

*Glycolipid-Engineering* zur Aufklärung  
der biologischen Funktion von  
Steryglycosiden in der Pexophagie  
von *Pichia pastoris*

Dissertation  
Zur Erlangung der Würde  
des Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

des Department Biologie,  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Dipl.-Biol. Sandra Grille**  
aus Riesa

Hamburg, Juli 2010

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Herr Priv.-Doz. Dr. D. WARNECKE  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. P. DÖRMANN  
Tag der Disputation: 12. Mai 2010

Hamburg, den 27. April 2010



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Temming'.

Professor Dr. Axel Temming  
Leiter des Departments Biologie

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1 Die Vielfalt freier Sterole und ihrer Derivate, der Sterylglycoside . . . . .	5
1.2 Die Sterol-Glycosyltransferasen . . . . .	9
1.3 Sterol- $\beta$ -Glucosyltransferasen - Wo kommen sie vor und welche Charakteristika weisen sie auf? . . . . .	14
1.4 Präsenz, intrazelluläre Lokalisierung und biologische Funktionen von SGs . . . . .	19
1.5 SGs von <i>Borrelia spec.</i> und <i>H. pylori</i> . . . . .	26
1.6 SGs von filamentösen Pilzen und Hefen . . . . .	31
1.7 SG spielt eine Rolle in der Degradation von Peroxisomen . . . . .	34
1.8 <i>Glycolipid-Engineering</i> -Methode . . . . .	42
1.9 Zielsetzung . . . . .	44
<b>2 Ergebnisse</b>	<b>46</b>
2.1 Analyse der Funktion von $\beta$ -ErgGlc in <i>P. pastoris</i> . . . . .	46
2.2 Identifizierung, Klonierung & Charakterisierung von SGTs zur Substitution des $\beta$ -ErgGlc in <i>P. pastoris</i> . . . . .	55
2.3 Einfluss von SG auf die Peroxisomendegradation in <i>P. pastoris</i> . . . . .	77
<b>3 Diskussion</b>	<b>86</b>
3.1 $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese korreliert mit der MIPA-Elongation in <i>P. pastoris</i> . . . . .	88
3.2 Bb0572p, Bh0572p und drei FgUgts wurden als SGTs identifiziert . . . . .	96
3.3 Heterologe, bakterielle SGTs benötigen Lokalisierungsdomänen? . . . . .	107
3.4 Ausblick . . . . .	110
<b>4 Material &amp; Methoden</b>	<b>117</b>
4.1 Chemikalien, Lösungsmittel, Verbrauchsmaterialien und Reaktionskits . . . . .	117
4.2 Mikroorganismen und deren Kultivierung . . . . .	118
4.3 Vektoren und Plasmide . . . . .	123
4.4 Präparation von Nukleinsäuren . . . . .	123
4.5 Agarosegelelektrophorese . . . . .	126
4.6 Polymerase-Kettenreaktion . . . . .	129
4.7 Methoden zur DNA-Klonierung . . . . .	132
4.8 Generierung kompetenter Zellen und Transformationen . . . . .	135

## Inhaltsverzeichnis

4.9 Screening generierter, putativer <i>P. pastoris</i> -Transformanten . . . . .	138
4.10 Heterologe Expression in <i>E. coli</i> C41(DE3) . . . . .	140
4.11 Expression in <i>P. pastoris</i> . . . . .	141
4.12 Enzymassays . . . . .	142
4.13 Proteinbiochemische Methoden . . . . .	146
4.14 Isolierung und Analyse von Lipiden . . . . .	154
4.15 Mikroskopie . . . . .	158
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>162</b>
<b>Anhang</b>	<b>182</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>199</b>
<b>Beteiligungen an dieser Arbeit</b>	<b>200</b>
<b>Danksagung</b>	<b>201</b>

### WICHTIGE ANMERKUNGEN:

In dieser Arbeit werden chemische Substanzen nach IUPAC-IUBMB\*-Regeln benannt. Trivialnamen oder Kurzformen werden dagegen wie zusammengesetzte Hauptwörter behandelt. Dabei werden willkürlich Bindestriche eingeführt, um die Lesbarkeit zu verbessern.

\*International Union of Pure and Applied Chemists and the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUPAC-IUBMB) Commission on Biochemical Nomenclature

Ebenfalls werden in dieser Arbeit Gene, Proteine, cDNA etc. verschieden gekennzeichnet. Da dies normalerweise abhängig vom Organismus ist, wurden in dieser Arbeit folgende Parameter angewendet und die Schreibweisen vereinfacht dargestellt: Gene werden kursiv geschrieben, wobei der erste Buchstabe groß geschrieben wird (z.B. *Ugt51B1*). Dazu zählen auch Sequenzen, denen nur eine Markierungssequenz angefügt wurde. Deletierte Gene werden mit kursiven Kleinbuchstaben dargestellt (*ugt51b1*). cDNAs (*complementary DNAs*), PCR-Fragmente oder Inserts in Vektoren werden im Text nicht kursiv und klein geschrieben (*ugt51b1*). Proteine werden in Großbuchstaben und nicht kursiv dargestellt (UGT51B1) bzw. bei bakteriellen Proteinen mit einem kleinen "p" versehen (Hp0421p). Zur Vereinfachung wurde u.a. die bakterielle Gen- bzw. Proteinnomenklatur nicht entsprechend ihrer Konvention berücksichtigt. Die hier aufgeführten Angaben beziehen sich eher auf die Nomenklatur von *Saccharomyces cerevisiae*. Die Handhabungen verschiedener bakterieller und pilzlicher Nomenklaturen können u.a. folgender Website entnommen werden:

<http://science.jrank.org/pages/56620/Gene-nomenclature.html>.

I.d.R. wurden in dieser Arbeit codierende Gensequenzen analysiert, welche den ORF (*open reading frame*), teilweise mit Markierungssequenzen versehen, umfassen. Es sollte beachtet werden, dass der Vereinfachung wegen auch diese Sequenzen als Gensequenzen oder Gene bezeichnet werden. Streng genommen müssten für die Gen-Bezeichnung die untranslatierten Bereiche (UTRs) präsent sein. In dieser Arbeit detektierte Proteine wiesen zudem mehr als 100 Aminosäuren auf, deswegen wurde der Begriff "Polypeptid" für diese nicht mehr angewendet. Die Abkürzungen der verschiedenen Sterylglycoside und Sterol-Glycosyltransferasen sind einem separaten Abschnitt im Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Strukturformel des Cholesterols. . . . .	6
1.2	Strukturformeln diverser Sterole und eines bakteriellen Steroläquivalents. . . . .	8
1.3	Exemplarische Darstellung eines Sterylglycosids. . . . .	9
1.4	Mechanismus von <i>inverting</i> - und <i>retaining</i> -Glycosyltransferasen. . . . .	12
1.5	Schematische Darstellung von $\beta$ -SGlcT-Isoformen mit verschiedenen nicht-katalytischen Domänen. . . . .	14
1.6	Sequenzalignment der katalytischen Domänen diverser $\beta$ -SGlcTs. . . . .	19
1.7	Membranaufbau von gram-negativen Bakterien und <i>Borrelia spec.</i> . . . . .	28
1.8	Vier Autophagie-Prozesse in Hefen. . . . .	36
1.9	Schematische Darstellung des Ablaufs der Mikropexophagie in der Hefe <i>P. pastoris.</i> . . . . .	38
1.10	Funktionelle Domänen der $\beta$ -ErgGlcT UGT51B1 und deren Beteiligung an der Mikropexophagie. . . . .	39
1.11	Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit durchzuführenden Projekte. . . . .	45
2.1	Ausgewählte Bereiche für die <i>site directed mutagenesis</i> von <i>Ugt51B1</i> aus <i>P. pastoris.</i> . . . . .	48
2.2	Mutationen in UGT51B1 beeinträchtigten die $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese in <i>P. pastoris.</i> . . . . .	50
2.3	UGT51B1-Varianten der Hefetransformanten konnten nachgewiesen werden. . . . .	52
2.4	UGT51B1-Varianten, die $\beta$ -ErgGlc synthetisieren konnten, zeigten ihre Lokalisierung in einer <i>cup-like-structure</i> und die in der $\beta$ -ErgGlc-Synthese-beeinträchtigten Varianten in einem punktförmigen CFP-Signal. . . . .	54
2.5	<i>Hp0421</i> -exprimierende Hefen zeigten $\alpha$ -SGlc-Synthese. . . . .	57
2.6	Unter Kontrolle des native Promotors von <i>Ugt51b1</i> konnte <i>Hp0421p</i> in <i>P. pastoris</i> die Umsetzung von Ergosterol und UDP-Glucose zu $\alpha$ -ErgGlc katalysieren. . . . .	58
2.7	Die heterolog exprimierten, nativen Gensequenzen <i>Bb0572</i> und <i>Bb0767</i> führten zu keiner $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese. . . . .	62
2.8	<i>Bb0572</i> könnte für eine $\beta$ -SGalT codieren. . . . .	65
2.9	<i>Bh0572</i> -exprimierende Hefen zeigten $\beta$ -SGlc-Synthese. . . . .	67
2.10	Strukturen der SGs aus transgenen Hefekulturen nach Expression von <i>Bb0572</i> und <i>Bh0572</i> in <i>P. pastoris.</i> . . . . .	70
2.11	Die Aktivität der Enzyme <i>Bb0572p</i> und <i>Bh0572p</i> ist membranassoziiert. . . . .	74
2.12	SG-Biosynthese ist abhängig von der Induktionsdauer. . . . .	76
2.13	Peroxisomenproliferation und -degradation sind abhängig von der vorliegenden Kohlenstoffquelle und der $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese. . . . .	80
2.14	Alle Hefezellen zeigten unter mikropexophagischen Konditionen Wachstum. . . . .	81
2.15	<i>Hp0421</i> -exprimierende Hefen starben während der Methanol-Induktion. . . . .	83
3.1	In dieser Arbeit erreichte Ziele. . . . .	87
4.1	Übersicht über mögliche AS-Austausche und Screening-Möglichkeiten mittels Restriktion. . . . .	183
4.2	Übersicht über die eingefügten Mutationen in pCFP-ugt51b1. . . . .	184
4.3	Übersicht über die erstellte Klonierungsstrategie der synthetischen Gene für die Kandidaten <i>Bb0572</i> , <i>Bb0767</i> und <i>Bh0572.</i> . . . . .	185
4.4	Native und synthetische Nukleotidsequenz von <i>Bb0572.</i> . . . . .	186

## Abbildungsverzeichnis

4.5	Native und synthetische Nukleotidsequenz von <i>Bb0767</i> . . . . .	187
4.6	Alignment der Nukleotidsequenzen von <i>Bh0572</i> und <i>Bb0572</i> . . . . .	188
4.7	Alignment der Proteinsequenzen von <i>Bb0572</i> und <i>Bh0572</i> . . . . .	189
4.8	Native und synthetische Nukleotidsequenz von <i>Bh0572</i> . . . . .	190

# Tabellenverzeichnis

1.1	Vorkommen von SGs. . . . .	21
2.1	$\beta$ -ErgGlc-defiziente Hefen zeigten nach Wechsel der Kohlenstoffquelle von Methanol zu Glucose AOX-Aktivität. . . . .	78
2.2	Hefen, welche <i>Hp0421</i> exprimierten, zeigten nach Wechsel der Kohlenstoffquelle von Methanol zu Glucose keine AOX-Aktivität. . . . .	82
3.1	Mikropexophagie in Hefen, die UGT51B1-Varianten exprimierten. . . . .	93
4.1	In dieser Arbeit verwendete Reaktionskits. . . . .	191
4.2	Verwendete Organismen und Stämme. . . . .	192
4.3	Verwendete Vektoren. . . . .	193
4.4	Generierte Konstrukte. . . . .	194
4.5	Generierte Hefestämme. . . . .	195
4.6	Bezeichnung, Sequenz und Produktgrößen von in dieser Arbeit verwendeter Primerpaare. . . . .	196

# Abkürzungsverzeichnis I

## Glycolipide, Glycosyltransferasen etc.

FS	Freies Sterol/Freie Sterole
( $\alpha$ -, $\beta$ -)GT(s)	( $\alpha$ -, $\beta$ -)Glycosyltransferase(n)
SGT(s)	Sterol-Glycosyltransferase(n)
UGT(s)	UDP-Glucose:Sterol- $\beta$ -Glucosyltransferase(n)
SGlcT(s)	Sterol-Glucosyltransferase(n)
$\beta$ -SGalT(s)	Sterol- $\beta$ -Galactosyltransferase(n)
$\alpha$ -SGlcT(s)	Sterol- $\alpha$ -Glucosyltransferase(n)
$\beta$ -SGlcT(s)	Sterol- $\beta$ -Glucosyltransferase(n)
$\beta$ -CholGalT(s)	Cholesterol- $\beta$ -Galactosyltransferase(n)
$\alpha$ -CholGlcT(s)	Cholesterol- $\alpha$ -Glucosyltransferase(n)
$\beta$ -CholGlcT(s)	Cholesterol- $\beta$ -Glucosyltransferase(n)
$\beta$ -ErgGlcT(s)	Ergosterol- $\beta$ -Glucosyltransferase(n)
SG(s)	Sterylglycosid(e)
SGlc(s)	Sterylglucosid(e)
ASG(s)	Acyl-Sterylglycosid(e)
ASGlc(s)	Acyl-Sterylglucosid(e)
$\beta$ -CholAGal(s)	Cholesteryl-Acyl- $\beta$ -Galactosid(e)
$\beta$ -SGal(s)	Steryl- $\beta$ -Galactosid(e)
$\beta$ -ErgGal(s)	Ergosteryl- $\beta$ -Galactosid(e)
$\beta$ -CholGal(s)	Cholesteryl- $\beta$ -Galactosid(e)
$\alpha$ -SGlc(s)	Steryl- $\alpha$ -Glucosid(e)
$\alpha$ -ErgGlc(s)	Ergosteryl- $\alpha$ -Glucosid(e)
$\alpha$ -CholGlc(s)	Cholesteryl- $\alpha$ -Glucosid(e)
$\alpha$ -CholAGlc(s)	Cholesteryl-Acyl- $\alpha$ -Glucosid(e)
$\alpha$ -CholPGlc(s)	Cholesteryl-Phosphatidyl- $\alpha$ -Glucosid(e)
$\alpha$ -CholLPGlc(s)	Cholesteryl-Lysophosphatdiyl- $\alpha$ -Glucosid(e)
$\beta$ -SGlc(s)	Steryl- $\beta$ -Glucosid(e)
$\beta$ -ErgGlc(s)	Ergosteryl- $\beta$ -Glucosid(e)
$\beta$ -CholGlc(s)	Cholesteryl- $\beta$ -Glucosid(e)
GlcCer(s)	Glucosylceramid(e)
TAG(s)	Triacylglycerol(e)



# Abkürzungsverzeichnis II

## Sonstige Abkürzungen in alphabetischer Reihenfolge

<i>Acc.No.(s)</i>	<i>Accession Number(s)</i>
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AOX	Alkoholoxidase
APC	Antigen-präsentierende Zellen ( <i>antigen presenting cells</i> )
AK	Antikörper
AS	Aminosäure(n)
ATG	<i>Autophagy related gene</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>BLAST</i>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAI	Codon-Adaptionsindex
CAT	<i>catalytic domain</i> (katalytische Domäne)
CAZy	<i>Carbohydrate-Active enZymes</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CFP/GFP	Cyanes/Grünes fluoreszierendes Protein
CFU	<i>colony forming units</i>
Cvt	<i>cytoplasm-to-vacuole-targeting</i>
DC	Dünnschichtchromatographie (engl. TLC, <i>thin layer chromatography</i> )
DIM	<i>detergent-insoluble membranes</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
xDNA	x: g, genomische DNA; ps, Plasmid; ds, doppelsträngige
dpm	<i>disintegrations/decays per minute</i> (Zerfälle/min)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EVK	Expressionsvektorkonstrukt
FYVE-Finger	Fab1, YOTB, Vac1, EEA1-Finger
GALE	UDP-Glucose/UDP-Galactose-Epimerase (Glucose-4-Epimerase)
GRAM-Domäne	Glucosyltransferase, Rab-like-GTPase-Aktivator und Myotubularin-Domäne
HPTLC	<i>High performance thin layer chromatography</i>
<i>his4</i>	Histidin-Dehydrogenase (mutiert)
KDO	3-Desoxy-D-manno-oct-2-ulosonsäure
KO	<i>knock-out</i>
LOS	Lipooligosaccharid
LPA	<i>Lag-phase autophagy</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MIPA	Mikropexophagischer Apparat ( <i>micropepophagic apparatus</i> )
MIPS	<i>Munich Information Center for Protein Sequences</i>
MS	Massenspektrometrie
NDP	Nukleosiddiphosphat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance (spectroscopy)</i> (Kern(spin)resonanzspektroskopie)
OD	Optischen Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
PA(GE)	Polyacrylamid(-Gelelektrophorese)
PAS	Präautophagosomale Struktur ( <i>preautophagosomal structure</i> )
PBD	Phosphoinositol-bindende Domäne ( <i>phosphoinositide-binding domain</i> )
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
psbd	<i>putative steroid/sterol binding domain</i> (putative Sterolbindedomäne)
(tr)PH-G(RAM)-Domäne	( <i>truncated</i> ) <i>Pleckstrin homology</i> -GRAM-Domäne
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PE	Phosphatidylethanolamin
PI(s)	Phosphatidylinositol(e) bzw. Phosphoinositide
PIP(s)	Phosphatidylinositol-Phosphat(e)
PI(X)P(s)	Phosphatidylinositol-X-Monophosphat(e)
PI(X)K(s)	Phosphatidylinositol-X-Kinase(n)
PM	Plasmamembran

# Abkürzungsverzeichnis II

## Sonstige Abkürzungen in alphabetischer Reihenfolge - Fortsetzung

RG	Reaktionsgefäß
Rf	Retentionsfaktor
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
rpm	<i>rounds/revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription/Transkriptase
SDM	<i>site directed mutagenesis</i> (gezielte Mutagenese)
TE(M)	Transmissionselektronen(mikroskopie)
TOR	<i>target of rapamycin</i>
üN	über Nacht
UDP	Uridindiphosphat
Vol	Volumen
VPS-Protein	<i>vacuolar protein sorting</i> -Protein
VSM	<i>vacuolar sequestering membrane</i> (Ausstülpungen der Vakuolenmembran)
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp

# Zusammenfassung

Sterylglycoside sind Membranlipide, die in vielen Eukaryoten und einigen Prokaryoten vorkommen. Durch die Aktivität von Sterol-Glycosyltransferasen werden diese Glycolipide aus einem Sterolmolekül und einem UDP-Zucker synthetisiert. Über die biologischen Funktionen dieser Membranlipide ist bislang nur wenig bekannt.

Studien wiesen der Ergosterol-Glycosyltransferase UGT51B1 eine Rolle beim Abbau von Peroxisomen in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* zu. Der Abbau der Peroxisomen ist ein Autophagie-Prozess. Autophagie-Prozesse sind zelluläre, degradative Prozesse, welche konserviert in Eukaryoten vorliegen und nach Änderungen der Umweltbedingungen ausgeführt werden. Steht der Hefe als Kohlenstoffquelle Methanol zur Verfügung, erzeugt diese viele, große Peroxisomen, die für den Katabolismus des Methanols das Enzym Alkoholoxidase beinhalten. Nach einem Wechsel der Kohlenstoffquelle von Methanol zu Glucose sammeln sich die Peroxisomen nahe der Vakuolenmembran, werden von dieser umhüllt und anschließend durch vakuoläre, hydrolytische Enzyme degradiert. In die Elongation der Vakuolenmembran ist ein Autophagie-spezifisches Membransystem involviert.

In dieser Arbeit sollten die biologischen Funktionen von Sterylglycosiden untersucht werden. Es sollte geklärt werden, ob Ergosteryl- $\beta$ -Glucosid für den Peroxisomenabbau essentiell ist. Oder ob das Protein UGT51B1 unabhängig von seiner enzymatischen Aktivität am Peroxisomenabbau beteiligt ist. Dazu wurden mittels gezielter Mutagenese Nukleotide in *Ugt51B1* ausgetauscht. Dies führte wiederum zu Aminosäureaustauschen in konservierten Bereichen der katalytischen Domäne des Proteins. So konnten UGT51B1-Varianten generiert werden, die zwar kein Ergosteryl- $\beta$ -Glucosid mehr synthetisieren konnten, aber in ihrer Proteinfaltung nicht beeinträchtigt sein sollten. Nach Expression dieser modifizierten Proteine in *P. pastoris* boten die in der Sterylglycosid-Synthese beeinträchtigten Hefen nun die Möglichkeit, das Protein UGT51B1 unabhängig von seiner Enzymaktivität zu analysieren.

Frühere Studien belegten, dass UGT51B1 an einen inaktiven Vorläufer des Autophagie-spezifischen Membransystems rekrutiert wird. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch UGT51B1-Aktivität synthetisiertes Ergosteryl- $\beta$ -Glucosid für die Differenzierung des funktionalen Membransystems unentbehrlich ist. Die Funktionalität dieses Membransystems ist wiederum essentiell für den Peroxisomenabbau.

Nachdem erste Untersuchungen auf eine Bedeutung des Ergosteryl- $\beta$ -Glucosids im Peroxisomenabbau hinwiesen, sollte festgestellt werden, ob das Sterylglycosid für die Erfüllung der Funktion im Abbauprozess strukturelle Voraussetzungen erfüllen muss. Dazu sollten weitere *P. pastoris*-Transformanten erzeugt werden, die in der Lage waren, strukturell modifizierte Sterylglycoside in einer UGT51B1-defizienten Mutante zu synthetisieren. Dies konnte durch das Anwenden der

## Zusammenfassung

*Glycolipid-Engineering*-Methode erreicht werden. Bei dieser werden Sterylglycoside nicht nur wie bei Erzeugung einer Gen-Deletionsmutante entfernt, sondern gegen strukturell modifizierte Sterylglycoside ausgetauscht. Dazu sollten heterologe Steryl-Glycosyltransferasen mit veränderter Spezifität in *P. pastoris* exprimiert werden. Durch Gegenüberstellung der Phänotypen der Wildtyp-Hefe und der transgenen Hefen war es anschließend möglich, die Funktionen der nativen Sterylglycoside zu identifizieren, welche von heterologen Sterylglycosiden nicht erfüllt werden konnten.

Zu Beginn dieser Arbeit war das Gen für eine Cholesterol- $\alpha$ -Glucosyltransferase aus *Helicobacter pylori* bereits bekannt. Weitere Gene mussten erst identifiziert, kloniert und charakterisiert werden. So wurde das erste Mal eine Cholesterol- $\beta$ -Galactosyltransferase aus *Borrelia burgdorferi* identifiziert. Ebenso konnte das codierende Gen für eine Cholesterol- $\beta$ -Glucosyltransferase aus *B. hermsii* ermittelt werden. Somit konnte auch eine bakterielle Variante von UGT51B1 identifiziert werden. Anschließend konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit transgene Hefen analysiert werden, die Ergosteryl- $\beta$ -Galactosid und Ergosteryl- $\alpha$ -Glucosid synthetisieren konnten. Als Kontrolle wurde zudem eine Hefe generiert, welche Ergosteryl- $\beta$ -Glucosid durch die Aktivität der bakteriellen Sterol-Glycosyltransferase aus *B. hermsii* synthetisierte. Mit Hilfe dieser Hefetransformanten sollte geklärt werden, ob die strukturellen Sterylglycosid-Varianten die Rolle von Ergosteryl- $\beta$ -Glucosid (Synthese katalysiert von UGT51B1) im Peroxisomenabbau übernehmen können. Dazu wurden erste Untersuchungen durchgeführt. Aus den Resultaten ging hervor, dass die Sterylglycosid-Varianten möglicherweise die Funktion des nativen Ergosteryl- $\beta$ -Glucosids im Abbau der Peroxisomen ersetzen können.

# 1 Einleitung

Nach heutiger Erkenntnis führen Biomembranen nicht nur generelle Funktionen aus. Neben jener der Separation biochemischer Reaktionsräume und für die Matrixbildung für Membranproteine sind sie auch in spezifischere Prozesse eingebunden.

Zur Kompartimentierung innerhalb eukaryotischer Zellen und als Abgrenzung zur Umwelt bilden Zellen Biomembranen - blattartige 6-10 nm dicke, durch nicht-kovalente Kräfte zusammengehaltene Strukturen - aus. Schon 1925 postulierten E. Gorter und F. Grendel, dass Zellmembranen Lipiddoppelschichten sein müssten [102]. H. Davson und J. Danielli erweiterten dieses Modell 1935 zum sogenannten "*Sandwich-Modell*", in dem auch Proteine berücksichtigt wurden [62]. Doch dieses Modell hielt der Erkenntnis nicht stand, dass Membranen mit unterschiedlicher Funktion sich auch in ihrer Zusammensetzung und Dicke unterscheiden. Zudem wurden die amphipathischen Eigenschaften der Proteine nicht berücksichtigt. Erst das 1972 entwickelte "*Fluid Mosaic Modell*" zeigte, dass sich aus Lipiden (hauptsächlich aus den amphipathischen Phospholipiden) eine homogene, flüssig-kristalline und semipermeable Doppelschicht ausbildet, in der sich frei diffundierende Proteine befinden können [325]. Amphipathische Lipide aggregieren in einem wässrigen Milieu zu komplexen Strukturen (Micellen oder Lipiddoppelschichten) und dienen als Basis für die Ausbildung von Biomembranen. Erst 2005 veröffentlichte D. M. Engelman ein aktualisiertes Modell, in dem die Proteine nicht mehr alleinig als Monomere beschrieben wurden, sondern sich zu weniger motilen Homo- oder Heterooligomeren zusammenschließen können [76]. Neben den Proteinen können Lipide ebenfalls in ihrer Motilität innerhalb der Membran eingeschränkt vorliegen.

Ein wichtiges Merkmal aller biologischen Membranen ist neben der variierenden Dicke und der Zusammensetzung das Verhältnis und die Verteilung von Lipiden und Proteinen. Membranproteine haben eine feste Ausrichtung. Sie werden asymmetrisch synthetisiert und können nicht von einer Membranseite zur anderen wechseln. Auch Lipide werden nur auf einer Membranseite synthetisiert und durch Transportprozesse, sowohl durch energieabhängige als auch -unabhängige Flippasen, stetig ungleich über die Membrandoppelschicht verteilt [136]. Der spontane Wechsel eines Lipides von einer Membranseite zur anderen (transversale Diffusion, Flip-Flop) kann nur sehr langsam erfolgen. Dies ist ebenso der Fall für Membranproteine, weil diese noch ausgedehntere polare Regionen besitzen. Deswegen besteht eine asymmetrische Verteilungen von Lipiden und Proteinen. Aufgrund dessen sind Membranen nicht nur strukturell, sondern auch funktionell asymmetrisch, da die Membraninnen- und Membranaußenseite unterschiedliche Komponenten mit unterschiedlichen Enzymaktivitäten aufweisen [23]. Neben der transversalen Diffusion gibt es die laterale (zur Seite hin gelegenen) Diffusion von Lipiden und auch in geringerer Form von Membranproteinen, begründet durch deren biophysikalische Eigenschaften. Bestimmte Lipide, beispielsweise Cholesterole und Sphingolipide, zeigen eine hohe Affinität zueinander und bilden aufgrund schwacher hydrophober

## 1 Einleitung

Wechselwirkungen separierte Membranbereiche zusammen mit Glyco- und Sphingolipiden aus: So genannte “*Lipidmikrodomänen*” (oder “*Lipid rafts*”), denen in Eukaryoten eine wichtige Funktion in zellulären Signaltransduktionsprozessen (“*downstream signaling*”) zukommt [41, 323, 238]. Phospholipide sind aus diesen Bereichen weitestgehend ausgegrenzt.

Biomembranen sind stets in dynamische Prozesse eingebunden. Die Biogenese und die Degradation von Organellen erfordert einen kontinuierlichen Vesikelfluss. Dazu ist es wichtig zu verstehen, dass Biomembranen verschiedene Strukturen aufweisen, die durch Lipid-Lipid-Interaktionen entstehen. Diese Interaktionen können durch Membranproteine modifiziert werden. Membranen bestehen aus lamellaren Bilayer-Lipid-Strukturen<sup>1</sup> und Nicht-Bilayer-Lipid-Strukturen<sup>2</sup> (gezeigt am zellwandlosen Bakterium *Acholeplasma laidlawii* [408, 384, 385] und an *Escherichia coli* [411]). Nicht-Bilayer-Lipid-Phasen sind hexagonal oder kubisch. Sie bewerkstelligen die Membrankrümmung und sind an transienten Membranereignissen beteiligt, z.B. bei der Abschnürung von Vesikeln oder bei deren Fusion mit der Membran sowie der Bildung von Poren [377].

Membranlipide sind offensichtlich aufgrund ihrer Eigenschaften und Interaktionsmöglichkeiten an vielen Membranprozessen beteiligt: Zell-/Organell-Proliferation, Wachstum und Teilung, Exo- und Endozytose, Signaltransduktion, Membranproteintransport und Zell-Zell-Erkennungsprozesse. Zelluläre Biomembranen sind aus folgenden drei Lipidklassen aufgebaut: Glycerolipide (Phospho- und Glycolipide), Sterole und Sphingolipide. Die Einteilung in Lipidklassen ist Fahy *et al.* zu entnehmen [79]. Durch die Verknüpfung lipophiler Komponenten mit Zuckermolekülen resultieren Glycolipide, welche von Tieren, Pflanzen, Pilzen und Bakterien synthetisiert werden können. Diese Glycolipide werden durch die Aktivität von Glycosyltransferasen (GTs) erzeugt, welche Zuckerreste von einem aktivierten Zucker (z.B. Uridindiphosphat(UDP)-Glucose) auf eine freie Hydroxygruppe eines Lipids übertragen. Dabei können Zucker (Pentosen und Hexosen) verschiedener epimerer und anomerer Konfigurationen verwendet werden. In mono-glycosylierten Lipiden dominieren Galactose und Glucose zumeist in  $\beta$ -glycosidischer Verknüpfung. Die Verknüpfung mit weiteren Zuckern (Oligoglycosylierung) führt zu einer Vielfalt verschiedener Glycolipide. Durch die Reaktion von Sterolen mit UDP-Glucose, katalysiert durch Sterol-Glycosyltransferasen (SGlTs), entstehen Sterylglycoside (SGlcs). Diese für Eukaryoten typischen Membranlipide sollten in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer biologischen Funktionen untersucht werden.

Doch welche biologischen Funktionen nehmen die Sterylglycoside (SGs) ein? Über die biologischen Funktionen dieser Glycolipide ist bislang wenig bekannt. Es herrscht keine Klarheit über das Einwirken dieser Lipide auf biophysikalische Membraneigenschaften und speziell auf Funktionen, die sie durch Protein-Interaktionen erreichen könnten. Die Deletion von Sterol-Glycosyltransferasen (SGTs) (durch homologe Rekombination) erzeugte bisher in den resultierenden SG-freien Mutanten physiologische Defekte, u.a. in der Degradation von Peroxisomen [262] sowie in der Pathogenität von Mikroorganismen wie *Helicobacter pylori* [419] und des filamentösen Pilzes *Ustilago maydis*

---

<sup>1</sup>bestehend z.B. aus Diglycosyldiacylglycerol (DGlcDAG)

<sup>2</sup>bestehend aus hexagonalbildenden Komponenten(H<sub>II</sub>) - mit kleiner Kopfgruppe - wie z.B. Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidsäure (PA) und Monoglycosyldiacylglycerol (MGlcDAG)

(Warnecke, unveröffentlichte Daten). Effekte u.a. in Wachstum und Entwicklung wurden zudem in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* festgestellt [65].

In dieser Arbeit sollten die biologischen Funktionen von SGs u.a. mit Hilfe der Expression heterologer (bakterieller) GTs verschiedener enzymatischer Spezifität untersucht werden. Im Speziellen wurde die Beteiligung von SG bei der Degradation von Peroxisomen (Pexophagie) in der methylo-trophen Hefe *Pichia pastoris* analysiert. Aufgrund der strukturellen Variabilität der SGs war es zudem von Interesse folgenden Aspekt zu klären: Ist die Funktion im Peroxisomenabbau abhängig oder unabhängig von der Zuckerkopfgruppe und deren anomerer und epimerer Konfiguration?

Um einen Einblick in die komplexe Thematik der Glycolipide, insbesondere der SGs, zu erlangen, werden diese Lipide und die als Rückgrat fungierenden Sterole zuerst vorgestellt. Im Folgenden werden der Funktionsmechanismus der Enzyme, welche die SG-Synthese katalysieren, und deren besondere Charakteristika sowie ihr Vorkommen, ihre intrazellulären Lokalisierung und bisher bekannte biologische Funktionen von SGs in allen Organismenreichen erläutert. Etwas detaillierter werden anschließend die SGs von Prokaryoten, Hefen und filamentösen Pilzen behandelt, um abschließend auf deren Verbindungen zu Pathogenitäts- und Degradationsprozessen und den Zielsetzungen dieser Arbeit einzugehen.

## 1.1 Die Vielfalt freier Sterole und ihrer Derivate, der Sterylglycoside

Freie Sterole (FS) und deren Derivate kommen ubiquitär vor. Die Sterole können in acylierter Form als Sterolester durch Verknüpfung am C3-Atom mit einer langkettigen Fettsäure, in alkylierter Form als Sterylalkylether oder mit einem Sulfat verknüpft (z.B. als Cholesterolsulfat) vorliegen. Eine weitere Variation, das SG, kann durch die Verbindung mit einem Zucker erzeugt werden (s. 1.1.2, S.8). Diese glycosylierte Form kann wiederum acyliert oder auch phosphatidyliert vorliegen.

### 1.1.1 Freie Sterole

Sterole gehören zur Gruppe der Steroide und bilden neben den Glycero- und Sphingolipiden die dritte große Klasse der Membranlipide. Es konnten bisher nur wenige Prokaryoten beschrieben werden, die Sterole (in geringer Quantität) synthetisieren [311, 403, 123, 30, 388]. Im Gegensatz hierzu liegen die multi-funktionalen Sterole in eukaryotischen Biomembranen ubiquitär vor und akkumulieren in der Plasmamembran (PM), in welcher sie quantitativ an die Menge von Phospholipiden heranreichen [119]. Des Weiteren spielen sie eine bedeutende Rolle als Signalmoleküle.

FS sind tetrazyklische Triterpene. Die strukturelle Basis bildet ein Cyclopentanoperhydrophenanthren-Ring (auch Steran genannt). Die Moleküle bestehen aus einem hydrophoben Steroidgerüst, einer hydrophilen Hydroxygruppe an der C3-Position sowie einer hydrophoben, variablen und verzweigten Seitenkette an der C17-Position. Die strukturelle Basis des Cholesterols bildet das Cholestan: Dabei handelt es sich um drei in der Sesselform kondensierte, apolare Cyclohexanringe (Ringe A-C), von denen Ring C mit einem apolaren Cyclopentanring (Ring D) verbunden ist (Abb.1.1). An

## 1 Einleitung

der C3-Position befindet sich eine durch unterschiedliche Enzyme derivatisierbare Hydroxygruppe, an der C10- und C13-Position eine Methylgruppe und eine variable, teils verzweigte, aliphatische Seitenkette an Position 17. Die Methylgruppe an der C10-Position bestimmt die systematische Namensgebung<sup>3</sup>. Die vier beschriebenen Ringe nehmen durch ihre *trans*-Verknüpfung eine möglichst spannungsfreie Konformation ein. Eine Konformationsänderung ist bei Sterolen nicht möglich. Die Ringe sind in Bezug auf ihre Rotation fixiert, d.h. alle Ringe stehen in *trans*-Stellung, liegen in einer Ebene und die Basis ist starr und planar. Sterole weisen aufgrund dessen eine hohe Rigidität auf. Alle Substituenten liegen hingegen relativ frei beweglich vor.

Sterole lagern sich in eine Lipiddoppelschicht ein, so dass ihre lange, relativ planare Achse senkrecht zur Membranebene liegt, wobei die Hydroxygruppe eine Wasserstoffbrücke zu einem Carbonylsauerstoffatom einer Phospholipidkopfgruppe ausbildet und sich die hydrophobe Seitenkette im unpolaren Membranzentrum befindet.

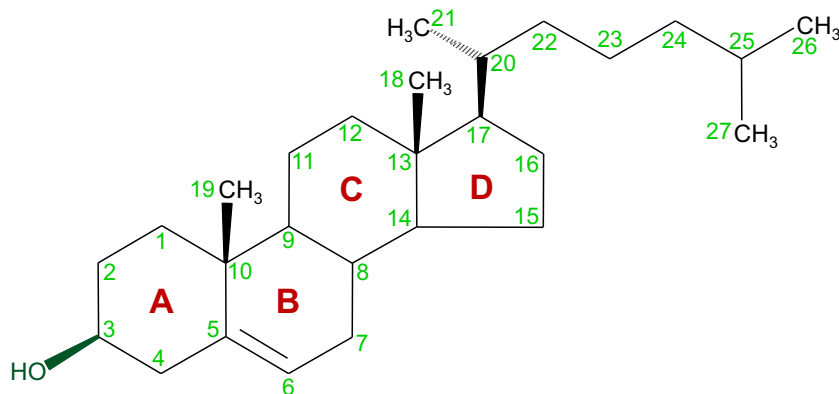


Abbildung 1.1: Strukturformel des Cholesterols.

Der systematische Name des Cholesterols lautet Cholest-5 $\Delta$ -en-3 $\beta$ -ol, dessen Grundgerüst ein 5 $\alpha$ -Cholestan bildet: vier kondensierte, apolare Ringe (A-C Cyclohexanringe, D Cyclopentanring).

Den größten Sterolanteil in Säugergewebe nimmt das Cholesterol ein. Es ist unter anderem in der Nebenniere, in Nervengewebe, in der Leber (dem Haupt-Cholesterolsyntheseort/-gewebe) und in Gallensteinen zu finden. Dieses Sterol wurde das erste Mal 1770 von P. de La Salle aus Gallensteinen isoliert. Dieses Sterol wurde das erste Mal 1770 von P. de La Salle aus Gallensteinen isoliert. Im Jahre 1815 isolierte M. E. Chevreul eine ester-unspaltbare Fraktion tierischen Fettes (Cholesterin). Die strukturelle Aufklärung folgte 1927 und 1928, vorangetrieben von H. O. Wieland und A. O. R. Windaus. Die Entdeckung des Cholesterols ist u.a. [378, 96] zu entnehmen.

Der Syntheseweg des Cholesterols beginnt mit dem Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA), einem aktivierten Acetylrest, welcher über einen komplexen Syntheseweg und mehrere Intermediate wie Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Squalen zum Cholesterol metabolisiert wird [267, 22, 23]. Die ersten Schritte der Biosynthese finden im Cytoplasma statt, die Vollendung der Synthese im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Dieses Organell, mit dem die meisten Biosynthese-Enzyme assoziiert

<sup>3</sup>Zur Methylgruppe "zusammen" (*Z*, *cis*)-stehende Substituenten werden mit dem Index  $\alpha$  gekennzeichnet, "entgegen" (*E*, *trans*)-stehende mit  $\beta$ . Doppelbindungen werden mit einem  $\Delta$  und der Nummer des vorgestellten C-Atoms benannt (z.B. Stigmasta-5,22 $\Delta$ -3 $\beta$ -ol). Liegen für dieses C-Atom mehrere Möglichkeiten vor, eine Doppelbindung einzugehen, wird die Position der Bindung zusätzlich durch die Nummer des nachfolgenden C-Atoms angegeben.



## 1 Einleitung

werden könnten, stellt den Hauptsyntheseort von Cholesterol (bzw. Ergosterol in Hefen) dar sowie der Triacylglycerole (TAGs) und Sterylester [118, 22, 377].

Cholesterol ist ein essentieller Bestandteil aller tierischen und menschlichen Zellmembranen und spielt eine bedeutende Rolle in der Regulierung der Membranpermeabilität, der Fluidität, der Polarität von Membranlipiden und der strukturellen Integrität von Membranen [66, 30, 283]. Es wird angenommen, dass das Cholesterol eine Schlüsselrolle in der lateralen Membranorganisation sowie der freien Raumverteilung (*free volume distribution*) spielt. Aufgrund seiner planaren Struktur weist es eine große Starrheit auf und behindert deswegen die Motilität von Alkylketten der Fettsäurereste anderer Membranlipide, wodurch die Membranfluidität verringert wird. Diese zwei Parameter scheinen bei der Regulierung der Aktivität von Membranproteinen und der sogenannten Lipidmikrodomänenbildung involviert zu sein [13]

Des Weiteren ist das Cholesterol neben seiner Funktion als Membranbaustein in vielen tierischen Organismen, wie auch dem Menschen, der Vorläufer wichtiger Steroidmoleküle: Der D-Vitamine, der Gallensalze und der Steroidhormone [23]. In Säugergewebe kommt das Cholesterol in unterschiedlicher Quantität vor. Die Lipidkomponente des Myelins, das als Isolator für bestimmte Nervenfasern dient, besteht beispielsweise zu 25% aus Cholesterol. Im Falle der rezeptorvermittelten Endocytose spielt das Vorkommen des Cholesterols in Form von Lipid-Protein-Komplexen als LDL-Cholesterol (*low density lipoprotein*) ebenfalls eine Rolle. Neben dem LDL-Cholesterol kann auch eine andere Transportform in Form von Cholesterylestern vorliegen, das HDL-Cholesterol (*high density lipoprotein*) [23].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Sterolfunktion auf den Wechselwirkungen mit anderen Lipiden oder Membranproteinen beruht. Allgemeine Funktionen in Membranen (*bulk function*) zur Regulation von Fluidität und Permeabilität werden von vielen Sterolen (Cholesterol, Ergosterol, Sitosterol) erfüllt. Voraussetzung ist hierbei nur die planare Struktur, welche auf der  $\alpha$ -Seite demethyliert ist, am C3-Atom eine Hydroxygruppe trägt und am C17-Atom eine Isooktyl-Seitenkette [66, 30]. Die Sterole Ergosterol und Sitosterol weisen ein sogenanntes "*Cholesterol-like behaviour*" auf. Stigmasterol besitzt eine 22 $\Delta$ -Doppelbindung, welche sich darauf anscheinend negativ auswirkt, weswegen dieses Sterol nicht in die Regulation der Membraneigenschaften involviert ist [118]. Spezielle Funktionen (*sparking functions*) werden meist nur von einem festgelegten Sterol erfüllt und beruhen vermutlich auf Interaktionen mit Proteinen/Enzymen, Rezeptoren oder regulatorischen Faktoren. So zeigte K. E. Bloch, dass eine *Mycoplasma*-Spezies besser in Anwesenheit von hohen Lanosterolkonzentrationen und wenig Cholesterol wuchs, als wenn nur Lanosterol in hoher Quantität präsent war [30]. Es wird angenommen, dass diese kleinen Sterolmengen spezifische Interaktionen mit Proteinen eingehen, welche Teil eines Signaltransduktionsprozesses sein könnten.

Im Gegensatz zu tierischen Geweben dominieren in verschiedenen anderen Organismen andere Sterole (Abb.1.2). Diese entsprechen in ihrer Sterolkomponente meist dem freien Sterol, welches im Organismus hauptsächlich vorzufinden ist. In vielen höheren Pflanzen sind dies Gemische unterschiedlicher Sterole, am häufigsten von Sitosterol und Stigmasterol [118]. In Pilzen und einigen einzelligen Algen liegt das Ergosterol vor [266, 22]. In Bakterien übernehmen sterolähnliche, pentazyklische Verbindungen, die Hopanoide, diverse Aufgaben von Sterolen. Diese werden aus der

## 1 Einleitung

Sterolvorstufe Squalen gebildet. Eine weit verbreitete Verbindung ist das C<sub>30</sub>-Hopanoid Diplopten [215]. Des Weiteren sind insbesondere pathogene Bakterien in der Lage, Cholesterol aus ihrem tierischen Wirt aufzunehmen. Schleimpilzen konnte kein gemeinsames Hauptsterol zugewiesen werden.

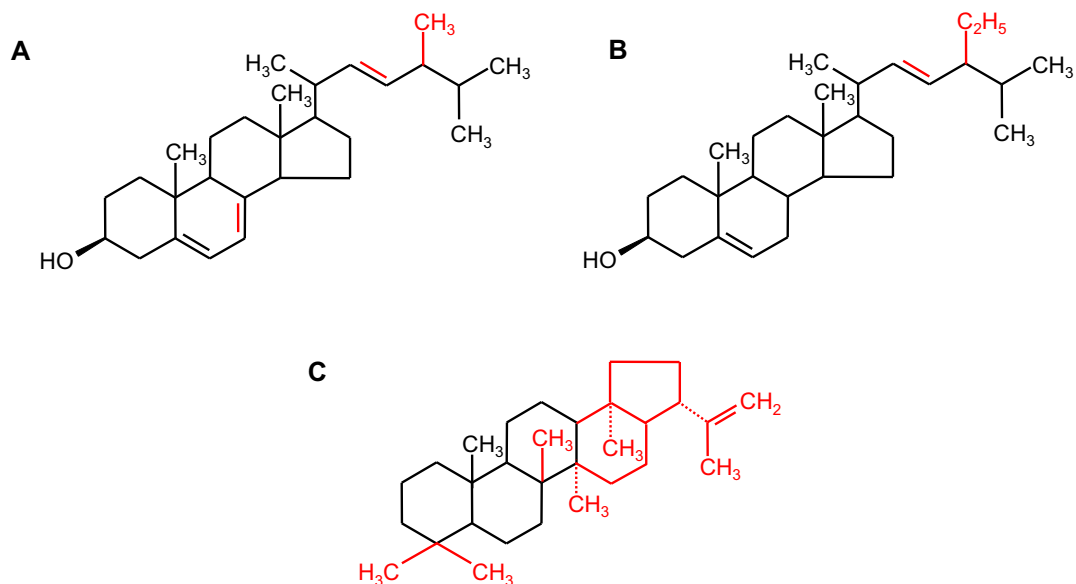


Abbildung 1.2: Strukturformeln diverser Sterole und eines bakteriellen Steroläquivalents.

**A** Pilzliches Ergosterol. **B** Pflanzliches Stigmasterol (mit Ethylgruppe am C24). **C** Diplopten, ein in vielen Eubakterien vorkommendes Hopanoid.

Wie bereits erwähnt, wurden bisher nur wenige Sterol-synthetisierende Bakterien identifiziert. In methanotrophen Bakterien, wie dem mikroaeroben Bakterium *Methylococcus capsulatus* und dem psychrophilen Bakterium *Methylosphaera hansonii* konnten große Mengen von Methylsterolen nachgewiesen werden, welche aus Lanosterol synthetisiert wurden [27, 34, 152, 306]. Diese Sterole können an komplexen, intracytoplasmatischen Membransystemen vorkommen, in denen die zur Methanoxidation benötigten Enzyme (z.B. die für diese Mikroorganismen einzigartige Methan-Monooxygenase) lokalisiert sind [215]. Auch in der stabilen L-Form von *Staphylococcus aureus* wurden Cholesterole vorgefunden, und der Organismus ist in der Lage, Cholesterol selbst zu synthetisieren [123, 201]. Einige *Mycoplasma*-Spezies sind hingegen, wie viele human-pathogene Bakterien, sterolauxotroph [30]. Diese Organismen sind darauf angewiesen, über ihren Wirt an das Sterol zu gelangen.

### 1.1.2 Sterylglycoside

Sterole liegen häufig mit einer Kopfgruppe modifiziert vor. SG entsteht durch die Verknüpfung der Hydroxygruppe eines Sterolmoleküls (an der C3-Position) mit einem aktivierten Zucker (z.B. UDP-Glucose) an dessen C1-Atom. Allgemein ist die Zuckerkopfgruppe hauptsächlich eine D-Aldohexose, seltener eine D-Aldopentose, wobei beide Varianten als Pyranosen (sechsgliedrige Ringform) oder Furanosen (fünfgliedrige Ringe) vorliegen. Die glycosidische Bindung liegt hauptsächlich in der  $\beta$ -Konfiguration vor. Eine Ausnahme bildet das human-pathogene Bakterium *H. pylori*, dessen SG eine

## 1 Einleitung

$\alpha$ -glycosidische Verknüpfung aufweist (s. 1.5, S.26). Die hydrophile Kopfgruppe besteht zumeist aus Glucose [397], aber auch andere Zucker, u.a. Galactose [6], Mannose [73, 94], Xylose [149] und Arabinose [48], können an einer Sterolglycosylierung beteiligt sein. Die Glycosylierung verleiht dem Molekül neue physikochemische Eigenschaften. Daraus resultiert eine neue Membranorientierung, da die polare Zuckerkopfgruppe dem wässrigen Milieu zugewandt ist und dort hydratisiert werden kann. Ihre Hydroxygruppen können daraufhin über Wasserstoffbrücken mit anderen Lipidkopfgruppen oder sonstigen Molekülen interagieren. Im Gegensatz zu den SGs interagieren die unpolaren Sterole in der Membran mit Acylresten von Glyceriden und Sphingolipiden (Lipidmikrodomänen-Formation) über Van-der-Waals-Kräfte.

Auch die SGs können modifiziert werden. Häufig tritt eine Acylierung am C6-Atom des Zuckers mit einer Fettsäure auf [198]. Weitere Derivate können u.a. durch Phosphorylierung erzeugt werden [130, 187]. Auch eine Oligoglycosylierung kann stattfinden: Di-, Tri- und Tetraglycoside entstehen durch die Übertragung weiterer Zucker [90, 170]. Auf den Mechanismus der Glycosylierung von Sterolen und die katalysierenden Enzyme, die SGTs, wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

## 1.2 Die Sterol-Glycosyltransferasen

SGTs gehören zur Klasse der GTs (EC 2.4.x.y), näher betrachtet zu den NDP-GTs (Leloir-Enzyme, EC 2.4.1.x). Um den Zucker-Donor glycosidisch mit einem Akzeptormolekül, dem Aglycon, zu verknüpfen, verwenden diese Enzyme aktivierte Nukleosiddiphosphat- (NDP), Nukleosidmonophosphat-Zucker oder Zuckerphosphate. Die Akzeptorsubstrate von GTs können Zucker sowie auch Lipide, Proteine und Nukleinsäuren sein. Insbesondere zählen zu den Akzeptoren Alkohole oder Moleküle mit freien Hydroxy- oder Aminogruppen. Zusätzlich kann der Zuckertransfer, der zumeist auf einen nukleophilen Sauerstoff von einem Hydroxy-Substituenten des Akzeptors erfolgt, auch andere Nukleophile nutzen. Dies kann Stickstoff für Stickstoff-gebundene Glycoproteine oder Schwefel für Thioglycoside in Pflanzen sein [182]. Im in dieser Arbeit vorliegenden Fall der “membrangebundenen” oder “membranassoziierten” SGTs wird ein UDP-aktivierter Zucker über sein C1-Atom glycosidisch mit dem C3-Atom eines Sterolmoleküls verknüpft und es entsteht ein SG (Abb.1.3) [119, 397]:

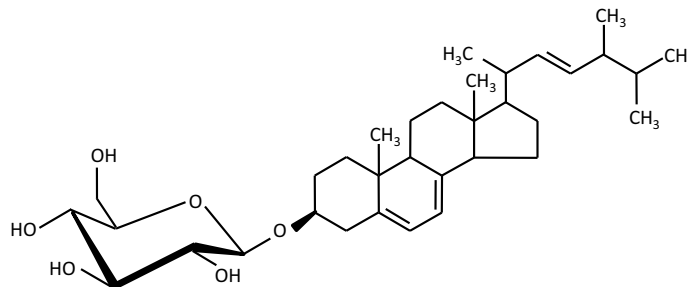
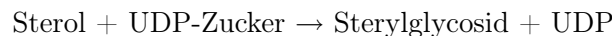


Abbildung 1.3: Exemplarische Darstellung eines Sterylglycosids.

Eine Ergosterol- $\beta$ -Glucosyltransferase ( $\beta$ -ErgGlcT) katalysiert die Reaktion von Ergosterol mit einem UDP-Glucose-Molekül. Es entsteht ein Ergosteryl- $\beta$ -Glucosid ( $\beta$ -ErgGlc).

### 1.2.1 Nomenklatur der Glycosyltransferasen

Zur systematischen Einordnung von NDP-GTs wurde die EC-Nomenklatur (IUBMB<sup>4</sup>-System) verwendet, welche um eine sequenzbasierte Klassifizierung in Familien erweitert wurde. Diese Erweiterung bietet den Vorteil, dass die Enzyme auch nach intrinsischen, strukturellen Eigenschaften eingeordnet wurden [45]. So konnten die GTs anhand der stereochemischen Eigenschaften ihrer Substrate und Produkte in sogenannte *retaining*- und *inverting*-Enzyme eingeteilt werden [326]. Eine aktuelle Einordnung der Enzyme in Familien ist der öffentlich zugänglichen Datenbank CAZy (*Carbohydrate-Active enZymes*<sup>5</sup>), betreut durch B. Henrissat und P. M. Coutinho, zu entnehmen [46]. In dieser Datenbank werden GT-Superfamilien basierend auf Sequenzähnlichkeiten abgegrenzt und nach jeweils gleichen, dreidimensionalen Faltungsmustern eingeteilt [45, 56, 293, 182]. Die Sequenzähnlichkeiten basieren auf einem kurzen, u.a. mittels *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) [7] abgeglichenen, Aminosäure(AS)-Sequenzabschnitt.

Bei der Klassifizierung in Superfamilien wird zwischen zwei generellen Proteinfaltungsvarianten unterschieden, GT-A und GT-B, zu denen sich die GTs größtenteils zuordnen lassen [35, 56, 293, 126, 182]. Zumindest eine Nukleotidbindedomäne in Form einer ROSSMANN<sup>6</sup>-Faltung sollte vorliegen. GT-A zeigt zwei unterschiedliche Domänen auf: eine Nukleotidbindedomäne und eine Akzeptorbindestelle. Die Proteintopologie des Enzyms weist eine offene, zentrale  $\beta$ -Faltblatt-Struktur auf, welche von beiden Seiten dicht von  $\alpha$ -Helices umgeben ist und an zwei dicht beieinanderliegende, ROSSMANN-typische Faltungen erinnert. GT-B weist ebenfalls zwei charakteristische Untereinheiten der ROSSMANN-Falte auf, doch der Unterschied zu GT-A liegt darin, dass die zwei ROSSMANN-Domänen sich gegenüberliegen und locker verbunden sind [126, 182]. Neben diesen beiden Faltungen gibt es noch die GT-C-Faltung, entdeckt durch wiederholte *BLAST*-*Searches* [202]. Diese weist höchstwahrscheinlich große hydrophobe, integrale Membranproteine auf, die im ER oder der PM lokalisiert sind. Die Membranproteine besitzen zwischen acht und 13 Transmembran-Helices, und deren aktives Zentrum liegt in einer langen *loop*-Region [342, 348, 217].

Die Art der Faltung und des Reaktionsmechanismus, auf den im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird, ist stets konserviert [35]. Die beiden Faltungsstrukturen GT-A und GT-B scheinen zudem nur in GTs vorhanden zu sein, die einen Nukleotid-Zucker als Donor nutzen [126].

Die UDP-Glycosyltransferasen, welche der GT-1-Superfamilie der NDP-Glycosyltransferasen nach Campbell *et al.* entsprechen [45], wurden um eine weitere sequenzbasierte Nomenklatur erweitert [214, 213]. So wurde beispielsweise eine UDP-Glucose:Sterol- $\beta$ -Glucosyltransferase (UGT) von *A. thaliana* mit UGT80A2 benannt. Das Enzym gehört zur Familie 80 und zur Subfamilie A. Die zweite Ziffer gibt das individuelle Gen der Familie oder Subfamilie wieder<sup>7</sup>. Anhand all dieser genannten Kriterien zur Einteilung kann beispielweise:

<sup>4</sup>International Union of Biochemistry and Molecular Biology

<sup>5</sup><http://www.cazy.org> bzw. <http://www.cazy.org/GlycosylTransferases.html>

<sup>6</sup>benannt nach M. Rossmann, dem Entdecker der ROSSMANN-Falte, die wahrscheinlich eine Nukleotidbindedomäne darstellt [23].

<sup>7</sup>Weitere Beispiele bzw. die Einteilung der verschiedenen Enzyme und die Organismen sind auch der UDP Glucuronosyltransferase Homepage unter <http://som.flinders.edu.au/FUSA/ClinPharm/UGT/index.html> zu entnehmen.

## 1 Einleitung

1. die Cholesterol- $\alpha$ -Glucosyltransferase ( $\alpha$ -CholGlcT) Hp0421p<sup>8</sup> von *H. pylori*
  - dem GT-B-Faltungsmotiv,
  - den *retaining*-Enzymen ( $\alpha$ -GT),
  - sowie der GT-4-Superfamilie zugeordnet werden.
2. die Ergosterol- $\beta$ -Glucosyltransferase ( $\beta$ -ErgGlcT) UGT51B1 von *P. pastoris*
  - dem GT-B-Faltungsmotiv,
  - den *invertig*-Enzymen ( $\beta$ -GT),
  - sowie der GT-1-Superfamilie zugeordnet werden.

Wie schon genannt, erfolgt ebenfalls eine Einteilung in der CAZy-Datenbank aufgrund des zugrunde liegenden Katalysemechanismus in *retaining*- oder *invertig*-Enzyme. Diese zwei Mechanismen sollen im nächsten Abschnitt näher erläutert werden.

### 1.2.2 *Inverting*- und *retaining*-Katalysemechanismen von UDP-Glycosyltransferasen

Einer Zuordnung zu einer Katalysemechanismus-Klasse, die innerhalb einer GT-Superfamilie, unterteilt nach ihrer Faltung und Aktivität, konserviert vorliegt [326, 182], erfolgt durch die von NDP-GTs verwendeten Substrate und der Enzymprodukte in Abhängigkeit ihrer stereochemischen Eigenschaften.

Es lassen sich zwei Katalysemechanismen differenzieren (Abb.1.4). Diese Differenzierung basiert auf der axialen ( $\alpha$ -ständigen) Orientierung der Abgangsgruppe, des NDPs zum Zuckermolekül. Es kann zu einer

- *Umkehrung* (*Inverting*/*Inversion*) der anomerischen Konfiguration der glycosidischen Bindung kommen, so dass eine äquatoriale Orientierung resultiert (z.B. UDP- $\alpha$ -Glucose  $\rightarrow$   $\beta$ -Glucosid). Oder es resultiert die
- *Aufrechterhaltung* (*Retaining*/*Retention*) der anomerischen Konfiguration der glycosidischen Bindung, bei der die axiale Orientierung bestehen bleibt (z.B. UDP- $\alpha$ -Glucose  $\rightarrow$   $\alpha$ -Glucosid).

---

<sup>8</sup>Hp0000-Nomenklatur, siehe Abschnitt 1.5.2, S.29

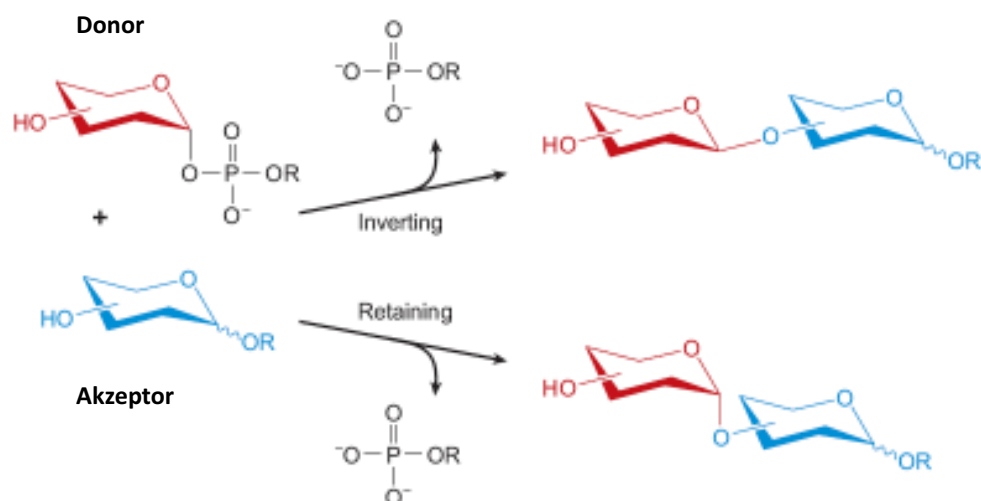


Abbildung 1.4: Mechanismus von *invertin*- und *retaining*-Glycosyltransferasen.

GTs katalysieren den Transfer eines Zuckermoleküls entweder durch Inversion oder Retention der anomeren Stereochemie des Zuckerdonors (aus [182]).

*Inverting*-GTs vollziehen sehr wahrscheinlich eine nukleophile Substitutionsreaktion 2. Ordnung ( $S_N2$ -Reaktion). Bei dieser Reaktion führt der Akzeptor, eine Hydroxygruppe des Aglycons, einen nukleophilen Angriff auf das anomere C1-Atom des Zuckerdonors aus. Dabei wird gleichzeitig die Abgangsgruppe freigesetzt.

Der *retaining*-Mechanismus ist weniger aufgeklärt [182], aber wahrscheinlich folgen die Enzyme einer inneren, nukleophilen Substitution (interner  $S_N2$ -Mechanismus), bei der die Konfiguration erhalten bleibt. Der nukleophile Angriff der Hydroxygruppe des Aglycons sowie das Verlassen der Abgangsgruppe erfolgt asynchron unter Bildung eines kovalenten Enzym-Zwischenprodukts auf derselben Seite des Glycosids, womit die  $\alpha$ -Konfiguration der glycosidischen Verknüpfung im NDP-Zucker beibehalten werden kann [97, 182].

Eine Vielzahl bekannter SGTs ( $\beta$ -GTs) folgt dem *invertin*-Mechanismus. Nur wenige Vertreter von  $\alpha$ -GTs sind bisher bekannt. Zu diesen gehören u.a. die SGTs aus *H. pylori* [130], *Helicobacter spec.* [117, 116, 115] und *Acholeplasma axanthum* [224].

Zu der Katalyse-Reaktion beitragende AS-Reste sind Aspartat- und/oder Glutamatreste, welche eine geeignete Reaktivität ( $pK_s$ -Werte zwischen 4,0 und 4,3) bieten, um den Akzeptor zu aktivieren, und deren Seitenketten auch als Nukleophil dienen können, um ein Glycosyl-Intermediat zu generieren [45, 35, 182].

### 1.2.3 Weitere katalytische Eigenschaften von SGTs

Um die Reaktion, die in Abschnitt 1.2 (S.9) beschrieben wurde, katalysieren zu können, folgen die UGTs (E.C. 2.4.1.173) einem sequentiellen bi-bi-Mechanismus [372]. Dabei werden die Substrate der Reihe nach gebunden und die Produkte nacheinander wieder freigesetzt. Im vorliegenden Fall ist

## 1 Einleitung

die UDP-Glucose das zuerst gebundene Substrat und UDP das zuletzt freigesetzte Produkt. Durch die Verwendung eines aktivierten Substrates handelt es sich bei der Zuckerübertragung um eine exergone Reaktion. Durch die energiereiche Acetalphosphatbindung des Zuckers mit einem NDP kann eine exergone Übertragung des Zuckers stattfinden. Dabei läuft die Reaktion nur in Richtung der Produkte ab und ist somit nicht umkehrbar [23]. Nur mittels einer Hydrolase können beide Komponenten, Sterol und Zucker, wieder freigesetzt werden. Bisher wurden nur in Pflanzen (*Sinapis alba* und *Nicotiana tabacum*) SGlc-Hydrolasen identifiziert [154, 36].

Hou *et al.* zeigten Ende der 60er Jahre erstmals die *in vitro*-Glucosylierung von Sterolen mit UDP-Glucose an zellfreien Extrakten unreifer Samen der Sojabohne (*Glycine max*) [139]. Die katalytischen Eigenschaften und Reaktionsbedingungen dieser Enzyme wurden schon mehrmals *in vitro* untersucht. Dabei wurde jedoch hauptsächlich mit Pflanzen und weniger mit Hefen oder Schleimpilzen (Myxomyceten) gearbeitet [414, 372, 393]. Bei Tieren konnten bisher keine SGTs identifiziert bzw. charakterisiert werden. Die Klonierung und Expression von SGTs geschah bisher u.a. für die Pflanzen *Avena sativa*, *A. thaliana* [397] und *Withania somnifera* [216] sowie die Hefen *Saccharomyces cerevisiae*, *P. pastoris* und *Candida albicans*, den Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* [393] und für das human-pathogene Bakterium *H. pylori* [187, 188]. *In vitro*-Experimente zur Bestimmung der SGT-Aktivität wurden hauptsächlich mit Homogenaten oder partiell aufgereinigten Enzymen durchgeführt und nur selten mit vollständig aufgereinigten Enzymen [398, 216]. Warnecke *et al.* reinigten beispielsweise die membrangebundene Sterol- $\beta$ -Glucosyltransferase ( $\beta$ -SGlcT, UGT80A1) aus *A. sativa* auf [398].

Alle bisher untersuchten Enzyme zeigten eine engere Spezifität für den Zuckerdonor als für das Sterol. Als Substrat mit der größten Spezifität hatte sich UDP-Glucose herausgestellt. Umgesetzt wurden u.a. auch TDP- und CDP-Glucose, jedoch mit weitaus niedrigeren Umsatzraten [414, 393, 278]. Die Verwendung von UDP-Galactose korreliert vermutlich mit der Präsenz einer UDP-Glucose/UDP-Galactose-Epimerase (Glucose-4-Epimerase, GALE)<sup>9</sup> [413, 278]. Das Enzym  $\beta$ -ErgGlcT der Hefe *P. pastoris* vermag neben Glucose, wenn auch nur in geringem Maße, Xylose zu übertragen [234]. Der Zuckerakzeptor richtet sich nach den vorliegenden freien Sterolen im Organismus. Es liegt eine breite Spezifität vor, wobei jedoch endogen produzierte Sterole bevorzugt werden. Die einzige Voraussetzung für die Umsetzung des Sterols ist das planare Ringsystem mit der  $\beta$ -Hydroxygruppe an der C3-Position und der demethylierten C4-Position. Alles Weitere, wie Doppelbindungen im Ring oder der Seitenkette, sind nicht relevant [414, 413, 372]. Ceramide oder Diacylglyceride können nicht als Akzeptoren fungieren [393].

Zudem konnte gezeigt werden, dass negativ geladene Phospholipide die Enzymaktivität (partiell gereinigter Enzyme) stimulieren können [371, 373, 372], wobei die Enzymaktivität in Homogenaten durch eine Lipidzugabe nicht beeinflusst werden konnte [278]. Membrangebundene Enzyme können hypothetisch durch die natürliche Lipidumgebung der Membranen *in vivo* reguliert werden. Ein positiver Effekt kann ebenfalls durch die Zugabe des Detergens Triton X-100 erreicht werden, welches zur Solubilisierung des Enzyms, z.B. bei präparationsbedingter Vesikelbildung, beiträgt [278].

Nach der Erläuterung von SGs und SGTs soll im nächsten Abschnitt näher auf die charakteristischen Eigenschaften von  $\beta$ -SGTs eingegangen werden.

---

<sup>9</sup>katalysiert die Änderung der Konfiguration der Hydroxygruppe am C4-Atom.

## 1.3 Sterol- $\beta$ -Glucosyltransferasen - Wo kommen sie vor und welche Charakteristika weisen sie auf?

SGlcTs sind sowohl in Pflanzen, Pilzen als auch Bakterien vorzufinden, wobei Sterol- $\beta$ -Glucosyltransferasen ( $\beta$ -SGlcT) dominieren. AS-Sequenzalignments verschiedener  $\beta$ -SGlcTs aus Pflanzen, Pilzen und dem Echten Schleimpilz *D. discoideum* ergaben, dass diese Organismen eine  $\beta$ -SGlcT oder mehrere (1-9) Isoenzyme enthalten, die zudem aufgrund diverser Proteindomänen bzw. subzellulärer Lokalisierungssignale in Gruppen unterteilt werden können (Abb.1.5). Pflanzen besitzen zwei bis drei Isoenzyme, Hefen und *D. discoideum* hingegen nur ein Isoenzym und filamentöse Pilze bis zu neun Isoenzyme [396]. Im Carboxyterminus zeigen die Enzyme eine signifikante Sequenzähnlichkeit auf, während der Aminoterminus nur in einigen Bereichen konserviert vorliegt. Die Enzyme enthalten die katalytische Domänen neben einem amino- oder carboxyterminalen Bereich, der jeweils Domänen enthalten kann. Pflanzlichen Enzymen fehlen die ersten 820 AS [393] sowie auch den Enzymen aus filamentösen Ascomyceten [106].

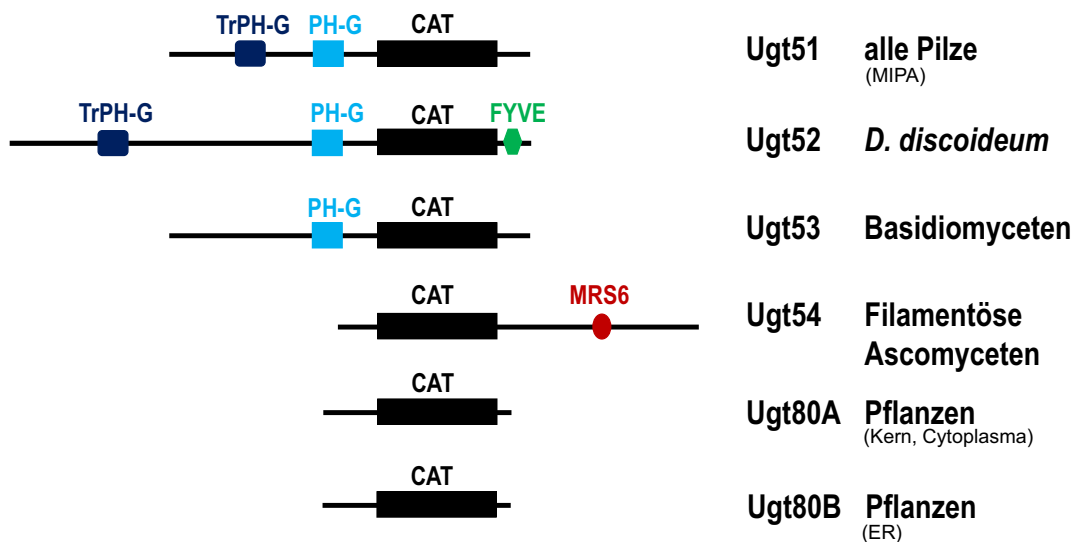


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung von  $\beta$ -SGlcT-Isoformen mit verschiedenen nicht-katalytischen Domänen.

Pilze und Pflanzen besitzen verschiedene  $\beta$ -SGlcT-Isoformen [106]. Rechts sind die Isoformen, die zugehörigen Organismen und soweit bekannt die intrazelluläre Lokalisation dargestellt. Linksseitig befindet sich die schematische Darstellung der Proteindomänen der Enzyme. TrPH-G: verkürzte (*truncated*) Pleckstrin-Homologie-GRAM-Domäne, PH-G: PH-GRAM-Domäne, MRS6 (VPS13: Vakuoläre-Protein-Sortierungs-assoziierte)-Domäne (Hefehomolog des Choroideremia-Gens aus Säugern, [390]), FYVE: FYVE-Finger, CAT: katalytische Domäne, MIPA: "Micropephagic Apparatus" (entnommen aus [396, 106]).

Die dargestellte Einteilung basiert auf der Präsenz spezieller amino- und carboxyterminaler nicht-katalytischer Domänen. Die Pleckstrin-Homologie-Domäne, die PH-GRAM-Domäne und der FYVE-Finger sind für die Bindung von Proteinen an Phosphatidylinositol-Phosphate (PIPs, auch Phosphoinositide (PIs) genannt) verantwortlich [196, 99, 262, 425, 195]. Die Funktion der MRS6-Domäne ist bisher unbekannt. Es wird angenommen, dass auch diese Domäne eine Funktion bei der reversiblen Assoziation der Enzyme an intrazelluläre Membranen (bzw. PIP-haltige Membransysteme) inne hat, da im Protein keine hypothetischen Transmembrandomänen vorliegen. Dies entspricht



der Vorstellung, dass SGTs, die ein membrangebundenes Substrat, das Sterol, nutzen, zumindest kurzfristige (reversible) Membrankontakte eingehen. Die Enzyme sind auf der cytosolischen Seite der Membran lokalisiert, und die benötigten UDP-Zucker kommen ebenfalls im Cytoplasma vor. Aufgrund des kurzen Aminoterminus konnten keine nicht-katalytischen Domänen für pflanzliche Sterol- $\beta$ -Glucosyltransferasen identifiziert werden. Infolgedessen ist die Interaktion dieser Enzyme mit Membranen gänzlich unaufgeklärt.

Die subzelluläre Lokalisierung der Enzyme kann mittels Fluoreszenzprotein-Reporterkonstrukten untersucht werden. Kenntnisse über die Lokalisierung(en) der Enzyme kann die Aufklärung der unterschiedlichen biologischen Funktionen von SGlcS in verschiedenen Membransystemen auf molekularer Ebene unterstützen (s. 1.4.3, S.22). Im weiteren Verlauf dieses Abschnitts soll etwas näher auf die diversen nicht-katalytischen Domänen und deren Verbindung mit der Enzymlokalisierung sowie auf die katalytische Domäne der SGTs eingegangen werden.

### 1.3.1 Nicht-katalytische Domänen begünstigen Membranassoziation

Die **GRAM-Domäne** erhielt ihren Namen durch die Reihenfolge der Proteine, die sie enthält: **G**lucosyltransferasen, **R**ab-like-GTPase-Aktivatoren und **M**ytotubularine [69]. Entdeckt wurde diese Domäne durch einen *PSI-BLAST*<sup>10</sup> des Aminoterminus der  $\beta$ -SGlcT aus *D. discoideum* und besteht aus 50 bis 70 AS. Der GRAM-Domäne wird eine protein- und lipidbindende Funktion zugewiesen. Den bislang einzigen Beweis lieferten Oku *et al.*, die anhand der Deletion des entsprechenden Sequenzabschnitts im  $\beta$ -ErgGlcT-codierenden Gen *Ugt51B1* aus *P. pastoris* zeigten, dass diese Domäne für die korrekte Lokalisierung des Enzyms benötigt wird [262]. Die Lokalisierung wird vermutlich durch die Rekrutierung des Enzyms an eine spezielle, intrazelluläre Membran durch dortige Phosphatidylinositol-4-Monophosphate (PI(4)Ps) vermittelt [425, 424]. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass alle GRAM-tragenden Proteine membranassoziiert vorliegen und alle anderen nicht-katalytischen Domänen, die zusammen mit der GRAM-Domäne in Proteinen vorkommen, in Prozesse der Membranassoziation involviert sind [69].

Die **PH-Domäne** ist in den verschiedensten Proteinen vorzufinden und ca. 100-110 AS groß. Sie wurde aufgrund ihrer Homologie zu amino- und carboxyterminalen Domänen des Pleckstrin-Proteins identifiziert, welches eine Rolle in Signaltransduktionsprozessen als Hauptbestandteil der Proteinkinase C sowie auch in Cytoskelettorganisationsprozessen einnimmt [122, 225, 98, 147, 272, 302]. Aufgrund dieser Grundlage wurde diese Domäne als **Pleckstrin-Homology domain** bezeichnet. PH-Domänen sind an der Membranlokalisierung von Proteinen beteiligt, indem sie an PIs - hauptsächlich an PI(3,4,5)P<sub>3</sub> und/oder PI(3,4)P<sub>2</sub> - binden [196, 195]. Jedoch trifft dies nicht auf alle PH-Domänen-tragenden Proteine zu. Weniger als 10% aller PH-Domänen binden an PIs mit einer hohen Spezifität und Affinität. In diesen Fällen dienen als Bindungspartner nur PIs, deren Inositolkopfgruppe zwei benachbarte Phosphatgruppen trägt. PI(3)P, PI(5)P und PI(3,5)P<sub>2</sub> werden somit unspezifisch und nicht affin gebunden. Diese hochaffinen Domänen ermöglichen eine Umsetzung des Substrates durch das Enzym, ohne dass das Enzym während des gesamten Prozesses von der Membran dissoziieren und wieder assoziieren muss. Die restlichen 90% gehen nur unspezifische Bindungen ein. Dies liegt

---

<sup>10</sup> *Position-Specific Iterative BLAST*: Zur Identifizierung entfernter Verwandter eines Proteins.

## 1 Einleitung

in ihrer niedrigen Affinität begründet. Somit lassen sich diese Domänen entsprechend ihrer Affinität in *high*- und *low-affinity* PH-Domänen unterteilen [196].

Wie zuvor erwähnt, müssen Proteine mit *high-affinity* Domänen nicht von der Membran dissoziieren. Doch wie verhält sich dies bei Proteinen mit sogenannten *low-affinity* Domänen? Lemmons und Ferguson (2000) beschrieben hierzu die Möglichkeit einer Bündelung aller Affinitäten aufgrund von Proteinoligomerisierung (Avidität). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass diese Proteine für die Membranassoziation mit einem anderen Protein interagieren müssen, welches die Membranbindung fördert. Als Kandidaten wurden kleine GTPasen der Arf-(*ADP-ribosylation factor*)-Proteinfamilie identifiziert [193, 194]. Alle bisher genannten Fakten konnten durch eine Untersuchung von 33 PH-Domäne-tragenden Proteinen aus *S. cerevisiae* nachgewiesen werden [433]. Die Proteine wurden in Bezug auf ihre Bindungsfähigkeit an PIs untersucht. Nur ein Protein (entspricht 3%) mit einer *high-affinity* Domäne konnte identifiziert werden. Die isolierte PH-Domäne der  $\beta$ -SGlcT (UGT51A1) von *S. cerevisiae* zeigte in *in vitro*-Experimenten nur unspezifische Bindungen an PIs und *in vivo* eine Lokalisierung des PH-GRAM-GFP-Fusionskonstrukts im Cytoplasma.

Neuere Studien fassen beide bisher beschriebenen Domänen als ***PH-GRAM-Domäne*** zusammen. Dies begründet sich auf der Entdeckung, dass die GRAM-Domäne Teil eines größeren Motivs ist, nämlich der PH-Domänen-Faltung [18]. Sequenzanalysen verifizierter GRAM-Domänen (auch jener von  $\beta$ -SGlcTs) wiesen hoch konservierte Bereiche auf, und es wurde postuliert, dass die GRAM-Domänen alle Teil eines PH-GRAM-Strukturmotivs sind. Dies lässt auch die Annahme zu, dass PH-Domänen nicht nur der reinen Bindung an PIs dienen, sondern eine Faltungsstruktur konservieren: Ein  $\beta$ -Sandwich aus zwei orthogonalen  $\beta$ -Faltblättern bildet einen hydrophoben Kern, aus welchem drei variable Schleifen ragen, und an der abgespreizten Seite befindet sich eine amphipathische  $\alpha$ -Helix [196]. Diese spezielle Faltung ermöglicht wahrscheinlich die Bindung unterschiedlichster Liganden. Berger *et al.* zeigten, dass in einem MTM-verwandten Protein 2 (MTMR-2, *myotubularin-related protein 2*) eine PH-GRAM-Domäne für die Bindung an PI(3,5)P<sub>2</sub> und PI(5)P verantwortlich ist und somit zur Membranassoziation beiträgt [25].

Nach Vorstellung universell vorkommender Proteindomänen sollen nun spezifische Proteindomänen behandelt werden. Diese Domänen treten in Proteinen von bestimmten Organismen auf. Dazu zählt die ***MRS6-Domäne*** (vorkommend in filamentösen Ascomyceten) und der ***FYVE-Finger*** (aus *D. discoideum*).

Die in diesem Abschnitt beschriebene Domäne wird in dieser Arbeit MRS6-Domäne genannt, da ein Abgleich von humanen VPS13-Proteinen und UGT54-Proteinen mit der PFAM-Datenbank<sup>11</sup> eine Homologie zu MRS6 aus *S. cerevisiae*<sup>12</sup> feststellte. Die ***MRS6-Domäne*** wurde durch die Analyse zweier humaner VPS13-Proteine, CHAC (VPS13A) und COH1(VPS13B) identifiziert und eine Homologie zu dem VPS13(SOI1)-Protein aus *S. cerevisiae* und seinem Ortholog aus *Schizosaccharomyces pombe* gefunden [285, 370, 171]. Auch weitere VPS-(*vacuolar protein sorting*)-Proteine

---

<sup>11</sup><http://pfam.sanger.ac.uk/>

<sup>12</sup><http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/locus.fpl?locus=MRS6>

wurden in *S. cerevisiae* entdeckt und untersucht. Diese sind an der Membranproteinsortierung von Golgi-Apparat zu Vakuole beteiligt, wobei das VPS13-Protein speziell für den Transport zwischen Trans-Golgi-Netzwerk und dem prävakulären Kompartiment (spätes Endosom) vermittelt [40, 207]. Es konnte gezeigt werden, dass das im Cytosol vorliegende VPS13-Protein an die Membranen beider Kompartimente bindet. Inwiefern die VPS13-Domäne an dieser Bindung beteiligt ist, konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Neben CHAC (Vps13A, *chorein2*) und COH1 (Vps13B) wurden 2004 weitere humane Proteine mit einer VPS13-Domäne identifiziert: die humanen Proteine VPS13C und VPS13D [379]. Diese Proteine und weitere Proteine mit dieser Domäne werden “VPS13-like proteins” genannt. Mutationen in den humanen Proteinen CHAC und COH1 resultieren in schweren Erkrankungen wie Chorea-Akanthozytose und dem Cohen-Syndrom, zwei autosomal-rezessiven Erkrankungen [285, 171].

Ein Sequenzalignment pilzlicher UGT54-Proteine weist hohe Ähnlichkeiten in einer carboxyterminalen Region mit dem VPS13-Protein auf. Diese exklusive Region, hier MRS6 genannt, besteht aus ca. 60 AS [106]. Die Präsenz von MRS6 sowohl in VPS13-Proteinen als auch in SGTs der Ugt54-Familie weist darauf hin, dass diese Proteine möglicherweise mit denselben (bisher unbekannt) Membransystemen interagieren.

Der **FYVE-Finger** wurde analog zur GRAM-Domäne nach der Reihung der identifizierten Proteine benannt: **F**ab1, **Y**OTB, **V**ac1, **E**EA1 [341]. Diese Domäne besteht aus einer  $\alpha$ -Helix und zwei einfachen  $\beta$ -Faltblättern. Diese Struktur erreicht ihre Stabilität durch eine Komplexbindung von zwei Zink-Ionen mit vier Cysteinresten [180], wobei das dritte und vierte Cystein mit folgendem Motiv in Verbindung gebracht wird: R(R/K)HHCRxCG [340]. Die zwei  $\beta$ -Faltblätter formen eine Art “Tasche”, welche die in die Tasche “passende” Bindung an den Inositolphosphatring fördert [99]. Die Domäne selbst vermittelt eine hochspezifische und affine Bindung an PI(3)Ps und trägt zur Proteinlokalisierung an Membranen bei [93, 270, 195]. Vorwiegend wurde die FYVE-Domäne in Proteinen gefunden, die eine Funktion in der Proteinsortierungsmaschinerie, der Signaltransduktion und der Organisation des Aktin-Cytoskeletts inne haben [340].

### 1.3.2 Tragen die nicht-katalytischen Domänen zur intrazellulären Lokalisierung von SGLcTs bei?

Die intrazelluläre Lokalisierung von SGLcTs wurde hauptsächlich in pflanzlichen Systemen untersucht. Nach differentieller Zentrifugation und anschließender Messung der Aktivität der Membranfraktionen konnte eine Korrelation der Enzymaktivität mit der Lokalisierung von SGLcs gezeigt werden (s. 1.4.2, S.21). Von Ullmann *et al.* wird die Plasmamembran (PM) als Syntheseort angegeben [372]. Des Weiteren konnte Aktivität auch in Membranfraktionen des Golgi-Apparates, welcher durch Vesikeltransportprozesse mit der PM “verbunden” ist, detektiert werden [372, 394]. Eine Aktivität im ER wurde seltener beobachtet.

Durch Verifizierung der Enzym-codierenden Gene konnte auch die Expression von GFP-Fusionskonstrukten zur Lokalisierung beitragen<sup>13</sup>. So zeigten Huh *et al.* eine Lokalisierung der UGT51A1 von

---

<sup>13</sup>siehe auch: *UCSF yeast GFP fusion localization database*: <http://yeastgfp.ucsf.edu>

## 1 Einleitung

*S. cerevisiae* im Cytoplasma [144]. Oku *et al.* [262] und Yamashita *et al.* [425, 424] zeigten die Rekrutierung von UGT51B1 in *P. pastoris* nach Änderung der physiologischen Konditionen an eine spezielle intrazelluläre Membran, an die das Enzym kurzfristig (transient) bindet (s. 1.7.2, S.37). Die Lokalisation der beiden pflanzlichen Enzyme UGT80B1 und UGT80A2 aus *A. thaliana* erfolgte in epidermalen Zwiebelzellen, dabei konnte UGT80A2 sowohl im Kern als auch im Cytoplasma lokalisiert werden und UGT80B1 im ER [179]. Das Enzym könnte an der cytosolischen Seite mit der ER-Membran assoziiert sein, da die UDP-Zucker nur im Cytoplasma vorliegen. Eine Lokalisierung im Cytoplasma und Kern überrascht, da das membrangebundene Sterol nur membran-nah umgesetzt werden kann, auch hier könnte ein transients Membrankontakt eine Rolle spielen. Ein potentielles Kern-Lokalisierungssignal konnte jedenfalls identifiziert werden [179]. Andere Forschergruppen fanden UGT80 auch in der PM, in Golgi-Vesikeln, in der ER-Membran sowie gelegentlich in jener des Tonoplasten [119, 430, 371, 65].

Aufgrund der bisher durchgeführten Studien konnte folgende Hypothese formuliert werden: Die nicht-katalytischen Domänen sind für die Lokalisierung der Enzyme zuständig, dadurch entstehen transiente Membrankontakte, und die Biosynthese kann gezielt am jeweiligen Syntheseort ablaufen.

### 1.3.3 Die katalytische Domäne enthält vier konservierte Bereiche

Der Aminoterminus und auch der Carboxyterminus verschiedener  $\beta$ -SGlcTs zeigt verschiedene Motive. Neben diesen wurde in der carboxyterminalen Region mit ca. 360 AS die katalytische Domäne identifiziert. Diese zeigte nach *Alignments* pilzlicher und pflanzlicher  $\beta$ -SGlcTs große Ähnlichkeit auf. Dabei konnten vier stark konservierte Regionen identifiziert werden [393] (Abb.1.6). Die konservierten Bereiche *Box 1* und *Box 3* finden sich auch in Proteinen von Prokaryoten, die der UGT-Superfamilie angehören, aber sind nicht präsent in anderen (hier nicht gezeigten) eukaryotischen Mitgliedern. Nahe des carboxyterminalen Endes wurde eine Region von 29 AS (*Box 4*) gefunden, die einer sogenannten "Signatur-Sequenz" entspricht, welche charakteristisch für die Superfamilie der NDP-Zucker-GTs ist und wahrscheinlich die UDP-Zucker-Bindestelle repräsentiert [214]. Eine weitere Region, *psbd* (*putative steroid binding domain*) genannt, repräsentiert die hypothetische Steroid-Bindestelle. *Box 2*, ein weiterer konservierter Bereich, kommt speziell in  $\beta$ -SGlcTs vor. Die Funktion dieser Domäne wurde bisher noch nicht aufgeklärt [393].

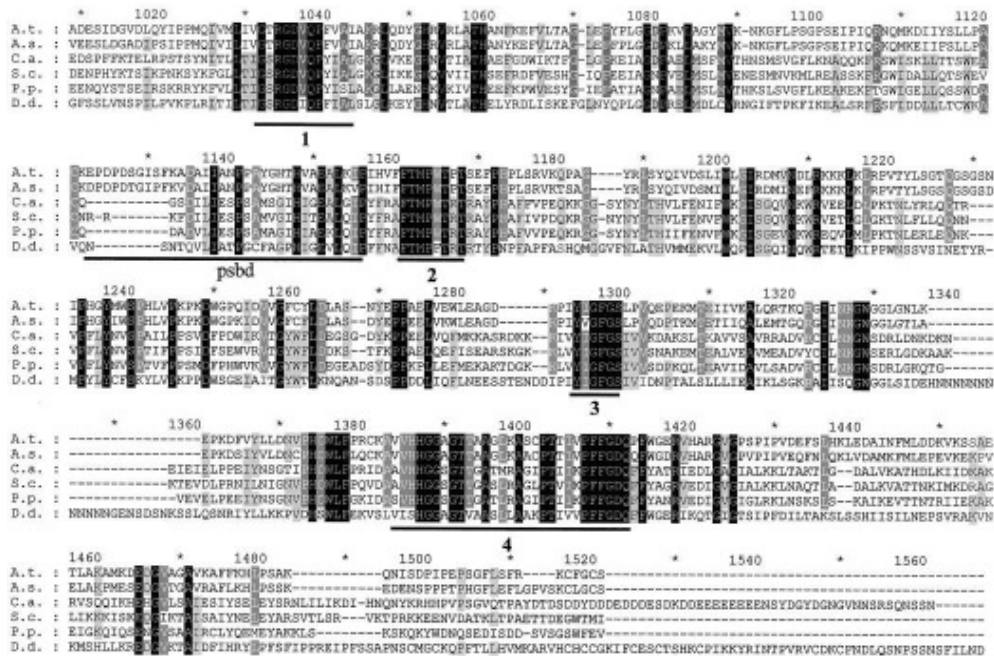


Abbildung 1.6: Sequenzalignement der katalytischen Domänen diverser  $\beta$ -SGlcTs.

