIST und E. M. ZDOBNOV: InterPro—an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Bioinformatics* **16**, 1145–1150 (2000)
- [4] BECKER D. und V. LUNDBLAD: *Saccharomyces cerevisiae*. In: ASUBEL F., R. BRENT, R. KINGSTON, D. MOORE, J. SEIDMAN, J. SMITH, K. STRUHL, L. ALBRIGHT, D. COEN und A. VARKI (Herausgeber): *Current protocols in molecular biology*, Kapitel 13. John Wiley & Sons, New York (1993)

- [5] BIELAWSKA A., H. M. CRANE, D. LIOTTA, L. M. OBEID und Y. A. HANNUN: Selectivity of ceramide-mediated biology. Lack of activity of *erythro*-dihydroceramide. *J. Biol. Chem.* **268**, 26226–26232 (1993)
- [6] BONNEAU R., C. E. M. STRAUSS, C. A. ROHL, D. CHIVIAN, P. BRADLEY, L. MALMSTRÖM, T. ROBERTSON und D. BAKER: *De novo* prediction of three-dimensional structures for major protein families. *J. Mol. Biol.* **322**, 65–78 (2002)
- [7] BRAUN S., U. AUF DEM KELLER, H.-D. BEER, M. KRAMPERT, M. MÜLLER, S. WERNER, C. DICKSON und S. WERNER: Growth factors in development, repair and disease. *Eur. J. Cell Biol.* **81**, 375–382 (2002)
- [8] BROADWATER J. A., E. WHITTLE und J. SHANKLIN: Desaturation and hydroxylation: Residues 148 and 324 of *Arabidopsis* FAD2, in addition to substrate chain length, exert a major influence in partitioning of chemoselectivity. *J. Biol. Chem.* **277**, 15613–15620 (2002)
- [9] BROEKAERT W. F., F. R. G. TERRAS, B. P. A. CAMMUE und R. W. OSBORN: Plant defensins: Novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* **108**, 1353–1358 (1995)
- [10] BROUN P., S. BODDUPALLI und C. SOMERVILLE: A bifunctional oleate 12-hydroxylase:desaturase from *Lesquerella fendleri*. *Plant J.* **13**, 201–210 (1998)
- [11] BROUN P., J. SHANKLIN, E. WHITTLE und C. SOMERVILLE: Catalytic plasticity of fatty acid modification enzymes underlying chemical diversity of plant lipids. *Science* **282**, 1315–1317 (1998)
- [12] CADENA D. L., R. C. KURTEN und G. N. GILL: The product of the MLD gene is a member of the membrane fatty acid desaturase family: overexpression of MLD inhibits EGF receptor biosynthesis. *Biochemistry* **36**, 6960–6967 (1997)

- [13] CANDELORE M. R., M. J. WRIGHT, L. M. TOTA, J. MILLIGAN, G.-J. SHEI, J. D. BERGSTROM und S. M. MANDALA: Phytosphingosine 1-phosphate: a high affinity ligand for the S1P₄/Edg-6 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 600–606 (2002)
- [14] CAUSERET C., L. GEERAERT, G. VAN DER HOEVEN, G. P. MANNAERTS und P. P. VAN VELDHoven: Further characterization of rat dihydroceramide desaturase: tissue distribution, subcellular localization, and substrate specificity. *Lipids* **35**, 1117–1125 (2000)
- [15] CHESTER M. A.: IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) – Nomenclature of glycolipids. Recommendations 1997. *Eur. J. Biochem.* **257**, 293–298 (1998)
- [16] CHUNG N., C. MAO, J. HEITMAN, Y. A. HANNUN und L. M. OBEID: Phytosphingosine as a specific inhibitor of growth and nutrient import in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**, 35614–35621 (2001)
- [17] CROSSMAN M. W. und C. B. HIRSCHBERG: Biosynthesis of phytosphingosine by the rat. *J. Biol. Chem.* **252**, 5815–5819 (1977)
- [18] CROSSMAN M. W. und C. B. HIRSCHBERG: Biosynthesis of 4D-hydroxysphinganine by the rat. En bloc incorporation of the sphinganine carbon backbone. *Biochim. Biophys. Acta* **795**, 411–416 (1984)
- [19] DAUM G., N. D. LEES, M. BARD und R. DICKSON: Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1471–1510 (1998)
- [20] DESIKAN R., R. GRIFFITHS, J. HANCOCK und S. NEILL: A new role for an old enzyme: Nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 16314–16318 (2002)