Die gezeigten Sequenzen der katalytischen Domäne (AS 1030-1425) stammen von folgenden Organismen: *A. thaliana* (A.t.), *A. sativa* (A.s.), *C. albicans* (C.a.), *S. cerevisiae* (S.c.), *P. pastoris* (P.p.) und *D. discoideum* (D.d.). Schwarz gekennzeichnete Bereiche zeigen in allen Sequenzen identische AS. Graue Bereiche zeigen identische AS in vier oder fünf Sequenzen. In dieser Region wurden vier konservierte Bereiche markiert: *Box 4*: Signatur-Sequenz der UDP-GT-Superfamilie. Die *psbd*-Region (*putative steroid-binding domain*). *Box 1-3*: charakteristische Bereiche für Enzyme von Prokaryoten. *Box 2*: charakteristisch für  $\beta$ -SGlcTs (aus [393]).

Nachdem die Charakteristika der SGTs erläutert wurden, soll im nächsten Abschnitt nun auf das Vorkommen, die intrazelluläre Lokalisation und die biologische Funktion von SGs eingegangen werden.

## 1.4 Präsenz, intrazelluläre Lokalisierung und biologische Funktionen von SGs

SGs sind im gesamten Organismenreich präsent. Hauptsächlich sind sie in Eukaryoten (stets  $\beta$ -glycosidisch verknüpft) und nur in wenigen Prokaryoten (auch  $\alpha$ -glycosidische Bindungen möglich) vertreten (s. 1.5, S.26). Obwohl diese Lipide aus den unterschiedlichsten Organismen isoliert werden konnten, sind sie nicht generell als Membranbestandteil in all diesen Organismen zu betrachten, sondern können aufgrund ihrer intrazellulären Lokalisation diverse Funktionen erfüllen. Auf alle genannten Aspekte soll nun näher eingegangen werden<sup>14</sup>.

<sup>14</sup>Weiterführende Angaben über Vorkommen, Lokalisation und Funktion von SGs können auch dem *Review* von Grille *et al.* entnommen werden [106]

### 1.4.1 In welchen Organismen sind SGs vertreten?

In Pflanzen kommen SGs ubiquitär vor. Zu den untersuchten Pflanzen zählen u.a. *A. thaliana* und *A. sativa* [397]. Bei den Enzym-Produkten handelte es sich stets um Steryl- $\beta$ -Glucoside ( $\beta$ -SGlcs). Auch in Algen sind diese Lipide vertreten und konnten in verschiedenen Grün-, Braun- und Rotalgen nachgewiesen werden [70]. Eine tabellarische Auflistung von SGs eukaryoter Algen, monokotyle und dikotyle Pflanzen ist der Arbeit von F. Müller zu entnehmen [234].

Neben den Pflanzen kommen SGs ebenfalls in filamentösen Pilzen sowie auch in Hefen, Oomyceten (Algenpilze) und Myxomyceten (Echte Schleimpilze) vor. Die Sterolderivate können jedoch nicht von allen Pilzen synthetisiert werden. Eine Ausnahme bei den Hefen bildet *S. pombe* (*fission yeast*): In dieser Hefe konnte kein SG sowie kein codierendes Gen für eine SGT identifiziert werden<sup>15</sup> [241]. In tierischen Geweben konnten bisher nur einige SGs nachgewiesen werden. Cholesteryl- $\beta$ -Glucoside ( $\beta$ -CholGlc) konnten bisher aus verschiedenen Quellen isoliert werden: der Schlangenhaut [1], der Hühnerepidermis [406], humanen Fibroblasten und dem Rattenmagen [176, 178]. In der menschlichen Leber konnten Muhiudeen *et al.* [239] nach NMR<sup>16</sup>-spektroskopischer Analyse “3-O- $\beta$ -D-glucopyranuronosyl-cholesterol” nachweisen. Eine Variation, das Cholesteryl- $\beta$ -Galactosid ( $\beta$ -CholGal), konnte im Rattenhirn von Hungund *et al.*[145] nach radioaktiver Markierung der Lipide möglicherweise identifiziert werden. Es sollte in diesem Fall beachtet werden, dass der Rückschluss auf dieses Lipid bisher nicht struktur-analytisch belegt wurde.

Auch in Bakterien gibt es einige Vertreter, die SGs aufweisen. Unter den Eubakterien ist zudem auffällig, dass einige phyto- oder zoopathogene Arten SGs aufweisen. Dabei handelt es sich aufgrund des nur durch den Wirt zu Verfügung stehenden Cholesterols im Falle von Zoopathogenität ausschließlich um Cholesterylglycoside. Diese Glycolipide liegen überwiegend als  $\beta$ -Anomere vor, wohingegen die  $\alpha$ -Anomere in nur wenigen Prokaryoten nachgewiesen werden konnten. Eine tabellarische Zusammenfassung des Vorkommens von SGs in allen Organismenreichen ist Tabelle 1.1 zu entnehmen.

Nähere Erläuterungen zu den SGs aus *Borrelia spec.*, *H. pylori* und Pilzen können den Abschnitten 1.5 und 1.6 (S.26 und 31) entnommen werden.

---

<sup>15</sup>siehe UGT-Tabelle: <http://som.flinders.edu.au/FUSA/ClinPharm/UGT/ugt.html>

<sup>16</sup>nuclear magnetic resonance (spectroscopy, Kern(spin)resonanzspektroskopie

# 1 Einleitung

Tabelle 1.1: Vorkommen von SGs.

(modifiziert nach [362])

★: SG wurde mittels Analyse nach Lipidextraktion nachgewiesen.

◇: Nachweis von SGT-Aktivität durch *in vitro*-Enzymassay.

Phylum	Organismus	Besonderheit	Referenz
<b>Algen/ Cyanobakterien</b>	<i>Gracilaria verrucosa</i>	Rotalge	[11] ★
	<i>Nannochloropsis salina</i>	Mikroalge	[236] ★
	<i>Nostoc commune</i>	Cyanobakterium	[71]
	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	marine Diatomee	[389] ★
	<i>Skeletonema costatum</i>	Mikroalge	[236] ★
	<i>Tetraselmis chuii</i>	Mikroalge	[236] ★
<b>Eubacteria</b>	<i>Acholeplasma axanthum</i>	Cholesteryl- $\alpha$ -Diglucosid	[224] ★
	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	Cholesteryl- $\beta$ -Galactosid	[20] ★
	<i>Borrelia hermsii</i>	Cholesteryl- $\beta$ -Glucosid	[309] ★ [205] ★ [334]
	<i>Helicobacter pylori</i>	Cholesteryl- $\alpha$ -Glucosid	[130] ★
	<i>Mycoplasma spec.</i>	Cholesteryl- $\beta$ -Glucosid	[294] ◇
	<i>Mycoplasma gallinarum</i>	Cholesteryl- $\beta$ -Glucosid	[328] ◇
	<i>Spiroplasma citri</i>	Cholesteryl- $\beta$ -Glucosid; Phytopathogen	[269] ★
<b>Mycetozoa</b> (Echte Schleimpilze)	<i>Physarum polycephalum</i>		[244] ★
	<i>Dictyostelium discoideum</i>	zellulärer Acrasiomycot	[121] ★
<b>Oomycota</b>	<i>Pythium sylvaticum</i>	Phytopathogen	[227] ★
<b>Pflanzen</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>		[413]
	<i>Avena sativa</i>		[397]
	<i>Secale cereale</i>		[234]
	<i>Zea mays</i> und viele mehr		[394]
<b>Pilze</b>	<i>Candida albicans</i>	Zoopathogen	[94, 95] ★
	<i>Fusarium graminearum</i>	Phytopathogen	[438] ★ ◇
	<i>Pichia pastoris</i>	methylo trope Hefe	[300] ★
	<i>Rhodotorula bogoriensis</i>	früher: <i>Candida bogoriensis</i>	[78] ◇
	<i>Rhynchosporium secalis</i>	Phytopathogen	[155] ★ ◇ [300] ★
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bäcker-/Brauhefe	[367] ★ [268]
	<i>Sordaria macrospora</i>	Ascomycet	[300] ★
	<i>Ustilago maydis</i>	Phytopathogen	[300] ★
<b>Tiere</b>	Echte Bullennatter ( <i>Pituophis melanoleucus sayi</i> )	Epidermis	[1] ★
	Legehennen ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Epidermis	[406] ★
	Mensch ( <i>Homo sapiens</i> )	Leber	[239] ★
	Mensch ( <i>H. sapiens</i> )	kultivierte Fibroblasten	[176] ★
	Ratte ( <i>Rattus spec.</i> )	Rattenmagen & -hirn	[145] ★, [178] ★

## 1.4.2 Wo sind die SGs intrazellulär lokalisiert?

Die intrazelluläre Lokalisierung von SGs in Pilzen und tierischen Zellen wurde bisher noch nicht untersucht. Lokalisierungsstudien sind bisher nur an Pflanzen durchgeführt worden (*reviewed by* [394]).

## 1 Einleitung

Bretscher und Munro zeigten, dass die Menge von freiem Sterol (FS) graduell vom ER über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran (PM) zunimmt [39]. Änderungen des FS können zu abweichendem Verhalten der Membranproteine führen. Ein ähnlicher Gradient konnte in Pflanzenzellen für SGs und acylierte SGs (Acyl-Sterylglycoside, ASGs) beobachtet werden [42]. Die Sterolderivate sind in diesem Fall nur in geringem Maße in ER und Golgi-Apparat vorhanden, jedoch wurde ein deutlich höherer Anteil (entspricht 40% des Gesamtlipidgehaltes) im Tonoplasten und der PM nachgewiesen [42]. Diese Lipide können bis zu 40 mol% des PM-Gesamtlipidgehaltes repräsentieren [265, 369]. Des Weiteren könnten SGs auch im ER synthetisiert werden und durch Transportprozesse in die Golgi-Membranen, den Tonoplasten und die PM gelangen.

Nachgewiesen wurden SGs im ER, im Golgi-Apparat, in der PM und im Tonoplasten von Wurzeln der Gerste (*Hordeum vulgare*) [42], im Tonoplasten von Primärblättern des Hafers (*A. sativa*) [383], der Mungobohne (*Vigna radiata* L.) [430] und des Brutblattes (*Kalanchoë daigremontiana*) [120]. Dabei bilden SGs (SGIcs und die acylierte Form) die quantitativ wichtigsten Glycolipide der pflanzlichen PM: In *A. thaliana* stellen sie ca. 8 mol% und in *A. sativa* bis zu ca. 30 mol% der Gesamtplasmamembranlipide dar [369, 368]. Bei *A. thaliana* liegt der Anteil der glycosylierten Sterolderivate deutlich unter dem der FS (35 mol%) [368]. Bei *A. sativa* überwiegt der SG-Anteil mit ca. 30 mol% zu 8 mol% FS [369]. In *Solanum tuberosum* konnten sogar mehr als 35 mol% an SGs in der PM nachgewiesen werden. Dieser Wert übersteigt jenen für FS mit 4 mol% deutlich [265].

In den Wurzeln von *Medicago truncatula* (Schneckenklee) liegen SGs in der PM angereichert vor, genauer in *detergent-insoluble membranes* (DIM) - Lipidmikrodomänen - in denen auch FS eine Rolle einnehmen [190]. Diese Membranmikrodomänen spielen eine wichtige Rolle in Signaltransduktions- und Proteinsortierungsprozessen sowie in Wirt-Pathogen-Interaktionen tierischer und Hefe-Zellen. Nach Mongrand *et al.* bilden sich diese Domänen vorwiegend durch das Clustern von Sterolen und Sphingolipiden aus, die in nicht-ionischen Detergenzien bei niedriger Temperatur unlöslich sind [238]. Laloi *et al.* zeigten ebenfalls die Präsenz von Phytosteryl-Glucosiden in DIMs der PM und Golgi-Membranen von *A. thaliana* und *Allium porrum* [183]. SGs und ihre acylierten Formen sollen an der Modulation der Aktivität einer mit DIMs assoziierten PM-H<sup>+</sup>-ATPase beteiligt sein [238, 26]. Eine Interaktion der Tonoplasten H<sup>+</sup>-ATPase von *Oryza sativa* mit DIMs konnte bereits nachgewiesen werden [423]. Als Resümee kann festgehalten werden, dass die SGs neben den (hier nicht näher beschriebenen) Glycosylceramiden und Galactolipiden (in der Thylakoidmembran) zu den quantitativ wichtigsten Glycolipidklassen zählen [21, 394, 106].

### 1.4.3 Die biologischen Funktionen von SGs

Membranlipide erfüllen als Bestandteil von Biomembranen generelle Funktionen: mechanische Isolierung der Zelle von der Umwelt, Aufbau eines Membranpotentials (u.a. zur Energiegewinnung) und Kompartimentierung der eukaryotischen Zelle. Neben diesen generellen Funktionen fallen auch spezifische Funktionen an. Darunter Erkennungsprozesse, Proteinverankerung, (reversible) Assoziation von Proteinen an Membranen, Membranfusion mit Vesikeln sowie als *second messenger* in intra- und interzellulären Signaltransduktionsprozessen. Spezielle Funktionen sind zumeist mit bestimmten Lipiden des jeweiligen Organismus verknüpft, welche diese Funktionen erfüllen.

Sterole, welche Biomembranen eine höhere Starrheit verleihen, erfüllen aufgrund ihrer physiko-



## 1 Einleitung

chemischen Eigenschaften andere Funktionen als ihre Derivate, die SGs. Durch die Verknüpfung mit einem Zucker werden die Sterolderivate deutlich hydrophiler. Bisher ist bekannt, dass SGs in den verschiedensten biologischen Prozessen wichtige Funktionen einnehmen. Auf der molekularen Ebene konnte diese Aussage jedoch noch nicht verifiziert werden. In diesem Abschnitt sollen nun Funktionen von SGs in Pflanzen (Celluloseaufbau etc.), Stress, Wachstum und auch als Neurotoxin behandelt werden. Die biologische Funktionen von SGs der Prokaryoten *B. burgdorferi*, *B. hermsii* und *H. pylori* sowie filamentöser Pilze und Hefen bezüglich Pathogenität und Peroxisomendegradation werden in den nachfolgenden Abschnitten 1.5, 1.6 und 1.7 (S.26, 31 und 34) separat beschrieben.

### SG-Funktionen in Pflanzen

In Pflanzen wird dem Sitosteryl- $\beta$ -Glucosid eine Funktion als Startermolekül (Primer, Glucose-Donor) in der Cellulosebiosynthese in Baumwollpflanzen (*Gossypium spec.*) zugeschrieben [274]. *In vitro*-Experimente zeigten, dass die Glucose-Moleküle der  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,4-Glucane aus dem SGlc-Molekül hervorgehen [264]. *In vivo* entstehen durch Bindung weiterer Glucosemoleküle an das Sitosteryl- $\beta$ -Glucosid, dessen Synthese an der inneren Plasmamembranseite stattfindet, Sitosterol-Cellodextrine. Diese werden dann zur Außenseite der Membran transportiert. SGlcs dienen demnach als Primer, aus dem nach mehreren Glucosylierungen mit Hilfe der Cellulose-Synthase Cellodextrine (kurze Glucanketten) entstehen. Peng *et al.* vermuteten, dass ein Enzym an der Außenseite der Plasmamembran, die Korrigan-Cellulase, die Cellodextrine vom Sterol abspaltet und auf den Cellulose-Synthase-Komplex überträgt [274]. Durch den transmembranen rosetten-artigen Cellulose-Synthase-Komplex werden die Cellodextrine elongiert und  $\beta$ -1,4-Glucanketten (Cellulose) entstehen [286]. Der Einfluss von SGlcs auf den Celluloseaufbau bleibt jedoch spekulativ. Von *A. thaliana* *Ugt80A2*- und *Ugt80B1*-Einzel- und Doppelmantanten wurden Samen, Schoten, Blüten sowie Stängel analysiert und kein Einfluss der Sterol-Glucosylierung auf das Celluloselevel festgestellt [65]. Dabei sollte Beachtung finden, dass ein SGlc-Defizit das Celluloselevel beeinflusst. Möglich ist auch, dass Spuren des Sitosteryl- $\beta$ -Glucosids nur eine unwesentliche Rolle in diesem Prozess einnehmen. In pflanzlichen Systemen (genauer in *Phaseolus vulgaris*, Gartenbohne) verwendet ein weiteres Enzym (unter Aufwendung von Adenosintriphosphat, ATP) das Glucosemolekül des Sterolderivates: Die Glucosylceramid(GlcCer)-Synthethase. Diese katalysiert die Glucosylierung eines Ceramides, und das SGlc-Molekül fungiert dabei als intermediärer "Carrier" der Glucose. Es wird angenommen, dass das auf cytoplasmatischer Seite synthetisierte SGlc durch die Membran transloziert wird ("transbilayer flopping") und auf apoplastischer Seite als Glucose-Donor anstelle von UDP-Glucose für die GlcCer-Synthese dient [209].

Hillig *et al.* zeigten, dass die GlcCer-Synthethase aus *Gossypium arboreum* *in vitro* Sterole glucosylieren kann, aber auch SGlc-unabhängig agiert [129]. Weiterhin dienen SGlcs von Pflanzen als Substrate der membrangebundenen Sterylglycosid-Hydrolase (katalysiert die Hydrolyse zu freiem Sterol) und der Sterylglycosid-Acyltransferase (katalysiert den Transfer eines Acyl-Rests an die Hydroxygruppe der C6-Position des Zuckers).

Es liegt nahe, dass die Verwendung oder enzymatische Umsetzung dieser Sterolderivate einen Bezug zur Regulierung der Menge von freiem Sterol hat und dieses Level immer den zellulären Ansprüchen anpasst [371, 372]. Eine Regulierung hätte folglich auch Auswirkungen auf die Membraneigenschaften

## 1 Einleitung

ten und den Lipidtransfer, da freie Sterole aufgrund ihrer Polarität schneller zwischen den Monolayern wechseln können als SG und ASG [136].

### SG und Stress

Weiterhin wird SGs eine Funktion in Stress-Situationen zugeschrieben. Freie Sterole sind, wie bereits schon genannt, in Lipidmikrodomänen involviert. Die Glucosylierung dieser Sterole könnte bestimmte Signaltransduktionswege in frühen Stress-Stadien aktivieren. Beobachtet wurde dies im Falle von Hitzestress u.a. in Säugerzellen [176].

Auch die Hefe *P. pastoris* steigert ihren SGlc-Gehalt unter Stressbedingungen (Nährstoffmangel, Hitze-, Ethanol-Stress) [300]. Bei *Physarum polycephalum* (Echter Schleimpilz) und in humanen Fibroblasten wird die SGlc-Biosynthese ebenfalls durch Hitze induziert [245, 244, 176]. Die Zugabe von exogenem Cholesterylglucosid zu kultivierten humanen Fibroblasten aktiviert die Induktion der  $\beta$ -SGlcT und die Synthese des Sterolderivates sowie einen durch den Hitzeschock-induzierten Signaltransduktionsweg. Dabei aktiviert das SGlc den *Heat Shock Factor-1* (Transkriptionsfaktor HSF-1), der an ein *Heat Shock Element* (HSE) bindet und zur Induktion der Transkription von *Heat Shock Protein 70* (HSP70) führt [177]. Eine  $\beta$ -SGlcT-Aktivität und Aktivierung des beschriebenen Signaltransduktionsweges konnte auch beobachtet werden, wenn ein Hitzeschock ohne die Zugabe von exogenem Cholesterylglucosid erfolgte [176]. Das Cholesterylglucosid scheint sogar vor Magengeschwüren zu schützen [178]. Dieser cytoprotektive Effekt steht in Zusammenhang mit der schnellen Induktion der Synthese von  $\beta$ -CholGlc nach Stressexposition im Gewebe, besonders im Magen, und weist dem Glycolipid eine Rolle als Mediator eines Signaltransduktionsprozesses (Aktivierung u.a. von HSP70 und nachfolgende Reduzierung von Cytokinen) in frühen Stress-Stadien zu.

Auch bei Kältestress und der nach sich ziehenden Dehydratisierung (“Trockenstress”) durch extrazelluläre Eisbildung von akklimatisierten und nicht-akklimatisierten Pflanzen könnten SGlc (auch Acyl-Sterylglucoside, ASGlc) eine Rolle spielen [210, 265, 369, 368]. Es konnte ein verändertes SGlc/ASGlc-Verhältnis gemessen werden. Die Dehydratisierung einer Membran geht mit einem Übergang in eine nicht-lamellare, invers-hexagonale Phase ( $H_{II}$ ) (Inverse Micellenbildung) einher, d.h. es bilden sich membranbilayer-schädigende Lipidzylinder. Es wird angenommen, dass die gering hydratisierten SGs dazu beitragen. Webb *et al.* zeigten an artifiziellen Membranen, dass die Zugabe von freien Sterolen und ASGlc zu diesem Effekt beitragen [400]. DeBolt *et al.* hingegen zeigten, anhand von *A. thaliana* *Ugt80A2*- und *Ugt80B1*-Einzel- und Doppelmutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT), dass sie bei der Temperaturadaption keine signifikanten Unterschiede feststellen konnten [65]. Sie stellten bei allen Versuchstemperaturen (10-22°C) ein verringertes Wachstum der Pflanzen fest und implizierten eine Rolle der SGlc in Wachstum und Entwicklung. Der Beweis der Rolle der Sterolderivate in der Kältestresstoleranz bzw. Temperaturadaption konnte bisher noch nicht erbracht werden. Dafür nehmen DeBolt *et al.* aufgrund weiterer Experimente an, dass (acylierte) SGs eine Rolle im Transport von Lipidpolyestern-(Cutin und Suberin)-Vorläufern inne haben, da bei den SGT-Mutanten diese Stoffe vermehrt im Cytosol akkumulierten und nicht zur äußeren Schicht des Samens transportiert wurden [65]. Zudem zeigte die *ugt80a2,b1*-Doppelmutante einen verminderten Suberin- und Cutin-Gehalt, so dass ein Einfluss der Glycolipide auf die Bildung der

Lipidpolyester angenommen wurde.

### Funktion von SG in Wachstum und Zelldifferenzierung

In Hefe nimmt das SG eine Rolle in der Metabolisierung von Alkanen ein. So haben Stasyk *et al.* bei *Yarrowia lipolytica* gezeigt, dass diese Hefe Alkane als einzige Kohlenstoffquelle nutzen kann [331]. Ein *knock-out* (KO) des  $\beta$ -SGlcT-Gens ( $\Delta ugt51h1$ ) zeigte ein schlechteres Wachstum mit Decan ( $C_{10}H_{22}$ ) und Dodecan ( $C_{12}H_{26}$ ). Bei höheren Alkanen ist dieses Defizit nicht mehr festzustellen. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Assimilation kurzkettiger Alkane vom SGlc-Gehalt der Plasmamembran sowie einem Endocytose-ähnlichen Pfad abhängt. Daten, die anhand von verschiedenen Sterolkomponenten erhoben wurden, zeigten die Erforderlichkeit von internalisierenden und post-internalisierenden Schritten bei der Endocytose in *S. cerevisiae* [125]. Diese Daten könnten die Hypothese stützen.

Bei *P. polycephalum* wird den Glycolipiden zudem eine Funktion in Zelldifferenzierungsprozessen zugeschrieben. Die Zelldifferenzierung und die Membraneigenschaften der zwei Entwicklungsstadien des Schleimpilzes scheinen miteinander verknüpft zu sein: Im amöboiden Stadium findet keine SGlc-Synthese statt, im plasmodialen Stadium hingegen wird mehr SGlc erzeugt, und die Membran weist eine höhere Fluidität und Instandsetzungsfähigkeit auf [243, 245].

Ghannoum *et al.* zeigten, dass das Hefestadium von *C. albicans* große Anteile von freien Sterolen enthält im Gegensatz zur Myzelform [94]. Einige Male konnten jedoch in der Myzelform mehr SGs und weitere Derivate als freie Sterole detektiert werden. Die Cholesteryl- $\beta$ -Mannoside und andere Sterol-Derivate kommen zumeist nur in Spuren im Hefestadium vor. Eine Beteiligung der SG-Synthese von *C. albicans* am dimorphen Wachstum konnte damals nicht verifiziert werden und somit die Hypothese nicht gestützt werden. Sakaki *et al.* widerlegten 2001 die Vermutung der Korrelation der SG-Synthese mit einem dimorphen Wachstum [300]. Sie konnten weder in der Myzelform noch in der Hefeform SG nach Analyse der Gesamtlipide nachweisen. Zudem verwiesen sie darauf, dass sich ihre Kultivierung der Hefezellen von jener von Ghannoum *et al.* unterschied. Diese Differenzen könnten die konträren Resultate der beiden Gruppen erklären. Zudem zeigte T. Zank, dass die SGT aus *C. albicans* (UGT51C1) in *in vitro*-Enzymassays keine Mannose, sondern nur Glucose transferierte [436].

### SG als Neurotoxin

Auch bei der Entstehung verschiedener humaner Krankheitsbilder sind die SGs beteiligt. Das krankmachende Prinzip (die Etiopathogenese) könnte beim Menschen auf neurotoxischen Eigenschaften der Glycolipide beruhen und dadurch zu verschiedenen, neurodegenerativen Erkrankungen führen. Dazu zählt eine auf Guam auftretende neurodegenerative Erkrankung: ALS/PDC (*amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia-complex*) [231, 312, 208, 335, 32]. Diese beruht vermutlich auf der Nutzung von Stärke aus den Samen der Pflanze *Cycas micronesia* oder *C. circinalis* als Mehl [335]. In dem Mehl wurde ein hoher SGlc-Anteil ( $\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-glucosid) festgestellt, während dies bei anderen Cycad-Toxinen nicht der Fall war [412]. Synthetisch erzeugte SGlcs dieser Art konnten *in vitro* kultivierte Neuronen abtöten [231]. Khabazian *et al.* isolierten neben dem bereits genannten Lipid, welches die höchste Toxizität aufzeigte, noch Campesterylglucosid und

Stigmasterylglucosid [160]. Da alle Pflanzen solche toxischen SGlc produzieren, hängt deren Wirkung vermutlich von der Dosierung ab [208]. Um seine toxische Wirkung entfalten zu können, muss das SG jedoch zuerst aufgenommen werden. Aufnahmestudien von N. Weber und K. H. Pegel an Ratten zeigten eine niedrige Sitosteryl- $\beta$ -Glucosid-Aufnahme [402, 273]. Diese niedrige Absorption von  $\beta$ -SGlc kann nach Studien von Maitani *et al.* im Darm die Aufnahme von Peptid-Therapeutika steigern [218]. Dieser Effekt folgt aufgrund der physikochemischen Eigenschaften des  $\beta$ -SGlc sowie auch der niedrigen intestinalen Absorption. Bisher fehlen Studien, welche die Aufnahme von Sitosteryl- $\beta$ -Glucosiden in Menschen beschreiben.

Es kann zusammengefasst werden, dass die biologische Funktion von SGs immer in Korrelation mit physiologischen Konditionen zu betrachten ist. Biologische Funktionen können sich zwischen Organismen unterscheiden, die andere Lebensweisen aufweisen oder anderen Umweltbedingungen ausgesetzt sind. Untersuchungen zur Rolle der biologischen Funktionen von SGs wurden auch in Pilzen und in den wenigen SG-synthetisierenden Prokaryoten durchgeführt. Auf diese beiden Organismengruppen soll in den folgenden Abschnitten 1.5 und 1.6 (S.26 und 31) etwas näher eingegangen werden, da diese in dieser Arbeit von großer Bedeutung sind.

### 1.5 SGs von *Borrelia spec.* und *H. pylori*

Wie bereits erwähnt, tritt SG sehr viel seltener in Prokaryoten als in Eukaryoten auf. Bisher konnten  $\beta$ -CholGlc in *Mycoplasma spec.* [294], *Mycoplasma gallinarum* [328] und *Spiroplasma citri* [269] sowie in *Borrelia hermsii* [205] identifiziert werden. In *Borrelia burgdorferi* konnte  $\beta$ -CholGal entdeckt werden [137, 20, 309]. Cholesteryl- $\alpha$ -Glucoside ( $\alpha$ -CholGlc) finden sich seltener: U.a. in *H. pylori* [130, 221] sowie in *A. axanthum* auch als acyliertes Cholesteryl- $\alpha$ -Diglucosid [224]. Das für die Glycosylierung benötigte Cholesterol ist für das Wachstum des jeweiligen Bakteriums nicht essentiell, aber es kann bei Bedarf aus der Umgebung aufgenommen und dann mit eigenen Enzymen glycosyliert werden. Dies konnte u.a. für *Mycoplasma spec.* [328, 295], *B. hermsii* [205] und auch *H. pylori* [115] gezeigt werden.

In den nächsten Abschnitten sollen die Organismen *B. burgdorferi*, *B. hermsii* und *H. pylori* sowie die für die Organismen spezifischen SGs näher vorgestellt werden.

#### 1.5.1 *B. burgdorferi* synthetisiert $\beta$ -CholGal & *B. hermsii* $\beta$ -CholGlc

$\beta$ -CholGlc und acylierte Formen<sup>17</sup> wurden erstmals 1978 in *B. hermsii* von Livermore und Johnson [205] identifiziert und das acylierte SG von Stübs *et al.* [334] strukturell aufgeklärt. In einer anderen Spezies, *B. burgdorferi*, wurde eine Variation in Form von Cholesteryl-Acyl- $\beta$ -Galactosiden<sup>18</sup> ( $\beta$ -CholAGal) gefunden. Als weiteres Glycolipid konnte neben dem SG Diacylglycerol- $\alpha$ -Monoga-

<sup>17</sup>Cholesteryl-6'-O-acyl- $\beta$ -D-glucopyranosid

<sup>18</sup>Cholesteryl-6'-O-acyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

## 1 Einleitung

lactosid<sup>19</sup> identifiziert werden [137, 20]. Im selben *B. burgdorferi*-Stamm wurde ebenfalls 2003 von Schröder *et al.* die Vorstufe des acylierten Derivats, das  $\beta$ -CholGal, identifiziert [309].

*Borrelia* stellt eine der Hauptgattungen der *Spirochaeten* dar. Spirochaeten sind gram-negative, bewegliche, enggewundene Bakterien, welche bei Tieren weit verbreitet sind und einige Krankheiten hervorrufen können [215]. Der größte Teil der *Borrelia*-Vertreter sind Zoo- oder Human-Pathogene. Die human-pathogene Art *B. burgdorferi* sensu lato kann in drei Unterspezies eingeteilt werden: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* und *B. afzelii*. Jede dieser Spezies, welche zur *Lyme-Borreliose* führt, zeigt antigene Variationen auf, welche die Bekämpfung dieser Bakterien erschwert [12, 401, 334].

In den meisten Fällen nutzen die Bakterien zur Übertragung auf Mensch oder Tier einen Insektenvektor. *B. burgdorferi* sensu stricto, nachfolgend nur noch *B. burgdorferi* genannt, wird durch Zecken, vor allem durch die Rehzecke *Ixodes dammini* oder die Gewöhnliche Waldzecke *I. ricinus*, übertragen und verursacht die *Lyme-Borreliose* bei Menschen und Tieren vor allem in den USA, aber auch in Europa [44, 336, 337, 338, 401]. Auf der Genom-Ebene erscheint ein weiterer interessanter Aspekt von *B. burgdorferi*: Das Bakterium besitzt ein lineares (statt ringförmiges) Chromosom und bis zu 17 verschiedene zirkuläre und lineare Plasmide [87, 215]. Ein weiterer Aspekt ergibt sich bezogen auf den GC-Gehalt der genomischen DNA der Spirochaeten, dieser beträgt 27-66% und bei *Borrelia* spec. sogar nur 27-32% [12].

*B. hermsii*, der Verursacher des Zecken-Rückfallfiebers (*tick-borne relapsing fever*), nutzt als Vektor die Lederzecke *Ornithodoros hermsi*. Diese Spirochaeten-Art ist endemisch auf den Westen der USA sowie auf den südlichen Teil von British Columbia (Kanada) beschränkt [313].

### Ersetzen Cholesterylglycoside in *Borrelia* spec. das Lipopolysaccharid?

In Bezug auf die Zusammensetzung ihrer Zellwand unterscheiden sich Borrelien von anderen gram-negativen Bakterien. Gram-negative Bakterien besitzen neben der Peptidoglycanschicht eine zusätzliche Schicht, die Lipopolysaccharid-(LPS)-Schicht, welche die Außenseite der äußeren Membran bildet. Die LPS-Struktur setzt sich aus einem Kernpolysaccharid (meist 3-Desoxy-D-manno-oct-2-ulosonsäure, KDO), einem O-Polysaccharid/-Antigen (zumeist Hexosen, hochvariabel) und dem Lipid-Anker, dem Lipid A (Endotoxin), zusammen [185, 215]. Obwohl das LPS in der Spirochaeten-Gattung *Leptospira* nachgewiesen werden konnte [53, 3, 386], fehlt *Borrelia* spec. interessanterweise das typische LPS [351] sowie Phosphatidylethanolamin [19]. Diverse Gruppen wollen jedoch LPS oder LPS-Charakteristika nachgewiesen haben [17, 112, 156]. Takayama *et al.* [351] sowie auch Eiffert *et al.* [74] und Ben-Menachem *et al.* [20] konnten hingegen kein LPS sowie keine LPS-Charakteristika wie KDO, Lipid A oder 3-Hydroxyfettsäuren finden. Für *Treponema* und *Borrelia* konnten stattdessen LPS-like Antigene (früher Lipooligosaccharide LOS genannt, heutzutage LPS-like-Fraktion) nachgewiesen werden [113, 52]. Eine Präsenz von LPS konnte vollständig ausgeschlossen werden, nachdem in die LPS-Biosynthese-involvierte Gene (*Lpx*-Locus) nur im Genom von *Leptospira* nachgewiesen werden konnten und nicht im Genom von *B. burgdorferi* [87, 88, 260, 282, 316]. Es wird vermutet, dass das  $\beta$ -CholAGal und/oder das Diacylglycerol- $\alpha$ -Monogalactosid die Funktionen des LPS in *B. burgdorferi* ersetzen [20]. Der Membranaufbau von gram-negativen Bakterien im Vergleich

---

<sup>19</sup>1,2-Di-O-acyl-3-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-*sn*-glycerol

## 1 Einleitung

zu dem von *Borrelia spec.* ist der nachfolgenden Abbildung 1.7 zu entnehmen.

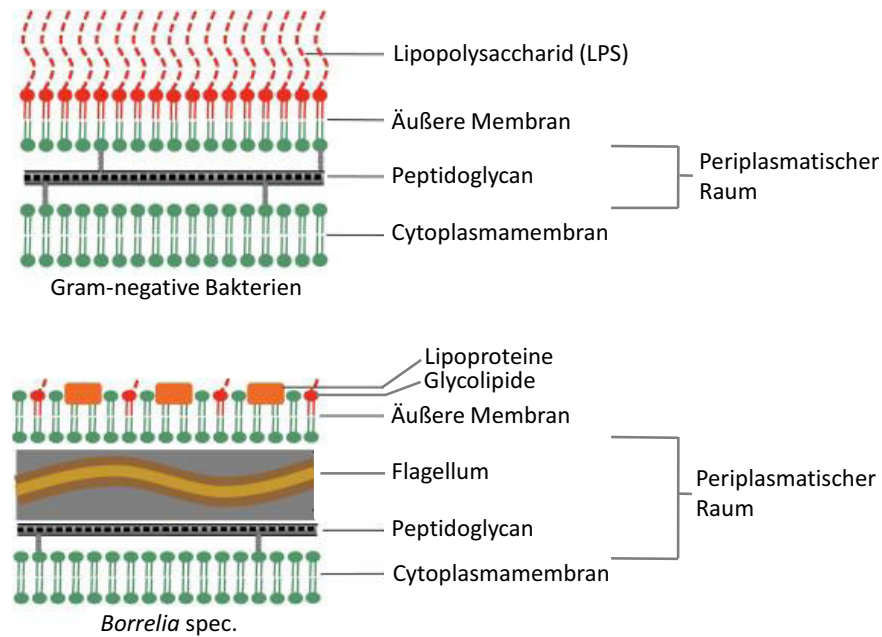


Abbildung 1.7: Membranaufbau von gram-negativen Bakterien und *Borrelia spec.*

Gram-negative Bakterien besitzen im Gegensatz zu gram-positiven Bakterien eine äußere Membran, deren äußere Schicht aus Lipopolysacchariden (LPS) besteht. Bei Spirochaeten steht die äußere Membran nicht in direktem Kontakt zur Peptidoglycanschicht, zudem beherbergt der periplasmatische Raum das Flagellum. Die äußere Membran beinhaltet des Weiteren verschiedene Lipoproteine und Glycolipide. Es sollte unbedingt beachtet werden, dass LPS nur für *Leptospira* nachgewiesen werden konnte und für *Borrelia* und *Treponema* ausgeschlossen wurde (modifiziert nach [308]).

### Acylierte Cholesterylgalactoside zeigen immunogene Wirkung

Es wurde festgestellt, dass das  $\beta$ -CholAGal als Antigen bei der Borreliose in Säugern fungiert. Aufgrund dessen ist die Biosynthese spezifischer Antikörper möglich. Die unacylierten Vorstufe zeigt diese immunogene Wirkung dagegen nicht [137, 20, 309]. Das mit 36% quantitativ häufigste Lipid von *B. burgdorferi*, das Diacylglycerol- $\alpha$ -Monogalactosid wird durch die Aktivität der Monogalactosyl-1,2-Diacylglycerol-Synthase (Bb0454p<sup>20</sup>) synthetisiert [333]. Diese Glycolipid führt zu einer Cytokinin-vermittelten Immunantwort [164]. Das acylierte  $\beta$ -CholGlc von *B. hermsii* zeigt wiederum keine signifikante immunogene Wirkung und ist somit im Gegensatz zum  $\beta$ -CholAGal von *B. burgdorferi* kein aussichtsreicher Kandidat für die Entwicklung eines Impfstoffes bzw. die Verbesserung serologischer Tests [334]. Diacylglycerol- $\alpha$ -Monogalactosid zeigt hingegen eine starke immunogene Wirkung. Neben *B. burgdorferi* sensu lato ist dieses Lipid noch in *B. hermsii* sowie anderen Spirochaeten und Vertebraten vertreten und aus diesem Grund weniger als Kandidat geeignet [339, 206, 205, 334].

<sup>20</sup>Die Bb0000-Nummern entsprechen einer automatischen Genannotierung durch das *B. burgdorferi*-Genomprojekt, welches alle hypothetischen Loci auflistet [87]. In dieser Arbeit werden die ORFs (*open reading frames*) der Gene mit ihrem Bb0000-Code bezeichnet und die Proteine mit Bb0000p.

### 1.5.2 *H. pylori* synthetisiert $\alpha$ -CholGlc

Eines der selten vorkommenden  $\alpha$ -CholGlc<sup>21</sup> konnte in *H. pylori* identifiziert werden [130, 221]. Kurz darauf konnte dieses Glycolipid auch in weiteren *Helicobacter*-Spezies nachgewiesen werden [117, 116, 115]. *Helicobacter spec.* gehört zur  $\epsilon$ -Untergruppe der Proteobakterien und ebenso zu den gram-negativen, beweglichen Spirillen, die mikroaerophil leben können. *H. pylori* ist ein Vertreter der human-pathogenen Spirillen und wurde Anfang der 80er Jahre in menschlichen Darmbiopsien identifiziert. Diese Bakterien kolonisieren den oberen Darmtrakt und größtenteils nicht-invasiv(!) die Magenwand durch Anheften an die Magenschleimhaut-Epithelzellen. Der Krankheitsverlauf kann von einer chronischen Gastritis bis zu einer gastroduodenalen Ulkuskrankheit, zu MALT-Lymphomen (*gastric mucosa-associated lymphoid tissue*-Lymphom) oder zu Magenkrebs fortschreiten [57, 68, 215, 250, 310, 165, 50]. Das Bakterium kann die Immunantwort des Wirts dort modulieren [165, 419].

Das bakterielle Genom von *H. pylori* wurde 1997 von Tomb *et al.* entschlüsselt und auf Genomebene eine Besonderheit festgestellt [364]: Das Bakterium codiert Proteine, die im Vergleich zu anderen Prokaryoten die doppelte Menge der basischen AS Arginin und Lysin enthalten. Für das Überleben des Bakteriums im sauren Milieu des Magens (entspricht ca. pH 2 [215]) wurden verschiedene Strategien entwickelt. Die Präsenz einer Multisubunit-Urease, welche die Umsetzung von Harnstoff zu Ammoniak und CO<sub>2</sub>/Bicarbonat katalysiert und so den pH-Wert des Magensafts lokal erhöht, sichert das Überleben, bevor die Bakterien das fast neutrale, Säureproduktions-freie Milieu der Magenschleimschicht erreichen [310, 165]. Des Weiteren besitzt *H. pylori* die Fähigkeit, bei niedrigem pH-Wert ein invertiertes elektrisches Membranpotential (außen negativ) aufbauen zu können, um den intrazellulären pH neutral zu halten [223, 364]. Zudem sollte beachtet werden, dass *H. pylori* aufgrund seiner eingeschränkten ökologischen Nische, in der Zahl regulatorischer Netzwerke, dem Repertoire an Stoffwechselwegen und seiner Biosynthesekapazität eingeschränkt ist [364].

Für die Auslösung der Krankheitsbilder ist u.a. die Kombination von bakteriellen Pathogenitätsfaktoren und Reaktionen des Wirtsgewebes essentiell. Zu den Pathogenitäts- bzw. Virulenzfaktoren gehören u.a. das VacA-Protein (ein Cytotoxin), das *Helicobacter*-eigene Enzym Urease, das CagA-Protein (Cytotoxin-assoziiertes Gen A-Protein), und das LPS der äußeren Membran [364, 165]. Diese Faktoren tragen zur lokalen Gewebeerstörung und folglich zur Geschwürbildung bei. Das Lipid A des LPS zeigt bei *H. pylori* eine geringere Toxizität auf, und die ausgelöste Phagozytose ist weniger effizient im Vergleich zu dem gram-negativen Enterobakterium *E. coli* [279, 221]. Zusätzlich zu den schon aufgeführten Faktoren wendet *H. pylori* noch eine weitere Strategie an, um sich erfolgreich im Wirtsorganismus einzunisten und sich insbesondere vor dem Immunsystem zu tarnen. Hierfür ist die Präsenz von  $\alpha$ -CholGlc in der Bakterienmembran entscheidend.

Neben dem bereits genannten  $\alpha$ -CholGlc treten in *H. pylori* drei Derivate dieses Glycolipids auf: Cholesteryl-Acyl- $\alpha$ -Glucosid<sup>22</sup> ( $\alpha$ -CholAGlc), Cholesteryl-Phosphatidyl- $\alpha$ -Glucosid<sup>23</sup> ( $\alpha$ -CholPGlc) und Cholesteryl-Lysophosphatidyl- $\alpha$ -Glucosid<sup>24</sup> ( $\alpha$ -CholLPGlc) [130, 187].

Die Quantität dieser Glycolipide ist abhängig von der Morphologie des Bakteriums (Spirale oder

<sup>21</sup>Cholesteryl- $\alpha$ -D-glucopyranoside

<sup>22</sup>Cholesteryl-6'-O-tetradecanoyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid

<sup>23</sup>Cholesteryl-6'-O-phosphatidyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid

<sup>24</sup>Cholesteryl-6'-O-lysophosphatidyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid

## 1 Einleitung

Kokke [321]) oder der Kolonieviation (HpL- oder HpS-Variante [357]). Je nachdem verschieben sich auch die Mengenverhältnisse der Glycolipide. Das zum Wachstum und zur SG-Synthese benötigte Cholesterol kann das Bakterium jedoch nicht selbständig *de novo* synthetisieren [360], sondern ist aufgrund seiner Cholesterolauxotrophie auf seinen eukaryotischen Wirt angewiesen, aus dessen Mageneithelzellen es das Cholesterol absorbiert. Die Absorption erfolgt dabei aus der Plasmamembran der Mageneithelzellen, wobei es zu einer Zerstörung dieser Membran und vorhandenen Lipidmikrodomänen kommt [419]. Nach der Absorption kann das Cholesterol dann durch eigene Enzyme glycosyliert werden. Nach Wunder *et al.* kann das Bakterium Cholesterol in sehr geringen Konzentrationen (bis zu 250  $\mu\text{M}$ ) detektieren und zudem einem ansteigenden Konzentrationsgradienten folgen [419], wobei es zwischen Cholesterol und anderen Steroiden sowie Phospholipiden differenzieren kann. Die Cholesterolaufnahme und Inkorporation selbst wird möglicherweise durch die Aufnahme eines wirtseigenen Proteins - Apolipoprotein A-I - beeinflusst [327].

### **Hp0421p ist erforderlich für die SG-Biosynthese in *H. pylori***

Die Biosynthese aller Cholesterylglucoside von *H. pylori* konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Es ist jedoch bekannt, dass im ersten Schritt die Synthese des  $\alpha$ -CholGlc durch die Aktivität einer  $\alpha$ -CholGlcT (Hp0421p<sup>25</sup>) katalysiert wird. 2006 wurde das Enzym und das codierende Gen *Hp0421* identifiziert und charakterisiert [187, 188]. Einer *H. pylori* KO-Mutante ( $\Delta hp0421$ ) fehlten neben  $\alpha$ -CholGlc auch dessen drei Derivate. Eine heterologe Expression in *E. coli* zeigte, dass Hp0421p die Übertragung der Glucose von UDP-Glucose auf das Cholesterol katalysiert. Zudem wurde festgestellt, dass die Enzymaktivität überwiegend in der Membranfraktion von aufgearbeiteten *H. pylori*-Zellen vorlag [187]. Bisherige Untersuchungen ergaben jedoch keine klare Aussage über die Präsenz einer Transmembrandomäne [186, 362]. Es bleibt unklar, inwiefern Hp0421p die Membran durchspannt und ob die Lokalisierung entweder nur in der inneren oder der äußeren Membran vorliegt oder beide Membranen durchspannt werden. Aufgrund der Verwendung von UDP-Glucose als Substrat liegt es jedoch nahe, dass die Substratbindestelle der cytoplasmatischen Membranseite zugewandt ist [187]. Eine Möglichkeit zur Membranbindung würden amphipathische  $\alpha$ -Helices bieten [24]. Diese wurden durch Analyse der 1,2-Diacylglycerol- $\alpha$ -3-Glucosyltransferase von *A. laidlawii* vorhergesagt und könnten eine "Bindung" an negativ geladene Membranabschnitte fördern. Das  $\alpha$ -CholGlc wird vermutlich von Hp0421p an der Innenseite der bakteriellen inneren Membran synthetisiert. Jedoch zeigten Shimomura *et al.*, dass alle drei *H. pylori*-Glycolipide in der äußeren Membran angereichert vorliegen [322]. Dies impliziert einen Transport des  $\alpha$ -CholGlc von der inneren zur äußeren Membran.

### **$\alpha$ -CholGlc tarnt *H. pylori* vor dem Immunsystem**

Wunder *et al.* zeigten, dass  $\alpha$ -CholGlc in der Wirt-Pathogen-Interaktion von *H. pylori* eine essentielle Rolle einnimmt [419]. Durch die Cholesterolaufnahme wird das Bakterium für das humane Immunsystem erkennbar, und eine Immunantwort tritt in Kraft. Eine *H. pylori*-Infektion löst eine klassi-

---

<sup>25</sup>genauer: UDP-Glucose:Cholesterol- $\alpha$ -D-Glucopyranosyltransferase. Die Hp0000-Nummern entsprechen einer automatischen Genannotierung durch das *H. pylori*-Genomprojekt, welches alle hypothetischen Loci auflistet [364]. In dieser Arbeit werden die ORFs der Gene mit ihrem *Hp0000*-Code bezeichnet und die Proteine mit Hp0000p.



sche, zelluläre, Cytokinin-induzierte und über Typ1-T-Helferzellen-( $T_H1$ -Lymphozyten)-vermittelte Immunreaktion aus. Es wurde festgestellt, dass im Bakterium vorliegendes freies Cholesterol diese Immunantwort *in vitro* vermittelt, da die Beladung von *H. pylori*-Zellen mit Cholesterol zu einer Aufnahme und anschließenden Phagozytose durch Antigen-präsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APCs) führte. Eine Glucosylierung des Cholesterols führt zu Synthese von  $\alpha$ -CholGlc.  $\alpha$ -CholGlc tarnt das Bakterium vor der Erkennung durch das Immunsystem, und es konnte eine eingeschränkte Phagozytierung durch APCs bzw. Makrophagen detektiert werden. Eine Beladung mit dem  $\beta$ -Anomer erzeugte eine vergleichbare Reaktion, wie sie auch für freies Cholesterol vorlag. Sie erzielte den spezifischen Effekt des  $\alpha$ -Anomers nicht und macht somit das Bakterium durch das Immunsystem angreifbar. Die Bedeutung des  $\alpha$ -CholGlc für *H. pylori* konnte auch durch die Generierung einer KO-Mutante ( $\Delta hp0421$ ) festgestellt werden. Diese Mutante büßte ihre gesamte Pathogenität ein und wurde von den Makrophagen phagozytiert. Eine Komplementation mit der  $\alpha$ -CholGlcT führte wieder zum WT-Zustand.

### Die $\alpha$ -CholGlc-Biosynthese kann durch O-Glycane inhibiert werden

*H. pylori* nistet sich in die Magenschleimhautbarriere ein. Diese Schleimschicht besteht aus zwei verschiedenen Typen von Mucinen. Es handelt sich zum Einen um von Epithelzellen der Magenschleimhaut (*Epitheliocyti superficiales gastricae*) sezernierte Mucine und zum Anderen um Mucine aus O-Glycanen mit endständigem,  $\alpha$ -1-4-gebundenem N-Acetylglucosamin, welche von tieferliegenden Drüsenzellen der Eigenschicht (*Lamina propria mucosae*) sezerniert werden [249]. *H. pylori* kolonisiert ausschließlich die erst genannten Mucine und bildet in dieser Schicht Mikrokolonien aus [127]. Die Schicht mit den O-Glycanen wird gemieden, da diese die  $\alpha$ -CholGlcT(-Aktivität) inhibieren können. O-Glycane beeinflussen auch das Bakterienwachstum negativ. Dies wird mit den Verlust des  $\alpha$ -CholGlc, einem der anteilmäßig größten Zellwandkomponenten, begründet [157, 189]. Lee *et al.* zeigten, dass für den Effekt verschiedene O-Glycan-Mucin-Typen verantwortlich sein können [188]. Diese weisen alle ein endständiges  $\alpha$ -1-4-N-Acetylglucosamin auf.

## 1.6 SGs von filamentösen Pilzen und Hefen

SGs können nicht von allen Pilzen synthetisiert werden. Sie konnten bisher u.a. in den Hefen *S. cerevisiae* [367, 393] sowie *P. pastoris* [393, 300] und *Rhodotorula bogoriensis* [155] identifiziert werden. Bei Vertretern der Schleimpilze konnten ebenfalls SGs identifiziert werden: Das  $\Delta^{22}$ -Stigmastenyl-D-glucosid aus *D. discoideum* sowie das Poriferasteryl-D-Glucosid aus *P. polycephalum* [121, 243]. Des Weiteren erfolgte ein Nachweis auch in folgenden filamentösen Pilzen: *U. maydis*, *Sordaria macrospora* und *Rhynchosporium secalis* [300]. Aus einigen Vertretern konnten die Lipide isoliert und strukturell analysiert werden. Dabei handelte es sich hauptsächlich um  $\beta$ -SGlcs. Über die Präsenz von  $\alpha$ -Anomeren ist bisher nichts bekannt. Zu den wenigen strukturellen Varianten zählt das strukturell verifizierte Cholesteryl- $\beta$ -D-glucosid-6'-*O*-palmitat aus dem Oomyceten *Pythium sylvaticum* [227] sowie das noch nicht weiter verifizierte Cholesteryl- $\beta$ -Mannosid aus der human-pathogenen Hefe *C. albicans* [94]. Es sollte in letzterem Fall beachtet werden, dass Sakaki *et al.* in *C. albicans* kein SG nachweisen konnten [300] (s. auch 1.4.3, ab S.22).

SGT-Aktivität bzw. -Gene konnten bisher in einigen phytopathogenen Pilzen (z.B. *Magnaporthe oryzae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum lagenarium* (syn. *C. orbiculare*) und *Leptosphaeria maculans*) sowie in den Hefen *Y. lipolytica* und *S. cerevisiae* nachgewiesen werden [268, 266, 347, 393, 162, 146, 331, 9]. Es wurde festgestellt, dass die Deletionen einiger für  $\beta$ -SGlcTs-codierender Gene auf eine Rolle der SGlcS in Pathogenitätsprozessen hinweisen.

### 1.6.1 SGs beeinflussen die Pathogenität filamentöser Pilze

In diesem Abschnitt ist es wichtig, zwischen Pathogenität und Virulenz zu unterscheiden. Die Entwicklung einer Krankheit wird nicht nur einseitig vom "Angreifer", sondern auch wesentlich von den Abwehrkräften des Wirts bestimmt. Die auftretenden Interaktionen bilden die Grundlage einer Wirt-Pathogen-Beziehung. Pathogenität beschreibt die Fähigkeit, einen anderen Organismus zu befallen bzw. zu infizieren und in diesem mehr oder weniger stark ausgeprägte Krankheitssymptome hervorrufen zu können. Virulenz hingegen beschreibt den Grad der Pathogenität, also folglich wie schwerwiegend die Symptome ausfallen. Das Maß wird dabei im Wesentlichen von den Wirt-Pathogen-Interaktionen bestimmt: Ist beispielweise die Widerstandskraft (Resistenz) des Wirts gering und die Aggressivität des Erregers hoch, entsteht eine kompatible (verträgliche) Beziehung, die i.d.R. durch starke Symptome geprägt ist. Die Aggressivität muss also zumindest so hoch sein wie die Resistenz, damit eine Besiedlung geschehen kann. Trifft ein wenig aggressiver Erreger auf einen resistenten Wirt, entsteht eine kurzzeitige (bis zum Auslöschung des Eindringlings) inkompatible Beziehung mit keinen bzw. gering ausgeprägten Symptomen [304].

In dem Reisbranderreger *M. oryzae* (syn. *M. grisea*), einem Ascomyceten, konnte ein für eine  $\beta$ -SGlcT-codierendes Gen (*Ugt51G1*, *pth8*) identifiziert werden [347, 393]. Eine Insertionsmutante, erzeugt durch REMI (*restriction enzyme-mediated integration*), zeigte eine reduzierte Virulenz. Im Gegensatz zu diesem Resultat zeigten Kershaw und Talbot, dass eine  $\Delta$ *ugt51g1*-Mutante ähnliche Läsionen erzeugte wie der WT-Stamm [159]. Neben diesem bisher genannten Vertreter aus der Ugt51-Familie besitzt *M. oryzae* noch drei weitere Isoenzyme aus der Ugt54-Familie (UGT54C1, -E1 und -G1) [438, 396].

Ein weiterer Vertreter der Ascomyceten, *C. gloeosporioides*, der Verursacher der Fruchtfäule (Anthrachnose) bei zahlreichen Kulturpflanzen (Avocado, Banane, Kakao, Citrus, Kaffee), trägt ein Virulenzgen, dessen Expression in den Konidien während des Oberflächenkontaktes induziert wird [162]. Das resultierende Protein der Ugt54-Familie [438, 396] wird auch CHIP6 (*Colletotrichum hard-surface induced protein*) genannt. Die meisten Pilze benötigen vor der Ausbildung ihrer Infektionsstrukturen den Kontakt ihrer asexuellen Sporen (Konidien) mit einer zumeist hydrophoben, harten Oberfläche (z.B. der pflanzlichen Cuticula), an welcher sie durch extrazelluläre Adhäsine anhaften. Im nächsten Schritt erfolgt die Induktion der Keimung. Dies kann physikalisch durch eine harte Oberfläche und/oder durch Hydrophobizität erreicht werden. Auch chemische Induktoren sind bekannt. So induziert Ethylen bei Fruchtpathogenen wie *Colletotrichum* spp. die Keimung und die anschließende Differenzierung bis zur Appressorienbildung. Bei *C. gloeosporioides* induzieren die Wachse der Wirtspflanze Avocado (*Persea americana*) spezifisch diese Prozesse [276]. Die Deletion des Gens *chip6* resultierte jedoch nicht in einer Beeinträchtigung des Pilzwachstums, der Konidien-

## 1 Einleitung

und Infektionsstrukturenausbildung, sondern einzig in einem verminderter Fäulnisvorgang bei der Avocado, also einer reduzierten Virulenz [162]. In der Deletionsmutante wurde ebenfalls die SGlcT-Aktivität gemessen und eine verbleibende, wenn auch deutlich reduzierte Aktivität, registriert. Dies könnte darauf hinweisen, dass noch weitere SGTs der Ugt54-Familie vorhanden sind.

In den bisher beschriebenen Pilzen sowie in *L. maculans* wurde nur jeweils eines der Isoenzyme “deletiert”, und es konnte folglich keine SG-freie Mutante generiert werden. Dies wurde mit dem Basidiomyceten *U. maydis* durchgeführt. *U. maydis*, der Erreger des Maisbrandes, besitzt zwei  $\beta$ -SGlcT-Gene, *Ugt51D1* und *Ugt53A1*. Durch deren Deletion via homologer Rekombination konnte erstmals eine SGlc-freie Mutante eines pathogenen Pilzes generiert werden (Warnecke, unveröffentlichte Daten). Die  $\Delta$ *ugt51d1*-Mutante zeigte eine reduzierte Virulenz, aber zeigte auch eine unveränderte Menge von SGlc. Die  $\Delta$ *ugt53a1*-Mutante zeigte keine veränderte Virulenz, dafür konnte kein SGlc nachgewiesen werden. Der zudem erzeugte SGlc-freie Doppel-KO zeigte eine noch geringere Virulenz als die  $\Delta$ *ugt51d1*-Mutante. Auffallend sind in dem vorliegenden Fall die sehr unterschiedlichen Mengen von synthetisiertem SGlc. Der überwiegende Anteil des SGlc, welcher der Expression von *Ugt53A1* zugrunde liegt, scheint an der Virulenz des Pilzes nicht beteiligt zu sein. Nur ein sehr geringer Anteil unterhalb der Nachweisgrenze, begründet durch die Expression von *Ugt51D1*, scheint eine Rolle zu spielen. Unterschiedliche Wirkorte bzw. Lokalisierungen der beiden Enzyme könnten für diesen Umstand verantwortlich sein. Geringe Sequenzunterschiede in den vorliegenden Domänen trPH-GRAM und PH-GRAM könnten eine unterschiedliche Membranlokalisierung zur Folge haben. Somit kann gefolgert werden, dass die Virulenz von *U. maydis* von einer SGlc-Synthese an einer definierten, intrazellulären Membran während des Infektionsprozesses beeinflusst wird.

Einzig die  $\Delta$ *ugt51e1*-Mutante des Ascomyceten *L. maculans*, dem Verursacher der Wurzelhals- und Stängelfäule, zeigt eine unveränderte Virulenz und somit keinen Einfluss der SGlc auf den Pathogenitätsprozess [146]. Dieser Pilz unterscheidet sich zudem in seiner Weise des Wirtbefalls. Während alle bisher genannten Pilze die Wirtsoberfläche direkt penetrieren, infiziert *L. maculans* die Pflanze über natürliche Öffnungen (Stomata) oder Wunden.

Bis zu neun Isoenzyme, die für SGTs codieren könnten, wurden in dem Ascomyceten und Getreideschädling *Fusarium graminearum* [103] identifiziert. *F. graminearum* löst die sogenannte “Ährenbleiche” (*Fusarium head blight*, FHB) aus. Der Pilz tötet durch Mykotoxinbildung das Pflanzengewebe von diversen Getreidesorten (u.a. Weizen, Gerste und Reis) ab und führt je nach Eintrittsort (zumeist über die Blüte) zu Wurzel-Stängel- und Ährenfusariosen und anschließend zu FHB. Eines der Isoenzyme gehört der Ugt51-Familie an (UGT51G3) und acht der Ugt54-Familie (UGT54-A2,-C2,-F2,-E5,-E6,-E7,-H1 und -J1) (s. auch [106]).

Der Einfluss des Ergosteryl- $\beta$ -Glucosids ( $\beta$ -ErgGlc) aus *C. lagenarium* und *M. oryzae* auf die Pathogenität und in diesem Zusammenhang auf den Abbauprozess von Peroxisomen wird detailliert in Abschnitt 1.7.3 (S.40) beschrieben.

### 1.6.2 Welche Effekte zeigt SG in Hefe?

Auch in Hefen konnte SGT-Aktivität nachgewiesen werden: U.a. in *S. cerevisiae* [367, 393], *C. albicans* [94] sowie *Y. lipolytica* [331] und *P. pastoris* [393, 300]. Es ist bekannt, dass die  $\beta$ -ErgGlcTs

PpUGT51B1 und YlUGT51H1 in den beiden letztgenannten Hefen verschiedene Rollen einnehmen. Während jene in *Y. lipolytica* der Metabolisierung von Decanen ([331]; s. 1.4.3, S.22) dienen, wurde im Falle von *P. pastoris* festgestellt, dass das erzeugte  $\beta$ -ErgGlc eine essentielle Rolle in der Peroxisomendegradation der Hefe spielt [262]. *Ugt51B1* (syn. *Atg26*, *Paz4*) codiert, wie gerade genannt, für eine  $\beta$ -ErgGlcT [393]. Bisher ist bekannt, dass dieses Enzym, welches die Reaktion einer UDP-Glucose mit dem in vielen Pilzen dominierenden Ergosterol zu  $\beta$ -ErgGlc katalysiert, keine Transmembrandomänen aufzeigt, obwohl es sich bei dem Ergosterol um ein membrangebundenes Substrat handelt (s. 1.3, S.14). Dafür konnten in der Sequenz, wie auch in Abschnitt 1.3 aufgezeigt, charakteristische Motive im (nicht-katalytischen) Aminoterminus identifiziert werden: eine PH-GRAM-Domäne. Explizit wird auf den Prozess des Peroxisomenabbaus und die Rolle von UGT51B1 in diesem Prozess im nächsten Abschnitt eingegangen.

Anzumerken wäre, dass die  $\beta$ -ErgGlcT ScUGT51A1 von *S. cerevisiae* keine essentielle Funktion in den bisher genannten Prozessen hat [47]. Zudem produziert die Hefe im Gegensatz zu *in vitro*-Untersuchungen *in vivo* nur sehr geringe Mengen an  $\beta$ -ErgGlc [367, 393].

## 1.7 SG spielt eine Rolle in der Degradation von Peroxisomen

In diesem Abschnitt sollen zuerst verschiedene Autophagie-Prozesse beschrieben werden. Im Speziellen soll auf den Prozess des Peroxisomenabbaus (Pexophagie) in der Hefe *P. pastoris* eingegangen werden sowie auf den Einfluss der Pexophagie auf die Pathogenität filamentöser Pilze (s. 1.7.2 und 1.7.3, S.37 und 40).

### 1.7.1 Die verschiedenen Formen der Autophagie

Autophagie repräsentiert einen zellulären Prozess, der vor allem Abbaureaktionen beschreibt, welche speziell in Eukaryoten ablaufen, und dient in eukaryotischen Zellen folgenden Zwecken: Nährstoff-Recycling während Mangelphasen, Re-Modellierung von Zellkomponenten und Strukturen während der Entwicklung sowie bei Apoptose und zuletzt in der Pathogen-Abwehr [233, 277]. Änderungen in den Wachstumsbedingungen oder Faktoren der Umwelt und Entwicklung, z.B. die Verfügbarkeit von Nährstoffen oder Stress, können einen Autophagie-Prozess auslösen. In Pflanzen kann auch ein Pathogenbefall durch Aktivierung der pflanzeigenen Immunabwehr zu Autophagie und letztendlich zum programmiertem Zelltod führen [314]. Der bei Pathogenbefall (Bakterien, Pilze, Viren) greifende selektive Autophagie-Prozess (Xenophagie) führt zu einer Umhüllung der "Eindringlinge" durch ein Doppelmembranvesikel (Xenophagosom) [354, 167]. Manche Pathogene können mit Hilfe von Membran-abbauenden Enzymen, wie Phospholipasen, aus den Vesikeln entkommen [28]. Im Pflanzensystem dient Autophagie zudem als ein Überlebensmechanismus um Mangel- und Stressphasen zu überstehen und auch als Vorstufe oder Mechanismus des programmierten Zelltods [353, 431]. Autophagie stellt in Pflanzen eine Komponente der pflanzlichen Abwehr gegen eindringende Pathogene dar. Hefen könnten ohne Autophagie-Prozesse nicht länger als zwei Tage unter Nährstoffmangel überleben, da es während diesen Phasen essentiell ist, langlebige Proteine und Organellen

## 1 Einleitung

abzubauen, die nicht benötigt werden. Dazu werden diese von einer Membran umhüllt und zu einem abbauenden Organell transportiert. Es handelt sich dabei um Vakuolen in Hefezellen bzw. Lysosomen in Säugerzellen, die eine starke hydrolytische Aktivität aufweisen [343]. Treten Defekte in den Autophagie-Prozessen auf, können diese zu vielen verschiedenen Krankheiten führen. In Säugern haben sie u.a. Krebserkrankungen, Kardiomyopathie und neurodegenerative Funktionsstörungen zur Folge [343].

Für die Einkapselung oder Umschließung cytoplasmatischer Komponenten und Organellen existieren zwei nicht-selektive Mechanismen: **Mikro- und Makroautophagie** (Abb.1.8 a,c) [343, 166]. Mikroautophagie beinhaltet das direkte Umschließen cytoplasmatischer Komponenten oder Organellen durch eine lysosomale bzw. vakuoläre Membran, gefolgt von deren Internalisierung und abschließender Degradation. Im Gegensatz dazu ist an der Makroautophagie die Ausbildung eines Doppelmembran-Vesikels (Autophagosom) beteiligt. Diese Vesikel transportieren die Fracht (Cargo) zur Vakuole oder zum Lysosom.

Ein weiterer Mechanismus wurde bisher nur in Säugern identifiziert: Die Chaperon-vermittelte Autophagie (CVA). Cytosolische Proteine mit einem definierten Peptidsequenzmotiv (KFERQ) werden mittels Chaperon-Bindung zu den Lysosomen transportiert [343, 219]. Eine weitere Form, welche die Hefe *S. cerevisiae* neben der Makroautophagie durchführt, ist der Cvt-(*cytoplasm to vacuole targeting*)-Prozess zur Rekrutierung von Vorstufen vakuolärer Hydrolasen aus dem Cytoplasma. Dabei handelt es sich um den einzig nicht-abbauenden Prozess [343].

Neben diesen u.a. durch Nährstoffmangel-induzierten nicht-selektiven Mechanismen existieren zwei selektive Wege: **Mikro- und Makropexophagie** (Abb.1.8 b,d) [343, 166]. Beide führen zu einem selektiven Abbau von Peroxisomen. Vor allem methylotrophe Hefen wie *P. pastoris* und *Hansenula polymorpha*, die fähig sind Methanol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen, führen diese Prozesse durch (u.a. [100, 262, 197]). Wachsen diese Hefen in Methanol-haltigem Medium, synthetisieren sie viele, große Peroxisomen, welche das für die Metabolisierung des Methanols benötigte Enzym Alkoholoxidase (AOX) beinhalten [375]. Die Metabolisierung erfolgt durch Oxidation zu Formaldehyd mit atmosphärischem Sauerstoff. Da die AOX allerdings nur eine geringe Affinität zu Sauerstoff besitzt, wird dieser Effekt wohl durch die Synthese einer großen Menge dieses Enzyms kompensiert [128]. *P. pastoris* kann aufgrund ihrer zwei peroxisomalen AOX, codiert durch *Aox1* und *Aox2* [172], das Methanol nutzen. Beide Gene unterliegen einer Induktion durch Methanol und des Weiteren einer Repression durch andere Kohlenstoffquellen: Ethanol, Acetaldehyd, Glycerol oder Glucose [172, 60, 246]. Wird das Methanol nun durch eine andere Kohlenstoffquelle (Glucose oder Ethanol) ersetzt, werden die Peroxisomen in dieser Anzahl nicht länger benötigt und durch Mechanismen der Mikro- oder Makropexophagie abgebaut [366, 365].

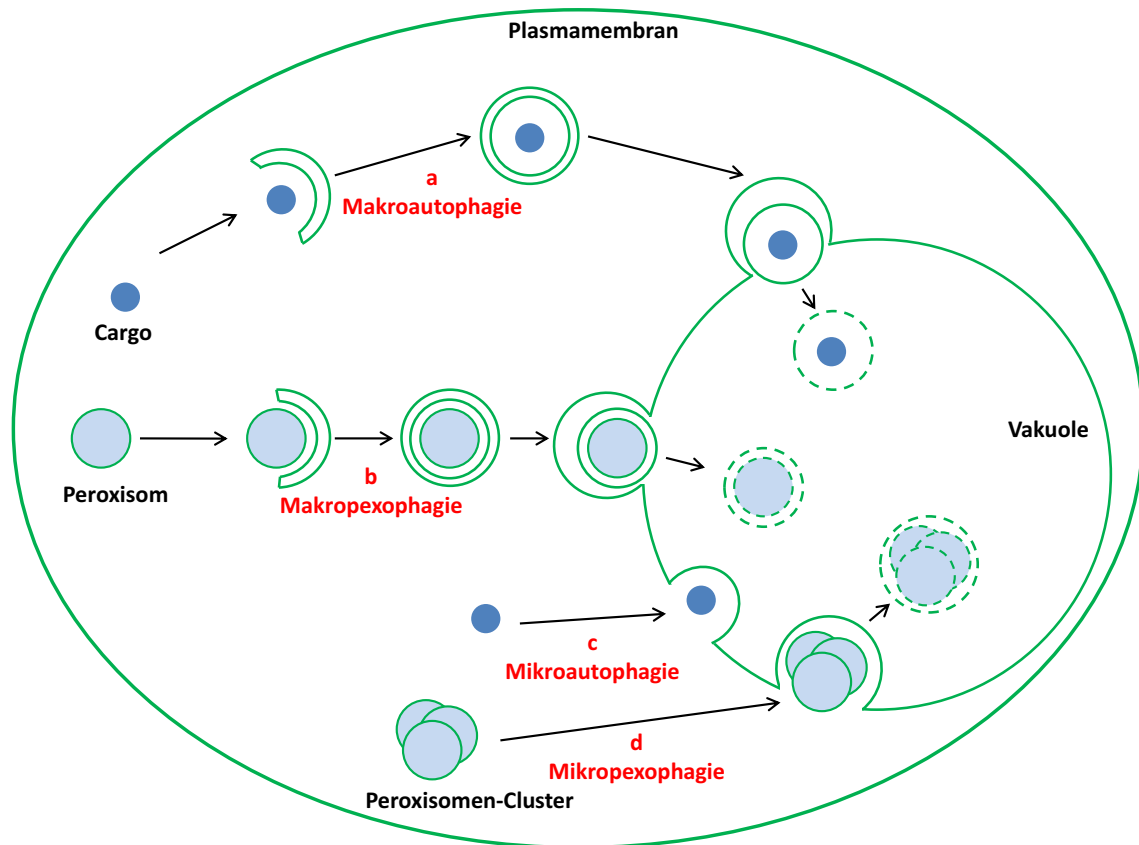


Abbildung 1.8: Vier Autophagie-Prozesse in Hefen.

Makroautophagie (a) und Makropexophagie (b) erfordern die Ausbildung von Vesikeln, die das Cargo/die Peroxisomen umschließen. Diese Doppelmembran-Vesikel (Autophagosom oder Pexophagosom) fusionieren anschließend mit der Vakuole und entlassen Vesikel mit einer einfachen Membran, welche durch die hydrolytische Aktivität der Vakuole abgebaut werden. Im Falle der Mikroautophagie (c) und Mikropexophagie (d) wird das Cargo/das Peroxisomen-Cluster direkt ohne die Ausbildung eines Auto-/Pexophagosoms an die Vakuole abgegeben (modifiziert nach [343]).

Bei den Peroxisomen handelt es sich um Zellorganellen, die durch eine Membran umschlossen sind, in allen Eukaryoten vorliegen und welche durch einen von Hefen bis zum Menschen konservierten selektiven Autophagiemechanismus abgebaut werden: der Pexophagie [83, 299]. Im Metabolismus besitzen sie viele Funktionen: In der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, im Glyoxylatzyklus und in der Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffspezies [307]. In einigen Hefen sind sie auch für die Methanol-assimilation zuständig sowie in dem filamentösen Pilz *Penicillium chrysogenum* für die Penicillin-Synthese [235, 374, 345].

Die Anzahl von Peroxisomen ändert sich in Abhängigkeit von verschiedenen Umweltbedingungen. Zum Beispiel wird die Peroxisomenproliferation in Hefen durch Stimuli, beispielsweise Oleat oder Methanol, für die Verstoffwechslung dieser Substrate in Gang gesetzt [375, 108]. Generell ist die Homöostase von Organellen abhängig von Synthese- und Degradationsprozessen. Es ist bekannt, dass die Peroxisomenproliferation von einer Gruppe von mehr als 20 gut konservierten Peroxin-Proteinen abhängig ist, welche durch *PEX*-Gene codiert werden [375, 346, 72]. Mutationen in diesen Genen resultieren nicht nur in einer Unfähigkeit zum Peroxisomenaufbau, sondern auch in Störungen wie dem Zellweger-Syndrom beim Menschen, in der Letalität des Embryos bei *A. thaliana* und in einem

Verlust der Pathogenität bei einigen phytopathogenen Pilzen [184, 163, 80, 89, 284].

Die unter Methanol-Einfluss proliferierten Peroxisomen können über Pexophagie-Prozesse abgebaut werden, an denen sogenannte durch *ATG* (*autophagy related genes*)-codierte Proteine<sup>26</sup> beteiligt sind. ATG-Proteine sind sowohl für nicht-selektive als auch für selektive Formen der Autophagie verantwortlich. So ist beispielsweise *Atg8* (*Atg8*, *Atg7*, *Cvt5*, *Paz2*) für die Elongation der umschließenden Membran zuständig und reguliert zudem den Zeitpunkt der Assoziation mit der Vakuole. Deswegen bietet sich dieses Enzym nach Markierung mit einem Fluoreszenzprotein für die Beobachtung der Membrandynamik während des Abbauprozesses an [343, 242, 248]. Einige Gene wie *Atg26* (*Paz4*, *Ugt51*) und *Atg30* sind jedoch vorrangig für die Pexophagie zuständig [262, 82]. Beide sind an der Ausbildung von essentiellen Strukturen beteiligt: Dem MIPA (*“micropepophagic apparatus”*) bei der Mikropexophagie (s. 1.7.2, S.37) und dem Pexophagosom bei der Makropexophagie. *ATG30*, welches an der Ausbildung beider Strukturen beteiligt ist, scheint für die richtige Lokalisierung von *ATG8* zuständig zu sein [82]. Da in dieser Arbeit hauptsächlich die Mikropexophagie im Mittelpunkt steht, soll an dieser Stelle näher auf diese Form der Pexophagie eingegangen werden.

### 1.7.2 UGT51B1 spielt eine Rolle in der Mikropexophagie in

#### *P. pastoris*

Mikropexophagie wird durch einen Wechsel in der Verfügbarkeit der Kohlenstoffquelle von Methanol zu Glucose in *P. pastoris* induziert [434]. Die einzelnen Schritte dieses Prozesses konnten elektronen- und fluoreszenzmikroskopisch identifiziert werden [298, 242]. Eine schematische Darstellung in Abb.1.9 illustriert die einzelnen Schritte. Die Mikropexophagie zeichnet sich durch die Umhüllung von zu Clustern zusammengelagerten Peroxisomen mit der Vakuolenmembran aus. Dadurch gelangen die Peroxisomen in die Vakuole und werden in dieser lysiert, so dass alle Komponenten enzymatisch degradiert werden können.

---

<sup>26</sup>Durch unabhängig durchgeführte Experimente wurden den Genen verschiedene Namen zugeordnet: *Atg*, *Aut*, *Cvt*, *Gsa*, *Pag*, *Paz* und *Pdd*. Diese wurden letztendlich einheitlich als *Atg*-Gene (*autophagy related genes*) benannt (bzw. umbenannt), um Irritationen zu vermeiden. Die diversen, früheren Benennungen sowie die aktuellen Gen-Namen sind Klionsky *et al.* zu entnehmen [168].

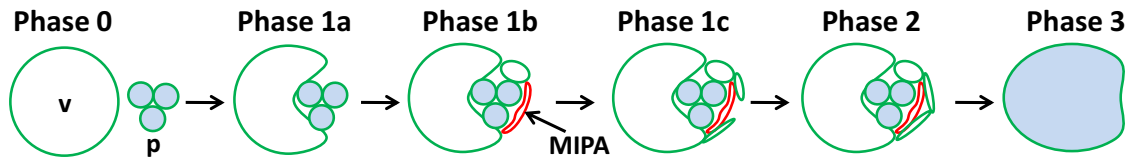


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung des Ablaufs der Mikropexophagie in der Hefe *P. pastoris*.

Nach einem Wechsel der Kohlenstoffquelle von Methanol zu Glucose “clustern” die Peroxisomen und nähern sich an die Vakuole an (Phase 0 und 1a). Dann stülpt sich die Vakuolenmembran ein und beginnt die Peroxisomen zu umhüllen. Zu diesem Zeitpunkt wird auch ein neues Membransystem, der MIPA (*micropepexophagic apparatus*), nahe des Peroxisomen-Clusters gebildet (Phase 1b; [240]). Diese Membran wird für die komplette Umschließung der Peroxisomen durch die Vakuolenmembran, welche auch den MIPA umschließt, benötigt (Phase 1c und 2). Letztendlich werden die Peroxisomen in der Vakuole lysiert und durch hydrolytische Enzyme degradiert (Phase 3). p: Peroxisomen-Cluster, v: Vakuole. Schematische Darstellung entsprechend jener aus [262].

Es konnte gezeigt werden, dass eine *Ugt51B1*-Deletionsmutante ( $\Delta ugt51b1$ ) in der  $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese sowie der Durchführung der Mikropexophagie beeinträchtigt war [262]. Der Defekt der Mutante äußerte sich dadurch, dass der Prozess in Phase 1b blockiert war (Abb.1.9). Dies zeigte sich darin, dass die vakuoläre Membran das Peroxisomen-Cluster nicht komplett umschließen konnte. Dieser Mechanismus erfordert offenbar Membrantransport- und Membranfusionsprozesse, an denen das Enzym beteiligt ist. Es wird angenommen, dass ein defektes MIPA-Membransystem eine Rolle für den Degradationsdefekt spielen könnte. Dieses Membransystem konnte durch ein GFP- bzw. CFP-<sup>27</sup>gekoppeltes UGT51B1-Protein identifiziert werden. Die *getaggte* Gen-Kopie, eingebracht in *P. pastoris* $\Delta ugt51b1$ , komplementierte zum Einen den Defekt in Bezug auf die  $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese und zum Anderen die Fähigkeit des Peroxisomenabbaus (Abb.1.10). Des Weiteren zeigten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen die Lokalisierung des Enzyms an einem speziellen Membrankompartiment, welches zuerst als MIPA-Membransystem [262], später als ein Vorläufer des MIPA identifiziert werden konnte und in unmittelbarer Nähe zur Vakuolenmembran lag [425, 424]. UGT51B1 (ATG26) scheint für die Elongation und Reifung dieser autophagosomalen Struktur nach Bindung an einen cytosolischen Lipid-Protein-Nukleierungskomplex essentiell zu sein [425]. Dabei wird angenommen, dass ein Vorläufer dieses Komplexes, bestehend aus verschiedenen ATG-Proteinen, mit Hilfe einer hohen Konzentration von PI(4)P UGT51B1 über die PI-Bindedomäne (PBD, *phosphoinositide-binding domain*, PH-GRAM) rekrutiert. Die Enzymaktivität an diesem Wirkort initiiert vermutlich die Formation des MIPA und trägt somit zum regulären Ablauf des Mikropexophagie-Prozesses bei. Dieses MIPA-Membransystem wurde jedoch bisher noch nicht ausreichend charakterisiert. Auch konnte bisher der Ursprung und die Biogenese präautophagosomaler Strukturen (PAS, *preautophagosomal structure*), zu denen auch der MIPA gehört, sowohl für selektive als auch für nicht-selektive Autophagie noch nicht geklärt werden. Es wird die Synthese aus einem schon existierenden Organell bzw. die *de novo*-Formation angenommen. Als Quellen werden das ER, der Golgi-Komplex und die Plasmamembran diskutiert [324].

<sup>27</sup>Grün- oder Cyan-fluoreszierendes Protein



## 1 Einleitung

Weitere Studien zeigten, dass die Deletion der PH-GRAM-Domäne keinen Einfluss auf die  $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese nimmt, jedoch auf die Fähigkeit den Mikropexophagie-Prozess durchzuführen (Abb.1.10). Dies könnte auf die veränderte, intrazelluläre Lokalisierung des Enzyms zurückzuführen sein, bei der das Glycolipid nicht am "richtigen" Ort synthetisiert wird, um seine Wirkung entfalten zu können. Wurde hingegen die katalytische Domäne deletiert, entsprach zwar die Lokalisierung des nativen Enzyms den Vorstellungen, doch die Enzymaktivität war nicht detektierbar. Neben der fehlenden  $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese war auch die Fähigkeit zur Mikropexophagie nicht mehr präsent.

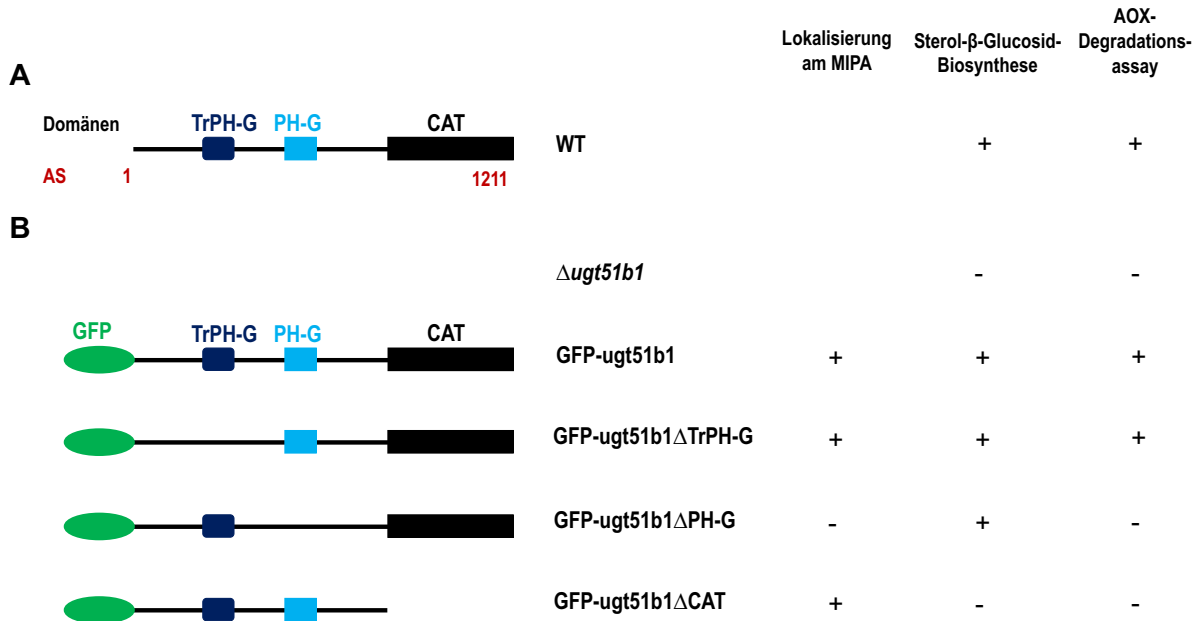


Abbildung 1.10: Funktionelle Domänen der  $\beta$ -ErgGlcT UGT51B1 und deren Beteiligung an der Mikropexophagie.

**A** Schematische Darstellung der annotierten Domänen von UGT51B1 (Wildtyp, WT) (s. auch 1.3, S.14). **B** Verschiedene *Ugt51B1*-Varianten wurden in  $\Delta ugt51b1$ -Zellen unter der Kontrolle des *Aox1*-Promotors exprimiert. Die Benennungen dieser Varianten befinden sich in der Mitte und eine graphische Darstellung linksseitig. Auf der rechten Seite ist eine Übersicht über die Ergebnisse für jeden Stamm bezüglich der Lokalisierung am MIPA-Membransystem, der  $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese sowie der AOX-Degradation dargestellt. Alkoholoxidasen (AOX) sind Markerenzyme, welche die Methanol-Umsetzung katalysieren, unter Methanol angereichert und im Laufe der Mikropexophagie zusammen mit den Peroxisomen abgebaut werden. Verändert nach [262].

Die von Oku *et al.* und Yamashita *et al.* erhobenen Daten [262, 425, 424] lassen vermuten, dass bei einem regulären Mikropexophagie-Prozess zwei Bedingungen erfüllt sein müssen: Zum Einen die Lokalisierung des Enzyms an der MIPA-Vorläufer-Membran und zum Anderen die  $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese an eben dieser Membran. Die Möglichkeit, dass weitere Proteine in Form von Protein-Protein-Interaktionen an der katalytischen Domäne Einfluss auf die Enzymfunktionalität bei der Mikropexophagie nehmen, kann bisher weder ausgeschlossen noch belegt werden.

Es lässt sich festhalten, dass UGT51B1 einen Faktor darstellt, welcher für die Durchführung des Mikropexophagie-Prozesses von *P. pastoris* unabkömmlich und dabei offenbar an Membrantransport- und Membranfusionsprozessen beteiligt ist [262, 425, 424].

Nach Nazarko *et al.* ist UGT51B1 vor allem für den Abbau von sehr großen durch Methanol-Induktion proliferierten Peroxisomen und auch für den Makropexophagie-Prozess essentiell [251,

253]. Da das Enzym an der Formation des Pexophagosoms oder an der Initiierung großflächiger Membranstrukturen mit Bezug zum MIPA beteiligt ist, lässt sich darüber spekulieren, ob es durch seine Aktivität diese Prozesse erleichtert [251, 253]. Wird die Peroxisomenproliferation beispielsweise mit Oleat oder Aminen induziert, resultieren kleinere Peroxisomen und UGT51B1 ist zwar am Abbau beteiligt, aber nicht essentiell. Oleat- oder Amin-induzierte Peroxisomen der Hefe *Y. lipolytica* werden über einen UGT51B1-unabhängigen Makropexophagie-Prozess degradiert. Es scheint folglich eine Korrelation zwischen dem Induktor und dem Abbauprozess zu bestehen. Wriessnegger *et al.* und Nazarko *et al.* zeigten jeweils transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen, die die Peroxisomen nach Methanol- und Oleat-Induktion zeigten [416, 252]. Nazarko *et al.* stellten zudem die These auf, dass je größer die Peroxisomen sind, desto mehr Pexophagie-spezifische ATG-Proteine für den Abbauprozess essentiell sind [252].

In *S. cerevisiae* erfüllt UGT51A1 (ATG26) keine essentielle Funktion in den verschiedenen Autophagie-Prozessen. Dies konnte für den Cvt- und Makroautophagie-Prozess sowie den durch Nährstoffmangel-induzierten selektiven Peroxisomenabbau bestätigt werden [47].

### 1.7.3 Pexophagie kann die Pathogenität von filamentösen Pilzen beeinflussen

Auch bei filamentösen Pilzen wird die Homöostase der Peroxisomen in Abhängigkeit von Umwelt- und physiologischen Konditionen durch ihre Biogenese sowie ihren Abbau (Pexophagie) reguliert. *PEX*-Gene, die eine wichtige Rolle in der Proliferation von Peroxisomen einnehmen, konnten von Kimura *et al.* mit der Pathogenität von Pilzen in Zusammenhang gebracht werden [163]. Sie zeigten, dass *ClaPEX6* für die Infektion von Gurkenpflanzen durch *C. lagenarium* (syn. *C. orbiculare*) bedeutend ist. Die Deletion von *ClaPEX6* (oder *Pex6*) resultierte in einer Beeinträchtigung des Peroxisomen-Metabolismus sowie in kleineren (nicht-funktionalen) Appressorien mit stark reduzierter Melanisierung und dem Verlust der Infektionsfähigkeit. Appressorien stellen weit verbreitete, stark mit Melanin pigmentierte Infektionsstrukturen dar [4, 5]. Das Melanin, eingelagert zwischen Plasmamembran und Zellwand des Appressoriums, erlaubt dem Pilz durch den Aufbau eines hohen Turgordrucks die Penetration der Wirtspflanze [141]. Der sekundäre Metabolit Melanin bildet eine Permeabilitätsbarriere zwischen Plasmamembran und Zellwand des Appressoriums und nur an der Anheftungsstelle an die Wirtspflanze befindet sich ein nicht-melanisierter Bereich. Da in den Appressorien Glycerol (ein kompatibles Solut) akkumuliert wird und die melanisierte Zellwand dafür impermeabel ist [63], wird ein hoher Turgordruck erzeugt: 2-4 MPa bei *Blumeria graminis* (Echter Mehltau), ca. 5 MPa bei *Colletotrichum graminicola* und bis zu 8 MPa bei *M. oryzae* [140, 141, 15, 281]. Dies erlaubt dem Pilz Druck auf die Pflanzenoberfläche auszuüben und diese über einen Penetrationspflock zu penetrieren. Kubo *et al.* zeigten, dass Appressorien Melanindefizienter Mutanten nicht mehr penetrationsfähig waren [175]. 2001 zeigten Kimura *et al.* daraufhin den Einfluss des Peroxins PEX6 auf die fungale Pathogenität bzw. auf die Bildung und Funktionalität des Appressoriums [163]. Auch bei *M. oryzae* zeigte eine *pex6*-Mutante neben einer gestörten Peroxisomen-Biogenese einen Defekt in der Melanisierung der Appressorien, und somit konnte eine Korrelation des peroxisomalen Metabolismus mit der Pathogenität angenommen werden [284, 392]. Vor kurzem konnte bei diesem Pilz ebenfalls gezeigt werden, dass die Inhibierung

## 1 Einleitung

des durch Nährstoff-Mangel induzierten Autophagie-Prozesses zum Verlust der Pathogenität führt [380, 381, 204]. Veneault-Fourrey *et al.* zeigten, dass der Pilz für die Ausbildung des Appressoriums teilweise die Mitose einstellt und den Tod der Konidie durch (Makro-)Autophagie-Prozesse in Kauf nimmt [380]. Eine Mutation im *Atg8*-Gen resultierte in einer beeinträchtigten Autophagie sowie Appressorium-Formation und führte zur Penetrationsunfähigkeit. Die Unfunktionalität von Appressorien kann durch einen zu niedrigen Turgordruck, begründet durch eine gestörte Glycerol-Produktion, erreicht werden [204]. Liu *et al.* zeigten anhand von Deletionen weiterer Hefe-Homologe von *Atg2*, *Atg4*, *Atg5*, *Atg9* und *Atg18* in *M. oryzae*, dass die Autophagie essentiell für die Generation des appressorialen Turgors sowie folglich für die Penetration der pflanzlichen Cuticula ist [203]. Die Relevanz des peroxisomalen Metabolismus für die Pathogenität zeigten Asakura *et al.* anhand einer *Icl1*-Mutante [10]. *Icl1* codiert für eine Isocitrat-Lyase und ist in den Glyoxylat-Zyklus der Peroxisomen involviert. Die  $\Delta icl1$ -Mutante zeigte zwar funktionale Appressorien, aber eine schwere Beeinträchtigung der Virulenz, da sie keine Infektionshyphen ausbilden konnte.

Während die Peroxisomen-Proliferation für die Glycerolakkumulation durch den Abbau von Glycogen und Triacylglycerol (TAG) erforderlich ist [363, 307], ist der anschließende Abbau bisher in Bezug auf die Appressorienfunktion noch nicht geklärt. Thines *et al.* zeigten die Mobilisierung von Glycogen und TAG in einem Modell. Nach diesem erfolgt der Abbau über den “*PMK1 MAPK-Pathway*”. Der Glycogenabbau treibt die Glycolyse an und könnte durch das Metabolisieren von Dihydroxyaceton-3-Phosphat (DHAP), Dihydroxyaceton (DHA) oder Glycerinaldehyd (GAD) zur Glycerolproduktion beitragen. Glycerolproduktion könnte ebenfalls durch den Abbau von TAG durch eine TAG-Lipase erfolgen. Die freien Fettsäuren werden anschließend über  $\beta$ -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut, und Glycerol könnte über den Glyoxylat-Zyklus und die Gluconeogenese erzeugt werden.

Asakura *et al.* und Takano *et al.* zeigten kürzlich erstmals einen Zusammenhang des Peroxisomenabbaus mit der Appressorienfunktion, indem sie in *C. lagenarium* (syn. *C. orbiculare*) ein Ortholog zu Pp*Atg26* (Pp*Ugt51B1*) als Pathogenitätsfaktor identifizierten: Co*Atg26* [9, 350]. Wie zuvor schon erwähnt, besteht die Vermutung, dass ein Zusammenhang zwischen Pexophagie und fungaler Pathogenität besteht. Dies begründet sich in der Anwesenheit von Peroxisomen in den Konidien vor der Differenzierung und deren Abbau im Laufe dieses Prozesses. Eine  $\Delta atg26$ -Mutante zeigte nur eine reduzierte SGT-Aktivität, da möglicherweise noch weitere Isoenzyme der Ugt54-Familie vorhanden sind. Eine Deletion des *pex6*-Gens führte zu unmelanisierten Appressorien. Die Deletion von *Atg26* führte hingegen zu melanisierten Appressorien, zeigte aber einen Defekt in der Invasion des Wirtes, da keine Infektionshyphen ausgebildet wurden. Interessanterweise konnte die Mutante aber die Cuticula immunsupprimierter Gurkenblätter sowie Nitrocellulosemembranen penetrieren. Dies legt nahe, dass die melanisierten Appressorien penetrationsfähig sind, aber im Falle der Mutante die pflanzliche Abwehr den Pilz daran hindert, das Pflanzengewebe zu infizieren.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass ATG26 die Homöostase der Peroxisomen in den Appressorien aufrecht erhält und somit die physiologische Signifikanz dieser Organellen in Bezug zur Pathogenität aufzeigt [9]. Es wurde zudem gezeigt, dass der WT-Stamm seine Peroxisomen während des Infektionsprozesses der Vakuole abbaut. Die  $\Delta atg26$ -Mutante zeigte jedoch neben einem ver-

## 1 Einleitung

zögerten Peroxisomenabbau (eine signifikante Menge verblieb im Appressorium) einen Defekt in der Invasion des Wirtes, so dass davon auszugehen ist, dass ATG26 vermutlich an der Funktionalität der Appressorien trotz des Melanins beteiligt ist. Wie auch schon Co-Lokalisierungsstudien des *P. pastoris*-Homologs zeigten [262, 425], konnte auch CoATG26 an einer präautophagosomalen Struktur aufgrund der wahrscheinlichen Bindung mittels PI-Bindedomäne lokalisiert werden. Diese spezifische Bindung scheint einen Einfluss auf die Phytopathogenität des Pilzes zu haben, denn *Atg26* $\Delta$ PDB konnte den Pexophagie- und Pathogenitäts-Defekt nicht komplementieren. Dies traf auch auf *Atg26* $\Delta$ CAT-Mutante zu.

Welche Verbindung könnte nun zwischen der Pexophagie und der Phytopathogenität eines Pilzes bestehen?

Die ATG26-abhängige Pexophagie sorgt für die Verwertung intrazellulärer Komponenten. Das Recycling von AS innerhalb der Appressorien könnte die Proteinbiosynthese unterstützen, welche für die Invasion erforderlich ist. Andererseits könnten nicht-degradierte Peroxisomen einen negativen Einfluss auf den Metabolismus und die strukturellen Aspekte der Appressorien-vermittelten Penetration nehmen. Es wird angenommen, dass ATG26 zur zellulären Integrität der Appressorien beiträgt und zwar durch das Recycling von Zellkomponenten, mit denen der Zellwandaufbau unterstützt werden kann. Doch auch der Zeitpunkt der Degradationsprozesse spielt eine wichtige Rolle. Werden die Peroxisomen größtenteils zu früh abgebaut, behindert dies möglicherweise die Appressorienreifung. Dies kann daran liegen, dass das Acetyl-CoA, synthetisiert durch die  $\beta$ -Oxidation in den Peroxisomen, dann nicht mehr für die Biosynthese des Melanins zur Verfügung stehen würde [163, 10]. Deshalb muss die Homöostase strikt reguliert werden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Peroxisomen-Homöostase (Peroxisomen-Aufbau und -Degradation) für die Phytopathogenität eine wichtige Rolle einnimmt und zudem, dass ATG26 einen regulierenden Faktor dieser Abbauprozesse an einer definierten Membran darstellt, dessen Rekrutierung an diese Membran über die PI-Bindedomäne erreicht wird.

Im Gegensatz zu den Resultaten von Asakura *et al.* [9] zeigten Kershaw und Talbot [159], dass die Deletion von *Atg26* in *M. oryzae* nicht zu einer eingeschränkten Infektionsfähigkeit führt. Die  $\Delta$ *atg26*-Mutante zeigte einen Befall des Wirtes und auch keine Auffälligkeiten in der konidialen und appressorialen Autophagie. Yoshimoto *et al.* fassten schließlich die bisherigen Erkenntnisse der Korrelation von Pathogenität und Pexophagie in *M. oryzae* und *C. orbiculare* in einem *Review* zusammen [431].

## 1.8 Glycolipid-Engineering-Methode

Eine *Glycolipid-Engineering*-Methode sollte in dieser Arbeit zur Funktionsanalyse von Glycolipiden eingesetzt werden. Normalerweise werden zur Aufklärung von Funktionen von Genen/Proteinen/Stoffwechselprodukten Gen-Deletionsmutanten erzeugt. Dazu wird die konventionelle “*Reverse Genetics*”-Methode angewandt. Die Deletion eines Gens, welches z.B. für ein wichtiges Enzym in einem

## 1 Einleitung

Stoffwechselweg codiert, kann zu einem physiologischen Phänotyp führen. Über diesen Phänotyp können durch den Vergleich mit dem Phänotyp des WT's Rückschlüsse auf die biologische Funktion des Stoffwechselprodukts gezogen werden. Aber das Fehlen eines Gens bzw. des resultierenden Stoffwechselprodukts kann auch zu schwerwiegenden Funktionsstörungen (beeinträchtigt Wachstum und Lebensfähigkeit) führen. Zudem können unter Umständen keine detaillierten Rückschlüsse auf die Funktion(en) des fehlenden Gens geschlossen werden, da auch pleiotrophe Effekte, d.h. Veränderungen mehrerer phänotypischer Merkmale, hervorgerufen werden können. Als Beispiel für einen solchen Effekt kann der Zwergwuchs einer transgenen Pflanze angeführt werden. Zudem bietet die Herstellung einer Gen-Deletionsmutante nur die Möglichkeit festzustellen, ob ein Molekül eine bestimmte biologische Funktion hat. Welche strukturellen Eigenschaften des Moleküls der Funktion zugrunde liegen, kann durch Anwenden einer *Glycolipid-Engineering*-Methode analysiert werden. Die *Glycolipid-Engineering*-Methode beinhaltet das Austauschen eines Enzyms, wodurch ein strukturell verändertes Stoffwechselprodukt erzeugt werden kann. Dadurch kann ein natives Stoffwechselprodukt durch möglichst identische Quantitäten eines ähnlichen Stoffwechselprodukts ersetzt werden. Der Vergleich des transgenen Organismus mit dem nativen Organismus ermöglicht anschließend die Identifizierung von spezifischen Funktionen. Dies beruht darauf, dass durch den Austausch eines Enzyms generelle Funktionen durch dessen Stoffwechselprodukt aufrecht erhalten werden. Spezifische Funktionen des nativen Stoffwechselprodukts können hingegen erkannt werden, wenn das strukturell ähnliche Stoffwechselprodukt diese Funktionen nicht erfüllen kann.

D. Warnecke beschrieb 2007 und 2010 die einzelnen Schritte, die der Methode zugrunde liegen [396, 395] und welche hier anhand eines Austauschs eines Glycolipids dargestellt werden:

1. Auswahl der Organismen nach Glycolipid-Zusammensetzung und genetischer Manipulierbarkeit.
2. Klonierung von Genen zur Charakterisierung der Funktion der codierten Enzyme.
3. Erzeugung von Deletionsmutanten.
4. Nachweis von physiologischen Defekten der Deletionsmutante.
5. Substitution der nativen durch modifizierte Glycolipide.
6. Vergleich der Phänotypen des WT und des transgenen Organismus.
7. Analyse der biologischen Funktionen der Glycolipide auf molekularer Ebene.

Die beschriebene *Glycolipid-Engineering*-Methode konnte bereits erfolgreich angewendet werden: Hölzl *et al.* veränderten das Glycolipidmuster in Thylakoiden von Pflanzen und Blaualgen durch heterologe Expression bakterieller GTs [131, 134]. Sie konnten funktionale Unterschiede zwischen Galactolipiden und Glucolipiden in der Photosynthese höherer Pflanzen nachweisen [133]. Neben der Rolle in der Photosynthese konnte auch die Rolle dieser Glycolipide in der Membranlipid-Homöostase untersucht werden [132]. Auch die Gruppen von A. Wieslander und W. Dowhan wandten diese Methode bereits für *E. coli* an. Sie exprimierten heterologe Diacylglycerol-Glycosyltransferasen in *E. coli*-Mutanten mit Defekt in der Phospholipidbiosynthese [411, 420, 410] und untersuchten den Einfluss der erzeugten Galacto- und Glucolipide in dieser PE-defizienten Mutante, die

in verschiedenen Membran-assoziierten Prozessen beeinträchtigt war.

### 1.9 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die biologischen Funktionen von SGs näher untersucht werden, da bisher über die Funktionen dieser Glycolipide wenig bekannt war. Die im vorherigen Abschnitt vorgestellte Methode des *Glycolipid-Engineering* sollte dazu (ab Schritt 5) Anwendung finden.

Zu Beginn existierte bereits eine *P. pastoris*-Mutante ( $\Delta ugt51b1$ ), die eine Deletion des  $\beta$ -ErgGlcT-codierenden Gens *Ugt51B1* aufwies. Durch die Deletion wurde neben dem Verlust der  $\beta$ -ErgGlcT-Aktivität ein physiologischer Defekt hervorgerufen: Die Hefe war nicht mehr in der Lage, ihre Peroxisomen nach einem Wechsel der Kohlenstoffquelle von Methanol zu Glucose (unter mikropexophagischen Konditionen) abzubauen [262]. Es stellte sich daraufhin die Frage, inwiefern das Glycolipid  $\beta$ -ErgGlc für den Degradationsprozess der Peroxisomen essentiell ist. Es bestand auch die Möglichkeit, dass das Protein UGT51B1 unabhängig von seiner katalytischen Fähigkeit am Degradationsprozess beteiligt ist. Um zu prüfen, ob das Protein oder das Glycolipid für den Prozess essentiell ist, wurden durch den Austausch einzelner AS in der katalytischen Domäne modifizierte Proteine generiert. Diese sollten nach Möglichkeit in ihrer  $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese-Aktivität beeinträchtigt sein und optimalerweise keine Änderung in ihrer Tertiärstruktur aufweisen. Durch den Vergleich der Phänotypen einer Hefe, welche eine katalytisch-inaktive UGT51B1-Variante exprimiert, mit dem des WT konnte die Rolle des Proteins oder des Glycolipids in der Degradation von Peroxisomen analysiert werden.

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob strukturellen Eigenschaften des SGs für die biologische Funktion in der Peroxisomendegradation erfüllt werden müssen oder ob neben  $\beta$ -ErgGlc auch strukturell ähnliche SG-Varianten dessen Rolle im Abbauprozess einnehmen könnten.

Um dies aufzuklären, wurde die *Glycolipid-Engineering*-Methode verfolgt, durch die das native  $\beta$ -ErgGlc durch strukturell ähnliche SGs ersetzt werden sollte. Es sollte erreicht werden, dass SG-Varianten möglichst in denselben Quantitäten im Organismus erzeugt werden. Dadurch sollten die generellen Funktionen von SG gewährleistet und der Zusammenbruch von Membransystemen aufgrund des fehlenden Membranlipids in den transgenen Hefen vermieden werden. Auf diese Weise konnte es zudem ermöglicht werden, spezifische Funktionen durch Gegenüberstellung der Phänotypen der WT-Hefe und der Hefen aufzuklären, die SG-Varianten erzeugten. Um andere SGs synthetisieren zu können, sollten heterologe SGTs in einer UGT51B1-defizienten *P. pastoris*-Mutante exprimiert werden. Diese SGTs wiesen u.a. andere Zuckerspezifitäten auf und konnten sowohl den *retaining*- als auch den *inverting*-Katalysemechanismus ausführen, so dass vielfältige SG-Varianten untersucht werden konnten.

Einige heterologe SGT-Gene waren zu Beginn dieser Arbeit bereits bekannt, andere mussten zunächst identifiziert werden. Die für eine  $\alpha$ -SGlcT-codierende Sequenz aus dem human-pathogenen Bakterium *H. pylori* wurde 2006 von Anne-Hélène Lebrun identifiziert, kloniert, heterolog exprimiert

## 1 Einleitung

und charakterisiert [187] und sollte in die Analyse der spezifischen Funktion von SG in *P. pastoris* eingesetzt werden. Um noch weitere SG-Varianten zur Verfügung zu haben, sollten die codierenden Gene für eine  $\beta$ -SGalT aus *B. burgdorferi* und eine  $\beta$ -SGlcT aus *B. hermsii* identifiziert werden. Nach anschließender Expression der heterologen SGTs in *P. pastoris* war es letztendlich möglich, die spezifische Funktion der SG-Varianten im Peroxisomenabbau zu analysieren. Ein Schema, welches die Vorhaben dieser Arbeit zusammenfasst, befindet sich in Abbildung 1.11.

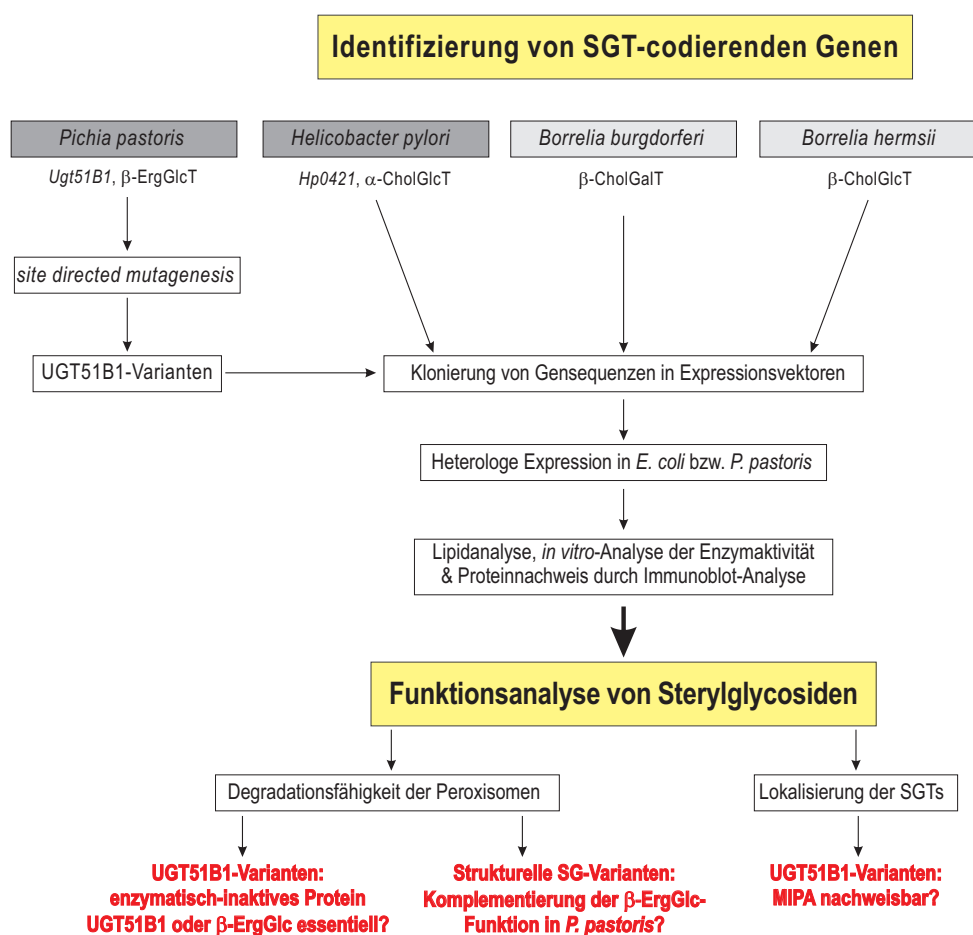


Abbildung 1.11: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit durchzuführenden Projekte.

Dunkelgrau hinterlegt: SGT-Sequenzen waren schon im Vorfeld dieser Arbeit bekannt. Hellgrau hinterlegt: SGT-codierende Sequenzen sollten im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden. SGT, Sterol-Glycosyltransferase; SG, Sterylglycosid; MIPA, Mikropexophagischer Apparat.

## 2 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es mittels der *Glycolipid-Engineering*-Methode Hefetransformanten zu erzeugen, die verschiedene SGT-Gene exprimierten, um die biologische Funktion von SG beim Abbau von Peroxisomen in der methylo-trophen Hefe *P. pastoris* zu analysieren. Des Weiteren sollte durch die Generation von UGT51B1-Varianten mittels “*site directed mutagenesis*” (SDM) geklärt werden, ob nicht das  $\beta$ -ErgGlc, sondern das enzymatisch-inaktive Protein UGT51B1 für den Abbauprozess essentiell sein könnte. Detaillierte Informationen zu den Zielen sind 1.9 (S.44) zu entnehmen.

Im folgenden Teil soll nun zuerst auf die Generation und die Lokalisierung der genannten UGT51B1-Varianten eingegangen werden. Danach soll die Identifizierung neuer SGT-Gene und die Generation von Hefen mittels *Glycolipid-Engineering*-Methode vorgestellt werden. Die erzeugten Hefen sollten in der Lage sein, verschiedene SG-Varianten zu synthetisieren (s. 2.2, S.55). Im nächsten Schritt war es schließlich möglich, die biologische Funktion der modifizierten UGT51B1-Varianten bzw. der SG-Varianten in der Degradation von Peroxisomen zu analysieren (s. 2.3, S.77).

### 2.1 Analyse der Funktion von $\beta$ -ErgGlc in *P. pastoris*

Die  $\beta$ -ErgGlcT (UGT51B1) aus *P. pastoris* katalysiert die Reaktion von Ergosterol und UDP-Glucose zu  $\beta$ -ErgGlc und wurde von Warnecke *et al.* identifiziert, kloniert, heterolog exprimiert und charakterisiert [393]. 2003 wurde dann von Oku *et al.* beschrieben, dass UGT51B1 eine essentielle Rolle in der Mikropexophagie, dem Abbau der Peroxisomen nach einem Wechsel der Kohlenstoffquelle von Methanol zu Glucose, einnimmt [262]: Eine  $\beta$ -ErgGlcT-defiziente KO-Mutante konnte ihre Peroxisomen nicht mehr abbauen. Eine weitere Mutante mit Deletion der katalytischen Domäne des Proteins konnte ebenfalls kein  $\beta$ -ErgGlc mehr synthetisieren und ihre Peroxisomen nicht mehr abbauen (s. 1.7.2, S.37). Nun sollte weiterführend geklärt werden, ob das Protein  $\beta$ -ErgGlcT unabhängig evt. durch (unbekannte) Protein-Interaktionen oder abhängig von seiner katalytischen Aktivität am Peroxisomenabbau beteiligt ist.

#### 2.1.1 Zwei Mutationen in UGT51B1 beeinträchtigen die $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese in *P. pastoris*

In dieser Arbeit wurden verschiedene  $\beta$ -ErgGlcT-Varianten erzeugt, indem einzelne Nukleotide in der Sequenz des codierenden Gens *Ugt51B1* mittels SDM so modifiziert wurden, dass nach Translation eine AS im Protein verändert vorlag. Die Modifikationen sollten in stark konservierten Bereichen der katalytischen Domäne erfolgen (s. Abb.2.1). Die konservierten Bereiche, welche modifiziert



## 2 Ergebnisse

werden sollten, umfassten folgende konservierte AS:

- A: Phe Thr Met Pro
- B: His Gly Gly
- C: Pro Phe Phe Gly Asp Gln
- D: Arg Gly Asp (X) Gln Pro

Die in diesem Bereich abgeleiteten Mutationen/Mutanten werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit Mutation/Mutante(Mut)A-D bezeichnet. Die Bezeichnung beschreibt sowohl den mutagenisierten/modifizierten Bereich als auch explizit die ausgetauschte AS.

Im ersten Schritt mussten die ausgewählten Bereiche in Bezug auf die Folgen eines Nukleotidaustausches überprüft werden. Es musste zum Einen ein AS-Austausch erreicht werden und zum Anderen auch eine Möglichkeit bestehen, die native Gensequenz während der Klonierungsphase von der punkt-mutierten Gensequenz zu unterscheiden. Deswegen wurden die DNA-Abschnitte auch in Bezug auf Überprüfungsmöglichkeiten durch Restriktionsanalysen analysiert. D.h. es wurde überprüft, ob durch den Nukleotidaustausch eine Restriktionsstelle erzeugt oder deletiert wurde. Dadurch ergeben sich bei Überprüfung des zu transformierenden Vektors zum Ursprungsvektor verschiedene Restriktionsmuster. Der Ursprungsvektor pCFP-ugt51b1-FL (von Yasuyoshi Sakai, Univ. Kyoto, JP), in dem das native Gen aminoterminal mit einem (cyanen) Fluoreszenzprotein (CFP) versehen ist, wurde für die SDM-Methode genutzt. Durch das gekoppelte CFP konnte das Protein mittels Immunoblot-Analyse nachgewiesen und die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Die Genexpression wurde durch den Methanol-aktivierbaren *Aox1*-Promotor gewährleistet.

Alle vorgefundenen Möglichkeiten für AS-Austausche sind Anhang 1 (s. 4.15.2, ab S.182) zu entnehmen. Die ausgewählten Bereiche für die Modifikationen mittels SDM können der nachfolgenden Abbildung 2.1 entnommen werden.

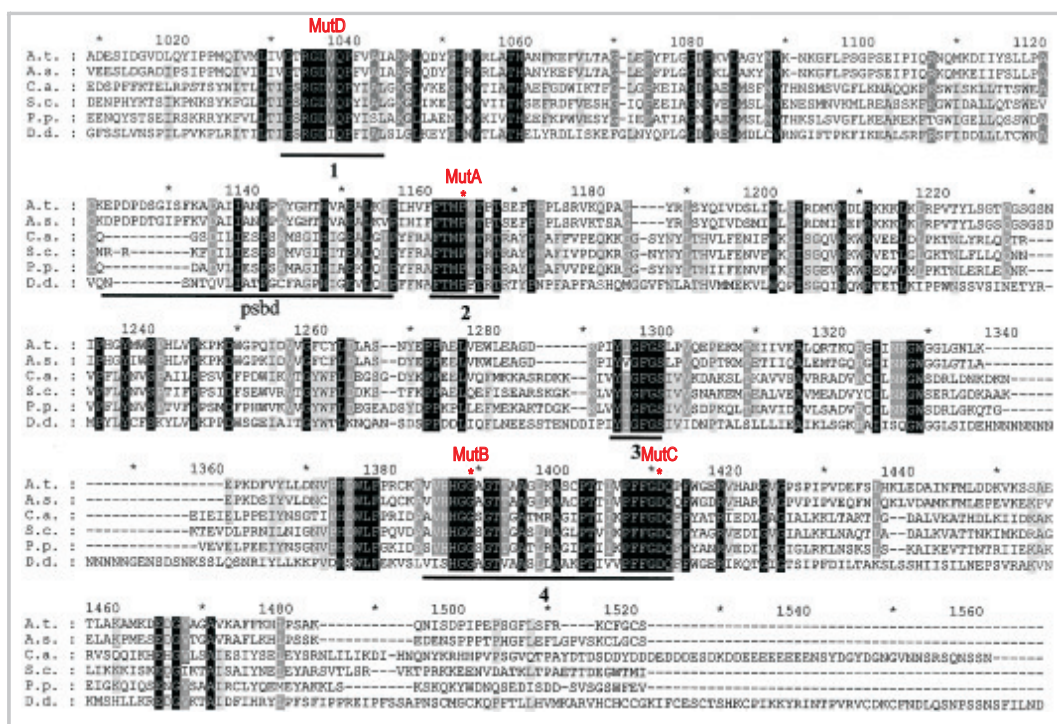


Abbildung 2.1: Ausgewählte Bereiche für die *site directed mutagenesis* von *Ugt51B1* aus *P. pastoris*.

AS-Sequenzalignment der katalytischen Domänen der SGTs aus *A. thaliana* (A.t.), *A. sativa* (A.s.), *C. albicans* (C.a.), *S. cerevisiae* (S.c.), *P. pastoris* (P.p.) und *D. discoideum* (D.d.). Die konservierten Bereiche, welche in Bezug auf Möglichkeiten eines AS-Austausches analysiert wurden, sind mit MutA-D gekennzeichnet. Die Mutationsstellen der korrespondierenden DNA aus *P. pastoris*, welche mit einem roten \* gekennzeichnet wurden, sollten wie folgt modifiziert werden: MutA P1164L, MutB G1389R und MutC D1412A. Für MutD wurden im Rahmen dieser Arbeit keine SDM-Primer hergestellt. Weiterführende Informationen zu dieser Abbildung sind auch Abb.1.6 (S.19) zu entnehmen.

Nach der Synthese adäquater Mutagenisierungsprimer für MutA, MutB und MutC konnte das zur Verfügung gestellte Ausgangsplasmid pCFP-ugt51b1-FL einer SDM-PCR unterzogen werden. Dabei sollte folgende AS modifiziert werden: Prolin zu Leucin an Position 1164 (MutA, P1164L), Glycin zu Arginin an Position 1389 (MutB, G1389R) und Aspartat zu Alanin an Position 1412 (MutC, D1412A).

Daraufhin wurden die folgenden Vektoren generiert: pCFP-ugt51b1-MutA P1164L, pCFP-ugt51b1-MutB G1389R und pCFP-ugt51b1-MutC D1412A. So wurde u.a. das heterozyklische, unpolare, neutrale Prolin gegen die aliphatische, unpolare, neutrale AS Leucin getauscht. Des Weiteren wurde Glycin (neutral, unpolar) gegen Arginin (basisch, polar) ausgetauscht sowie auch Aspartat (sauer, polar) gegen Alanin (neutral, unpolar). Eine Verifizierung der Mutationen in den Konstrukten erfolgte nach Vervielfältigung der Plasmide in *E. coli* mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung im Vorfeld der Hefetransformation. Ein AS- und Nukleinsäuresequenzalignment der drei mutierten Vektoren und des Ausgangsvektors sind Anhang 2 (s. 4.15.2, ab S.182) zu entnehmen.

Anschließend wurden die generierten Konstrukte für die Transformation der  $\beta$ -ErgGlcT-defizienten *P. pastoris* Mutante PPY12 $\Delta$ *ugt51b1* mit SalI restringiert, um durch Linearisierung eine homologe Rekombination in das Hefegenom zu gewährleisten, und die Zellen transformiert. Es sollten anschließend Hefetransformanten ausgewählt werden, die Histidin-prototroph sind und die eingebrachte

## 2 Ergebnisse

Gensequenz aufwiesen, wobei der *Aox1*-Locus intakt vorliegen sollte. Die erhaltenen Transformanten wurden zuerst hinsichtlich der Kompensation der Histidin-Auxotrophie (durch die Komplementation der mutierten Histidin-Dehydrogenase (*his4*)) untersucht. Dazu wurden die Transformanten auf einem Histidin-defizienten Nährboden angezogen und darauf selektiert. Auf Methanol-haltigem Nährboden konnte untersucht werden, welche der Histidin-prototrophen Transformanten noch eine intakte AOX aufwiesen: Diejenigen, welche schnell wuchsen, entsprachen dem Mut<sup>+</sup>-Schema und wiesen auf ein intaktes *Aox1*-Gen hin. Die langsam wachsenden entsprachen dem Mut<sup>S</sup>-Schema und konnten aufgrund der deletierten *Aox1* das als einzige Energiequelle vorliegende Methanol nicht sofort umsetzen. Eine AOX2-Aktivität tritt erst später auf (s. 2.3.1, S.77). Optional konnte auch noch eine sogenannter *in situ*-AOX-Aktivitätsfärbung (nach Stasyk *et al.* [330]) durchgeführt werden. Im nächsten Schritt wurden die Zellen genotypisch untersucht. Dabei wurden die Präsenz des ins Genom integrierten Gens sowie die Integrität der *Aox1* überprüft. Die PCR wurde mit genspezifischen, internen Primern für *CAT* (repräsentiert einen Part der katalytischen Domäne von UGT51B1 auf Nukleotidebene) und *Aox1* durchgeführt. Es konnte die Präsenz von *Ugt51B1* sowie von *Aox1* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, dass außer der KO-Mutante alle Hefe-Transformanten sowie der WT als Kontrolle *Ugt51b1* aufwiesen. Durch die Integrität des *Aox1*-Locus konnte eine Integration der *Ugt51B1*-Varianten in diesen Gen-Locus ausgeschlossen werden. Anschließend wurde untersucht, ob die UGT51B1-Varianten in der rekombinanten Hefe aktiv waren. Dazu wurde die Genexpression nach Kultivierung der Zellen mittels Methanol für ca. 20 h bei 30°C induziert und Gesamtlipide durch Ausschütteln mit Chloroform-Methanol-Gemischen aus den Zellen für eine Lipidanalyse extrahiert. Im vorliegenden Fall wurde zur besseren Visualisierung das SG zusammen mit dem GlcCer, einem weiteren Glycolipid, säulenchromatographisch von den restlichen Lipiden des Gesamtlipidextraktes abgetrennt und diese Fraktion mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Während der Kultivierung und nach Zugabe von Methanol aktiviert der *Aox1*-Promotor die Genexpression der inserierten Gensequenzen. Bei dem Hefe-WT-Stamm erfolgt die Expression des  $\beta$ -ErgGlcT-Gens *Ugt51B1* unter Kontrolle des nativen, konstitutiven Promotors. Zur Gleichbehandlung wurden diese Hefezellen ebenfalls in Methanol-haltigem Medium kultiviert. Nach einer Methanol-Induktion von vier Stunden bei 30°C wurde ebenso ein zellfreies Homogenat durch Aufbrechen der Zellen mit Glasperlen sowie nach Sonifizierung hergestellt und dieses in eine *in vitro*-Enzymanalyse mit markiertem [<sup>14</sup>C]Cholesterol und UDP-Glucose eingesetzt. Die Reaktion wurde mit Chloroform/Methanol (2:1) und 0,45% NaCl abgestoppt, die untere, organische Phase entnommen und dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt. Die Reaktionsprodukte konnten anschließend mittels "Radioscanning" identifiziert und gegebenenfalls auch quantifiziert werden. Nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung erfolgte die Zuordnung der SGs zu einem Anomer i.d.R. nach Lipidanalyse und *in vitro*-Enzymassay nach Abgleich der ermittelten Retentionsfaktor(Rf)-Werte mit den Rf-Werten nicht-markierter Referenzen. Rf-Werte werden in dieser Arbeit nicht explizit erwähnt, sondern nur die durch den Abgleich erfolgten Zuordnungen zu einem Anomer oder einer Zuckerkopfgruppe genannt.

## 2 Ergebnisse

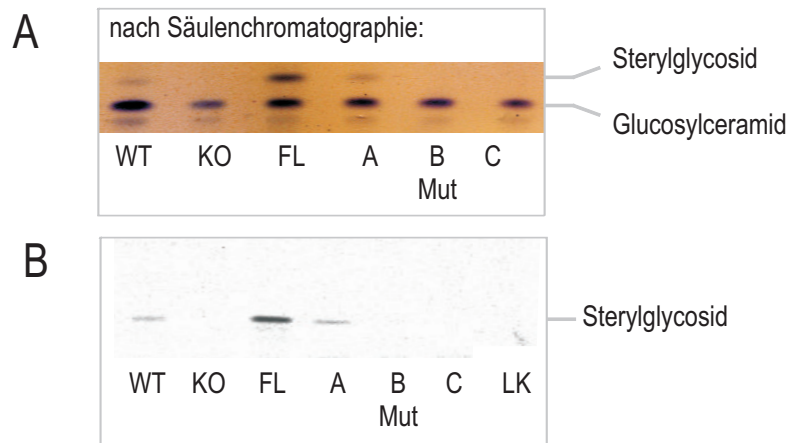


Abbildung 2.2: Mutationen in UGT51B1 beeinträchtigten die  $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese in *P. pastoris*.

**A** Dünnschichtchromatographische Auftrennung nach säulenchromatographischer Fraktionierung der Glycolipide aus einem Gesamtlipidextrakt. **B** Dünnschichtchromatographische Auftrennung radioaktiver Produkte nach *in vitro*-Enzymanalyse zur Bestimmung der SGT-Aktivität. Eingesetzt wurden 20  $\mu\text{g}$  Protein, [ $^{14}\text{C}$ ]Cholesterol (ca. 160.000 dpm; Endkonz.: 13  $\mu\text{M}$ ) und nicht-markierte UDP-Glucose (0,25 mM). LK: Leerkontrolle ohne Homogenat. Es wurde nur der Sterylglycosid-umfassende Bereich dargestellt. Extrakte wurden aus transgenen Hefen generiert, welche drei verschiedene modifizierte *CFP-Ugt51B1*-Varianten (MutA-C) im Genom aufwiesen sowie die unmodifizierte *CFP-Ugt51B1*-Version (FL). Als Kontrollen dienten der *P. pastoris* WT-Stamm PPY12 und eine  $\beta$ -ErgGlcT-defiziente KO-Mutante (PPY12 $\Delta$ *ugt51b1*). Alle Proben wurden dünn-schichtchromatographisch in Chloroform/Methanol 85:15 aufgetrennt. Die Detektion der Lipide erfolgte mittels des Sprührea-genzes  $\alpha$ -Naphtholschwefelsäure und anschließendem Veraschen (A) bzw. mittels "Radioscanning" nach zwei Stunden Exposition (B).

Nach einer Gesamtlipidextraktion konnten nur geringen Mengen an SG im WT, dem Komplementierer FL mit der unmodifizierten *Ugt51B1*-Version und der *Ugt51B1*-MutA-exprimierenden Hefe neben den anderen in einer Lipidextraktion enthaltenen Lipiden (Phospho- und Neutrallipide, Glc-Cer, Ergosterol) detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Eine bessere Visualisierung des SGs konnte nach Säulenchromatographie des Gesamtlipidextraktes erreicht werden. Die Analyse der erhaltenen Glycolipid-Fraktion (Abb.2.2A) bestätigte die Analyse der Gesamtlipidextrakte (nicht gezeigt). Die Intensitäten der SGs sind in dieser Abbildung besser zu erkennen und zur Verdeutlichung der Lipid-extraktauftragungsmenge ist GlcCer ebenfalls dargestellt. Die Expressions- und Synthesestärken in Abhängigkeit der Promotoren sind auf diese Weise deutlich zu erkennen: Die stärkste Intensität zeigte der Komplementierer FL. Schwächere  $\beta$ -SGlc-Lipidbanden zeigten hingegen der WT und die transgene Hefe, welche das Protein UGT51B1-MutA synthetisierte. Die *in vitro*-Enzymanalyse mit markiertem Cholesterol (Abb.2.2B) zeigte ebenfalls, dass neben dem WT weitere Hefen (FL, UGT51B1-MutA) in der Lage waren,  $\beta$ -CholGlc zu synthetisieren. Die Intensitäten der  $\beta$ -SGlc-Banden korrelierten mit denjenigen aus Abb.2.2A. Die Leerkontrolle ohne Homogenat zeigte kein Signal. Weitere Variationen des Assays, u.a. durch Zugabe von Triton X-100, mit verlängerter Reak-tionszeit sowie nach Einsatz variierender Proteinmengen zeigten keine signifikanten Auswirkun-gen auf die  $\beta$ -SGlcT-Aktivität. Eine Induktion der Zellen mit Methanol für 24 h führte im Enzymassay sogar zu schwächeren SGT-Aktivitäten (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass zwei Punktmutationen G1389R (MutB) und D1412A (MutC) in UGT51B1 die  $\beta$ -SGlc-Synthesefähigkeit beeinträchtigten, während nach Generation von Mutation P1164L (MutA) die SG-Synthese aufrecht gehalten wurde.

### 2.1.2 Rekombinante UGT51B1-Varianten konnten in den transgenen Hefen nachgewiesen werden

Nachdem in 2.1.1 gezeigt wurde, dass die erzeugten Mut-Konstrukte erfolgreich in das *P. pastoris*-Genom integriert wurden und die vorhandenen Mutationen zum Teil die  $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese beeinträchtigten, sollte anschließend analysiert werden, ob alle rekombinanten Proteine der UGT51B1-Varianten synthetisiert wurden.

Zur Detektion dieser Varianten mussten in einem ersten Schritt nach der Induktion der Genexpression aus den *P. pastoris*-Zellen die gesamten Proteine isoliert werden. Die transgenen Hefen hatten entweder das *CFP-Ugt51B1*-FL-Gen oder eine mutierte Variante (*CFP-Ugt51B1*-MutA, -MutB oder -MutC) in ihr Genom aufgenommen. Nicht alle der Extraktionsmethoden (u.a. Schatz'scher Aufschluss, Harnstoff-SDS-Methode) erwiesen sich als geeignet für die Analyse der Proteine mittels SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und Proteinfärbung oder anschließender Immunoblot-Analyse. Sie resultierten zumeist in einer schlechten Separation der Proteine im Polyacrylamid (PA)-Gel und/oder nach Immunoblot-Analyse in der Detektion von UGT51B1-Fragmenten, welche durch Degradationsprozesse entstanden sein könnten und nicht in einer Proteinbande mit einer molekularen Masse von 163 kDa für CFP-UGT51B1 (Daten nicht gezeigt). Nur mit einer Proteinextraktionsmethode, der TCA-Proteinextraktion, und anschließendem Immunoblot konnte ein ansprechendes Ergebnis erreicht werden. Bei der Herstellung des Homogenats wurden die Proteinpellets bei dieser Methode allerdings direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen, weswegen OD-Einheiten geerntet wurden, um die in die SDS-PAGE eingesetzte Proteinkonzentration konstant zu halten. Nachträglich konnte die Proteinkonzentration mit der colorimetrischen Methode nach BRAMHALL bestimmt werden.

Die Hefezellen wurden angezogen und die Genexpression mittels Methanol über Nacht (üN, hier ca. 20 h) bei 30°C induziert. Danach wurden aus einer OD-Einheit nach Protokoll von Oku und Sakai die gesamten Proteine extrahiert [261]. Nach Aufnahme des Proteinpellets in SDS-Probenpuffer wurden die Proteine hitze-denaturiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine danach mittels Western-Blot auf eine Membran transferiert. Der Transfer großer Proteine ist jedoch nicht unproblematisch, da diese präzipitieren können und somit schlechter transferiert werden. Zugabe von SDS in den Transferpuffer dient der Mobilisierung der Proteine. Das Methanol im Transferpuffer neigt dazu das SDS wieder von den Proteinen zu entfernen, so dass beim Transfer großer Proteine die Methanolkonzentration gesenkt werden sollte. Am Besten erwies sich im hier vorliegenden Fall der Transfer mit 0,1% SDS und 10% Methanol im Transferpuffer. Nach dem Transfer erfolgte die Detektion des gesuchten Proteins mit einem monoklonalen Anti-GFP-Antikörper. Zudem wurden die Proteine in einer parallelen SDS-PAGE ebenfalls aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Resultate der Proteinanalysen sind Abbildung 2.3 zu entnehmen.

## 2 Ergebnisse

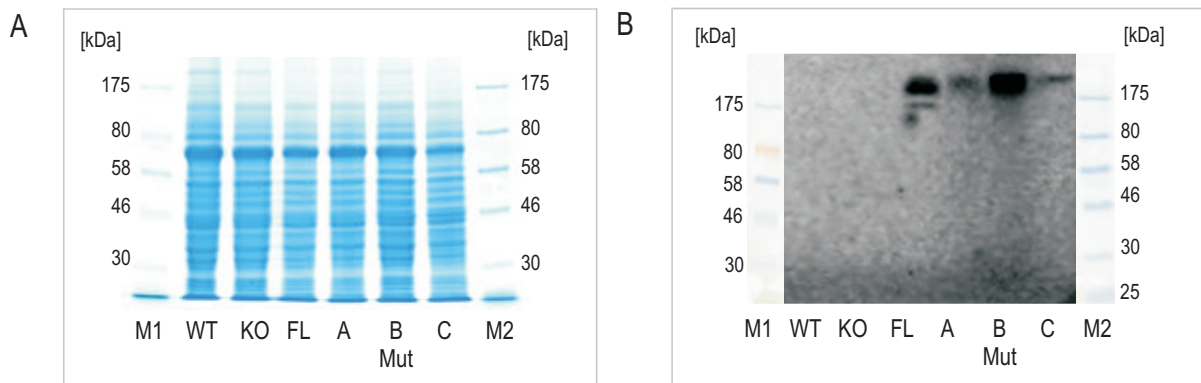


Abbildung 2.3: UGT51B1-Varianten der Hefetransformanten konnten nachgewiesen werden.

**A** SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. **B** Immunoblot-Analyse zur Detektion CFP-markierter UGT51B1-Varianten. Die Detektion erfolgte mit einem *Anti-GFP Monoclonal Antibody*. Exponiert wurde die Membran anschließend für 30 min im "LAS3000-Imaging-System" unter sehr *sensitiven* Einstellungen. Im Schnitt wurden  $\sim 80 \mu\text{g}$  Protein der TCA-Proteinextrakte aus *P. pastoris* einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Brilliant-Blue G250-Färbung bzw. Immunoblot-Analyse unterzogen. TCA-Proteinextrakte wurden aus *P. pastoris*-Zellen des WT-Stamms PPY12, einer  $\beta$ -ErgGlcT-defizienten KO-Mutante (PPY12 $\Delta$ *ugt51b1*), einer *CFP-Ugt51B1*-aufweisenden Hefetransformante (FL) und der Transformanten hergestellt, welche die *CFP-Ugt51B1*-MutA, -MutB, -MutC-Varianten im Genom integrierten. Als Molekulare-Masse-Standards wurden der *ColorPlus Prestained Protein Marker* (M1) und der *Prestained Protein Marker* (M2) von NEB verwendet.

Abbildung 2.3A zeigt die Coomassie-Färbung von Gesamtproteinen nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteinextrakte (transgener) *P. pastoris*-Zellen. Im 175 kDa-Bereich sind die großen Proteine in der WT-Probe am Besten wahrzunehmen, aber eine Akkumulation von UGT51B1 bzw. dessen Varianten war in keinem Proteinhomogenat zu erkennen. Eine parallel durchgeführte Immunoblot-Analyse (Abb. 2.3B) zeigte insgesamt vier Signale und zwar nur in Spuren, in denen Proteinhomogenate aus Hefen aufgetragen wurden, welche ein *CFP*-markiertes *Ugt51B1*-Gen aufwiesen. Die ermittelte molekulare Masse des zu detektierenden Proteins CFP-UGT51B1 beläuft sich auf 163 kDa, es wurden jedoch Proteinbanden oberhalb der 175 kDa-Proteinstandard-Bande detektiert. Die intensivste Bande wurden für den Komplementierer FL und für die transgene Hefe mit UGT51B1-MutB-Variante erhalten. Im Homogenat von FL konnte zudem eine "filigranere" Bande unterhalb des starken Signals detektiert werden. Diese schwächere Bande lag ungefähr auf der Höhe der 175 kDa-Bande des Proteinstandards. In den Proteinextrakten der transgenen Hefen mit UGT51B1-MutA und UGT51B1-MutC-Varianten waren insgesamt schwächere Proteinbanden zu erkennen.

Um zu beweisen, dass der GFP-Antikörper auch an andere Fluoreszenzprotein-Varianten<sup>1</sup> bindet und es sich bei den in Abb. 2.3B detektieren Signalen um die CFP-UGT51B1-Varianten handelte, wurden zur Kontrolle die Gensequenzen der Fluoreszenzproteine CFP und GFP aus den Plasmiden p123-CFP und p123-GFP mittels *NcoI*(3') und *NotI*(5') restringiert und gerichtet in den pET24d(+)-Expressionsvektor kloniert. Nach Transformation von *E. coli* C41(DE3) wurde die Genexpression in den generierten, transgenen Zellen durch IPTG-Zugabe für 3 h bei 30°C induziert. Durch Sonifizierung der Zellen konnte anschließend ein zellfreies Proteinhomogenat hergestellt werden, von dem 10  $\mu\text{g}$  Protein nach Proteinbestimmung nach BRADFORD in einer SDS-PAGE

<sup>1</sup>Das CFP wird durch Modifizierungen des GFP-Chromophors (AS 66-68: Gly-Tyr-Gly) generiert. Das Glycin an Position 66 wurde durch ein Threonin ersetzt (> 66-68:Thr-Tyr-Gly) [105].

aufgetrennt, danach gefärbt oder in eine Immunoblot-Analyse mit dem zuvor genannten Antikörper eingesetzt wurden. Im Coomassie-gefärbten PA-Gel konnte jeweils eine stärkere Bande von 25 kDa (ermittelte molare Masse: 27 kDa) detektiert werden, welche mittels Immunoblot-Analyse als CFP bzw. GFP in den jeweiligen Homogenaten der Fluoreszenzprotein-exprimierenden *E. coli*-Zellen identifiziert wurde. Der Einsatz eines polyklonalen Anti-GFP-Antikörpers erwies sich als nicht zweckdienlich. Bei den *P. pastoris*-Proben führte dieser Antikörper zu unspezifischen Bindungen, und in den *E. coli*-Kontrollen konnten überhaupt keine Proteinbanden detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die CFP-markierten UGT51B1-Varianten konnten in *P. pastoris* mittels Immunoblot-Analyse nachgewiesen werden. Im nächsten Schritt konnte die Bedeutung der  $\beta$ -SGlc-Synthese bezüglich der in *P. pastoris* vorliegenden Lokalisierung des Enzyms analysiert werden.

### 2.1.3 UGT51B1-Aktivität beeinflusst Lokalisierung und MIPA-Differenzierung

Durch das aminoterminalen CFP-Tag war es möglich, die Expression und Lokalisierung der  $\beta$ -ErgGlcT-Varianten in *P. pastoris* unter mikropexophagischen Konditionen fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen.

Zur Kontrolle, ob die generierten Hefen unter Methanoleinfluss fluoreszieren, wurden der Komplementierer FL, welcher die unmodifizierte, CFP-markierte UGT51B1-Variante synthetisierte, und der WT-Stamm PPY12 in Vollmedium angezogen und danach für ca. 20 h in Methanol-Medium bei 30°C inkubiert. Dadurch wurden die Peroxisomen proliferiert und der *Aox1*-Promotor aktiviert, welcher die Expression des *getaggen* *Ugt51B1*-Gens steuert. Im Anschluss wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die CFP-UGT51B1-synthetisierende Hefe zeigte kleine Fluoreszenz-“Spots”, während der WT diese konzentrierten Signale wiederum nicht erkennen ließ (Daten nicht gezeigt). Weitere Fluoreszenz-Studien wurden von unserem Kooperationspartner Masahide Oku (Univ. Kyoto) durchgeführt. In Kyoto fanden sich optimalere Bedingungen: Vor allem fand sich dort die Erfahrung, um die mikroskopischen Analysen adäquat einordnen zu können.

Für die fluoreszenzmikroskopischen Analysen wurden die Zellen in Vollmedium angezogen, danach in Methanol-Medium für ca. 12 h und anschließend für 30 min in Glucose-Medium kultiviert, bevor die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurden (Abb.2.4). Die Vakuole konnte mit FM4-64 gefärbt werden und Co-Expressionsstudien mit einem Marker für die Präsenz des MIPA, YFP-ATG8 (syn. PAZ2), durchgeführt werden. Die Lokalisierung des Proteins YFP-ATG8 konnte nach Co-Expression des codierenden Gens ebenfalls mittels Induktion durch Methanol mit dem Fluoreszenz-Muster von CFP-UGT51B1 verglichen werden.

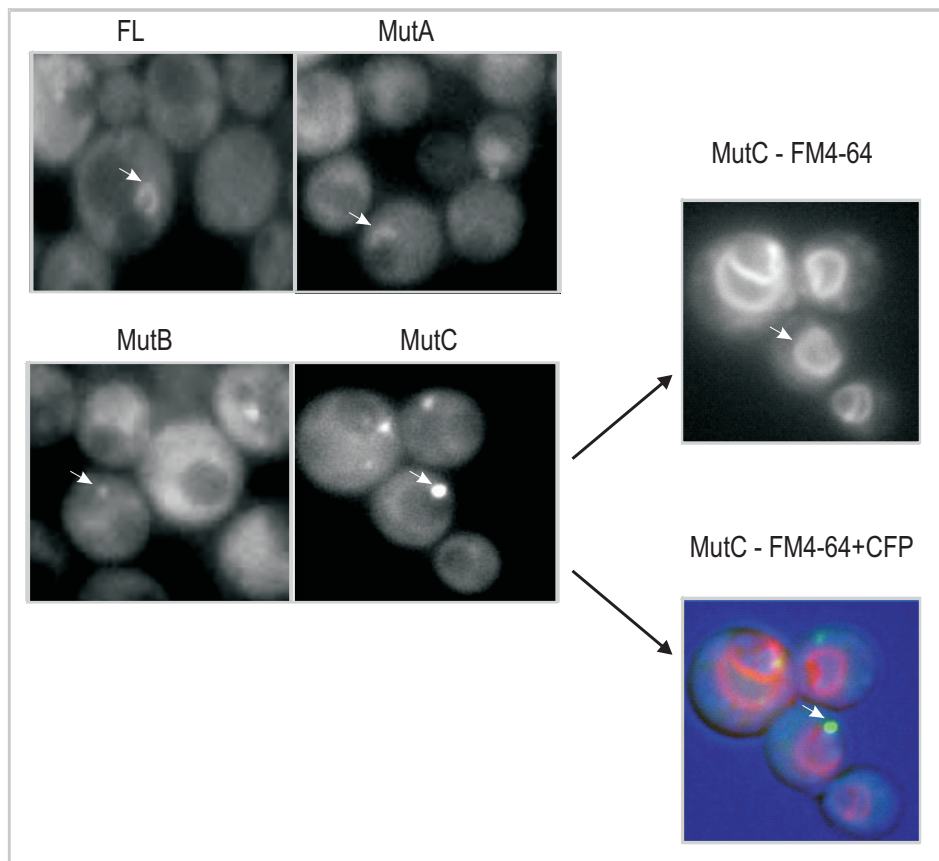


Abbildung 2.4: UGT51B1-Varianten, die  $\beta$ -ErgGlc synthetisieren konnten, zeigten ihre Lokalisierung in einer *cup-like-structure* und die in der  $\beta$ -ErgGlc-Synthese-beeinträchtigten Varianten in einem punktförmigen CFP-Signal.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen detektierter CFP-Signale in verschiedenen *P. pastoris*-Transformanten, welche CFP-UGT51B1 bzw. Variationen synthetisierten. Mut A-C wiesen jeweils eine Mutation in UGT51B1 auf, während FL das native Protein beinhaltete. Die Aufnahmen wurden 30 min nach einem Wechsel in Glucose-Medium nach 12-stündiger Inkubation in Methanol-Medium angefertigt. Aufnahmen der Lokalisierungsanalyse von UGT51B1-MutC zeigen exemplarisch in separaten Aufnahmen eine Vakuolenfärbung mit FM4-64 (mit Pfeil markiert) und eine Fusion des CFP- und des FM4-64-Signals. Pfeile weisen ebenso auf die Fluoreszenz-Signale hin, welche sowohl eine punktförmige (MutB und C) als auch eine *cup-like-structure* (FL, MutA) darstellen können.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der *P. pastoris*-Zellen in Abbildung 2.4 zeigen folgende Muster auf: Die Hefen, die das native Protein (FL) bzw. die UGT51B1-MutA-Variante synthetisierten, zeigten eine sogenannte "*cup-like-structure*". Diese Struktur konnte sehr nah an der Vakuolenmembran detektiert werden. Dies verdeutlicht die Färbung der Vakuolenmembran mit FM4-64, dargestellt durch eine rote Struktur, und die Fusion des CFP- und des FM4-64-Signals. Im Gegensatz dazu zeigten die anderen Protein-Varianten UGT51B1-MutB und -MutC punktförmige CFP-Signale.

Des Weiteren wurde eine Co-Expression mit YFP-ATG8 durchgeführt und die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. M. Oku konnte eine Co-Lokalisierung von YFP-ATG8 in den Zellen detektieren, welche die *cup-like-structures* aufzeigten (Daten nicht gezeigt) und verwies darauf, dass diese Hefen in der Lage sind, ein funktionales MIPA-Membransystem auszubilden (s. 1.7.2, S.37).



Es konnte durch die fluoreszenzmikroskopischen Analysen gezeigt werden, dass die Lokalisierungsstudien der UGT51B1-Varianten unter mikropexophagischen Konditionen verschiedene Lokalisierungsmuster zeigten. Die Detektion einer *cup-like-structure* und die Folgerung auf einen funktionalen MIPA ließ darauf schließen, dass die Hefen, welche das Enzym nur in einer punktförmigen Struktur lokalisierten, keinen funktionalen MIPA ausbildeten und dadurch ihre Peroxisomen nicht degradieren konnten.

Im Rahmen der Erzeugung von UGT51B1-Varianten führten zwei Punktmutationen G1389R (MutB) und D1412A (MutC) zur Beeinträchtigung der  $\beta$ -SGlc-Synthesefähigkeit, während nach Generation von Mutation P1164L (MutA) die SG-Synthese aufrecht gehalten wurde. Die CFP-markierten UGT51B1-Varianten konnten in *P. pastoris* mittels Immunoblot-Analyse nachgewiesen und fluoreszenzmikroskopisch lokalisiert werden.  $\beta$ -ErgGlc-synthetisierende UGT51B1-Varianten lokalisierten in einer *cup-like-structure* und enzymatisch-inaktive UGT51B1-Varianten in einer punktförmigen Struktur. Im nächsten Schritt sollten nun geklärt werden, ob die Zellen mit *cup-like*-Lokalisation Peroxisomen abbauen können und die mit punktförmiger Lokalisation nicht (s. 2.3.1, S.77).

## 2.2 Identifizierung, Klonierung & Charakterisierung von SGTs zur Substitution des $\beta$ -ErgGlcs in *P. pastoris*

In diesem Abschnitt wird die Identifizierung von SGT-codierenden Gensequenzen aus *B. burgdorferi* und *B. hermsii* behandelt. Nach Identifizierung von Kandidaten-Gensequenzen wurden diese in Expressionsvektoren kloniert, eine UGT51B1-defiziente *P. pastoris*-Mutante mit den Konstrukten transformiert und die Gensequenzen heterolog exprimiert. Die Expression der SGT-Gene war notwendig, da es im Vorfeld dieser Arbeit nicht gelang die UGT51B1-defiziente *P. pastoris*-Mutante mit strukturellen SG-Varianten zu füttern.

Deswegen sollten in dieser Arbeit transgene Hefen generiert werden, welche heterologe SGTs exprimierten und die KO-Mutante in die Lage versetzten, verschiedene SG-Varianten zu synthetisieren. Die in *P. pastoris* erzeugten SGs konnten danach hinsichtlich ihrer Struktur durch NMR- und Massenspektrometrie(MS)-Analyse untersucht und die SGTs charakterisiert werden. Die Charakterisierung sollte das Ermitteln von pH-Bereichen umfassen, in denen SGT-Aktivität auftritt, und die Affinität von Substraten durch Ermitteln der Michaelis-Menten-Konstante ( $K_M$ ).

Die Expression heterologer SGTs nach der *Glycolipid-Engineering*-Methode sollte zu Hefetransformanten führen, die in der Lage waren, strukturelle Varianten des  $\beta$ -ErgGlcs zu synthetisieren, um auch die biologische Funktion dieser SG-Varianten im Vergleich zum nativen  $\beta$ -ErgGlc zu analysieren (s. 2.3.1, S.77).

Die  $\alpha$ -CholGlcT aus *H. pylori* war zu Beginn bereits bekannt, so dass direkt mit der Generation von Hefetransformanten begonnen werden konnte. Darauf wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

### 2.2.1 Substitution des $\beta$ -ErgGlc in *P. pastoris* durch $\alpha$ -ErgGlc

Um die biologische Funktion von  $\alpha$ -SGlc in *P. pastoris* bezüglich der Degradation der Peroxisomen in der Hefe untersuchen zu können (s. auch 2.3.2, S.82), musste mittels *Glycolipid-Engineering* zuerst eine Hefe generiert werden, welche  $\alpha$ SGlc anstelle des regulären  $\beta$ -ErgGlc synthetisiert. Durch Integration des  $\alpha$ -SGlcT-Gens in das Genom der UGT51B1-defizienten KO-Mutante (GS115 $\Delta$ *ugt51b1*) sollte die Hefe in der Lage sein,  $\alpha$ -SGlc zu synthetisieren.

Die besagte  $\alpha$ -SGlcT (Hp0421p) aus *H. pylori* wurde 2006 von A.-H. Lebrun im Rahmen ihrer Diplomarbeit identifiziert. Dazu wurde die codierende Gensequenz *Hp0421* kloniert und sowohl in *E. coli* als auch in *P. pastoris* heterolog exprimiert [186, 187]. Jedoch wurden die erhaltenen Transformanten hinsichtlich der Integration des für die  $\alpha$ -SGlcT-codierenden Gensequenz *Hp0421* nicht der Zielsetzung dieser Arbeit nutzend selektiert. Es wurden damals diejenigen Transformanten ausgewählt, welche *Hp0421* im *Aox1*-Locus integriert hatten. Durch die Deletion des *Aox1*-Gens waren die resultierenden Mut<sup>S</sup>-Stämme hinsichtlich einer Untersuchung der Peroxisomendegradationsfähigkeit nicht mehr zu verwenden, da eine intakte AOX hierfür essentiell ist (s. 2.3.1 und 2.3.2, S.77 und 82). Deswegen sollte auch hier, wie in den anderen bisher in dieser Arbeit generierten Transformanten, eine Integration in den *His4*-Locus erreicht werden.

Aus diesem Grund wurde die *P. pastoris* GS115 $\Delta$ *ugt51b1*-Mutante erneut mit dem Konstrukt pPIC3.5-hp0421 (inkl. Kozak-Sequenz) bzw. dem Leervektor pPIC3.5 nach Linearisierung mit Aat-II und NdeI transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden danach zuerst hinsichtlich der Kompensation der Histidin-Auxotrophie (durch die Komplementation von *his4*), wie bereits beschrieben, untersucht. Auf Methanol-haltigem Nährboden konnte, wie ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit schon beschrieben, untersucht werden, welche der Transformanten noch eine intakte AOX1 aufwiesen: Diejenigen, welche schnell wuchsen, entsprachen dem Mut<sup>+</sup>-Schema und wiesen auf eine intakte *Aox1* hin. Die langsam wachsenden Transformanten entsprachen dem Mut<sup>S</sup>-Schema und konnten aufgrund des deletierten *Aox1*-Gens das Methanol als einzige vorhandene Energiequelle nicht umsetzen. Nach Identifikation von Mut<sup>+</sup>-Transformanten (T1-3) wurde eine *in situ*-AOX-Aktivitätsanalyse (eine AOX-Färbung) nach Stasyk *et al.* durchgeführt [330]: Zwei Transformanten (T1+3) zeigten eine starke AOX1-Aktivität (AOX2 s. 2.3.1, S.77) und eine weitere Transformante (T2) eine etwas schwächere. So wurde die getroffene Auswahl bestätigt und eine intakte AOX1 phänotypisch nachgewiesen. Danach wurden die rekombinanten Hefen genotypisch mittels PCR weitergehend analysiert, um anschließend einem Nachweis hinsichtlich der SGT-Aktivität unterzogen zu werden: Zum Einen mittels einer Lipidanalyse und zum Anderen mittels eines radioaktiven Enzymassays.

Die PCR wurde sowohl mit genspezifischen, internen Primern für *Hp0421* als auch für *Aox1* durchgeführt. Mittels dieser PCRs konnte belegt werden, dass das gewünschte Gen inseriert wurde und der *Aox1*-Locus von der Integration des Inserts unangetastet blieb (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt konnte nun untersucht werden, ob die inserierte Gensequenz in der rekombinanten Hefe exprimiert wurde und das translatierte Enzym aktiv war. Dazu wurde die Genexpression nach Kultivierung der Zellen mittels Methanol für 16 h bei 30°C induziert und im Anschluss zum Einen eine Lipidanalyse durchgeführt, indem die Lipide aus Hefezellen, wie bereits beschrieben, extrahiert

## 2 Ergebnisse

und die Lipidextrakte dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt wurden (Abb.2.5A). Zum Anderen konnte, wie ebenfalls bereits beschrieben, ein zellfreies Homogenat hergestellt und dieses in eine *in vitro*-Enzymanalyse mit markiertem [<sup>14</sup>C]Cholesterol und UDP-Glucose eingesetzt werden (Abb.2.5B).

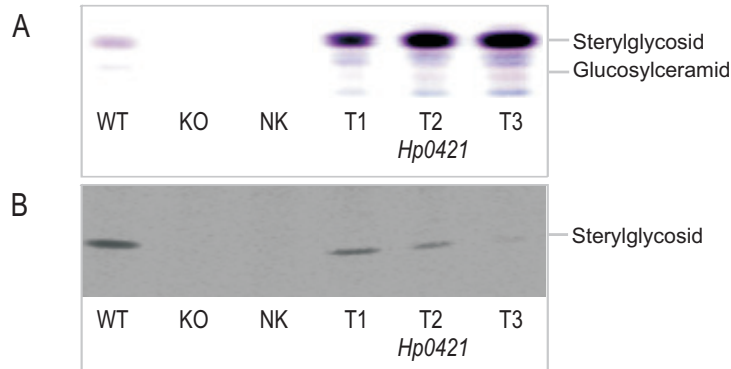


Abbildung 2.5: *Hp0421*-exprimierende Hefen zeigten  $\alpha$ -SGlc-Synthese.

**A** Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Gesamtlipidextrakten. **B** Dünnschichtchromatographische Auftrennung von radioaktiven Produkten eines Enzymassays zur Bestimmung der SGT-Aktivität. Eingesetzt wurden 50  $\mu$ l Protein und als markiertes Substrat [<sup>14</sup>C]Cholesterol (270.000 dpm; 21  $\mu$ M) und als Zuckerdonor nicht-markierte UDP-Glucose (0,2 mM). Gesamtlipidextrakte und Homogenate wurden aus rekombinanten Hefen (KO, NK, T1-3) und zugehörigen Kontrollen hergestellt: Aus dem *P. pastoris*-WT-Stamm GS115 und einer KO-Mutante ( $\Delta$ *ugt51b1*) hergestellt. Rekombinante Hefen (T1-3) wurden durch Transformation der KO-Mutante mit pPIC3.5-*hp0421* generiert. Als Negativkontrolle (NK) wurde eine Hefetransformante, nach Transformation mit dem pPIC3.5-Leervektor aufgeführt. Alle erhaltenen Extrakte wurden dünn-schichtchromatographisch in Chloroform/Methanol 85:15 aufgetrennt. Die Detektion der Lipide erfolgte in A mittels des Sprühreagenzes  $\alpha$ -Naphtholschwefelsäure und anschließendem Veraschen und in B mittels "Radioscanning" nach dreistündiger Exposition. Es sind nur die Sterylglycosid-umfassenden Bereiche dargestellt.

In Abbildung 2.5A und B ist zu erkennen, dass die *Hp0421*-exprimierenden Hefen (T1-3) nach Methanol-Induktion  $\alpha$ -SGlc synthetisierten und  $\alpha$ -SGlcT-Aktivität zeigten. Die dünn-schichtchromatographische Auftrennung der Gesamtlipidextrakte zeigte nach Expression des heterologen Gens *Hp0421* eine starke Akkumulation von  $\alpha$ -SGlc, welche von T1 bis zu T3 zunimmt (A). Im Gegensatz dazu fielen die Lipidbanden der *in vitro*-Analyse (B) etwas schwächer aus, und auch die Intensität der  $\alpha$ -SGlc-Bande nahm von T1 zu T3 ab. Als Positivkontrolle diente der *P. pastoris* WT-Stamm GS115, welcher  $\beta$ -SGlc sowohl *in vivo* als auch nach einem *in vitro*-Enzymassay synthetisierte. Die  $\beta$ -SGlcT-defiziente KO-Mutante ( $\Delta$ *ugt51b1*) und die Leerplasmid-Kontrolle (NK) zeigten keine SG-Synthese bzw. SGT-Aktivität. Diese Abbildung zeigt eine schlechte Auftrennung des SG und GlcCer, so dass das SG nicht über den Rf-Wert, sondern im hier vorliegenden Fall durch Erfahrungswerte einem Anomer zugeordnet wurde. In der nächsten Abbildung liegt eine bessere Auftrennung vor, welche die an dieser Stelle vorgenommene Zuordnung bestätigen konnte.

Nach erfolgreicher Integration des Gens *Hp0421* in das *P. pastoris*-Genom und dem Nachweis der Aktivität der  $\alpha$ -SGlcT (*Hp0421p*) wurde eine der Hefetransformanten (T3) für weitere Untersuchungen ausgewählt. Das rekombinante SG sollte einer Analyse seiner biologischen Funktion unterzogen werden. Es sollte analysiert werden, ob diese rekombinante Hefe nach einem Wechsel der Kohlenstoffquelle von Methanol zu Glucose in der Lage war, ihre Peroxisomen abzubauen. Näheres zu dieser Analyse ist Abschnitt 2.3.2 (S.82) zu entnehmen.

Nachdem erste Resultate der Analyse der biologischen Funktion der SG-Variante zeigten, dass die Genexpression unter der Kontrolle des starken *Aox1*-Promotors einen negativen Effekt auf die Le-

## 2 Ergebnisse

bensfähigkeit (Viabilität) der Hefezellen hatte (s. 2.3.2, S.82), musste eine Alternative gefunden werden. Als Alternative wurde der Promotorbereich der *Pichia*-eigenen  $\beta$ -SGlcT anstelle des *Aox1*-Promotors in das pPIC3.5-*hp0421*-Vektorkonstrukt eingebracht. Dies sollte die Genexpression etwas moderater gestalten. Die *P. pastoris* GS115 $\Delta$ *ugt51b1*-Mutante wurde mit dem SalI-linearisierten Vektorkonstrukt pPIC3.5-*P<sub>ugt51b1</sub>*-*hp0421* transformiert. Nach Selektion und genotypischer Analyse mit genspezifischen, internen Primern für *Hp0421* und *Aox1* (Daten nicht gezeigt) wurde der ausgewählte rekombinante Klon mittels einer Lipidanalyse und einem radioaktiven Enzymassay hinsichtlich seiner Enzymaktivität, wie zuvor beschrieben, untersucht (Abb.2.6). Die Induktion der Genexpression erfolgte in diesem Fall für drei Stunden bei 30°C mit Methanol.

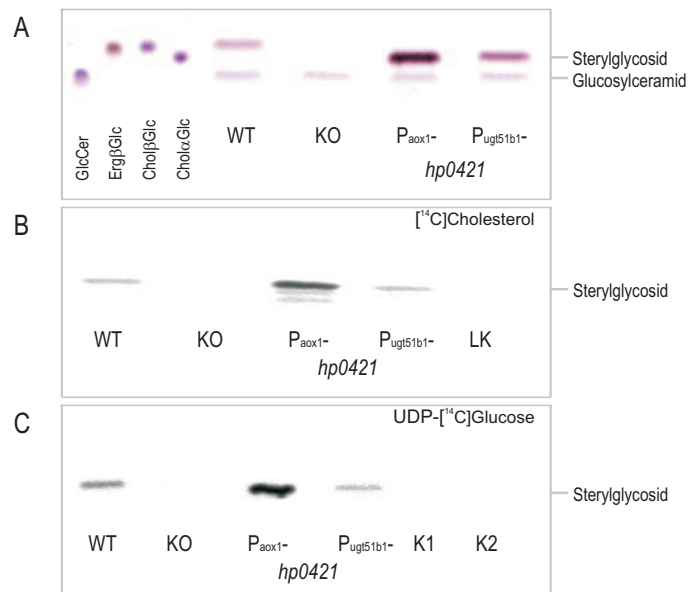


Abbildung 2.6: Unter Kontrolle des native Promotors von *Ugt51b1* konnte *Hp0421p* in *P. pastoris* die Umsetzung von Ergosterol und UDP-Glucose zu  $\alpha$ -ErgGlc katalysieren.

**A** Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Gesamtlipidextrakten. **B** und **C** Dünnschichtchromatographische Auftrennung von radioaktiven Produkten nach einem *in vitro*-Enzymassay zur Bestimmung der SGT-Aktivität. Die Enzymassays wurden beide mit 100  $\mu$ g Protein durchgeführt. In **B** wurden [<sup>14</sup>C]Cholesterol (400.000 dpm; 16  $\mu$ M) und nicht-markierte UDP-Glucose (0,5 mM) verwendet, während der Assay in **C** mit UDP-[<sup>14</sup>C]Glucose (100.000 dpm, 0,75  $\mu$ M) und Cholesterol (0,2 mM) durchgeführt wurde. Extrakte wurden aus rekombinanten Hefen, welche zum Einen *Hp0421* unter der Kontrolle des *Aox1*-Promotors (*P<sub>aox1</sub>*-*hp0421*) bzw. unter jener des nativen  $\beta$ -SGlcT-Promotors (*P<sub>ugt51b1</sub>*-*hp0421*) exprimierten, nach dreistündiger Induktion der Genexpression mit Methanol gewonnen. Als Kontrollen dienten der *P. pastoris* WT GS115 und der KO-Stamm GS115 $\Delta$ *ugt51b1* und als Referenzen isoliertes Glucosylceramid (GlcCer), Ergosteryl- $\beta$ -Glucosid ( $\beta$ -ErgGlc), Cholesteryl- $\beta$ -Glucosid ( $\beta$ -CholGlc) und Cholesteryl- $\alpha$ -Glucosid ( $\alpha$ -CholGlc). LK: Leerkontrolle ohne Homogenate. K1+2: Kontrollen mit Homogenat von WT und *P<sub>ugt51b1</sub>*-*hp0421*-exprimierender Hefe ohne markierten Zuckerdonor. Alle Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch in Chloroform/Methanol 85:15 aufgetrennt. Die Detektion der Lipide erfolgte in **A** mittels des Sprühreagenzes  $\alpha$ -Naphtholschwefelsäure und anschließendem Veraschen und in **B** und **C** mittels "Radioscanning" nach zwei- (**B**) und sechsständiger (**C**) Exposition. Es wurden jeweils nur die Sterylglycosid-umfassenden Bereiche dargestellt.

Die Abbildungen 2.6 A-C zeigen, dass die Expression von *Hp0421* auch unter der Kontrolle des nativen Promotors von *Ugt51b1* erfolgte. Für die rekombinanten Hefen, die *Hp0421* unter der Kontrolle des starken *Aox1*-Promotors (*P<sub>aox1</sub>*-*hp0421*) bzw. des konstitutiven, nativen *Ugt51b1*-Promotors (*P<sub>ugt51b1</sub>*-*hp0421*) exprimierten, konnte die Synthese von  $\alpha$ -ErgGlc *in vivo* und die Enzymaktivität einer  $\alpha$ -SGlcT *in vitro* nachgewiesen werden. Der WT-Stamm synthetisierte *in vivo*  $\beta$ -ErgGlc,

und eine entsprechende Enzymaktivität konnte *in vitro* detektiert werden, während der *Ugt51B1*-defiziente KO-Stamm keine Synthesefähigkeit und Enzymaktivität zeigte. Im Lipidextrakt war in allen Extrakten unterhalb der SG-Bande noch ein weiteres Glycolipid, das GlcCer, zu detektieren (A). *In vitro* konnten die nach Lipidanalyse ermittelten Resultate für die Enzymaktivität nach einem Enzymassay mit markiertem Cholesterol (B) als auch markierter UDP-Glucose (C) bestätigt werden. Kontrollen ohne Homogenat bzw. ohne markierten Zuckerdonor zeigten in beiden Ansätzen keine SG-Synthese. In allen Versuchsansätzen (nach Lipidanalyse oder Enzymassay) wurden unter der Kontrolle des *Aox1*-Promotors die intensivsten Banden für SG detektiert. Im Gegensatz dazu fielen die SG-Banden unter der Kontrolle des nativen Promotor von *Ugt51B1* moderater aus. Die Banden der  $P_{ugt51b1}$ -*hp0421*-exprimierenden Mutante entsprachen in ihrer Intensität der SG-Bande des WT-Stamms.

Es konnten zwei Hefestämme generiert werden, welche Hp0421p anstelle von UGT51B1 synthetisierten und dadurch in der Lage waren,  $\alpha$ -SGlc zu generieren. Von den *Hp0421*-exprimierenden Hefen wurde zwei Varianten generiert: Die heterologe Expression erfolgte entweder unter Kontrolle des starken *Aox1*-Promotors oder des konstitutiven, nativen Promotors von *Ugt51B1*. Unter dem nativen Promotor verlief die Genexpression und die SG-Biosynthese etwas moderater. Auch die rekombinante Hefe, welche *Hp0421* moderater exprimierte, wurde in weitere Analysen zur Bestimmung der Peroxisomendegradationsfähigkeit eingesetzt. Dabei sollte, wie zuvor schon beschrieben, analysiert werden, ob diese rekombinante Hefe in der Lage ist, nach einem Wechsel der Kohlenstoffquelle von Methanol zu Glucose ihre Peroxisomen abzubauen. In diesem Fall sollte auch überprüft werden, ob die Zellviabilität der rekombinanten Hefe nach moderater *Hp0421*-Expression im Gegensatz zur Expression unter Kontrolle des *Aox1*-Promotors nicht mehr beeinträchtigt ist (s. 2.3.2, S.82).

### 2.2.2 Identifizierung der $\beta$ -CholGalT aus *B. burgdorferi* und Substitution des $\beta$ -ErgGlcs in *P. pastoris* durch $\beta$ -ErgGal

In diesem Abschnitt wird die Identifikation eines Cholesterol- $\beta$ -Galactosyltransferase ( $\beta$ -CholGalT)-Gens aus *B. burgdorferi* behandelt. Das Enzymprodukt  $\beta$ -CholGal konnte in dem Mikroorganismus schon nachgewiesen werden [20, 309].

Einen Ausgangspunkt, um passende Kandidaten-Sequenzen auszuwählen, bot die CAZy-Datenbank. Basierend auf den Daten dieser Datenbank standen vier Kandidaten mit putativer GT- bzw. SGT-Funktion aus vier verschiedenen Proteinfamilien zur Auswahl<sup>2</sup>, welche prinzipiell alle für eine  $\beta$ -SGalT aus *B. burgdorferi* B31 codieren konnten. Die vier Kandidaten des 2005 von Janosch Hildebrand gestarteten Projektes waren:

---

<sup>2</sup><http://www.cazy.org/geno/224326.html>

## 2 Ergebnisse

- Bb0454: ein putatives LPS-Biosynthese-bezogenes Protein (GT4,  $\alpha$ -GT)
- Bb0572 (LgtD): eine putative GT (GT2,  $\beta$ -GT)
- Bb0767 (MurG):  
eine putative UDP-N-Acetylglucosamin:N-Acetylmuramyl-(pentapeptid)pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamin-Transferase (GT28,  $\beta$ -GT)
- Bb0732: ein putatives Penicillin-bindendes Protein (PBP-3) (GT51,  $\beta$ -GT)

Die zugehörigen *Accession Numbers* (*Acc.No.s*) sind für Bb0454 AAC66815.1 (Genbank) und O51410 (Uniprot), für Bb0572 AAC66931.1 und O51519, für Bb0767 AAC67113.1 und O51708 sowie für Bb0732 AAC67082.1 und O51674.

Einer der Kandidaten konnte 2007 von dem weiteren Vorgehen ausgeschlossen werden. *Bb0454* wurde in diesem Jahr von Östberg *et al.* als Monogalactosyl-1,2-Diacylglycerol-Synthase identifiziert [333]. Zudem wurde dieser Sequenz als einziger eine putative  $\alpha$ -GT-Funktion zugrunde gelegt, so dass diese als sehr unwahrscheinlicher Kandidat gehandelt wurde. Bb0454 wurde im hier vorliegenden Fall nicht weiter bearbeitet.

Alle anderen ORFs der für putative  $\beta$ -SGalT-codierenden Gene konnten mittels spezifischer Primer mit gDNA von *B. burgdorferi* B31 als Matrize amplifiziert und zur Überprüfung in einen Klonierungsvektor (pCR2.1-TOPO bzw. pGEM-T) kloniert werden. Es wurden bereits von Janosch Hildebrand schon Zwischenkonstrukte generiert, und nach Übernahme dieses Projektes Anfang 2007 wurden alle inserierten *Borrelia*-Amplifikate nochmals durch Sequenzierung überprüft. Wenn notwendig, wurden die ORFs erneut amplifiziert, neue Zwischenvektoren generiert und die Gensequenzen in Expressionsvektoren kloniert. Dies war der Fall, wenn die Sequenzierungsanalysen z.B. im Fall von Bb0572 auf unerwünschte Modifikationen wie Punktmutationen, Verschiebungen des Leserahmens (*frame shift*) u.ä. hinwiesen. Zu den vorgenommenen PCRs ist anzumerken, dass sich die Amplifikate mit ca. 1 kb problemlos amplifizieren und klonieren ließen. Probleme hingegen bereitete *Bb0732* mit einer Größe von ca. 2,8 kb. Der *Bb0732*-beinhaltende pGEM-T-Zwischenvektor wurde vom MPI für Infektionsbiologie (Berlin) generiert und zur Verfügung gestellt.

Nach Überprüfung der Zwischenvektoren durch Sequenzierung wurden die codierenden Bereiche der potentiellen  $\beta$ -SGalT-Gensequenzen mit Typ II-Restriktionsenzymen aus den Zwischenvektoren restringiert. Entsprechende Erkennungssequenzen wurden zuvor an die 5'-Bereiche der Primer angefügt, mit welchen die codierende Sequenz mit *Borrelia*-genomischer DNA (gDNA) oder Plasmid-DNA (psDNA) eines zuvor genannten Klonierungsvektors als Matrize amplifiziert worden war. Dann konnte das Schnittprodukt in entsprechende Expressionsvektoren für *E. coli* (pET24d(+) oder pET24c(+) mit His<sub>6</sub>-Tag) sowie für *P. pastoris* (pPIC3.5 bzw. pGAPz-B) gerichtet kloniert werden. Bei *P. pastoris* wurde bei der Amplifikation zur Förderung der Expression eine Kozak-Sequenz an den 5'-Bereich angefügt. Die für die anschließende Klonierung verwendeten codierende-Sequenz-Vektor-Kombinationen und Überhänge zur Klonierung können Tabelle 4.4 (Anhang 10, S.194) entnommen werden. Die Klonierung von *Bb0732* in pET24c(+) schlug mehrmals fehl, so dass das pGEM-T-Zwischenvektorkonstrukt in *E. coli* C41(DE3) eingeschleust wurde. Alle anderen zu transformierenden *E. coli*- und *P. pastoris*-Stämme wurden je nach generiertem Expressionsvektorkonstrukt ausgewählt: pET24d(+)- und pET24c(+)-Konstrukte wurden in *E. coli* C41(DE3) eingebracht, pPIC3.5-Konstrukte in *P. pastoris* GS115 $\Delta$ *ugt51b1* (his<sup>-</sup>, Zeo<sup>R</sup>) und pGAPz-B-Konstrukte

## 2 Ergebnisse

aufgrund der im Vektor zur Selektion vorliegenden Zeocinkassette in GS115 $\Delta$ *ugt51b1* (HIS<sup>+</sup>, Zeo<sup>S</sup>). Die Linearisierung der pPIC3.5-Konstrukte erfolgte mit BglIII und des pGAPz-B-Konstruktes mit AvrII und AgeI.

Nach Klonierung in die jeweiligen Expressionsvektoren wurden folglich die entsprechenden Zellen von *E. coli* und *P. pastoris* mit den jeweiligen Konstrukten transformiert. Die anschließende Selektion der Transformanten erfolgte bei *E. coli* über die im Vektor vorliegende Kanamycin-Resistenz (bei pGEM-T über die Ampicillin-Resistenz). Bei *P. pastoris* wurden die Transformanten im ersten Schritt bei pPIC3.5-Konstrukten über die Komplementation der Histidin-Auxotrophie (durch die Komplementation von *his4*) und bei pGAPz-B-Konstrukten über die erzeugte Zeocin-Resistenz selektiert. Dazu wurden die Transformanten auf Histidin-defizientem oder Zeocin-haltigem Festmedium angezogen und die Zellen, die Wachstum zeigten, weitergehend analysiert. Der Genotyp ausgewählter Transformanten wurde anschließend mit genspezifischen, internen Primern für die jeweiligen Borrelien-Gene verifiziert (Daten nicht gezeigt). Für eine weitergehende Analyse war es zudem wichtig, nur diejenigen Transformanten weiter zu verwenden, welche über eine funktionale AOX1 verfügten (s. 2.3.1 und 2.3.3, S.77 und 84). Dazu wurde eine PCR mit genspezifischen, internen Primern für *Aox1* zur Verifizierung der Präsenz und Integrität von *Aox1* durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Nachdem die Transformanten nach den genannten Kriterien ausgewählt wurden, konnten die rekombinanten Hefen und *E. coli*-Zellen bezüglich ihrer  $\beta$ -SGal-Synthesefähigkeit und der Aktivität des zugrunde liegenden Enzyms analysiert werden.

Die Expression der heterologen Gene in *E. coli* erfolgte i.d.R. für 3 h bei 30°C nach Zugabe von IPTG. Nach Sonifizierung der Zellen wurde ein zellfreies Homogenat hergestellt und die Proben, wie bereits beschrieben, einem radioaktivem Enzymassay mit [<sup>14</sup>C]Cholesterol und nicht-markierter UDP-Galactose unterzogen. In *P. pastoris*-Zellen wurde die Genexpression durch Zugabe von Methanol i.d.R. für ca. 16 h bei 30°C induziert. Bei den mit dem pGAPz-B-Konstrukten transformierten Hefen musste eigentlich keine Geninduktion vorgenommen werden, da die Expression durch den vorliegenden Promotor konstitutiv erfolgte. Nach der Inkubation wurden, wie bereits beschrieben, zellfreie Homogenate hergestellt, in einen radioaktiven Enzymassay eingesetzt und die Reaktionsprodukte anschließend dünnschichtchromatographisch aufgetrennt.

Sowohl die Lipidextrakte gewonnen aus Hefezellen (s. Abb.2.7) als auch die *in vitro*-Enzymanalyse mit Homogenaten aus *E. coli*- und Hefezellen (nicht gezeigt) resultierten in keiner  $\beta$ -SGal-Synthese bzw.  $\beta$ -SGalT-Aktivität. Es kann insgesamt festgehalten werden, dass die durchgeführten Analysen nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung von Lipidextrakten der rekombinanten Hefen, welche jeweils eines der Borrelien-Gene (*Bb0572*, *Bb0767*, *Bb0732*) in ihr Genom integriert hatten, keine  $\beta$ -ErgGal-Synthese zeigten. Abbildung 2.7 zeigt exemplarisch das Resultat einer Lipidanalyse nach 19 h Methanol-Induktion der Hefen mit den inserierten Kandidatengenen *Bb0572* und *Bb0767*.

## 2 Ergebnisse

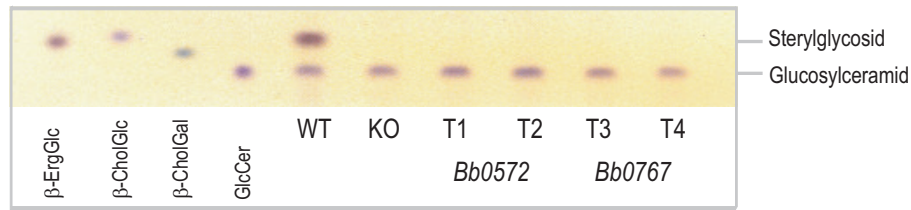


Abbildung 2.7: Die heterolog exprimierten, nativen Gensequenzen *Bb0572* und *Bb0767* führten zu keiner  $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese.

Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Lipidextrakten rekombinanter Hefen (T1-4), welche entweder *Bb0572* oder *Bb0767* exprimierten. Die Induktion der Genexpression erfolgte für 19 h mit Methanol. Als Kontrollen dienten der WT-Stamm GS115 und eine  $\beta$ -ErgGlc-defiziente KO-Mutante (GS115 $\Delta$ *ugt51b1*) sowie als Referenzen isoliertes Ergosteryl- $\beta$ -Glucosid ( $\beta$ -ErgGlc), Cholesteryl- $\beta$ -Glucosid ( $\beta$ -CholGlc), Cholesteryl- $\beta$ -Galactosid ( $\beta$ -CholGal) und Glucosylceramid (GlcCer). Nach einer Gesamtlipidextraktion wurden alle Extrakte dünn-schichtchromatographisch in Chloroform/Methanol 85:15 aufgetrennt. Die Detektion der Lipide erfolgte mittels des Sprühreagenzes  $\alpha$ -Naphtholschwefelsäure und anschließendem Veraschen. In der Abbildung ist nur die Glycolipidfraktion dargestellt.

Abbildung 2.7 zeigt, dass nur der *P. pastoris*-WT  $\beta$ -ErgGlc synthetisierte, da nur in diesem Lipidextrakt eine Lipidbande mit einem entsprechendem Rf-Wert zeigte, welchen auch die  $\beta$ -ErgGlc-Referenz aufwies. Der Rf-Wert der  $\beta$ -CholGlc-Referenz wich nur geringfügig ab. Ein Glycolipid, welches dasselbe Laufverhalten wie die  $\beta$ -CholGal-Referenz zeigte, konnte in keinem Lipidextrakt detektiert werden. Die  $\beta$ -ErgGlc-defiziente KO-Mutante synthetisierte erwartungsgemäß kein SG. In allen Lipidextrakten konnten jedoch eine Glycolipidbande unterhalb des SGs als GlcCer identifiziert werden.

Die *in vitro*-Analysen führten ebenfalls zu keiner  $\beta$ -SGal-Synthese (Daten nicht gezeigt). Ausschließlich die Kontrollen zeigten die erwarteten Ergebnisse. Als Positivkontrolle diente der *P. pastoris* WT-Stamm GS115, welcher  $\beta$ -ErgGlc synthetisierte. Der KO-Stamm GS115 $\Delta$ *ugt51b1*, welcher als Negativkontrolle eingesetzt wurde, zeigte hingegen keine SG-Syntheseaktivität (Daten nicht gezeigt). Die heterologe Expression in *E. coli* führte ebenfalls nicht zum Erfolg und zeigte keine  $\beta$ -SGal-Synthese (Daten nicht gezeigt). Versuche die Genexpression und folglich die Enzymaktivität durch Änderungen der Inkubationsbedingungen zu beeinflussen zeigten keine SG-Synthese-fördernde Wirkung. Es wurde u.a. die Induktion mit Methanol-haltigem Minimal-Glycerolmedium durchgeführt oder die Enzymassay-Bedingungen durch die Zugabe des Detergens Triton X-100 modifiziert.

Aufgrund der Präsenz der His<sub>6</sub>-Tag-Sequenz im pET24d(+)-Vektorsystem und des Entfernens des Stoppcodons der klonierten Borrelia-Gensequenzen konnten die Proteine der exprimierten Gene mit diesem carboxyterminalen Tag versehen werden. Anhand dessen sollte nun überprüft werden, inwiefern die heterologen Gene überhaupt exprimiert und in Proteine translatiert werden. Der Nachweis über das His<sub>6</sub>-Tag der Proteine, die eine errechnete molekulare Masse von ca. 42 kDa besitzen, konnte mittels Immunoblot-Analyse ausschließlich für Bb0572p und Bb0767p durchgeführt werden, da *Bb0732* im pGEM-T-Vektor ohne His<sub>6</sub>-Tag vorlag. Für den Nachweis wurde zellfreies Homogenat aus dem zuvor beschriebenen Enzymassay verwandt. Es wurden 10  $\mu$ g Gesamtprotein mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Western-Blot auf eine Membran übertragen. Der Nachweis des Proteins erfolgte durch den Einsatz eines monoklonalen Anti-His-Tag-Antikörpers.



## 2 Ergebnisse

Die Immunoblot-Analyse verzeichnete ausschließlich für die Kontrollen Proteinbanden, welche darauf verwiesen, dass die Methode prinzipiell funktioniert hat. Als Positivkontrolle wurde Homogenat einer *Hp0421*-exprimierenden *E. coli*-Kultur nach Transformation mit pET24d-hp0421 verwandt. Es konnte nach 16-minütiger Exposition ein schwaches Signal mit einer molekularen Masse von ca. 47 kDa detektiert werden. Die berechnete molekulare Masse von Hp0421p beträgt ebenfalls 47 kDa. Als Negativkontrolle wurde eine Probe einer pET24d(+)-Leervektor exprimierenden Kultur eingesetzt. Diese zeigte kein Signal (Daten nicht gezeigt).

Es lässt sich festhalten, dass die heterologe Expression der nativen *Borrelia*-Sequenzen *Bb0572* und *Bb0767* weder im prokaryotischen noch im eukaryotischen System dazu führte, die Organismen in die Lage zu versetzen,  $\beta$ -SGal zu synthetisieren. In *E. coli* und *P. pastoris* konnte keine Enzymaktivität detektiert und in *E. coli* auch keine Proteine nachgewiesen werden. Das weitere Vorgehen, um noch einen der beiden Kandidaten(-sequenzen) als codierendes Gen für eine  $\beta$ -SGalT zu identifizieren, wird im Folgenden beschrieben.

Die Analyse von *Bb0572* und *Bb0767* ergab einen verhältnismäßig hohen Anteil an Adenin und Thymin (AT-Gehalt *Bb0572*: 74%, *Bb0767*: 72%), welcher die Expression in *E. coli* und *P. pastoris* beeinträchtigen könnte. Deswegen wurde die Synthese synthetischer Gensequenzen mit Optimierung der *codon usage* erwogen. Die Planung der optimierten Gensequenzen umfasste die Strategie für die Klonierung in den pET24d(+)- und pPIC3.5-Vektor und folglich für die heterologe Expression in *E. coli* und *P. pastoris*. Die Synthese durch GENEART erfolgte zuerst für die Expression in *P. pastoris*, und für die Klonierung und heterologe Expression wurde Folgendes berücksichtigt: Zur Unterstützung der Expression wurde eine Kozak-Sequenz eingeführt. BglII-Erkennungssequenzen wurden hingegen vermieden, da diese Restriktionsstellen für die Linearisierung der Expressionskonstrukte benötigt wurden, denn nur in linearisiertem Zustand kann die zu integrierende (synthetische) Sequenz homolog in das Hefegenom integrieren. Die synthetischen Gensequenzen konnten optional mit einer aminoterminalen His<sub>6</sub>-Markierung kloniert und exprimiert werden. Durch die Optimierung der *codon usage* konnte der AT-Anteil in beiden Fällen auf 58% reduziert werden. Die AS-Sequenz blieb davon unberührt. Eine Übersicht über die Synthese- und Klonierungsstrategie sowie die Nukleotidsequenzen (native und synthetische) können dem Anhang (Anhang 3 und 5 in 4.15.2, ab S.182) entnommen werden.

Die synthetischen Gene wurden von GENEART in einen Standardvektor (pMA) kloniert. Aus diesem konnten die gewünschten Fragmente restringiert werden. Um das Gen mit His<sub>6</sub>-Tag zu erhalten, wurde der pMA-Vektor mit BamHI (5') und NotI (3') restringiert, und ohne His<sub>6</sub>-Tag wurde die Kombination SnaBI (5') und NotI (3') verwendet. Anschließend konnten die synthetischen Gensequenzen in den mit den entsprechenden Restriktionsenzymen restringierten Expressionsvektor pPIC3.5 gerichtet kloniert werden. Es resultierten folgende Konstrukte, die linearisiert mit BglII in eine Transformation einer  $\beta$ -ErgGlc-defizienten *P. pastoris*-Mutante (GS115 $\Delta$ *ugt51b1*) eingesetzt wurden: pPIC3.5-Ppartbb0572(+His<sub>6</sub>) und pPIC3.5-Ppartbb0767(+His<sub>6</sub>). Nach erfolgreicher Auswahl von Transformanten mittels Selektion auf Histidin-Prototrophie und genotypischer PCR-Analyse auf Präsenz der inserierten Gensequenzen und des intakten *Aox1*-Gens, wie bereits beschrieben, wurden die rekombinanten Hefen mittels Lipidanalyse und radioaktivem Enzymassay

## 2 Ergebnisse

untersucht.

Die genotypische Verifizierung erfolgte mit genspezifischen, internen Primern für Ppart*Bb0572* und Ppart*Bb0767* und des Weiteren mit jenen für *Aox1* (Daten nicht gezeigt). Auch in diesem Fall musste eine Deletion von *Aox1* für eine spätere Funktionsanalyse bezüglich der Peroxisomendegradationsfähigkeit ausgeschlossen werden (s. 2.3.1 und 2.3.3, S. 77 und 84). Nach Identifizierung der Insertion der Gensequenzen und der Integrität von AOX1 konnte nun untersucht werden, ob das inserierte Gen in der Hefe heterolog exprimiert wird und das translatierte Produkt aktiv ist. Dazu wurde die Genexpression mittels Methanol in den kultivierten Hefen für 3 h bei 30°C induziert und danach, wie zuvor beschrieben, aus den Zellen Lipidextrakte gewonnen und dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt bzw. zellfreie Homogenate generiert und in eine *in vitro*-Enzymanalyse mit markiertem [<sup>14</sup>C]Cholesterol und UDP-Zucker (UDP-Glucose bzw. UDP-Galactose) eingesetzt. Nach dreistündiger Induktion zeigte die dünn-schichtchromatographische Auftrennung der Lipidextrakte keine  $\beta$ -ErgGal-Synthese in den Ppart*Bb0572*- und Ppart*Bb0767*-exprimierenden Hefetransformanten (Daten nicht gezeigt). Die WT- und KO-Kontrolle verhielten sich gemäß den Erwartungen: Der WT synthetisierte  $\beta$ -ErgGlc im Gegensatz zur UGT51B1-Deletionsmutante, die keine SG-Synthese zeigte. Erst mittels eines radioaktiven Enzymassays gelang es, die Kandidatensequenz zu identifizieren, welche womöglich für eine  $\beta$ -SGalT aus *B. burgdorferi* codierte: **Bb0572**. Nach zweistündiger Exposition konnten in den Homogenaten nach einem *in vitro*-Enzymassay Ppart*Bb0572*-exprimierenden Hefezellen schwache  $\beta$ -CholGal-Banden detektiert werden. Homogenate aus Ppart*Bb0767*-exprimierenden Hefezellen wiesen hingegen keine SG-Synthese auf (Daten nicht gezeigt). Um auch nach Analyse der Gesamtlipide  $\beta$ -ErgGal detektieren zu können, wurden die Ppart*Bb0572*-exprimierenden Hefen einer längeren Methanol-Induktion von 15 h ausgesetzt. Danach wurde erneut eine Lipidanalyse und ein radioaktiver Enzymassay, wie zuvor beschrieben, durchgeführt und zudem ein Enzymassay mit unmarkiertem Cholesterol und UDP-[<sup>14</sup>C]Galactose (s. Abb.2.8).

## 2 Ergebnisse

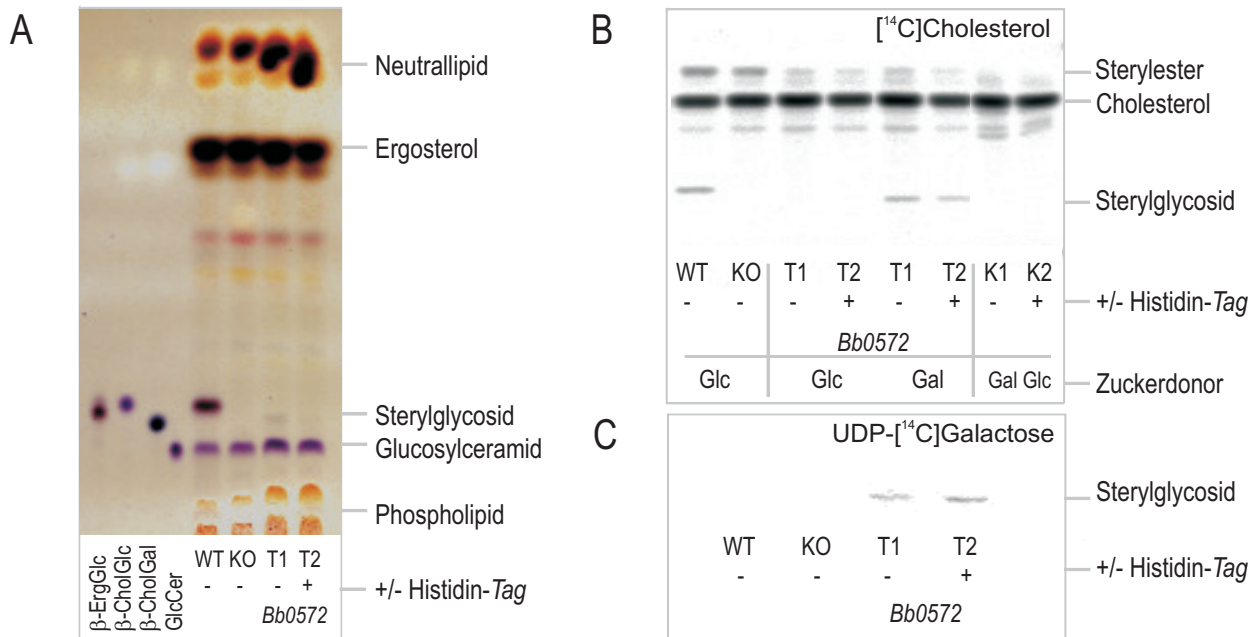


Abbildung 2.8: *Bb0572* könnte für eine  $\beta$ -SGalT codieren.

**A** Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Gesamtlipidextrakten. **B** und **C** Dünnschichtchromatographische Auftrennung radioaktiver Produkte nach Durchführung einer *in vitro*-Enzymanalyse zur Bestimmung der SGT-Aktivität. In die Analyse wurden 100  $\mu\text{g}$  Protein eingesetzt sowie in B [ $^{14}\text{C}$ ]Cholesterol (400.000 dpm; 16  $\mu\text{M}$ ) und nicht-markierte UDP-Glucose (0,5 mM) oder UDP-Galactose (0,5 mM). Als Kontrollen dienten Leerkontrollen ohne Homogenat (K1+K2). Der Assay in C wurde mit UDP- $^{14}\text{C}$ ]Galactose (200.000 dpm; 1,45  $\mu\text{M}$ ) und Cholesterol (0,5 mM) durchgeführt. Extrakte wurden aus für 15 h-Methanol-induzierten Zellen der rekombinanten Hefen T1+2 gewonnen, welche *PpartBb0572* ohne *Tag* bzw. mit  $\text{His}_6\text{-Tag}$  versehen exprimierten. Kontrollen: WT-Stamm GS115 und die KO-Mutante GS115 $\Delta\text{ugt51b1}$ . Referenzen: isoliertes Glucosylceramid (GlcCer), Ergosteryl- $\beta$ -Glucosid ( $\beta$ -ErgGlc), Cholesteryl- $\beta$ -Glucosid ( $\beta$ -CholGlc) und Cholesteryl- $\beta$ -Galactosid ( $\beta$ -CholGal). Alle erhaltenen Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch in Chloroform/Methanol 85:15 aufgetrennt. Die Detektion der Lipide erfolgte in A mittels des Sprühreagenzes  $\alpha$ -Naphtholschwefelsäure und anschließendem Veraschen. In B und C erfolgte die Detektion mittels "Radioscanning" nach vier- (B) bzw. 13,5-stündiger (C) Exposition.

Abbildung 2.8A zeigt, dass nach 15 h Induktion der Genexpression außer in der *P. pastoris* WT-Kontrolle auch in weiteren Ansätzen SG detektiert werden konnte. Die rekombinanten Hefen (T1+2), die *PpartBb0572*(+His<sub>6</sub>) exprimierten, zeigten eine Bande, welche aufgrund ihres Rf-Wertes als  $\beta$ -ErgGal identifiziert werden konnte. Die Intensität dieser Lipidbande war jedoch nur sehr schwach, und die Bandenintensität war in der Hefe (T2), welche die markierte Gensequenz exprimierte, noch geringer. Der WT synthetisierte  $\beta$ -ErgGlc, und die KO-Mutante zeigte keine  $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese. Außer den SGs konnten, da es sich um Gesamtlipidextrakte handelte, weitere Lipide nachgewiesen werden: GlcCer, ein weiteres Glycolipid sowie Phospholipide, Ergosterol und Neutrallipide. Die *in vitro*-Enzymanalyse mit markiertem Cholesterol (Abb.2.8B) bestätigte das Ergebnis aus der Lipidanalyse. Mit UDP-Glucose als Zuckerdonor ist ausschließlich der WT in der Lage  $\beta$ -CholGlc zu synthetisieren. Die *PpartBb0572*-exprimierenden Hefetransformanten T1+2 sowie die KO-Mutante und die zwei Kontrollen konnten keine SGs synthetisieren. Nur in Gegenwart von UDP-Galactose konnte in den Homogenaten der rekombinanten Hefen  $\beta$ -CholGal detektiert werden. Die Bandenintensitäten wurden schon in Abb.2.8A beschrieben und verhielten sich im vorliegenden Fall ebenso. Neben den SGs konnten nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der radioaktiven Produkte weitere Banden für Sterylester, Cholesterol sowie durch Oxidation des Cholesterols entstan-

dene Abbauprodukte detektiert werden. Wurde der Assayansatz mit markierter UDP-Galactose und nicht-markiertem Cholesterol durchgeführt (Abb. 2.8C), konnte nur für die Ppart*Bb0572*(+His<sub>6</sub>)-exprimierende Hefe ein Enzymprodukt detektiert werden. Die KO-Mutante zeigte keinen Umsatz der angebotenen Substrate und auch der WT zeigte, dass die *Pichia*-eigene  $\beta$ -SGlcT UDP-Galactose nicht umzusetzen vermochte.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass *Bb0572* für eine  $\beta$ -SGalT aus *B. burgdorferi* codieren könnte. Um diese katalytische Funktion zu verifizieren, wurde nach heterologer Expression in *P. pastoris* synthetisiertes SG strukturanalytisch untersucht (s. 2.2.4, S.68).

### 2.2.3 Identifizierung einer bakteriellen $\beta$ -SGlcT aus *B. hermsii*

Während in *B. burgdorferi*  $\beta$ -CholGal nachgewiesen werden konnte [309], enthält *B. hermsii*  $\beta$ -CholGlc [205]. Der folgende Teil dieser Arbeit beschäftigte sich damit, das Gen dieser bakteriellen  $\beta$ -SGlcT zu identifizieren. Diese  $\beta$ -SGlcT könnte als Kontrolle in Analysen der biologischen Funktion von SG eingesetzt werden, da das bakterielle Enzym auch die Synthese zu  $\beta$ -ErgGlc katalysiert. Das Protein ist jedoch nicht identisch zu UGT51B1, so dass das bakterielle Protein andere Protein-Protein-Interaktionen eingehen könnte.

Zunächst musste eine Sequenz, welche für diese bakterielle  $\beta$ -SGlcT codieren könnte, ermittelt werden. Dies erfolgte mittels *BLAST-Searches* (*BLASTp*, NCBI) mit der *Bb0572p*-Sequenz gegen das *B. hermsii*-Genom (Stamm DAH). Ein Treffer konnte erzielt werden: **Bh0572** (*Acc.No.* YP001883999.1 (NCBI), AAX17079.1 (GenBank) und B2S0S3 (UniProt)). Diese Sequenz findet sich in der CAZy-Datenbank ebenfalls wie *Bb0572* in der GT2-Familie.

*BLAST2Seq*-Analysen von *Bb0572p*- und *Bh0572p*-Sequenzen zeigten eine Identität von 69% und eine Ähnlichkeit von 85%. Auf Nukleotidebene zeigte sich eine Identität der Gensequenzen von 76% (Alignments sind dem Anhang 5 ab S.182 zu entnehmen).

Die Nukleotidsequenz von *Bh0572* weist ebenfalls wie jene von *Bb0572* einen hohen AT-Gehalt von 72% auf. Da die Expression des nativen Gens *Bb0572* aus *B. burgdorferi* in *P. pastoris* und *E. coli* nicht zur SG-Synthese führte (s. Abb.2.7, S.62), wurde basierend auf der nativen Gensequenz, wie zuvor für *Bb0572* und *Bb0767* beschrieben, die Synthese eines synthetischen Gens mit Optimierung der *codon usage* für *P. pastoris* in Auftrag gegeben. Die Planung der Konstrukte und Berücksichtigung weiterer Belange erfolgte analog wie für die Synthese von Ppart*Bb0572* beschrieben. Durch die Optimierung der *codon usage* konnte der AT-Anteil auf 58% reduziert werden. Die AS-Sequenz blieb auch in diesem Fall von der Optimierung unberührt. Eine Übersicht über die Synthese- und Klonierungsstrategie sowie die native und die synthetische Nukleotidsequenz können dem Anhang entnommen werden (Anhang 3 und 6 in 4.15.2, ab S.182).

Die Klonierung der synthetischen Gensequenz erfolgte ebenfalls analog zur Klonierung der synthetischen Sequenz Ppart*Bb0572* sowie auch die Hefe-Transformation und Selektion mittels der erzeugten Histidin-Prototrophie. Die genotypische Verifizierung erfolgte in diesem Fall im Anschluss mit genspezifischen, internen Primern für Ppart*Bh0572* und, ebenfalls wie zuvor beschrieben, mit jenen für *Aox1* (Daten nicht gezeigt). Auch in diesem Fall musste eine Deletion von *Aox1* für eine spätere

## 2 Ergebnisse

Funktionsanalyse bezüglich der Peroxisomendegradation ausgeschlossen werden (s. 2.3.1 und 2.3.3, S.77 und 84).

Eine dünnschichtchromatographische Analyse von Gesamtlipidextrakten bzw. von radioaktiven Produkten nach einem *in vitro*-Enzymassay zur Bestimmung der SGT-Aktivität erfolgte im vorliegenden Fall nach ca. 20-stündiger Induktion der Genexpression mittels Methanol bei 30°C. Die Aufarbeitung der kultivierten Hefezellen bis zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung erfolgte wie bereits beschrieben. Die Resultate der durchgeführten Analysen sind Abbildung 2.9 zu entnehmen.

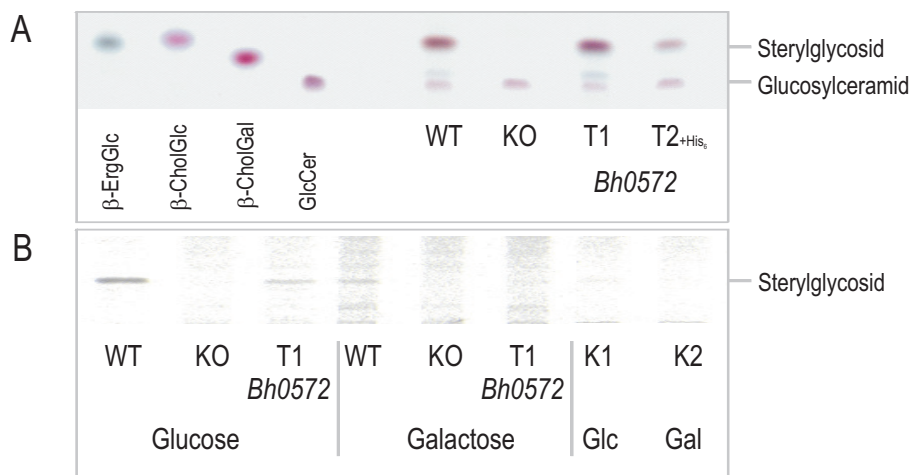


Abbildung 2.9: *Bh0572*-exprimierende Hefen zeigen  $\beta$ -SGlc-Synthese.

**A** Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Gesamtlipidextrakten. **B** Dünnschichtchromatographische Auftrennung radioaktiver Produkte nach Durchführung einer *in vitro*-Enzymanalyse zur Bestimmung der SGT-Aktivität. Es wurden 100  $\mu$ g Protein in den Assay eingesetzt. Als Substrate dienten [<sup>14</sup>C]Cholesterol (400.000 dpm; 16  $\mu$ M) und nicht-markierte UDP-Glucose (0,5 mM) bzw. UDP-Galactose (0,5 mM) sowie als Kontrollen Leerkontrollen ohne Homogenat (K1+K2). Gesamtlipidextrakte bzw. Homogenate wurden nach 20 h Methanol-Induktion aus Zellen rekombinanter Hefen (T1, T2+His<sub>6</sub>) hergestellt, welche Ppart*Bh0572*(+His<sub>6</sub>) exprimierten. Kontrollen: WT-Stamm GS115 und die KO-Mutante GS115 $\Delta$ *ugt51b1*. Referenzen: isoliertes Ergosteryl- $\beta$ -Glucosid ( $\beta$ -ErgGlc), Cholesteryl- $\beta$ -Glucosid ( $\beta$ -CholGlc), Cholesteryl- $\beta$ -Galactosid ( $\beta$ -CholGal) und Glucosylceramid (GlcCer). Alle Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch in Chloroform/Methanol 85:15 aufgetrennt. Die Detektion der Lipide erfolgte in A mittels des Sprühreagenzes  $\alpha$ -Naphtholschwefelsäure und anschließendem Veraschen. In B mittels "Radioscanning" nach 8 h Exposition. A und B: Die Darstellung umfasst in A nur den Glycolipid-umfassenden Bereich mit GlcCer und Sterylglycosid (SG) und in B nur den SG-aufzeigenden Bereich.

Abbildung 2.9 zeigt, dass Ppart*Bh0572* für eine  $\beta$ -SGlcT codieren könnte, da nach Expression sowohl in einem Gesamtlipidextrakt als auch nach einem *in vitro*-Enzymassay  $\beta$ -SGlc detektiert wurde. Das SG wurde durch Abgleich mit dem Rf-Wert der Referenz als  $\beta$ -SGlc identifiziert. Ansonsten waren nur noch WT-Zellen in der Lage, *in vivo* und *in vitro* mittels eines Enzymassays  $\beta$ -SGlc zu synthetisieren. Die KO-Mutante zeigte erwartungsgemäß keine SG-Synthese.

Die Lipidbande des nach heterologer Expression synthetisierten  $\beta$ -SGlc entsprach nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung des Gesamtlipidextraktes in etwa dem WT-SG-Signal. In den Gesamtlipidextrakten aus den Hefezellen mit His<sub>6</sub>-markiertem Ppart*Bh0572* ist eine Abschwächung der SG-Bande zu erkennen. Neben den SGs wurde in allen Extrakten noch GlcCer, ein weiteres Glycolipid, detektiert. Alle anderen Lipide, die in Abbildung 2.8 exemplarisch beschrieben wurden, werden hier nicht dargestellt.

Die *in vitro*-Enzymanalyse<sup>3</sup> mit markiertem Cholesterol (Abb.2.9B) bestätigte das Ergebnis aus der Lipidanalyse. Der WT war in der Lage  $\beta$ -CholGlc mit UDP-Glucose als Zuckerdonor zu synthetisieren. Eine schwächeres Bande mit ähnlichem Rf-Wert konnte unter Verwendung von UDP-Galactose detektiert werden. Die KO-Mutante sowie die zwei Leerkontrollen ohne Homogenat (K1+2) zeigten keine SGT-Aktivität, unabhängig von der eingesetzten Zuckerspezies. Die rekombinante Hefe (T1) hingegen konnte nur in Präsenz von UDP-Glucose  $\beta$ -CholGlc synthetisieren. Auch in diesem Fall waren die Signalintensitäten des heterolog synthetisierten SGs insgesamt schwächer. Neben den SGs konnten auch in diesem Assay weitere Signale für Sterylester und Cholesterole sowie durch Oxidation entstandene Abbauprodukte detektiert werden. Diese werden aber in dieser Darstellung ebenfalls nicht gezeigt.

Es kann zusammengefasst werden, dass *Bh0572* für eine  $\beta$ -SGlcT aus *B. hermsii* codieren könnte. Um diese katalytische Funktion zu bestätigen, wurde nach heterologer Expression in *P. pastoris* synthetisiertes SG strukturanalytisch untersucht (s. 2.2.4, S.68).

### 2.2.4 Bb0572p und Bh0572p synthetisieren $\beta$ -ErgGal bzw. $\beta$ -ErgGlc

In vorhergehenden Untersuchungen wurden die heterolog exprimierten SGs nach Abgleich der Rf-Werte mit jenen von Lipidstandards als  $\beta$ -SGal (Bb0572) und  $\beta$ -SGlc (Bh0572) "identifiziert". Dies wies auf eine potentielle SGT-Funktion der Enzyme Bb0572p und Bh0572p hin (s. 2.2.2 und 2.2.3, S.59 und 66). Um diese katalytischen Funktionen zu bestätigen, sollten die SGs mittels spektrometrischer und spektroskopischer Analysen analysiert werden. Dabei sollten das Sterol-Rückgrat, die Zuckerkopfgruppe und deren stereochemische Eigenschaften identifiziert werden.

ESI-FT ICR-Massenspektrometrie<sup>4</sup> wurde angewandt, um die Molekülmasse des SGs zu bestimmen. Da Hexosen wie Glucose und Galactose dieselbe Masse aufweisen und durch diese Methode auch keine Aussage über die Verknüpfung des Zuckers getroffen werden konnte, wurden die SGs ebenfalls mittels NMR-Spektroskopie untersucht.

Für die Strukturanalysen wurden Kulturen der rekombinanten *P. pastoris*-Stämme angezogen und die Expression von Ppart*Bb0572* und Ppart*Bh0572* i.d.R. üN (ca. 16 h - 18 h) mit Methanol induziert. Danach wurden Gesamtlipidextrakte hergestellt, indem die Hefezellen aufgebrochen und die Lipide durch Ausschütteln mit Chloroform/Methanol-Gemischen, wie bereits beschrieben, extrahiert wurden. Anschließend wurde der Gesamtlipidextrakt alkalisch verseift oder über eine Säule fraktioniert, so dass die Glycolipide von den anderen Lipiden abgetrennt werden konnten. Nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung in Chloroform/Methanol (85:15) konnte das SG durch "Abkratzen" der entsprechenden Bande von der DC-Platte von GlcCer und durch Ausschütteln mit Chloroform/Methanol/0,45% Natriumchlorid (2:1:0,75) vom Kieselgel getrennt werden. Das gereinigte SG wurde peracetyliert und die peracetylierte Probe in die NMR- und MS-Analysen eingesetzt. Aufgrund der geringen Ausbeute von  $\beta$ -SGal nach Expression von Ppart*Bb0572* in *P. pastoris* (s. Abb.2.8, S.65) mussten größere Kulturvolumina (> 1 L) verarbeitet werden. Die Aufarbeitung von

<sup>3</sup>*In vitro*-Enzymanalyse von Ppart*Bh0572*+His<sub>6</sub> kann Abb. 2.11, S. 74 entnommen werden.

<sup>4</sup>ESI-Fourier-Transform-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie

## 2 Ergebnisse

$\beta$ -SGlc aus Ppart*Bh0572* exprimierenden Hefen konnte aufgrund der guten Expression (s. Abb.2.9, S.67) in einem moderateren Rahmen (0,05-0,5 L) durchgeführt werden. Nach Acetylierung der isolierten SGs konnten zwei Lipidbanden detektiert werden. Diese wiederum wurden erneut separiert und getrennt in die Strukturanalysen eingesetzt.

Die massenspektrometrischen und NMR-spektroskopischen Analysen und Auswertungen der erhaltenen Spektren wurden von Prof. Dr. Ulrich Zähringer und seinen Mitarbeitern (Forschungszentrum Borstel) vorgenommen. Für die Auswertung der ESI-Massenspektren mussten die theoretischen Massen der erwarteten Moleküle berechnet und diese anschließend den detektierten Massen in den ESI-Massenspektren zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt). Die Deutung der NMR-Spektren (Daten nicht gezeigt) konnte durch den Vergleich mit NMR-Spektren bekannter Moleküle unterstützt werden. Nützlich waren dabei Spektren von peracetyliertem Ergosteryl- $\beta$ -D-Glucopyranosid aus *P. pastoris* sowie eine Epidioxy-Verbindung eines *Hp0421*-exprimierenden *P. pastoris*-Stamms. Diese Epidioxy-Verbindung wurde als 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxy-ergosta-6,22-dien-3- $\alpha$ -D-glucopyranosid identifiziert. Die nachfolgende Abbildung 2.10 zeigt die ermittelten Strukturen.

## 2 Ergebnisse

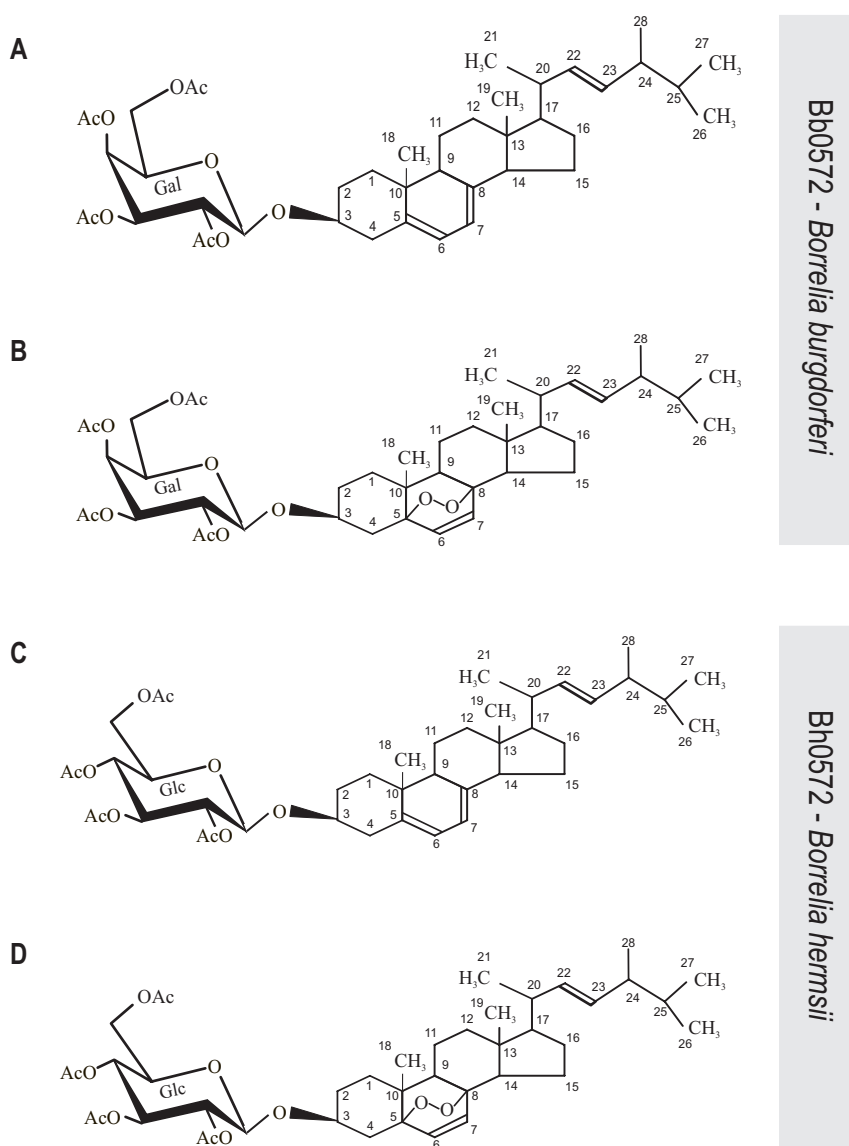


Abbildung 2.10: Strukturen der SGs aus transgenen Hefekulturen nach Expression von *Bb0572* und *Bh0572* in *P. pastoris*.

Mittels NMR- und ESI-MS-Analysen identifizierte Strukturen. Für die Analysen wurde SG aus Ppart*Bb0572*- und Ppart*Bh0572*-exprimierenden Hefen isoliert und peracetyliert. Nach der Peracetylierung resultierten nach dünnenschichtchromatographischer Auftrennung in Diethylether-haltigem Laufmittel je zwei Banden, welche erneut isoliert wurden. Anschließende Analysen der Spektren ergaben folgende Resultate:

- A** Ergosteryl-3-*O*- $\beta$ -(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid,
- B** 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxy-ergosteryl-3-*O*- $\beta$ -(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid,
- C** Ergosteryl-3-*O*- $\beta$ -(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranosid und
- D** 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxy-ergosteryl-3-*O*- $\beta$ -(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranosid.

A und B basieren auf der heterologen Expression des synthetischen Gens Ppart*Bb0572* (mit optimierter *codon usage* für *P. pastoris*, ursprünglich aus *B. burgdorferi*) und C und D auf jener des synthetischen Gens Ppart*Bh0572* (ursprünglich aus *B. hermsii*).

Die Strukturanalysen (Abb.2.10) konnten bestätigen, dass es sich bei Bb0572p um eine  $\beta$ -SGalT handelt, welche die Synthese von  $\beta$ -SGal katalysiert. Bei Bh0572p handelt es sich wiederum um eine  $\beta$ -SGlcT, welche die Synthese von  $\beta$ -SGlc katalysiert. Nach heterologer Expression ist der Akzeptor



im vorliegenden Fall Ergosterol. In natürlicher Umgebung würden die Enzyme das Cholesterol nutzen, das die Bakterien von ihrem Wirt aufnehmen. Neben  $\beta$ -ErgGal und  $\beta$ -ErgGlc konnten weitere Strukturen identifiziert werden. Dabei handelte es sich um Epidioxy-Derivate der genannten SGs. Im nächsten Schritt sollten nun die Enzyme Bb0572p und Bh0572p untersucht werden.

### 2.2.5 Charakterisierungsstudien der Enzyme Bb0572p und Bh0572p wurden begonnen

Einige biochemische Eigenschaften von Enzymen können mittels verschiedener Assays aufgeklärt werden. Durch diese können u.a. das Reaktionsmilieu (pH-Optimum) sowie die Donoren und Akzeptoren für die Enzymaktivität bestimmt werden. Des Weiteren kann die Affinität für die Substrate ermittelt werden. Analysiert werden sollten die  $\beta$ -SGalT aus *B. burgdorferi* (Bb0572p) und die  $\beta$ -SGlcT aus *B. hermsii* (Bh0572p) nach heterologer Expression in *P. pastoris*.

Für die Charakterisierung wurden Proteinhomogenate nach 16-stündiger Methanol-Induktion bei 30°C, wie bereits beschrieben, aus Hefekulturen hergestellt. Als Kontrolle in den Studien diene eine transgene Hefe, welche *Hp0421* unter dem nativen *Ugt51b1*-Promotor exprimierte (s. 2.2.1, S.56). *Hp0421p* wurde im Rahmen der Diplomarbeit von A.-H. Lebrun [186] schon charakterisiert und bot sich neben dem *P. pastoris*-WT als Kontrolle an. Die hergestellten Homogenate wurden in verschiedene Enzymassays mit fest definierten Mengen an markierter UDP-[<sup>14</sup>C]Glucose (50.000 dpm; 0,76  $\mu$ M) bzw. UDP-[<sup>14</sup>C]Galactose (50.000 dpm, 0,75  $\mu$ M) und unmarkiertem Cholesterol (0,2 mM) eingesetzt. Dieser Assay wurde zur Bestimmung der Proteinlinearität mit 0-100  $\mu$ g Proteinhomogenat für 30 min bei 30°C durchgeführt und die Reaktion in diesem Fall mit Ethylacetat und 0,45% Natriumchlorid abgestoppt. Nach Abnahme der oberen, organischen Phase konnte diese im Szintillationszähler vermessen werden. Unter den gegebenen Bedingungen konnten jedoch keine verwertbaren SGT-Aktivitäten gemessen werden. Die eingesetzte Kontrolle ohne markiertes Substrat zeigte ebenso wie die anderen Proben keine SGT-Aktivität. Nach Vermessen der zurückgebliebenen Unterphase konnte die eingesetzte Radioaktivität in dieser detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Zur Kontrolle wurde ein Enzymassay mit markiertem [<sup>14</sup>C]Cholesterol (200.000 dpm; 16  $\mu$ M) und UDP-Glucose bzw. UDP-Galactose (je 0,5 mM) mit 50 bzw. 100  $\mu$ g Protein ebenfalls für 30 min durchgeführt. Dieser Assay wurde, wie zuvor beschrieben, mit Chloroform:Methanol (2:1) und 0,45% NaCl abgestoppt, die radioaktiven Produkte nach dünnenschichtchromatographischer Auftrennung detektiert und interpretiert. Erst nach 14-stündiger Exposition konnten leichte Lipidbanden für  $\beta$ -CholGal im Homogenat der Ppart*Bb0572*-exprimierende Hefe detektiert werden. Die Positivkontrolle, die *Hp0421*-exprimierende Hefe, zeigte in diesem Fall keine SG-Synthese (Daten nicht gezeigt). Diese Resultate belegten, dass die Induktions- und Reaktionsbedingungen noch optimiert werden mussten, um eine Quantifizierbarkeit der radioaktiven Produkte für die biochemische Charakterisierung der Enzyme zu erreichen.

Die fehlende Quantifizierbarkeit der radioaktiven SGs nach Expression der Borrelien-SGT-Gensequenzen in *P. pastoris* führte dazu, dass das Hefesystem für die Charakterisierungsstudien in Frage gestellt wurde. Deswegen sollte die Expression in *E. coli* untersucht werden. Dazu entwickelte der Projektstudent Daniel Maag eine eigenständige Klonierungsstrategie. Um die synthetischen Gensequenzen

## 2 Ergebnisse

von Ppart*Bb0572* und Ppart*Bh0572* aus dem pMA-Vektor im 3'-Bereich zu modifizieren, führte er eine PCR mit einem Primerpaar durch, bei dem der *forward*-Primer einen BamHI-Überhang hatte und der *reverse*-Primer einen NotI-Überhang und gleichzeitig das Stoppcodon entfernte. Durch das Entfernen des Stoppcodons konnte das im pET24d(+)-Vektor vorliegende, aminoternale His<sub>6</sub>-Tag genutzt werden.

Nach Zwischenklonierung in pGEM-T und Verifizierung der Sequenz konnte die Gensequenz mit BamHI (5') und NotI (3') restringiert und gerichtet in einen ebenso vorbereiteten pET24d(+)-Expressionsvektor kloniert werden. Danach war es möglich, *E. coli* C41(DE3)-Zellen zu transformieren und die Genexpression durch IPTG für 3 h bei 30°C zu induzieren. Danach wurde aus den Zellen, wie bereits beschrieben, ein zellfreies Homogenat hergestellt und in einen radioaktiv Enzymassay mit markierten UDP-Zuckern, analog zu jenem mit den Homogenaten aus *P. pastoris*, durchgeführt. Auch in diesem Fall verblieb die Radioaktivität in der nicht-organischen Phase. Nur für *Hp0421*-exprimierende *E. coli*-Zellen konnten (leichte) Umsätze verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt). Zur Kontrolle wurde ebenfalls ein Assay mit [<sup>14</sup>C]Cholesterol (400.000 dpm; 32 µM) und mit UDP-Glucose bzw. UDP-Galactose (0,5 mM) durchgeführt. Es konnten nur für die *E. coli*-Zellen, welche *Hp0421* exprimierten, schon nach zweistündiger Exposition intensive Signale detektiert werden. Dieses Signale konnten als α-CholGlc interpretiert werden. Sonst konnte nur bei den Ppart*Bh0572*-exprimierenden *E. coli*-Zellen eine schwache SG-Bande detektiert werden, welche nach entsprechender Verlängerung der Expositionsdauer auf bis zu 15 h verstärkt werden konnte. Diese Lipidbande konnte aufgrund der ähnlichen Rf-Werte nach schlechter Auftrennung der Lipide nicht eindeutig als β-CholGlc interpretiert werden. Bei den anderen rekombinanten *E. coli*-Zellen, welche Ppart*Bb0572* exprimierten, wurde keine β-SGalT-Aktivität detektiert.

Auch mit dem *E. coli*-System konnte keine bessere Quantifizierbarkeit der radioaktiven Produkte erreicht werden, und die fehlende Detektion von SG warf die Frage nach der Synthese des Proteins auf. Im Falle der rekombinanten *E. coli*-Zellen war es möglich, eine Immunoblot-Analyse gegen den aminoternalen His<sub>6</sub>-Tag des rekombinanten Ppart*Bb0572*- oder Ppart*Bh0572*-Proteins durchzuführen. Dadurch konnte überprüft werden, ob es überhaupt zur Translation der Proteine nach der Genexpression kam. Für den Nachweis wurden die Homogenate verwandt, welche auch in den zuletzt beschriebenen *in vitro*-Enzymassay eingesetzt wurden. Es wurden 15 µg Gesamtprotein mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt und die PA-Gele entweder anschließend mittels Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt oder die Proteine mittels Western-Blot auf eine Membran übertragen. Die Detektion erfolgte durch die Verwendung eines monoklonalen Anti-His-Tag-Antikörpers. In der Immunoblot-Analyse konnte keine erwartete Proteinmasse von ca. 43 kDa für Bb0572p sowie für Bh0572p detektiert werden. Die Funktionalität der Methode konnte durch die Detektion eines Proteins mit einer Masse von ca. 47 kDa, welches als Hp0421p identifiziert werden konnte, bewiesen werden. Auch nach Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung des PA-Gels konnte nur im Proteinhomogenat der *Hp0421*-exprimierenden Hefe eine dickere Bande unterhalb der 46 kDa detektiert werden. Eine Akkumulation eines Proteins in der Größenordnung von 43 kDa konnte in den Homogenaten von Ppart*Bb0572*- und Ppart*Bh0572*-exprimierenden *E. coli*-Zellen nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Sowohl im Hefe- als auch im *E. coli*-System konnten keine ausreichend quantifizierbaren radioaktiven SG-Mengen nach Expression von Ppart*Bb0572* und Ppart*Bh0572* erreicht werden. Mittels

## 2 Ergebnisse

Immunoblot-Analyse konnten in *E. coli* zudem keine Proteine für Bb0572p und Bh0572p nachgewiesen werden. Deswegen soll sich nun im weiteren Verlauf dieses Abschnitts damit befassen werden, wie die geringe Enzymaktivität durch Optimierungen in Induktion und Assayablauf in einen quantifizierbaren Bereich gebracht werden könnte, um die Charakterisierungsstudien durchführen zu können. Folgende Modifikationen wurden im Rahmen der Aktivitätsoptimierung vorgenommen. Es wurden

- dem Reaktionspuffer Kationen zugesetzt und
- der Induktionszeitraum
- sowie die Induktionstemperatur variiert.

Zu Beginn wurde der Versuchsansatz des zuletzt beschriebenen Enzymassays für *E. coli* und *P. pastoris* mit denselben Induktionsbedingungen wiederholt, aber geringere Proteinmengen (10-50  $\mu\text{g}$ ) eingesetzt und der Reaktionspuffer in einer niedrigeren Konzentration (50 mM Tris anstelle von 100 mM) verwendet. Die Konzentrationen der in den Assay eingesetzten Substrate blieben, wie zuvor beschrieben, doch der Enzymassay zeigte auch nur für die Kontrollen die entsprechenden Lipidbanden (Daten nicht gezeigt). Eine erste Variation, basierend auf dem soeben beschriebenen Ansatz, wurde durch Modifikation des Assaypuffers erreicht: Aus *P. pastoris*-Zellen wurden nach ca. 16 h Induktion mit Methanol sowie aus *E. coli*-Zellen nach 3 h Induktion mit IPTG bei 30°C Homogenate hergestellt. Der Homogenisierungspuffer blieb unverändert und dem Assayreaktionspuffer (50 mM Tris) wurden u.a. Kationen und ein Komplexbildner (5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 1 mM  $\text{Mn}^{2+}$ , 1 mM EDTA) zugesetzt. Die Assaybedingungen selbst wurden beibehalten. Doch auch die Zugabe der Kationen zeigte keinen SG-Synthese-fördernden Effekt (Daten nicht gezeigt).

Danach wurden die Induktionszeiten und auch die Temperaturen variiert. Die Hefezellen wurden in diesem Fall für 6 h bei 30°C und die *E. coli*-Zellen für ca. 24 h bei 16°C inkubiert. Nach gängiger Homogenatherstellung wurde etwas Gesamthomogenat abgenommen, der Rest einer Ultrazentrifugation bei 100.000 xg für 30 min unterzogen und danach im Gesamthomogenat und den Fraktionen (Sediment und Überstand) die Proteinkonzentrationen nach BRADFORD bestimmt. Anschließend wurden 50  $\mu\text{g}$  Protein in einen Assay mit 100 mM Tris im Assaypuffer eingesetzt. Die Ergebnisse der Enzymassays sind Abbildung 2.11 zu entnehmen.

## 2 Ergebnisse

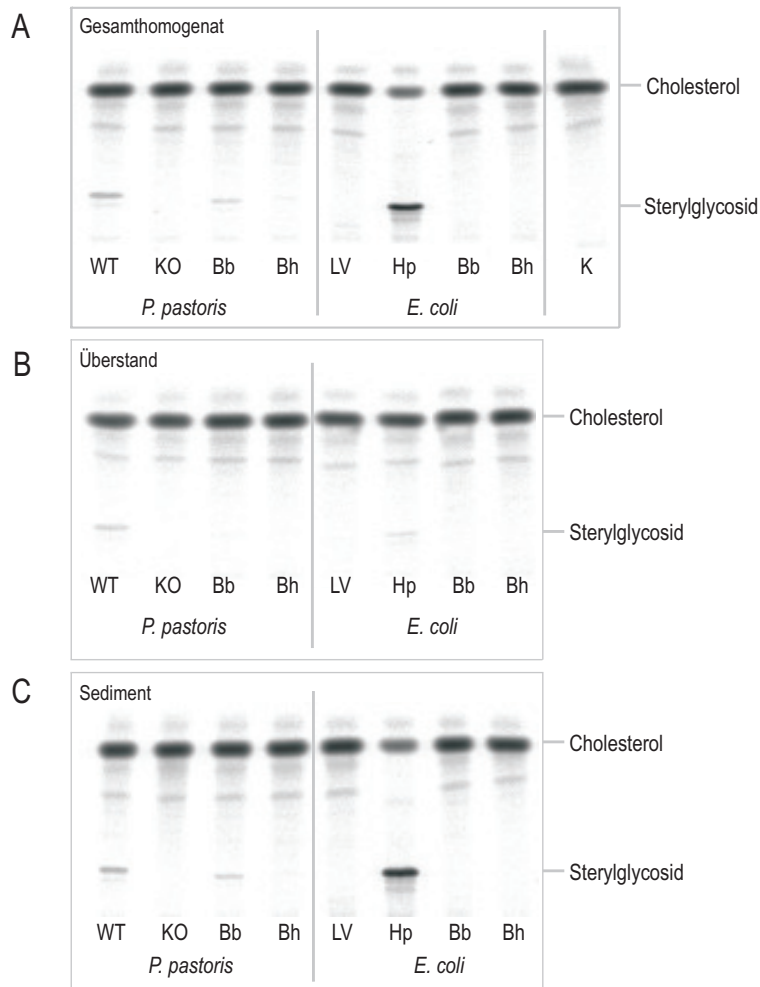


Abbildung 2.11: Die Aktivität der Enzyme Bb0572p und Bh0572p ist membranassoziiert.

Dünnschichtchromatographische Auftrennung von radioaktiven Produkten nach einem *in vitro*-Enzymassay zur Bestimmung der SGT-Aktivität. Der Assay wurde entweder mit Gesamthomogenat (A), Homogenat-Überstand (B) nach Ultrazentrifugation bzw. -Sediment (C) durchgeführt. Homogenate wurden aus rekombinanten Hefe- und *E. coli*-Zellen hergestellt, welche PpartBb0572 (Bb) und PpartBh0572 (Bh) nach einer Induktion für 6 h (Pp) bzw. 24 h (Ec) exprimierten. *P. pastoris*-Kontrollen: Zellen des WT-Stamms GS115 und einer KO-Mutante (GS115 $\Delta$ ugt51b1). *E. coli*-Kontrollen: Hp0421-exprimierende Zellen (Hp) als Positivkontrolle und Zellen als Negativkontrolle, welche nur mit dem pET24d(+)-Leervektor (LV) transformiert wurden. Als Leerkontrolle (K) wurde ein Assayansatz ohne Homogenat verwendet. In alle anderen Ansätze wurde jeweils 50  $\mu$ g Protein eingesetzt. Verwendete Substrate waren [ $^{14}$ C]Cholesterol (190.000 dpm; 15  $\mu$ M) und nicht-markierte UDP-Glucose (0,5 mM) bzw. UDP-Galactose (0,5 mM - nur für Bb). Alle Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch in Chloroform/Methanol 85:15 aufgetrennt. Die Detektion der Lipide erfolgte mittels "Radioscanning" nach zwei Stunden Exposition.

Abbildung 2.11A zeigt die Ergebnisse der mit den Gesamthomogenaten durchgeführten Enzymassays, in denen die PpartBb0572-exprimierende Hefe eine  $\beta$ -SGalT-Aktivität aufwies, da Lipidbanden für  $\beta$ -CholGal detektiert wurden. Der PpartBh0572-exprimierende Hefe-Stamm zeigte hingegen eine geringe  $\beta$ -SGlcT-Aktivität aufgrund der Detektion einer geringen Menge von  $\beta$ -CholGlc. Nach 16-stündiger Exposition war diese Lipidbande besser zu erkennen (nicht gezeigt). In der WT-Kontrolle wurde ein höherer Umsatz der Substrate zu  $\beta$ -CholGlc festgestellt. Keinen Umsatz zeigte hingegen die KO-Mutante GS115 $\Delta$ ugt51b1. Das *E. coli*-System zeigte nur für das Homogenat aus den Hp0421-exprimierenden Zellen eine SGT-Aktivität. Die detektierte Lipidbande

## 2 Ergebnisse

wurde als  $\alpha$ -CholGlc identifiziert. Die Ppart*Bb0572*- und Ppart*Bh0572*-exprimierenden Zellen sowie die mit dem Leervektor (LV) pPIC3.5 transformierten *E. coli*-Zellen zeigten keine Aktivität. In Abb.2.11B sind die Resultate des Assays mit den nach Ultrazentrifugation erhaltenen Homogenat-Überständen dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass die Aktivitäten schwächer ausfallen, da die Intensitäten der Lipidbanden ebenfalls schwächer sind. Schwache Banden sind für den Hefe-WT und die *Hp0421*-exprimierenden *E. coli*-Zellen zu erkennen. Die SGs konnten wie zuvor über die Rf-Werte, wie für 2.11A. beschrieben, identifiziert werden. Nach 16 h Exposition konnte auch noch für die Ppart*Bb0572*-exprimierende Hefe ein Lipidbande als  $\beta$ -CholGal detektiert werden (nicht gezeigt). Die Ergebnisse in Abb.2.11C mit dem Einsatz des nach Ultrazentrifugation erhaltenen Sediments entsprechen jenen aus Abb.2.11A, jedoch zeigte das aus dem Homogenat der Ppart*Bh0572*-exprimierenden Hefezellen gewonnene Sediment erst nach 16 h Exposition eine  $\beta$ -CholGlc-Synthese (nicht gezeigt). Neben den SGs konnte ebenfalls Cholesterol detektiert und dargestellt werden.

Es kann festgehalten werden, dass die WT-Hefe die stärkste SGT-Aktivität besaß. Bei den Hefen, welche die synthetischen Gensequenzen Ppart*Bb0572* und -*Bh0572* exprimierten, zeigte Bb0572p eine höhere Aktivität als Bh0572p. Die besten Aktivitäten befanden sich im Gesamthomogenat bzw. im Sediment. Mit dem *E. coli*-System konnten dagegen keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden, da Bb0572p und Bh0572p kein SG-Synthese katalysierten. Daher wurde im weiteren Verlauf mit den Ppart*Bb0572*- und Ppart*Bh0572*-exprimierenden Hefen weitergearbeitet.

Es sollte u.a. die Expression von Ppart*Bb0572* optimiert werden, da dies für die Synthese von  $\beta$ -SGal hilfreich sein könnte. Wie in Abb.2.7 (S.62) gezeigt, wurden die Lipide *in vivo* nur in geringen Mengen synthetisiert. Weitere Experimente entweder mit einer verlängerten Induktion der Genexpression von 30 h oder mit Zugabe von Galactose (Endkonz. 1%) im Induktionsmedium und sechsständiger Inkubation wurden durchgeführt. Zudem wurden auch Schikanekolben zur besseren Durchlüftung verwendet. Alle Modifikationen brachten keine Steigerung der SG-Biosynthese (Daten nicht gezeigt). Es wurden weitere Induktionszeiten getestet und in diesem Fall die *in vivo* erfolgte Lipidsynthese nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung, wie beschrieben, hergestellter Gesamtlipidextrakte analysiert. Die erhaltenen Resultate wurden dann den Resultaten eines *in vitro*-Enzymassays nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der radioaktiven Produkte aus parallel generierten Homogenaten gegenübergestellt. Dazu wurden die Hefekulturen angezogen und für zwei, vier und 16 Stunden mit Methanol bei 30°C induziert. Der *in vitro*-Enzymassay wurde an dieser Stelle wieder für eine Stunde bei 30°C in 50 mM Tris-Puffer inkubiert. Die Resultate beider Analysen sind Abbildung 2.12 zu entnehmen.

## 2 Ergebnisse

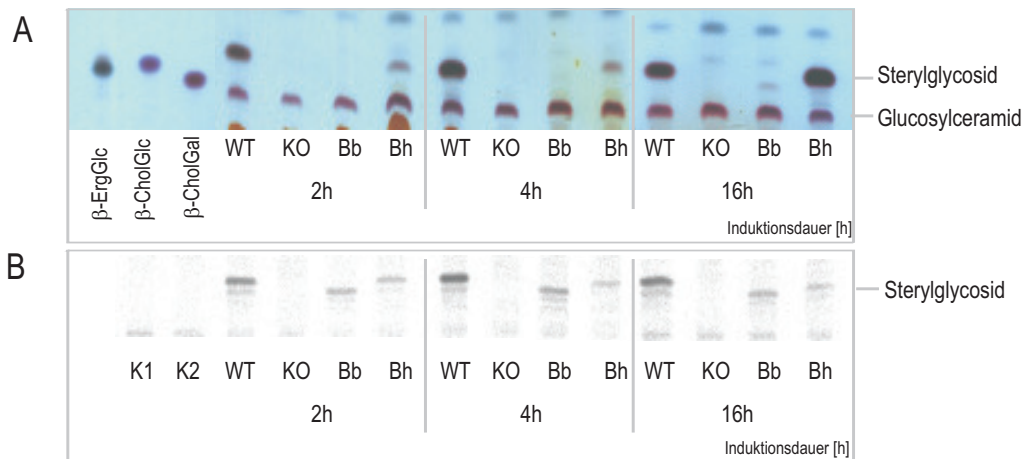


Abbildung 2.12: SG-Biosynthese ist abhängig von der Induktionsdauer.

**A** Dünnschichtchromatische Auftrennung von Gesamtlipidextrakten. Gezeigt ist nur ein Ausschnitt, der die Glycolipide umfasst. **B** Dünnschichtchromatographische Auftrennung radioaktiver Produkte zur Bestimmung der SGT-Aktivität nach einem radioaktiven Enzymassay, in den 100  $\mu$ g Protein eingesetzt wurden. Als Substrate dienten [ $^{14}$ C]Cholesterol (400.000 dpm; ca. 32  $\mu$ M) und nicht-markierte UDP-Glucose (1 mM - für WT, KO, K1, Bh) bzw. UDP-Galactose (1 mM - für K2, Bb). Kontrollen: Leerkontrollen ohne Homogenat (K1+K2). Auch hier ist nur ein Ausschnitt dargestellt, welcher die Sterylglycoside repräsentiert. Gesamtlipidextrakte bzw. Homogenate wurden aus folgenden Kulturen hergestellt: *P. pastoris*-Zellen, welche PpartBb0572 (Bb) bzw. PpartBh0572 (Bh) exprimierten, aus Zellen des WT-Stamms GS115 und einer KO-Mutante (GS115 $\Delta$ ugt51b1). Die Genexpression wurde für 2, 4 und 16 h mit Methanol induziert. Referenzen: isoliertes Ergosteryl- $\beta$ -Glucosid ( $\beta$ -ErgGlc), Cholesteryl- $\beta$ -Glucosid ( $\beta$ -CholGlc) und Cholesteryl- $\beta$ -Galactosid ( $\beta$ -CholGal). Alle Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch in Chloroform/Methanol 85:15 aufgetrennt. Die Detektion der Lipide erfolgte in A mittels des Sprühreagenzes  $\alpha$ -Naphtholschwefelsäure und anschließendem Veraschen und in B mittels "Radioscanning" nach zwei Stunden Exposition.

Abbildung 2.12A zeigt, dass der *P. pastoris* WT *in vivo*  $\beta$ -ErgGlc synthetisiert. Dabei ist die stärkste Akkumulation nach vierstündiger Induktion zu beobachten, während die Lipidbande nach zweistündiger und 16-stündiger Methanol-Induktion weniger ausgeprägt ist. Die KO-Mutante zeigte unabhängig von der Induktionsdauer keine  $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese. Die rekombinante Hefe, die PpartBb0572 exprimierte, zeigte erst nach 16 h eine sehr schwache Lipidbande, welche als  $\beta$ -ErgGal identifiziert wurde. Die PpartBh0572-exprimierenden Hefezellen synthetisierten hingegen  $\beta$ -ErgGlc, das während der Induktion von zwei über vier bis zu 16 Stunden stark akkumuliert. Die parallel durchgeführte *in vitro*-Enzymanalyse mit markiertem Cholesterol (Abb.2.12B) zeigte, dass Zellen des WTs und der PpartBh0572-exprimierende Hefe nach Homogenisierung in der Lage waren,  $\beta$ -CholGlc zu synthetisieren. Die KO-Mutante sowie die zwei Leerkontrollen (K1+2) ohne Homogenat zeigten keine SG-Synthese. Die rekombinante Hefe, welche PpartBb0572 exprimierte, setzte die Substrate zu  $\beta$ -CholGal um. Dabei waren die Intensitäten der SG-Lipidbanden des WTs am stärksten, wobei nach 16 h die stärkste Bande detektiert werden konnte. Für die PpartBb0572-exprimierende Hefe war dies hingegen schon nach vier Stunden der Fall und für die PpartBh0572-exprimierende Hefe nach zwei Stunden.

Die beschriebenen Enzymassay-Varianten führten zu keiner verbesserten Aktivität der SGTs, welche für eine entsprechende Quantifizierbarkeit der SGs sorgen könnte. Es konnten aber aus den Variationen Erkenntnisse gewonnen werden, welche für folgende Optimierungsversuche hilfreich sein könnten. Zum Beispiel, dass sich die höchste Enzymaktivität der Borrelien-SGTs im Sediment befindet

und dass die SGs *in vivo* mit verlängerter Induktion akkumulierten, dies aber keinen signifikanten Einfluss auf die *in vitro* ermittelte Enzymaktivität nahm.

### 2.3 Einfluss von SG auf die Peroxisomendegradation in *P. pastoris*

Ziel der Versuche war es, zu untersuchen, inwiefern SG Einfluss auf die Peroxisomendegradationsfähigkeit von *P. pastoris* nimmt. *P. pastoris* ist in der Lage Methanol als Kohlenstoffquelle in den Peroxisomen umzusetzen. Durch Induktion mit Methanol werden Peroxisomen proliferiert, welche das zum Methanol-Katabolismus benötigte Enzym AOX beinhalten. Im vorliegenden Fall induziert das Methanol auch die Synthese der zu analysierenden  $\beta$ -ErgGlc-Varianten. Steht Glucose zur Verfügung, beginnt der Prozess der Peroxisomendegradation, da die Peroxisomen in dieser großen Anzahl für den Katabolismus von Glucose nicht benötigt werden. Die Detektion der Peroxisomendegradation erfolgte gekoppelt an die Präsenz der AOX. Wurde AOX-Aktivität gemessen, bedeutete dies, dass Peroxisomen vorhanden waren, da die AOX in diesen Organellen lokalisiert ist und dort auch der Katabolismus des Methanols stattfindet. Während der Degradation der überschüssigen Peroxisomen musste folglich die AOX-Aktivität abnehmen und nach vollständiger Degradation nicht mehr bzw. kaum messbar sein.

Unter diesen mikropexophagischen Bedingungen sollten transgene Hefen untersucht werden, welche UGT51B1-Varianten synthetisierten und zum Teil in der SG-Biosynthese beeinträchtigt waren (s. 2.1.1, S.46), um die Bedeutung des Proteins auch unabhängig von seiner katalytischen Aktivität analysieren zu können. Des Weiteren wurden auch Hefen untersucht, welche strukturelle SG-Varianten in einer  $\Delta ugt51b1$ -Mutante synthetisieren konnten (s. 2.2, ab S.55). Dabei handelte es sich um die im Rahmen dieser Arbeit generierten Hefetransformanten, die nach heterologer Expression einer  $\alpha$ -SGlcT (Hp0421p)  $\alpha$ -ErgGlc bzw. einer  $\beta$ -SGalT (Bb0572p)  $\beta$ -ErgGal synthetisierten. Mit Hilfe dieser strukturellen SG-Varianten soll aufgeklärt werden, ob das SG im Peroxisomenabbau eine bestimmte Epimerie oder Anomerie aufweisen muss und/oder ob die verknüpfte Hexose von Belang ist. Den Abschnitten 2.3.2 und 2.3.3 können die Analysen der strukturellen SG-Varianten bezüglich der Aufklärung ihrer Beteiligung am Peroxisomenabbau entnommen werden.

#### 2.3.1 Einfluss der $\beta$ -ErgGlc-Synthese auf die Peroxisomendegradation in *P. pastoris*

In diesem Abschnitt wird die Analyse von Hefen beschrieben, welche UGT51B1-Varianten synthetisierten. Diese waren teilweise in der  $\beta$ -ErgGlc-Synthese beeinträchtigt. Die transgenen Hefen sollten bezüglich ihrer Fähigkeit, ihre Peroxisomen degradieren zu können im Vergleich zu Hefen analysiert werden, die ein funktionales Enzym synthetisierten.

Durch eine *in situ*-AOX-Aktivitätsfärbung nach Stasyk *et al.* konnte die Präsenz (Aktivität) der AOX1 in der die Peroxisomenproliferation-induzierenden Methanol-Phase bestimmt werden [330]. Nach einem Wechsel zu Glucose als Kohlenstoffquelle konnte mittels einer *in situ*-Aktivitätsfärbung

## 2 Ergebnisse

nach Sakai *et al.* festgestellt werden, ob die AOX1 noch detektiert werden konnte [298]. Neben *Aox1* gibt es noch ein weiteres Gen, *Aox2*, welches ebenfalls für eine AOX codiert [172, 60]. Jedoch macht das Genprodukt von *Aox1* den größten Anteil mit 30% der löslichen Proteine in der Hefezelle aus [55], weswegen mit der Färbung primär AOX1 detektiert wird.

Für die Färbungen wurden die (transgenen) *P. pastoris*-Zellen angezogen und für zwei Tage auf Methanol-Platten zur Proliferation der Peroxisomen und zur Induktion der Expression der (modifizierten)  $\beta$ -ErgGlcT-Gene inkubiert. Auf Methanol-haltigem Nährboden katalysiert die AOX die Umsetzung von Methanol und Sauerstoff zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid. Durch Zugabe einer Peroxidase kann das Wasserstoffperoxid mit einem Dimethoxybenzidin einen roten chinoiden Farbstoff bilden. Für die *in situ*-Färbung nach Sakai *et al.* wurden die Hefezellen vom Methanol-haltigen Nährboden mittels einer Membran auf einen Glucose-haltigen Nährboden transferiert und für acht bis zehn Stunden auf diesem inkubiert. Anschließend wurde die AOX-Aktivität mittels eines Assays visualisiert, welcher ebenfalls auf der Entstehung von Wasserstoffperoxid basiert. Durch Zugabe von exogenem Methanol und Peroxidase wird ein ebenfalls exogen zugegebener Redoxindikator (ABTS) oxidiert. Diese Oxidation resultiert in der Verfärbung der Hefezellen zu grün-lila. Die Resultate der verschiedenen Aktivitätsfärbungen sind Tabelle 2.1 zu entnehmen.

Tabelle 2.1:  $\beta$ -ErgGlc-defiziente Hefen zeigten nach Wechsel der Kohlenstoffquelle von Methanol zu Glucose AOX-Aktivität.

Hefen	AOX - Methanol	AOX - Glucose
WT	+	-
KO	+	+
FL	+	-
MutA	+	-
MutB	+	+
MutC	+	+

Resultate zweier AOX-Aktivitätsfärbungen nach Stasyk *et al.* [330] und Sakai *et al.* [298]. Eingesetzt wurden Zellen des *P. pastoris* WT-Stamms PPY12 sowie von einer  $\beta$ -ErgGlc-defizienten KO-Mutante (PPY12 $\Delta$ *ugt51b1*) als Kontrolle neben Zellen transgener Hefen. Dies waren Zellen der mit CFP-UGT51B1 komplementierten Hefe (FL) und jene Hefezellen, welche CFP-UGT51B1-MutA, -MutB oder -MutC synthetisierten. Nach Kultivierung der Zellen auf Vollmedium wurden diese für zwei Tage auf Methanol-Festmedium transferiert. Auf Methanol-Festmedium wurde die Färbung nach Stasyk *et al.* angewandt. Nach Transfer der Zellen auf ein Glucose-haltiges Festmedium wurde nach 8-10 h die AOX-Aktivität nach Sakai *et al.* bestimmt. Mit + gekennzeichnete Hefen zeigten AOX-Aktivität im Gegensatz zu jenen mit -.

Tabelle 2.1 zeigt, dass alle Hefen in der Lage waren, AOX zu bilden, um Methanol zu katabolisieren. Nach einem Wechsel auf Glucose-haltigen Nährboden und nach acht bis zehn Stunden Inkubation konnte nur noch bei der KO-Mutante und den Hefen mit MutB- und MutC-Modifikation in UGT51B1, welche alle in der  $\beta$ -ErgGlc-Synthese beeinträchtigt waren, AOX-Aktivität und folglich kein Abbau der Peroxisomen festgestellt werden. Hefen, die nicht in ihrer SG-Synthese beeinträchtigt waren, zeigten keine AOX-Aktivität mehr, so dass auf einen funktionalen Peroxisomenabbau geschlossen werden konnte.

Eine weitere Möglichkeit den Peroxisomenabbau zu detektieren, bot das Durchführen einer Immunoblot-Analyse mit einem Anti-AOX-Antiserum. Dazu wurden die (transgenen) Hefen wiederum in



## 2 Ergebnisse

Vollmedium kultiviert, die Expression der  $\beta$ -SGlcT bzw. die Proliferation der Peroxisomen mit Methanol induziert und dann die Kohlenstoffquelle zu Glucose gewechselt. Erwartet wurden basierend auf den *in situ*-AOX-Aktivitätsfärbungen die folgenden Muster: Alle  $\beta$ -ErgGlc-synthetisierenden Hefen (WT, FL, UGT51B1-MutA) sollten direkt nach dem Wechsel zu Glucose als Kohlenstoffquelle eine hohe Aktivität aufweisen, welche im Laufe der Umstellung des Metabolismus der Hefen zum Glucosekatabolismus abnimmt. Im Gegensatz dazu sollten die in der  $\beta$ -ErgGlc-Synthese beeinträchtigten Hefen (KO, UGT51B1-MutB,-MutC) eine konstant hohe AOX-Aktivität aufzeigen. Zudem sollte das AOX-Protein unter nicht-induzierbaren Bedingungen nicht nachgewiesen werden können, da die Transkription der *Aox*-Gene nur mit Methanol stattfindet und durch Glucose reprimiert wird [247].

Für den Erhalt der Proteinhomogenate wurden zwei Strategien im Rahmen dieser Arbeit verfolgt. Es wurden zum Einen definierte Proteinmengen in die Analysen eingesetzt. Da dabei das Zellwachstum nicht berücksichtigt wurde, musste beachtet werden, dass die Zunahme der Zellmasse die Ergebnisse verfälschen könnte. Eine hohe AOX-Aktivität zu Beginn des Wechsels in Glucose-Medium könnte "konstant" bleiben, wenn die geringer werdende Aktivität durch die Zunahmen an Zellen ausgeglichen wird und akkumuliert. Wiederum müsste dies für die Hefen, bei denen eine konstante Aktivität erwartet wurde, bedeuten, dass eine Zunahme der AOX-Aktivität zu beobachten wäre. Deswegen wurde in einem weiteren Versuchsansatz das Zellwachstum berücksichtigt und auch eine Kontrolle vor der Methanol-Zugabe mitgeführt. In letzterem Fall wurden Optische Dichte-(OD)-Einheiten geerntet und das Wachstum der Zellen gemessen, um die eingesetzten Proteinmengen an das Zellwachstum anzupassen. D.h. mit gesteigertem Zellwachstum um Faktor X wurde auch die eingesetzte Proteinmenge entsprechend um diesen Faktor erhöht.

Für beide Strategien wurde die Genexpression für neun Stunden mit Methanol induziert und die Zellen nach dem Wechsel in Glucose-Medium zu definierten Zeitpunkten (0, 3, 6, 9 und u.a. 20 h) geerntet und zu Proteinhomogenaten durch Aufbrechen mit Glasperlen aufgearbeitet. Diese Proteinhomogenate konnten anschließend einer SDS-PAGE mit anschließender Proteinfärbung bzw. einer Immunoblot-Analyse unterzogen werden.

Es konnten Proteinbanden mit einer molekularen Masse von ca. 80 kDa detektiert werden. Die ermittelte molekulare Masse von AOX beträgt 74 kDa. Nur in den nicht-induzierten Zellen wurde kein AOX-Protein nachgewiesen. Basierend auf der vorangegangenen Aktivitätsfärbung sollte eine Korrelation zwischen  $\beta$ -ErgGlc-Synthese und der Fähigkeit zum Peroxisomenabbau durch eine Abnahme des AOX-Signals im Laufe der Glucose-Adaption detektiert werden. Ein solches Muster konnte jedoch nicht zuverlässig detektiert werden. Nur für den Komplementierer FL konnte eindeutig auf dieses Muster geschlossen werden. Der WT, der ebenfalls dieses Muster aufzeigen sollte, ließ sich nicht problemlos in dieses erwartete Aktivitätsmuster einordnen. So wurde darauf geschlossen, dass die Immunoblot-Analyse-Bedingungen noch optimiert werden mussten, damit Ergebnisse mit Konstanz erzeugt und zur Interpretation der Peroxisomendegradationsfähigkeit hinzugezogen werden können.

Die Präsenz der Peroxisomen nach Methanol-Induktion und der (beeinträchtigte) Abbau nach einem Wechsel zu Glucose als Kohlenstoffquelle konnte auch durch transmissionselektronenmikroskopische Analysen direkt nachgewiesen werden. Zur Etablierung der Probenpräparation für die

## 2 Ergebnisse

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden die Zellen von *P. pastoris* WT PPY12 und der KO-Mutante PPY12 $\Delta$ *ugt51b1* in Vollmedium angezogen. Nach einem Wechsel in Methanol- bzw. in Glucose-Medium wurden Zellen zu definierten Zeitpunkten (0 und 30 min sowie nach 2, 3, 6 und 9 h Adaption an die jeweilige Kohlenstoffquelle) für die Analyse entnommen. Nach Präparation der Zellen durch Fixierung, Entwässerung, Einbettung, Schnittpräparation und Kontrastierung wurden die Präparate mikroskopisch analysiert (Abb.2.13).

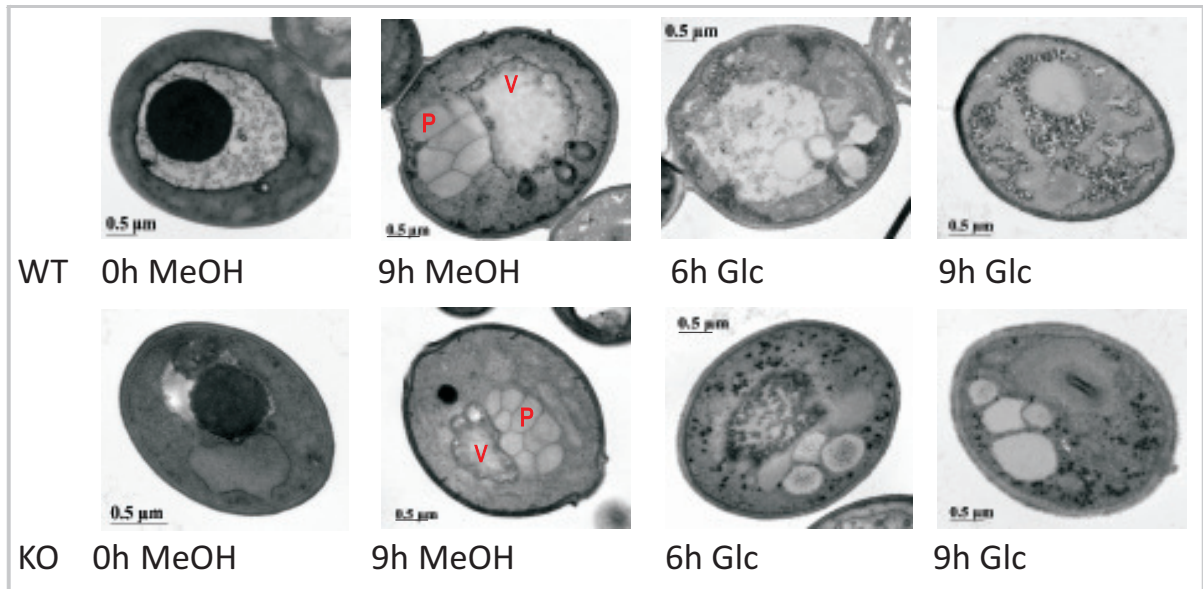


Abbildung 2.13: Peroxisomenproliferation und -degradation sind abhängig von der vorliegenden Kohlenstoffquelle und der  $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese.

Transmissionselektronenmikroskopische Analysen von *P. pastoris* WT-Stamm PPY12 (obere Reihe) und  $\beta$ -ErgGlc-defizienter KO-Mutante PPY12 $\Delta$ *ugt51b1* (untere Reihe). Abgebildet ist eine Auswahl der präparierten Proben: Zellen nach 0 und 9 h Adaption an Methanol (MeOH) als Kohlenstoffquelle und nach 6 und 9 h an Glucose (Glc). Kontrastiert wurde mit Uranylacetat und Bleicitrat. Kristalle bzw. kristalline Aggregate in den Peroxisomen weisen auf hohe Konzentrationen des peroxisomalen Enzyms Katalase hin, welches die Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser katalysiert, bzw. auf die AOX hin. P, Peroxisomen; V, Vakuole.

Abbildung 2.13 ist zu entnehmen, dass sowohl die Peroxisomen des WTs als auch der *Ugt51b1*-defizienten Mutante nach Induktion durch Methanol in großer Anzahl und Umfang proliferieren (siehe 9 h MeOH). Die Peroxisomen traten "geclustert" nahe der Vakuole auf. Nach einem Wechsel der Kohlenstoffquelle zu Glucose begann der WT mit der Degradation der Peroxisomen und nach sechs Stunden Glucose-Adaption waren die Peroxisomen teilweise schon in der Vakuole zu erkennen. Nach weiteren drei Stunden waren keine Peroxisomen mehr wahrzunehmen. Dagegen konnten in der KO-Mutante selbst nach neun Stunden Wachstum in Glucose-Medium noch Peroxisomen nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit konnte eine Präparationsmethode der Hefezellen zur Analyse der Peroxisomenproliferation und -degradation mit Hilfe von Elke Woelken (Univ. Hamburg) entwickelt werden. Jedoch konnten die aufwendige Präparation bzw. nachfolgende TEM-Analysen der UGT51B1-Varianten nicht mehr erfolgen. Die bisher durchgeführten TEM-Analysen belegten die Proliferation von Peroxisomen unter Methanol-Induktion sowohl für die WT-Kontrolle als auch für die KO-Mutante. In der KO-Mutante konnte zudem der Abbaufekt gezeigt werden.

## 2 Ergebnisse

Neben der Beobachtung der AOX als Indikator des Peroxisomenabbaus wurden unter mikropexophagischen Konditionen des Weiteren die  $\beta$ -ErgGlc-Synthese als auch das Zellwachstum beobachtet. Das bedeutet, dass nach einer neunstündigen Methanol-Induktion Zellen von WT, KO und allen UGT51B1-Varianten in Glucose-haltiges Medium überführt und direkt nach dem Wechsel sowie nach drei und sechs Stunden, wie bereits beschrieben, Gesamtlipidextrakte hergestellt und dünn-schichtchromatographisch analysiert wurden. Parallel wurde das Zellwachstum durch Bestimmung der Zelldichte (Abb.2.14) und der CFU (*colony forming units*) bestimmt. Die Lipidanalyse zeigte, dass beim WT nach neunstündiger Methanol-Induktion noch keine  $\beta$ -ErgGlc-Synthese festgestellt werden konnte. Erst drei Stunden nach dem Wechsel zu Glucose als Kohlenstoffquelle konnte  $\beta$ -ErgGlc detektiert werden, welches nach weiteren drei Stunden akkumulierte. Beim Komplementierer FL konnte eine  $\beta$ -ErgGlc-Synthese schon nach der Methanol-Induktion detektiert werden. Das synthetisierte  $\beta$ -ErgGlc akkumulierte drei Stunden nach dem Wechsel zu Glucose als Kohlenstoffquelle und nach weiteren drei Stunden schwächte sich die detektierte SG-Bande ab. Insgesamt waren die nachgewiesenen  $\beta$ -ErgGlc-Banden nicht sehr intensiv (Daten nicht gezeigt). Die KO-Kontrolle zeigte erwartungsgemäß wie die Hefen mit den UGT51B1-Varianten MutB und MutC keine SG-Synthese im Gegensatz zur UGT51B1-Variante mit MutA (vgl. Abb.2.2, S.50). Des Weiteren zeigten alle Hefezellen unter mikropexophagischen Konditionen Wachstum auf (Abb.2.14). Die Hefen mit den UGT51B1-Varianten MutB und MutC zeigten etwas geringere Wachstumsraten. Ein Zellwachstum konnte auch durch die Auswertung der CFU bestätigt werden (nicht gezeigt).

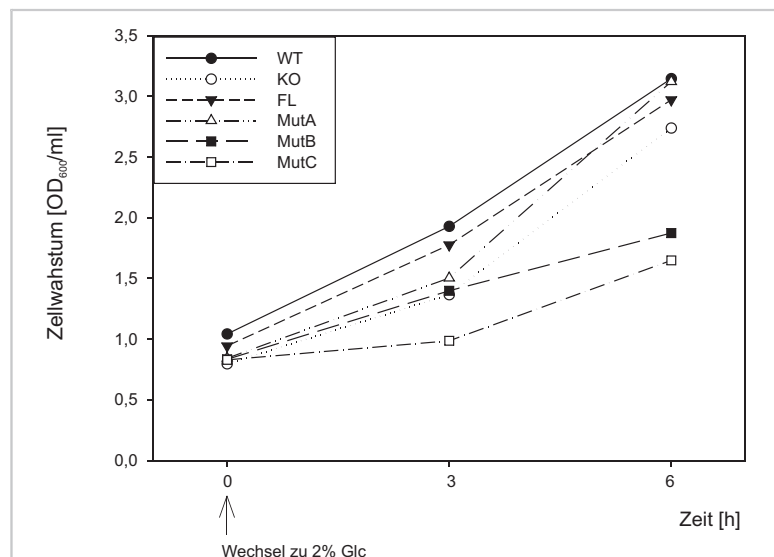


Abbildung 2.14: Alle Hefezellen zeigten unter mikropexophagischen Konditionen Wachstum.

Graphische Darstellung des Zellwachstums. Die Zelldichte wurde durch Ermitteln der Optischen Dichte (OD) bei 600 nm bestimmt. Es wurde Zellen folgender Stämme analysiert: vom *P. pastoris* WT-Stamm PPY12, einer UGT51B1-defizienten KO-Mutante und von Hefen, welche verschiedene UGT51B1-Varianten (FL, MutA-C) synthetisierten. Diese wurden für neun Stunden in Methanol-Medium (0,5%) kultiviert und dann in Glucose-Medium (2%) umgesetzt. 0, 3 und 6 h nach dem Wechsel wurden die Zellen analysiert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass zwei in UGT51B1 inserierte Mutationen einen Verlust der  $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese zur Folge hatten. Die Hefe-Stämme UGT51B1-MutB (G1389R)

und -MutC (D1412A) konnten kein  $\beta$ -ErgGlc synthetisieren. Die UGT51B1-MutA (P1164L)-Transformante zeigte keinen Verlust der SG-Biosynthese. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen zeigten, dass die  $\beta$ -ErgGlc-defizienten Stämme eine Lokalisierung von UGT51B1 in einer punktförmigen Struktur aufwiesen. Die nicht in der SG-Synthese beeinträchtigten Hefestämme zeigten eine Lokalisierung von UGT51B1 in einer *cup-like-structure*. Die  $\beta$ -ErgGlcT-Enzymvarianten konnten in beiden Fällen nahe der Vakuolenmembran lokalisiert werden. Beide detektierten Strukturen werden mit dem MIPA-System in Verbindung gebracht, und es konnte postuliert werden, dass  $\beta$ -ErgGlc bei der Differenzierung des MIPA beteiligt sein könnte. Die Analysen der AOX-Aktivitäten ergaben erste Hinweise auf eine Korrelation der  $\beta$ -ErgGlc-Synthese und der Fähigkeit zum Peroxisomenabbau. Zudem konnte eine Präparationsmethode von *P. pastoris*-Zellen für transmissionselektronenmikroskopische Analysen etabliert werden, die es erlaubt, die Proliferation und die Degradation von Peroxisomen direkt nachzuweisen.

### 2.3.2 Expression von *Hp0421* unter Kontrolle des *Aox1*-Promotors beeinträchtigte die Viabilität von *P. pastoris*

Nachdem erste Resultate darauf verwiesen, dass  $\beta$ -ErgGlc für den Peroxisomenabbau essentiell sein könnte, sollte untersucht werden, ob auch strukturelle SG-Varianten zum Peroxisomenabbau führen. So sollte die Fähigkeit zum Peroxisomenabbau der Hefen, welche *Hp0421* exprimierten, ebenfalls durch einen indirekten Nachweis über die AOX, wie bereits in 2.3.1 beschrieben, nachgewiesen werden. Diese Hefen synthetisierten  $\alpha$ -ErgGlc entweder unter der Kontrolle des nativen *Ugt51b1*-Promotors oder des starken *Aox1*-Promotors. Die Resultate einer *in situ*-AOX-Aktivitätsfärbung können Tabelle 2.2 entnommen werden.

Tabelle 2.2: Hefen, welche *Hp0421* exprimierten, zeigten nach Wechsel der Kohlenstoffquelle von Methanol zu Glucose keine AOX-Aktivität.

Hefen	AOX - Methanol	AOX - Glucose
WT	+	-
KO	+	+
$P_{aox1}$ - <i>hp0421</i>	+	-
$P_{ugt51b1}$ - <i>hp0421</i>	+	-

Resultate zweier AOX-Aktivitätsfärbungen nach Stasyk *et al.* und Sakai *et al.* [330, 298] mit Zellen des *P. pastoris* WTs GS115 sowie von einer  $\beta$ -ErgGlc-defizienten KO-Mutante (GS115 $\Delta$ *ugt51b1*) als Kontrolle neben Zellen transgener Hefen. Die transgenen UGT51B1-defizienten Hefen exprimierten *Hp0421* zum Einen unter der Kontrolle des *Aox1*-Promotors ( $P_{aox1}$ -*hp0421*), zum Anderem unter der des nativen  $\beta$ -SGlcT-Promotors ( $P_{ugt51b1}$ -*hp0421*). Nach Kultivierung der Zellen auf Vollmedium wurden diese für zwei Tage auf Methanol-Festmedium transferiert. Auf Methanol-Festmedium wurde die Färbung nach Stasyk *et al.* durchgeführt. Nach Transfer der Zellen auf ein Glucose-haltiges Festmedium konnte nach 8-10 h die AOX-Aktivität nach Sakai *et al.* bestimmt werden. Mit + gekennzeichnete Hefen zeigten AOX-Aktivität im Gegensatz zu jenen mit - auf.

Die Aktivitätsfärbungen (Tab.2.2) zeigten für die transgenen Hefen und die WT-Kontrolle auf Methanol-Nährboden AOX-Aktivität, welche nach dem Wechsel zu Glucose und nach einer Adaptionsphase nicht mehr detektiert werden konnte. Die KO-Mutante, welche kein  $\beta$ -ErgGlc mehr synthetisieren konnte, wies sowohl auf Methanol- als auch auf Glucose-Nährboden AOX-Aktivität

## 2 Ergebnisse

auf. Aufgrund dieser Resultate konnte auf eine Korrelation von SG-Synthese und AOX-Aktivität geschlossen werden und dass die strukturellen SG-Varianten den Degradationsdefekt komplementieren könnten. Außerdem wurden das Zellwachstum und die Viabilität der Zellen sowie die SG-Biosynthese mittels Lipidanalysen unter Methanol-induzierenden Bedingungen verfolgt, wie schon im vorhergehenden Abschnitt beschrieben.