- [21] DIAZ A. R., M. C. MANSILLA, A. J. VILA und D. DE MENDOZA: Membrane topology of the acyl-lipid desaturase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **277**, 48099–48106 (2002)
- [22] DICKSON R. C., E. E. NAGIEC, M. SKRZYPEK, P. TILLMAN, G. B. WELLS und R. L. LESTER: Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*. *J. Biol. Chem.* **272**, 30196–30200 (1997)
- [23] DOHMEN R. J., A. W. M. STRASSER, C. B. HÖNER und C. P. HOLLENBERG: An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**, 691–692 (1991)
- [24] DUNN T. M., D. HAAK, E. MONAGHAN und T. J. BEELER: Synthesis of monohydroxylated inositolphosphorylceramide (IPC-C) in *Saccharomyces cerevisiae* requires Scs7p, a protein with both a cytochrome b₅-like domain and a hydroxylase/desaturase domain. *Yeast* **14**, 311–321 (1998)
- [25] DYER J. M. und R. T. MULLEN: Immunocytological localization of two plant fatty acid desaturases in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **494**, 44–47 (2001)
- [26] ECKMANN J.-P. und E. MOSES: Curvature of co-links uncovers hidden thematic layers in the World Wide Web. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99**, 5825–5829 (2002)
- [27] EDIDIN M.: The state of lipid rafts: From model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 257–283 (2003)
- [28] ENDO K., T. AKIYAMA, S. KOBAYASHI und M. OKADA: *degenerative spermatocyte*, a novel gene encoding a transmembrane protein required for the initiation of meiosis in *Drosophila* spermatogenesis. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 157–165 (1996)

- [29] ENDO K., Y. MATSUDA und S. KOBAYASHI: *Mdes*, a mouse homolog of the *Drosophila degenerative spermatocyte* gene is expressed during mouse spermatogenesis. *Develop. Growth Differ.* **39**, 399–403 (1997)
- [30] ENRIGHT A. J., S. V. DONGEN und C. A. OUZOUNIS: An efficient algorithm for large-scale detection of protein families. *Nucl. Acids Res.* **30**, 1575–1584 (2002)
- [31] ENRIGHT A. J. und C. A. OUZOUNIS: BioLayout—an automatic graph layout algorithm for similarity visualization. *Bioinformatics* **17**, 853–854 (2001)
- [32] FUJINO Y. und M. OHNISHI: Sphingolipids in wheat grain. *J. Cereal Sci.* **1**, 159–168 (1983)
- [33] GEERAERT L., G. P. MANNAERTS und P. P. VAN VELDHOVEN: Conversion of dihydroceramide into ceramide: Involvement of a desaturase. *Biochem. J.* **327**, 125–132 (1997)
- [34] GRILLEY M. M., S. D. STOCK, R. C. DICKSON, R. L. LESTER und J. Y. TAKEMOTO: Syringomycin action gene *SYR2* is essential for sphingolipid 4-hydroxylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 11062–11068 (1998)
- [35] GUPTA C. M., R. RADHAKRISHNAN und H. G. KHORANA: Glycerophospholipid synthesis: Improved general method and new analogs containing photoactivable groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 4315–4319 (1977)
- [36] HAAK D., K. GABLE, T. BEELER und T. DUNN: Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p. *J. Biol. Chem.* **272**, 29704–29710 (1997)
- [37] HANNUN Y. A. und C. LUBERTO: Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.* **10**, 73–80 (2000)