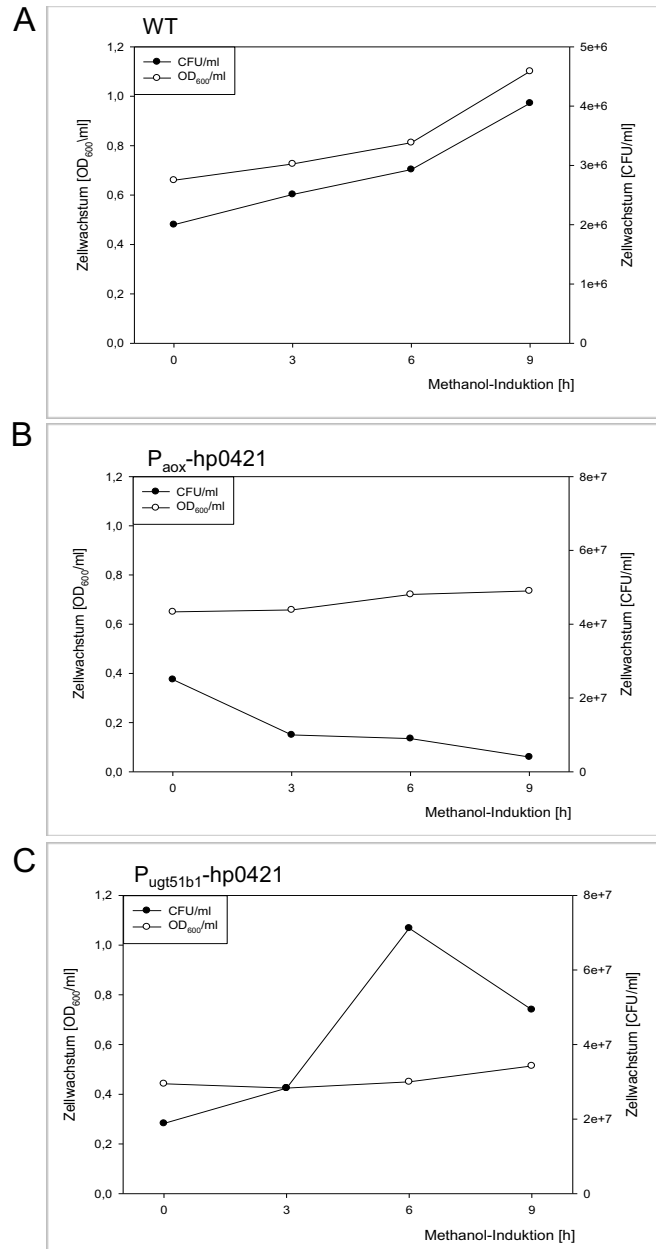


Abbildung 2.15: *Hp0421*-exprimierende Hefen starben während der Methanol-Induktion.

Graphische Darstellung des Zellwachstums durch Bestimmung der OD<sub>600</sub> und Auszählen der CFU. Das Zellwachstum wurde während der Methanol-Induktion (0-9 h) analysiert: Von dem *P. pastoris* WT-Stamm GS115 (A), einer mit Hp0421p-komplementierten UGT51B1-defizienten Mutante, in der die heterologe Expression des Gens unter Kontrolle des *Aox1*-Promotors erfolgte (B) bzw. unter der Kontrolle des nativen *Ugt51B1*-Promotors (C).

Abbildung 2.15A zeigt, dass der WT-Stamm unter Methanol-induzierenden Bedingungen Zellwachstum zeigte. In B ist zu erkennen, dass die unter Kontrolle des *Aox1*-Promotors *Hp0421*-exprimierende Hefe keine Zunahme in der Zelldichte (OD<sub>600</sub>/ml) zeigte, daraufhin wurde die Lebensfähigkeit der Zellen durch Ermitteln der CFU bestimmt. Diese zeigte, dass die Zellen während der Methanol-Induktion sterben. Dies war auch der Fall, wenn die Methanol-Konzentration von 0,5% auf 0,2% sowie auf 0,05% erniedrigt wurde (nicht gezeigt). Als Alternative wurde anstelle des sehr starken *Aox1*-Promotors der native Promotor von *Ugt51B1* vor den 5'-terminalen Bereich von *Hp0421* kloniert, um die Expressionsstärke abzuschwächen (s. Abb.2.6, S.58). Diese Hefe überlebte die Methanol-Induktion, auch wenn die Zahl an lebenden Zellen nach neun Stunden absank (C). D.h. diese Zellen kamen besser mit den Konditionen zurecht, zeigten allerdings auch kaum Zellwachstum.

Wie bereits genannt, wurden ebenfalls Gesamtlipidextrakte hergestellt und dünnschichtchromatographisch analysiert. Der WT zeigte unter Methanol-induzierenden Bedingungen eine Akkumulation von  $\beta$ -ErgGlc. Auch die Expression von *Hp0421* unter der Kontrolle des *Aox1*-Promotors führte zu einer Akkumulation von  $\alpha$ -ErgGlc. Die  $\alpha$ -ErgGlc-Synthese war dabei stärker als im WT-Stamm (vgl. Abb.2.6). Wurde die Methanol-Konzentration auf 0,2% bzw. 0,05% herabgesenkt, akkumulierte ebenfalls  $\alpha$ -ErgGlc, nur war die Synthese entsprechend abgeschwächer zu detektieren. Eine moderatere Akkumulation von  $\alpha$ -ErgGlc wurde ebenfalls nach Expression von *Hp0421* unter Kontrolle des nativen *Ugt51B1*-Promotors nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

### 2.3.3 Analyse der Funktion von $\beta$ -ErgGal in der Peroxisomendegradation von *P. pastoris*

Auch die transgenen Hefen, welche Ppart*Bb0572* unmarkiert oder mit aminoterminalen His<sub>6</sub>-Tag exprimierten und eine  $\beta$ -SGalT-Aktivität aufwiesen, wurden weitergehend untersucht. Bisher konnten die Enzymaktivität nachgewiesen und das  $\beta$ -SGal strukturell verifiziert werden. Auffällig war bisher nur, dass eine geringe Biosynthese des  $\beta$ -ErgGals in *P. pastoris* vorlag (s. 2.2.2 und 2.2.4, S.59 und 68). Die Fähigkeit der transgenen Hefen, ihre nach Methanol-Induktion proliferierten Peroxisomen nach einem Wechsel der Kohlenstoffquelle degradieren zu können, erfolgte, wie in Abschnitt 2.3.1 (S.77) näher beschrieben, auch in diesem Fall gekoppelt an die Präsenz des peroxisomalen Enzyms AOX.

Diese transgene Hefen wurden ebenfalls mit einer *in situ*-AOX-Aktivitätsfärbung, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, untersucht. Die Daten zeigten ein entsprechendes Muster, wie es auch in Tabelle 2.2 (S.82) dargestellt wurde: Auf Methanol-Nährboden zeigten die transgenen, Ppart*Bb0572*-exprimierenden Hefen und die WT-Kontrolle AOX-Aktivität, welche nach dem Wechsel auf Glucosehaltigen Nährboden und nach einer Adaptionsphase nicht mehr detektiert werden konnte. Die KO-Mutante, welche kein  $\beta$ -ErgGlc mehr synthetisieren konnte, wies sowohl auf Methanol- als auch auf Glucose-Nährboden AOX-Aktivität auf. Auch in diesem Fall könnte auf eine Korrelation zwischen SG-Synthese und der AOX-Aktivität bzw. der Präsenz von Peroxisomen geschlossen werden. In Methanol-haltigem Medium konnte, wie auch schon bei den *Hp0421*-exprimierenden Hefen, kein bzw. kaum Wachstum der transgenen Hefen festgestellt werden. Die Auswertung der Zellviabilität ergab, dass die Zellen den Induktionsprozess überlebten. Durch dünnschichtchromatischer Auftren-

## 2 Ergebnisse

nung von Gesamtlipidextrakten konnten in diesem Fall aufgrund des geringen Kulturvolumens keine  $\beta$ -SGal-Synthese detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann Folgendes festgehalten werden: Keine der transgenen Hefen (*Hp0421*- und *Bb0572*-exprimierende Hefestämme), welche strukturelle Varianten ( $\alpha$ -SGlc und  $\beta$ -SGal) anstelle des nativen  $\beta$ -ErgGlc synthetisierte, zeigte nach einem Wechsel der Kohlenstoffquelle von Methanol zu Glucose noch AOX-Aktivität. Somit könnten diese SG-Varianten die Funktion des  $\beta$ -ErgGlc komplementieren. Auffällig war jedoch, dass die transgenen Hefezellen selbst nur ein geringes Zellwachstum zeigten, wenn die Viabilität der Zellen gewährleistet werden konnte.

Die  $\beta$ -SGlcT (*Bh0572p*) aus *B. hermsii*, welche keine strukturelle SG-Variante erzeugt, aber ein Enzym bakteriellen Ursprungs zur Verfügung stellt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden. Auch die *Bh0572*-exprimierende Hefe sollte hinsichtlich ihrer Fähigkeit ihre Peroxisomen zu degradieren untersucht werden. Es sollte geklärt werden, ob das durch eine bakterielle SGT erzeugte  $\beta$ -ErgGlc den Degradationsdefekt komplementieren könnte.

# 3 Diskussion

GTs vermitteln die Übertragung von Zuckerresten auf vielfältige Moleküle, u.a. Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate und auch Lipide. Glycosylierungsprozesse sind an intra- und interzellulären Erkennungs- und Regulationsprozessen beteiligt, wurden jedoch hauptsächlich bei Glycoproteinen nachgewiesen [271], wohingegen die biologischen Funktionen von Glycolipiden noch weitestgehend unbekannt sind. Glycolipide (Glycosyldiacylglycerole, Glycosylceramide und SGs) sind am Aufbau von Biomembranen beteiligt und weisen eine große strukturelle Vielfalt auf. Diese strukturelle Vielfalt führt zur Frage, welche allgemeinen und/oder spezifischen Funktionen die Glycolipide in Pflanzen, Pilzen, Bakterien und Tieren haben. Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zur Aufklärung der biologischen Funktion von SGs bei der Degradation von Peroxisomen in der methylo-trophen Hefe *P. pastoris* leisten (s. Zielsetzung S.44). Sie befasste sich u.a. mit der Identifizierung neuer SGT-codierender Gene und der Herstellung und Analyse von *P. pastoris*-Transformanten mittels Anwendung der “*Glycolipid Engineering*”-Methode [410, 395].

Mit dem nachfolgenden Schema (Abb.3.1) soll illustriert werden, welche Ziele im Rahmen dieser Arbeit erreicht werden konnten, bevor die Daten diskutiert werden (s. auch 1.11, S.45).

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit

- eine  $\beta$ -SGalT (Bb0572p) aus *B. burgdorferi* identifiziert werden.
- eine  $\beta$ -SGlcT (Bh0572p) aus *B. hermsii* identifiziert werden.
- die Transkriptsynthese von drei FgUgts aus *F. graminearum* identifiziert werden. Diese drei FgUgts konnten von Anna Zaslowski [438] als  $\beta$ -SGlcTs identifiziert werden (nicht gezeigt).
- durch Generation von UGT51B1-Varianten sichergestellt werden, dass die  $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese essentiell für die Reifung des MIPA-Membransystems und vermutlich für den Ablauf der Mikropexophagie ist.
- durch *Glycolipid-Engineering* Hefetransformanten generiert werden, die in der Lage waren, strukturelle SG-Varianten zu synthetisieren. Es konnte jedoch noch nicht endgültig geklärt werden, ob die strukturellen SG-Varianten die Rolle von  $\beta$ -ErgGlc in der Mikropexophagie einnehmen können.



### 3 Diskussion

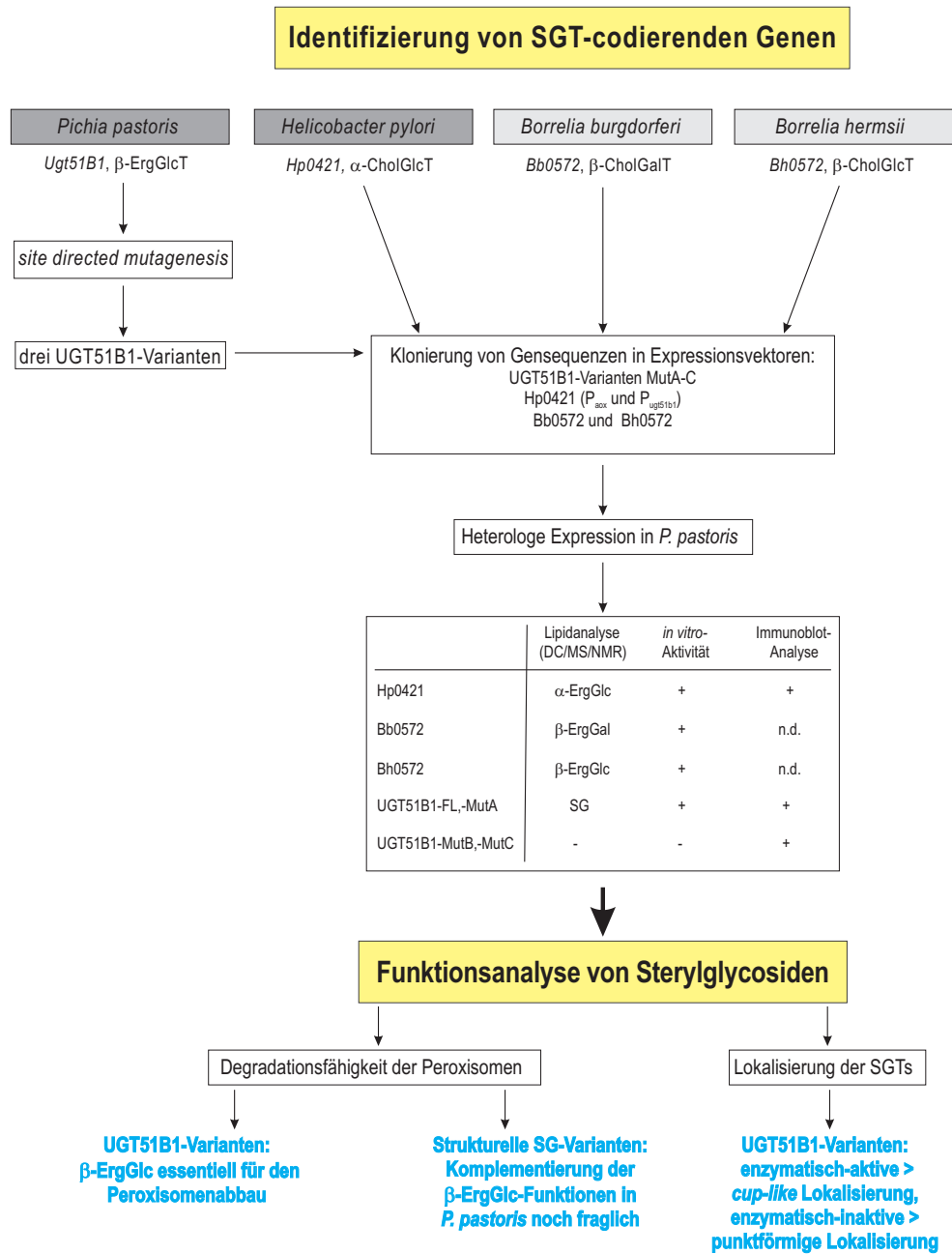


Abbildung 3.1: In dieser Arbeit erreichte Ziele.

Schematische Aufzeichnung der erzielten Resultate der in der Zielsetzung (S.44) formulierten Projekte. Hellgrau hinterlegt: SGT-Gene waren vor Beginn dieser Arbeit unbekannt. Dunkelgrau hinterlegt: SGT-Gene wurden im Vorfeld schon identifiziert. n.d.: nicht durchgeführt.

### 3.1 $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese korreliert mit der MIPA-Elongation in *P. pastoris*

Ein wichtiger Aspekt, welcher im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt werden sollte, war es, die biologische Funktion der  $\beta$ -SGlcT (UGT51B1) bzw. von deren Enzymprodukt  $\beta$ -SGlc in *P. pastoris* zu untersuchen. Basierend auf früheren Daten [262, 425] sollte geklärt werden, ob UGT51B1 unabhängig oder abhängig von seiner enzymatischen Aktivität (SG-Synthese) in den Peroxisomenabbau involviert ist.

Dazu sollte eine SDM-Methode angewandt werden, welche die Synthese des Proteins aufrecht erhält, aber die katalytische Aktivität u. U. beeinträchtigt. SDM-Studien dieser Art wurden schon erfolgreich durchgeführt: z.B. an der Glucosylceramid-Synthase aus Ratte (*Rattus*), einem Enzym, welches Glucose von UDP-Glucose auf Ceramid überträgt, um Glucosylceramid zu formieren [418, 222]. Durch auf SDM basierende AS-Austausche wurde die katalytische Aktivität beeinträchtigt. Durch einen AS-Austausch wurden auch Zuckerspezifitäten von pflanzlichen GTs gewechselt. Bei der UDP-Galactose:Anthocyanin-Galactosyltransferase aus *Aralia cordata* wurden durch Austausch eines konservierten Histidins durch Glutamin eine Glucosyltransferase-Aktivität erreicht. Andererseits wurde durch den Austausch von Glutamin durch Histidin bei der UDP-Glucose:Flavonoid-Glucosyltransferase aus *Scutellaria baicalensis* kein Wechsel der Zuckerspezifität erzeugt, während die eigentliche katalytische Aktivität nur stark zurückging [174]. Das bedeutet, dass ein Austausch einer AS nicht immer zu einem erwarteten Effekt führen muss. Im nächsten Abschnitt werden die in dieser Arbeit erzeugten Mutationen bzw. AS-Austausche in der katalytischen Domäne von UGT51B1 diskutiert.

#### 3.1.1 Die konservierte Aminosäuresequenz "Box4" repräsentiert wahrscheinlich die Nukleosidphosphat-Bindestelle

Im Rahmen der SDM-Methode wurden Punktmutationen in der Nukleotidsequenz in konservierten Bereichen erzeugt, welche einen Austausch einer AS im Protein (UGT51B1) zur Folge hatten (Abb.2.1, S.48). Generierte Transformanten sollten für die Funktionalitätsanalysen bezüglich der Peroxisomendegradation (s. 2.3.1, S.77) einen intakten *Aox1*-Locus neben einer Insertion der erzeugten UGT51B1-Varianten im *His4*-Locus des Hefegenoms aufweisen. Diese Voraussetzungen wurden erfüllt. Alle Transformanten zeigten einen positiven Nachweis des *Aox1*-Gens. Der Nachweis der inserierten (modifizierten) *Ugt51B1*-Gene konnte ebenfalls mittels PCR erbracht werden (Daten nicht gezeigt). Untersuchungen der Enzymaktivität zeigten, dass zwei UGT51B1-Varianten in ihrer  $\beta$ -ErgGlc-Synthesefähigkeit beeinträchtigt waren. Die Expression der *Ugt51B1*-Varianten MutB und MutC führte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu keiner SG-Synthese (Abb.2.2). Der *P. pastoris*-WT-Stamm PPY12 synthetisierte *in vivo* nur wenig  $\beta$ -ErgGlc. Die mit dem nativen UGT51B1 komplementierte Hefetransformante zeigte dagegen eine deutlichere Syntheseleistung, welche sich auf die Expression von *Ugt51B1* unter der Kontrolle des starken *Aox1*-Promotors zurückführen lässt. Die Transformante, welche die UGT51B1-Variante mit MutA synthetisieren sollte, zeigte als einzige Transformante  $\beta$ -ErgGlc-Synthese, welche aufgrund des *Aox1*-Promotors etwas stärker aus-

### 3 Diskussion

fiel als die Synthesefähigkeit des WTs (Abb.2.2A). *In vitro* konnte die  $\beta$ -ErgGlc-Synthesefähigkeit der Transformante mit der inserierten *Ugt51B1*-Variante MutA bestätigt werden. Die komplementierte Hefe zeigte auch in diesem Fall die stärkste Enzymaktivität (Abb.2.2B).

Zusammengefasst bedeutet dies, dass alle Mutationen in gewisser Weise zu Beeinträchtigungen der Enzymaktivität führten, nur bei Variante MutB und MutC kam die Aktivität komplett zum Erliegen. Beide Mutationen befinden sich in dem als Box4 gekennzeichneten Bereich (s. Abb.1.6, S.19). Diese Box wird als "Signatur-Sequenz" beschrieben, die charakteristisch für die Superfamilie der NDP-Zucker-GTs ist. Es wird angenommen, dass es sich hierbei um die UDP-Zuckerbindestelle handelt [214]. Das Motiv, welches durch Einfügen von Mutation C modifiziert wurde, ist das sogenannte DxD-Motiv (Asp-x-Asp). Das DxD-Motiv konnte in vielen *invertin*- als auch *retaining*-NDP-Zucker-GTs nachgewiesen werden und ist in der katalytischen Region angesiedelt. Das Motiv soll in die Bindung von divalenten Kationen ( $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) involviert sein, welche die Phosphate der UDP-Zucker im aktiven Zentrum koordiniert [409, 182]. Das Kation soll hierbei den Abgang der NDP-Gruppe durch die Stabilisierung der negativen Ladung erleichtern. Ein ähnliches Motiv, DQxD, findet sich auch in den humanen UDP-Glucuronosyltransferasen, und das erste Aspartat interagiert mit dem Substrat UDP-Glucuronsäure [422]. Das AS-Motiv, welches der Modifikation mit Mutation B in der Box4-Signatursequenz zugrundeliegt, wurde bisher noch beschrieben. Die Wahrscheinlichkeit, dass Box4 die Zuckerbindestelle darstellt, ist sehr hoch, da zwei AS-Austausche in dieser konservierten Sequenz zur Synthese von Proteine führten, die keine Enzymaktivität mehr aufwiesen.

Mutation A führt im Gegensatz zu den Mutationen B und C nur zu einer geringen Beeinträchtigung der Syntheseleistung. Im Gegensatz zum WT-Enzym hat die SG-Syntheseleistung zwar aufgrund der Genexpression unter Kontrolle des starken *Aox1*-Promotors zugenommen, aber in Vergleich zu der Aktivität des komplementierten Enzyms, ebenfalls unter der Kontrolle des starken Promotors, wies UGT51B1-MutA eine eingeschränkte SG-Syntheseleistung auf (Abb.2.2). Mutation A wurde in der konservierten AS-Sequenz von Box2 eingeführt. Diese Box liegt universell in  $\beta$ -SGlcTs vor, und ihre Funktion wurde bisher noch nicht aufgeklärt [393].

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob alle transgenen Hefen die *Ugt51B1*-Varianten exprimieren und UGT51B1-Proteine synthetisieren. Damit sollte gezeigt werden, dass die SG-Synthesefähigkeit und nicht nur das Protein ohne seine katalytische Aktivität im Peroxisomenabbau essentiell ist. Deshalb musste vor allem bei den keine Enzymaktivität aufweisenden *P. pastoris*-Transformanten der Nachweis der Proteinsynthese erbracht werden. Daraufhin wurde mit Gesamtproteinhomogenaten eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung bzw. eine Immunoblot-Analyse mit einem Anti-GFP-Antikörper durchgeführt. Erwartet wurde für die CFP-markierten UGT51B1-Varianten eine molekulare Proteinmasse von 163 kDa.

Mittels einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung konnte das Gesamtproteinmuster aller Homogenate betrachtet werden. Bei den höheren Proteinmassen konnten keine prominenten 163 kDa-Banden detektiert werden (Abb.2.3A, S.52). Eventuell wurden die UGT51B1-Proteine nur in geringem Maß synthetisiert und lagen unterhalb der Nachweisgrenze der Coomassie-Brilliant-Blue G250-Färbung. Auffällig war hingegen eine Bande unterhalb von 80 kDa, welche als AOX identifi-

ziert werden konnte. Diese nimmt einen hohen Proteinanteil nach Methanol-Induktion (hier für ca. 20 h) ein. Durch Immunoblot-Analyse konnte schließlich der Proteinnachweis erbracht werden. Bei allen Transformanten, die eine CFP-markierte UGT51B1-Variante synthetisieren sollten, konnten Proteinsignale detektiert werden (Abb.2.3B). Allerdings konnte die berechnete Proteinmasse von 163 kDa nicht nachgewiesen werden, sondern es wurden Signale oberhalb der 175 kDa-Bande des Proteinstandards detektiert. Dabei handelte es sich sehr wahrscheinlich um die CFP-markierten UGT51B1-Varianten. Denn der Anti-GFP-Antikörper konnte nur "spezifisch" an diese Varianten binden und nicht an die unmarkierte Variante des WT-Stamms. Es ist weiterhin nicht ungewöhnlich, dass Proteine nicht ihrer berechneten molekularen Masse entsprechend im PA-Gel laufen. Dies konnte schon gelegentlich in unserem Labor beobachtet werden.

Bisher konnten zwei Mutationen (MutB G1389R und MutC D1412A) identifiziert werden, welche die katalytische Aktivität von UGT51B1 beeinträchtigten, wohingegen nach einer Mutation (MutA P1164L) die SG-Synthese aufrecht gehalten wurde. Alle CFP-markierten UGT51B1-Proteine konnten in *P. pastoris* nachgewiesen werden. Im nächsten Abschnitt sollen nun die Analysen bezüglich der Rolle von  $\beta$ -ErgGlc in der Peroxisomendegradation diskutiert werden.

#### 3.1.2 $\beta$ -ErgGlc-Synthese korreliert vermutlich mit der Fähigkeit zum Peroxisomenabbau

Die Lokalisierung der Enzym-Varianten konnte weitere, interessante Daten liefern: Die Studien stellten eine Korrelation zwischen der  $\beta$ -ErgGlc-Synthese und der Ausbildung eines funktionalen MIPA-Membransystems fest. Beachtung finden sollte vor der Diskussion dieser Daten, dass (unveröffentlichte) Daten von der Gruppe um Y. Sakai (Univ. Kyoto, JP) belegten, dass die Expression unter Kontrolle des starken *Aox1*-Promotors kein optimales System darstellt (persönliche Mitteilung). Nach Leipelt *et al.* kann eine starke Überexpression zu Störungen im gezielten Proteintransport führen, indem das System mit Molekülen "geflutet" wird und die Kapazitäten überschritten werden [192]. Deswegen ist es möglich, dass es zu Falschlokalisierungen des zu analysierenden Proteins kommen könnte. Dieser Effekt einer Falschlokalisierung konnte im hier vorliegenden Fall nicht durch Expression unter Kontrolle des natürlichen Promotors ausgeschlossen werden, da nach Aussage von Y. Sakai und M. Oku aufgrund der Schwäche des nativen Promotors keine Lokalisierungsstudien möglich waren (persönliche Mitteilung). Das Fluoreszenzlevel war so niedrig, dass nicht zwischen der Fluoreszenz des CFPs/GFPs und der Autofluoreszenz der Zellen in Vollmedium, Methanol oder unter mikropexophagischen Konditionen unterschieden werden konnte. Auch die Verwendung stärkerer Fluoreszenzproteine (z.B. *enhanced GFP*) zeigte keine Auswirkung, so dass es vorerst keine Alternative zum *Aox1*-Promotor gab.

Nach Durchführung der Fluoreszenzanalysen, welche von M. Oku ausgeführt wurden, konnten zwei verschiedene Lokalisierungsmuster ermittelt werden, welche mit der  $\beta$ -ErgGlc-Synthesefähigkeit der Hefen in Zusammenhang gebracht werden konnten (Abb.2.4, S.54). Eine Lokalisierung von UGT51B1 in einer *cup-like*-Struktur, welche als funktionales MIPA-System interpretiert werden konnte [262, 425], zeigten nur Hefen, die noch in der Lage waren  $\beta$ -ErgGlc zu synthetisieren (Stämme: FL und UGT51B1-MutA). Zudem konnte der funktionale MIPA durch Co-Expression mit

### 3 Diskussion

YFP-ATG8, einem Marker für den MIPA, nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Hefen, die die Fähigkeit zur  $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese verloren hatten (Stämme: UGT51B1-MutB und -MutC), zeigten die Lokalisierung in einer punktförmigen Struktur, welche als MIPA-Vorläufer-Membran diskutiert wurde [425]. Aufgrund der erhobenen Daten ließ sich folgern, dass neben der spezifischen Lokalisierung des Enzyms dessen katalytische Aktivität zur Bildung von  $\beta$ -ErgGlc essentiell ist, um für die Reifung der MIPA-Vorläufermembran zu sorgen.

Dieses erste Indiz, dass funktionales UGT51B1 an der MIPA-Differenzierung und folglich am Peroxisomenabbau beteiligt ist, sollte überprüft werden. D.h. die generierten Hefen sollten untersucht werden, ob sie in der Lage waren, ihre Peroxisomen nach einem Wechsel der Kohlenstoffquelle von Methanol zu Glucose abzubauen zu können. Die Fähigkeit den Mikropexophagie-Prozess auszuüben wurde zuerst nicht direkt nachgewiesen. Die Detektion erfolgte gekoppelt an die Präsenz des peroxisomalen Enzyms AOX. Die AOX wurde in dieser Arbeit durch *in situ*-Aktivitätsfärbungen und Immunoblot-Analysen nachgewiesen. Der *in situ*-AOX-Nachweis nach Stasyk *et al.* [330] und Sakai *et al.* [298] zeigte recht deutlich, dass eine Kopplung von  $\beta$ -ErgGlc-Synthesefähigkeit und von AOX-Aktivität und somit Präsenz von Peroxisomen vorlag (Tab.2.1, S.78). Unter Methanol-Einfluss werden die *Aox*-Gene transkribiert, und die Aktivität konnte in allen Hefen nachgewiesen werden. Unter Glucose-Einfluss wird die gebildete AOX über den Peroxisomenabbau entfernt. Ohne Methanol findet auch keine weitere Transkription der *Aox*-Gene statt, da Glucose als Repressor fungiert [247]. Auch bei Wachstum mit Glycerol oder Ethanol wird die AOX nicht benötigt [200]. Nach dem Wechsel von Methanol- zu Glucose-Medium zeigten die Hefen, welche kein  $\beta$ -ErgGlc mehr synthetisieren konnten (KO-Mutante sowie UGT51B1-MutB und UGT51B1-MutC) noch AOX-Aktivität im Gegensatz zu Hefen, die in der Lage waren,  $\beta$ -ErgGlc zu synthetisieren.

Die AOX-Aktivität sollte auch mittels Immunoblot-Analysen, in denen ein Anti-AOX-Antiserum verwandt wurde, untersucht werden. Dabei führten die verschiedenen Versuchsansätze zu verschiedenen Resultaten. Deswegen wurden diese Resultate nicht zur Interpretation herangezogen, da eine Zuverlässigkeit der Ergebnisse bisher noch nicht gewährleistet werden konnte.

Die Präsenz großer, proliferierter Peroxisomen konnte auch direkt nachgewiesen werden, indem die Zellen transmissionselektronenmikroskopisch untersucht wurden. Yount *et al.* beschrieben, dass es aufwendig ist, *P. pastoris*-Zellen für die TEM zu präparieren, da die Zellwand sehr dicht und robust ist [432]. Daher ist es schwieriger die Zellen zu fixieren. Die Fixierung stellt allerdings einen für die Erhaltung der Ultrastruktur notwendigen Schritt dar. Mit Hilfe von Elke Woelken (Univ. Hamburg) konnte eine Präparationsmethode für den *P. pastoris*-WT-Stamm PPY12 und für eine UGT51B1-defiziente KO-Mutante entwickelt werden (Abb.2.13, S.80). Es konnte ein funktionales Protokoll entwickelt werden, welches aufgrund der von Yount *et al.* beschriebenen Tipps in Zukunft noch etwas optimiert werden könnte [432]. Die TEM-Analysen dieser Arbeit konnten belegen, dass Peroxisomen nach Kultivierung in Vollmedium nicht nachgewiesen werden konnten. Wriessnegger *et al.* konnten nur sehr wenige, kleine Peroxisomen in den Ultradünnschnitten detektieren [416]. Eine gewisse "Grundausstattung" mit Peroxisomen wird u. a. für die Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffspezies, die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren und den Glyoxylatzyklus benötigt [374, 345, 307]. Nach Methanol-Induktion konnte schließlich eine Akkumulation großer Peroxisomen detektiert wer-

### 3 Diskussion

den und des Weiteren die Zunahme der Peroxisomengröße korrelierend zur Induktionsdauer nachgewiesen werden [251, 252]. Aufgrund der "immensen" Größe der Peroxisomen konnten kristalline Aggregate in den Peroxisomen visualisiert werden, welche auf eine hohe Konzentration der peroxisomalen Katalase zurückzuführen sein könnten. Dieses Enzym detoxifiziert das Nebenprodukt der Methanol-Oxidation, das Wasserstoffperoxid [307]. Aber auch AOX kann kristalline Aggregate bilden, welche nicht von hydrolytischen Enzymen der Vakuole abgebaut werden können. Dadurch kann sich der Abbauprozess evt. zeitlich verzögern [261]. Im Gegensatz zur Beschreibung in der Literatur (u.a. [262]) konnten die Peroxisomen schon vor dem Einleiten des Mikropexophagie-Prozesses "geclustert" nahe der Vakuole wahrgenommen werden (Abb.2.13 nach 9 h MeOH). Aufgrund der räumlichen Einschränkung ist dies nicht weiter verwunderlich, da die Akkumulation großer Peroxisomen auch zu einem hohen "Raumbedarf" dieser Organellen führt.

Der Mikropexophagie-Prozess konnte nach einem Wechsel zu Glucose in der WT-Hefe beobachtet werden. Dieser resultierte in einem Abbau der überschüssigen, großen Peroxisomen, welche für den Katabolismus von Glucose nicht benötigt werden. Nach sechs Stunden Adaption an Glucose ließ sich die Aufnahme der Peroxisomen in die Vakuole beobachten, in welcher sie abgebaut wurden. In der KO-Mutante  $\Delta ugt51b1$  konnten sowohl mit Methanol als auch mit Glucose als Kohlenstoffquelle Peroxisomen detektiert werden. Der Abbauprozess konnte, wie von Sakai *et al.* beschrieben, nachgewiesen werden, dauerte aber im vorliegenden Fall länger (6 h anstatt 2-3 h) [298]. Um eine endgültige Aussage über die Peroxisomendegradationsfähigkeit treffen zu können, müssen noch die anderen transgenen Hefen mit den UGT51B1-Varianten transmissionselektronenmikroskopisch untersucht werden. Diese aufwendigen Präparationen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Die Beobachtung des Zellwachstums unter mikropexophagischen Konditionen zeigte, dass alle Hefezellen vital waren und die Zelldichte nach einem Wechsel zu Glucose als Kohlenstoffquelle stetig zunahm. Etwas geringere Wachstumsraten zeigten die UGT51B1-MutB- und UGT51B1-MutC-synthetisierenden Hefen (Abb.2.14, S.81). Die  $\beta$ -ErgGlc-Synthese konnte nach einem Wechsel in Glucose-Medium in Lipidextrakten des WTs und des Komplementierers FL nachgewiesen werden. Unerwarteterweise blieb die SG-Synthese der Hefe mit der enzymatisch-aktiven UGT51B1-Variante MutA (vgl. Abb.2.2, S.50) unter der Nachweisgrenze, wohingegen der WT-Stamm ein unerwartet gute SG-Synthese zeigte. Anzumerken ist jedoch, dass eine unter der Nachweisgrenze liegende SG-Synthese im Rohextrakt trotzdem das Ausführen der Peroxisomendegradation erlaubt. Für diesen spezifischen Prozess wird sehr wahrscheinlich nur eine geringe Menge von  $\beta$ -ErgGlc benötigt. Der in dieser Arbeit verwendete Hefe-Stamm PPY12 synthetisiert *in vivo* i.d.R. wenig SG.

Die Funktionsanalyse hinsichtlich der Peroxisomendegradation lieferte noch keine verlässlichen Ergebnisse. Dennoch zeigten die Lokalisierungsstudien und die *in-situ*-AOX-Aktivitätsfärbungen eine Korrelation der  $\beta$ -ErgGlc-Synthesefähigkeit mit der Bildung eines funktionalen MIPA-Systems sowie dem Abbau der Peroxisomen. Diese Korrelation sollte jedoch noch durch Immunoblot-Analysen, den fehlenden TEM-Analysen und parallel durchgeführten Analysen der  $\beta$ -ErgGlc-Synthese unterstützt werden.

### 3.1.3 Einordnung der mit den UGT51B1-Varianten erhobenen Resultate in den Mikropexophagie-Prozess

In diesem Abschnitt werden alle Ergebnisse, die im Rahmen der Analyse der UGT51B1 und deren katalytischer Funktion bezüglich der Mikropexophagie erhoben wurden, zusammenfassend dargestellt (Tab.3.1). Im Anschluss werden die ermittelten Daten kritisch in bisher bekannte Prozesse der Mikropexophagie bzw. Autophagie eingeordnet.

Tabelle 3.1: Mikropexophagie in Hefen, die UGT51B1-Varianten exprimierten.

Aspekte	WT	KO	FL	MutA	MutB	MutC
$\beta$ -ErgGlc-Synthese ( <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> )	+	-	+	+	-	-
Biosynthese von UGT51B1 ("anti-GFP")			+	+	+	+
UGT51B1-Lokalisierung (fluoreszenzmikrosk.)			<i>cup</i>	<i>cup</i>	<i>dot</i>	<i>dot</i>
Mikropexophagie ( <i>in situ</i> )	+	-	+	+	-	-
Peroxisomenpräsenz (TEM)	+	-				

Eine leere Position bedeutet, dass eine Analyse aus methodischen oder zeitlichen Gründen nicht durchgeführt wurde. *cup* und *dot* weisen auf die identifizierten Lokalisierungsmuster hin. Analysiert wurden verschiedene CFP-UGT51B1-Varianten: Die native UGT51B1-Variante FL und drei modifizierte UGT51B1-Varianten (UGT51B1-MutA-P1164L, -MutB-G1389R, -MutC-D1412A). Als Kontrollen fungierten der WT-Stamm PPY12 sowie die KO-Mutante PPY12 $\Delta$ *ugt51b1*.

Yamashita *et al.* lokalisierten UGT51B1 in einem Membrankompartiment, welches sie als MIPA-Vorläufer-Membran definierten [425, 424]. Studien von Oku *et al.* zeigten, dass eine UGT51B1 Deletionsmutante kein  $\beta$ -ErgGlc mehr synthetisierte, aber auch ihre Peroxisomen durch Mikropexophagie nicht mehr abbauen konnte [262]. Enzyme mit intakter katalytischer Domäne, aber deletierter PH-GRAM-Lokalisierungsdomäne konnten den Mikropexophagie-Prozess ebenfalls nicht durchführen. Auch eine Variante mit deletierter katalytischer Domäne, welche zwar an der MIPA-Vorläufermembran lokalisiert wurde, aber keine  $\beta$ -ErgGlc-Synthese aufzeigte, konnte den Degradationsdefekt nicht komplementieren. Im Vorfeld zu dieser Arbeit war folglich bekannt, dass für den Peroxisomenabbau eine funktionale  $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese und eine spezifische Lokalisierung des Enzyms UGT51B1 an der MIPA-Vorläufermembran vorliegen muss (s. Abb. 1.10, S.39). Eine Interaktion von anderen (unbekannten) Proteinen mit UGT51B1 konnte allerdings bisher nicht ausgeschlossen werden.

In den beschriebenen Arbeiten wurde jedoch nie mit dem vollständigen UGT51B1-Protein gearbeitet. Deswegen wurde in dieser Arbeit UGT51B1 durch gezielte Mutagenese (SDM) in seiner katalytischen Domäne modifiziert, so dass die katalytische Aktivität beeinträchtigt vorlag, um die Bedeutung der Rolle des Enzyms bzw. seines Enzymproduktes ( $\beta$ -ErgGlc) zu untersuchen. Basierend auf den Ergebnissen, die im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden, konnte die These, dass die Enzymaktivität bedeutend für den Degradationsprozess der Peroxisomen ist, gestützt werden. Es kann Folgendes festgehalten werden:

*Die Ergosteryl- $\beta$ -Glucoside werden für die Reifung der MIPA-Vorläufermembran zum funktionalen MIPA benötigt.*

UGT51B1-MutB- oder UGT51B1-MutC-synthetisierende Hefen zeigten die Lokalisierung des Proteins in Form einer punktförmigen Struktur, welche die MIPA-Vorläufermembran repräsentiert.

### 3 Diskussion

Der Verlust der  $\beta$ -ErgGlc-Synthesefähigkeit scheint die Bildung eines funktionalen MIPA nicht zu fördern. Hefen, die die UGT51B1-Varianten MutA und FL synthetisierten, zeigten wiederum eine intakte  $\beta$ -ErgGlc-Biosynthese und die Ausbildung eines funktionalen MIPA-Membransystems in Form einer *cup-like-structure*. Im nächsten Absatz soll nun etwas näher auf den Mikropexophagie-Prozess im Allgemeinen eingegangen und die Funktion von UGT51B1 diskutiert werden. Es sollte beachtet werden, dass viele Aspekte aus Studien zur Untersuchung der Makroautophagie von Säugern oder *S. cerevisiae* resultieren und bezüglich der Mikropexophagie noch nicht untersucht wurden.

In einem ersten Schritt muss die methylo-trophe Hefe *P. pastoris* über (einen) Rezeptor(en) perzipieren, dass ein Wechsel der Kohlenstoffquelle stattgefunden hat und nun Glucose zur Verfügung steht. Die Perzeption eines Glucose-Signals und dessen signaltransduktorische Weiterleitung über einen G-Protein-gekoppeltes Rezeptorsystem bzw. ein bisher schwer erfassbares Glucose-Phosphorylierungs-abhängiges System ist in *S. cerevisiae* schon untersucht worden [439, 292]. Über diesen signaltransduktorischen Prozess und auch die Regulation des Abbauprozesses der Peroxisomen ist in *P. pastoris* noch wenig bekannt [237, 254, 255]. In Säugern ist die Induktion der Autophagie schon detaillierter beschrieben worden und in *S. cerevisiae* der (Macro-)Autophagie-Prozess [161, 233, 81, 248, 220]. In diesen Säugern und *S. cerevisiae* wird die Autophagie im Allgemeinen durch einen Mangel an Nährstoffen induziert. Dieses Mangelsignal wird über den mTOR (*target of rapamycin*)-Pathway transduziert. Liegen genügend Nährstoffe vor, wird eine Phosphatidylinositol-3-Kinase (Säuger: Class I PI3K; *S. cerevisiae*: VPS34, Class III PI3K) aktiviert, welche in Säugern über den AKT-Pathway (*S. cerevisiae*: cAMP-abhängige Proteinkinase PKA) mTOR aktiviert. mTOR wiederum inhibiert daraufhin ATG1, das Schlüsselprotein der Autophagie-Induktion. Die Aktivität der Kinase selbst wird durch eine PI(3)P-Phosphatase reguliert [382]. PI(3)P ist notwendig, um den Autophagie-Prozess zu initiieren und um aus verschiedenen ATG-Proteinen den PAS oder die sogenannte *isolation membrane* zu formen [425, 382]. Inwiefern PI(3)P an der Initiation und der Autophagosom-Biogenese beteiligt ist, ist noch nicht bekannt [382].

Wird also ein Nährstoffmangel detektiert, wird mTOR inaktiviert und die Autophagie induziert. Der TOR-Komplex konnte ebenfalls in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden [259]. TOR ist ein Phosphatidylinositolkinase-Homolog [259, 305]. Die Beteiligung von TOR am Mikropexophagie-Prozess in *P. pastoris* wurde noch nicht untersucht [83, 237].

Alle Autophagieformen haben, wie erwähnt, die Biogenese eines PAS gemein. Im Mikropexophagie-Prozess wird diese schon beschriebene Membran MIPA genannt. Dieses Membransystem wurde bisher weder in Säugern noch in Hefen charakterisiert. Auch konnte der Ursprung und die Biogenese der zu PAS zugeordneten Strukturen sowohl für selektive als auch für nicht-selektive Autophagie bisher nicht aufgeklärt werden. Es wird die Synthese aus einem schon existierenden Organell (ER, Golgi-Komplex, Plasmamembran) sowie die *de novo* Formation diskutiert [324]. Bisher konnte auch nur ein einziges Membranprotein (ATG9) im PAS detektiert werden, dem eine Beteiligung an der Autophagosom-Formation zugewiesen wird [421]. ATG9 wird während der Elongation und Reifung der Membranen über einen Rückgewinnungsmechanismus wieder entfernt [124, 191, 429, 428]. Die Gruppe um Fulvio Reggiori postulierte, dass der PAS oder genauer ein Vorläufer aus ATG9-Reservoirs hervorgeht und somit das Autophagosom (Doppelmembranvesikel) *de novo* geformt wird



### 3 Diskussion

(Konferenzbeitrag [288]). Die vollständige Autophagosomformation aus dem PAS ist ebenso wie die Entstehung des PAS noch nicht aufgeklärt worden [289]. Farré *et al.* bezeichneten die “Quelle” von ATG9 in Hefe *kryptisch* als *peripheral compartment*, welches vermutlich irgendwo im ER in *P. pastoris* oder nahe der Mitochondrien in *S. cerevisiae* liegt [81].

Yamashita *et al.* untersuchten die Rolle u.a. von zwei PI4Ks (PIK4 und LSB6) in der Peroxisomen-degradation [425]. Bei diesen PI4Ks könnte es sich um Regulatoren des Mikropexophagie-Prozesses handeln. Die synthetisierten PIs rekrutieren UGT51B1 über die PH-GRAM-Domäne an einen cytosolischen Lipid-Protein-Nukleierungskomplex. Dort wird UGT51B1 für die Aktivierung der Elongation und Reifung der MIPA-Vorläufermembran benötigt. An der Nukleierung des Vesikels sind verschiedene ATG-Proteine beteiligt, z.B. ATG8-Phosphatidylethanolamin (ATG-PE) und ATG9. ATG26 (syn. UGT51B1) hingegen ist nur am Reifungsprozess beteiligt und nicht an der Membrannukleierung (exemplarisch: [83, 425, 220]). Interessanterweise wurde dem nicht-PE-verknüpften ATG8 eine Mikropexophagie-blockierende Wirkung zugewiesen. D.h. die Induktion des Abbaus wird blockiert, so lange Methanol als Kohlenstoffquelle vorliegt [83]. Nach Reifung/Formation des funktionalen MIPAs bildet auch die Vakuolenmembran Ausstülpungen (*vacuolar sequestering membrane*, VSM), gesteuert durch ATG18 sowie PI(3)P und PI(3,5)P<sub>2</sub> (Konferenzbeitrag [297]; [81]), und umhüllt das Peroxisomen-Cluster (u.a. [262, 299]).

Das resultierende, in die Vakuole aufgenommene Vesikel wird anschließend lysiert. Erstaunlicherweise geschieht dies, obwohl die Vesikelmembran aus der Vakuolenmembran hervorgegangen ist, welche selbst nicht von den hydrolytischen, vakuolären Enzymen angegriffen wird. Würde diese Membran lysiert werden, wäre dies letal für die Zelle, da die Integrität der Vakuole ebenfalls zerstört würde. Dies lässt folgende Hypothese formulieren: Die Vesikelmembran muss sich in irgendeiner Form von der ausgehenden Vakuolenmembran unterscheiden. Doch in welcher Form eine Modifikation erfolgt, ist bisher noch nicht bekannt.

Es könnte eine laterale Separation von Lipiden und/oder auch Proteinen während der Ausbildung der Vakuolenmembranausstülpungen erfolgen. Nach homotypischer Fusion der Ausstülpungen der Vakuolenmembran [240, 299] kann die entstandene Membran somit modifiziert vorliegen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass nach der homotypischen Fusion neue Lipide und/oder Proteine importiert werden, die die Membraneigenschaften verändern. Die dritte Möglichkeit besteht darin, dass neue Lipide und/oder Proteine während der heterotypischen Fusion der Ausstülpungen der Vakuolenmembran mit dem MIPA-Membransystem [299] eingeführt werden und die Vesikelmembran danach ebenfalls verändert vorliegt. Die Einführung neuer Lipide und/oder Proteine könnte die Lyse durch die hydrolytischen Enzyme unterstützen. Auch ein bisher vollkommen unbekannter Mechanismus kann nicht ausgeschlossen werden [106]. Über eine Beteiligung von UGT51B1 an der Sensitivität der Vesikelmembran für die Lyse lässt sich nur spekulieren, da dieses Enzym die Sterole in der MIPA-Vorläufermembran glucosyliert und dadurch deren Membraneigenschaften verändert. Unbekannte Proteine könnten womöglich durch Anlagerung und/oder Integration eine Sensitivität der Vesikelmembran gegenüber den vakuolären Hydrolasen hervorrufen. Deswegen wäre es auf jeden Fall nützlich zu wissen, aus welchen Lipiden und Proteinen sich das Vesikel zusammensetzt. Wie schon erwähnt, sollte es sich von der Vakuolenmembran unterscheiden. Das bedeutet, dass sich zu

einem bestimmten Zeitpunkt die beiden Vesikelmembranseiten differenzieren müssen. D. Klionsky beschrieb, dass in Hefe an der Nukleierung und der Elongation des PAS und MIPA-Membransystems beteiligtes ATG8-PE anfangs auf beiden Membranseiten des Vesikels zu finden ist [166]. Im weiteren Verlauf verbleibt dieses nur auf der Vesikelinnenseite und wird von der Außenseite entfernt, während SNARE-Proteine ausschließlich auf der Außenseite verbleiben. SNARE-Proteine sind an der Fusion von biologischen Membranen beteiligt, wie auch an der heterotypischen Fusion von MIPA und den Ausstülpungen der Vakuolenmembran [220].

Die Beteiligung von ATG-Proteinen an der Lyse des Vesikels innerhalb der Vakuole ist hingegen bekannt. Daten dazu lieferten u.a. Eppler *et al.* [77]. Sie beschrieben, dass im letzten Schritt der Makroautophagie das Autophagosom in der Vakuole durch die Aktivität des *Lipase-like* ATG15 und vakuolären Proteinasen (A und B, [220]) lysiert wird. Bei ATG15 handelt es sich um eine putative Lipase, welche eine Rolle im Abbau intravakuolärer Vesikel inne haben soll (entnommen aus: *Description-of-autophagy-related-genes*<sup>1</sup>). Eine *Atg15*-Deletionsmutante versagte jedenfalls bei der Degradation von in die Vakuole aufgenommenen Peroxisomen. ATG15 weist ein Lipase (oder Esterase) *active site motif* auf, welches durch SDM des Serins im aktiven Zentrum in seiner Aktivität gestört werden konnte. Nach D. Klionsky bleibt das Substrat dieser Lipase jedoch unklar und zudem ist nicht bekannt, wo genau am Vesikel das Enzym angreifen würde [166].

Bei der Mikropexophagie handelt es sich, wie bei allen anderen Autophagie-Prozessen, um einen sehr komplexen, intrazellären Vorgang, an dem mehrere ATG-Proteine in verschiedenen Stadien beteiligt sind [81]. Dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Protein UGT51B1 (ATG26) konnten zusammenfassend folgende Funktionen im Mikropexophagie-Prozess zugewiesen werden:

- UGT51B1 ist nur essentiell für die Degradation mittlerer bis großer, Methanol-induzierter Peroxisomen in *P. pastoris* [251, 253, 252].
- Die UGT51B1-Aktivität muss an einer spezifischen Membran erfolgen, um den Mikropexophagie-Prozess durchführen zu können [262, 425].
- Durch  $\beta$ -ErgGlc wird die MIPA-Vorläufermembran zum funktionalen MIPA-Membransystem ausgebildet (diese Arbeit). D.h.  $\beta$ -ErgGlc ist nach ersten Indizien für den Abbau von Peroxisomen essentiell.
- Eventuell ist  $\beta$ -ErgGlc an Membranveränderungen beteiligt, welche die Peroxisomen-umhüllende Membran sensitiv für hydrolytische, vakuoläre Enzyme macht.

## 3.2 Bb0572p, Bh0572p und drei FgUgts wurden als SGTs identifiziert

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mittels *Glycolipid-Engineering*-Methode Hefetransformanten erzeugt werden, welche strukturelle SG-Varianten anstelle des nativen  $\beta$ -ErgGlc synthetisieren konnten. Einige SGT-Gene waren jedoch zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt und mussten erst

<sup>1</sup><http://www.mcdb.lsa.umich.edu/labs/klionsky/GeneOverlap.pdf>

identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es schließlich, eine  $\beta$ -SGalT aus *B. burgdorferi* als auch eine  $\beta$ -SGlcT aus *B. hermsii* zu identifizieren und zur Identifizierung von drei  $\beta$ -SGlcT-Genen aus *F. graminearum* (Ergebnisse von *F. graminearum* nicht dargestellt) beizutragen.

### 3.2.1 Bb0572p codiert für eine $\beta$ -SGalT

2003 konnten Schröder *et al.* sowie Ben-Menachem *et al.* und 1999 auch Hossain *et al.* schon nachweisen, dass *B. burgdorferi*  $\beta$ -CholGal erzeugt [138, 20, 309]. Das die Reaktion von Cholesterol und UDP-Galactose katalysierende Enzym war zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, das für die  $\beta$ -CholGalT-codierende Gen *Bb0572* zu identifizieren.

Zu Beginn standen vier Kandidatensequenzen aus dem Genom von *B. burgdorferi* zur Verfügung, welche in der CAZy-Datenbank<sup>2</sup> durch Sequenzabgleiche zu vier GT-Familien zugeteilt wurden [45, 56]. Drei der Kandidatensequenzen konnten dem *inverting*-Katalysemechanismus zugewiesen werden und nur Bb0454 dem *retaining*-Katalysemechanismus. Die Auswahl der Kandidaten Bb0454, Bb0572, Bb0767 und Bb0732 soll nun etwas näher beschrieben werden. Aufgrund bekannter Aktivitäten wurden diesen Sequenzen putative Funktionen zugewiesen.

Bei Bb0454 handelte es sich um ein putatives LPS-Biosynthese bezogenes Protein der Familie GT4, und Bb0454 weist als einziger Kandidat eine Zuordnung zum *retaining*-Katalysemechanismus auf [87]. Eine in CAZy angegebene bekannte Aktivität dieser GT-Familie ist die sogenannte Digalactosyldiacylglycerol-Synthase-Aktivität (EC 2.4.1.46). Diese konnte 2007 bestätigt werden, als Östberg *et al.* Bb0454 als Monogalactosyl-1,2-Diacylglycerol-Synthase (MGDG-Synthase) identifizierten [333]. Das Enzym katalysiert die Reaktion von UDP-Galactose und 1,2-Diacyl-*sn*-glycerol zu UDP-3- $\beta$ -D-Galactosyl-1,2-diacyl-*sn*-glycerol. Dieses Glycolipid kann zu einer Cytokinin-vermittelten Immunantwort führen [164].

Während die Funktion von Bb0454 experimentell nachgewiesen wurde, sind die im Weiteren beschriebenen Funktionen der anderen Kandidaten hypothetisch und basieren auf Vorhersagen der CAZy-Datenbank, welche auf Sequenzähnlichkeiten mit Genen bekannter Funktion beruhen.

Ein weiterer Kandidat war Bb0572 aus der Familie GT2, dem als einzigem Kandidaten direkt eine putative GT-Aktivität zugewiesen wurde. Diese als LgtD klassifizierte Transferase gehört in *Neisseria gonorrhoeae* zum *lgtABCDE*-Gencluster und ist in die LOS-Biosynthese involviert [104]. Auch in *Haemophilus influenzae* konnte LgtD im Rahmen der Aufklärung der LPS-Biosynthese identifiziert werden [318]. Die Identität der AS-Sequenz von Bb0572p und LgtDp aus *H. influenzae* sowie der LgtDp aus *N. gonorrhoeae* ist mit 37% bzw. 32% jedoch sehr gering (*BLASTp2Seq*, NCBI). LgtDp konnte in *H. influenzae* als  $\beta$ -1,3-N-Acetylgalactosamintransferase (E.C.2.4.1.79) identifiziert werden, welche N-Acetylgalactosamin mit dem terminalen Globotriose-Motiv (Gal $\alpha$ -4Gal- $\beta$ -4Glc) des charakteristischen *H. influenzae*-LPS verknüpft. Das Protein zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu bakteriellen GTs, welche in die LPS-Biosynthese involviert sind [296]. Mit weniger Effizienz kann dieses Enzym aber auch UDP-Galactose und UDP-N-Glucosamin umsetzen [356], und vielleicht könnte das Protein auch eine Funktion als UDP-Galactose:Sterol-Galactosyltransferase erfüllen, da in *B. burgdorferi* kein LPS vorliegt? Die schon erwähnten LOS (oder die LPS-*like*-Fraktion) konnten anstelle

<sup>2</sup><http://www.cazy.org/b41.html>

### 3 Diskussion

des LPS in *B. burgdorferi* nachgewiesen werden [52]. LOS treten zumeist bei der rauhen-Form von gram-negativen Bakterien auf. Diese R-Formen synthetisieren inkomplette LPS mit mangelhafter bzw. fehlendem O-Antigen oder defektem Kernsaccharid [52, 138, 137]. Cinco *et al.* bezeichneten die von ihnen identifizierte Form als LOS [52], aber heutzutage wird diese Fraktion als LPS-like-Fraktion bezeichnet, bei der es sich um die Lipidfraktion aus *B. burgdorferi* mit den beiden antigenen, Oberflächen-exponierten Galactolipiden  $\beta$ -CholAGal und Diacylglycerol- $\alpha$ -Monogalactosid handelt [137, 20, 309].

Der dritte Kandidat Bb0767 wurde der GT28-Familie zugeordnet, und es wurde ihm eine putative MurG-Transferase( $\alpha$ -1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase)<sup>3</sup>-Aktivität zugewiesen. Dieses Enzym ist neben zwei Carrier-Molekülen, dem Trägermolekül Uridinphosphat und dem Lipidcarrier Bactoprenol (Undecaprenolphosphat), an der Peptidoglycan(Murein)-Biosynthese beteiligt [215]. Der Lipidcarrier ist über eine Phosphodiesterbindung an N-Acetylmuraminsäure gebunden, an die wiederum ein Pentapeptid gekoppelt ist (Undecaprenyl-pyrophosphoryl-Mur-NAc-pentapeptid, Lipid I). Die hier vorgestellte MurG-Transferase fügt den zweiten Aminosucker, das N-Acetylglucosamin, an, und es entsteht Lipid II [33]. Danach wird zur Quervernetzung über eine Gruppe von AS bei gram-positiven Bakterien eine Pentaglycinbrücke ausgebildet, und bei gram-negativen wird die Amino-Gruppe von *meso*-Diaminopimelinsäure (mDAP) mit der Carboxygruppe des terminalen D-Alanins verknüpft. Der Lipidcarrier wird benötigt, um das Disaccharid-Pentapeptid (Lipid II) aus dem Cytoplasma durch die Cytoplasmamembran zu leiten, da es den Zuckerzwischenprodukten ausreichend hydrophobe Eigenschaften verleiht, um sie über die Membran zu translozieren und den Komplex in das Glycanrückgrat einsetzen zu können. An der Membranaußenseite katalysieren spezielle GTs (Murein-Synthasen) die Verknüpfung der Lipid II-Moleküle [226]. MurG konnte bereits in *E. coli* identifiziert und kristallisiert werden [229, 111, 110, 143]. Im Gegensatz zu LPS konnte Murein im *B. burgdorferi* nachgewiesen werden [16]. Anstatt der mDAP wurde in *Borrelia*-Murein allerdings Ornithin nachgewiesen [427].

Auch der vierte Kandidat Bb0732, welcher zur GT51-Familie zugeordnet wurde, spielt eine putative Rolle in der Peptidoglycan-Synthese, genauer in der Quervernetzung der Glycanstränge über die Peptidreste, bei der ein D-Alanin aus der Aminogruppe durch eine neue Peptidbindung mit mDAP ersetzt wird. Diese Transpeptidierung wird von speziellen Murein-Synthasen, den Transpeptidasen, katalysiert. Penicillin kann diese Vernetzung unterbinden, da es dem D-Ala-D-Ala-Rest strukturell ähnlich ist und die Transpeptidasen kovalent an das Penicillin binden können [215, 226]. Aufgrund dessen werden Transpeptidasen auch als Penicillin-bindende Proteine (PBPs) bezeichnet. Bb0732 wird eine putative PBP-3-Funktion zugewiesen. Ebenso ergab die Analyse der Proteinsequenz, die Präsenz einer Penicillin-resistenten Transglycosidase-Domäne am Aminoterminus, welche in die Verknüpfung von linearen Glycanketten involviert ist. Am Carboxyterminus konnte eine Penicillin-sensitive Transpeptidase-Domäne identifiziert werden (PFAM<sup>4</sup>-Resultat). Weiteres Charakteristikum für PBPs ist ein konserviertes Serin im aktiven Zentrum [101, 303, 437].

Nachdem Östberg *et al.* Bb0454 als MGDG-Synthase identifizierten, stellten sie Bb0572 als aussichtsreichsten Kandidaten für eine UDP-Galactose-abhängige Galactosyltransferase dar [333]. Die

---

<sup>3</sup>N-Acetylmuramyl-(pentapeptid)-pyrophosphorylundecaprenol-N-Acetylglucosamintransferase-Aktivität

<sup>4</sup><http://pfam.sanger.ac.uk/>

### 3 Diskussion

annotierten Sequenzen Bb0767 und Bb0732 wiesen neben CAZy auch nach TIGR<sup>5</sup> eine Homologie zu den in Prokaryoten konserviert vorliegenden Peptidoglycan-Biosynthese Proteinen, PBP und MurG, auf.

Die Kandidaten Bb0572, Bb0767 und Bb0732 sollten im Rahmen dieser Arbeit sowohl in *E. coli* als auch in *P. pastoris* heterolog exprimiert werden. *E. coli* ist eines der ersten Expressionssysteme, welches zur heterologen Expression von prokaryotischen als auch eukaryotischen Proteinen zur Verfügung stand [135, 107]. Der Organismus ist für die *in vitro*-Enzymassays zur Bestimmung der SGT-Aktivität sehr gut geeignet, da er selbst nicht über endogene Sterole verfügt und zudem konnte anhand von  $\beta$ -SGlcTs aus Pflanzen und Pilzen gezeigt werden, dass die Proteine keine eukaryotischen, posttranslationalen Modifikationen benötigen [397, 393]. Jedoch kann die Expression von Fremdproteinen auch Schwierigkeiten aufwerfen, wenn die überexprimierten Proteine in *E. coli* nicht löslich vorliegen. Dann akkumulieren die Proteine in sog. *Inclusion bodies* (Einschlusskörperchen), welche die Zellen auch vor toxischen Effekten schützen [232, 230]. Die Expression der  $\alpha$ -SGlcT (Hp0421p) aus *H. pylori* führte in *E. coli* zur Akkumulation der rekombinanten Proteine in diesen Einschlusskörpern [362]. Da SGTs im Allgemeinen membrangebundenes Sterol umsetzen, müssen die Proteine/Enzyme entweder ebenfalls mit der Membran verbunden oder zumindest während der Umsetzung der Substrate mit dieser assoziiert sein [106]. Oku *et al.* zeigten, dass die  $\beta$ -SGlcT UGT51B1 nach einem Wechsel der Kohlenstoffquelle von Methanol zu Glucose transient an ein intrazelluläres Membransystem bindet und dort Sterol und UDP-Glucose zu  $\beta$ -SGlc umsetzt [262]. Aufgrund der implizierten Membranassoziation wurde der *E. coli*-Stamm C41(DE3) verwendet, der die Expression von Membranproteinen toleriert (Näheres s. 4.2, S.118). Der pGEM-T-Expressionsvektor mit inserierter Bb0732-Sequenz konnte aufgrund des zugrundeliegenden, IPTG-induzierbaren T7 RNA-Polymerase-Promotors ebenso wie die pET-Expressionskonstrukte von Bb0572 und Bb0767 in *E. coli* C41(DE3) exprimiert werden (siehe Manual von Promega<sup>6</sup>). Das pET-System bietet jedoch den Vorteil, das rekombinante Protein nach erfolgreicher Expression mittels eines *Tags* aufzureinigen zu können (siehe Merck-(Novagen)-Homepage, pET-*Vectors*<sup>7</sup>). Doch obwohl das *E. coli*-System als sehr zuverlässig gilt, konnten die Borrelien-Gene nicht erfolgreich exprimiert werden. Ein radioaktiver Enzymassay zeigte, auch nach Zugabe von Triton X-100 zur Solubilisierung der (Membran-)Proteine und für eine bessere Löslichkeit des hydrophoben Substrates Cholesterol, keine Aktivitäten (Daten nicht gezeigt). Es wurde daraufhin postuliert, dass eventuell die Genexpression fehlschlug und keine Proteine synthetisiert werden konnten. Aufgrund des im pET-System vorliegenden His<sub>6</sub>-*Tags* konnten die Proteinhomogenate aus *Bb0572*- und *Bb0767*-exprimierenden Hefezellen mittels Immunoblot-Analyse untersucht werden. Der Nachweis der Proteine blieb jedoch aus (Daten nicht gezeigt). Nun konnte es auch der Fall gewesen sein, dass die Proteine in Einschlusskörpern akkumulieren und diese für eine Immunoblot-Analyse präpariert werden müssten oder dass die Expression in *E. coli* sehr schwach ist und es notwendig wäre, das Protein über das verfügbare *Tag* erst anzureichern. Letztere Erklärung wäre plausibler, da es Östberg *et al.* schafften, Bb0454p-Aktivität in *E. coli* nachzuweisen, wenn auch nur auf einem geringem Level [333] und eine Akkumulation in

<sup>5</sup><http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?database=gbb>

<sup>6</sup><http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>

<sup>7</sup>Novagen, Merck Chemicals: <http://www.merck-chemicals.de/life-science-research/>; *technical bulletins*

### 3 Diskussion

Einschlusskörpern vorwiegend bei hoher Expression vorliegt (siehe Hp0421p).

Neben dem *E. coli*-System wurde die Hefe *P. pastoris* verwendet, die erstmals von J. M. Cregg als Expressionssystem beschrieben wurde [58]. *P. pastoris* weist sehr hohe Expressionsraten heterologer Proteine auf, welche durch die Verwendung des *Aox1*-Promotors kontrolliert werden. Zudem kann die Hefe leicht genetisch manipuliert und in großen Mengen kultiviert werden. Auch vermag sie die rekombinanten Proteine intrazellulär zu akkumulieren als auch ins Medium zu sekretieren und ist im Gegensatz zu *E. coli* in der Lage, posttranslationale Modifikationen (proteolytische Prozessierung von Signalsequenzen, Faltung, Ausbildung von Disulfidbrücken sowie *O*- und *N-linked* Glycosylierung) auszuführen [128, 200, 59, 199, 61, 212]. Für die Identifizierung von SGT-Aktivität ist allerdings zu beachten, dass der Hefe-WT selbst  $\beta$ -ErgGlc synthetisiert. Deswegen ist es möglich, die Aktivität heterologer SGT-Proteine auch *in vivo* zu überprüfen, da *P. pastoris* die notwendigen Substrate, Sterol und UDP-Zucker, zur Verfügung stellt [300]. Die Expression der heterologen Borrelien-Kandidatengene musste aufgrund der *Pichia*-eigenen Biosynthese des strukturell sehr ähnlichen  $\beta$ -ErgGlc in einer  $\beta$ -ErgGlcT-defizienten KO-Mutante ( $\Delta$ *ugt51b1*) erfolgen [234]. In diesen KO-Stamm wurden die drei Kandidatensequenzen von Bb0572, Bb0767 und Bb0732 unter Kontrolle eines Methanol-induzierbaren oder konstitutiven Promotors inseriert. Aber auch die Expression im Hefesystem führte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu keiner  $\beta$ -SGal-Synthese (Abb.2.7, S.62). Aufgrund eines fehlenden *Tags* war es im Falle von *P. pastoris* nicht möglich, das Protein nachzuweisen. So bestand auch in diesem Fall die Möglichkeit, dass wenig Protein synthetisiert wurde und somit die Enzymaktivität nicht detektierbar war. Dem fehlenden Nachweis einer Enzymaktivität können generell viele Ursachen zugrunde gelegt werden: Eine, wie eben erwähnt, schwache Expression, fehlende oder fehlerhafte posttranslationale Modifikation (welche die Aktivität erfordern kann), eine falsche intrazelluläre Lokalisierung (d.h. nur am "richtigen Ort" findet Enzymaktivität statt), oder das Protein ist Teil eines Komplexes und der Komplex liegt unvollständig vor oder das Enzym wird inaktiviert etc. [186].

Die Expression in *E. coli* und *P. pastoris* konnte aber auch durch den hohen AT-Gehalt der Borrelien-Gene beeinträchtigt werden, wodurch nur eine geringe Menge von Protein synthetisiert werden konnte. Der Gehalt an Adenin(A) und Thymin(T) der Kandidaten-Nukleotidsequenzen ist mit 70-75% sehr hoch. Dies ist typisch für die DNA von *B. burgdorferi* und der Gattung *Borrelia* im Allgemeinen [12, 87]. Die Tatsache, dass die *codon usage* von verschiedenen Organismen unterschiedlich ist, kann folglich zu Problemen bei heterologer Expression führen [43, 109]. Wird ein Gen mit einer nicht dem Expressionsorganismus entsprechenden *codon usage* exprimiert, kann dies die Biosynthese (Translation) des Proteins beeinträchtigen. Eine Anpassung der *codon usage* an die der Wirtsorganismen *E. coli* und *P. pastoris* könnte zu einer besseren Effizienz führen [114, 142]. Dazu werden Triplets in der Nukleotidsequenz favorisiert, welche von dem Expressionsorganismus häufig genutzt werden. Die Nutzung dieser Triplets kann durch das Einführen stiller Mutationen erreicht werden, da somit die AS-Sequenz nicht verändert wird.

Nach Fraser *et al.* erbrachte die Analyse der *codon usage* in *B. burgdorferi*, dass alle 61 Triplets genutzt werden [87]. Die *codon usage* von *E. coli* kann Sharp *et al.* [319] und jene für *P. pastoris* De Schutter *et al.* [64] entnommen werden. Mittels des Codon-Adaptionsindex' (CAI) kann ermittelt werden, wie gut die Codons eines heterolog zu exprimierenden Gens der *codon usage* des Expres-

sionsorganismus entsprechen [320]. Optimal wäre ein CAI von 1,0, ab einem CAI  $> 0,9$  werden allerdings schon gute Expressionslevel erwartet. Durch Anpassung der *codon usage* kann RNA-Instabilität, Degradation oder eine zu geringe Translationseffizienz vermieden werden. Auch sollte ein sehr hoher ( $> 80\%$ ) und sehr niedriger ( $< 30\%$ ) GC-Gehalt vermieden werden. Ein angepasster GC-Gehalt soll die Lebenszeit und Integrität der *messenger* RNA (mRNA) in *P. pastoris* verlängern [263, 415]. Folgende Parameter wurden für die Synthese der synthetischen Gensequenzen von Bb0572 und Bb0767 für die Expression in *P. pastoris* geändert: Der CAI von Bb0572 betrug vor Optimierung 0,86 und danach 0,87, wobei der GC-Gehalt von 28% auf 43% gesteigert wurde. Der CAI von Bb0767 betrug zuvor 0,75, danach 0,86, und der GC-Gehalt konnte von 30% auf 43% erhöht werden. Das Einbringen einer Kozak-Sequenz sollte zudem die heterologe Expression in der Hefe unterstützen, da sie eine Rolle in der Initiation der Translation einnimmt [173]. Die Expression von PpartBb0572 und PpartBb0767 führte nach dreistündiger Induktion *in vivo* zu keiner  $\beta$ -ErgGlc-Detektion (nicht gezeigt). Der sensitivere, radioaktive Enzymassay zeigte  $\beta$ -CholGalT-Aktivität des Kandidaten Bb0572, wenn Galactose als Zuckerdonor zur Verfügung stand (nicht gezeigt). Glucose vermochte das durch Bb0572-codierte Enzym nicht umzusetzen. Für Bb0767 konnte keinerlei Aktivität verzeichnet werden und eine  $\beta$ -SGalT-Funktion wurde ausgeschlossen. *In vivo* führte erst eine Verlängerung der Induktionszeit um das Fünffache zur Detektion der Synthese von  $\beta$ -SGal in der PpartBb0572-exprimierenden Hefe (Abb.2.8A, S.65). Jedoch fiel die Biosynthese nur sehr gering aus. *In vitro* konnten eindeutigere Aktivitäten durch Umsetzung der Substrate zu  $\beta$ -CholGal detektiert werden. Auch hier wurde UDP-Galactose als Substrat favorisiert (Abb.2.8B). Der mit radioaktiv-markierter UDP-Galactose durchgeführte Enzymassay bestätigte die Präferenz für Galactose (Abb.2.8C). Auffällig war hingegen, dass die SGal-Biosynthese bzw. Aktivität der bakteriellen  $\beta$ -SGalT stets geringer ausfiel als jene der *P. pastoris* UGT51B1 und auch die SGT-Aktivität nach heterologer Expression des His<sub>6</sub>-markierten Gens stets ein wenig schlechter ausfiel. Proteinmarkierungen, wie z.B. die Polyhistidin (His<sub>6</sub>)-Markierung, sollten optimalerweise keinen bzw. nur einen minimalen Effekt auf die tertiäre Struktur eines Proteins ausüben, um die biologische Aktivität nicht zu beeinträchtigen [359]. Eine Interaktion des Affinitäts-*Tags* auf die Protein-Aktivität kann jedoch nie vollständig ausgeschlossen werden. Ein Transfer des *Tags* von Carboxy- zu Aminotermi-nus oder umgekehrt kann in einem solchen Fall eine Lösung sein. Da die Aktivitätsdifferenzen hier aber nur sehr gering ausfielen, wurde ein Versetzen des *Tags* nicht in Betracht gezogen.

Es konnte zu diesem Zeitpunkt festgestellt werden, dass Bb0572 für eine  $\beta$ -SGalT codieren könnte, aber die katalytische Funktion noch mittels Strukturanalyse des synthetisierten SGs bestätigt werden musste (s. 3.2.3, S.102).

### 3.2.2 Bh0572p codiert für eine $\beta$ -SGlcT

Nachdem das potentiell für eine  $\beta$ -SGalT-codierende Gen Bb0572 aus *B. burgdorferi* bekannt war, war es von weiterem Interesse, das für eine  $\beta$ -SGlcT-codierende Gen aus dem nahen Verwandten *B. hermsii* zu verifizieren.  $\beta$ -SGlc in *B. hermsii* konnte schon von Livermore und Johnson nachgewiesen werden [205]. *BLASTp*-Searches verwiesen auf Bh0572 als Kandidaten. Aufgrund der möglichen Expressionsschwierigkeiten wegen des hohen AT-Gehalts von 72% wurde für Bh0572 ebenfalls die Optimierung der *codon usage* und des GC-Gehaltes für die heterologe Expression in

*P. pastoris* in Betracht gezogen. Der CAI wurde somit von 0,8 auf 0,87 und der GC-Gehalt von 30% auf 43% erhöht. Im Vergleich zu den Resultaten von PpartBb0572p in Abb.2.8 (S.65) zeigte PpartBh0572p eine gute  $\beta$ -SGlc-Synthese *in vivo* entsprechend jener Akkumulation des  $\beta$ -SGlcs des WT-Stamms GS115 (Abb.2.9A, S.67). Aber auch bei der PpartBh0572-exprimierenden Hefe fiel die  $\beta$ -SGlc-Biosynthesefähigkeit des mit His<sub>6</sub>-Markierung-versehenen Proteins schwächer aus. Ein *in vitro*-Assay konnte die Spezifität des Enzyms für Glucose bestätigen, da UDP-Galactose als Substrat nicht umgesetzt wurde (Abb.2.9B). UGT51B1 konnte im vorliegenden Fall  $\beta$ -CholGlc synthetisieren, wenn UDP-Galactose verwandt wurde. Dies wurde möglich, da die UDP-Galactose mit Hilfe der GALE zu UDP-Glucose umgewandelt wurde und UGT51B1 diesen Zucker als Substrat verwenden konnte. Eine solche GALE-Aktivität wurde ebenfalls schon in Pflanzen beobachtet. Durch die Aktivität der pflanzlichen GALE konnte den pflanzlichen  $\beta$ -SGlcTs ebenfalls UDP-Glucose als Substrat zur Verfügung gestellt werden. UDP-Glucose wird als Zuckerdonor favorisiert, denn bei Verwendung anderer Zucker fielen die SG-Umsatzraten geringer aus [413, 278]. Bei UGT51B1 konnte ebenfalls nur eine geringe Verwendung von anderen Zuckerdonoren (Xylose) nachgewiesen werden [234]. Bei Bh0572p verhielt es sich wie für Bb0572p. Die potentielle  $\beta$ -SGlcT-Aktivität musste durch eine Analyse des synthetisierten SGs noch bestätigt werden. Die Identifizierung der Strukturen wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

### 3.2.3 Epidioxy-Verbindung der bakteriellen SGs: (k)ein Artefakt?

Nachdem die potentiell für eine  $\beta$ -SGalT bzw.  $\beta$ -SGlcT-codierenden Gene *Bb0572* und *Bh0572* identifiziert werden konnten, sollten die Enzymprodukte, welche bisher nur über den Abgleich der Rf-Werte mit denen von Lipidstandards einem Anomer und einem Zucker zugeordnet wurden, auch strukturanalytisch untersucht werden. Diese Strukturanalyse konnte die jeweilige katalytische Enzymfunktion durch Identifizierung der Struktur der Enzymprodukte bestätigen.

Für die massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Analyse wurde das in *P. pastoris* synthetisierte  $\beta$ -SGal bzw.  $\beta$ -SGlc isoliert und peracetyliert. Nach Maskierung der freien Hydroxygruppen (Peracetylierung) und dünnschichtchromatographischer Auftrennung resultierten zwei Lipidbanden, welche separiert voneinander strukturanalytisch untersucht wurden. Die Strukturen wurden wie folgt aufgeklärt: Für Bb0572 konnte eine Ergosteryl- $\beta$ -D-Galactopyranosid-Verbindung und ein Epidioxy-Derivat dieser Verbindung sowie für Bh0572 eine Ergosteryl- $\beta$ -D-Glucopyranosid-Verbindung und ebenfalls eine Epidioxy-Derivat identifiziert werden (Abb.2.10, S.70). Nach der Acetylierung war das Epidioxy-Ergosterylglycosid hydrophiler als das Ergosterylglycosid (mündliche Mitteilung von Wiebke Hellmeyer).

Ein Epidioxy-Derivat des Sterols kann durch eine Diels-Alder-Reaktion entstehen: Der Part des B-Ringes des Sterols mit der C5- und C7-Doppelbindung ist das konjugierte Dien und molekularer Sauerstoff das Dienophil. Die Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung ist jedoch nicht stabil und neigt zur homolytischen Spaltung unter Bildung reaktiver Radikale, weswegen diese Verbindungen in der Natur nur in geringen Mengen vorkommen. Bei den in dieser Arbeit identifizierten Epidioxy-Verbindungen könnte es sich um Artefakte handeln, welche durch Oxidation von SG unter Belichtung und in Gegenwart eines Photosensibilisators [2] während des Aufreinigungsverfahrens entstanden sein könnten. Da eine solche Epidioxy-Verbindung des SG jedoch schon nach heterologer Expression der  $\alpha$ -



SGlcT Hp0421p aus *H. pylori* in *P. pastoris* sowie nach Expression von drei  $\beta$ -SGlcTs (FgUgt51G3, FgUgt54E7 und FgUgtF2) aus *F. graminearum* nach strukturanalytischer Analyse identifiziert werden konnten [186, 438], könnte es durchaus sein, dass es sich bei den Epidioxy-Verbindungen um keine Artefakte handelt. Ergosterolperoxid<sup>8</sup> könnte auch von der Hefe selbst synthetisiert und glycosyliert werden. Schon 1947 konnten Ergosterolperoxide in *Aspergillus fumigatus* von Wieland und Prelog nachgewiesen werden. Damals war man sich jedoch nicht sicher, ob es sich um ein Stoffwechselprodukt des Pilzes handelt oder es sekundär gebildet wird, da es in der Natur bis dahin noch nicht vorgefunden wurde [407]. Doch in den 60er und 70er Jahren konnten auch in anderen (filamentösen) Pilzen Ergosterolperoxide nachgewiesen werden [14, 355, 54, 8], aber die Zweifel blieben partiell durchaus bestehen. J. D. Weete beschrieb schließlich 1973 im Rahmen eines *Reviews* über pilzliche Sterole, dass es sich bei dem Ergosterolperoxid um ein Intermediat bei der Umwandlung von Lanosterol zu Ergosterol in der Hefe *S. cerevisiae* handeln könnte [405]. 1997 isolierten Sgarbi *et al.* Ergosterolperoxid aus dem Hefestadium des pathogenen Pilzes *Sporothrix schenckii* und postulierten, dass es sich um ein Produkt einer Wasserstoffperoxid-abhängigen enzymatischen Oxidation von Ergosterol handelt, welches der Pilz zum Schutz gegen reaktive Sauerstoff-Spezies bildet [317]. Im selben Jahr wiesen auch Nemec *et al.* diese Ergosterol-Derivate in verschiedenen *Aspergillus*-Spezies nach [256]. Sie widerlegten die Artefakt-Theorie, indem sie ihre Arbeiten auch ohne Lichteinfall und mit Zugabe eines Antioxidants (BHT) durchführten und dieselben Resultate mit Belichtung und ohne BHT-Zugabe erhielten. Nes *et al.* präsentierten anhand von Analysen von *S. cerevisiae* und *Gibberella fujikuroi* schon 1989 die Widerlegung der Artefakt-Hypothese [257]. Sie nahmen an, dass das Peroxid vom Ergosterol ausgehend metabolisiert wird, wohingegen andere Gruppen behaupteten, dass die Epidioxy-Verbindung als Vorstufe für das Ergosterol dient. Ergosterolperoxide können die Phospholipase A2, ein Enzym, welches an der Biosynthese der entzündungsgekoppelten Prostaglandine beteiligt ist, inhibieren [91]. Neben entzündungshemmenden Aktivitäten zeigen Ergosterolperoxide (und auch Ergosterole) anti-krebsfördernde Aktivitäten [31, 352, 169]. Bok *et al.* beschrieben und identifizierten strukturell neben dem Ergosterolperoxid auch Ergosterolperoxid-Glucosid<sup>9</sup> aus *Cordyceps sinensis* (Chin. Raupenpilz) [31]. Das Glucosid wirkte ebenfalls als Inhibitor der Proliferation verschiedener Krebs-Zelllinien. Auch aus dem ebenfalls in der chinesischen Medizin vertretenen Pilz *Hericum erinacens* sowie aus dem Milchbrätling *Lactarius volemus* konnte ein Epidioxy-Ergosterylglucosid isoliert und verifiziert werden [349, 435].

Aufgrund der genannten Belege wird darauf geschlossen, dass es sich bei den in dieser Arbeit identifizierten Ergosterylperoxid-Glycosiden nicht um Aufreinigungsartefakte handelt, sondern diese von *P. pastoris* synthetisiert werden können.

#### 3.2.4 Charakterisierung von Bb0572p und Bh0572p scheiterte an zu geringer Enzymaktivität

Im Rahmen dieser Arbeit wurde, wie bereits erwähnt, die Biosynthese von  $\beta$ -SGal und  $\beta$ -SGlc durch die Aktivität von Bb0572p und Bh0572p erfolgreich aufgeklärt. Die heterologe Expression

<sup>8</sup>5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxy-22E-ergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol

<sup>9</sup>5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxy-24(R)-methylcholesta-6,22-dien-3 $\beta$ -D-glucoopyranosid

### 3 Diskussion

in *P. pastoris* und die Struktur-Analyse der heterolog synthetisierten Glycolipide bestätigten die Synthese der genannten SGs (s. 3.2.1, 3.2.2 und 3.2.3). Bb0572p unterscheidet sich von bekannten SGTs, da es anstatt der weit verbreiteten UDP-Glucose UDP-Galactose umsetzt. Bh0572p synthetisiert wie bekannte eukaryotische SGTs  $\beta$ -SGlc, ist aber aufgrund des bakteriellen Ursprungs dieses Enzyms nicht minder interessant. Die Expression in *P. pastoris* zeigte zudem, dass Bb0572p sowie auch Bh0572p Ergosterol als Akzeptor verwandten. Die Enzyme nutzen in natürlicher Umgebung eigentlich Cholesterol als Akzeptor [205, 137, 20, 334].

Die Bestimmung einiger biochemischer Eigenschaften der  $\beta$ -SGTs aus *B. burgdorferi* und *B. hermsii* sollte mit Hilfe von *in vitro*-Enzymassays mit *P. pastoris*-Homogenaten durchgeführt werden. Die Analyse sollte zur Bestimmung von pH-Optimum sowie der Michaelis-Menten-Konstante ( $K_M$ ) für UDP-Glucose und UDP-Galactose dienen.

Die Bestimmung der Proteinlinearität führte jedoch schon zu keinen verwertbaren Aktivitäten (Daten nicht gezeigt). Dass auch die Positivkontrolle nach Expression von *Hp0421* unter Kontrolle des nativen *Ugt51b1*-Promotors keine messbaren Aktivitäten zeigte, konnte durch die lange Induktionszeit von ca. 16 h begründet werden. Es konnte festgestellt werden, dass eine lange Induktion der Genexpression von *Hp0421* zwar zu hoher Akkumulation von  $\alpha$ -ErgGlc führte, aber die Enzymaktivität im Gegenzug abnahm (Abb.2.5A und B, S.57 unter Kontrolle des *Aox1*-Promotors; mündliche Mitteilung Dirk Warnecke). Nach Durchführung eines Enzymassays mit radioaktiv-markiertem Cholesterol konnten nur sehr geringe Enzymaktivitäten für Bb0572p verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt). Da jedoch eine Quantifizierbarkeit vorausgesetzt wird, um die Umsätze zu SG unter verschiedenen pH-Bedingungen sowie die Unterschiede in der Verwendung von UDP-Glucose und UDP-Galactose durch den  $K_M$  zu bestimmen, konnte der Assay in dieser Form nicht weiter fortgeführt werden. Die Durchführung des Assays musste optimiert werden, um Aktivitäten in einem quantifizierbaren Bereich zu erhalten. Dazu wurden die für Expression in *P. pastoris* optimierten Gensequenzen für Bb0572p und Bh0572p in *E. coli*-Expressionsvektoren eingebracht. Doch auch die Expression in *E. coli* führte zu keiner verwertbaren Enzymaktivität, einzig die Expression von *Hp0421* konnte detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Der Assay mit radioaktiv-markiertem Cholesterol zeigte gut quantifizierbare Lipidbanden aufgrund einer Hp0421p-Aktivität. Jedoch zeigte der Assay nur eine sehr schwache, für eine Quantifizierung vernachlässigbare SGT-Aktivität im Homogenat aus Ppart*Bh0572*-exprimierende *E. coli*-Zellen (Daten nicht gezeigt). Somit stellte sich das *E. coli*-System als nicht für die Charakterisierungsstudien nutzbar heraus. Jedoch konnte mit Hilfe dieses Systems untersucht werden, inwieweit die rekombinanten Proteine synthetisiert wurden. Mittels Immunoblot-Analyse über den His<sub>6</sub>-Tag konnte nur ein Signal von 44 kDa detektiert werden, welches als Hp0421p (berechnete Masse: 47 kDa) identifiziert wurde (nicht gezeigt). Geringe Auftrennungsunterschiede nach SDS-PAGE und somit Massenunterschiede in der Detektion des Signals wurden häufiger beobachtet [362, 287], deswegen wurde diesen Abweichungen keine Bedeutung zugemessen. Erwartet wurden für Bb0572p und Bh0572p Proteinsignale in derselben Größenordnung (ca. 43 kDa).

Obwohl in den erwähnten Assays mit Homogenaten aus *E. coli* und *P. pastoris* auch schwache SG-Banden zu beobachten waren, konnten keine ausreichende Quantifizierbarkeit erreicht werden.

### 3 Diskussion

Eventuell werden nur sehr geringen Mengen Protein synthetisiert. Es kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass eine Steigerung der Enzymaktivität erreicht werden musste. In Abschnitt 2.2.5 (ab S.71) wurden Modifikationen der Enzymanalysen dargestellt, welche u.a. in Form von Kationenzugabe, Ändern des Induktionszeitraums und der -temperaturen erfolgten. Die Zugabe von Kationen konnte im vorliegenden Fall keine Verbesserung der SGT-Aktivität erzeugen (Daten nicht gezeigt). Dies war auch der Fall bei einer UGT in *Solanum melongena* (Aubergine). Deren SGT-Aktivität ließ sich ebenfalls nicht durch Kationen ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) und Metallchelatoren (EDTA, EGTA) verbessern [278]. Dafür zeigte die Zugabe von Schwermetallionen ( $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ) einen starken inhibitorischen Effekt auf die SGT-Aktivität in Aubergine. Die  $\beta$ -SGlcT-Aktivität von etiolierten Erbsenkeimlingen konnte hingegen durch  $Ca^{2+}$ , etwas weniger durch  $Mg^{2+}$  stimuliert und durch  $Zn^{2+}$  inhibiert werden [332].

Möglicherweise könnte die Zugabe des Detergens Triton X-100 eine Verbesserung erreichen (nicht durchgeführt), welches zur Solubilisierung des Enzyms führt und auch die Löslichkeit des hydrophoben Sterol-Substrates verbessert [413, 278]. Jedoch wurden auch schon reduzierte Aktivitäten nach Triton-Zugabe gemessen [372, 106], und die Triton-Zugabe zeigte z.B. für Hp0421p keine Unterschiede in der Enzymaktivität [186]. Eine andere Möglichkeit bietet die Zugabe negativ geladener Phospholipide, welche die Enzymaktivität (partiell gereinigter Enzyme) stimulieren können [371, 373, 372], wobei die Enzymaktivität in Homogenaten durch eine Lipidzugabe bisher nicht beeinflusst werden konnte [278], d.h. die Proteine müssten erst partiell aufgereinigt und angereichert werden. Dies kann in *E. coli* über den verfügbaren, carboxyterminalen His<sub>6</sub>-Tag erreicht werden und in *P. pastoris* nach Expression der mit einem aminoterminalen His<sub>6</sub>-Tag versehenen Varianten, die in dieser Arbeit generiert wurden. Eine Verkürzung der Induktion der Expression (6 h) der Borrelia-Gene in *P. pastoris* führte zu einer Detektion von Bb0572p-Aktivität und sehr geringer Bh0572p-Aktivität. Diese Verkürzung der Induktion führte im Gegensatz zu Assays mit Hp0421p zu keiner verbesserten SGT-Aktivität (Abb.2.11A-C, S.74). In *E. coli* konnte durch Induktion für 24 h bei 16°C ebenfalls keine Steigerung der SGT-Aktivität erreicht werden (Abb.2.11A-C). Nach Ultrazentrifugation konnte gezeigt werden, dass die meiste Aktivität im Sediment gemessen werden konnte, welches die Membranfraktionen beinhaltet (Abb.2.11C). Da aufgrund des membran gebundenen Sterols und des im Cytoplasma vorliegenden Zuckerdonors wenigstens ein transienter Membrankontakt erwartet wurde, entsprach dieses Resultat den Erwartungen [106]. Dies konnte für Hp0421p bereits gezeigt werden [186].

Detektiert wurde in dieser Arbeit ebenfalls, dass die geringe Enzymaktivität von Bb0572p mit einer geringen  $\beta$ -SGal-Synthese korreliert. Versuche mit entweder einer verlängerten Induktionszeit (30 h), einer Zugabe von Galactose (Endkonz. 1%) zum Induktionsmedium und sechsständiger Inkubation oder unter Verwendung von Schikanekolben zur besseren Durchlüftung zeigten keine Auswirkung auf die  $\beta$ -SGal-Synthese (Daten nicht gezeigt). Weitere Variationen der Induktionszeiten zeigten für Bh0572p *in vivo* eine stetige Akkumulation von  $\beta$ -ErgGlc, nachdem die heterologe Genexpression für zwei, vier und 16 Stunden mit Methanol induziert wurde (Abb.2.12A, S.76). *In vitro* verhielten sich die Bh0572p-Aktivitäten, wie auch für Hp0421p beschrieben (s. 3.3, S.107), und nahmen ab. Die Bb0572p-Aktivitäten blieben *in vitro* hingegen stabil, und die Akkumulation von  $\beta$ -ErgGal erfolgte nur sehr langsam (Abb.2.12B).

Einige Optimierungsversuche wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, um quantifizierbare Aktivitäten zu erreichen. Die durchgeführten Enzymassay-Varianten führten zu keiner verbesserten Aktivität der SGTs, welche für eine entsprechende Quantifizierbarkeit der SGs sorgen könnten. Es konnten jedoch Erkenntnisse gewonnen werden, welche für folgende Optimierungsversuche hilfreich sein könnten. Zum Beispiel, dass sich die höchste Enzymaktivität der Borrelien-SGTs im Sediment befindet und dass das SG *in vivo* mit verlängerten Induktion akkumuliert, dies aber keinen signifikanten Einfluss auf die *in vitro* ermittelte Enzymaktivität hat. Die aussichtsreichste Lösung besteht kurzfristig in der Anreicherung der Enzyme. Auf weiterführende Lösungen wird in Abschnitt 3.4 (ab S.110, Punkt 1) näher eingegangen.

Es konnten zwei neue SGT-Gene identifiziert werden: *Bb0572* codiert für eine  $\beta$ -SGalT aus dem human-pathogenen Bakterium *B. burgdorferi* und *Bh0572* für eine  $\beta$ -SGlcT aus *B. hermsii*, deren Charakterisierung noch abgeschlossen werden muss. Die mittels *Glycolipid-Engineering* generierten Hefetransformanten konnten jedoch schon auf ihre Fähigkeit unter mikropexophagischen Konditionen ihre Peroxisomen abzubauen zu können untersucht werden, um zu beweisen, wie essentiell die strukturellen Eigenschaften des SGs in diesem Prozess sind (s. 3.3, S.107).

#### 3.2.5 Drei $\beta$ -SGlcTs aus *F. graminearum* konnten identifiziert werden

In dem Ascomyceten *F. graminearum* sollten  $\beta$ -SGlcT-codierende Gene identifiziert werden. Die Identifizierung dieser Gene wurde in dieser Arbeit begonnen und im Rahmen einer parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Diplomarbeit von Anna Zaslowski fortgeführt. Es sollen in diesem Zusammenhang kurz die Resultate aus diesem Projekt diskutiert werden.

Nach Datenbankanalysen<sup>10</sup> konnten neun hypothetische Gene für UGTs identifiziert werden. Im ersten Schritt wurde die Transkriptsynthese dieser neun Sequenzen überprüft. Es handelte sich um Sequenzen von neun hypothetischen Isoenzymen, von denen eines der Ugt51-Familie zugeordnet werden konnte und die restlichen der Ugt54-Familie. Die Zuordnung erfolgte aufgrund der für die Familien charakteristischen Präsenz und Anordnung nicht-katalytischer Domänen (trPH-GRAM, PH-GRAM und MRS6). Bei den Kandidaten-Gensequenzen handelte es sich um Ugt51G3, den einzigen Kandidaten der Ugt51-Familie, und acht Vertreter der Ugt54-Familie: Ugt54A2, -C2, -E5, -E6, -E7, -F2, -H1 und -J1<sup>11</sup>.

Im ersten Schritt sollte, wie bereits erwähnt, zuerst überprüft werden, ob die putativen für  $\beta$ -SGlcT-codierenden Gensequenzen überhaupt transkribiert werden. Da neun Isoenzyme im Organismus vorliegen, war es durchaus möglich, dass die verschiedenen Gene nur unter unterschiedlichen Umweltbedingungen exprimiert werden oder es sich bei einigen Gensequenzen um "Pseudo-Gene" handeln

<sup>10</sup><http://www.helmholtz-muenchen.de/en/mips/>; MIPS (*Munich Information Center for Protein Sequences*) *Fusarium graminearum* Genome Database, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/fusarium>; *Broad Institute of MIT and Harvard*, <http://www.broadinstitute.org/>; *Fusarium Comparative Database*, [http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium\\_group/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html)

<sup>11</sup>Die *Acc.No.s* können der Diplomarbeit von A. Zaslowski sowie Grille *et al.* entnommen werden (Quelle: Broad) [438, 106].

konnte. Die Transkriptsynthese sollte durch *RT*-PCR-Analysen untersucht werden. Dazu wurde Pilzmyzel unter zwei verschiedenen physiologischen Bedingungen (in Voll- und in Minimalmedium) kultiviert und Gesamt-RNA aus dem gekeimten Myzel präpariert. Für die PCR wurden Primer konzipiert, welche im aminoterminalen Bereich nahe dem 3'-Ende binden konnten. Sie durften nicht in konservierten Bereichen binden, und auch die Lage von Introns musste bei der Konzipierung beachtet werden. In eukaryotischen Genen wird der ORF oftmals von Introns unterbrochen, welche im Rahmen der mRNA-Prozessierung durch Spleißen entfernt werden. Der ORF wird hierbei definiert als der Codonbereich von Start- zu Stoppcodon. Als Kontrolle für die PCR dienten Primer für das *Housekeeping*-Gen  $\beta$ -Tubulin (*Acc.No.* AACM01000261, NCBI bzw. fgd261-40, MIPS).

Mittels *RT*(Reverse-Transkription)-PCR-Analysen konnte anschließend die Transkriptsynthese der FgUgts 51G3, -54A2, -54C2, -54E5, -54E7 und -54F2 nach Kultivierung der Konidien in Vollmedium nachgewiesen werden. Keine Transkripte konnten für die FgUgts 54E6, -54H1 und -54J1 detektiert werden (nicht gezeigt). Bei diesen drei Kandidaten könnte es sich nun um sogenannte "Pseudo-Gene" handeln oder um Gene, welche unter anderen Umweltbedingungen exprimiert werden. Letzterer Aspekt könnte durch weitere *RT*-PCR-Analysen oder durch eine *Real-time*-PCR untersucht werden. Dies wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft.

Die durch Transkriptnachweis verifizierten Sequenzen konnten anschließend heterolog in *P. pastoris* exprimiert werden. Diese weiterführenden Analysen wurden von A. Zaslowski im Rahmen ihrer Diplomarbeit fortgeführt [438]. Sie exprimierte die ORFs ausgewählter Sequenzen (FgUgt51G3, FgUgt54E7 und -F2) heterolog in *P. pastoris* und analysierte die SG-Synthese (*in vivo*) und SGT-Aktivität (*in vitro*). Es wurde  $\beta$ -SGlc-Synthese und  $\beta$ -SGlcT-Aktivität nach Expression aller drei analysierten Gensequenzen nachgewiesen. Zudem konnten die synthetisierten SGs nach Strukturanalyse als Epidioxy-Derivate des  $\beta$ -ErgGlc identifiziert werden. Details zur Vorgehensweise und den detaillierten Ergebnissen sowie zur Diskussion dieser Daten sind an dieser Stelle nicht wiedergegeben, sondern sind der genannten Arbeit von A. Zaslowski zu entnehmen.

Inwiefern die generierten *P. pastoris*-Transformanten, nach Überprüfung der Integrität der AOX, in die Studien zur Rolle von SG in der Peroxisomendegradation eingesetzt werden könnten, wird in Abschnitt 3.4 (ab S. 110) unter Punkt 6 behandelt.

## 3.3 Heterologe, bakterielle SGTs benötigen Lokalisierungsdomänen?

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass  $\beta$ -ErgGlc an der Reifung der MIPA-Vorläufermembran zum funktionalen MIPA-Membransystem beteiligt ist. Es stellte sich die Frage, ob auch strukturelle Varianten des SGs dessen Rolle im Peroxisomenabbau-Prozess einnehmen könnten oder ob diese Funktion nur spezifisch von  $\beta$ -ErgGlc erfüllt werden kann. Dazu wurden mittels *Glycolipid-Engineering* im Rahmen dieser Arbeit Hefetransformanten generiert, welche SG-Varianten synthetisieren konnten.

Es wurden u.a. mittels *Glycolipid-Engineering*-Methode *P. pastoris*-Transformanten generiert, welche das  $\alpha$ -SGlcT-Gen (*Hp0421*) unter der Kontrolle des starken *Aox1*-Promotors exprimierten. Die

### 3 Diskussion

generierte transgene Hefe zeigte *in vivo* eine große Akkumulation von  $\alpha$ -ErgGlc (Abb.2.5A, S.57). Interessanterweise verhielt sich die detektierte  $\alpha$ -SGlcT-Enzymaktivität gegensätzlich zur Detektion des *in vivo* synthetisierten  $\alpha$ -SGlcs. *In vitro* wurde die Enzymaktivität der  $\alpha$ -SGlcT geringer, je mehr  $\alpha$ -SGlc *in vivo* akkumulierte (Abb.2.5B). Aufgrund der hohen  $\alpha$ -SGlc-Syntheseleistung von Hp0421p, erzeugt durch eine starke Expression unter Kontrolle des *Aox1*-Promotors [200, 59, 61], könnten je "besser" die Expression erfolgt, die Substrate schneller umgesetzt werden. Somit würden diese nicht mehr ausreichend zur Verfügung stehen, so dass die Aktivität des Enzyms abnimmt. Des Weiteren ist es auch möglich, dass die Hefen durch die Akkumulation der großen  $\alpha$ -SGlc-Menge gestresst werden und lytische Prozesse eingeleitet werden, welche sich in einer verringerten Detektion der SGT-Aktivität bemerkbar macht. Aus diesen Gründen wurde die Induktion der Genexpression von *Hp0421* auf drei Stunden verkürzt, um eine gute SGT-Aktivität *in vivo* zu gewährleisten (Abb.2.6A, S.58). *In vitro* konnten in diesem Fall ebenfalls höhere Enzymaktivitäten im Gegensatz zu jener des WT-Enzyms detektiert werden (Abb.2.6B und C). Die Hefen konnten nun nach Sicherstellung der SGT-Aktivität bezüglich der Peroxisomendegradation analysiert werden, welche mittels *in situ*-AOX-Aktivitätsfärbungen erfolgte. Die transgene *Hp0421*-exprimierende Hefe (unter Kontrolle des *Aox1*-Promotors) zeigte ebenso wie der *P. pastoris* WT-Stamm nach Wechsel der Kohlenstoffquelle von Methanol zu Glucose im Gegensatz zu der in der Degradation blockierten KO-Mutante  $\Delta ugt51b1$  keine AOX-Aktivität auf (Tab.2.2, S.82). Da es sich bei AOX um ein peroxisomales Enzym handelt, wird gefolgert, dass durch Methanol-Induktion (viele) Peroxisomen proliferiert worden sind, wenn AOX-Aktivität detektiert werden konnte. War diese nach einem Wechsel zu Glucose als Kohlenstoffquelle nicht mehr nachweisbar, sind die überschüssigen Peroxisomen abgebaut worden. Es konnte somit der Eindruck erlangt werden, dass die Hp0421p-Aktivität unter Kontrolle des starken *Aox1*-Promotors die Unfähigkeit der KO-Mutante ihre Peroxisomen degradieren zu können komplementiert.

Die Beobachtung des Zellwachstums im Vergleich zum WT unter Peroxisomen-proliferierenden Konditionen zeigte wie erwartet ein geringes Zellwachstum (Abb.2.15, S.83). Bei Verfügbarkeit von Methanol als Kohlenstoffquelle ist ein geringes Wachstum nicht überraschend, da die Hefen Methanol zwar umsetzen können, die Energieausbeute (ATP) jedoch im Gegensatz zum Katabolismus von Glucose geringer ist und somit auch das Zellwachstum geringer ausfällt [215, 64]. Nach einem Wechsel der Kohlenstoffquelle zu Glucose sollte aufgrund der optimaleren Energiequelle ein gesteigertes Zellwachstum erreicht werden. Die  $\alpha$ -SGlc-synthetisierende Hefe zeigte ebenfalls kein Wachstum, wenn die Konzentration des Methanol herabgesetzt wurde. Es wurden verschiedene Methanol-Konzentrationen (0,05%-0,5%) eingesetzt, da festgestellt wurde, dass die Anzahl der lebenden Zellen (CFU) im Vergleich zu jener der WT-Hefe auf ein Absterben der Zellen während der Methanol-Induktion schließen ließ (Abb.2.15B). Könnte das Protein Hp0421p toxisch für die Hefezellen sein? Der durch Methanol-aktivierte *Aox1*-Promotor trägt zu einer starken Proteinexpression und zur Synthese großer Mengen heterologer Enzyme bei [128, 200]. Dies könnte sich als schädlich für die Zellen herausstellen, da das Enzym sehr aktiv ist und zu einer großen Abnahme des freien Ergosterols aufgrund der hohen Synthese von  $\alpha$ -ErgGlc führt. Einer dieser Aspekte oder auch beide zusammen könnten negative Auswirkungen auf die Zellviabilität haben. Das Verwenden niedrigerer Methanol-Konzentrationen zeigte jedenfalls keinen positiven Effekt bezüglich der Überlebensrate

### 3 Diskussion

der Zellen (nicht gezeigt).

Um die Expressionsstärke etwas zu reduzieren, wurden Hefetransformanten generiert, welche die Expression von *Hp0421* mit Hilfe des nativen, schwächeren Promotors von *Ugt51b1* regulierten. Die *in vivo* detektierte  $\alpha$ -SGlc-Synthese war etwas schwächer als nach Expression unter dem starken *Aox1*-Promotor, aber immer noch etwas stärker als die Synthese des WT- $\beta$ -ErgGlc (Abb.2.6A). Die Enzymaktivität war hingegen *in vitro* etwas schwächer als jene von UGT51B1 (Abb.2.6B). Es ist zu beachten, dass die Expression unter Kontrolle des schwächeren, nativen *Ugt51B1*-Promotors keiner Induktion unterliegt. D.h. auch unter nicht-Mikropexophagie-induzierenden Bedingungen synthetisiert *P. pastoris* SG. Somit ist die SG-Synthese wohl nicht nur beschränkt auf die MIPA-Vorläufermembran, sondern auch andere (unbekannte) transiente Membrankontakte sind zu erwarten [106].

Eine erste Analyse der Peroxisomendegradationsfähigkeit wurde ebenfalls über eine *in situ*-AOX-Aktivitätsfärbung geführt (Tab.2.2, S.82). Somit konnte auch hier der Eindruck erlangt werden, dass eine Komplementation des Degradationsdefekts erreicht wurde. Während der Methanol-Induktion konnte ein Überleben der Zellen während der Methanol-Induktion zwar erstmals sichergestellt werden, aber auch diese Hefetransformante zeigte kein Zellwachstum (Abb.2.15C).

Auch die im Rahmen dieser Arbeit generierten Hefetransformanten, welche in der Lage waren,  $\beta$ -ErgGal zu synthetisieren, sollten bezüglich des Peroxisomenabbaus analysiert werden. Das für eine  $\beta$ -SGalT-codierende Gen *Bb0572* wurde nach Optimierung der *codon usage* in einer *P. pastoris*-Deletionsmutante ( $\Delta$ *ugt51b1*) heterolog exprimiert. Diese transgene Hefe zeigte, unabhängig davon ob *Bb0572p* mit einem *His<sub>6</sub>-Tag* markiert war, bei den *in situ*-AOX-Aktivitätsfärbungen und den Beobachtungen des Zellwachstums dasselbe Verhalten, wie es auch nach Expression von *Hp0421* unter Kontrolle des *Ugt51B1*-Promotors beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt, s. 2.3.3, S.84).

Bei allen analysierten Hefetransformanten, die strukturelle SG-Varianten synthetisierten, konnte unter Peroxisomen-proliferierenden Konditionen kaum Zellwachstum festgestellt werden, sondern zum Teil sogar eine Beeinträchtigung der Zellviabilität. Die *in situ*-AOX-Aktivitätsfärbungen gaben erste Hinweise darauf, dass die SG-Varianten das  $\beta$ -ErgGlc ersetzen könnten. Nach den Analysen der in dieser Arbeit analysierten SG-Varianten kann vorerst festgehalten werden, dass das SG keine definierte Epimerie oder Anomerie aufweisen muss und auch die Verwendung der Hexosen Glucose und Galactose für den Peroxisomenabbau nicht essentiell ist. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Zucker bzw. andere Moleküle zu anderen Resultaten führen könnten. Im vorliegenden Fall könnte möglicherweise auch keine Komplementation des Defekts stattfinden, sondern die Hefezellen könnten durch die Expression der SG-Varianten so unter Stress geraten (s. *Hp0421p*), dass nicht-selektive Autophagie-Prozesse eingesetzt haben könnten. Diese unspezifischen Abbauprozesse könnten dazu führen, dass die Resultate der *in-situ*-AOX-Aktivitätsfärbung fälscherweise als Komplementationseffekt für die Mikropexophagie gedeutet werden könnten. Des Weiteren stellt sich in diesen zwei Fällen der Expression bakterieller SGTs und ihrer Rolle in der Peroxisomendegradation eine Frage zur Lokalisation. Da die  $\beta$ -SGlc-Synthese in *P. pastoris* an einer definierten MIPA-Vorläufermembran erfolgen muss, müssten auch die rekombinanten Proteine an dieser spezifischen Membran ihre SG-Varianten synthetisieren. Aber die in *P. pastoris* UGT51B1 beschriebenen

nicht-katalytischen Domänen: PH-GRAM und trPH-GRAM (s. 1.3.1, S.15) weisen die bakteriellen Proteine nicht auf. Diese Domänen von UGT51B1 binden PI(4)P zur Rekrutierung des Proteins an die MIPA-Vorläufermembran [425, 424]. PIs dienen als Vermittler von Signaltransduktionsereignissen und regulieren physiologische zelluläre Prozesse. Diese Lipide sind vor allem auf der cytosolischen Seite von Membranen vorzufinden, werden aber primär im ER synthetisiert und dann entweder über einen Vesikeltransport oder Transferproteine zu anderen Membranen transportiert [179, 67]. Einige Enzyme, wie auch das hier vorliegende UGT51B1, binden, wie bereits erwähnt, PIs, welche ihnen die Rekrutierung an einer Membran erleichtern. Dies würde bedeuten, dass die bakteriellen SGTs ihre Enzymaktivität nur zufällig an der gewünschten Membran ausführten. Es wäre deswegen sinnvoll, die nicht-katalytische Domäne von UGT51B1 an den 5'-Bereich der bakteriellen Gene zu fügen. Optional wäre eine Markierung mit einem Fluoreszenzprotein anzuraten, um die Lokalisierung des jeweiligen Enzyms fluoreszenzmikroskopisch verfolgen zu können (Näheres s. 3.4 Punkt 6, ab S.110).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass zu diesem Zeitpunkt noch keine endgültige Aussage darüber getroffen werden kann, ob strukturelle Varianten des  $\beta$ -ErgGlcS dessen Rolle im Degradationsprozess der Peroxisomen in *P. pastoris* übernehmen können. Es sollte vorerst sichergestellt werden, dass die rekombinanten Proteine ihre Enzymaktivität auch an dem spezifischen MIPA-Vorläufer-Membransystem ausführen. Weiterhin wäre es interessant zu prüfen, ob die bakterielle Variante der  $\beta$ -SGlcT Bh0572p (mit der Fähigkeit sich an der MIPA-Vorläufermembran lokalisieren zu können) in der Lage ist, den Degradationsdefekt zu komplementieren.

## 3.4 Ausblick

### 1. Wie können die Enzymaktivitäten von Bb0572p und Bh0572p zur Charakterisierung der Enzyme optimiert werden?

Die geringe *in vitro*-Aktivität der SGTs Bb0572p und Bh0572p in den *P. pastoris*-Homogenaten stellt ein Problem für die Durchführung der Enzymcharakterisierungsanalysen dar. Die Proteine werden nur in geringen Mengen von *P. pastoris* synthetisiert. Dies zeigten W. Hellmeyer und Olga Topko mit einer Immunoblot-Analyse, welche zu keinem Nachweis der SGT-Proteine führte (nicht gezeigt). Eine Möglichkeit die SGT-Aktivitäten zu verbessern, wäre die Proteine für die *in vitro*-Enzymanalysen anzureichern. Die native Aufreinigung der Proteine kann über den aminoterminalen His<sub>6</sub>-Tag der rekombinanten Bb0572p und Bh0572p erfolgen. Durch die His<sub>6</sub>-Markierung ist eine affinitätschromatographische Reinigung mittels IMAC (*Immobilized metal affinity chromatography*) möglich (s. [287]). Sollte es gelingen, die Proteine ausreichend anzureichern und in die *in vitro*-Enzymassays einzusetzen, könnten gut quantifizierbare Enzymaktivitäten resultieren und die Charakterisierungsanalysen (Enzymkinetik, pH-Optimum) fortgeführt werden.

Die erfolgreiche Anreicherung eines nativ aufgereinigten Proteins kann noch als Grundlage für weitere Untersuchungen herangezogen werden: Das native Protein könnte als Antigen für die Herstellung spezifischer Antikörper eingesetzt werden. Diese wiederum könnten bei einer intrazellulären Lokalisation von Nutzen sein. Neben Immunoblot-Analysen gegen das jeweilige Protein könnten auch



elektronenmikroskopische Immunlokalisationen von Ultradünnschnitten durchgeführt werden. Eine Präparation und Separation der inneren, cytoplasmatischen (IM) und äußeren (OM) Membran wäre für Lokalisierungsstudien der SGTs von Vorteil. Der Versuch der Membranseparation in *B. burgdorferi*, durchgeführt von Bledsoe *et al.* [29], generierte Resultate, auf denen weiter aufgebaut werden könnte. Generell kommen für die Membranseparation folgende Methoden in Frage: Saccharosedichtegradient, Percollgradient oder *Two Phase Transitioning*. Diese könnten auch für die OM und IM-Separation aus *H. pylori* analog angewandt werden. Die Membranfraktionen könnten auch mittels eines Enzymassays mit radioaktiv-markierten Substraten auf Enzymaktivität hin untersucht werden. Zusätzlich könnte das nativ aufgereinigte Protein strukturell durch STD-NMR (*Saturation Transfer Difference-NMR*<sup>12</sup>) analysiert werden. Unterstützt werden könnte die Identifizierung und Charakterisierung aktiver Zentren durch röntgenkristallographische Studien.

Die schlechte Quantifizierbarkeit und geringe  $\beta$ -SG-Ausbeute könnte durch Überexpression der *P. pastoris*-eigenen GALE *in vivo* verbessert werden. Die Überexpression der GALE könnte die SGT-Aktivität unterstützen. Dieses Projekt wurde von dem Projektstudenten D. Maag begonnen und wird derzeit noch weiter fortgeführt. Kurz zusammengefasst: D. Maag hat das GALE-Gen mit und ohne einem aminoterminalen Golgi-Signal mit einer carboxyterminalen His<sub>6</sub>-Markierung versehen (Golgi-Lokalisierungsdomäne von *S. cerevisiae*  $\alpha$ -1,2-Mannosyltransferase Mnn2p; s. auch [151, 64]). Dieses konzipierte Gen wurde zur Synthese in Auftrag (GENEART) gegeben, danach wurden *P. pastoris*-Expressionsvektoren erzeugt und ein im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierter *P. pastoris*-Stamm transformiert. Dabei handelte es sich um eine UGT51B1-defiziente KO-Mutante, in welche die synthetische Gensequenz von Bb0572 integriert wurde (GS115 $\Delta$ ugt51b1+PpartBb0572). Nach Überprüfung der Integration sollte die  $\beta$ -SG-Synthese erneut untersucht werden. Erste Analysen ließen jedoch keinen signifikanten Unterschiede in der Synthese und damit der SGT-Aktivität erkennen. Weitere Analysen befinden sich zur Zeit noch in Bearbeitung.

Eine weitere, aufwendigere Option, die Enzymaktivität von Bb0572p und Bh0572p zu verbessern, basiert auf einer neuen Klonierung der Expressionskonstrukte. Wu *et al.* kombinierten den GAP- und den *Aox1*-Promotor [417]. Der Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAP)-Promotor sorgt für eine starke konstitutive Expression heterologer Proteine [399] und liegt von der Expressionsstärke auf demselben Niveau wie der Methanol-aktivierte *Aox1*-Promotor in *P. pastoris*. Durch die Kombination beider Promotoren, d.h. nach Hinzufügen des *Aox1*-Promotors zum GAP-Promotor, konnten sie die heterologe Expression eines sekretierten humanen Proteins verdoppeln.

## 2. Wo befindet sich die Zuckernucleotidbindestelle in Bb0572p und Bh0572p?

Ein weiterer, interessanter Aspekt ergibt sich aus der Ähnlichkeit der beiden Proteine Bb0572p und Bh0572p. *BLAST2Seq*-Analysen von Bb0572p- und Bh0572p-Sequenzen lieferten eine Identität von 69% und eine Ähnlichkeit von 85%. Diese Ähnlichkeit der beiden Proteine wirft die Frage auf, wo die Domäne angesiedelt ist, die dafür verantwortlich ist, dass die beiden Enzyme ihre UDP-Zucker spezifisch umsetzen. Der *conserved domain-Search*<sup>13</sup> ergab keine Resultate bzw. keinen Hinweis auf eine "Signatur-Sequenz", und das DxD-Motiv wurde ebenfalls nicht identifiziert.

<sup>12</sup>ermöglicht die Aufklärung der Interaktionsstellen der Substrate

<sup>13</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>

*Uniprot-BLAST-Searches*<sup>14</sup> mit Bb0572p und Bh0572p führten jedenfalls zu keiner Präsenz eines DxD-Motivs, obwohl dieses Motiv schon in anderen GTs in der GT2-Familie identifiziert werden konnte: Die GT WbbE aus *Salmonella enterica*, SpsA aus *Bacillus subtilis* und auch eine  $\beta$ -Gal-GT aus *Bos primigenius taurus* zeigten dieses in die UDP-Zuckerbindung involvierte Motiv auf [49, 92, 158, 358]. Hp0421p, eine  $\alpha$ -CholGlcT der GT4 aus *H. pylori*, zeigte dieses Motiv ebenso wie die Borrelien-Proteine nicht auf [188]. Dies erschwert das Identifizieren der Zuckerbindestelle. D. Maag begann daraufhin mit der Generation von Hybriden, d.h. er erzeugte Expressionsvektoren, welche Fusionskonstrukte des Aminoterminus von Bb0572p und des Carboxyterminus von Bh0572p und umgekehrt beinhalteten. Die generierten *P. pastoris*-Transformanten ("komplementierte" UGT51B1-defiziente Mutanten) sollten anschließend hinsichtlich ihrer Zuckerspezifität untersucht werden. Durch die Strategie verschiedene Abschnitte der beiden Proteine miteinander zu fusionieren, soll der die Zuckerbindestelle beinhaltende Bereich immer weiter eingegrenzt werden. Die Analysen dauern zur Zeit noch an.

#### **3. Hätte die Deletion von Bb0572p bzw. Bh0572p einen Effekt auf die Pathogenität der Borrelien? Könnten durch Bb0572p- und Bh0572p-Enzymaktivität synthetisierte $\beta$ -SGs das $\alpha$ -Anomer in *H. pylori* ersetzen?**

Die Erzeugung von *Bb0572*- und *Bh0572*-Gen-Deletionsmutanten in *B. burgdorferi* und *B. hermsii* würde dazu führen, die Rolle der Enzyme bezüglich der Pathogenität der Bakterien zu untersuchen. Die Kultivierung der Borrelien-Zellen ist jedoch recht anspruchsvoll. Sind genügend Zellen vorhanden, könnten diese mittels Elektroporation mit Deletionskonstrukten transformiert werden. Nach Selektion könnten schließlich Mäuse mit den transgenen *Borrelien* infiziert und im weiteren Verlauf u.a. die Infektions- und Sterblichkeitsrate bestimmt und festgestellt werden, wie pathogen die Deletionsmutanten sind (s. exemplarisch [404]).

Des Weiteren wäre es interessant, die Borrelien-Enzyme in *H. pylori* zu exprimieren und die transgenen Zellen zu analysieren (s. [419]). Es sollte festgestellt werden, ob  $\beta$ -CholGal an der Modulation der Immunabwehr des Wirtes mitwirken kann. Die  $\beta$ -SGlc-Variante aus *B. hermsii* sollte als Kontrolle eine vergleichbare Reaktion, wie sie Wunder *et al.* bereits beschrieben haben, erzeugen und das Bakterium durch das Immunsystem angreifbar machen [419].

#### **4. Wie könnte die Peroxisomendegradation weiter nachgewiesen werden?**

Wie zuvor beschrieben, stehen noch weitere Immunoblot-Analysen zum Nachweis der Peroxisomendegradation über die Präsenz des Enzyms AOX aus. In diese sollten neben den in dieser Arbeit beschriebenen Hefen auch eine Mut<sup>S</sup>-Kontrolle (Integration des Zielgens erfolgte im *Aox1*-Locus) und eine AOX-Deletionsmutante zum Einsatz kommen. Beide Kontrollen wären im *Aox*-Locus deletiert und das AOX-Protein sollte nicht nachgewiesen werden können. Des Weiteren sollten die TEM-Analysen zum Nachweis der Peroxisomenproliferation und des -abbaus mit den in dieser Arbeit generierten UGT51B1-Varianten fortgeführt und dabei evt. das Protokoll nach Yount *et al.* [432] weiterhin optimiert werden.

Bei Kultivierung der (transgenen) Hefezellen sollten die im Folgenden beschriebenen Aspekte in

---

<sup>14</sup><http://www.uniprot.org/uniprot/>

### 3 Diskussion

allen Analysen unbedingt Beachtung finden. Yamashita *et al.* beschrieben, dass Mangelerscheinungen während der Kultivierung der *P. pastoris*-Zellen zu Autophagie-(Cvt)-Prozessen führen [426]. Sie zeigten, dass *P. pastoris* nach Änderungen der Umweltbedingungen, z.B. der Verfügbarkeit der Energiequelle, ihr Zellwachstum verlangsamt, um sich zuerst auf die neue Situation einzustellen. Während dieser *lag*-Phase nach Wechsel von Glucose zu Methanol konnte der Cvt-Prozess zur Rekrutierung von Vorstufen vakuolärer Hydrolasen aus dem Cytoplasma beobachtet werden. Dadurch werden zwei Proteine, der cytosolische Aminopeptidase I (Ape1)-*Precursor* und die cytosolische  $\alpha$ -Mannosidase (Ams1), in einem Cvt-Vesikel in die Vakuole transportiert [343, 211]. PrApe1 wird anschließend in der Vakuole nach Abspaltung eines Propeptids aktiviert. Die beschriebene *lag*-Phase-Autophagie (LPA) war jedoch nicht vorhanden, wenn bis zu 20 AS ins Kulturmedium zugegeben wurden. In der *lag*-Phase scheinen die Hefen unter einem AS-Mangel zu leiden, obwohl die Zellen alle AS synthetisieren können. Frühere Studien zeigten eine Verbindung von Cvt und PpUGT51B1 auf: Der Verlust von UGT51B1 reduzierte den Transport von prApe1 während der LPA in die Vakuole in *P. pastoris*, wohingegen UGT51B1 in *S. cerevisiae* für den Cvt-Prozess entbehrlich ist [47, 84]. UGT51B1 fungiert sozusagen als Unterstützer des prApe1-Transports in *P. pastoris*. Yamashita *et al.* untersuchten auch die AOX-Proteinsynthese-Kinetik [426]. AOX ist für das Wachstum von *P. pastoris* auf Methanol essentiell, und das Transkriptionslevel wird durch Methanol-Induktion drastisch erhöht [75]. AOX diente auch in dieser Arbeit als eine Art Reporterprotein. Interessanterweise beeinflussen zwei ATG-Proteine die AOX-Synthese: Deletionsmutanten von ATG1 (Proteinkinase, essentiell für alle Autophagie-Prozesse) und ATG17 (wie ATG1 an der Formation des PAS beteiligt) zeigten eine verzögerte AOX-Synthese. Um die von Yamashita *et al.* entdeckte LPA zu umgehen, ist es ratsam, das Methanol-Medium mit bis zu 0,1 mg/ml von 20 verschiedenen L-AS bzw. 0,5% Hefeextrakt anzureichern. Bei Einsatz von Hefeextrakt sollten keine Auswirkungen auf das *Aox1*-Promotorsystem erfolgen. Enthaltene Glucose würde als Repressor fungieren. Auf die SG-Synthese kann sich eine Hefeextrakt-Zugabe allerdings negativ auswirken (nicht gezeigt).

Bei der Kultivierung der Hefezellen spielt die Belüftung der Zellen ebenfalls eine große Rolle für die AOX-Aktivität. Bei niedriger Sauerstoff-Konzentration (0,19 mM) konnte ein  $K_M$ -Wert von 1,4 mM und bei einer Konzentration von 0,93 mM von 3,1 mM festgestellt werden [55]. Dies bedeutet, dass die AOX-Aktivität abhängig ist von der Belüftungsqualität der Kulturen, da die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidation von Methanol mit Zunahme der Sauerstoff-Konzentration ebenfalls zunimmt. Oku und Sakai [261] beschrieben in einem *Methodenpaper*, dass die Kultivierung eine ausreichende Belüftung erfordert, um die Oxidation des Methanols in den Hefen zu gewährleisten. Deswegen sollten nicht weniger als 180 rpm (*rounds/revolutions per minute*, Umdrehungen pro Minute) als Schüttelfrequenz genutzt werden und die Erlenmeyerkolben das 10-fache Volumen zum Kulturvolumen aufweisen. In dieser Arbeit wurde bei 180-200 rpm geschüttelt, jedoch aus Kapazitätsgründen das Kolben-/Kulturvolumenverhältnis teils etwas verringert. Auf die Belüftung sollte in Zukunft ein größeres Augenmerk gelegt werden, da durch Schwankungen in der Sauerstoffverfügbarkeit der Pexophagie-Prozess verzögert ablaufen kann. Des Weiteren sollte, wie auch in der vorliegenden Arbeit getan, beachtet werden, die Kulturen während des Mediumtransfers nicht zu stark abzukühlen. Das Wechselmedium sollte auf Raumtemperatur (RT) vorgewärmt sein. Schwankungen in der Tem-

peratur können die Zellanzahl erniedrigen, welche zur Mikropexophagie übergeht.

Eine weitere Alternative, die Zellen mittels eines *Plattenassays* visuell auf ihre AOX-Präsenz zu analysieren, basiert auf der Verwendung von Allylalkohol, welcher als AOX-Substrat fungiert. Es handelt sich in diesem Fall um eine positive Selektion, im Gegensatz zu einer negativen Selektion wie sie für die AOX-Aktivitätsfärbung in dieser Arbeit beschrieben wurde (nach Stasyk *et al.* [330]). Allylalkohol wird durch die Aktivität der AOX zu einem hochtoxischen Aldehyd, Acrolein. Dies bedeutet, dass AOX-defiziente Zellen überleben, da sie das toxische Produkt nicht bilden können.

#### 5. Die Reaktionen am und um den MIPA: Aufklärung der *black box* möglich?

Bei Pflanzen sind SGs generell ein fester Bestandteil der Vakuolenmembran [42]. Es wäre interessant zu erfahren, ob SG die Vakuolenmembran modifiziert, so dass sie angreifbar für die hydrolytischen, vakuolären Enzyme wird. Jedoch könnte auch ein anderes Lipid und/oder Protein einen solchen Effekt auslösen. Das Durchführen von Proteomics und Lipidomics-Techniken mit dem MIPA wäre wünschenswert. Eine sehr interessante Frage lautet u.a.: Welche Rolle nimmt  $\beta$ -ErgGlc bei der Entwicklung, Ausdehnung, Krümmung etc. des MIPAs im Detail ein? Dazu wäre es angebracht, den MIPA zu isolieren und zu charakterisieren. Nach mündlicher Mitteilung von Fulvio Reggiori (Univ. Utrecht, Niederlande) auf der Autophagie-EMBO-Tagung in Ascona (Schweiz, Okt.2009) arbeiten zur Zeit verschiedene Gruppen an der Isolierung der sogenannten PAS-Membran.

Zudem wäre es interessant zu erfahren, ob UGT51B1 (am MIPA) Interaktionen mit anderen Proteinen einhergeht. Dieser Aspekt ließe sich theoretisch durch die sogenannte Yeast2Hybrid (Y2H)-Technik untersuchen (s. auch [51, 391, 150]). Allerdings könnte es problematisch werden, da das aktive UGT51B1 transient mit einer Membran interagiert, der Y2H-Nachweis jedoch im Zellkern erfolgt und das Protein aber durch seine Membranbindung nicht in den Zellkern transportiert werden kann. Da eine DNA-Aktivierung und somit eine Lokalisation im Kern erforderlich ist, scheiden alle Proteine, die nicht in den Kern gebracht werden können - z.B. Membranproteine - aus. Deswegen wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt die Interaktionen von Membranproteinen mit anderen Proteinen zu analysieren: Das Split-Ubiquitin-System [153, 329, 85, 361]. Wäre ein Interaktionspartner bekannt, könnte eine Interaktion auch mittels FRET (Förster-Resonanzenergietransfer bzw. *Fluorescence resonance energy transfer microscopy*) nachgewiesen werden [275, 315].

#### 6. Bakterielle Enzyme benötigen Lokalisierung am MIPA! Könnten pilzliche FgUgts UGT51B1 eventuell ersetzen?

Den bakteriellen Enzymen fehlt, wie in 3.3 (S.107) schon erwähnt, möglicherweise ein Lokalisierungssignal, damit sie an die MIPA-Vorläufermembran rekrutiert werden können. Dies könnte erreicht werden, wenn die Gensequenzen aminoterminal mit dem Aminoterminus von UGT51B1 und einem Fluoreszenzmarker (z.B. GFP, CFP, YFP) versehen werden.

Die Analyse der  $\beta$ -SGlcT aus *B. hermsii* in *P. pastoris* bezüglich der Degradationsfähigkeit steht noch aus und wäre auf jeden Fall interessant, da dieses Enzym über keine der bekannten UGT51B1-Lokalisierungsdomänen verfügt und dennoch  $\beta$ -SGlc synthetisiert. Jedoch wäre es auch hier ratsam, das bakterielle Enzym mit den nötigen Lokalisierungsdomänen auszustatten und zu untersuchen, ob es den Verlust von UGT51B1 in *P. pastoris* komplementieren kann. Die identischen Lokalisie-

rungsdomänen zu UGT51B1 zeigt hingegen UGT51G3 aus *F. graminearum* und sollte theoretisch den Abbaufekt in der UGT51B1-Deletionsmutante problemlos komplementieren können. Doch was könnten die beiden Enzyme UGT54E7 und UGT54F2 ausrichten? Diese besitzen nur einen kurzen, Domänen-freien Aminoterminus und am Carboxyterminus findet sich eine weitere Domäne, MRS6 (s. Abb.1.5, S.14 und in Abschnitt 1.3.1, ab S.15). Ob Bindungen an eine Membran mittels MRS6 zustande kommen, wurde bisher nicht aufgeklärt. Aber könnten die Enzyme eventuell sogar an der MIPA-Vorläufermembran lokalisieren und durch ihre Enzymaktivität Einfluss auf die Peroxisomendegradation nehmen? Oder zeigen sie ihre Enzymaktivität an verschiedenen intrazellulären Membrankompartimenten? Deswegen wären auch im Falle der FgUgts Lokalisierungsstudien der einzelnen Proteine angebracht.

Zinser und Daum [440] beschrieben Isolierungsmethoden und biochemische Charakterisierung von Organellen aus *S. cerevisiae*. Diese Methoden könnten als Grundlage für die Isolierung von Organellen/Membransystemen aus *P. pastoris* angewandt werden [396]. Wriessnegger *et al.* [416] beschrieben z.B. die Isolation und Charakterisierung von Peroxisomen aus *P. pastoris*. Die verschiedenen, isolierten Membranen würde eine Grundlage bieten, um Enzymaktivitäten mittels *in vitro*-Enzymassays in *P. pastoris* zu detektieren. Jedoch beinhaltet *F. graminearum* selbst neun Isoenzyme, deren Aktivitäten nicht differenziert werden könnten, da sie vermutlich größtenteils zur selben Zeit exprimiert werden (nicht gezeigt). Die Anwendung der RNA-Interferenz-(RNAi)Technik [86] zur kontrollierten Supprimierung der Genexpression der FgUgts wäre in diesem Fall sehr aufwendig. Die Untersuchung der Lokalisation könnte durch die Generation von GFP-Fusionkonstrukten erfolgen. Dabei werden die codierenden Sequenzen der FgUgt-Enzyme als GFP-Fusionskonstrukte exprimiert und die Lokalisation kann sowohl in *P. pastoris* als auch in *F. graminearum* untersucht werden. Weitere Informationen zu möglichen Analysen der FgUgts können auch der Arbeit von A. Zaslowski entnommen werden [438].

#### **7. Gibt es (UGT51B1 involvierende) Pexophagie-Prozesse auch in filamentösen Pilzen, die andere Lebensweisen und Infektionsstrategien verfolgen?**

Basierend auf den Arbeiten von Asakura *et al.* [9] und Kershaw und Talbot [159], zusammengefasst von Yoshimoto *et al.* [431] (s. 1.7.3, S.40), könnten auch die neun *F. graminearum* SGT-Isoenzyme eventuell an einem Pexophagie-Prozess in dem filamentösen Pilz beteiligt sein. Demnach stellt sich die Frage, ob diese Autophagie für die Virulenz erforderlich ist. Dies ist fraglich, da *F. graminearum* seinen Wirt über natürliche Öffnungen (hauptsächlich über die Blüte) infiziert und somit essentiell keine Turgordruck-aufbauenden Appressorien benötigt. *F. graminearum* besitzt hingegen sogenannte Appressorium-ähnliche Strukturen. Die beiden bisher analysierten Pilze *M. oryzae* und *C. orbiculare* sind hemibiotroph. Das bedeutet, sie formieren melanisierte Appressorien, um die pflanzliche Cuticula und Zellwand zu durchbrechen und etablieren direkt nach Eindringen zuerst eine biotrophe Phase und wechseln schließlich in die nekrotrophe Phase. *F. graminearum* lebt u.a. saprophytisch, d.h. auf bereits abgestorbenem Pflanzenmaterial oder perthotroph. Perthotrophe Parasiten töten die Zellen des Wirtes für ihre eigene Ernährung ab. *F. graminearum* produziert dazu Mykotoxine [103].

Bisher sind jedenfalls keine anderen pathogenen Pilze bekannt, in denen für die Infektion der Pflan-

### 3 Diskussion

ze erforderliche Autophagie-Prozesse nachgewiesen wurden. Deswegen wäre es interessant, die Rolle der Autophagie bzw. Pexophagie (und u.U. von UGT51B1-Äquivalenten) in Pilzen zu untersuchen, die eine andere Lebensweise und Infektionsstrategie verfolgen. Biotrophe Pilze beispielsweise (z.B. *Uromyces spec.*, Rostpilze, Basidiomyceten) lassen den Wirt überleben und bilden sogenannte Ernährungsstrukturen in Form von Haustorien aus, die die Versorgung des Pilzes mit Nährstoffen gewährleisten [228, 387]. Ein Kandidat für einen nekrotrophen, phytopathogenen Pilz wäre der Grauschimmelerreger *Botrytis cinerea* (Ascomycet) [376], welcher die Pflanze über Wunden oder natürliche Öffnungen infiziert. Aber auch eine Penetration über eine appressorienähnliche Struktur ist möglich, welche Unterstützung durch die Sekretion sogenannter cutinolytischer und zellwandabbauender Enzyme (Cutinasen, Lipasen, verschiedene Pektinasen und Zellulasen) [290] erfährt. Nach der Infektion kommt es schließlich zum schnellen Absterben des infizierten Gewebes [280]. *BLASTp*-Searches mit UGT51B1 lieferten im *B. cinerea*-Genom einen Treffer mit 52% Identität. Dabei handelt es sich um ein hypothetisches Protein (BCIG\_12424) und eventuell um einen potentiellen Kandidaten für eine SGT?

# 4 Material & Methoden

## 4.1 Chemikalien, Lösungsmittel, Verbrauchsmaterialien und Reaktionskits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel stammten, sofern nicht anders angegeben, von den folgenden Firmen:

APPLICHEM (Darmstadt, D), BD DIFCO<sup>TM</sup> (Detroit, USA), CARL ROTH (Karlsruhe, D), DUCHEFA BIOCHEMIE (Haarlem, NL), MERCK/VWR INTERNATIONAL (Darmstadt, D), Roche (Karlsruhe, D) und SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen, D). Verbrauchsmaterialien wurden hauptsächlich bezogen von BIOZYM (Hessisch Oldendorf, D), EPPENDORF (Hamburg, D), GREINER (Frickenhausen, D) und SARSTEDT (Nümbrecht, D).

Die pH-Werte aller Lösungen, Puffer und Medien wurden mit dem pH-Meter "766 Calimatic" (Knick, Berlin, D) eingestellt. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Substanzen der Puffer und Lösungen in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> (teilweise schon sterilisiert) gelöst.

Eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Reaktionskits findet sich in Tabelle 4.1 (S.191) im Anhang 7.

Bevor nun in den folgenden Abschnitten u.a. auf die verschiedenen Kultivierungen der Mikroorganismen und die in dieser Arbeit verwendeten Methoden eingegangen wird, sollte auf folgende Punkte verwiesen werden: Es soll an dieser Stelle angemerkt werden, mit welchen Zentrifugen die ZENTRIFUGATIONSSCHRITTE in der Regel erfolgten. Die rpm- oder xg-Angaben in den beschriebenen Protokollen beziehen sich auf das entsprechende Gerät. Kleine Reaktionsgefäße (0,5-2 ml) wurden i.d.R. in der *Mikro 22R*-Zentrifuge der Firma HETTICH (Tuttlingen, D) zentrifugiert (max. 14.000 rpm bzw. 21.910 xg; 13.000 rpm entsprechen z.B. 18.890 xg) und größere Reaktionsgefäße (15-50 ml, alle Glas-Schliffgläschen) in der *Centrifuge 5810R* der Firma EPPENDORF (Hamburg, D; max. 4.000 rpm bzw. 3.220 xg). Die Geschwindigkeiten sind in dieser Arbeit entweder als rpm (*rounds/revolutions per minute*, Umdrehungen/min) angegeben oder beziehen sich auf die Schwere- bzw. die Fallbeschleunigung der Erde ( $g = 9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ ). Die Formel zur Berechnung der Umdrehungsgeschwindigkeit einer Zentrifuge [rpm] auf das Vielfache der Erdbeschleunigung [xg] lautet wie folgt:

$$\text{xg} = \text{RZB} = (\text{rpm} / 1000)^2 \cdot r [\text{mm}] \cdot 1,118$$

$$\text{RZB} = (r \cdot \omega^2) / g$$

$$\omega = (2 \cdot \pi \cdot \text{rpm}) / 60$$

RZB, relative Zentrifugalbeschleunigung. Bei der Angabe des Radius (r) muss allerdings beachtet werden, ob man den minimalen, den mittleren oder den maximalen Radius des Rotors verwendet, da der Abstand der Drehachse des Rotors zum oberen bzw. unteren Rand des Röhrchens meistens unterschiedlich ist.

Des Weiteren sollte Beachtung finden, dass alle Kulturen im Inkubationsschüttler *Multitron* der Firma INFORS (Bottmingen, CH) angezogen wurden.

## 4.2 Mikroorganismen und deren Kultivierung

In den Tabellen 4.2 und 4.5 (S.192 und 195) im Anhang 8 und 11 sind alle Mikroorganismen aufgelistet, die in dieser Arbeit Anwendung fanden bzw. im Rahmen dieser generiert wurden. Neben der Angabe des jeweiligen Stammes wird auf die Herkunft bzw. darauf verwiesen, von welcher Institution Mikroorganismen freundlicherweise zur Verfügung gestellt bzw. von welcher Firma sie bezogen wurden. Des Weiteren finden sich Angaben, in welcher Form (DNA, Zellen, Konidien) die Mikroorganismen bezogen bzw. in dieser Arbeit verwandt wurden.

Bei den angewandten *E. coli*-Stämmen sollte Folgendes beachtet werden: Der Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue wurde als Wirt für zu klonierende DNA verwendet, während *E. coli* C41(DE3) für die Überexpression von Membranproteinen gut geeignet ist [232]. Dieser Stamm wurde von dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) abgeleitet, welcher oftmals in Verbindung mit dem auch in dieser Arbeit genutzten pET-Vektorsystem genutzt wird: Das Zielgen wird von der Bakteriophagen T7 RNA-Polymerase transkribiert [344], diese wird vom  $\lambda$ -Lysogen produziert und ihre Expression erfolgt unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren UV5-Promotors ([232], pET-Manual<sup>1</sup>). Doch für (potentielle) Membranproteine war dieser Wirt nicht geeignet, da die Zellen nach der Expression starben. Eine Mutante C41(DE3) dieses Stammes, welche das Oxoglutarat-Malat-Carrierprotein (aus Rind) überexprimierte und diese Überexpression tolerierte, produzierte die Proteine und akkumulierte diese in Einschlusskörpern ohne die Auswirkungen eines toxischen Effekts [232]. Aufgrund dessen wurde der Stamm C41(DE3) in dieser Arbeit genutzt.

In den folgenden Abschnitten werden die Kultivierungsbedingungen der verwendeten Mikroorganismen näher beschrieben. Alle Nährmedien wurden durch Autoklavieren sterilisiert. Einzelne Lösungen, z.B. Antibiotikallösungen, wurden steril filtriert und erst nach Abkühlen des Mediums (auf ca. 60°C) hinzu gegeben.

### 4.2.1 Kultivierung und Anlegen von Dauerkulturen von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte sowohl als Verdünnungsausstrich auf LB-Nährboden als auch als Flüssigkultur in LB-Medium auf einem Schüttler (200 rpm) bzw. Roller. Eine Selektion erfolgte durch Zugabe der erforderlichen Resistenz in Form eines Antibiotikums, wie zum Beispiel Ampicillin (Amp), in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Die optimale Kultivierungstemperatur für die Bakterien betrug 35-37°C.

Für die Herstellung von *E. coli*-Dauerkulturen wurden (mit Hilfe einer abgeflamten Impföse) 5 bis 10 ml LB-Medium (mit z.B. 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Amp) mit *E. coli*-Zellen inokuliert und bis zur Trübung des Mediums (meist üN) bei 35-37°C im Roller inkubiert. Abschließend wurden die Zellen für 5 min bei 18.890 xg abzentrifugiert und das Pellet in 70% Glycerin/LB-Medium aufgenommen (Endkonzentration des Glycerin: 35%). Die Lagerung der Dauerkulturen erfolgte bei -80°C.

#### Nährmedien für *E. coli*:

##### **LB-Medium(/-Agar)**

25 g LB-Broth High Salt, DUCHEFA (bestehend aus: 10 g Trypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt)  
(15-20 g DIFCO Agar, 1,5-2%)

> autoklavieren und abkühlen lassen

> Zugabe von Antibiotika zur Plasmidselektion:

1 ml Ampicillin (100 mg/ml, steril filtriert) = Amp100; Endkonzentration: 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$

oder

1 ml Kanamycin (30 mg/ml, steril filtriert) = Kan30; Endkonz.: 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$

ad 1 L  $\text{H}_2\text{O}_{dest}$

<sup>1</sup>Novagen, Merck Chemicals: <http://www.merck-chemicals.de/life-science-research/>; *technical bulletins*



### AIX-Agar (Amp-IPTG-X-GAL), pH 7,5

- 25 g LB-Broth High Salt, DUCHEFA (bestehend aus: 10 g Trypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt)
- 15-20 g DIFCO Agar, 1,5-2%
- > autoklavieren und abkühlen lassen
- > Zugabe von Antibiotika zur Plasmidselektion:
  - 1 ml Ampicillin Amp100; Endkonz.: 100 µg/ml
- > Zugabe für Blau/Weiß-Screening:
  - 500 µM Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) (steril filtriert)
  - 2 oder 4% 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (X-Gal)  
(X-Gal in Dimethylformamid (DMF), steril filtriert = Endkonz. 100 µg/ml)
- ad 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

### Low Salt LB(/-Agar)

- 10 g Bacto-Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- (15-20 g DIFCO Agar, 1,5-2%)
- ad 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, pH 7,5
- > autoklavieren und abkühlen lassen
- > Zugabe von Antibiotika zur Plasmidselektion:
  - 25 µl Zeocin (100 mg/ml, steril filtriert) = Zeo100; Endkonz.: 25 µg/ml

### SOC-Medium

LB-Medium inkl. 20 mM Glucose

## 4.2.2 Kultivierung, Ermitteln von Zellwachstum und Anlegen von Dauerkulturen von *P. pastoris*

Die Kultivierung von *P. pastoris* erfolgte sowohl als Verdünnungsausstrich auf YPD/YPDSZ oder Minimal-Nährboden als auch als Flüssigkultur geschüttelt bei 180-200 rpm. Eine Selektion erfolgte durch Zugabe in Form von Aminosäuren um die vorliegende Auxotrophie (hier Histidin und/oder Arginin) zu komplementieren. Es erfolgte eine Zugabe von 2 ml/L L-Histidin oder L-Arginin (10 mg/ml, Endkonz.: 20 mg/L). Die optimale Kultivierungstemperatur für die Hefezellen betrug 30°C.

Für die Herstellung von *P. pastoris*-Dauerkulturen wurden (mit Hilfe einer abgeflamten Impföse) 5 bis 10 ml YPD/YPDSZ/Minimal-Medium (evt. mit AS) mit *P. pastoris*-Zellen inokuliert und bis zur Trübung des Mediums (meist ün) bei 30°C und 180-200 rpm im Schüttler inkubiert. Abschließend wurden die Zellen für 5 min bei 18.890 xg abzentrifugiert und das Pellet in 70% Glycerin/Medium aufgenommen (Endkonz. Glycerin: 35%). Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Zum Ermitteln der Zelldichte wurde die Optische Dichte (OD) bei 600 nm bestimmt. Da der ermittelte Wert sowohl die lebenden als auch die abgestorbenen Zellen umfasst, kann die Anzahl der vitalen Zellen, wie folgt beschrieben, untersucht werden. Dazu wird die Anzahl der Kolonie-bildenden Zellen (*colony forming units*, CFU) bestimmt. Für die Analyse der CFU wurde eine Verdünnungsreihe (von 10<sup>-1</sup> bis zu 10<sup>-5</sup> reichend) hergestellt und je 100 µl einer Verdünnung auf YPD-Agarplatten aufgebracht. Die Inkubation erfolgte bei 30°C. Anschließend wurden die gebildeten Kolonien ausgezählt und die CFU/ml konnten gegen die Zeit [in h] graphisch dargestellt werden.

Nährmedien für *P. pastoris*

**YPD-(Yeast Extract Peptone Dextrose)-Medium(/-Agar)**

20 g Bacto-Trypton, DIFCO  
10 g Hefeextrakt, DIFCO  
(15-20 g Bacto-Agar, 1,5-2%, DIFCO)  
> autoklavieren und abkühlen lassen  
+ 50 ml 40% D-Glucose (steril filtriert)  
+ 1 ml Ampicillin (Amp100; Endkonz.: 100 µg/ml)  
ad 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

**YPDSZ-(YPD-Sorbitol-Zeocin)-Medium(/-Agar)**

20 g Bacto-Trypton  
10 g Hefeextrakt  
182,2 g Sorbitol  
(15-20 g Bacto-Agar, 1,5-2%)  
> autoklavieren und abkühlen lassen  
+ 50 ml 40% D-Glucose (steril filtriert)  
+ 1 ml Ampicillin (Amp100; Endkonz.: 100 µg/ml)  
+ 0,5 ml Zeocin (Zeo100; Endkonz.: 100 µg/ml)  
ad 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

**20x Yeast Nitrogen Base (YNB)**

134 g YNB (mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ohne Aminosäuren), DIFCO  
ad 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>  
> steril filtrieren

**MD-(Minimal Dextrose)-Medium(/-Agar)**

(20 g Bacto Yeast-Agar, 2%, DIFCO)  
(ad) 850 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>  
> autoklavieren und abkühlen lassen  
+ 100 ml 20x YNB  
+ 50 ml 40% D-Glucose (steril filtriert)  
+ 1 ml Ampicillin (Amp100; Endkonz.: 100 µg/ml)

**MM-(Minimal Methanol)-Medium(/-Agar)**

(15-20 g Bacto Yeast-Agar, 1,5 - 2%, DIFCO)  
(ad) 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>  
> autoklavieren und abkühlen lassen  
+ 100 ml 20x YNB  
+ 5 ml Methanol (HPLC grade) = Endkonz.: 0,5%  
+ 1 ml Ampicillin (Amp100; Endkonz.: 100 µg/ml)

### MGly-(Minimal Glycerol)-Medium

- 1,155 g Drop out-Powder
- ad 830 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>
- > autoklavieren und abkühlen lassen
- + 100 ml 20x YNB
- + 50 ml 20% Glycerol (v/v)
- + 2 ml 0,02% Biotin
- + 6 ml 10 mg/ml L-Leucin (Endkonz.: 60 mg/L; steril filtriert)
- + 4 ml 10 mg/ml L-Tryptophan (Endkonz.: 60 mg/L; steril filtriert)
- + 10 ml 2 mg/ml L-Uracil (Endkonz.: 20 mg/L, steril filtriert)
- + 1 ml Ampicillin (Amp100; Endkonz.: 100 µg/ml)

### Drop out-Powder

- 2,5 g Adenin (Hemisulfat)
- 1,2 g L-Arginin (HCl)
- 6 g L-Aspartat
- 6 g L-Glutamat (Na<sup>+</sup>)
- 1,8 g L-Lysin (HCl)
- 1,2 g L-Methionin
- 3 g L-Phenylalanin
- 22,5 g L-Serin
- 12 g L-Threonin
- 1,8 g L-Tyrosin
- 9 g L-Valin

## 4.2.3 Kultivierung und Anlegen von Dauerkulturen von *F. graminearum*

Die Kultivierung von *F. graminearum* erfolgte sowohl durch Inokulation des Mediums(/-Agars) mit ausreichend Konidien (ca. 30.000/50 ml Kultur) im Brutschrank als auch mit Myzel(-Agarblöckchen) schüttelnd bei 180-200 rpm. Eine Selektion erfolgte durch Zugabe des Antibiotikums Hygromycin (Hyg100, steril filtriert, Endkonz.: 100 µg/ml) und die optimale Kultivierungstemperatur betrug 28°C.

Für die Herstellung von Dauerkulturen wurden Konidien mittels H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> und einem Drigalski-Spatel von einer Agar-Platte abgeschwemmt und zweimal für 3 min bei 2000 rpm in einem 1,5-2 ml-RG mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen. Nach Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer wurden Aliquots bei -80°C aufbewahrt. Die Zugabe von Glycerol als Frostschutzmittel war nicht nötig. Alternativ konnten auch kleine Myzelblöckchen in ein Medium/Glyceringemisch aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt werden.

Nährmedien für *F. graminearum*

**CM-Vollmedium (*complete medium*)(/-Agar)**

1 g Hefeextrakt  
1 g Bacto-Trypton  
(15-20 g Bacto Yeast-Agar, 1,5 - 2%, DIFCO)  
> autoklavieren und abkühlen lassen  
+ 50 ml 40% D-Glucose  
+ 10 ml Lösung A  
+ 10 ml Lösung B (steril filtriert)  
+ 1 ml MNS (minerals-nutrients-salts, Spurenelemente)  
+ 1 ml Ampicillin (Amp100; Endkonz.: 100 µg/ml)  
ad 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

**Lösung A (100x)**

10% Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O

**Lösung B (100x)** (steril filtriert)

2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
2,5% MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
1% NaCl

**MNS-Lösung**

60 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
390 mg CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
13 mg KI  
60 mg MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
51 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> x 4 H<sub>2</sub>O  
5,5 g ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
0,93 mg FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
2 ml Chloroform (zum Sterilisieren)  
ad 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

**SNA-(*Synthetic Nutrient Poor*)-Medium nach Nirenberg [258]**

1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1 g KNO<sub>3</sub>  
0,5 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
0,5 g KCl  
0,2 g D-Glucose  
0,2 g Saccharose  
(22 g Agar)  
ad 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

## 4.3 Vektoren und Plasmide

In dieser Arbeit verwendete Vektoren sind in Tabelle 4.3 (S.193) im Anhang 9 aufgelistet. Diese Tabelle zeigt wichtige Merkmale (z.B. Promotor, Resistenzmarker) und den Verwendungszweck in dieser Arbeit. Einige Vektoren wurden kommerziell erworben, andere wiederum freundlicherweise zur Verfügung gestellt: Der Vektor pCFP-atg26(ugt51b1)-FL wurde freundlicherweise von Yasuyoshi Sakai der Universität Kyoto (JP) zur Verfügung gestellt. Als Ressourcen für CFP und GFP wurden mir freundlicherweise die Plasmide p123-CFP und p123-GFP von Matthias Hahn (TU Kaiserslautern, D) überlassen.

In dieser Arbeit generierte Vektorkonstrukte lassen sich wiederum Tabelle 4.4 (S.194) im Anhang 10 mit weiterführenden Angaben über das Insert und dessen Klonierung entnehmen. Der Vektor pGEM-T-Bb0732 wurde von Mitarbeitern der Gruppe von T.F. Meyer des MPI für Infektionsbiologie (Berlin, D) generiert und zur Verfügung gestellt. pMA-Vektoren mit synthetischen Sequenzen wurden von der Firma GENEART (Regensburg, D) bezogen. Mit einem Teil dieser Vektoren wurden Hefestämme transformiert. Eine Auflistung dieser Stämme findet sich in Tabelle 4.5 (S.195) in Anhang 11.

## 4.4 Präparation von Nukleinsäuren

### 4.4.1 Präparation von genomischer DNA aus *P. pastoris*

Zur Isolierung von genomischer DNA (gDNA) aus *P. pastoris* waren für die Durchführung des Präparationsprotokolls neben 3 M Kaliumacetat (pH 4,8) folgende Puffer anzusetzen:

Breaking-Puffer (RT)	TE-Puffer (RT)	Tris-Puffer (RT)
2% TritonX-100	10 mM Tris	10 mM Tris
1% SDS	1 mM EDTA	pH 7,5/8,0 (HCl)
100 mM NaCl	pH 8,0 (HCl)	
10 mM Tris-HCl, pH 8,0		
1 mM EDTA, pH 8,0		

(Der Puffer sollte immer frisch angesetzt werden.)

Alle im Folgenden beschriebenen Zentrifugationsschritte wurden bei RT durchgeführt. 15 ml MD- oder YPD-Medium wurden mit den entsprechenden Hefezellen beimpft und üN bei 30°C und 180 rpm inkubiert. Nach Ernte der Zellen bei 3.220 xg für 5 min wurde das Zellpellet mit ca. 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen und anschließend in 1 ml Breaking-Puffer resuspendiert. Es folgte eine Zugabe von ca. 300 mg Glasperlen (d = 0,45 mm) und 1 ml Chloroform. Das Gemisch wurde für 4 min kräftig gevortext und danach mit 1 ml TE-Puffer versehen. Nach erneuter Zentrifugation bei 3.220 xg für 10 min wurde der Überstand in ein 2 ml-Reaktionsgefäß (RG) überführt. Die Probe wurde wiederum zentrifugiert (18.890 xg für 10 min), um die noch vorhandenen Zelltrümmer etc. abzutrennen. Der Überstand wurde abgenommen, in ein frisches 2 ml-RG überführt und mehrfach mit 1 ml Chloroform ausgeschüttelt, wobei die Phasentrennung bei 18.890 xg für 10 min erfolgte. Die finale, proteinfreie Oberphase wurde anschließend mit 1/10 Volumen (Vol) 3 M Kaliumacetat (pH 4,8) und 2 Vol Ethanol (96%) versetzt, um die gDNA für mindestens 2 h bei -20°C auszufällen. Die Präzipitation der gDNA erfolgte durch Zentrifugation bei 18.890 xg für 15 min. Der Überstand wurde im Anschluss verworfen und das erhaltene gDNA-Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol p.a. gewaschen. Abschließend wurde die gDNA getrocknet (für ca. 15-30 min bei 37°C) und in 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) aufgenommen. Die Mengen- sowie die Qualitätsbestimmung der gDNA erfolgte mittels Gelelektrophorese (s. 4.5, S.126).

### 4.4.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um Plasmid-DNA (psDNA) aus *E. coli* XL1-Blue-Zellen zu isolieren, wurde das folgende Protokoll modifiziert nach Riggs und McLachlan [291] angewandt. Dazu mussten folgende Puffer und Lösungen angesetzt werden.

BF-Puffer (RT) <sup>1</sup>	IS-Mix (RT) <sup>2</sup>
8% (w/v) Saccharose	5 Vol (400 $\mu$ l) Isopropanol
0,5% (w/v) Triton X-100	1 Vol (80 $\mu$ l) 5 M NH <sub>4</sub> -Acetat <sup>3</sup>
10 mM Tris-HCl, pH 8,0	
50 mM EDTA, pH 8,0	
Lysozym-Lsg. (-20°C)	RNase A-Lsg. (-20°C)
20 mg/ml Lysozym <sup>4</sup>	10 mg/ml RNase A <sup>4</sup> in 0,01 M NH <sub>4</sub> -Acetat lösen (Lsg. 15 min kochen, langsam abkühlen lassen)

<sup>1</sup> BF-Puffer steril filtrieren <sup>2</sup> IS-Mix immer frisch ansetzen! <sup>3</sup> steril filtriert <sup>4</sup> diverse Hersteller

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten (falls nicht anders angegeben) bei 18.890 xg und RT. Eine 2 ml üN-Kultur des gewünschten *E. coli*-Klons wurde in LB-Medium (inkl. Selektionsmarker) bei 37°C im Roller angezogen. Diese 2 ml-Kultur wurden am nächsten Tag in ein 2 ml-RG überführt und für max. 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 190  $\mu$ l BF-Puffer plus 10  $\mu$ l Lysozym (Endkonz. ca. 1 mg/ml) resuspendiert. Die Zellen wurden für 1 min in kochendem Wasser lysiert und auf Eis abgekühlt. Eine anschließende Zentrifugation für 15 min sedimentierte Proteine und Zelltrümmer als auch gDNA. Das entstandene Pellet wurde mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt, ohne den erhaltenen Überstand überführen zu müssen, denn dieser wurde zur Fällung der psDNA (und RNA) mit 480  $\mu$ l IS-Mix versetzt, gemischt und optional für 5-15 min bei RT inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation zur Sedimentierung der psDNA wurde der Überstand dekantiert und das entstandene Pellet mit 500  $\mu$ l 70%igem Ethanol gewaschen. Nach weiterer, zweiminütiger Zentrifugation und Entfernen des Überstandes wurde das Pellet für ca. 15-30 min bei 37°C getrocknet und schließlich in 100  $\mu$ l 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) inkl. 3  $\mu$ l RNase A-Lösung aufgenommen. Die Spaltung vorhandener RNA durch die zugegebene RNase A erfolgte während 30-minütiger Inkubation bei 37°C. Im Anschluss daran konnte die isolierte psDNA einer Kontrollrestriktion unterzogen (s. 4.7.2, S.133) oder bei -20°C gelagert werden. Die psDNA konnte generell direkt weiterverwendet werden, zum Sequenzieren musste sie jedoch noch einer Aufreinigung unterzogen werden.

Für präparative Zwecke und um eine reinere Plasmid-Minipräparation zu erzielen, wurde psDNA i.d.R. mit Hilfe des "QIAprep® Spin Miniprep"-Kits der Firma QIAGEN isoliert. Zur Vorbereitung wurde eine üN-Kultur der entsprechenden *E. coli*-Kultur nach Anleitung des Kits aufgearbeitet. Für die üN-Kultur wurden 10 ml LB-Medium mit dem/n entsprechenden Antibiotikum/a zur Selektion mit *E. coli*-Zellen angeimpft und bei 35-37°C im Roller kultiviert. Pro Säule wurden 2-5 ml einer üN-Kultur in das Protokoll "Plasmid DNA Purification Using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge" eingesetzt. Anstatt des Elutionspuffers wurde die isolierte psDNA in 50  $\mu$ l sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgenommen. Dies kann Probleme beim anschließenden Sequenzieren durch das im Elutionspuffer evt. vorhandene EDTA im Vorfeld unterbinden.

Um eine höhere Quantität zu erreichen, wurden MIDI-Präparationen (besonders bei *low copy*-Plasmiden) durchgeführt. Dazu wurde das "NucleoBond Xtra Midi Plus"-Kit (MACHEREY NAGEL) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren (DNA-Ausbeute meist 0,5-1  $\mu$ g/ $\mu$ l). Die Elution erfolgte auch hier mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>.

Alternativ konnte die mittels Lysozym isolierte psDNA auch direkt nach Präparation einer Aufreinigung mit dem "Nucleo Spin Extract II"-Kit (MACHEREY NAGEL) unterzogen werden oder

phenolisiert werden: Im ersten Schritt musste die wässrige Phase mit 200  $\mu\text{l}$  10 mM Tris-HCl, pH 8,0 vergrößert werden. Danach wurde zweimal mit 1 Vol Phenol-Chloroform ausgeschüttelt. Die Zentrifugationen erfolgte jeweils für 5 min bei 13.000 rpm und die erhaltenen Überstände wurden jeweils in ein neues RG überführt. Danach wurde mit 1 Vol Chloroform ausgeschüttelt, für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der abgenommene Überstand mit 1 Vol 5 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  und 5 Vol Ethanol (96%) versetzt. Die Fällung erfolgte für 1 h bei RT. Um ein psDNA-Pellet zu erhalten, wurde erneut für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde die psDNA mit 70%igem Ethanol p.a. gewaschen. Es folgte wiederum eine Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm. Nach Trocknen der psDNA wurde diese in 30  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{dest}$  oder 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 eluiert.

### 4.4.3 Präparation von Gesamt-RNA aus *F. graminearum* und cDNA-Synthese

#### RNA-Präparation

Für die RNA-Präparation wurde gekeimtes Myzel von *F. graminearum* verwendet. Die Kultivierung erfolgte entweder in 100 ml SNA- oder in CM-Medium. Die Konidienkonzentration, mit der inokuliert wurde, betrug bis zu  $1,6 \cdot 10^7$  Konidien/ml. Anschließend wurden die Konidien bei 28°C und 180 rpm inkubiert bis ausreichend Myzel vorhanden war. Folgende Puffer und Lösungen wurden neben RNase-freiem Wasser für die Durchführung der Präparation benötigt:

Zellysepuffer	Proteinpräzipitationspuffer
2% SDS	4 M NaCl
68 mM (tri)Na-Citrat	17 mM (tri)Na-Citrat
132 mM Citronensäure	33 mM Citronensäure
pH 3,5	pH 3,5

Für alle RNA-Lösungen gilt, dass diese nach Zugabe von 0,1% DEPC für 2 h bei 30°C bis 37°C oder üN bei RT ausgeschüttelt und anschließend autoklaviert werden müssen. DEPC inaktiviert und zerstört alle Proteine und RNAsen, die sehr widerstandsfähig sind und auch den Autoklavievorgang überstehen. Die Zugabe von DEPC soll eine Kontamination durch exogene RNAsen verhindern.

Das gekeimte Myzel wurde zu je 20 ml in 50 ml Falcons überführt und für 15 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das erhaltene (Achtung: noch etwas lose!) Pellet wurde anschließend vom Medium mittels eines 40  $\mu\text{m}$  oder 100  $\mu\text{m}$  Siebes (Wilson-Sieves) getrennt, um zu vermeiden, dass das lose Myzel nicht verloren geht. Danach wurde das Myzel zu je 100 mg Material in 2 ml-RGs überführt. Die anschließende Präparation erfolgte nach einer Modifikation des US-Patents 5,973,137 von Gentra-Systems, Purescript<sup>®</sup>. Das Myzel wurde in einen Mörser oder alternativ in ein mit zu 1/3 mit Glasperlen (0,75-1 mm  $\varnothing$ ) gefülltes 2 ml-RG gegeben. In beiden Fällen wurde 1 ml Zellysepuffer vorgelegt. Durch Mörsern in Seesand oder durch starkes Vortexen (ca. 10 min) im Fall der Glasperlenvariante wurden die Zellen aufgebrochen. Die Suspension wurde anschließend in ein frisches RG überführt und es wurden 340  $\mu\text{l}$  Proteinpräzipitationspuffer zugegeben. Für die Glasperlenvariante war kein neues Gefäß notwendig. Nach Zugabe des Proteinpräzipitationspuffers wurde ca. 10-mal invertiert oder kurz sanft gevortext und für 5 min auf Eis inkubiert. Die ausgefällten Proteine wurden als weiße Trübung sichtbar. Diese und der restliche Seesand bzw. die Glasperlen konnten nun für 10 min bei 13.000 rpm und RT abzentrifugiert werden. Es wurde ein festes Pellet erwartet, welches Zelltrümmer, DNA und Proteine beinhaltet. Der klare Überstand (ohne Zelltrümmer) wurde in ein neues RG überführt. Nach Zugabe von 1 Vol Isopropanol und gutem Mischen wurde für mindestens 15 min die RNA bei RT oder üN bei -20°C gefällt. Das resultierende RNA-Präzipitat wurde für

5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das RNA-Pellet mit 75%igem Ethanol p.a. gewaschen. Nach dem Waschen wurde der Überstand vollständig entfernt und das RNA-Pellet luftgetrocknet. Abschließend wurde das RNA-Pellet in 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{DEPC}$  aufgenommen. Die Lagerung erfolgte kurzfristig bei  $-20^\circ\text{C}$  bzw. längerfristig bei  $-80^\circ\text{C}$ . Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Die Überprüfung der Qualität und Intaktheit erfolgte durch Auftrennen von ca. 1,5  $\mu\text{g}$  RNA auf einem denaturierenden Agarosegel (s. 4.5.3, S.128) oder alternativ auf einem  $\text{TBE}_{DEPC}$ -Gel (s. 4.5.1, S.127).

### DNase-Behandlung der isolierten RNA

Um eine spätere genspezifische Amplifikation mit gDNA in der anschließenden PCR zu verhindern, wurde die restliche gDNA vor der Reversen Transkription mit Hilfe einer DNase-Behandlung entfernt. Für die DNase-Behandlung wurde u.a. die DNaseI von INVITROGEN (Karlsruhe, D) verwendet. Der DNaseI-Verdau konnte nachträglich erfolgen oder in die RNA-Präparation vor den Fällungsprozess integriert werden. In die DNase-Behandlung wurden i.d.R. 5  $\mu\text{g}$  der isolierten RNA eingesetzt und die DNase-Behandlung nach Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt. Die DNase-behandelte RNA konnte bis zur Reversen Transkription (cDNA-Synthese) bei  $-80^\circ\text{C}$  längerfristig aufbewahrt werden.

### cDNA-Synthese

Für die Umschreibung der DNase-behandelten RNA mittels *Reverser Transkriptase (RT)* wurden oligodT-Primer verwendet, um zu gewährleisten, dass ausschließlich mRNA in cDNA umgeschrieben wird. Die oligodT-Primer lagern sich an den PolyA-Schwanz der mRNA an und ermöglichen auf diese Weise die Umschreibung in cDNA. In dieser Arbeit fand u.a. das "Cloned AMV First Strand cDNA Synthesis"-Kit von INVITROGEN (Karlsruhe, D) Anwendung. In eine Reaktion wurden in dieser Arbeit 2  $\mu\text{g}$  RNA eingesetzt und den Angaben des Herstellers zur Durchführung gefolgt. Die erhaltene cDNA konnte anschließend in eine semiquantitative PCR (s. 4.6.4, S.131) eingesetzt werden.

### 4.4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung einer Nukleinsäurelösung erfolgte photometrisch ("PHARMACIA Biotech GeneQuant II", RNA/DNA Calculator) durch Messung der Absorption bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$ . Zudem konnten die Absorptionswerte bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$  und  $320 \text{ nm}$  gemessen werden. Der Konzentrationsberechnung liegt zugrunde, dass eine 50  $\text{ng}/\mu\text{l}$  dsDNA-Lösung und eine 40  $\text{ng}/\mu\text{l}$  RNA-Lösung jeweils einen  $\text{OD}_{260\text{nm}}$ -Wert von 1 haben. Die Konzentration konnte darauf basierend nach folgender Formel berechnet werden:

$$c [\text{ng}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260\text{nm}}\text{-Wert} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot F$$

F bezeichnet den Multiplikationsfaktor, der für dsDNA (psDNA, gDNA) einen Wert von 50 und für RNA einen Wert von 40 annimmt. Die Reinheit der Nukleinsäure-Lösung konnte mit nachfolgender Formel berechnet werden:

$$\text{Reinheit} = \text{OD}_{260\text{nm}} / (\text{OD}_{280\text{nm}} - \text{OD}_{320\text{nm}})$$

Für dsDNA (psDNA) sollte ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 erzielt werden, wobei die Reinheit höher ist, je näher der Wert bei 1,8 liegt. Für RNA sollte der Wert im optimalen Fall ca. 2,0 betragen.

## 4.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zum Auftrennen von DNA-Fragmenten. In dieser Arbeit wurde diese vorwiegend dazu genutzt, PCR- und RT-PCR-Produkte sowie Plasmide bzw. Vektorkonstruk-



te zu überprüfen und DNA-Konzentrationen abzuschätzen. Zu klonierende Fragmente konnten auch wieder aus dem Agarosegel gereinigt werden. Mit einem denaturierenden Gel war es zudem möglich, isolierte RNA zu überprüfen.

### 4.5.1 DNA-Agarosegele

In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich 1,0-1,2%ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung eines Gels wurde die entsprechende Menge (w/v) Agarose (LE Agarose; BIOZYM, Hessisch Oldendorf, D) abgewogen und mittels Aufkochen in der Mikrowelle in 1x-TBE-Puffer gelöst. Die 5x-TBE-Stocklösung, pH 8,3 setzte sich folgendermaßen zusammen:

445 mM **T**ris  
 445 mM **B**orsäure  
 10 mM **E**DTA (Na<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O) (pH 8,0)  
 (1x-Lösung verwenden!)

Die aufgekochte Agarose wurde nach dem Aufkochen auf ca. 60-70°C gekühlt. Optional nach Abkühlen: Zugabe von Ethidiumbromid (EtBr) mit einer Endkonzentration von 0,05 µg/ml - erspart Färben nach dem Gellauf. Die Agarose-TBE-Lösung wurde anschließend in einen abgedichteten Gelschlitten ("Horizon Gel Casting System 11-14"; GIBCO BETHESDA RESEARCH LABORATORIES -Life Technologies., Inc., USA) gegossen. Dieser wurde mit einem gewünschten Probenastchenkamm versehen und die Agarose danach für ca. 15 min auspolymerisieren gelassen. Das erstarrte Gel wurde zur Verwendung mit dem Schlitten in eine mit 1x-TBE-Puffer gefüllte Gelkammer bzw. Flachbett-Agarosegelelektrophorese-Apparatur (Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus "Horizon. 11-14"; GIBCO BRL oder BIO-RAD, München, D) eingesetzt. Die Oberfläche des Gels sollte nach Einsetzen von 1x-TBE-Puffer bedeckt sein.

Kurz zusammengefasst war die Zusammensetzung eines Agarosegels die Folgende:

1 - 1,2% (w/v) Agarose  
 5 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml; Endkonz. 0,05 µg/ml)  
 ad 100 ml 1x-TBE-Puffer

Anschließend wurden die DNA-Proben neben einem entsprechenden Nukleinsäure-Molekulargewicht-Standard aufgetragen: Gene Ruler<sup>TM</sup> 1 kb oder 100 bp von FERMENTAS (St. Leon-Rot, D) oder 2log- bzw. 1 kb- und 100 bp-DNA-Ladder von NEW ENGLAND BIOLABS (NEB, Frankfurt/Main, D). Alle Proben wurden mit einer Endkonzentration von 1x-DNA-Ladepuffer versehen.

Ein 6x-DNA-Ladepuffer konnte in 2 Varianten angesetzt werden:

Variante 1	Variante 2
0,25% Bromphenolblau	0,2% Bromphenolblau
0,25% Xylencyanol FF	60 mM EDTA
30% Glycerol	60% Glycerol

Für die Gelelektrophorese legte man je nach gewünschter Auftrennungsqualität eine konstante Spannung von 90-120 V an (Spannungsquelle: "PowerPac 300", BIO-RAD). Die Länge der Auftrennungszeit variierte. Um die aufgetrennten DNA-Banden nach der Gelelektrophorese sichtbar zu machen, wurden die Agarosegele, wenn zuvor nicht mit EtBr versetzt, in einem EtBr-Bad (500 µl/L) für ca. 15 min gefärbt und anschließend kurz mit Leitungswasser abgespült. Danach wurden die durch das interkalierte, fluoreszierende EtBr (λ = 254 nm) sichtbar gemachte DNA mittels eines UV-Transilluminators ("Gene Genius BioImaging System", SYNGENE, Cambridge, UK) mit kurzweiliger UV-Strahlung von 312 nm angeregt und im Agarosegel detektiert. Mit einer am UV-Transilluminator befestigten Kamera konnte das Resultat mittels der *GeneSnap*-Aufnahmesoftware

(SYNGENE) dokumentiert werden.

Der Bestimmung der DNA-Konzentration via Agarosegelelektrophorese liegt zugrunde, dass man von einer Markerkonzentration von 50 ng DNA pro  $\mu\text{l}$  Marker ausgehen konnte, um von diesem Wert ausgehend die DNA-Konzentration der gewünschten Bande abschätzen zu können.

#### 4.5.2 Reinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Zur Reinigung von PCR-Produkten und anderen DNA-Fragmenten, z.B. nach einer Restriktion, wurden die DNA-Proben (wie soeben beschrieben) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gelextraktion erfolgte mit dem "NucleoSpin Extract IP"-Kit (MACHEREY-NAGEL) oder mit dem "QIAquick® PCR-Purification"-Kit (QIAGEN). Statt des im Protokoll angegebenen Elutionspuffers wurde, um Störungen durch z.B. EDTA in nachfolgenden Reaktionen wie der Sequenzierung zu vermeiden, mit  $\text{H}_2\text{O}_{dest}$  eluiert.

Alternativ konnte auch eine Gelextraktion über einen Glaswollefilter durchgeführt werden: Die gewünschte Bande wurde mittels einem Skalpell, nach Visualisierung durch einen UV-Transilluminator, in ein 1,5 ml- bzw. 2 ml-RG überführt. Zur Elution der DNA aus der Agarose wurde eine blaue Pipettenspitze mit etwas Glaswolle gestopft und durch den Deckel des RGs gesteckt. Eine Öffnung muss eventuell vorher mit einer Präpariernadel o.Ä. erzeugt werden. Danach wurde das Agarosestück in die Pipettenspitze gegeben und der gesamte Aufbau in ein 50 ml-Falcon gesetzt. Das Falcon wurde anschließend für 5 min bei 4.000 rpm zentrifugiert. Dabei wird die DNA und der TBE-Puffer durch die Glaswolle gedrückt, während die Agarose zurückgehalten wird. Der Durchfluß wurde anschließend in ein neues RG überführt und das Volumen auf 500  $\mu\text{l}$  mit TE bzw. 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 erhöht. Die Entfernung der restlichen Proteine erfolgte danach durch Ausschütteln mit 1 Vol Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1). Nach einer Zentrifugation für 3 min bei 13.000 rpm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues RG überführt und das restliche Phenol durch Ausschütteln mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) entfernt. Nach erneuter Zentrifugation (wie zuvor) wurde die Oberphase wiederum überführt und zur Fällung mit 1/10 Vol 3 M NaAc (pH 5,2) und 2 Vol Ethanol (96%) versetzt. Gefällt wurde im Anschluss für mindestens 30 min bei  $-20^\circ\text{C}$ . Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol p.a. gewaschen und in 20  $\mu\text{l}$  10 mM Tris-HCl, pH 7,5 bzw.  $\text{H}_2\text{O}_{dest}$  resuspendiert.

#### 4.5.3 Denaturierende RNA-Gele

Um die Qualität isolierter RNA überprüfen zu können, wurde ein denaturierendes Gel verwendet. Zur Anwendung dieser Methode wurden folgende Puffer/Lösungen benötigt.

10x-RNA-Laufpuffer	1x-RNA-Gelladepuffer
0,2 M MOPS	7,5 ml Formamid
50 mM NaAcetat	1,5 ml 10x-RNA-Laufpuffer
10 mM EDTA, pH 6,8	2,4 ml Formaldehyd (37%)
	1,0 ml $\text{H}_2\text{O}_{DEPC}$
	1,0 ml Glycerol
	0,8 ml Bromphenolblau (10%)

#### Probenvorbereitung

Ungefähr 1,5  $\mu\text{g}$  der RNA-Probe (ausreichend für ein Kontrollgel) wurden in RGs transferiert und bei zu hohem Volumen gegebenenfalls zuvor mit einer Speed-Vac<sup>TM</sup> auf ca. 5  $\mu\text{l}$  eingengt. Nach dem Einengen wurden 5-15  $\mu\text{l}$  1x-RNA-Gelladepuffer zugegeben, gevortext und für 10 min bei  $70^\circ\text{C}$  im Heizblock denaturiert. Anschließend wurde die Probe kurz abzentrifugiert und für 2 min auf Eis

vor dem Auftragen auf das Gel inkubiert.