- [38] HANNUN Y. A. und L. M. OBEID: The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: Stress encounters of the lipid kind. *J. Biol. Chem.* **277**, 25847–25850 (2002)
- [39] HOBSON J. P., H. M. ROSENFELDT, L. S. BARAK, A. OLIVERA, S. POULTON, M. G. CARON, S. MILSTIEN und S. SPIEGEL: Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* **291**, 1800–1803 (2001)
- [40] HSIEH T. C.-Y., K. KAUL, R. A. LAINE und R. L. LESTER: Structure of a major glycosphingolipid from tobacco leaves, PSL-I: 2-deoxy-2-acetamido-D-glucopyranosyl(α 1 \rightarrow 4)-D-glucuronopyranosyl(α 1 \rightarrow 2)myoinositol-1-*O*-phosphoceramide. *Biochemistry* **17**, 3575–3581 (1978)
- [41] HUELSENBECK J. P. und F. RONQUIST: MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**, 754–755 (2001)
- [42] IMAI H., M. OHNISHI, K. HOTSUBO, M. KOJIMA und S. ITO: Sphingoid base composition of cerebrosides from plant leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 351–353 (1997)
- [43] INOUE H., H. NOJIMA und H. OKAYAMA: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23–28 (1990)
- [44] ITO S., M. KOJIMA und Y. FUJINO: Occurrence of phytoglycolipid in rice bran. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1873–1875 (1985)
- [45] JENKINS G. M. und Y. A. HANNUN: Role for *de novo* sphingoid base biosynthesis in the heat-induced transient cell cycle arrest of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**, 8574–8581 (2001)
- [46] JENKINS G. M., A. RICHARDS, T. WAHL, C. MAO, L. OBEID und Y. HANNUN: Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272**, 32566–32572 (1997)

- [47] KAMATH R. S., A. G. FRASER, Y. DONG, G. POULIN, R. DURBIN, M. GOTTA, A. KANAPIN, N. LE BOT, S. MORENO, M. SOHRMANN, D. P. WELCHMAN, P. ZIPPERLEN und J. AHRINGER: Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**, 231–237 (2003)
- [48] KARLSSON K.-A.: On the chemistry and occurrence of sphingolipid long-chain bases. *Chem. Phys. Lipids* **5**, 6–43 (1970)
- [49] KAUL K. und R. L. LESTER: Characterization of inositol-containing phospholipids from tobacco leaves. *Plant Physiol.* **55**, 120–129 (1975)
- [50] KAWAGUCHI M., H. IMAI, M. NAOE und Y. YASUI: Cerebrosides in grapevine leaves: Distinct composition of sphingoid bases among the grapevine species having different tolerances to freezing temperature. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1271–1273 (2000)
- [51] KAWAI G.: Molecular species of cerebrosides in fruiting bodies of *Lentinus edodes* and their biological activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1001**, 185–190 (1989)
- [52] KAWAI Y., Y. KONDU, M. OHNISHI und S. ITO: Separation and chemical composition of high-molecular phytylglycolipids from etiolated soybean seedlings. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* **43**, 229–236 (1994)
- [53] KIM J. H., J. H. KIM, W. K. SONG, J. H. KIM und J. S. CHUN: Sphingosine 1-phosphate activates Erk-1/-2 by transactivating epidermal growth factor receptor in rat-2 cells. *IUBMB Life* **50**, 119–124 (2000)
- [54] KIM S. K., J. LUND, M. KIRALY, K. DUKE, M. JIANG, J. M. STUART, A. EIZINGER, B. N. WYLIE und G. S. DAVIDSON: A gene expression map for *Caenorhabditis elegans*. *Science* **293**, 2087–2092 (2001)
- [55] KISIC A., M. TSUDA, R. J. KULMACZ, W. K. WILSON und G. J. SCHROEPFER, JR.: Sphingolipid bases. a revisitation of the *O*-methyl derivati-

- ves of sphingosine. isolation and characterization of diacetate derivatives, with revised ^{13}C nuclear magnetic resonance assignments for D-erythro-sphingosine. *J. Lipid Res.* **36**, 787–803 (1995)
- [56] KLUK M. J. und T. HLA: Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1582**, 72–80 (2002)
- [57] KLUK M. J., C. COLMONT, M. T. WU und T. HLA: Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced chemotaxis does not require the G protein-coupled receptor S1P₁ in murine embryonic fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **533**, 25–28 (2003)
- [58] KOGA J., T. YAMAUCHI, M. SHIMURA, N. OGAWA, K. OSHIMA, K. UMEMURA, M. KIKUCHI und N. OGASAWARA: Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *J. Biol. Chem.* **273**, 31985–31991 (1998)
- [59] KOK J. W., M. NIKOLOVA-KARAKASHIAN, K. KLAPPE, C. ALEXANDER und A. H. MERRILL, JR.: Dihydroceramide biology. *J. Biol. Chem.* **272**, 21128–21136 (1997)
- [60] KOLTER T. und K. SANDHOFF: Sphingolipids. Their metabolic pathways and the pathobiochemistry of neurodegenerative diseases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 1532–1568 (1999)
- [61] KROGH A., B. LARSSON, G. VON HEIJNE und E. L. L. SONNHAMMER: Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**, 567–580 (2001)
- [62] LEIPELT M., D. WARNECKE, U. ZÄHRINGER, C. OTT, F. MÜLLER, B. HUBE und E. HEINZ: Glucosylceramide synthase, a gene family responsible for the biosynthesis of glucosphingolipids in animals, plants, and fungi. *J. Biol. Chem.* **276**, 33621–33629 (2001)

- [63] LEISTER D.: Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet.* **19**, 47–56 (2003)
- [64] LESTER R. L. und R. C. DICKSON: Sphingolipids with inositolphosphate-containing head groups. *Adv. Lipid Res.* **26**, 253–274 (1993)
- [65] LINDQVIST Y., W. HUANG, G. SCHNEIDER und J. SHANKLIN: Crystal structure of Δ^9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. *EMBO J.* **15**, 4081–4092 (1996)
- [66] LIN T.-Y., S. VISWANATHAN, C. WOOD, P. G. WILSON, N. WOLF und M. T. FULLER: Coordinate developmental control of the meiotic cell cycle and spermatid differentiation in *Drosophila* males. *Development* **122**, 1331–1341 (1996)
- [67] LI X. und M. CAI: Recovery of the yeast cell cycle from heat shock-induced G₁ arrest involves a positive regulation of G₁ cyclin expression by the S phase cyclin Clb5. *J. Biol. Chem.* **274**, 24220–24231 (1999)
- [68] VAN DE LOO F. J., P. BROUN, S. TURNER und C. SOMERVILLE: An oleate 12-hydroxylase from *Ricinus communis* L. is a fatty acyl desaturase homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 6743–6747 (1995)
- [69] LYNCH D. V.: Sphingolipids. In: MOORE, JR. T. S. (Herausgeber): *Lipid Metabolism in Plants*, Kapitel 9. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo (1993)
- [70] MATHIAS S., L. A. PEÑA und R. N. KOLESNICK: Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem. J.* **335**, 465–480 (1998)
- [71] MCLACHLAN A. und M. G. RIGGS: A simplified screening procedure for large numbers of plasmid minipreparations. *Biotechniques* **4**, 310–313 (1986)

- [72] MICHAELSON L. V., A. J. LONGMAN, O. SAYANOVA, A. K. STOBART und J. A. NAPIER: Isolation and characterization of a cDNA encoding a Δ^8 sphingolipid desaturase from *Aquilegia vulgaris*. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 1073–1075 (2001)
- [73] MICHEL C. und G. VAN ECHTEN-DECKERT: Conversion of dihydroceramide to ceramide occurs at the cytosolic face of the endoplasmatic reticulum. *FEBS Lett.* **416**, 153–155 (1997)
- [74] MICHEL C., G. VAN ECHTEN-DECKERT, J. ROTHER, K. SANDHOFF, E. WANG und A. H. MERRILL, JR.: Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-*trans*-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *J. Biol. Chem.* **272**, 22432–22437 (1997)
- [75] MIKAMI T., M. KASHIWAGI, K. TSUCHIHASHI, T. AKINO und S. GASA: Substrate specificity and some other enzymatic properties of dihydroceramide desaturase (ceramide synthase) in fetal rat skin. *J. Biochem.* **123**, 906–911 (1998)
- [76] MIRONOV V., L. DE VEYLDER, M. VAN MONTAGU und D. INZÉ: Cyclin-dependent kinases and cell division in plants—the nexus. *Plant Cell* **11**, 509–521 (1999)
- [77] MITCHELL A. G. und C. E. MARTIN: Fah1p, a *Saccharomyces cerevisiae* Cytochrome b_5 Fusion Protein, and Its *Arabidopsis thaliana* Homolog That Lacks the Cytochrome b_5 Domain Both Function in the α -Hydroxylation of Sphingolipid-associated Very Long Chain Fatty Acids. *J. Biol. Chem.* **272**, 28281–28288 (1997)
- [78] MORRISON W. R. und J. D. HAY: Polar lipids in bovine milk. II. Long-chain bases, normal and 2-hydroxy fatty acids, and isomeric *cis* and *trans* monoenoic fatty acids in the sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta* **202**, 460–467 (1970)