### Gelherstellung und Elektrophorese

Für den Gellauf wurde ein 1%iges Agarosegel vorbereitet. Dazu wurde die entsprechende Menge (w/v) Agarose (LE Agarose von BIOZYM) in 1x-RNA-Laufpuffer aufgenommen und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf 50-60°C wurden unter dem Abzug 3 ml 37%iges Formaldehyd und 1 µl (10 mg/ml) EtBr zugegeben. Die entstandene Lösung wurde in einen geeigneten Gelträger mit Kamm gegossen (s. auch 4.5.1, S.127). Nach Erstarren des Gels wurde dieses in eine Gelkammer, die mit 1x-RNA-Laufpuffer gefüllt war, gelegt und die vorbereiteten Proben neben einem Größenmarker aufgetragen, wie auch für DNA-Agarosegele beschrieben. Die Elektrophoresekammer wurde zum Entfernen vorhandener RNAsen zuvor mit 0,7% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> befüllt, für 1 h inkubiert und danach mit 1x-RNA-Laufpuffer befüllt. Das denaturierende Gel wurde bei 90-95 V aufgetrennt, wobei die Laufzeit variierte. Anschließend wurde das Gel(-resultat) mit Hilfe eines UV-Transilluminators (eventuell mit Lineal) dokumentiert.

Alternative kann auch ein Agarosegel verwendet werden, dessen TBE-Puffer mit DEPC ausgeschüttelt wurde (s. 4.4.3 und 4.5.1, S.125 und 127).

## 4.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient dazu DNA-Fragmente für analytische wie auch für präparative Zwecke zu amplifizieren. Die Reaktion vervielfältigt mit Hilfe von Oligonukleotidprimern und einer thermostabilen DNA-Polymerase definierte DNA-Bereiche. Auch die "Amplifikation" von RNA-Fragmenten ist möglich, wenn diese zuvor durch die "Reverse Transkription" in cDNA umgeschrieben wurde (s. 4.4.3, ab S.125).

Eine PCR beginnt durch Hitzedenaturierung der dsDNA, wodurch beide Einzelstränge separiert werden. Anschließend erfolgt eine Abkühlung bis zur optimalen Bindungstemperatur (*annealing*) der Oligonukleotidprimer an die DNA. Durch die Aktivität einer DNA-Polymerase kann der DNA-Doppelstrang abschließend wieder hergestellt werden.

### 4.6.1 Oligonukleotide

Für die Wahl der passenden Oligonukleotidprimer sollten einige Kriterien beachtet werden:

- Die Länge (des bindenden Abschnitts ohne Überhänge) sollte nach Möglichkeit zwischen 18-30 bp betragen.
- Am 3'-Ende werden GC-reiche Sequenzen bevorzugt (ca. 2-4 Nukleotide).
- Strukturen wie Hairpins/Dimere sollten vermieden werden.
- Das Primerpaar sollte möglichst wenig intramolekulare Wechselwirkungen aufweisen.
- Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) eines Primers sollte optimalerweise zwischen 55 und 70°C liegen und sich bei einem Primerpaar um nicht mehr als 4°C unterscheiden. Folgende Formel hilft bei der Einschätzung:

$$T_m[^\circ\text{C}] = 4 \cdot (\text{G} + \text{C}) + 2 \cdot (\text{A} + \text{T}) + 4$$

(Dabei stehen G, C, A und T für die jeweiligen Basen im bindenden Teil des Primers).

- Primer, die zur Sequenzierung verwendet werden, sollten jeweils 10 Purinbasen enthalten, so dass die  $T_m$  bei ca. 60°C liegt.

Die genannten Kriterien sowie die Schmelztemperatur konnten mit Hilfe des Programmes "Clone Manager 7" (SCI ED SOFTWARE, Cary NC, USA) sowie des Online-Programmes "Oligo-calculator" (SIGMA ALDRICH, München, D) überprüft werden.

Für eine gerichtete Klonierung wurden die Primer zumeist an ihrem 5'-Ende mit passenden Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme und Schutzbasen versehen. Sollte ein *Tag* angefügt werden, wurde bei (*reverse*-)Klonierungsprimern auf das Stoppcodon verzichtet, so dass die Polypeptide/Proteine beispielsweise mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-*Tag* versehen werden konnten.

Für *Pichia*-Expressionskonstrukte sollte auf ein Vorhandensein der Kozak-Sequenz [173] geachtet werden. Diese zeichnet sich durch ein A-Nukleotid oder auch ein G-Nukleotid in der dritten Position vor dem Startcodon ATG; z.B. 5'-**A/GCC** ATG G aus und spielt bei der Initialisierung der Translation in Eukaryoten eine wichtige Rolle. Manchmal wurde auf den Einbau verzichtet, um eine optimale Hybridisierung der Primer an die Matrize zu gewährleisten. Dies geschah meist, wenn nicht-optimale Amplifikationsbedingungen vorlagen. Nach Beachtung aller Kriterien konnte die Oligonukleotid-Synthese bei der Fa. SIGMA ALDRICH in Auftrag gegeben werden.

Eine Auflistung der zur Durchführung der Arbeit verwendeten Primer sowie deren Sequenz und Verwendungszweck befindet sich in Tabelle 4.6 (S.196) im Anhang 12.

### 4.6.2 Standard-PCR

Ein Standard-PCR-Ansatz von 50  $\mu$ l sah gewöhnlich wie folgt aus:

- x  $\mu$ l Template-DNA (ca. 20 ng, gDNA oder psDNA)
- 10  $\mu$ l 5x-Puffer (Endkonz. 1x)
- 25 mM MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM)
- 1  $\mu$ l 50  $\mu$ M *forward*-Primer (1  $\mu$ M)
- 1  $\mu$ l 50  $\mu$ M *reverse*-Primer (1  $\mu$ M)
- 1  $\mu$ l 10 mM dNTP-Mix(0,2 mM)
- 0,2  $\mu$ l 5U/ $\mu$ l gotaq (0,02 U)
- 2  $\mu$ l DMSO (1%), optional
- ad 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

Eine Dimethylsulfoxid (DMSO)-Zugabe fand überwiegend bei Primern mit starken Sekundärstrukturen Verwendung. Neben der Taq-Polymerase "gotag" von PROMEGA (Mannheim, D) wurden auch sogenannte *proof-reading*-Polymerasen verwendet. Dies waren u.a. die "peqGOLD pwo-Polymerase" von PEQLAB (Erlangen, D), die "Herculase<sup>®</sup> Enhanced DNA Polymerase" und die "Herculase<sup>®</sup> II Fusion DNA Polymerase" von AGILENT/STRATAGENE (Böblingen, D).

Die DNA-Fragmente wurden in einem Thermocycler (T-Gradient, Uno II und TRIO Thermoblock, BIOMETRA, Göttingen, D) amplifiziert. Das PCR-Programm wurde zumeist wie folgt gewählt:

- (1) 94°C, 2 min (primäre Denaturation)
  - (2) 94°C, 30 sek (Denaturation im Zyklus)
  - (3) 55°C, 30 sek (Annealing, abhängig von der T<sub>m</sub> der Primer)
  - (4) 72°C, 1 min (Elongation, abhängig von Insertgröße und Geschwindigkeit der Polymerase)
  - (5) 72°C, 5-10 min (finale Elongation)
  - (6) 10°C,  $\infty$  (Abkühlphase)
- Schritt (2-4): 30-35 Zyklen

Je nach Polymerase können die einzelnen Schritte etwas variieren. Bei Thermocyclern ohne Deckelheizung musste der Ansatz zudem mit Mineralöl überschichtet werden.

Nach Abschluss der PCR wurden die Proben auf einem DNA-Agarosegel (s. 4.5.1, S.127) überprüft.

### 4.6.3 Kolonie-PCR

Für eine Kolonie-PCR wurden Zellen direkt von einem Nährboden abgenommen (mit einem sterilen Zahnstocher oder einer sterilen Pipettenspitze) und entweder direkt in den PCR-Ansatz (Ansatz wie eben aufgelistet nur ohne DNA-Template) oder in 50  $\mu\text{l}$  TE-Puffer gegeben. Das Zellen/TE-Gemisch wurde anschließend für 50-60 sek in der Mikrowelle (*full power*) erhitzt und danach das Kondenswasser kurz abzentrifugiert. Es bildete sich ein kleines Zellpellet. Aus dem Überstand wurden 1-2  $\mu\text{l}$  als DNA-Template in die PCR eingesetzt. Bei einer Kolonie-PCR wurde die primäre Denaturation auf 4 min verlängert.

### 4.6.4 Semiquantitative PCR

Die erhaltene cDNA konnte als DNA-Template für eine semiquantitative PCR, die der Analyse der Expression von Genen dient, verwendet werden. Das Programm für die semiquantitative PCR war im Grunde jenes für eine Standard-PCR. Die Zyklenzahl wurde allerdings auf 26 Zyklen minimiert, da sich die Amplifikation der cDNA zu diesem Zeitpunkt in der exponentiellen Phase befinden sollte.

### 4.6.5 Gezielte Mutagenese mittels PCR

Die *site directed mutagenesis*-PCR wurde mit dem "Phusion<sup>TM</sup> SDM-Kit" von FINNZYMES (Espoo, FI) durchgeführt. Die Angaben des Herstellers wurden geringfügig modifiziert.

Das *Primer design* für die Mutagenese-Primer wurde unter Berücksichtigung der Angaben des Herstellers geplant und die Synthese anschließend bei SIGMA-ALDRICH in Auftrag gegeben. Die generierten Primer sind ebenfalls Tabelle 4.6 (S.196) im Anhang 12 zu entnehmen. Kurz zusammengefasst:

- Nicht beide Primer mussten die Mutationsstelle tragen.
- Die Primerlänge sollte 24-30 Nukleotide betragen.
- Die Mutationsstelle sollte mittig liegen.
- Beide Primer müssen für die Religation am 5'-Ende phosphoryliert sein.
- Die Annealing-Temperatur sollte zwischen 65 and 72°C liegen. Näheres siehe Manual<sup>2</sup>.

In die SDM-PCR sollten nach Herstellerangaben 10 pg psDNA eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurden gute Erfahrungen mit dem Ansetzen einer Verdünnungsreihe gemacht. Diese reichte beispielweise von einer  $10^{-1}$ - bis  $10^{-4}$ -Verdünnung (konkret: 322,5 ng/ $\mu\text{l}$  als Ausgang zu 32,5 pg/ $\mu\text{l}$ ). Je 0,5-1  $\mu\text{l}$  der  $10^{-1}$ - bis  $10^{-4}$ -Verdünnung wurde als DNA-Template verwandt und in folgenden PCR-Ansatz eingesetzt:

0,5-1  $\mu\text{l}$  Template-DNA  
10  $\mu\text{l}$  5x-Phusion-HF-Puffer (Endkonz. 1x)  
0,5  $\mu\text{l}$  50  $\mu\text{M}$  *forward*-Primer (0,5  $\mu\text{M}$ )  
0,5  $\mu\text{l}$  50  $\mu\text{M}$  *reverse*-Primer (0,5  $\mu\text{M}$ )  
1  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP-Mix (0,2 mM)  
0,5  $\mu\text{l}$  2U/ $\mu\text{l}$  Phusion Hot Start DNA Polymerase (0,02 U)  
ad 50  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

---

<sup>2</sup>[http://www.finnzymes.com/sequencing/\\_mutagenesis/phusion\\_site-directed\\_mutagenesis\\_kit.html](http://www.finnzymes.com/sequencing/_mutagenesis/phusion_site-directed_mutagenesis_kit.html)

Das PCR-Programm wurde gewöhnlich folgendermaßen gewählt:

- (1) 98°C, 30 min (primäre Denaturation)
  - (2) 98°C, 30 sek (Denaturation im Zyklus)
  - (3) 70°C, 30 sek (Annealing, siehe auch Manual des Herstellers)
  - (4) 72°C, x min (Elongation, 15-30sek/kb, abhängig von Insertgröße)
  - (5) 72°C, 10 min (finale Elongation)
  - (6) 10°C, ∞ (Abkühlphase)
- Schritt (2-4): 25 Zyklen

Nach Beendigung der PCR wurde das Produkt mittels des "Nucleo Spin Extract II"-Kits (MACHEREY NAGEL) aufgereinigt und in 30  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{dest}$  aufgenommen. Ein Agarosegel erübrigte sich, da die geringen Produktmengen nicht visualisiert werden können. 10  $\mu\text{l}$  aufgereinigtes Produkt wurden anschließend über die Phosphate an den Primerenden folgendermaßen religiert:

- 10  $\mu\text{l}$  aufgereinigtes PCR-Produkt
- 1,5  $\mu\text{l}$  10x-T4-Ligase-Puffer (Endkonz. 1x, NEB)
- 1  $\mu\text{l}$  T4-Ligase (20 U/ $\mu\text{l}$ , 400 kohäsive Enden/ $\mu\text{l}$ , NEB)
- ad 15  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{dest}$
- > Inkubation für 2 h, 22°C

Nach der Ligation mussten mittels einer Restriktion mit DpnI die noch vorhandenen methylierten und hemimethylierten Ausgangsplasmide entfernt werden, um nur die durch SDM modifizierten Plasmide in eine *E. coli*-Transformation einzusetzen. Dazu wurden der folgende Ansatz hergestellt:

- 15  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz
- 2  $\mu\text{l}$  10x-Puffer 4 (Endkonz. 1x, NEB)
- 0,5  $\mu\text{l}$  DpnI (20 U/ $\mu\text{l}$ , NEB)
- ad 20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{dest}$
- > Inkubation für 1 h, 37°C

Sowohl nach PCR, Ligation als auch nach DpnI-Restriktion konnte jeweils eine Lagerung bei +4°C bzw. -20°C erfolgen. Nach der Restriktion wurden letztendlich mit 5  $\mu\text{l}$  des Ansatzes *E. coli*-Zellen transformiert (s. 4.8.2, S.136)

## 4.7 Methoden zur DNA-Klonierung

In den nächsten Abschnitten soll auf diverse Methoden, die in Klonierungsstrategien der vorliegenden Arbeit Berücksichtigung finden konnten, eingegangen werden.

### 4.7.1 Anfügen eines 3'-A-Überhanges

Manche (Zwischen-)Klonierungsvektoren wie z.B. pGEM-T oder pCR2.1-TOPO, welche an ihren 5'-Enden T-Überhänge besitzen, benötigen für die Klonierung ein Gegenstück mit komplementären A-Überhängen an den 3'-Enden. Um diese zu generieren, wird ausgenutzt, dass Taq-Polymerasen ein Adenin-Nukleotid an das 3'-Ende von etwa 90% aller PCR-amplifizierten Fragmente anfügen. *Proofreading*-Polymerasen mit Exonuklease-Aktivität (z.B. Pwo-Polymerase oder Herculase®II-Polymerase) können diese nicht erzeugen. Infolge dessen musste nach Amplifikation mit eben genannten Polymerasen für die Ligation das PCR-Produkt direkt nach der PCR oder nach einer Aufreinigung mit A-Überhängen versehen werden. Ein Reaktionsansatz sah gewöhnlich wie folgt aus:

16  $\mu\text{l}$  gereinigter PCR-Ansatz  
1  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP-Mix (bzw. 10 mM dATP)  
2  $\mu\text{l}$  10x-Taq-Pol-Puffer oder 4  $\mu\text{l}$  5x-Taq-Pol-Puffer (Endkonz. 1x)  
1  $\mu\text{l}$  Taq-Polymerase  
ad 20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{dest}$

Jede herkömmliche Taq-Polymerase konnte in den Ansatz eingesetzt werden. Der Ansatz wurde anschließend für 30 min bei 72°C inkubiert. Eine nachfolgende Aufreinigung war nicht erforderlich, d.h. der Ansatz konnte direkt in die Ligation (s. 4.7.5, S.134) eingesetzt werden.

### 4.7.2 Restriktion

Restriktionsendonukleasen (des Typs II) schneiden DNA an spezifischen Stellen (palindrome Sequenzen) von meist 6-8 bp. Durch die Spaltung der kovalenten Bindung zwischen dem Ribose- und dem Phosphat-Rest entstehen charakteristische Enden, die wiederum mit Ligasen neu verknüpft werden können. Je nach Enzym werden "klebrige Enden" (*sticky ends*; 5'- oder 3'-Überhänge) oder "glatte Enden" (*blunt ends*, keine Überhänge) generiert. In dieser Arbeit diente die Restriktionsanalyse u.a. dazu Plasmide zu verifizieren oder um DNA-Fragmente für eine Klonierung zu restringieren.

Verwendung fanden in dieser Arbeit hauptsächlich, wenn nicht anders angegeben, Restriktionsenzyme der Firmen NEB (Frankfurt/Main, D) oder FERMENTAS (St. Leon-Roth, D). Nach Möglichkeit wurde bei einer Restriktion mit mehreren Enzymen versucht, die Restriktionen gleichzeitig durchzuführen. Es konnte jedoch auch der Fall sein, dass eine sequentielle Restriktion notwendig war, wenn z.B. die Reaktionstemperatur der Enzyme unterschiedlich bzw. eine Pufferverträglichkeit nicht vorhanden war. Dann musste das Enzym nach der ersten Reaktion inaktiviert werden. Dies geschah i.d.R. mittels Hitze durch eine Inkubation von 20 min bei 65°C oder 80°C (abhängig vom Enzym). Optional konnte das Enzym auch durch eine Chloroform-Extraktion aus dem Ansatz entfernt werden. Wurde auch ein Pufferwechsel nötig, wurde die DNA mit 3 M NaAc (pH 5,2) gefällt. Die Restriktion eines (leeren) Expressionsvektors erfolgte i.d.R. sequentiell, da sich die Enzyme aufgrund ihrer Größe in der oft "schmalen" MCS (*multiple cloning site*) gegenseitig behindern konnten, wenn die Erkennungsschnittstellen sich nah (< 40 bp) beieinander befanden.

Für die Überprüfung von isolierten Plasmiden wurden je 3  $\mu\text{l}$  der psDNA mit 1 Unit des entsprechenden Enzyms für ca. 60 min inkubiert. Eine Unit ist definiert als die Enzymmenge, die 1  $\mu\text{g}$  DNA in 60 min vollständig restringiert. Präparative Restriktionsansätze wurden 1-2 h (je nach DNA-Menge und je Enzym bei sequentieller Restriktion) inkubiert. Die eingesetzte Enzymmenge lag dabei ca. 10% über der Mindestmenge (z.B. 11 Units pro 10  $\mu\text{g}$  DNA). Ein Standard-Restriktionsansatz (10  $\mu\text{l}$ ) sah gewöhnlich wie folgt aus:

200 ng DNA  
1  $\mu\text{l}$  10x-Reaktionspuffer (enzymabhängig für optimale Aktivität; Endkonz. 1x)  
1  $\mu\text{l}$  10x-BSA (Rinderserumalbumin, *bovine serum albumin*; optional, Endkonz. 1x)  
0,2 U Restriktionsenzym  
ad 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{dest}$

Die Restriktion erfolgte für mind. 1 h bei 37°C. Zur Überprüfung der Restriktion wurde der Ansatz mittels einer Agarosegelelektrophorese (s. 4.5.1, S.127) überprüft.

### 4.7.3 Generierung von "glatten Enden" (*blunt ends*)

In manchen Fällen konnten Vektor und Insert nicht über gleiche/passende Enden nach der Restriktion kloniert werden. Dann mussten durch Restriktion erzeugte "klebrige Enden" (*sticky ends*)

“geglättet” werden. Dies konnte mit Hilfe des Klenow-Fragments (große Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *E. coli*) gewährleistet werden. Dabei wurden 3'-Überhänge entfernt bzw. 5'-Überhänge mit dNTPs aufgefüllt. Ein Standard-Ansatz (50  $\mu\text{l}$ ) sah gewöhnlich wie folgt aus:

10  $\mu\text{l}$  gereinigtes DNA-Fragment (in  $\text{H}_2\text{O}_{dest}$ )  
1  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP-Mix  
5  $\mu\text{l}$  10x-Puffer 2 (NEB)  
1  $\mu\text{l}$  Klenow-Fragment (5 U/ $\mu\text{l}$ ; NEB)  
ad 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{dest}$

Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei 25°C inkubiert. Das Enzym musste anschließend durch Ausschütteln mit Phenol/Chloroform entfernt werden, da die Zugabe von EDTA zum Abstoppen die nachfolgende Dephosphorylierung (s. 4.7.4) gehemmt hätte. Optional konnte auch eine Aufreinigung mit dem “Nucleo Spin Extract IP”-Kit (MACHEREY NAGEL) bei der die Elution des aufgereinigten Produktes mit  $\text{H}_2\text{O}_{dest}$  erfolgte.

### 4.7.4 Dephosphorylierung von Restriktionsstellen

Um Selbstligationen von Vektorfragmenten zu vermeiden, war es notwendig, vor der Ligation freie 5'-Enden von DNA-Molekülen zu dephosphorylieren. Dabei wurden die 5'-Phosphatreste der restringierten DNA mit Hilfe der Antarktische Phosphatase (AP; NEB, Frankfurt/Main, D) entfernt. Zu diesem Zweck wurde die entsprechende DNA mit AP für 60 min bei 37°C inkubiert. Ein exemplarischer Dephosphorylierungsansatz sah folgendermaßen aus:

x  $\mu\text{l}$  Vektor-DNA (restringiert)  
5  $\mu\text{l}$  10x-AP-Puffer (1/10 Vol; NEB)  
1  $\mu\text{l}$  AP (AP; 5U/ $\mu\text{l}$ )  
ad 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{dest}$

Abgestoppt wurde die Reaktion für 5 min bei 65°C. Die dephosphorylierte DNA konnte im Anschluss direkt in eine Ligation (s. 4.7.5) mit der T4-Ligase von NEB eingesetzt werden, da diese AP im Gegensatz zur CIP (*calf intestinal phosphatase*) durch Hitze inaktiviert werden kann und die Komponenten der Dephosphorylierungsreaktion die Ligation nicht beeinträchtigen. Bei Verwenden nicht-kompatibler Phosphatasen und Ligasen sollte eine Aufreinigung mit dem “Nucleo Spin Extract IP”-Kit (MACHEREY NAGEL) mit finaler Elution des aufgereinigten Produktes in  $\text{H}_2\text{O}_{dest}$  erfolgen.

### 4.7.5 Ligation

Für den Ligationsansatz wurden die zu ligierenden Fragmente in einem äquimolaren Verhältnis eingesetzt. Zur Ligation von PCR-Produkten in (mehrfach) größere Plasmide wurden die Inserts in 3-5fachem Überschuss zugegeben. Vor der Ligation war es wichtig, die zu ligierenden Produkte mit Hilfe des “NucleoSpin® Extract IP”-Kits (MACHEREY-NAGEL) aufzureinigen, um störende Komponenten z.B. aus der Restriktion zu entfernen.

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase von NEB (Frankfurt/Main, D) verwendet und ein exemplarischer Ansatz sah folgendermaßen aus.



- 2  $\mu\text{l}$  Vektor (restringiert, dephosphoryliert)
- 4  $\mu\text{l}$  Insert (aufgereinigt)
- 1  $\mu\text{l}$  10x-T4-DNA-Ligase-Puffer (Endkonz. 1x, NEB)
- 1  $\mu\text{l}$  T4-DNA-Ligase (20 U/ $\mu\text{l}$ , 400 kohäsive Ende/ $\mu\text{l}$ , NEB)
- ad 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{dest}$

Die Ligation erfolgte für 4 h bei 16°C bzw. üN bei +4°C oder für 2 h bei 22°C (RT).

Die Ligation von PCR-Produkten (mit 3'-A-Überhang) in z.B. pGEM-T (5'-T-Überhang) erfolgte wiederum mit der T4-DNA-Ligase von PROMEGA (Mannheim, D), die im Vektor-Kit inkludiert war. Sie wurde nach Herstellerangaben verwendet, wobei zumeist nur 50 ng pGEM-T-Vektor eingesetzt wurden.

Die Ligationsansätze wurden anschließend bei +4°C bis zur *E. coli*-Transformation (s. 4.8.2, S.136) gelagert.

### 4.7.6 Sequenzierung

Sämtliche Sequenzierungen von in dieser Arbeit klonierten DNA-Fragmenten oder von PCR-Produkten wurden vom DNA CLONING SERVICE (Hamburg, D) durchgeführt. Die anschließende Auswertung erfolgte mit Hilfe der CHROMAS-Software (TECHNELYSIUM PTY LTD., Tewantin QLD, AUS). Die Fragmente wurden mit Sequenzierungsprimern<sup>3</sup> in *forward*- und *reverse*-Richtung sequenziert, die im optimalsten Fall jeweils zwei miteinander überlappende Sequenz-Fragmente liefern. Die resultierenden Sequenz-Fragmente konnten im Anschluss durch Berechnung von Sequenzalignments mit Hilfe der "Clone Manager 7"-Software (SCI ED SOFTWARE, Cary NC, USA) zu einer DNA- bzw. Aminosäure-Gesamtsequenz zusammengesetzt werden. Nach Bestätigung der korrekten, da z.B. mit der NCBI-Datenbank übereinstimmend, Insert-Sequenz konnte die Klonierung fortgeführt bzw. das finale Konstrukt exprimiert werden. Sequenzierungen großer DNA-Fragmente (ca. 3 kb) wurden von der Firma AGOWA (Berlin, D) durchgeführt.

## 4.8 Generierung kompetenter Zellen und Transformationen

In diesem Abschnitt werden die Methoden zu Herstellung kompetenter *E. coli*- und *P. pastoris*-Zellen beschrieben sowie die Methoden diese mit Fremd-DNA zu transformieren.

### 4.8.1 Generierung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen nach Inoue *et al.* [148]

Eine Voraussetzung der Transformierbarkeit von *E. coli*-Zellen liegt in der Fähigkeit ihrer Kompetenz, d.h. der Fähigkeit Fremd-DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen und in ihr Genom zu integrieren. Da *E. coli*-Zellen von Natur aus nicht kompetent sind, kann durch eine Behandlung mit Calciumchlorid diesen Zellen Kompetenz verliehen werden. In dieser Arbeit wurden chemisch-kompetente Zellen für die *E. coli*-Stämme XL1-Blue und C41(DE3) mittels nachfolgend beschriebener Methode nach Inoue *et al.* [148] generiert.

Die Kultivierung der *E. coli*-Zellen erfolgte in 2 ml SOB-Medium (s. 4.2.1, S.118) üN bei 35-37°C

---

<sup>3</sup>Diese Primer sind teilweise auch aus Tabelle 4.6 auf S.196 im Anhang zu entnehmen. Einige Standard-Primer z.B. M13-*for* und M13-*rev* wurden vom Sequenzier-Service zur Verfügung gestellt.

und 200 rpm. Am folgenden Tag wurde die  $\ddot{u}$ N-Vorkultur bis auf 200 ml mit SOB-Medium aufgefüllt und unter den schon genannten Bedingungen bis zu einer  $OD_{600}$  von ungefähr 0,5 kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen für 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend bei  $+4^{\circ}\text{C}$  und  $2.500 \times g$  in einem 50 ml-RG sedimentiert. Der im weiteren Verlauf benötigte TB-Puffer setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

10 mM PIPES (pH 6,7) (steril filtriert)

55 mM  $\text{MnCl}_2$  (autoklaviert)

5 mM  $\text{CaCl}_2$  (autoklaviert)

50 mM KCl (autoklaviert)

(Der Puffer sollte immer frisch angesetzt werden.)

Das erhaltene Zellpellet wurde nach Verwerfen des Überstandes in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Nun wurde das Zellpellet nur noch in 15 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen und der Suspension 1,2 ml (= 7%) DMSO als Gefrierschutzmittel hinzugefügt. Nach erneuter 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen als 100  $\mu\text{l}$  Aliquots in neue RGs transferiert und sofort (!) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es ist wichtig darauf zu achten, dass die Zellen während der Prozedur niemals erwärmt werden, da dies die Qualität der Kompetenz und damit der Transformationseffizienz erniedrigen kann. Die kompetenten *E. coli*-Zellen konnten für mehrere Monate bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und bei Bedarf in eine Transformation (s. 4.8.2 und 4.8.3) eingesetzt werden.

### 4.8.2 Transformation von *E. coli* XL1-Blue nach Sambrook & Russell [301]

Zur Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* XL1-Blue-Zellen wurden für einen Transformationsansatz 100  $\mu\text{l}$  der nach Inoue *et al.* [148] (vorhergehender Abschnitt 4.8.1)-hergestellten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Danach erfolgte eine Zugabe von 2-10  $\mu\text{l}$  eines Ligationsansatzes (s. 4.7.5, S.134) oder 20-50 ng psDNA (für eine Retransformation). Nach vorsichtigem Mischen wurde das Gemisch für ca. 15-30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 1-minütiger Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad und kurzes Abkühlen auf Eis. Zur Regeneration wurden 400  $\mu\text{l}$  RT-warmes, Antibiotika-freies, steriles LB-Medium zugegeben und vorsichtig durch Invertieren gemischt. Optional konnten die Zellen bis zu 1 h im Roller bei  $35-37^{\circ}\text{C}$  inkubiert werden. Die Ausplattierung der Zellen erfolgte auf einem dem Selektionsmarker des Plasmids angepassten Selektionsmedium, in Form vorgewärmter Agarplatten. Entsprechend der eingebrachten Vektorkonstrukte handelte es sich um LB-Amp100-, LB-Kan30- oder AIX-Nährböden (s. 4.2.1, S.118). Die Platten wurden anschließend  $\ddot{u}$ N bei  $35-37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert.

Für "anspruchsvolle" Konstrukte (z.B. Konstrukte  $> 9$  kb) fanden chemisch-"super-kompetente" *E. coli* XL1-Blue-Zellen des DNA CLONING SERVICE (Hamburg, D) Verwendung. 50  $\mu\text{l}$  dieser Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und danach mit max. 10% Ligationsansatz (max. 5  $\mu\text{l}$ ) versehen, vorsichtig gemischt und 10-30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 30-sekündiger Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad und kurzes Abkühlen auf Eis. Zur Regeneration wurden 200  $\mu\text{l}$  RT-warmes, Antibiotika-freies, steriles LB-Medium zugegeben und vorsichtig durch Invertieren gemischt. Optional konnten die Zellen auch in diesem Fall bis zu 1 h im Roller bei  $35-37^{\circ}\text{C}$  inkubiert werden. Anschließend wurden die Zellen, ebenfalls wie zuvor beschrieben, auf ein Selektionsmedium in Form vorgewärmter Agarplatten ausplattiert und  $\ddot{u}$ N bei  $35-37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert.

Resultierende Transformanten konnten mittels einer Plasmid-Präparation bzw. einer nachfolgenden Kontrollrestriktion genauer analysiert werden (s. 4.4.2, S.124 und 4.7.2, S.133).

### 4.8.3 Transformation von *E. coli* C41(DE3)

Um eine Überexpression von Membranproteinen zu erreichen, wurde der *E. coli*-Stamm C41(DE3) verwendet, da dieser dafür besonders gut geeignet ist [232]. Basierend auf den Expressionsvektoren pET24c(+) und pET24d(+)<sup>4</sup> der Firma NOVAGEN (Merck, Darmstadt, D) wurden die zu transformierenden Expressionsvektorkonstrukte (EVKs) durch Klonierung generiert (s. auch Tab.4.4, S.194).

Zur Transformation von *E. coli* C41(DE3)-Zellen mit einem EVK wurde ein 100  $\mu$ l-Aliquot chemisch-kompetenter *E. coli* C41(DE3)-Zellen auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurden 2-5  $\mu$ l EVK (z.B. als Plasmid-Kit-Mini-Präparation oder als Kit-aufgereinigte manuelle Präparation) gegeben und die Zellsuspension vorsichtig gemischt. Es folgte eine mind. 15-minütige Inkubation auf Eis mit anschließendem Hitzeschock für 1 min bei 42°C im Wasserbad und nachfolgender kurzer Abkühlung auf Eis. Den transformierten Zellen wurden zur Regeneration 400  $\mu$ l RT-warmes, steriles LB-Medium (ohne Antibiotikaresistenz) zugesetzt und vorsichtig gemischt. Optional konnten die Zellen bis zu 1 h bei 35-37°C im Roller regeneriert werden. Im Anschluss wurden 100 ml LB-Kan30-Flüssigkulturen mit verschiedenen Volumina (i.d.R.: 20, 50 und 100  $\mu$ l) der transformierten Zellen angeimpft. Zur Selektion wurde LB-Kan30-Medium eingesetzt, da der verwendete pET24-Expressionsvektor den Transformanten eine Kanamycinresistenz verleiht. Die Zusammensetzung des Nährmediums ist Abschnitt 4.2.1 (S.118) zu entnehmen. Die Flüssigkulturen wurden anschließend üN bei 180-200 rpm und 35-37°C inkubiert. Zusätzlich wurden 50  $\mu$ l der transformierten Zellen auf vorgewärmten LB-Kan30-Agarplatten ausplattiert und ebenfalls üN bei 35-37°C im Brutschrank inkubiert. Die Induktion der Expression der klonierten DNA-Fragmente konnte am nächsten Tag erfolgen (s. 4.10, ab S.140).

### 4.8.4 Generierung elektro-kompetenter *P. pastoris*-Zellen

Um elektro-kompetente *P. pastoris*-Zellen zu generieren, wurden 100 ml YPD-Medium mit einer Vorkultur (üN-Kultivierung in 5 ml YPD) des zu transformierenden *Pichia*-Stammes (hier GS115 $\Delta$ *ugt51b1* oder PPY12 $\Delta$ *ugt51b1*, s. auch Tab.4.2, S.192) angeimpft und üN bei 30°C und 180-200 rpm im Schüttler angezogen bis eine OD<sub>600</sub> im Bereich von 0,8 bis 1,2 erreicht wurde. Alle im weiteren Verlauf notwendigen Zentrifugationsschritte erfolgten für 5 min bei 3.220 xg und +4°C. Die kultivierten Zellen wurden per Zentrifugation sedimentiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 ml sterilem, eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen wiederum nur noch in 50 ml sterilem, eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgenommen. Nach nochmaliger Sedimentierung wurden die Zellen in 8 ml sterilem, eiskaltem Sorbitol (1 M) resuspendiert und das Volumen nach wiederholter Zentrifugation durch Aufnahme in 400  $\mu$ l sterilem, eiskaltem Sorbitol (1 M) verringert. Die Zellen konnten bis zur Transformation auf Eis gelagert werden, sollten jedoch noch am Tag der Herstellung verwendet werden, da die Transformationseffizienz nicht dauerhaft stabil bleibt.

### 4.8.5 Transformation von *P. pastoris*

Um die in dieser Arbeit zu transformierenden *Pichia*-Stämme mit einem Vektorkonstrukt transformieren zu können, mussten diese Konstrukte, wie nachfolgend beschrieben, vorbereitet werden.

#### Linearisierung der pPIC3.5- und pGAPz-B-Vektoren

Die Integration von DNA-Sequenzen in das Genom von *P. pastoris* erfolgt durch ein *Cross-over*-Ereignis. Ein doppelt homologer *Cross-over* im *Aox1*-Locus, genauer zwischen dem chromosomalen *Aox1*-Gen und den homologen AOX1-Fragmenten auf dem pPIC3.5-Plasmid (5'-AOX1-Promotor

<sup>4</sup>Novagen, Merck Chemicals: <http://www.merck-chemicals.de/life-science-research/>; *technical bulletins*

und 3'-AOX1-Terminator) führt zum Verlust der AOX-Aktivität. Eine weitere Integrationsmöglichkeit wäre eine einfache Rekombination (im punktmultierten) *his4*-Locus. In diesem Fall bliebe die AOX(-Aktivität) erhalten. Letzteres Integrationsereignis sollte in dieser Arbeit erreicht werden. Weiteres zu den Rekombinationsprozessen ist dem Manual<sup>5</sup> des Herstellers INVITROGEN (Karlsruhe, D) zu entnehmen.

Für eine Integration in das Genom der Hefe musste die zu integrierende DNA-Sequenz linear vorliegen. Dazu wurden jeweils 20 µg psDNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert, im optimalsten Falle mit BglIII. In dieser Arbeit erfolgte die Linearisierung aber auch mit AatII und NdeI für pPIC3.5-hp0421 und SalI für die pCFP-ugt51b1-Konstrukte. Als weitere "Basis" für ein EVK stand pGAPz-B ebenfalls von INVITROGEN zur Verfügung. Die Rekombinationsprozesse zu diesem Vektor über den *GAP*-Promotorbereich lassen sich ebenfalls im Detail dem Manual<sup>6</sup> des Herstellers entnehmen. pGAPz-B-EVKs wurden in der vorliegenden Arbeit mit AvrII und AgeI linearisiert. Die Genexpression erfolgte bei diesem Vektor konstitutiv, während sie bei Verwendung von pPIC3.5. mit Methanol erst induziert werden musste. Die linearisierte psDNA wurde im Anschluss mit Hilfe des "NucleoSpin Extract II"-Kits von MACHEREY-NAGEL aufgereinigt, wobei die Elution mit 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> erfolgte. Eine Überprüfung der Vollständigkeit der Linearisierung konnte dann mittels einer Agarosegelelektrophorese erfolgen (s. 4.5.1, S.127).

### Transformation mittels Elektroporation

Die Transformation der generierten, kompetenten *P. pastoris*-Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Dazu wurden je Transformationsansatz 80 µl elektro-kompetente *P. pastoris*-Zellen vorsichtig mit 5-10 µg (max. Volumen 20 µl) linearisierter psDNA in einer eiskalten Elektroporationsküvette (2 mm *gap* von PEQLAB, Erlangen, D) gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte im Anschluss bei 1500 V für ca. 5 ms (Feldstärke 7500 V/cm; "Elektroporator 2510"; EPPENDORF, Hamburg, D). DIREKT danach wurde 1 ml Sorbitol (1 M) hinzugegeben und die Zellsuspension für 2 h bei 30°C ohne diese zu Schütteln (!) regeneriert. Abschließend wurden je 100 µl Aliquots auf einem entsprechenden Selektionsmedium (s. 4.2.2, S.119) ausgestrichen und für ca. 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Bei bestimmten Selektionen (z.B. auf Zeocin) konnte sich die Inkubationszeit um 1-2 Tage verlängern.

## 4.9 Screening generierter, putativer *P. pastoris*-Transformanten

Das Screening generierter, putativer *P. pastoris*-Transformanten konnte neben der genotypischen Verifizierung mittels PCR mit einem Methanol-Screening und *in situ*-AOX-Aktivitätsfärbungen ergänzt werden.

### 4.9.1 Methanol-Screening

Das Methanol-Screening wurde nach Angaben des pPIC3.5-Herstellers (INVITROGEN) durchgeführt. Bei Transformation mit dem pPIC3.5-Vektorsystem ergeben sich zweierlei Rekombinationsmöglichkeiten der zu integrierenden DNA in das Genom der Hefe: Zum Einen konnte das Konstrukt doppelt homolog in den *Aox1*-Locus integrieren und den Verlust der AOX durch Insertion zur Folge haben. Zum Anderen konnte sich auch eine einfache homologe Rekombination im (punktmultierten) *his4*-Locus ereignen. In diesem Fall wären die resultierenden Zellen HIS<sup>+</sup> (Histidin-prototroph) und zur selben Zeit auch noch fähig, mit Methanol als einziger Kohlenstoffquelle gut zu wachsen. In dieser Arbeit war es notwendig zwischen Mut<sup>+</sup>-(*methanol utilization plus*) und Mut<sup>S</sup>-(*methanol*

<sup>5</sup><http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V17320>

<sup>6</sup><http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V20020>

*utilization slow*) Transformanten zu differenzieren. Aufgrund dessen wurden pro Transformationsansatz 50-100 Kolonien parallel auf MM- und MD-Agarplatten (s. 4.2.2, S.119) ausgestrichen und für 1-2 Tage bei 30°C inkubiert.

Zur Untersuchung der Mikropexophagie im Rahmen dieser Arbeit ist ein "unversehrter" *Aox1*-Locus zwingend erforderlich, da die AOX für den Katabolismus von Methanol eine wichtige Rolle spielt. Mut<sup>S</sup>-Kolonien (also solche, die auf MM deutlich schlechter wuchsen als auf MD) wurden im weiteren Verlauf nicht weiter bearbeitet. Mut<sup>+</sup>-Kolonien wurden weiter verwandt und im nächsten Schritt genotypisch auf die Präsenz der *Aox1* und des zu inserierenden Gens mittels PCR untersucht.

### 4.9.2 PCR mit genspezifischen Primern

Die genotypische Analyse resultierender *P. pastoris*-Transformanten konnte durch eine PCR mit genspezifischen Primern bezüglich der inserierten Sequenz (*coding sequence*) und der *Aox1* erfolgen. Die verwendeten Primer sind Tabelle 4.6 (S.196) zu entnehmen. Als Positivkontrollen dienten die für die Transformation generierten EVKs (z.B. als Plasmid-Mini-Präparation) im zirkulären Zustand. Im Falle von *P. pastoris* konnte für das inserierte Gen wie auch für den Nachweis der AOX1 auch der WT- bzw. der zugrunde liegende KO-Stamm als Kontrolle hinzugezogen werden. Eine PCR ohne Matrize diente der Kontrolle, dass keine Kontaminationen in den PCR-Komponenten vorlagen. Weiterführende Angaben zu einer Standard- oder Kolonie-PCR lassen sich Abschnitt 4.6 (S.129) entnehmen.

### 4.9.3 *in situ*-AOX-Aktivitätsfärbungen

Einen ersten visuellen Einblick auf die Fähigkeit von Hefezellen den Mikropexophagie-Prozess, d.h. den Peroxisomenabbau, regulär durchführen zu können, konnte mit einer Aktivitätsfärbung der Hefezellen erreicht werden. Diese Analyse basiert auf der Kopplung der Fähigkeit des Peroxisomenabbaus durch die Präsenz des Enzyms AOX. So lange AOX detektiert werden kann, wird auch eine Präsenz von Peroxisomen impliziert und umgekehrt. Eine Integrität des *Aox*-Locus kann ebenfalls durch diese Färbungen nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden die zwei nachfolgend beschriebenen Färbemethoden angewandt.

#### *in situ*-AOX-Aktivitätsfärbung nach Stasyk *et al.* [330]

Diese Aktivitätsfärbung der AOX beruht auf dem Prinzip, dass das Enzym AOX die Reaktion von Methanol mit Sauerstoff zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid katalysiert. Das Wasserstoffperoxid wiederum bildet mit Aminophenazon und einem Benzoessäurederivat, katalysiert durch eine Peroxidase, einen roten chinoiden Farbstoff. Für die Analyse wurden putative, transgene Hefezellen auf einem MM-Nährboden (s. 4.2.2, S.119) angezogen und für 2 Tage bei 30°C kultiviert. Auf jeden Nährboden wurde dann der folgende Ansatz aufgebracht:

1. 10 ml 100 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer, pH 7-7,5
2. 5 mg *ortho*-Dianisidin (giftig!)
3. 30 mg Agarose (optional Agar)
4. > alle 3 Komponenten wurden in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle aufgeköcht und auf 40-50°C abgekühlt. Danach erfolgten die Zugaben von
5. 20 mg Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB, zum Permeabilisieren der Zellwand),
6. 1/2 Minilöffelspatel Peroxidase,
7. und optional (bei wenig in der Platte verbliebenen Methanol) 200 µl Methanol.

Färben sich die Hefezellen orange-rot ist die AOX noch intakt. Bleiben die Zellen weiß, ist keine AOX1-Aktivität mehr vorhanden. Nach längerer Wartezeit können sich diese Zellen dennoch verfärben. Dies beruht auf der langsam sichtbar werdenden Aktivität der AOX2, welche auch registriert

werden kann, sollten die Hefezellen länger als 3 Tage auf der Methanol-Platte gewachsen sein. Für Näheres über AOX1 und AOX2 siehe auch in Abschnitt 2.3.1 (ab S.77).

### ***in situ*-AOX-Aktivitätsfärbung nach Sakai *et al.* [298]**

Diese Aktivitätsfärbung der AOX beruht ebenfalls auf dem Prinzip, dass das Enzym AOX die Reaktion von Methanol mit Sauerstoff zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid katalysiert. Durch Zugabe von exogenem Methanol und Peroxidase wird ein ebenfalls exogen zugegebener Redoxindikator (ABTS, 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) oxidiert. Diese Oxidation resultiert in der Verfärbung der Hefezellen zu grün-lila.

Die zu analysierenden Hefezellen wurden für zwei Tage auf Methanol-haltigem (MM)-Festmedium bei 30°C angezogen und die Zellen, wenn nicht schon zuvor eine Nylonmembran aufgelegt war, mittels einer Nylonmembran (z.B. Nytran N 0,45  $\mu\text{M}$ ; WHATMAN SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel, D) auf ein Glucose-haltiges (MD)-Festmedium transferiert und weitere 8 bis 10 h bei 30°C auf dieser belassen, um den Mikropexophagie-Prozess zu initiieren. Nach Mukaiyama *et al.* sollte regulär nach 9 h keine AOX-Aktivität mehr detektierbar sein [242]. Nach den entsprechenden Zeiträumen wurde die Nylonmembran wieder abgenommen und die auf ihr befindlichen Zellen durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff fixiert. Nach anschließendem Antauen der Membran wurde diese auf eine mit Assay-Mixtur getränkte Whatman-Papier gegeben, so dass gewährleistet werden konnte, dass die Membran gut durchtränkt war. Die Assay-Mixtur bestand aus 6 mM ABTS, 20 U/ml Peroxidase sowie 100 mM Methanol in 50 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer, pH 7,0. Verfärbten sich die Zellen innerhalb der nächsten Stunde grün-lila, ist eine AOX-Aktivität vorhanden. Blieben sie weiß, war dies ein Indiz dafür, dass die Hefezellen durch den Abbau ihrer Peroxisomen auch keine AOX-Aktivität mehr aufzeigten. Ein weiterer Nachweis der AOX-Aktivität bzw. der Präsenz des Proteins konnte mittels Immunoblot-Analyse (s. 4.13, ab S.146) geführt werden.

## **4.10 Heterologe Expression in *E. coli* C41(DE3)**

Die heterologe Expression in *E. coli* C41(DE3) wurde nach Transformation (s. 4.8.3, S.137) der Zellen mit pET-EVKs mittels IPTG induziert und aus den Zellen ein zellfreies Homogenat hergestellt. Auch aus induzierten *P. pastoris*-Transformanten (s. 4.8.5, S.137) konnte ein zellfreies Homogenat hergestellt werden. Die zellfreien Homogenate konnten z.B. für die Durchführung einer Immunoblotanalyse (s. 4.13, ab S.146) oder eines radioaktiven Enzymassays (s. 4.12.1, S.142) hergestellt werden.

### **4.10.1 Induktion der Expression in *E. coli* C41(DE3) mittels IPTG**

Die mit den EVKs transformierten *E. coli* C41(DE3)-Kulturen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bis 1,2 angezogen. Die heterologe Expression aufgenommener DNA-Fragmente wurde anschließend durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 0,4 mM induziert. Die Expression erfolgte für 3 h bei 30°C und 180-200 rpm. Nach der Induktion konnte die Herstellung des *E. coli*-Homogenates erfolgen. Diese wird im nachfolgenden Abschnitt beschrieben.

### **4.10.2 Herstellung von Homogenaten aus *E. coli* C41(DE3)-Zellen**

Proteinhomogenate der induzierten *E. coli* C41(DE3)-Zellen konnten durch folgende Zellaufschluss- bzw. Homogenisierungsmethode erzeugt werden. Der Aufschluss erfolgte mittels Ultrabeschallung unter nativen Bedingungen bei einem physiologischem pH-Wert von 7,5. Dazu wurden die IPTG-induzierten *E. coli* C41(DE3)-Zellen in 50 ml-RGs für 10 min bei +4°C und 3.220 xg sedimentiert.

Der Überstand wurde verworfen, die resultierenden Zellpellets jeweils in 3 ml eisgekühltem Homogenisierungspuffer resuspendiert und auf Eis gelagert. Der Homogenisierungspuffer (pH 7,5) setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

50 mM Tris  
15% (w/v) Glycerol  
pH 7,5 (HCl)

Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis bzw. bei +4°C. Die aufgenommenen Zellen konnten nun mittels Ultrabeschallung (Ultraschallstab "Labsonic 2000"; B. Braun) aufgebrochen werden. Dazu wurden die Zellysate 10-12 Zyklen á 10 sek mit jeweils 15 sek Pause den Ultraschallwellen ausgesetzt. Die durch die Ultrabeschallung entstandenen Zelltrümmer wurden im Anschluss für 10 min bei 3.220 xg sedimentiert und die zellfreien Überstände, die die löslichen Proteine sowie auch die Membranfraktion und geringe Mengen an endogenen UDP-Zuckern enthielten, in ein neues RG überführt. Die Lagerung konnte durch die Glycerolbeigabe im Homogenisierungspuffer bei -20°C erfolgen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach BRADFORD durchgeführt (s. 4.13.2, S.147). Optional konnte die Membranfraktion von der löslichen Fraktion getrennt werden. Dies geschah durch eine 30-minütige Ultrazentrifugation bei 100.000 xg (Avanti® J-E Centrifuge, BECKHAM COULTER, Krefeld, D) und anschließender Abnahme und Überführung des Überstandes in ein frisches RG sowie Aufnahme des Sediments in Homogenisierungspuffer und Überführung ebenfalls in ein neues RG.

### 4.11 Expression in *P. pastoris*

Die Expression in *P. pastoris* erfolgte in dieser Arbeit sowohl homolog als auch heterolog. Homologe Ereignisse waren beispielsweise die Komplementation von PPY12 $\Delta$ *ugt51b1* mit den CFP-fusionierten teilweise punkt-mutierten Varianten von UGT51B1. Heterologe Ereignisse wiederum lagen vor, wenn die SGT-Gene aus anderen Mikroorganismen, z.B. *Helicobacter pylori* oder *Borrelia burgdorferi*, stammten.

#### 4.11.1 Induktion der Expression in *P. pastoris* mittels Methanol

Das in dieser Arbeit verwendete Vektorsystem pPIC3.5<sup>7</sup> (INVITROGEN) nutzt den *Aox1*-Promotor, um die Genexpression zu kontrollieren. Dieser Promotor wird durch die Abwesenheit von Glucose und Präsenz von Methanol aktiviert. Glucose selbst hat eine reprimierende Wirkung. Die Genexpression wurde in allen Kulturen induziert, obwohl das native Gen der WT-Kontrolle konstitutiv exprimiert wurde. Auch bei Einsatz des pGAPz-B-Vektors erfolgte eine konstitutive Expression. Durch die Gleichbehandlung aller Proben sollte eine bessere Vergleichbarkeit der Resultate gewährleistet werden.

Zur Induktion wurden *P. pastoris*-Zellen (WT-, KO- und/oder transgene Stämme) einer 50-100 ml üN-Kultur (YPD oder MD; s. 4.2.2, S.119) durch Zentrifugation bei 1.500 xg und für 3 min sedimentiert und mind. einmal mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> bzw. direkt mit MM-Medium gewaschen und abschließend in 50-100 ml MM-Medium resuspendiert. Die Induktion der Genexpression erfolgte zumeist üN (16-24 h) bei 30°C und 180-200 rpm. Für bestimmte Expressionen wurde die Induktion auf 2-4 h verkürzt, da dieser Zeitraum eine bestmögliche Expression aufwies. Anstelle von Glucose (YPD) konnte auch Glycerol (MGly) als Kohlenstoffquelle (s. 4.2.2, S.119) für die Kultivierung verwendet werden: Da der *Aox1*-Promotor nicht durch Glycerol, wenn Methanol zugegen ist, gehemmt wird, konnte in diesem Fall auf den Waschvorgang verzichtet werden. Die Induktion erfolgte demnach durch Zugabe von 500  $\mu$ l Methanol pro 100 ml Kulturvolumen (Inkubation wie zuvor beschrieben). Nachteilig ist bei dieser Variation, dass sich die Generationszeit der *Pichia*-Zellen verlängert.

<sup>7</sup><http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V17320>

Aus den induzierten Zellen konnte anschließend ein zellfreies Homogenat, wie es im nachfolgenden Abschnitt beschrieben wird, hergestellt werden.

### 4.11.2 Herstellung von Homogenaten aus *P. pastoris*-Zellen

Zur Herstellung eines Proteinhomogenats aus induzierten *Pichia*-Zellen mussten alle im Verlauf angewandten Zentrifugationsschritte für 5 min bei 3.220 xg und +4°C erfolgen. Die Zellen einer induzierten 50-100 ml-Kultur wurden sedimentiert, der Überstand und die Zellen in 2 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer (Zusammensetzung s. 4.10.2, S.140) aufgenommen. Zu der Suspension wurden ca. 500 µl Glasperlen (d = 0,4 mm) gegeben und das Gemisch zum Vorkühlen für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Gemisch mit Argon überschichtet, um eine Schutzatmosphäre zu gewährleisten, die eine Oxidation durch den entstehenden Sauerstoff verhindert, welcher durch den folgenden Aufbruch "erzeugt" wird. Der erste Aufbruch erfolgte durch kräftiges Mischen (mit Hilfe eines ein *Vortex*-Geräts) für 16 Zyklen á 30 sek. Nach Zugabe von 1 ml Homogenisierungspuffer wurde die Suspension ohne Glasperlen in ein 15 ml-RG überführt und anschließend 6-mal für jeweils 10 sek mit einem Ultraschallstab ("Labsonic 2000"; B. Braun) auf Eis sonifiziert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand, der das zellfreie Proteinhomogenat darstellte, in ein neues RG überführt. Die Lagerung konnte durch die Glycerolbeigabe im Homogenisierungspuffer bei -20°C erfolgen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde auch hier nach BRADFORD durchgeführt (s. 4.13.2, S.147).

Optional konnte noch die Membranfraktion von der löslichen Fraktion getrennt werden. Dies geschah durch eine 30-minütige Ultrazentrifugation bei 100.000 xg (Avanti® J-E Centrifuge, BECKHAM COULTER, Krefeld, D) und anschließender Abnahme und Überführung des Überstandes in ein frisches RG sowie Aufnahme des Sediments in Homogenisierungspuffer und Überführung ebenfalls in ein neues RG.

## 4.12 Enzymassays

In diesem Abschnitt wird der in dieser Arbeit durchgeführte Enzymassay zur Bestimmung der SGT-Aktivität generell beschrieben und seine Anwendung zur Ermittlung einer Enzymkinetik. Der Assay basiert auf der Umsetzung von radioaktiven Substraten.

### 4.12.1 *In vitro*-SGT-Assay

Zur Untersuchung der SGT-Aktivität wurden *in vitro* Enzymassays mit radioaktiv-markierten Substraten oder Akzeptoren durchgeführt.

#### Prinzip des *in vitro* Enzymassays

Ein zellfreies Proteinhomogenat (s. 4.10.2 und 4.11.2, S.140 und 142) konnte unter definierten Bedingungen mit Akzeptor- und Donor-Substraten inkubiert und die aus dieser Reaktion resultierenden Produkte analysiert werden.

Folgende Substrate und Akzeptoren wurden benötigt:

- [<sup>14</sup>C]UDP-Glucose bzw. -Galactose: Diese Zucker wurden aus dem Stock je 1:5 in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> verdünnt und die Zerfälle/min (dpm, *disintegrations/decays per minute*) im Szintillationszähler ("Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800 TR"; PERKINELMER) ausgemessen.
- [<sup>14</sup>C]Cholesterol: Es wurden 0,1 ml des Cholesterols (in Toluol) aus dem Stock entnommen, unter Argon bis zur Trockene eingeeengt bis gesichert war, dass keine Toluolrückstände mehr vorhanden waren. Danach wurde in 0,5 ml Ethanol abs. aufgenommen und die Zerfälle/min



## 4 Material & Methoden

im Szintillationszähler ausgemessen.

- 5-10 mM UDP-Glucose (*Molecular weight*, Molekulargewicht: 610,3 g/mol; 560,3 g/mol wasserfrei) bzw. -Galactose (MW: 610,3 g/mol): Diese Zucker wurden etwas höher konzentriert eingewogen, in  $H_2O_{dest}$  aufgenommen und die Konzentration der Lösung photometrisch bestimmt(★).
- 4 mM Cholesterol (MW: 386,67 g/mol): Hierfür wurde die entsprechende Menge eingewogen und in Ethanol abs. aufgenommen.

(★): Zur photometrischen Bestimmung wurden UV-Küvetten und das “Cary 50 Scan UV-Vis Spectrometer” von VARIAN (Darmstadt, D) verwendet. Die Absorption wurde bei 262 nm und pH 7,0 gemessen. Der Berechnung der Konzentration wurde ein molarer Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) von  $10.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  zugrunde gelegt. Zugrunde gelegt wurde auch das Gesetz nach Lambert und Beer:  $\Delta E = \epsilon \cdot c \cdot d$  ( $\Delta E$ , Extinktion;  $c$ , Konzentration der chem. Verbindung in mol/L;  $d$ , Schichtdicke der Küvette in cm). Anschließend wurde die entsprechende Menge Wasser hinzugefügt, um die gewünschte Endkonzentration einzustellen.

Radioaktiv-markierte Substrate wurden von GE HEALTHCARE (München, D) und unmarkierte von SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen, D) bezogen.

Zur Untersuchung einer Enzymaktivität wurde das Proteinhomogenat in einer gepufferten Umgebung mit

radioaktiv-markiertem Substrat und nicht-markiertem Akzeptor

oder

mit nicht-markiertem Substrat und radioaktiv-markiertem Akzeptor inkubiert.

Nach Abstoppen der Reaktion, wurde das Produkt, in diesem Fall ein Glycolipid, gegen ein Lösungsmittel-Wasser-Gemisch ausgeschüttelt und unter einer Schutzatmosphäre eingengt. Nach Resuspendierung des Lipids in einem kleinem Volumen Lösungsmittel konnte eine dünnschichtchromatographische Auftrennung (s. 4.14.2, S.155) durchgeführt werden. Nach Entwicklung der DC-Platte in einem definierten Laufmittel wurde diese im Dunkeln in einer Kassette mit einer aufliegenden “Imaging-Platte” (FUJIFILM, Düsseldorf, D) inkubiert. Zuvor war es sowohl für die Orientierung als auch für eine eventuelle Quantifizierung wichtig, Start und Front mit einer definierten Radioaktivitätsmenge zu markieren.

Durch die  $\beta$ -Strahlung radioaktiver Produkte wurden Elektronen der Kristalle der “Imaging-Platte” mobilisiert und durch diese Anregung auf ein höheres, metastabiles Energieniveau gehoben. Nach der Exposition konnte die “Imaging-Platte” mittels eines Schwachlichtlasers “gelesen” werden. Bei diesem Scanvorgang (*Radio-Scanning*) wurden die Elektronen durch den Laserstrahl nochmals angeregt und auf ein noch höheres, instabiles Energieniveau gehoben, von dem sie sofort auf ein stabiles Energieniveau zurück fielen. Bei diesem Prozess kam es zur Emission von Photonen, die wiederum von Photorezeptoren detektiert werden konnten. Es entstand eine elektronische, zweidimensionale Abbildung der Photonenemissionsaktivität, die der Verteilung und der Menge der radioaktiven Produkte und Edukte auf der DC-Platte entsprach. Die Detektion erfolgte mit einem speziellen Detektor (z.B. dem “Imaging System BAS-1000” (RAYTEST, Straubenhardt, D)) und die Auswertung konnte mit Hilfe einer zugehörigen Software (“PC-BAS”) erfolgen. Eine Quantifizierung der radioaktiv-markierten Produkte konnte durch den Vergleich mit einer auf die DC-Platten aufgetragenen, definierten Radioaktivitätsmenge vorgenommen werden. Die Identifizierung der Reaktionsprodukte konnte danach durch den Abgleich des Rf-Wertes der Probe und dem einer nicht-markierten Referenz erfolgen, welche ebenfalls auf die DC-Platte aufgetragen wurde und durch ein Sprühreagenz und Veraschen visualisiert werden konnte.

### Assaydurchführung

Der *in vitro*-Enzymassay zur Messung der UDP-Zucker:SGT-Aktivität wurde nach Warnecke und Heinz und Warnecke *et al.* [398, 397] modifiziert angewandt. Zum Einen wurden radioaktiv-markierte UDP-Zucker und zum Anderen radioaktiv-markiertes Cholesterol eingesetzt.

Die Reaktion wurde in (10 ml-) Glas-Schliffgläschen mit Spitzboden angesetzt, wobei das Gesamtvolumen i.d.R. 100  $\mu\text{l}$  betrug. Die Komponenten eines Reaktionsansatzes waren beispielsweise:

30-100  $\mu\text{g}$  Homogenat  
50.-100.000 dpm UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Zucker (Endkonz. 0,75-1,5  $\mu\text{M}$ )  
5-10  $\mu\text{l}$  4 mM Cholesterol  
ad 100  $\mu\text{l}$  Puffer (meist 50 mM Tris-HCl, pH 8,0)  
bzw.  
30-100  $\mu\text{g}$  Homogenat  
200.-400.000 dpm [ $^{14}\text{C}$ ]Cholesterol (Endkonz. ca. 15-30  $\mu\text{M}$ )  
5-10  $\mu\text{l}$  5-10 mM UDP-Zucker  
ad 100  $\mu\text{l}$  Puffer

Nach Inkubation für ca. 60 min (variabel von 15 min bis zu 3 h) bei 30°C im Wasserbad konnte der Assay auf zweierlei Weisen gestoppt und das gewünschte Lipid ausgeschüttelt werden:

- (A) durch Zugabe von 3 ml Chloroform/Methanol 2:1 sowie 0,8 ml 0,45% NaCl oder
- (B) durch Zugabe von 2 ml Ethylacetat und 1 ml 0,45 %NaCl.

An dieser Stelle konnten die Proben bei +4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden. Nach Ausschütteln und Phasentrennung (3 min, 1.000 xg, RT) verblieb nach (A) das [ $^{14}\text{C}$ ]Cholesterol und das [ $^{14}\text{C}$ ]Cholesterylglycosid in der unteren, organischen Phase. Diese Phase wurde unter Argon bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in 15-20  $\mu\text{l}$  Chloroform/Methanol 2:1 aufgenommen und auf eine DC-Platte (optional: HPTLC-Platte, *high performance thin layer chromatography*) aufgetragen. Nach dünn-schichtchromatischer Auftrennung wurden die Enzymprodukte nach zweistündiger Exposition mit einer "Imaging-Platte" (FUJIFILM, Düsseldorf) in einer "BAS Cassette 2000" (ebenfalls FUJIFILM) mittels "Radioscanning" und der PC-BAS-Software detektiert (Näheres siehe in der vorangehenden Beschreibung des Prinzips). Durch Ausschütteln mit Variante (B) verblieb der UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Zucker in der wässrigen Phase, währenddessen sich das [ $^{14}\text{C}$ ]Cholesterylglycosid in der organischen Phase befand. Die obere, organische Phase wurde dann in ein Szintillationsgefäß überführt, mit Szintillationscocktail (OptiPhase "HiSafe"3, PERKINELMER, Rodgau-Jügesheim, D) aufgefüllt und in einem Szintillationszähler ("Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800 TR"; PERKINELMER) wurden die Zerfälle [dpm/min] ausgemessen. Die Assays der Variante (B) können ebenfalls mittels DC analysiert werden, wenn die Produkte noch verifiziert werden sollten.

### Berechnung der Stoffmenge

Um eine Aussage darüber treffen zu können, wie hoch die Endkonzentrationen der verschiedenen Substrate im Enzym-Assay waren, wurden diese berechnet. Die Berechnung wird an dieser Stelle jeweils anhand eines Beispiels dargestellt.

#### *Nicht radioaktiv-markierte Substrate:*

Im Assay wurden 5  $\mu\text{l}$  10 mM UDP-Galactose (MW 610,3 g/mol) eingesetzt. 10 mM UDP-Gal entsprechen 6,103 mg/ml bzw. 6,103  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Da 5  $\mu\text{l}$  eingesetzt wurden, entsprechen 30,52  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  10 mM UDP-Gal. Das Endvolumen des Assayansatzes betrug 100  $\mu\text{l}$ , woraus folgt, dass 5  $\mu\text{l}$  1/20 des Endvolumens sind. Daher wurde die Konzentration der UDP-Gal-Stammlösung durch 20 dividiert: 10 mM : 20 = 0,5 mM = 500  $\mu\text{M}$ . Die UDP-Gal-Endkonzentration im Assay betrug demnach

500  $\mu\text{M}$ .

MW-Angaben [g/mol] der anderen Substrate finden sich in einer vorangegangenen Auflistung zu Beginn dieses Abschnitts, in dem das Prinzip des Enzymassays beschrieben wurde.

*Markierte Substrate:*

Für die Berechnung wurden folgende Gleichungen benötigt:

- (1)  $2,2 \cdot 10^6 \text{ dpm} = 1 \mu\text{Ci}$
- (2)  $1 \mu\text{Ci} = 37 \text{ kBq}$
- (3) Für UDP- $^{14}\text{C}$ Glc: MW = 576 g/mol, Spezifische Aktivität = 11,2 GBq/mmol
- (4) Für UDP- $^{14}\text{C}$ Gal: MW = 576 g/mol, Spezifische Aktivität = 11,4 GBq/mmol
- (5) Für  $^{14}\text{C}$ Chol: MW = 389 g/mol, Spezifische Aktivität = 2,11 GBq/mmol

Beispielrechnung:

$$\mu\text{Ci UDP-Glc} = 108 \cdot 10^3 \text{ dpm (ausgemessen)} / (1) = 0,05 \mu\text{Ci}$$

$$0,05 \mu\text{Ci} \cdot (2) = 1,82 \text{ kBq} = 1,82 \cdot 10^{-6} \text{ GBq}$$

$$\text{mmol UDP-Glc} = (1,82 \cdot 10^{-6} \text{ GBq}) / (11,2 \text{ GBq/mmol}) = 0,16 \cdot 10^{-6} \text{ mmol}$$

In 100  $\mu\text{l}$  Endreaktionsvolumen waren demnach  $0,16 \cdot 10^{-6} \text{ mmol}$  UDP- $^{14}\text{C}$ Glc enthalten, wenn 10  $\mu\text{l}$  eingesetzt wurden. Dieser Wert wurde nun auf mol/L bezogen und ergab  $1,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ . Die Endkonzentration im Assay betrug demnach 1,6  $\mu\text{M}$ .

## 4.12.2 Enzymkinetik

### Vorversuch: Einstellung der optimalen Pufferung und des pH-Bereichs

In einem Vorversuch zur  $K_M$ -Bestimmung sollten die verschiedenen SGT-Enzyme hinsichtlich ihrer Aktivität in verschiedenen Puffersystemen analysiert werden. Die Homogenatherstellung aus den Hefezellen (50 ml Kultur) erfolgte nach Protokoll (s. 4.10.2 und 4.11.2), mit der einzigen Änderung, dass die Zellpellets, sowohl nach Expression in *E. coli* als auch in *P. pastoris*, in eiskaltem 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 + 15% Glycerol als Homogenisierungspuffer aufgenommen wurden.

Um die Charakterisierung in einem linearen Bereich der Enzymaktivität durchzuführen, war es notwendig, mit jedem generierten Homogenat zunächst eine Bestimmung der **Proteinlinearität** des Assays durchzuführen. Dafür wurden unterschiedliche Volumina Homogenat (z.B. 0-100  $\mu\text{g}$  Protein) entsprechend mit markiertem UDP- $^{14}\text{C}$ Zucker und 4 mM Cholesterol in 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 durchgeführt (s. 4.12.1, S.142). Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 30°C im Wasserbad. Das Abstoppen erfolgte dann nach Variante (B) mit Ethylacetat und die gewünschte Phase wurde im Szintillationszähler ausgemessen. Anschließend konnte die passende Proteinmenge nach graphischer Auftragung der Produktmenge [in dpm] gegen die eingesetzte Proteinmenge [in  $\mu\text{g}$ ] bestimmt werden.

Die **Zeitlinearität** sollte hingegen durch die Wahl verschiedener Assay-Inkubationszeiten ermittelt werden. Dabei sollte eine definierte Proteinmenge (entsprechend dem Ergebnis der Proteinlinearitätsbestimmung) mit markiertem UDP- $^{14}\text{C}$ Zucker und 4 mM Cholesterol in 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 für 0, 10, 20, 30, 40, 50 bis zu 60 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert werden. Abgestoppt sollte die Reaktion ebenfalls nach Variante (B) und dementsprechend weiter verfahren werden. Die anzuwendende Inkubationszeit konnte im Anschluss durch die graphische Auftragung der Produktmenge [in dpm] gegen die Inkubationszeiten [in min] ermittelt werden.

Zur **Bestimmung des pH-Optimums** sollten die Homogenate in Assay-Puffern mit pH-Werten von 5,0 bis zu 11,0 inkubiert werden. Um alle pH-Bereiche abzudecken, wurden folgende Puffer verwendet:

100 mM Citrat-Puffer - pH: 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5

100 mM Bis-Tris-Puffer - pH: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0

100 mM Tris-Puffer - pH: 7,0; 7,5; 8,0; 9,0

## 4 Material & Methoden

100 mM Glycin-Puffer - pH: 8,5; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5; 11,0

100 mM Tris-Puffer - pH 7,5 mit 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM EDTA

100 mM Tris-Puffer - pH 8,0 mit 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM EDTA

Dafür sollten x  $\mu\text{g}$  Homogenat (s. Proteinlinearität) mit einer definiertem Menge (50.-100.000 dpm) an markiertem UDP-Zucker mit 5  $\mu\text{l}$  Cholesterol (4 mM, in Ethanol abs.) ad 100  $\mu\text{l}$  Puffer versetzt werden. Danach erfolgte eine Inkubation für x min (siehe Zeitlinearität) bei 30°C im Wasserbad. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt ebenfalls nach Variante (B). Nach Abnehmen der Oberphase, Überführen in Vials und Versetzen mit Szintillationscocktail wurden die Zerfälle pro Minute (dpm) im Szintillationszähler bestimmt (Zählzeit: 1-5 min). Im Anschluss konnte der Assay (sowie auch der Assay für Protein- und Zeitlinearität) auch mit markiertem Cholesterol durchgeführt und die Produkte nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung überprüft werden. Die Reaktionsprodukte konnten nach "Radioscanning" gegebenenfalls auch quantifiziert werden. Abschließend konnte die Produktmenge [dpm] gegen den pH graphisch aufgetragen werden.

Je nach Enzymcharakterisierung bietet es sich generell an, die Donor- und Akzeptorspezifität zu bestimmen (siehe [186]). Dies sollte im hier vorliegenden Fall jedoch nicht durchgeführt werden.

### Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante ( $K_M$ )

Sollten alle Vorversuche gut verwertbar sein, können die Enzyme hinsichtlich der Michaelis-Menten-Kinetik untersucht werden. Dazu werden z.B. 5  $\mu\text{l}$  Homogenat in Puffer X (jener, der im Vorversuch die optimale Aktivität aufzeigte) mit 5  $\mu\text{l}$  4 mM Cholesterol (in Ethanol abs.) und x  $\mu\text{l}$  markiertem UDP-Zucker versetzt. Die Konzentration des UDP-Zuckers beträgt 4,6  $\mu\text{M}$  bis zu 4,0 mM, welcher mit unmarkiertem UDP-Zucker geträgert wird, um einen übermäßigen Verbrauch von markiertem UDP-Zucker zu vermeiden (s. Tabelle von [186]). Es sollte deswegen auch eine ungeträgerte Kontrolle mitgeführt werden. Die Inkubation erfolgte im Anschluss für 20-30 min bei 30°C im Wasserbad. Bei steigender Substratkonzentration sollte die Assayzeit tendenziell eher gen 30 min tendieren. Abgestoppt wurde nach Variante (B) und die Oberphase ausgemessen (beides zuvor schon beschrieben). Abschließend kann aus der Produktmenge [dpm] die Reaktionsgeschwindigkeit berechnet und in einem Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit lässt sich wie folgt berechnen:

$$v \text{ [pmol Produkt/30 min]} =$$

$$(\text{Produktmenge [dpm]} \cdot \text{Konz. UDP-}^{[14\text{C}]}\text{Glc [pmol]} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}) / (\text{UDP-}^{[14\text{C}]}\text{Glc [dpm]})$$

Die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit  $1/v$  wird dementsprechend gegen die reziproke Substratkonzentration  $1/[S]$  aufgetragen. Es entsteht eine Gerade mit der Steigung  $K_M/v_{max}$ , welche die Abzisse bei  $1/K_M$  schneidet. Ein hoher Wert besagt, dass das angebotene Substrat keine große Affinität zum Enzym hat. Kann ein kleiner Wert ermittelt werden, ist die Affinität hingegen groß. Optional kann dieser Assay auch mit  $^{[14\text{C}]}$ Cholesterol durchgeführt werden, wobei der Einsatz konstant hoch sein muss und die UDP-Zucker langsam gesteigert werden. Die Quantifizierung muss in diesem Fall allerdings mittels dünn-schichtchromatographischer Auftrennung erfolgen.

## 4.13 Proteinbiochemische Methoden

In diesem Abschnitt werden die in dieser Arbeit erfolgreich angewandten Proteinisolierungsmethoden beschrieben sowie die Durchführung einer SDS-PAGE mit anschließender Färbung bzw. Immunoblot-Analyse.

### 4.13.1 Verschiedene Proteinisolierungsmethoden

#### Herstellung von *Pichia*-Protein-Homogenat für eine Immunoblot-Analyse von AOX

Das Protokoll für die *Pichia*-Protein-Homogenatherstellung für die AOX-Immunoblot-Analyse wurde von M. Oku zur Verfügung gestellt (schriftliche Mitteilung und siehe auch [261]). Induzierte Hefezellen wurden bei 2.000 xg für 5 min geerntet. Geerntet wurden eine definierte Menge Kultur (z.B. 10 ml) oder bis zu 10 OD-Einheiten (totale OD-Einheiten = Kulturvolumen · OD<sub>600</sub>), je nach Möglichkeiten des Versuchsansatzes. Die Ernte erfolgte zu verschiedenen Zeiten (0 bis 12 h) nach dem Wechsel der Kohlenstoffquelle von Methanol zu Glucose (MM- zu MD-Medium). Bis zum Zellaufschluss sollten die Zellen auf Eis aufbewahrt werden. Die pelletierten Zellen wurden hierfür in 0,5 ml Resuspendierungspuffer (0,1 M, Kaliumdihydrogenphosphatpuffer, pH 7,5 inkl. 1 mM PMSF und 12,5 µg/ml Leupeptin) aufgenommen. Danach erfolgte eine Zugabe von 0,5 ml Glasperlen (0,45-0,5 mm Ø) und der Aufbruch für 6-mal 30 sek mit zwischenzeitlichem Kühlen (für bis zu 1 min) durch Vortexen bei +4 °C. Die Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation (17.000 xg für 5 min bei +4 °C) abgetrennt. Der zellfreie Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration mittels BRADFORD (s. 4.13.2, S.147) bestimmt. Anschließend konnten 5-10 µg einer SDS-PAGE-Analyse mit anschließender Immunodetektion unterzogen werden (s. 4.13.5 und 4.13.7, S. 149 und 151). Optional konnte die eingesetzte Protein-Konzentration bei Ernten von OD-Einheiten noch der gemessenen OD<sub>600</sub> angeglichen werden: Es wurde mit dem Faktor X multipliziert wurde, um den die OD<sub>600</sub> gestiegen war.

#### Proteinextraktion mittels TCA

Das Protokoll für die Proteinextraktion mittels Trichloressigsäure (TCA) wurde von M. Oku zur Verfügung gestellt (schriftliche Mitteilung, siehe auch [261]). Mit diesem Protokoll konnte letztendlich der beste Nachweis der Detektion von UGT51B1 (163 kDa) erbracht werden. Dazu wurde je eine OD<sub>600</sub>-Einheit (induzierter) Hefezellen für 3 min bei 13.000 rpm sowie +4°C geerntet und das Zellpellet jeweils in 1 ml eisgekühlter Lösung A (0,25 N NaOH; 0,145 M β-Mercaptoethanol bzw. β-Mercaptoethansulfonsäure) resuspendiert und dann für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit je 120 µl 100% (w/v) TCA versetzt und kräftig gemischt. Nach einer weiteren Inkubation für 10 min auf Eis wurde für 10 min bei 14.000 rpm und +4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml, bei -20°C vorgekühltem, Aceton resuspendiert. Gelöst wurde das Pellet mittels Sonifizierung, wobei der Zeitraum zwischen 10 und 45 min variieren konnte. Anschließend wurde erneut wie zuvor zentrifugiert, das Aceton im Überstand verworfen und das Pellet bei RT getrocknet (ca. 5-10 min mit offenem Deckel des RGs). Danach wurde das Pellet mit 40 µl 1x-SDS-Probenpuffer versetzt und mittels Sonifizierung (für ca. 5 min) gelöst. Sollte sich die Probe aufgrund von TCA-Rückständen gelb verfärben, konnte mit 1-x µl 1N NaOH gegengepuffert werden bis die Probe bläulich blieb und somit kein Farbumschlag mehr zu verzeichnen war. Zur Denaturierung wurden die Proben abschließend für 2 min bei 96°C erhitzt und kurz abzentrifugiert (< 7.000 rpm). Die Lagerung der Proben bis zur Weiterverwendung erfolgte bei +4°C. Anschließend wurden bis zu 20 µl einer SDS-PAGE (s. 4.13.5, S.149) mit anschließender Immunoanalyse (s. 4.13.7, S.151) unterzogen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nachträglich nach BRAMHALL (s. 4.13.3, S.148).

### 4.13.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den hergestellten Protein-Homogenaten wurde der Assay nach BRADFORD [37] angewendet. Das Bradford-Reagenz setzte sich folgendermaßen zusammen:

25 mg Coomassie-Brilliant-Blue G-250  
in 25 ml Ethanol lösen  
50 ml 85%ige *ortho*-Phosphorsäure zugeben  
ad 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

Abhängig von der Proteinkonzentration der Probe wurden 1-15  $\mu$ l Proteinextrakt in einer 1,5 ml-Halbmikro-Plastikküvette ad 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> versehen, mit Bradford-Reagenz ad 1 ml versetzt, gemischt und für ca. 15 min bei RT inkubiert. Nach erfolgter Inkubation schloss sich eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595$  nm gegen einen Blindwert (100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> + 900  $\mu$ l Bradford-Reagenz) an (Spektrophotometer: "Spectronic<sup>®</sup> 20 Genesys", SPECTRONIC INSTRUMENTS, Leeds, UK).

Zur Kalibrierung wurden die OD<sub>595</sub>-Werte von Rinderserumalbumin (BSA, *bovine serum albumin*) in verschiedener Konzentration verwendet: 1 mg, 2 mg, 4 mg, 6 mg, 8 mg, 10 mg und 12 mg BSA. Aus den erhaltenen Absorptionswerten konnte eine Eichreihe erstellt werden und die Proteinkonzentrationen der Proben von dieser abgeleitet werden.

### 4.13.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRAMHALL

Alternativ zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach BRADFORD konnte eine colorimetrische Bestimmung nach BRAMHALL [38] angewendet werden. Dies war der Fall, wenn die Proben schon in Puffer (z.B. Probenpuffer) mit störenden Substanzen für eine BRADFORD-Bestimmung aufgenommen vorlagen und das Proteinextraktionsprotokoll dies erforderte.

Auf einem Filterpapier (hier: Gelblottingpaper 002, WHATMAN SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel, D) wurden mit weichem Bleistift Felder von 1 x 2 cm Größe aufgezeichnet. Unter einem warmen Luftstrom wurden 1 bis 20  $\mu$ l einer Probe (mit einer Hamilton-Spritze) aufgetragen und getrocknet. Das Filterpapier (mit allen Feldern) wurde anschließend in eiskalter 7,5%iger (w/v) TCA-Lösung fixiert und in dieser für 15 min auf 80°C erhitzt. Es folgte ein Waschen des Filterpapiers mit Diethylether/Ethanol (1:1), danach mit reinem Diethylether und anschließendes Trocknen. Alternativ konnte man die Waschung des Filterpapiers mit organischen Lösungsmitteln auch einschränken und das Filterpapier nur 15 sek in lauwarmer Methanol schwenken, um die hydrophoben Membranproteine nicht abzuwaschen. Nach Trocknen des Filterpapiers erfolgte das Anfärben der Proteine mit Färbelösung (0,1% Coomassie-Brilliant-Blue G250 in 7% Essigsäure) für 15 min bei 60°C. Bei gleicher Temperatur wurde in 7%iger Essigsäure - mit mehrfachem Wechsel der Säure - innerhalb von 30 min entfärbt. Nach Trocknen des Filterpapiers wurden die einzelnen Felder ausgeschnitten und mit 2-10 ml Elutionslösung (MeOH:H<sub>2</sub>O:NH<sub>3</sub> konz.; 66:33:1, v/v/v) versetzt. Die blau gefärbten Extrakte wurden gegen einen Nullwert (Feld ohne Proteinauftrag) bei 610 nm photometrisch gemessen. Als Eichstandard dienten verschiedene Volumina BSA (1 mg, 2 mg, 4 mg, 6 mg, 8 mg, 10 mg und 12 mg BSA). Aus den gemessenen Standardwerten wurde eine Eichgerade erstellt und die Konzentration der Proben mittels dieser bestimmt.

### 4.13.4 TCA-Proteinfällung und Vorbereitung der Proteinhomogenate für die SDS-PAGE

Lag in den Proteinextrakten eine zu geringe Proteinkonzentration vor, so dass das Volumen die Kapazität der SDS-PAGE-Geltasche überstiegen hätte, wurden die Proteine dieser Proben mittels Trichloressigsäure (TCA) gefällt:

Vier Teile der Probe wurden mit einem Teil 40%iger (w/v) TCA (Endkonzentration 8%) versetzt, gemischt und für 15-60 min bei +4°C inkubiert. Im Anschluss wurden ein Proteinpellet durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 3.000 xg und +4°C erhalten. Der Überstand konnte verworfen

## 4 Material & Methoden

werden, während dem Proteinpellet zur Neutralisation 2  $\mu$ l 1,5 M Tris-HCl (pH 9,0) zugegeben wurde. Des Weiteren wurde das Proteinpellet in 1x-SDS-PAGE-Probenpuffer (ca. 10-20  $\mu$ l) aufgenommen. Verfärbte sich der Puffer beim vorsichtigen Lösen des Pellets gelb, musste nochmals 1,5 M Tris-HCl (pH 9,0) zugegeben werden, um den vorliegenden pH bis zur einer stabilen Blaufärbung zu erhöhen. Zu beachten ist jedoch, dass die Zugabe größerer Mengen vermieden werden sollte, da die Erhöhung der Salzkonzentration die anschließende elektrophoretische Proteinauftrennung beeinträchtigen konnte.

Zur Aufnahme des Pellets wurde ein sogenannter SDS-PAGE-Probenpuffer (PP) verwendet, welcher sowohl 3x als auch 1x nach folgendem Schema angesetzt werden konnte:

	3x-SDS-PAGE-PP	1x-SDS-PAGE-PP
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)	1,75 ml	0,583 ml
Glycerol	1,5 ml	0,5 ml
SDS (10%ig)	5,0 ml	1,67 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	0,5 ml	0,167 ml
0,1% Bromphenolblau (in Ethanol) ad 10 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1,25 ml	0,412 ml

Das in diesem Probenpuffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol, alternativ: 2-Mercaptoethansulfonsäure) dient zur Trennung von Disulfidbrückenbindungen in den Proteinen.

Zur Auftrennung der Proteinextrakte mittels SDS-PAGE mussten die Proteinpellets nach einer TCA-Fällung mit 1x-SDS-PAGE-PP versetzt bzw. bei genügend konzentrierten Proteinextrakten mit 3x- bzw. 1x-SDS-PAGE-PP (im Verhältnis 3:1 bzw. 2:1) gemischt werden. Um die Proteine zu denaturieren und zu lösen, wurden die angesetzten Proben für 3-5 min bei 96°C erhitzt (Heizblock "Thermomixer compact", EPPENDORF, Hamburg, D).

### 4.13.5 Analytische SDS-PAGE zur Proteinauftrennung

Für die Proteinauftrennung wurden 7-12%ige SDS-Polyacrylamidgele (SDS-PA-Gele) nach LAEMMLI verwendet [181]. Die Auftrennung erfolgte mittels denaturierender, diskontinuierlicher Elektrophorese, wofür das vertikale Elektrophorese-System "Mini Protean II" von BIO-RAD (München, D), zumeist mit 1,5 mm dicken "Spacern" und 1,5 mm dicken Kämmen mit 10 Taschen á 0,5 cm Verwendung fand. Alle Bestandteile des Elektrophorese-Systems wurden vor Benutzung mit Ethanol (70%) gesäubert. Das Pipettierschema für zwei 10%ige SDS-PA-Gele (á 1,5 mm Dicke) war wie folgt:

Stammlösung	Trenngel (pH 8,6; 10%ig)	Sammelgel (pH 6,8; 4,6%ig)
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)	-	1,25 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl pH 8,6)	4,0 ml	-
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 (37,5 : 1) <sup>1</sup>	5,32 ml	0,75 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	6,48 ml	2,96 ml
SDS (20%ig)	40,0 $\mu$ l	25,0 $\mu$ l
Ammoniumpersulfat (APS 10%ig, frisch ansetzen!)	64,0 $\mu$ l	25,0 $\mu$ l
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	5,0 $\mu$ l	5,0 $\mu$ l

<sup>1</sup> 30%ige Acrylamid-Stammlösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1

Für höherprozentigere (12%) oder niederprozentigere (8%) SDS-PA-Gele wurde das Verhältnis von Acrylamid/Bisacrylamid zu Wasser dementsprechend berechnet. 10%ige PA-Gele sind gut geeignet

für die Auftrennung von 20-200 kDa-Proteinen und 12%ige für 10-100 kDa-Proteinen. Nach ABCAM<sup>8</sup> (Cambridge, UK) variieren die Bereiche für 10%ige PA-Gele von 15-100 kDa, für 12%ige von 10-70 kDa und niederprozentigere Gele von 8% eignen sich gut für die Auftrennung von 25-200 kDa Proteinen.

Die Gel-Lösung sollte nach der genannten Reihenfolge zusammengefügt werden, da die letzten beiden Komponenten (APS und TEMED) für das Auspolymerisieren des PA-Gels verantwortlich sind. Nach Gießen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol zwecks Sauerstoff-freier Atmosphäre überschichtet. Nach Auspolymerisation wurde das Isopropanol wieder entfernt, um das Sammelgel zu gießen und mit einem Kamm zu versehen.

Die hergestellten SDS-PA-Gel-Sandwiches wurden in eine Laufkammer eingesetzt und diese zu etwa 2/3 mit 1x-SDS-PAGE-Laufpuffer befüllt (etwa 200-300 ml). Die 5x-SDS-PAGE-Stocklösung des Laufpuffers setzte sich wie nachfolgend beschrieben zusammen:

125 mM Tris  
960 mM Glycin  
0,5% SDS  
ad 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

Der pH des Laufpuffers sollte zwischen pH 8,3 - 8,6 (ohne Einstellen) liegen und keinesfalls mit HCl korrigiert werden, da Cl<sup>2-</sup>-Ionen im Laufpuffer die Elektrophorese stören. Benutzter 1x (!)-Laufpuffer kann ca. 2-3x wiederverwendet werden.

Nach Auftragen der Proteinproben in die Geltaschen folgte die elektrophoretische Auftrennung bei 150 V (Spannungsquelle: "PowerPac 300", BIO-RAD). Die Auftrennung erfolgte bis die unterste Proteinstandard-Bande fast den unteren Rand des Gels erreicht hatte (nach ca. 60-90 min) bzw. der Bereich des Interesses genügend aufgetrennt wurde. Für die SDS-PAGEs wurden hauptsächlich Proteinstandards von NEB (Frankfurt/Main, D) sowie FERMENTAS (St. Leon-Roth, D) verwandt: (ColorPlus) Prestained Protein Marker, Broad Range von 7-175 kDa (NEB), PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder (10-170 kDa) bzw. Spectra<sup>TM</sup> Multicolor Broad Range (10-260 kDa) Protein Ladder (FERMENTAS).

Nach erfolgter Auftrennung wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel konnte einer Coomassie-Brilliant-Blue G250-Färbung, wie im nachfolgenden Abschnitt beschrieben, unterzogen bzw. in eine Western-Hybridisierung (s. 4.13.7, S.151) eingesetzt werden.

### 4.13.6 Coomassie-Färbung von SDS-PA-Gelen

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine konnten mit Coomassie visualisiert werden (unspezifisch, Nachweisgrenze: 0,5 µg pro Bande in einem PA-Gel). Dazu wurde das PA-Gel für 60 min in Coomassie-Färbelösung bei RT und einer Schüttelfrequenz von 75 min<sup>-1</sup> inkubiert. Die Entfärbung erfolgte für ca. 60 min ebenfalls bei RT in Coomassie-Entfärber, der jeweils nach ca. 15, 30 und 45 min gewechselt wurde. Anschließend wurden die PA-Gele üN bei RT in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> geschüttelt, um die überschüssigen Färbereste weiter zu minimieren. Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt.

Coomassie-Färbelösung	Coomassie-Entfärber
0,1% Coomassie-Brilliant-Blue G250 (v/v)	40% Methanol (v/v)
40% Methanol (v/v)	10% Eisessig (=100%ige Essigsäure)(v/v)
10% Eisessig (=100%ige Essigsäure) (v/v)	

<sup>8</sup><http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols>



### 4.13.7 Western-Blot mit anschließender Immunodetektion

Mittels Western-Blot-(WB)-Analysen und anschließender Immunodetektion konnten Proteine mittels eines spezifischen Antikörpers (AKs) detektiert werden. Dazu wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (s. 4.13.5, S.149) mit Hilfe eines Tank-(Wet-)Transfersystems ("Mini Trans-Blot cell"; 7,5 x 10 cm Blottingfläche; BIO-RAD, München, D) auf eine proteinbindende Membran überführt und die rekombinanten Proteine durch Antikörper spezifisch detektiert.