- [79] NG C. K.-Y., K. CARR, M. R. MCAINSH, B. POWELL und A. M. HETHERINGTON: Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* **410**, 596–599 (2001)
- [80] NOTREDAME C., D. G. HIGGINS und J. HERINGA: T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* **302**, 205–217 (2000)
- [81] OKULEY J., J. LIGHTNER, K. FELDMANN, N. YADAV, E. LARK und J. BROWSE: *Arabidopsis FAD2* gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell* **6**, 147–158 (1994)
- [82] PIKE L. J.: Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* **44**, 655–667 (2003)
- [83] PINTO M. R., M. L. RODRIGUES, L. R. TRAVASSOS, R. M. T. HAIDO, R. WAIT und E. BARRETO-BERGTER: Characterization of glucosylceramides in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation. *Glycobiology* **12**, 251–260 (2002)
- [84] PYNE S. und N. J. PYNE: Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem. J.* **349**, 385–402 (2000)
- [85] QI J., M. OJIKI und Y. SAKAGAMI: Termitomycephins A–D, novel neurotogenic cerebrosides from the edible chinese mushroom *Termitomyces albuinosus*. *Tetrahedron* **56**, 5835–5841 (2000)
- [86] RODRIGUES M. L., L. R. TRAVASSOS, K. R. MIRANDA, A. J. FRANZEN, S. ROZENTAL, W. DE SOUZA, C. S. ALVIANO und E. BARRETO-BERGTER: Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibit cell budding and fungal growth. *Infect. Immun.* **68**, 7049–7060 (2000)
- [87] ROSENFELDT H. M., J. P. HOBSON, M. MACEYKA, A. OLIVERA, V. E. NAVA, S. MILSTIEN und S. SPIEGEL: EDG-1 links the PDGF receptor to

- Src and focal adhesion kinase activation leading to lamellipodia formation and cell migration. *FASEB J.* **15**, 2649–2659 (2001)
- [88] ROWLEY A., G. C. JOHNSTON, B. BUTLER, M. WERNER-WASHBURNE und R. A. SINGER: Heat shock-mediated cell cycle blockage and G₁ cyclin expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1034–1041 (1993)
- [89] SAKAKI T., U. ZÄHRINGER, D. C. WARNECKE, A. FAHL, W. KNOGGE und E. HEINZ: Sterol glycosides and cerebrosides accumulate in *Pichia pastoris*, *Rhynchosporium secalis*, and other fungi under normal conditions or under heat shock and ethanol stress. *Yeast* **18**, 679–695 (2001)
- [90] SAMBROOK J., E. F. FRITSCH und T. MANIATIS: *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, zweite Auflage (1989)
- [91] SANG Y., S. ZHENG, W. LI, B. HUANG und X. WANG: Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase D α . *Plant J.* **28**, 135–144 (2001)
- [92] SCHLESSINGER J.: Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* **110**, 669–672 (2002)
- [93] SCHMIDT H. A., K. STRIMMER, M. VINGRON und A. VON HAESELER: TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* **18**, 502–504 (2002)
- [94] SHANKLIN J. und E. B. CAHOON: Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 611–641 (1998)
- [95] SHANKLIN J., E. WHITTLE und B. G. FOX: Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* **33**, 12787–12794 (1994)

- [96] SPERLING P., J. M. LUCHT, T. EGENER, R. RESKI, P. CIRPUS und E. HEINZ: Identification of a Δ^5 -fatty acid desaturase from *Physcomitrella patens*. In: MURATA N., M. YAMADA, I. NISHIDA, H. OKUYAMA, J. SEKIYA und H. WADA (Herausgeber): *Advanced Research on Plant Lipids*, Kapitel 4, Seiten 113–116. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (2003)
- [97] SPERLING P., A. BLUME, U. ZÄHRINGER und E. HEINZ: Further characterization of Δ^8 -sphingolipid desaturases from higher plants. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 638–641 (2000)
- [98] SPERLING P. und E. HEINZ: Desaturases fused to their electron donor. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **103**, 158–180 (2001)
- [99] SPERLING P., B. LIBISCH, U. ZÄHRINGER, J. A. NAPIER und E. HEINZ: Functional identification of a Δ^8 -sphingolipid desaturase from *Borago officinalis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **388**, 293–298 (2001)
- [100] SPERLING P., H. SCHMIDT und E. HEINZ: A cytochrome- b_5 -containing fusion protein similar to plant acyl lipid desaturases. *Eur. J. Biochem.* **232**, 798–805 (1995)
- [101] SPERLING P., P. TERNES, H. MOLL, S. FRANKE, U. ZÄHRINGER und E. HEINZ: Functional characterization of sphingolipid C4-hydroxylase genes from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **494**, 90–94 (2001)
- [102] SPERLING P., P. TERNES, T. K. ZANK und E. HEINZ: The evolution of desaturases. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **68**, 73–95 (2003)
- [103] SPERLING P., U. ZÄHRINGER und E. HEINZ: A sphingolipid desaturase from higher plants. Identification of a new cytochrome b_5 fusion protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 28590–28596 (1998)
- [104] SPIEGEL S. und S. MILSTIEN: Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J. Biol. Chem.* **277**, 25851–25854 (2002)

- [105] SPYRIDOPOULOS I., P. MAYER, K. S. SHOOK, D. I. AXEL, R. VIEBAHN und K. R. KARSCH: Loss of cyclin A and G1-cell cycle arrest are a prerequisite of ceramide-induced toxicity in human arterial endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* **50**, 97–107 (2001)
- [106] TAKAKUWA N., M. KINOSHITA, Y. ODA und M. OHNISHI: Isolation and characterization of the genes encoding Δ^8 -sphingolipid desaturase from *Saccharomyces kluyveri* and *Kluyveromyces lactis*. *Curr. Microbiol.* **45**, 459–461 (2002)
- [107] TAMAMA K.-I., J. KON, K. SATO, H. TOMURA, A. KUWABARA, T. KIMURA, T. KANDA, H. OHTA, M. UI, I. KOBAYASHI und F. OKAJIMA: Extracellular mechanism through the Edg family of receptors might be responsible for sphingosine-1-phosphate-induced regulation of DNA synthesis and migration of rat aortic smooth-muscle cells. *Biochem. J.* **353**, 139–146 (2001)
- [108] TANIMOTO T., Z.-G. JIN und B. C. BERK: Transactivation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR is involved in sphingosine 1-phosphate-stimulated phosphorylation of Akt and endothelial nitric-oxide synthase (eNOS). *J. Biol. Chem.* **277**, 42997–43001 (2002)
- [109] THEVISSSEN K., B. P. A. CAMMUNE, K. LEMAIRE, J. WINDERICKX, R. C. DICKSON, R. L. LESTER, K. K. A. FERKET, F. VAN EVEN, A. H. A. PARRET und W. F. BROEKAERT: A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 9531–9536 (2000)
- [110] THEVISSSEN K., R. W. OSBORN, D. P. ACLAND und W. F. BROEKAERT: Specific binding sites for an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 54–61 (2000)

- [111] THOMPSON J. D., T. J. GIBSON, F. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN und D. G. HIGGINS: The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* **24**, 4876–4882 (1997)
- [112] TOLEDO M. S., S. B. LEVERY, A. H. STRAUS und H. K. TAKAHASHI: Dimorphic expression of cerebrosides in the mycopathogen *Sporothrix schenckii*. *J. Lipid Res.* **41**, 797–806 (2000)
- [113] TOLEDO M. S., S. B. LEVERY, E. SUZUKI, A. H. STRAUS und H. K. TAKAHASHI: Characterization of cerebrosides from the thermally dimorphic mycopathogen *Histoplasma capsulatum*: expression of 2-hydroxy fatty *N*-acyl (*E*)- Δ^3 -unsaturation correlates with the yeast-mycelium phase transition. *Glycobiology* **11**, 113–124 (2001)
- [114] TRECO D. A. und V. LUNDBLAD: *Saccharomyces cerevisiae*. In: ASUBEL F. M., R. BRENT, R. E. KINGSTON, D. D. MOORE, J. G. SEIDMAN, J. A. SMITH, K. STRUHL, L. M. ALBRIGHT, D. M. COEN und A. VARKI (Herausgeber): *Current Protocols in Molecular Biology*, Kapitel 13. John Wiley & Sons, New York (1993)
- [115] UMEMURA K., N. OGAWA, J. KOGA, M. IWATA und H. USAMI: Elicitor activity of cerebroside, a sphingolipid elicitor, in cell suspension cultures of rice. *Plant Cell Physiol.* **43**, 778–784 (2002)
- [116] UMEMURA K., N. OGAWA, T. YAMAUCHI, M. IWATA, M. SHIMURA und J. KOGA: Cerebroside elicitors found in diverse phytopathogens activate defense responses in rice plants. *Plant Cell Physiol.* **41**, 676–683 (2000)
- [117] VAIDEHI N., W. B. FLORIANO, R. TRABANINO, S. E. HALL, P. FREDDOLINO, E. J. CHOI, G. ZAMANAKOS und W. A. GODDARD III: Prediction of structure and function of G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 12622–12627 (2002)

- [118] WANG H., Q. QI, P. SCHORR, A. J. CUTLER, W. L. CROSBY und L. C. FOWKE: ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.* **15**, 501–510 (1998)
- [119] WANG X.-Q., H. ULLAH, A. M. JONES und S. M. ASSMANN: G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* **292**, 2070–2072 (2001)
- [120] WARNECKE D. und E. HEINZ: Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cell. Mol. Life Sci.* (2003), im Druck als Manuskript CMLS 2243/M
- [121] WELLS G. B., R. C. DICKSON und R. L. LESTER: Heat-induced elevation of ceramide in *Saccharomyces cerevisiae* via *de Novo* synthesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 7235–7243 (1998)
- [122] WU W.-I., V. M. McDONOUGH, J. T. NICKELS, JR., J. KO, A. S. FISCHL, T. R. VALES, A. H. MERRILL, JR. und G. M. CARMAN: Regulation of lipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by Fumonisin B₁. *J. Biol. Chem.* **270**, 13171–13178 (1995)

Publikationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit habe ich bereits veröffentlicht:

Philipp Ternes, Stephan Franke, Ulrich Zähringer, Petra Sperling und Ernst Heinz: Identification and characterization of a sphingolipid Δ 4-desaturase family. *J. Biol. Chem.* **277**, 25512–25518 (2002)

Petra Sperling, Philipp Ternes, Thorsten K. Zank und Ernst Heinz: The evolution of desaturases. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **68**, 73–95 (2003)

Die Ergebnisse aus meiner Diplomarbeit „Klonierung zweier cDNAs aus *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. und ihre funktionale Charakterisierung als Sphinganin-C-4-Hydroxylasen“ am Institut für Allgemeine Botanik, Universität Hamburg, habe ich ebenfalls veröffentlicht:

Petra Sperling, Philipp Ternes, Hermann Moll, Stephan Franke, Ulrich Zähringer und Ernst Heinz: Functional characterization of sphingolipid C4-hydroxylase genes from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **494**, 90–94 (2001)

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Familienname: Ternes
 Vornamen: Philipp Günther
 Geburtsdatum: 19. Mai 1974
 Geburtsort: Saarbrücken
 Familienstand: verheiratet seit dem 5. Juli 2002

Ausbildung:

1980–1984 Besuch der Grundschule Bickbargen, Halstenbek
 1984–1993 Besuch des Wolfgang-Borchert-Gymnasiums, Halstenbek, mit dem Abschluss Abitur. Leistungsfächer: Mathematik und Physik, weitere Prüfungsfächer: Englisch und Erdkunde
 1993–1994 Zivildienst bei der Lebenshilfe für Behinderte e.V., Schenefeld
 1994 Beginn des Studiums an der Universität Hamburg im Diplomstudiengang Physik
 1995 Wechsel in den Diplomstudiengang Biologie
 1996–1998 Betreuung des Kurses „Einführung in die Pflanzenphysiologie“ als studentische Hilfskraft
 1997–1998 Betreuung des Tutoriums „Orientierungseinheit für Erstsemester“
 1998–1999 Auslandsstudium an der Purdue University, West Lafayette, Indiana, U.S.A., im Ph.D.-Studiengang *Plant Biology Program*
 2000 Abschluss des Biologiestudiums an der Universität Hamburg mit dem Grad eines Diplom-Biologen. Diplomprüfungsfächer: Allgemeine Botanik, Genetik/Molekularbiologie, Mikrobiologie, Physik
 2001 Beginn der Promotion am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg unter Anleitung von Prof. Dr. E. Heinz

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst habe. Ich habe alle Stellen, die im Wortlaut oder dem Inhalt entsprechend anderen Quellen entnommen sind, als Entlehnung kenntlich gemacht. Ich habe alle Personen, deren Hilfe ich in Anspruch genommen habe, namentlich aufgeführt.

Hamburg, den 5. März 2003