#### Equilibrierung von proteinbindenden Membranen

Im ersten Schritt musste die proteinbindende Membran equilibriert werden. Dies gewährleistet ihre Benetzbarkeit mit wässrigen Puffern. In Abhängigkeit ihrer Zusammensetzung wurden Membranen unterschiedlich behandelt: PVDF-(Polyvinylidendifluorid)-Transfermembranen ("Hybond-P"; GE HEALTHCARE, München, D) wurden erst für 10 sek in einer Färbeschale mit Methanol benetzt. Im Anschluss wurde die Membran für 5 min in  $H_2O_{dest}$  gewaschen und danach mind. 15 min bei  $+4^{\circ}C$  und einer Schüttelfrequenz von  $50 \text{ min}^{-1}$  in eiskaltem WB-Blotting-Puffer (WB-BlotP) equilibriert. Nitrocellulose-Transfermembranen ("Roti<sup>®</sup>-N"; 20 x 20 cm; ROTH, Karlsruhe, D) mussten dagegen nur für mind. 15 min bei  $+4^{\circ}C$  und einer Schüttelfrequenz von  $50 \text{ min}^{-1}$  in eiskaltem WB-BlotP inkubiert werden.

Der WB-Blotting-Puffer (WB-BlotP) setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 0,303% Tris
- 1,44% Glycin
- 20% Methanol

(Keine Einstellung des pH-Wertes notwendig!)

Für den Übertrag großer Proteine wurde der WB-BlotP etwas variiert. Zusätzlich wurde SDS (0,0375% bis 0,1%) zugegeben und die Methanolkonzentration auf 10% gesenkt. Dies sollte verhindern, dass große Proteine im Gel präzipitieren und der Transfer beeinträchtigt wird.

#### Proteintransfer vom SDS-PA-Gel auf die Membran

Alle Bestandteile des Transfersystems wurden vor ihrer Verwendung mit 70%igem Ethanol gereinigt. Vom PA-Gel, von dem zuvor das Sammelgel entfernt wurde, wurde das Trenngel durch das Entfernen einer oder mehrerer Ecken für die spätere Zuordnung markiert und in WB-BlotP für ca. 5 min equilibriert. In einem mit eiskaltem WB-BlotP befüllten Behältnis wurden unter (!) dem Flüssigkeitsspiegel die Blot-Sandwiches wie folgt zusammgebaut:

1. Der offene Blot-Sandwichrahmen wurde mit der schwarzen Seite untenliegend in das Behältnis gelegt.
2. Auf die schwarze Seite wurden nacheinander folgende Lagen geschichtet:
  - ein Glasfaserschwamm,
  - zwei Lagen Whatman-Papier (zugeschnitten auf Schwammgröße),
  - das vorbereitete Trenngel des PA-Gels,
  - die equilibrierte, proteinbindende Membran,
  - zwei Lagen Whatman-Papier (ebenfalls zugeschnitten auf Schwammgröße) und
  - ein Glasfaserschwamm.
3. Aus jeder Schicht mussten sorgfältig alle Luftblasen entfernt werden, um einen effektiven Proteintransfer sicherzustellen.
4. Das Sandwich wurde zugeklappt und verschlossen.

5. Die Blottingkammer wurde bis zum oberen Rand mit eiskaltem(!) WB-BlotP befüllt (ca. 450 ml) und der mit gefrorenem  $H_2O_{dest}$  befüllte Eiscontainer zur Kühlung in die Kammer eingebaut ("Bio-Ice cooling uni", BIO-RAD).
6. Danach wurde das Blot-Sandwich so in die Kammer eingefügt, dass es mit der schwarzen Seite zur schwarzen Seite der Blotapparatur zeigte. Zu beachten war, dass das Blotsandwich vollständig mit WB-BlotP bedeckt sein musste.
7. Der Proteintransfer erfolgte für 45-60 min bei 100 V (Spannungsquelle: "PowerPac 300", BIO-RAD).
8. Das Blot-Sandwich wurde nach dem Transferlauf wieder aus der Apparatur entfernt und auseinandergelöst bis nur noch das PA-Gel auf einer Schicht Whatman-Papier liegend und bedeckt von der Membran übrig war.
9. Die Gelbegrenzungen wurden inklusive der abgetrennten Ecke auf die Membran übertragen, indem diese mit einer Schere auf dem Gel liegend zugeschnitten wurde. **Für weiteren Verlauf zu beachten:** Die dem PA-Gel zugewandte Seite der Membran ist die Seite, auf der sich die immobilisierten Proteine befinden. Diese musste im weiteren Verlauf immer nach oben orientiert sein.

### Färbung mit Ponceaurot

Eine Ponceaurot-Färbung konnte zu folgenden Zwecken durchgeführt werden: Zum Einen zur Kontrolle der erfolgten Übertragung der Proteine auf die Membran und zum Anderen zum eventuellen Markieren eines ungefärbten Proteinstandards. Die Färbung erfolgte für ca. 1 min mit Ponceaurot (0,25% Ponceaurot in 1% Essigsäure). Sie besitzt eine Nachweisgrenze von 1  $\mu$ g Protein pro Bande, ist vollständig reversibel und stört in den meisten Fällen die nachfolgenden immunochemischen Reaktionen nicht. Zum Entfärben wurde 1%ige Essigsäure verwendet, wobei die vollständige Entfärbung der Membran erst im WB-Blocking-Puffer (WB-BlockP) erfolgte.

### Immunodetektion

Die Methode der Immunodetektion erzielt beim Nachweisen rekombinanter Proteine eine große Sensitivität und hohe Spezifität. Dies wird durch die spezifische Bindung eines primären AKs an das nachzuweisende Protein erreicht. An den gebundenen primären AK kann wiederum spezifisch über die vorliegenden konstanten Fc-Domänen ein sekundärer AK gebunden werden. An den sekundären AK kann ein chemisch leicht nachweisbares Enzym (z.B. die Meerrettichperoxidase; HRP, *horse radish peroxidase*) oder ein Fluorophor gekoppelt sein. Mittels eines passenden Nachweisreagenz können die auf diese Weise markierten Proteine detektiert werden.

In dieser Arbeit: Eine gekoppelte HRP katalysierte in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Umsetzung von Luminol (bzw. dessen Derivaten) in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz detektiert werden konnte. Diese Lumineszenz konnte nach Exposition mit einem Autoradiographiefilm und anschließender Entwicklung visualisiert werden. Alternativ konnte die Exposition und Visualisierung auch mit dem "LAS3000-Imaging-System" vorgenommen werden.

Für die Immunodetektion waren folgende Puffer notwendig: TTBS-Puffer, WB-Blocking-Puffer (WB-BlockP) und WB-Wasch-Puffer (WB-WaschP).

TTBS (pH 7,5) <sup>1</sup>	WB-BlockP (pH 7,5)	WB-WaschP (pH 7,5)
20 mM Tris-HCl 500 mM NaCl 0,05% Tween 20	10% Magermilchpulver <sup>2</sup> ad TTBS (pH 7,5)	0,5% Magermilchpulver <sup>2</sup> ad TTBS (pH 7,5)

<sup>1</sup>Tris-HCl Tween 20 Buffered Saline <sup>2</sup>Saliter, J.M. Gabler Saliter, Obergünzburg, D

## 4 Material & Methoden

Folgenden Antikörper (pAK-primärer AK, sAK-sekundärer AK) fanden u.a. in dieser Arbeit Verwendung:

### Zum Nachweis His<sub>6</sub>-markierter rekombinanter Proteine:

pAK: *His Tag<sup>®</sup> Monoclonal Antibody* aus Maus (NOVAGEN/MERCK, Darmstadt, D). 3 µg AK wurden nach Herstellerangaben in 100 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgenommen und zur Anwendung 1:1000 in WB-WaschP verdünnt.

sAK: *Anti-Mouse IgG (whole molecule) Peroxidase antibody* aus Ziege (SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, D) wurde zur Anwendung 1:5000 in WB-WaschP verdünnt.

### Zum Nachweis von mit GFP-(Derivaten)-markierten rekombinanten Proteinen:

pAK 1: *Anti-Green Fluorescent Protein (26-39) polyclonal Antibody* aus Kaninchen (CALBIOCHEM/MERCK, Darmstadt, D).

pAK 2: *Anti-GFP monoclonal Antibody clones 7.1 and 13.1* aus Maus (ROCHE, Mannheim, D).

Beide pAKs wurden i.d.R. zur Anwendung 1:1000-1:2000 in WB-WaschP verdünnt.

sAK 1: *Anti-Mouse IgG (whole molecule) Peroxidase antibody* aus Ziege (SIGMA-ALDRICH).

sAK 2: *Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase antibody* aus Ziege (SIGMA-ALDRICH). Beide sAKs wurden i.d.R. zur Anwendung 1:5000 in WB-WaschP verdünnt.

### Zum Nachweis des AOX-Proteins:

pAK: *Anti-AOX Antiserum* aus Kaninchen (urspr. von Dr. J. M. Goodman, Univ. of Texas, US, zur Verfügung gestellt von M. Oku von der Univ. Kyoto, JP). Der pAK wurden zur Anwendung 1:5000 in WB-WaschP verdünnt.

sAK: *Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase antibody* aus Ziege (SIGMA-ALDRICH). Der sAK wurden zur Anwendung 1:5000 in WB-WaschP verdünnt.

Die Membran wurde - mit der Proteinseite nach oben - in eine Färbeschale gelegt, die mit 30-50 ml WB-BlockP befüllt war. Die Absättigung der noch unbesetzten Membranbereiche mit den im BlockP enthaltenen Proteinen aus dem Milchpulver erfolgte üN bei +4°C und einer Schüttelfrequenz von 50 min<sup>-1</sup> oder alternativ für 30 min bei RT und 60-90 min<sup>-1</sup>. Durch die Absättigung dieser Proteinbindungsstellen auf der Membran sollte eine unspezifische Bindung der AKs verhindert werden. Nach Verwerfen des BlockPs wurde die Membran bei RT nacheinander für 10 sek und zweimal 10 min bei einer Schüttelfrequenz von 75 min<sup>-1</sup> in WB-WaschP gewaschen. Die Waschlösungen wurden jeweils verworfen und anschließend wurden ca. 30 ml des verdünnten, primären AKs auf die Membran gegeben, so dass diese vollständig benetzt wurde. Es folgte eine einstündige Inkubation bei RT und einer Schüttelfrequenz von 75 min<sup>-1</sup>. DIE AK-LÖSUNG WURDE JEWEILS WIEDER AUFGEFANGEN UND KONNTE CA. ZWEIMAL WIEDERVERWENDET WERDEN. Es folgte erneut ein dreimaliges Waschen für 10 sek und zweimal 10 min bei RT bei einer Schüttelfrequenz von 75 min<sup>-1</sup> in WB-WaschP. Die Waschlösungen wurden jeweils verworfen und anschließend wurden

ca. 30 ml des verdünnten, sekundären AKs auf die Membran gegeben, so dass diese vollständig benetzt wurde. Es folgte eine einstündige Inkubation bei RT und einer Schüttelfrequenz von  $75 \text{ min}^{-1}$ . DIE VERDÜNNTE AK-LÖSUNG WURDE JEWEILS WIEDER AUFGEFANGEN UND KONNTE CA. ZWEIMAL WIEDERVERWENDET WERDEN. Es folgte wiederum ein dreimaliges Waschen bei RT für 10 sek und zweimal 10 min bei einer Schüttelfrequenz von  $75 \text{ min}^{-1}$  in WB-WaschP. Die Waschlösungen wurden jeweils verworfen.

Die Western-Blot-Membran wurde in einer Folie (z.B. ein Autoklavierbeutel) liegend in eine Röntgenkassette transferiert und mit "VisGlow Plus Chemiluminescent Substrate HRP" von VISUAL PROTEIN (Taipeh, Taiwan) benetzt, das nach Herstellerangaben verwendet wurde. Pro Membran wurden je nach Membrangröße ca. 1-2 ml Substratlösung (bestehend aus Reagenz A und B im Verhältnis 2:1) angewendet. Es folgten verschieden lang andauernde Inkubationen (1-15 min oder länger je nach Notwendigkeit) mit einem Autoradiographiefilm ("Amersham Hyperfilm ECL", GE HEALTHCARE, München, D) in der Kassette. Der Film wurde anschließend in der Film-Entwicklungsmaschine "Processor Compact<sub>2</sub>" der Firma PROTEC (Oberstenfeld, D) entwickelt. Alternativ konnte die Membran auch mittels des "LAS3000-Imaging-Systems" (FUJIFILM COOPERATION, Düsseldorf, D) analysiert werden.

### 4.13.8 Dot Blot

Für einen Dot-Blot wurde die Membran je nach ihrer Zusammensetzung equilibriert (s. 4.13.7, ab S.151). Anschließend wurden 3, 5 und 10  $\mu\text{l}$  des Proteinextrakts bzw. des zu testenden AKs aufgetragen und 2 min einwirken gelassen. Danach war es wichtig, die Membranen in GETRENNTEN Gefäßen weiter zu behandeln! Das Blocken der Membranen erfolgte dann für 30-60 min bei RT in WB-BlockP und das Waschen für 10 sek und zweimal 10 min bei RT in WB-WaschP (Pufferzusammensetzungen s. 4.13.7). Der WB-BlockP sollte nach dieser Anwendung nicht wiederverwendet werden! Nach dem Waschen der Membranen konnten diese in einem Gefäß zusammengeführt werden und zuerst mit dem primären AK und nach Waschen (10 sek, zweimal 10 min) mit dem sekundären AK bei RT inkubiert werden (wie in 4.13.7 beschrieben). Nach dem letzten Waschschritt (10 sek, zweimal 10 min) erfolgte die Detektion mit dem "VisGlow Plus Chemiluminescent Substrate HRP". Die Exposition konnte, wie am Ende von 4.13.7 beschrieben, durchgeführt werden.

### 4.13.9 Funktionalitätstest von HRP-gekoppelten Antikörpern

Neben dem Dot Blot konnten die sekundären, HRP-gekoppelten AKs mittels DAB-Peroxidase-Substrat-Tabletten (Sigma Fast<sup>TM</sup> 3,3'-Diaminobenzidine Tablet Set; SIGMA ALDRICH, Taufkirchen, D) getestet werden. Nach Verwendung nach den Angaben des Herstellers konnte die Lösung dunkelrot werden. Dies war ein Indiz, dass der sekundäre AK aktiv war. Bleibt die Lösung nach Zugabe der 2 Tabletten nur leicht rot gefärbt, wies dies daraufhin, dass die an den sekundären AK gekoppelte Enzymreaktion defekt war.

## 4.14 Isolierung und Analyse von Lipiden

Für die Verifizierung generierter Hefetransformanten bezüglich ihrer Fähigkeit *in vivo* SG zu synthetisieren, wurden zuerst Gesamtlipidextrakte hergestellt. Danach konnte durch Verseifung die Glycolipid-Fraktion weiter separiert werden.

#### 4.14.1 Herstellung eines Gesamtlipidextrakts aus *P. pastoris*

Gesamtlipidextrakte wurden aus (Methanol-induzierten) *P. pastoris*-Zellen hergestellt. Dazu wurden die Zellen einer 50-100 ml Kultur mittels Zentrifugation in einem 50 ml-RG geerntet (5 min, 3.220 xg), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 15 ml  $H_2O_{dest}$  aufgenommen (Resuspendierung durch Vortexen), um für 10-15 min in kochenden Wasser erhitzt zu werden. Dies dient der Inaktivierung von Phospholipasen und Isomerasen. Nach einer Abkühlung auf Eis und Transfer in ein mittleres (20 ml) Glas-Schliffgläschen (Falcons mit 5 ml  $H_2O_{dest}$  nachgespült) folgte eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 1.000 xg bei RT (ohne Stopfen!). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml des Extraktionsgemisches Chloroform/Methanol im Verhältnis 1:1 resuspendiert. Die erste Extraktion erfolgte für mind. 4 h bei  $+4^{\circ}C$ , einer Schüttelfrequenz von  $175\text{ min}^{-1}$  liegend auf einem Schüttler. Anschließend wurde die Suspension bei 1.000 xg und RT für 5 min zentrifugiert und der erste Extrakt in ein großes (40 ml) Glas-Schliffgläschen mit Stopfen dekantiert und bei  $+4^{\circ}C$  gelagert (=1. Extrakt). In einem zweiten Extraktionsschritt wurden die Zellreste in 9 ml Chloroform/Methanol (2:1) resuspendiert, bei einer Schüttelfrequenz von  $175\text{ min}^{-1}$  liegend weitergeschüttelt und anschließend bei 1.000 xg und RT für 5 min abzentrifugiert. Der resultierende Überstand (=2. Extrakt) wurde mit dem 1. Extrakt vereinigt und konnte bei  $+4^{\circ}C$  gelagert werden. Abhängig von der Konsistenz der Zellpellets musste der 2. Extrakt evtl. durch eine mit Watte gestopfte Pasteurpipette filtriert werden.

Die erhaltenen Extrakte wurden im Glas-Schliffgläschen mit Chloroform, Methanol und  $H_2O_{dest}$  versetzt. Um ein Verhältnis von 2:1:0,75 einzustellen wurden 5 ml Chloroform und 6 ml 0,45% NaCl. Die Phasentrennung erfolgte anschließend durch Zentrifugation bei 1.000 xg und RT für 5 min. Die untere Chloroformphase wurde dann über eine mit Watte gestopfte Glas-Pasteurpipette in ein Sovirell-Röhrchen überführt und unter einem Argonstrom (erzeugt eine Sauerstoff-freie Inertatmosphäre) und bei  $50-55^{\circ}C$  in einem Heizblock bis zur Trockene eingengt (Probenaufbereitungssystem zum Eindampfen oder Trocknen von Probenmaterial "Clinitherm", BARKEY, Leopoldshöhe, D). Die eingengten Lipide (bzw. der Rückstand) wurden in ca. 300  $\mu\text{l}$  Chloroform bzw. Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen, wahlweise auch in mehr oder weniger, um eine einheitliche Gelbfärbung (ein Indiz für die Lipidmenge) zu erzielen. Die Gesamtlipidextrakte konnten bei  $-20^{\circ}C$  gelagert werden. Für eine qualitative Analyse wurden ca. 10  $\mu\text{l}$  Lipidextrakt dünnschichtchromatographisch aufgetrennt.

#### 4.14.2 Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Lipiden

Die Auftrennung eines Lipidgesamtextraktes in Lipidklassen konnte mittels der Methode der Dünnschichtchromatographie (DC) erreicht werden. Dazu wurden als stationäre Phase polare Kieselgel-DC-Glasplatten (Kieselgel 60-DC-Fertigplatten; Schichtdicke: 0,25 mm; 5, 10 und 20 cm x 20 cm; diverse Hersteller) oder Kieselgel-DC-Aluplatten (Kieselgel 60-DC-Fertigplatten, alu-minium sheets, diverse Hersteller) verwendet. Die unpolare, mobile Phase wurde entsprechend der zu trennenden Substanzen ausgewählt. Für eine sensitivere Auftrennung wurden HPTLC (*High performance thin layer chromatography*)-Platten verwandt.

Auf der DC-Platte wurde die Auftragslinie für die Proben 1-1,5 cm vom Rand entfernt festgelegt. Links und rechts von den Probenauftragungspunkten wurde je 1 cm frei gelassen. Die zumeist in Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommenen Proben wurden i.d.R. über eine Strecke von 0,5 - 1 cm mit Hamilton-Mikroliterspritzen aufgetragen, wobei 0,5-1 cm zwischen den einzelnen Proben ausgelassen wurde. Die Lipide wurden auf einer DC-Platte, welche in eine mit Laufmittel gesättigte DC-Kammer (DESAGA, Heidelberg, D) eingesetzt wurde, für ca. 1 h aufgetrennt. Durch Verwendung des Laufmittels Chloroform/Methanol (85:15) konnten Glycolipide aufgetrennt und das Lipid des Interesses - hier das SG - als eine einzelne Bande dargestellt werden.

Nach Entnahme der DC-Platte aus der DC-Kammer und Verdampfen des restlichen Laufmittels konnten die Lipide auf diverse Weisen visualisiert werden. Durch das  $\alpha$ -Naphtholschwefelsäure-Sprühreagenz konnten Glycolipide nach Veraschen bei  $150-180^{\circ}C$  ("TLC Plate Heater IIP", CAMAG,

Berlin, D) detektiert werden. Diese Visualisierung ist jedoch irreversibel und sollte für die Isolierung und Aufreinigung eines Glycolipids keine Verwendung finden. Stattdessen bietet sich die Visualisierung durch das Sprühreagenz ANS an (s. 4.14.4, S. 157). Das  $\alpha$ -Naphtholschwefelsäure-Sprühreagenz setzte sich folgendermaßen zusammen:

8 g  $\alpha$ -Naphthol  
250 ml Methanol lösen  
20 ml  $\text{H}_2\text{O}_{dest}$   
30 ml 96%  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
(Zugabe der Säure erfolgte unter Rühren auf Eis)

Nach der Visualisierung der Lipide konnten die Platten eingescannt und ausgewertet werden. Zur Bestimmung der Retentionsfaktor-Werte (Rf-Werte) der einzelnen Lipide wurde das Verhältnis der Laufstrecken der Lipidbanden zur Laufstrecke des Laufmittels bestimmt:

$$\text{Rf-Wert} = \text{Laufstrecke der Lipidbande [in cm]} / \text{Laufstrecke des Laufmittels [in cm]}$$

Die Zuordnung des synthetisierten SG zu einem bestimmten Anomer erfolgte in dieser Arbeit nach Abgleich der ermittelten Rf-Werte mit denen von nicht-markierten Referenzen. Durch diesen Abgleich kann die stereochemische Struktur "phänotypisch" ohne aufwendige Strukturanalyse bestimmt werden. Je besser die Auftrennung der Lipide erfolgte, desto eindeutiger konnte zwischen den Anomeren differenziert werden, aber auch der ermittelte Genotyp wurde der Verifizierung mit zugrunde gelegt. Zudem ist es wichtig zu beachten, dass Änderungen des Sterolrückgrats minimale Schwankungen im Rf-Wert hervorrufen konnten. Die Unterschiede im Laufverhalten ergeben sich hauptsächlich aus der Art des Zuckers und seiner Verknüpfung an das Sterolrückgrat.

### 4.14.3 Verseifung von Lipiden

Um Glycolipide besser aus einem Gesamtlipidextrakt isolieren zu können, ist es hilfreich zuvor die Phospholipide (Phosphoglycerolipide), welche auf der DC-Platte in Chloroform/Methanol (85:15) unterhalb der Glycolipide laufen, vor der Auftrennung zu hydrolysieren. Glycosylceramide/Cerebroside und SGs sind dagegen alkalistabil, und die freien Fettsäuren laufen kurz hinter der Lösungsmittelfront.

Die Verseifung konnte durch die alkalische Hydrolyse von Esterbindungen erzielt werden. Dazu wurde ein Gesamtlipidextrakt (mind. 100  $\mu\text{l}$ ) in einem Sovirell-Röhrchen unter einem Argonstrom (erzeugt eine Sauerstoff-freie Inertatmosphäre) und bei 50-55°C in einem Heizblock bis zur Trockene eingengt ("Clinitherm", BARKEY, Leopoldshöhe, D). Danach wurden die Lipide vollständig in Chloroform/Methanol (2:1) gelöst und anschließend 1/5 Vol 1,2 M KOH zugegeben. Das Gemisch musste nun für 1 h bei 40°C in einem Wasserbad inkubiert werden. Durch Zugabe von Chloroform, Methanol und 0,45% NaCl wurde ein Chloroform/Methanol/ $\text{H}_2\text{O}_{dest}$ -Verhältnis von 2:1:0,75 eingestellt. Die untere Chloroformphase wurde in ein neues Sovirell-Röhrchen überführt und erneut unter einem Argonstrom bei 50-55°C in einem Heizblock bis zur Trockene eingengt. Die eingengten Lipide wurden wieder in Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen.

Neben der Verseifung mit KOH konnte auch eine weitere Variante mit Natriummethylat angewandt werden. Dazu wurden mind. 100  $\mu\text{l}$  eines Lipidextraktes (am besten zuvor schon in Methanol gelöst, ansonsten nach Einengen unter einem Argonstrom) in 1,5 ml Methanol aufgenommen und mit 30  $\mu\text{l}$  Natriummethylat (30% in Methanol) versetzt. Es folgten 30 min Inkubation bei RT, anschließend wurden 3 ml Chloroform zugegeben, die Proben gegen 1,2 ml 0,45% NaCl ausgeschüttelt, wiederum unter einem Argonstrom bis zur Trockene eingengt und in einem kleinen Volumen Chloroform gelöst. Die verseiften Lipide konnten danach präparativ über eine DC-Platte gereinigt werden (Näheres in 4.14.4).

#### 4.14.4 Isolierung und Aufreinigung von Lipiden

Eine Isolierung einzelner Lipide aus einem Gesamtlipidextrakt konnte mittels präparativer Dünnschichtchromatographie erreicht werden. Um die Aufreinigung einzelner Lipide zu erleichtern, konnte der Gesamtlipidextrakt mittels eines Säulenverfahrens fraktioniert werden.

##### Präparative Dünnschichtchromatographie

Für die präparative Dünnschichtchromatographie wurde ein (verseifter) Gesamtlipidextrakt oder nur eine bestimmte Fraktion wie in 4.14.2 beschrieben auf eine Glas-DC-Platte aufgetragen und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Auftragefläche betrug diesmal jedoch 8-16 cm und um eine Überladung des Kieselgels zu unterbinden, wurde zuvor die Lipidmenge mit einer Test-DC abgeschätzt. Im Anschluss wurde die DC-Platte mit ANS-Sprühreagenz behandelt. Das Reagenz erwirkt ein Fluoreszieren aller hydrophoben Verbindungen bei 366 nm unter UV-Licht (UV-Leuchte (366 nm/254 nm), CAMAG, Berlin, D). Das ANS-Sprühreagenz setzte sich aus 0,2% 1-Anilin-8-naphthalinsulfonat gelöst in Methanol zusammen.

Der Bereich der zu isolierenden Lipidbande wurde mit einem Bleistift gekennzeichnet und nach leichtem Besprühen der Glasplatte mit  $\text{H}_2\text{O}_{dest}$  mit einem Spatel in ein 20 ml-Glas-Schliffgläschen abgekratzt. Das gewünschte Lipid wurde durch Zugabe von 6 ml Chloroform/Methanol (2:1) während ca. 5-minütiger Inkubation bei RT aus dem Kieselgel extrahiert. Des Weiteren wurden zur Isolierung des Lipids 1,5 ml 0,45% NaCl hinzugegeben, damit ein Chloroform/Methanol/ $\text{H}_2\text{O}_{dest}$  -Verhältnis von 2:1:0,75 eingestellt wurde, kräftig geschüttelt und zur Phasentrennung bei 1.000 xg für 5 min ohne Glasstopfen zentrifugiert. Die untere Chloroformphase wurde über eine mit Watte gestopfte Glas-Pasteurpipette, um die sich in der Phasengrenze angesammelten Kieselgelreste nicht mitzuführen, in ein 10 ml-Gläschen überführt und unter einem Argonstrom (erzeugt eine Sauerstofffreie Inertatmosphäre) und 50-55°C in einem Heizblock bis zur Trockene eingengt ("Clinitherm", BARKEY, Leopoldshöhe, D). Optional konnte die wässrige Phase ein zweites Mal durch Zugabe von 4 ml Chloroform ausgeschüttelt, kurz zentrifugiert und dann die beiden Chloroformphasen nach Filtration, wie zuvor beschrieben, vereinigt werden. Das gereinigte, isolierte Lipid wurde in 300  $\mu\text{l}$  Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen, konnte danach in ein Rollrandgläschen überführt, mit einer Bördelkappe verschlossen und bei -20°C aufbewahrt werden.

##### Fraktionierung eines Gesamtlipidextraktes

Größere Lipidextraktmengen konnten mit Hilfe von Strata SPE (*Solid Phase Extraction*)-Säulen (PHENOMENEX, Aschaffenburg, D) in Neutrallipide (freies Sterol, TAG, DAG, Sterylester), Glycolipide (GlcCer, SG) und Phosphoglycerolipide fraktioniert werden. Hierfür musste die Säule zuerst mit ca. 6 ml Chloroform/Petrolether (8:2) (alternativ konnte anstelle dessen auch nur Chloroform verwendet werden) equilibriert werden. Nach Zugabe des Lipidextraktes auf die Säule konnte die Neutrallipid-Fraktion durch mehrmaliges Spülen mit Chloroform/Petrolether (8:2) aus der Säulenmatrix gelöst und in einem Sovirell-Röhrchen aufgefangen werden. Die Glycolipide wurden mit Aceton/Isopropanol (9:1) und die verbleibenden Phospholipide schließlich durch Zugabe von Methanol eluiert. Alle Fraktionen wurden in jeweils neuen, frischen Sovirell-Röhrchen aufgefangen. Die gesammelten Fraktionen wurden unter einem Argonstrom bei 50-55°C in einem Heizblock bis zur Trockene eingengt ("Clinitherm", BARKEY, Leopoldshöhe, D) und in jeweils einem kleinen Volumen Chloroform oder Chloroform/Methanol (2:1) gelöst.

#### 4.14.5 Peracetylierung von Lipiden (für NMR- und ESI-FT ICR MS-Analyse)

Durch die Methode der Peracetylierung werden freie Hydroxygruppen mit der Essigsäure aus Essigsäureanhydrid verestert und auf diese Weise maskiert. Dies ist u.a. für die ESI-MS- und auch die NMR-Analyse von Vorteil.

Die zu acetylierende Probe musste hierfür wasserfrei sein. Das gereinigte Lipid (für eine NMR-Analyse wurden mindestens 200  $\mu\text{g}$  benötigt, für ein Massenspektrum etwa 20  $\mu\text{g}$ ) wurde im Spitzkolben am Rotationsverdampfer getrocknet, in 500  $\mu\text{l}$  Pyridin und 200  $\mu\text{l}$  Essigsäureanhydrid gelöst und üN bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 3 ml Isopropanol hinzugefügt und der Ansatz erneut eingeeengt. Zum Entfernen der Pyridinreste wurden die acetylierten Lipide noch weitere Male (4-5x) mit 3 ml Isopropanol gewaschen und schließlich in 300  $\mu\text{l}$  Chloroform gelöst. Die Reinigung erfolgte über eine präparative DC (s. 4.14.4) und als Laufmittel wurde Diethylether bzw. Diethylether/Petrolether (1:1) verwendet. Die acetylierten Lipide wurden abgekratzt, mit Chloroform/Methanol (2:1) aus dem Kieselgel gelöst, in Bördelgläschen abgefüllt und unter einem Argonstrom bei 50-55°C in einem Heizblock bis zur Trockene eingeeengt ("Clinitherm", BARKEY, Leopoldshöhe, D).

Die NMR- und ESI-MS-Analysen wurden von Herrn Prof. Dr. Ulrich Zähringer und seinen Mitarbeitern des Forschungszentrums Borstel durchgeführt.

### 4.15 Mikroskopie

In diesem Abschnitt soll auf die Transmissionselektronen- und Fluoreszenzmikroskopie eingegangen werden. Beide Methoden wurden in dieser Arbeit zur Analyse von (transgenen) Hefezellen angewandt.

#### 4.15.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Bei einem Transmissionselektronen-(TE)-Mikroskop handelt es sich ebenso wie bei einem Lichtmikroskop um ein Durchstrahlungsmikroskop. Analog zu dem im Lichtmikroskop vorhandenen Kondensor, Objektiv und Okular übernehmen die Elektronenlinsen im TE-Mikroskop diese Funktionen. Der Vorteil der Verwendung der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) liegt in der gesteigerten Auflösung.

Um aus freigesetzten Elektronen den benötigten Elektronenstrahl generieren zu können, ist das Anlegen eines Hochvakuums notwendig. Da ein Hochvakuum benötigt wird, können Lebewesen im Gegensatz zur Lichtmikroskopie nicht direkt betrachtet werden, sondern es erfordert das Präparieren von Dünnschnitten. Weitere Gründe, die gegen das Untersuchen lebender Objekte mittels TEM sprechen, sind die Objektdicke und Kontrastarmut. Durch die notwendigen Präparationsbedingungen kann ein Artefakt-Bild erhalten werden, d.h. das Verteilungsmuster von Schwermetallatomen eines zuvor entwässerten Präparates wird durch die Bestrahlung mit Elektronen registriert.

Nachfolgend sind die grundlegenden Präparationsschritte für die TEM-Darstellung kurz umschrieben:

##### 1. Fixation

Das Fixieren dient einer schnellen, bestmöglichen Strukturerhaltung sowie -stabilisierung und verhindert autolytische Abbauprozesse. Es wird mit einer chemischen Doppelfixation begonnen.

##### Primär-Fixation

Zur Primär-Fixation werden hauptsächlich Aldehyde verwendet. Diese vernetzen  $\text{NH}_2$ -Gruppen benachbarter Proteine über Methylenbrücken. Zu beachten ist jedoch, dass nur Aldehyd-gefärbtes Gewebe sehr kontrastarm ist.

##### Sekundär-Fixation

Eine zweite Fixation kann u.a. mit Osmium erfolgen, dabei werden vorrangig Membranen (Lipide/Proteine) fixiert. Dies beruht auf der Reaktion von Osmiumsäure ( $\text{H}_5\text{OsO}_5$ ,



## 4 Material & Methoden

Osmiumtetroxid in Wasser) mit Doppel- und Dreifachbindungen sowie mit SH-Gruppen von Lipoiden und Proteinen. Dieser Schritt dient zudem der Kontrastierung des Materials, da Osmium wegen seines hohen Atomgewichts ein gutes Kontrastmittel darstellt.

### 2. Entwässerung

Dieser Schritt ist wichtig, da unter Hochvakuum gearbeitet wird und das in der Probe vorhandene Wasser verdampfen würde! Zur Entwässerung wird meistens Alkohol oder Aceton verwendet.

### 3. Einbetten in Kunststoff

In diesem Schritt wird das Entwässerungsagens gegen Kunststoff getauscht und die Proben anschließend im Ofen ausgehärtet.

### 4. Dünnschnitte

Wie zuvor beschrieben müssen Dünnschnitte angefertigt werden, welche auf ein Trägermaterial aufgebracht werden. Dazu können z.B. Kupfernetzchen verwendet werden. Für eine hohe Auflösung sollten die Schnitte möglichst dünn und die Trägerfolien gut durchstrahlbar sein, wobei das Objekt die thermische, ionisierende Belastung und das Vakuum aushalten muss.

### 5. Kontrastierung der Schnitte

Da die generierten Elektronen nur ausreichend durch Schwermetalle abgelenkt werden, werden die Schnitte mit Bleicitrat und Uranylacetat nachkontrastiert. Dadurch wird die Elektronendichte künstlich erhöht, aufgrund dessen dass das Kontrastmittel von Teilen des Objektes mehr oder weniger spezifisch gebunden und das Objekt somit dunkler gegenüber seiner Umgebung wird.

### 6. Betrachtung der Schnitte.

## Detailliertes Protokoll zur Einbettung und Präparation von Dünnschnitten

In dieser Arbeit wurden Hefezellen für die TEM verwendet. Dazu wurden *P. pastoris*-Zellen in 50 ml YPD bei 30°C und 180-200 rpm angezogen bis eine OD<sub>600</sub> von 1,0 erreicht wurde (Medien s. 4.2.2, S.119). Danach wurden die Zellen für 3 min bei 3.220 xg geerntet, mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen und zur Induktion in 50 ml MM-Medium (0,5%) aufgenommen. Die Inkubation erfolgte für 9 h bei 30°C und 180-200 rpm. Danach wurden die Zellen wiederum geerntet, gewaschen und in 50 ml MD-Medium aufgenommen und für weitere 9 h bei 30°C und 180-200 rpm inkubiert. Die Zeitpunkte der Probenahmen variierten zwischen 0 h und 9 h in MM- und MD-Medium. Die Zeitpunkte konnten z.B. in Anlehnung an Sakai *et al.* [298] folgendermaßen gewählt werden: 0; 0,5; 2; 3; 6 und 9 h.

Nach Ernte von je 2 ml Kultur pro Zeiteinheit in einem 1,5 ml-RG (wegen dem zulaufenden Boden!) bei 13.000 rpm für 3 min, wurden die Zellen mit 0,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen. Danach folgte die erste Fixation der pelletierten Zellen für 30 min bei RT in 100 µl Glutaraldehyd (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, giftig) und anschließend für weitere 2 h auf Eis. Dazu wurden 2% Glutaraldehyd in 75 mM Cacodylat-Puffer, pH 7 angesetzt. ZU BEACHTEN IST, DASS DIE ZELLEN WÄHREND DER GESAMTEN PROZEDUR NICHT TROCKEN FALLEN DÜRFEN! Nach dreimaligem Waschen der Zellen in 100 µl 75 mM Cacodylat-Puffer, pH 7 und Zentrifugation für 3 min bei 13.000 rpm kann das Zellpellet im Überstand des letzten Waschpuffers bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert werden.

Zur einfacheren Handhabung der Zellen im weiteren Verlauf wurden diese einer Agareinbettung unterzogen. Dazu wurde nach Zentrifugieren und Absaugen des Waschpuffers das Zellpellet mit warmer 2%iger Agarlösung im Verhältnis 1:1 im 1,5 ml-RG gemischt und der Agar sofort auf Eis aushärtet. ACHTUNG: KEINE LUFTBLASEN ERZEUGEN UND DIE ZELLEN NICHT ZU SEHR AUFWIRBELN, DAMIT DIESE KOMPAKT BLEIBEN! Das ausgehärtete Zell-Agar-Gemisch wurde aus dem

## 4 Material & Methoden

Gefäß geklopft, die Zell-Agar-Blöcke von zellfreiem Agar abgetrennt (auf einer Glasplatte mit Rasierklinge), nochmals mit Agar betropft und auf Eis ausgehärtet. Nur Agar mit eingeschlossenen Zellen wurde in ein Rollrandgefäß überführt. Optional konnten die Zellen an dieser Stelle in 75 mM Cacodylat-Puffer (pH 7) im Rollrandgläschen bei +4°C bis zur nächsten Fixation gelagert werden! Die zweite Fixation konnte ün oder für 60 min bei RT nach Verwerfen des Waschpuffers in Osmiumtetroxid (OsO<sub>4</sub>, giftig; 1% in 75 mM Cacodylat-Puffer pH 7) erfolgen. Dabei verfärbten sich die Agar-Zell-Blöcke schwarz. Nach dreimaligem Waschen der Agar-Zell-Blöcke mit 75 mM Cacodylat-Puffer, pH 7 und Zentrifugation für 3 min bei 13.000 rpm konnte die Entwässerung folgen. Dazu wurde nach Entfernen des Waschpuffers für die Spurr-Einbettung stufenweise mit Aceton entwässert. Dabei wurde die Acetonkonzentration langsam, wie folgt, GESTEIGERT:

auf Eis für je 10 min inkubieren mit 15%, 30%, 50%, 70%, 90% und 100% Aceton  
bei RT für zweimal 15 min inkubieren mit 100% Aceton

Die Gesamtdauer betrug 90 min. Aceton, welches auf Eis angewendet wird, sollte gekühlt sein! Danach folgte der langsame Wechsel von Aceton zum Spurr-Einbettungsgemisch (LVG, Low Viscosity Gemisch), welches sich folgendermaßen zusammensetzt:

5 g VCD (E.R.L. 4206, Vinycyclohexendioxid)  
3 g D.E.R. 736 (Diglycidether von Propylenglycol - Weichmacher)  
13 g NSA (Nonenyl-Bernsteinsäureanhydrid - Härter)  
0,2 g DMAE (S-1, Dimethylaminoethanol - Beschleuniger)  
VCD + D.E.R 736 + NSA gut mischen (Magnetrührer)  
DMAE zugeben und weitere 30 min mischen  
(Spurr kann bei -20°C etliche Monate aufbewahrt werden, bei RT nur 2-3 d!!)

TIPP: FRÜHZEITIG ANSETZEN, DAMIT SICH DIE ZÄHE MASSE GUT DURCHMISCHEN KANN. GERADE DANN WENN MISCHUNGEN MIT ACETON ANGESETZT WERDEN MÜSSEN!

Danach wurden die Proben für 60 min in Aceton+Spurr (3+1 Teile) gerollt oder geschüttelt und im Anschluss für weitere 60 min in Aceton+Spurr (1+1 Teil).

Dann war das weitere Vorgehen variabel. Entweder man schüttelte (oder rollte) die Proben (A) für 60 min in Aceton+Spurr (1+3 Teile) und beließ die Proben ün in 100% Spurr, welches am nächsten Morgen noch einmal gewechselt wurde oder man schüttelte (oder rollte) die Proben (B) ün in Aceton+Spurr (1+3 Teile), wobei die Deckel der Rollrandgefäße nicht komplett verschlossen sein sollten, damit das Aceton ün etwas verdampfen konnte. Am nächsten Tag wurden die Proben dann für 3 h in 100% Spurr belassen, welches zwischendurch einmal gewechselt werden sollte. Alle diese Schritte waren bei RT durchzuführen.

Im Anschluss konnten die Objekte in Einbettungsformen aus Silikon oder Kautschuk gebracht und diese mit Spurr aufgefüllt werden. Die hier angewandte Flacheinbettung hat die Schaffung einer möglichst großen Querschnittsfläche für die nachfolgenden Ultradünnschnitt-Techniken zum Ziel. Das Auspolymerisieren der Proben erfolgte bei 70°C für 24 h in einem Ofen.

Die Herstellung der Ultradünnschnitte erfolgte mit einem Mikrotom der Firma DIATOME (Biel, Schweiz). Anschließend wurden die Schnitte auf ein Trägermaterial, z.B. Kupfernetzchen, aufgebracht. Hierbei gilt die Regel "Auflösung gleich 1/10 der Objektdicke", um eine möglichst hohe Auflösung im TEM zu erzielen.

Die Kontrastierung der Schnitte wurde mit Uranylacetat und Bleicitrat erreicht. Dabei kann einzeln wie auch hintereinander folgend doppelt kontrastiert werden. Folgende Kontrastmittel fanden in dieser Arbeit Anwendung:

*Uranylacetat* (UA, schwach radioaktiv) lagert sich an Phosphat-Gruppen der Nukleinsäuren an. Die Kontrastierung erfolgte mit einer gesättigten wässrigen Lösung für 5-10 min. Dazu wurden die Netze mit den Schnitten nach unten auf UA-Tröpfchen gelegt und das UA mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> wieder abgespült.

*Bleicitrat* bewirkt eine Kontrasterhöhung von Membranen, Proteinen und Nukleinsäuren. Nach *Reynolds* musste angesetzt werden:

- 1,33 g  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$
- 1,76 g  $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (Na-Citrat)
- + 30 ml frisch abgekochtes Wasser
- > 30 min Schütteln bis Bleinitrat zu Bleicitrat umgewandelt wurde
- + 8 ml 1 N NaOH-Lösung und mit frisch abgekochtem Wasser ad 50 ml auffüllen

Bei reduzierter  $\text{CO}_2$ -Konzentration wurden die Netze auf Tropfen der Lösung (pH 12) für 5-15 min gelegt, danach sofort kurz mit 0,02 N NaOH-Lösung abgespritzt (oder in diese eingetaucht) und nochmals dreimal mit Wasser gewaschen!

Die Durchmusterung der Schnitte erfolgte in einem TE-Mikroskop ("LEO 906 E", ZEISS, Oberkochen, D). Die Ergebnisse wurden mit einer im Gerät integrierten Kamera dokumentiert.

Die TEM-Analysen wurden mit Unterstützung von Elke Woelken (Biozentrum Klein-Flottbek, Universität Hamburg) durchgeführt. Dazu gehörte die Unterstützung bei der Einbettung, die zur Verfügungstellung von Reagenzien und Materialien sowie die Herstellung der Dünnschnitte und die Einweisung in das Mikroskop.

### 4.15.2 Fluoreszenzmikroskopie

Für die ersten fluoreszenzmikroskopischen Analysen wurden *P. pastoris*-Zellen mit Methanol induziert und in einer entsprechenden Verdünnung auf Fluoreszenzsignale überprüft. Dazu wurde das AxioVert-Fluoreszenzmikroskop "Imager Z1" (ZEISS, Jena, D) der Arbeitsgruppe Schäfer (Phytopathologie, Universität Hamburg) genutzt, dass die folgenden Filter zur Verfügung stellte: DAPI (exc 335-383 nm, em 420-470 nm), GFP (exc 450-490 nm, em 500-550 nm) und dsRed (exc 538-562/570 nm, em 570-640 nm).

Weiterführende Analysen wurden von Masahide Oku (Universität Kyoto, JP) durchgeführt. Dieser führte die Fluoreszenzstudien analog zu der Beschreibung in Oku und Sakai [261] durch.

# Literaturverzeichnis

- [1] ABRAHAM, W., WERTZ, P. W., BURKEN, R. R., and DOWNING, D. T.: Glucosylsterol and acylglucosylsterol of snake epidermis: structure determination. *J Lipid Res*, 28(4):446–449, 1987.
- [2] ADAM, H. K., CAMPBELL, I. M., and MCCORKINDALE, N. J.: Ergosterol peroxide: a fungal artefact. *Nature*, 216(5113):397, 1967.
- [3] ADLER, B., BALLARD, S. A., MILLER, S. J., and FAINE, S.: Monoclonal antibodies reacting with serogroup and serovar specific epitopes on different lipopolysaccharide subunits of *Leptospira interrogans* serovar pomona. *FEMS Microbiol Immunol*, 1(4):213–218, 1989.
- [4] AGRIOS, G. N.: *Plant Pathology*. Academic Press, San Diego, London, New York, Sydney, Tokio, Toronto, 4th edition, 1997.
- [5] AGRIOS, G. N.: *Colletotrichum* diseases. Academic Press, San Diego, CA, 5th edition, 2004.
- [6] AHMAD, V. U., ALIYA, R., PERVEEN, S., and SHAMEEL, M.: A sterol glycoside from marine green alga *Codium iyengarii*. *Phytochemistry*, 31:1429–1431., 1992.
- [7] ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., and LIPMAN, D. J.: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3):403–410, 1990.
- [8] ARDITTI, J., FISCH, E. M. H., and FLICK, B. H.: Ergosterol Peroxide from *Rhizoctonia repens*: Composition, Conformation, and Origin. *J C S Chem Comm*, pages 1217–1218, 1972.
- [9] ASAKURA, M., NINOMIYA, S., SUGIMOTO, M., OKU, M., YAMASHITA, S. I., OKUNO, T., SAKAI, Y., and TAKANO, Y.: Atg26-Mediated Pexophagy Is Required for Host Invasion by the Plant Pathogenic Fungus *Colletotrichum orbiculare*. *Plant Cell*, 21(4):1291–1304, 2009.
- [10] ASAKURA, M., OKUNO, T., and TAKANO, Y.: Multiple contributions of peroxisomal metabolic function to fungal pathogenicity in *Colletotrichum lagenarium*. *Appl Environ Microbiol*, 72(9):6345–6354, 2006.
- [11] AYDOGMUS, Z., TOPCU, G., and GÜVEN, K. C.: Studies on chemical constituents of *Gracilaria verrucosa*. *Nat Prod Res*, 22(18):1589–1596, 2008.
- [12] BARBOUR, A. G. and HAYES, S. F.: Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev*, 50(4):381–400, 1986.
- [13] BARENHOLZ, Y.: Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to "rafts". *Prog Lipid Res*, 41(1):1–5, 2002.
- [14] BAUSLAUGH, G., JUST, G., and BLANK, F.: Isolation of ergosterol peroxide from *Trichophyton schoenleinii*. *Nature*, 202:1218, 1964.
- [15] BECHINGER, C., GIEBEL, K. F., SCHNELL, M., LEIDERER, P., DEISING, H. B., and BASTMEYER, M.: Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science*, 285(5435):1896–1899, 1999.
- [16] BECK, G., BENACH, J. L., and HABICHT, G. S.: Isolation, preliminary chemical characterization, and biological activity of *Borrelia burgdorferi* peptidoglycan. *Biochem Biophys Res Commun*, 167(1):89–95, 1990.
- [17] BECK, G., HABICHT, G. S., BENACH, J. L., and COLEMAN, J. L.: Chemical and biologic characterization of a lipopolysaccharide extracted from the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *J Infect Dis*, 152(1):108–117, 1985.
- [18] BEGLEY, M. J., TAYLOR, G. S., KIM, S. A., VEINE, D. M., DIXON, J. E., and STUCKEY, J. A.: Crystal structure of a phosphoinositide phosphatase, MTMR2: insights into myotubular myopathy and Charcot-Marie-Tooth syndrome. *Mol Cell*, 12(6):1391–1402, 2003.
- [19] BELISLE, J. T., BRANDT, M. E., RADOLF, J. D., and NORGARD, M. V.: Fatty acids of *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. *J Bacteriol*, 176(8):2151–2157, 1994.
- [20] BEN-MENACHEM, G., KUBLER-KIELB, J., COXON, B., YERGEY, A., and SCHNEERSON, R.: A newly discovered cholesteryl galactoside from *Borrelia burgdorferi*. *PNAS*, 100(13):7913–7918, 2003.
- [21] BENSON, A. A., WISER, R., FERRARI, R. A., and MILLER, J. A.: Photosynthesis of Galactolipids. *J Am Chem Soc*, 80:4740, 1958.
- [22] BENVENISTE, P.: Sterol Metabolism. *The Arabidopsis Book*, pages 1–31, 2002.

## Literaturverzeichnis

- [23] BERG, J., TYMOCZKO, J., and STRYER, L.: Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 6th edition, 2007.
- [24] BERG, S., EDMAN, M., LI, L., WIKSTRÖM, M., and WIESLANDER, A.: Sequence properties of the 1,2-diacylglycerol 3-glucosyltransferase from *Acholeplasma laidlawii* membranes. Recognition of a large group of lipid glycosyltransferases in eubacteria and archaea. *J Biol Chem*, 276(25):22056–22063, 2001.
- [25] BERGER, P., SCHAFFITZEL, C., BERGER, I., BAN, N., and SUTER, U.: Membrane association of myotubularin-related protein 2 is mediated by a pleckstrin homology-GRAM domain and a coiled-coil dimerization module. *PNAS*, 100(21):12177–12182, 2003.
- [26] BHAT, R. A. and PANSTRUGA, R.: Lipid rafts in plants. *Planta*, 223(1):5–19, 2005.
- [27] BIRD, C. W., LYNCH, J. M., PIRT, F. J., and REID, W. W.: Steroids and squalene in *Methylococcus capsulatus* grown on methane. *Nature*, 230(5294):473–474, 1971.
- [28] BIRMINGHAM, C. L., CANADIEN, V., GOUIN, E., TROY, E. B., YOSHIMORI, T., COSSART, P., HIGGINS, D. E., and BRUMELL, J. H.: *Listeria monocytogenes* evades killing by autophagy during colonization of host cells. *Autophagy*, 3(5):442–451, 2007.
- [29] BLEDSOE, H. A., CARROLL, J. A., WHELCHER, T. R., FARMER, M. A., DORWARD, D. W., and GHERARDINI, F. C.: Isolation and partial characterization of *Borrelia burgdorferi* inner and outer membranes by using isopycnic centrifugation. *J Bacteriol*, 176(24):7447–7455, 1994.
- [30] BLOCH, K. E.: Sterol structure and membrane function. *CRC Crit Rev Biochem*, 14(1):47–92, 1983.
- [31] BOK, J. W., LERMER, L., CHILTON, J., KLINGEMAN, H. G., and TOWERS, G. H.: Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry*, 51(7):891–898, 1999.
- [32] BORENSTEIN, A. R., MORTIMER, J. A., SCHELLENBERG, G. D., GALASKO, D., BRADLEY, W. G., BANACK, S. A., COX, P. A., CRUZ-AGUADO, R., SHAW, C. A., SPENCER, P. S., PALMER, V., KISBY, G., MCGEER, P. L., and STEELE, J. C.: The ALS/PDC syndrome of Guam and the cycad hypothesis. *Neurology*, 72(5):474, 476; author reply 475–474, 476; author reply 476, 2009.
- [33] BOUHSS, A., TRUNKFIELD, A. E., BUGG, T. D. H., and MENGIN-LECREULX, D.: The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2):208–233, 2008.
- [34] BOURIER, P., ROHMAR, M., BENVENISTE, P., and OURISSON, G.: A8(14)-Steroids in the bacterium *Methylococcus capsulatus*. *Biochem J*, 159:267–271, 1976.
- [35] BOURNE, Y. and HENRISSAT, B.: Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr Opin Struct Biol*, 11(5):593–600, 2001.
- [36] BOUVIER-NAVE, P. and BENVENISTE, P.: Sterol acyl transferase and steryl ester hydrolase activities in a tobacco mutant which overproduces sterols. *Plant Sci*, 110:11–19, 2001.
- [37] BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254, 1976.
- [38] BRAMHALL, S., NOACK, N., WU, M., and LOEWENBERG, J. R.: A simple colorimetric method for determination of protein. *Anal Biochem*, 31(1):146–148, 1969.
- [39] BRETSCHER, M. S. and MUNRO, S.: Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science*, 261(5126):1280–1281, 1993.
- [40] BRICKNER, J. H. and FULLER, R. S.: SOI1 encodes a novel, conserved protein that promotes TGN-endosomal cycling of Kex2p and other membrane proteins by modulating the function of two TGN localization signals. *J Cell Biol*, 139(1):23–36, 1997.
- [41] BROWN, D. A. and LONDON, E.: Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14:111–136, 1998.
- [42] BROWN, D. J. and DUPONT, F. M.: Lipid Composition of Plasma Membranes and Endomembranes Prepared from Roots of Barley (*Hordeum vulgare* L.) : Effects of Salt. *Plant Physiol*, 90(3):955–961, 1989.
- [43] BÖTTNER, M.: Die Expression humaner Proteine in der Hefe *Pichia pastoris*: Hochdurchsatzverfahren und bioinformatische Identifizierung von Expression-beeinflussenden Sequenzmerkmalen. PhD thesis, Technical University Berlin, 2004.
- [44] BURGDORFER, W., BARBOUR, A. G., HAYES, S. F., BENACH, J. L., GRUNWALDT, E., and DAVIS, J. P.: Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science*, 216(4552):1317–1319, 1982.
- [45] CAMPBELL, J. A., DAVIES, G. J., BULONE, V., and HENRISSAT, B.: A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 326 ( Pt 3):929–939, 1997.

- [46] CANTAREL, B. L., COUTINHO, P. M., RANCUREL, C., BERNARD, T., LOMBARD, V., and HENRISAT, B.: The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue):D233–D238, 2009.
- [47] CAO, Y. and KLIONSKY, D. J.: Atg26 is not involved in autophagy-related pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy*, 3(1):17–20, 2007.
- [48] CASABUONO, A. C. and POMILIO, A. B.: Linear, steroidal, and triterpene esters, and steryl glycosides from *Festuca argentina*. *Lipids*, 32(2):205–210, 1997.
- [49] CHARNOCK, S. J. and DAVIES, G. J.: Structure of the Nucleotide-Diphospho-Sugar Transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in Native and Nucleotide-Complexed Forms. *Biochemistry*, 38:6380–6385, 1999.
- [50] CHEY, W. D., WONG, B. C. Y., and PRACTICE PARAMETERS COMMITTEE OF THE AMERICAN COLLEGE OF GASTROENTEROLOGY: American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*, 102(8):1808–1825, 2007.
- [51] CHIEN, C. T., BARTEL, P. L., STERNGLANZ, R., and FIELDS, S.: The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *PNAS*, 88(21):9578–9582, 1991.
- [52] CINCO, M., BANFI, E., BALANZIN, D., GODEAS, C., and PANFILI, E.: Evidence for (lipo) oligosaccharides in *Borrelia burgdorferi* and their serological specificity. *FEMS Microbiol Immunol*, 3(1):33–38, 1991.
- [53] CINCO, M., BANFI, E., and PANFILI, E.: Leptospiral lipopolysaccharide presence in the outer envelope: electrophoretic evidence and immunological specificity. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, 269(3):277–283, 1988.
- [54] CLARKE, S. M. and MCKENZIE, M.: *Penicillium sclerotigenum*: a new source of griseofulvin. *Nature*, 213(5075):504–505, 1967.
- [55] COUDERC, R. and BARATTI, J.: Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. *Agric Biol Chem*, 44:2279–80, 1980.
- [56] COUTINHO, P. M., DELEURY, E., DAVIES, G. J., and HENRISAT, B.: An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol*, 328(2):307–317, 2003.
- [57] COVER, T. L. and BLASER, M. J.: *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disease. *Annu Rev Med*, 43:135–145, 1992.
- [58] CREGG, J. M., BARRINGER, K. J., HESSLER, A. Y., and MADDEN, K. R.: *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol*, 5(12):3376–3385, 1985.
- [59] CREGG, J. M., LIN CEREGHINO, J., SHI, J., and HIGGINS, D. R.: Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*, 16(1):23–52, 2000.
- [60] CREGG, J. M. and MADDEN, K. R.: Use of site-specific recombination to regenerate selectable markers. *Mol Gen Genet*, 219(1-2):320–323, 1989.
- [61] DALY, R. and HEARN, M. T. W.: Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*, 18(2):119–138, 2005.
- [62] DANIELLI, J. F. and DAVSON, H.: A contribution to the theory of permeability of thin films. *J Cell Comp Physiol*, 5:495–508., 1935.
- [63] DE JONG, J. C., MCCORMACK, B. J., SMIRNOFF, N., and TALBOT, N. J.: Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature*, 389:244–245, 1997.
- [64] DE SCHUTTER, K., LIN, Y. C., TIELS, P., VAN HECKE, A., GLINKA, S., WEBER-LEHMANN, J., ROUZÉ, P., VAN DE PEER, Y., and CALLEWAERT, N.: Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol*, 27(6):561–566, 2009.
- [65] DEBOLT, S., SCHEIBLE, W. R., SCHRICK, K., AUERF, M., BEISSON, F., BISCHOFF, V., BOUVIER-NAVÉ, P., CARROLL, A., HEMATY, K., LI, Y., MILNE, J., NAIR, M., SCHALLER, H., ZEMLA, M., and SOMERVILLE, C.: Mutations in UDP-glucose:sterol-glucosyltransferase in *Arabidopsis* cause transparent testa phenotype and suberization defect in seeds. *Plant Physiol*, 151:78–87, 2009.
- [66] DEMEL, R. A. and DE KRUYFF, B.: The function of sterols in membranes. *Biochim Biophys Acta*, 457(2):109–132, 1976.
- [67] DI PAOLO, G. and DE CAMILLI, P.: Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 443(7112):651–657, 2006.
- [68] DIXON, M. F., GENTA, R. M., YARDLEY, J. H., and CORREA, P.: Histological classification of gastritis and *Helicobacter pylori* infection: an agreement at last? The International Workshop on the Histopathology of Gastritis. *Helicobacter*, 2 (Suppl 1):S17–S24, 1997.

- [69] DOERKS, T., STRAUSS, M., BRENDDEL, M., and BORK, P.: GRAM, a novel domain in glucosyltransferases, myotubularins and other putative membrane-associated proteins. *Trends Biochem Sci*, 25(10):483–485, 2000.
- [70] DUPERON, P., DUPERON, R., and THIERSAULT, M.: Occurrence of steryl glycosides and acylated steryl glycosides in some marine algae. *Phytochemistry*, 22:535–538, 1983.
- [71] DUPERON, R., DOIREAU, P., and DUPERON, P.: Presence of steryl glycosides and amyirin glycosides in a blue-green alga *Nostoc commune* and a red alga *Porphyridium* sp. In: *Biogenesis and Function of Plant Lipids. Symposium on Recent Advances in the Biogenesis and Function of Plant Lipids*, Paris, 1980.
- [72] ECKERT, J. H. and ERDMANN, R.: Peroxisome biogenesis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 147:75–121, 2003.
- [73] EICHENBERGER, W. and MENKE, W.: Sterole in Blättern und Chloroplasten. *Z Naturforsch*, 21b:859–867, 1966.
- [74] EIFFERT, H., LOTTER, H., JARECKI-KHAN, K., and THOMSEN, R.: Identification of an immunoreactive non-proteinaceous component in *Borrelia burgdorferi*. *Med Microbiol Immunol*, 180(5):229–237, 1991.
- [75] ELLIS, S. B., BRUST, P. F., KOUTZ, P. J., WATERS, A. F., HARPOLD, M. M., and GINGERAS, T. R.: Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol*, 5(5):1111–1121, 1985.
- [76] ENGELMAN, D. M.: Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, 438(7068):578–580, 2005.
- [77] EPPLE, U. D., ESKELINEN, E.-L., and THUMM, M.: Intravacuolar membrane lysis in *Saccharomyces cerevisiae*. Does vacuolar targeting of Cvt17/Aut5p affect its function? *J Biol Chem*, 278(10):7810–7821, 2003.
- [78] ESDERS, T. W. and LIGHT, R. J.: Occurrence of a uridine diphosphate glucose: sterol glucosyltransferase in *Candida bogoriensis*. *J Biol Chem*, 247(23):7494–7497, 1972.
- [79] FAHY, E., SUBRAMANIAM, S., BROWN, H. A., GLASS, C. K., MERRILL, A. H., MURPHY, R. C., RAETZ, C. R. H., RUSSELL, D. W., SEYAMA, Y., SHAW, W., SHIMIZU, T., SPENER, F., VAN MEER, G., VAN NIEUWENHZE, M. S., WHITE, S. H., WITZTUM, J. L., and DENNIS, E. A.: A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res*, 46(5):839–861, 2005.
- [80] FAN, J., QUAN, S., ORTH, T., AWAI, C., CHORY, J., and HU, J.: The *Arabidopsis* PEX12 gene is required for peroxisome biogenesis and is essential for development. *Plant Physiol*, 139(1):231–239, 2005.
- [81] FARRÉ, J.-C., KRICK, R., SUBRAMANI, S., and THUMM, M.: Turnover of organelles by autophagy in yeast. *Curr Opin Cell Biol*, 21(4):522–530, 2009.
- [82] FARRÉ, J.-C., MANJITHAYA, R., MATHEWSON, R. D., and SUBRAMANI, S.: PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy. *Dev Cell*, 14(3):365–376, 2008.
- [83] FARRÉ, J.-C. and SUBRAMANI, S.: Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process. *Trends Cell Biol*, 14(9):515–523, 2004.
- [84] FARRÉ, J.-C., VIDAL, J., and SUBRAMANI, S.: A cytoplasm to vacuole targeting pathway in *P. pastoris*. *Autophagy*, 3(3):230–234, 2007.
- [85] FETCHKO, M. and STAGLJAR, I.: Application of the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system to investigate membrane protein interactions. *Methods*, 32(4):349–362, 2004.
- [86] FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E., and MELLO, C. C.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669):806–811, 1998.
- [87] FRASER, C. M., CASJENS, S., HUANG, W. M., SUTTON, G. G., CLAYTON, R., LATHIGRA, R., WHITE, O., KETCHUM, K. A., DODSON, R., HICKEY, E. K., GWINN, M., DOUGHERTY, B., TOMB, J. F., FLEISCHMANN, R. D., RICHARDSON, D., PETERSON, J., KERLAVAGE, A. R., QUACKENBUSH, J., SALZBERG, S., HANSON, M., VAN VUGT, R., PALMER, N., ADAMS, M. D., GOCAYNE, J., WEIDMAN, J., UTTERBACK, T., WATHEY, L., McDONALD, L., ARTIACH, P., BOWMAN, C., GARLAND, S., FUJII, C., COTTON, M. D., HORST, K., ROBERTS, K., HATCH, B., SMITH, H. O., and VENTER, J. C.: Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 390(6660):580–586, 1997.
- [88] FRASER, C. M., NORRIS, S. J., WEINSTOCK, G. M., WHITE, O., SUTTON, G. G., DODSON, R., GWINN, M., HICKEY, E. K., CLAYTON, R., KETCHUM, K. A., SODERGREN, E., HARDHAM, J. M., MCLEOD, M. P., SALZBERG, S., PETERSON, J., KHALAK, H., RICHARDSON, D., HOWELL, J. K., CHIDAMBARAM, M., UTTERBACK, T., McDONALD, L., ARTIACH, P., BOWMAN, C., COTTON, M. D., FUJII, C., GARLAND, S., HATCH, B., HORST, K., ROBERTS, K., SANDUSKY, M., WEIDMAN, J., SMITH, H. O., and VENTER, J. C.: Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science*, 281(5375):375–388, 1998.

- [89] FUJIKI, Y., OKUMOTO, K., KINOSHITA, N., and GHAEDI, K.: Lessons from peroxisome-deficient Chinese hamster ovary (CHO) cell mutants. *Biochim Biophys Acta*, 1763(12):1374–1381, 2006.
- [90] FUJINO, Y. and OHNISHI, M.: Isolation and structure of diglycosylsterols and triglycosylsterols in rice bran. *Biochim Biophys Acta*, 574(1):94–102, 1979.
- [91] GAO, J. M., WANG, M., LIU, L. P., WEI, G. H., ZHANG, A. L., DRAGHICI, C., and KONISHI, Y.: Ergosterol peroxides as phospholipase A(2) inhibitors from the fungus *Lactarius hatsudake*. *Phytochemistry*, 14(12):821–824, 2007.
- [92] GASTINEL, L. N., CABBILLAU, C., and BOURNE, Y.: Crystal structure of the bovine  $\beta$ 4galactosyltransferase catalytic domain and its complex with uridine diphosphogalactose. *EMBO J*, 18:3546–57, 1999.
- [93] GAULLIER, J. M., SIMONSEN, A., D'ARRIGO, A., BREMNES, B., STENMARK, H., and AASLAND, R.: FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature*, 394(6692):432–433, 1998.
- [94] GHANNOUM, M. A., JANINI, G., KHAMIS, L., and RADWAN, S. S.: Dimorphism-associated variations in the lipid composition of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*, 132(8):2367–2375, 1986.
- [95] GHANNOUM, M. A., SWAIRJO, I., and SOLL, D. R.: Variation in lipid and sterol contents in *Candida albicans* white and opaque phenotypes. *J Med Vet Mycol*, 28(2):103–115, 1990.
- [96] GIBBONS, G. F.: From gallstones to genes: two hundred years of sterol research. A tribute to George J. Schroepfer Jr. *Lipids*, 37(12):1153–1162, 2002.
- [97] GIBSON, R. P., TURKENBURG, J. P., CHARNOCK, S. J., LLOYD, R., and DAVIES, G. J.: Insights into trehalose synthesis provided by the structure of the retaining glucosyltransferase OtsA. *Chem Biol*, 9(12):1337–1346, 2002.
- [98] GIBSON, T. J., HYVÖNEN, M., MUSACCHIO, A., SARASTE, M., and BIRNEY, E.: PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem Sci*, 19(9):349–353, 1994.
- [99] GILLOOLY, D. J., SIMONSEN, A., and STENMARK, H.: Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins. *Biochem J*, 355(2):249–258, 2001.
- [100] GLEESON, M. A. and SUDBERY, P. E.: The Methylophilic Yeasts. *Yeast*, 4:1–15, 1988.
- [101] GOFFIN, C. and GHUYSEN, J. M.: Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(4):1079–1093, 1998.
- [102] GORTER, E. and GREDEL, F.: On biomolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J Exp Med*, 41:439–443, 1925.
- [103] GOSWAMI, R. S. and KISTLER, H. C.: Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol Plant Pathol*, 5:515–525, 2004.
- [104] GOTSCHLICH, E. C.: Genetic locus for the biosynthesis of the variable portion of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide. *J Exp Med*, 180(6):2181–2190, 1994.
- [105] GRILLE, S.: Resistenz- und Fluoreszenzstudien am Pflanzenpathogen *Botrytis cinerea*. 1. Expressionanalyse von ABC- und MFS-Transportern in *Botrytis cinerea*-Freilandisolaten und ihre Rolle bei der multidrug resistance (MDR) 2. Erzeugung von GFP-exprimierenden *Botrytis cinerea*-Transformanten. Diploma thesis, Technical University of Kaiserslautern, 2006.
- [106] GRILLE, S., ZASLAWSKI, A., THIELE, S., PLAT, J., and WARNECKE, D.: Steryl glycosides come to those who wait: Recent functions of glycosylated sterols in plants, fungi, bacteria and animals. *Prog Lipid Res*, 49(3):262–288, 2010.
- [107] GRISSHAMMER, R. and TATE, C. G.: Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q Rev Biophys*, 28(3):315–422, 1995.
- [108] GURVITZ, A. and ROTTENSTEINER, H.: The biochemistry of oleate induction: transcriptional upregulation and peroxisome proliferation. *Biochim Biophys Acta*, 1763(12):1392–1402, 2006.
- [109] GUSTAFSSON, C., GOVINDARAJAN, S., and MINSHULL, J.: Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol*, 22(7):346–353, 2004.
- [110] HA, S., GROSS, B., and WALKER, S.: *E. coli* MurG: a paradigm for a superfamily of glycosyltransferases. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 1(2):201–213, 2001.
- [111] HA, S., WALKER, D., SHI, Y., and WALKER, S.: The 1.9 Å crystal structure of *Escherichia coli* MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. *Protein Sci*, 9(6):1045–1052, 2000.



## Literaturverzeichnis

- [112] HABICHT, G. S., BECK, G., BENACH, J. L., and COLEMAN, J. L.: *Borrelia burgdorferi* lipopolysaccharide and its role in the pathogenesis of Lyme disease. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A, 263:137–141, 1986.
- [113] HALTER, M. R. and JOENS, L. A.: Lipooligosaccharides from *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*. Infect Immun, 56(12):3152–3156, 1988.
- [114] HANNIG, G. and MAKRIDES, S. C.: Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. Trends Biotechnol, 16(2):54–60, 1998.
- [115] HAQUE, M., HIRAI, Y., YOKOTA, K., MORI, N., JAHAN, I., ITO, H., HOTTA, H., YANO, I., KANEMASA, Y., and OGUMA, K.: Lipid profile of *Helicobacter* spp.: presence of cholesteryl glucoside as a characteristic feature. J Bacteriol, 178(7):2065–2070, 1996.
- [116] HAQUE, M., HIRAI, Y., YOKOTA, K., and OGUMA, K.: Lipid profiles of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* grown in serum-supplemented and serum-free media. Acta Med Okayama, 49(4):205–211, 1995.
- [117] HAQUE, M., HIRAI, Y., YOKOTA, K., and OGUMA, K.: Steryl glycosides: a characteristic feature of the *Helicobacter* spp.? J Bacteriol, 177(18):5334–5337, 1995.
- [118] HARTMANN, M. A.: Plant sterols and the membrane environment. Trends in Plant Sci Rev, 3:170–175, 1998.
- [119] HARTMANN-BOUILLON, M. A. and BENVENISTE, P.: Sterol biosynthetic capability of purified membrane fractions from maize coleoptiles. Phytochemistry, 17: 1037–1042, 1978.
- [120] HASCHKE, H. P., KAISER, G., MARTINOIA, E., HAMMER, U., TEUCHER, T., DORNE, A., and HEINZ, E.: Lipid profiles of leaf tonoplasts from plants with different CO<sub>2</sub>-fixation mechanisms. Bot Acta, 103:32–38, 1990.
- [121] HASE, A.: Isolation and characterization of a glycolipid from *Dictyostelium discoideum*. Arch Biochem Biophys, 210(1):280–288, 1981.
- [122] HASLAM, R. J., KOIDE, H. B., and HEMMINGS, B. A.: Pleckstrin domain homology. Nature, 363(6427):309–310, 1993.
- [123] HAYAMI, M., OKABE, A., SASAI, K., HAYASHI, H., and KANEMASA, Y.: Presence and synthesis of cholesterol in stable staphylococcal L-forms. J Bacteriol, 140(3): 859–863, 1979.
- [124] HE, C. and KLIONSKY, D. J.: Atg9 trafficking in autophagy-related pathways. Autophagy, 3(3):271–274, 2007.
- [125] HEESE-PECK, A., PICHLER, H., ZANOLARI, B., WATANABE, R., DAUM, G., and RIEZMAN, H.: Multiple functions of sterols in yeast endocytosis. Mol Biol Cell, 13(8):2664–2680, 2002.
- [126] HENRISSAT, B., SULZENBACHER, G., and BOURNE, Y.: Glycosyltransferases, glycoside hydrolases: surprise, surprise! Curr Opin Struct Biol, 18(5):527–533, 2008.
- [127] HIDAKA, E., OTA, H., HIDAKA, H., HAYAMA, M., MATSUZAWA, K., AKAMATSU, T., NAKAYAMA, J., and KATSUYAMA, T.: *Helicobacter pylori* and two ultrastructurally distinct layers of gastric mucous cell mucins in the surface mucous gel layer. Gut, 49(4):474–480, 2001.
- [128] HIGGINS, D. R. and CREGG, J. M.: Introduction to *Pichia pastoris*. Methods Mol Biol, 103:1–15, 1998.
- [129] HILLIG, I., LEIPELT, M., OTT, C., ZÄHRINGER, U., WARNECKE, D., and HEINZ, E.: Formation of glucosylceramide and sterol glucoside by a UDP-glucose-dependent glucosylceramide synthase from cotton expressed in *Pichia pastoris*. FEBS Lett, 553(3):365–369, 2003.
- [130] HIRAI, Y., HAQUE, M., YOSHIDA, T., YOKOTA, K., YASUDA, T., and OGUMA, K.: Unique cholesteryl glucosides in *Helicobacter pylori*: composition and structural analysis. J Bacteriol, 177(18):5327–5333, 1995.
- [131] HÖLZL, G.: Veränderung des Glykolipidmusters in Thylakoiden von Pflanzen und Blaualgen durch heterologe Expression bakterieller Glykosyltransferasen. PhD thesis, University of Hamburg, 2004.
- [132] HÖLZL, G., WITT, S., GAUDE, N., MELZER, M., SCHÖTTLER, M. A., and DÖRMANN, P.: The role of diglycosyl lipids in photosynthesis and membrane lipid homeostasis in Arabidopsis. Plant Physiol, 150(3):1147–1159, 2009.
- [133] HÖLZL, G., WITT, S., KELLY, A. A., ZÄHRINGER, U., WARNECKE, D., DÖRMANN, P., and HEINZ, E.: Functional differences between galactolipids and glucolipids revealed in photosynthesis of higher plants. PNAS, 103(19):7512–7517, 2006.
- [134] HÖLZL, G., ZÄHRINGER, U., WARNECKE, D., and HEINZ, E.: Glycoengineering of cyanobacterial thylakoid membranes for future studies on the role of glycolipids in photosynthesis. Plant Cell Physiol, 46(11):1766–1778, 2005.

- [135] HOCKNEY, R. C.: Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. Trends Biotechnol, 12(11):456–463, 1994.
- [136] HOLTHUIS, J. C. M. and LEVINE, T. P.: Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. Nat Rev Mol Cell Biol, 6(3):209–220, 2005.
- [137] HOSSAIN, H., WELLENSIEK, H. J., GEYER, R., and LOCHNIT, G.: Structural analysis of glycolipids from *Borrelia burgdorferi*. Biochimie, 83(7):683–692, 2001.
- [138] HOSSAIN, M. H.: Lipide von *Borrelia burgdorferi*. PhD thesis, Justus-Liebig-University Giessen, 1999.
- [139] HOU, C. T., UMEMURA, Y., NAKAMURA, M., and FUNAHASHI, S.: Enzymatic synthesis of steryl glucoside by a particulate preparation from immature soybean seeds. J Biochem, 63(3):351–360, 1968.
- [140] HOWARD, R. J., FERRARI, M. A., ROACH, D. H., and MONEY, N. P.: Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. PNAS, 88(24):11281–11284, 1991.
- [141] HOWARD, R. J. and VALENT, B.: Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. Annu Rev Microbiol, 50:491–512, 1996.
- [142] HU, S., LI, L., QIAO, J., GUO, Y., CHENG, L., and LIU, J.: Codon optimization, expression, and characterization of an internalizing anti-ErbB2 single-chain antibody in *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif, 47(1):249–257, 2006.
- [143] HU, Y., CHEN, L., HA, S., GROSS, B., FALCONE, B., WALKER, D., MOKHTARZADEH, M., and WALKER, S.: Crystal structure of the MurG:UDP-GlcNAc complex reveals common structural principles of a superfamily of glycosyltransferases. PNAS, 100(3):845–849, 2003.
- [144] HUH, W. K., FALVO, J. V., GERKE, L. C., CARROLL, A. S., HOWSON, R. W., WEISSMAN, J. S., and O’ SHEA, E. K.: Global analysis of protein localization in budding yeast. Nature, 425(6959):686–691, 2003.
- [145] HUNGUND, B. L., DAYAL, B., DAYAL, V. K., and SALEN, G.: In vivo incorporation of [2-<sup>14</sup>C]mevalonic acid into rat brain complex glycolipids: characterization of glycosylsterols in mammalian brain. Chem Phys Lipids, 69(2):167–173, 1994.
- [146] IDNURM, A., WARNECKE, D. C., HEINZ, E., and HOWLETT, B. J.: Characterisation of neutral trehalase and UDP-glucose:sterol glucosyltransferase genes from the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. Physiol Mol Plant Pathol, 62:305–313, 2003.
- [147] INGLETON, E. and HEMMINGS, B. A.: Pleckstrin Homology (PH) Domains in Signal Transduction. J Cell Biochem, 56:436–443, 1994.
- [148] INOUE, H., NOJIMA, H., and OKAYAMA, H.: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene, 96(1):23–28, 1990.
- [149] IRIBARREN, A. M. and POMILIO, A. B.: Sitosterol 3-*O*- $\beta$ -D-xylopyranoside from *Bauhinia candicans*. Phytochemistry, 23:2087–2088, 1984.
- [150] ITO, T., CHIBA, T., OZAWA, R., YOSHIDA, M., HATTORI, M., and SAKAKI, Y.: A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. PNAS, 98(8):4569–4574, 2001.
- [151] JACOBS, P. P., GEYSSENS, S., VERVECKEN, W., CONTRERAS, R., and CALLEWAERT, N.: Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. Nat Protoc, 4(1):58–70, 2009.
- [152] JAHNKE, L. L., SUMMONS, R. E., DOWLING, L. M., and ZAHIRALIS, K. D.: Identification of methanotrophic lipid biomarkers in cold-seep mussel gills: chemical and isotopic analysis. Appl Environ Microbiol, 61(2):576–582, 1995.
- [153] JOHNSON, N. and VARSHAVSKY, A.: Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. PNAS, 91(22):10340–10344, 1994.
- [154] KALINOWSKA, M. and WOJCIECHOWSKI, Z. A.: Characterization of wax-ester hydrolase from roots of white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. Acta Biochim Pol, 32(3):259–269, 1985.
- [155] KASTELIC-SUHADOLC, T.: Cholesteryl glucoside in *Candida bogoriensis*. Biochim Biophys Acta, 620(2):322–325, 1980.
- [156] KATONA, L. I., BECK, G., and HABICHT, G. S.: Purification and immunological characterization of a major low-molecular-weight lipoprotein from *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun, 60(12):4995–5003, 1992.
- [157] KAWAKUBO, M., ITO, Y., OKIMURA, Y., KOBAYASHI, M., SAKURA, K., KASAMA, S., FUKUDA, M. N., FUKUDA, M., KATSUYAMA, T., and NAKAYAMA, J.: Natural antibiotic function of a human gastric mucin against *Helicobacter pylori* infection. Science, 305(5686):1003–1006, 2004.

## Literaturverzeichnis

- [158] KEENLEYSIDE, W. J., CLARKE, A. J., and WHITFIELD, C.: Identification of residues involved in catalytic activity of the inverting glycosyl transferase WbbE from *Salmonella enterica* serovar borreze. *J Bacteriol*, 183(1):77–85, 2001.
- [159] KERSHAW, M. J. and TALBOT, N. J.: Genome-wide functional analysis reveals that infection-associated fungal autophagy is necessary for rice blast disease. *PNAS*, 106(37):15967–15972, 2009.
- [160] KHABAZIAN, I., BAINS, J. S., WILLIAMS, D. E., CHEUNG, J., WILSON, J. M. B., PASQUALOTTO, B. A., PELECH, S. L., ANDERSEN, R. J., WANG, Y. T., LIU, L., NAGAI, A., KIM, S. U., CRAIG, U. K., and SHAW, C. A.: Isolation of various forms of sterol  $\beta$ -D-glucoside from the seed of *Cycas circinalis*: neurotoxicity and implications for ALS-parkinsonism dementia complex. *J Neurochem*, 82(3):516–528, 2002.
- [161] KIM, J. and KLIONSKY, D. J.: Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem*, 69:303–342, 2000.
- [162] KIM, Y. K., WANG, Y., LIU, Z. M., and KOLATTUKUDY, P. E.: Identification of a hard surface contact-induced gene in *Colletotrichum gloeosporioides* conidia as a sterol glycosyl transferase, a novel fungal virulence factor. *Plant J*, 30(2):177–187, 2002.
- [163] KIMURA, A., TAKANO, Y., FURUSAWA, I., and OKUNO, T.: Peroxisomal metabolic function is required for appressorium-mediated plant infection by *Colletotrichum lagenarium*. *Plant Cell*, 13(8):1945–1957, 2001.
- [164] KINJO, Y., TUPIN, E., WU, D., FUJIO, M., GARCIA-NAVARRO, R., RAFII-EL-IDRISSI BENHIA, M., ZAJONC, D. M., BEN-MENACHEM, G., AINGE, G. D., PAINTER, G. F., KHURANA, A., HOEBE, K., BEHAR, S. M., BEUTLER, B., WILSON, I. A., TSUJI, M., SELLATI, T. J., WONG, C. H., and KRONENBERG, M.: Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol*, 7(9):978–986, 2006.
- [165] KIST, M., GLOCKER, E., and SUERBAUM, S.: Pathogenesis, diagnostics and treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 48(6):669–678, 2005.
- [166] KLIONSKY, D. J.: The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci*, 118(1):7–18, 2005.
- [167] KLIONSKY, D. J., ABELIOVICH, H., and P. AGOSTINIS *et al.*: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 4(2):151–175, 2008.
- [168] KLIONSKY, D. J., CREGG, J. M., DUNN, W. A., EMR, S. D., SAKAI, Y., SANDOVAL, I. V., SIBIRNY, A., SUBRAMANI, S., THUMM, M., VEENHUIS, M., and OHSUMI, Y.: A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell*, 5(4):539–545, 2003.
- [169] KOBORI, M., YOSHIDA, M., OHNISHI-KAMEYAMA, M., and SHINMOTO, H.: Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. *Br J Pharmacol*, 150(2):209–219, 2007.
- [170] KOJIMA, M., OHNISHI, M., ITO, S., and FUJINO, Y.: Characterization of Acylmono-, Mono-, Di-, Tri- and Tetraglycosylsterol and Saponin in Adzuki Bean (*Vigna angularis*) Seeds. *Lipids*, 24:849–853, 1989.
- [171] KOLEHMAINEN, J., BLACK, G. C. M., SAARINEN, A., CHANDLER, K., CLAYTON-SMITH, J., TRÄSKELIN, A. L., PERVEEN, R., KIVITIE-KALLIO, S., NORIO, R., WARBURG, M., FRYNS, J. P., DE LA CHAPELLE, A., and LEHESJOKI, A. E.: Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. *Am J Hum Genet*, 72(6):1359–1369, 2003.
- [172] KOUTZ, P., DAVIS, G. R., STILLMAN, C., BARRINGER, K., CREGG, J., and THILL, G.: Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast*, 5(3):167–177, 1989.
- [173] KOZAK, M.: An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res*, 15(20):8125–8148, 1987.
- [174] KUBO, A., ARAI, Y., NAGASHIMA, S., and YOSHIKAWA, T.: Alteration of sugar donor specificities of plant glycosyltransferases by a single point mutation. *Arch Biochem Biophys*, 429(2):198–203, 2004.
- [175] KUBO, Y. and FURUSAWA, I.: Melanin biosynthesis: prerequisite for successful invasion of the plant host by appressoria of *Colletotrichum* and *Pyricularia*. In: *The Fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Plenum Press, pages 205–218, 1991.
- [176] KUNIMOTO, S., KOBAYASHI, T., KOBAYASHI, S., and MURAKAMI-MUROFUSHI, K.: Expression of cholesteryl glucoside by heat shock in human fibroblasts. *Cell Stress Chaperones*, 5(1):3–7, 2000.
- [177] KUNIMOTO, S., MUROFUSHI, W., KAI, H., ISHIDA, Y., UCHIYAMA, A., KOBAYASHI, T., KOBAYASHI, S., MUROFUSHI, H., and MURAKAMI-MUROFUSHI, K.: Steryl glucoside is a lipid mediator in stress-responsive signal transduction. *Cell Struct Funct*, 27(3):157–162, 2002.

- [178] KUNIMOTO, S., MUROFUSHI, W., YAMATSU, I., HASEGAWA, Y., SASAKI, N., KOBAYASHI, S., KOBAYASHI, T., MUROFUSHI, H., and MURAKAMI-MUROFUSHI, K.: Cholesteryl glucoside-induced protection against gastric ulcer. *Cell Struct Funct*, 28(3):179–186, 2003.
- [179] KUSMAKOW, O. V.: Versuche zur intrazellulären Lokalisierung der Sterol-Glucosyltransferase und der Glucosylceramid-Synthase in Zellen von *Allium fistulosum* L. PhD thesis, University of Hamburg, 2005.
- [180] KUTATELADZE, T. G., OGBURN, K. D., WATSON, W. T., DE BEER, T., EMR, S. D., BURD, C. G., and OVERDUIN, M.: Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition by the FYVE domain. *Mol Cell*, 3(6):805–811, 1999.
- [181] LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, 1970.
- [182] LAIRSON, L. L., HENRISSAT, B., DAVIES, G. J., and WITHERS, S. G.: Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem*, 77:521–555, 2008.
- [183] LALOI, M., PERRET, A.-M., CHATRE, L., MELSER, S., CANTREL, C., VAULTIER, M.-N., ZACHOWSKI, A., BATHANY, K., SCHMITTER, J.-M., VALLET, M., LESSIRE, R., HARTMANN, M.-A., and MOREAU, P.: Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiol*, 143(1):461–472, 2007.
- [184] LAZAROW, P. B. and MOSER, H. W.: Disorders in peroxisome biogenesis. In the *Metabolic Bases of Inherited Disease*. 6th. McGraw Hill, 1989.
- [185] LÖBAU, S., BRABETZ, W., BRADE, L., and BRADE, H.: Glycosyltransferasen der frühen Lipopolysaccharid-Biosynthese. *Chemotherapie J*, 5:183–186, 1999.
- [186] LEBRUN, A. H.: Charakterisierung von Genen und Enzymen des Cholesteryl-Glucosid-Stoffwechsels in *Helicobacter pylori*. Diploma thesis, University of Hamburg, 2006.
- [187] LEBRUN, A. H., WUNDER, C., HILDEBRAND, J., CHURIN, Y., ZÄHRINGER, U., LINDNER, B., MEYER, T. F., HEINZ, E., and WARNECKE, D.: Cloning of a cholesterol- $\alpha$ -glucosyltransferase from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*, 281(38):27765–27772, 2006.
- [188] LEE, H., KOBAYASHI, M., WANG, P., NAKAYAMA, J., SEEBERGER, P. H., and FUKUDA, M.: Expression cloning of cholesterol alpha-glucosyltransferase, a unique enzyme that can be inhibited by natural antibiotic gastric mucin O-glycans, from *Helicobacter pylori*. *Biochem Biophys Res Commun*, 349(4):1235–1241, 2006.
- [189] LEE, H., WANG, P., HOSHINO, H., ITO, Y., KOBAYASHI, M., NAKAYAMA, J., SEEBERGER, P. H., and FUKUDA, M.: Alpha1,4GlcNAc-capped mucin-type O-glycan inhibits cholesterol alpha-glucosyltransferase from *Helicobacter pylori* and suppresses *H. pylori* growth. *Glycobiology*, 18(7):549–558, 2008.
- [190] LEFEBVRE, B., FURT, F., HARTMANN, M. A., MICHAELSON, L. V., CARDE, J.-P., SARGUEIL-BOIRON, F., ROSSIGNOL, M., NAPIER, J. A., CULLIMORE, J., BESSOULE, J.-J., and MONGRAND, S.: Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol*, 144(1):402–418, 2007.
- [191] LEGAKIS, J. E., YEN, W.-L., and KLIONSKY, D. J.: A cycling protein complex required for selective autophagy. *Autophagy*, 3(5):422–432, 2007.
- [192] LEIPELT, M., WARNECKE, D., ZÄHRINGER, U., OTT, C., MÜLLER, F., HUBE, B., and HEINZ, E.: Glucosylceramide synthases, a gene family responsible for the biosynthesis of glucosphingolipids in animals, plants, and fungi. *J Biol Chem*, 276(36):33621–33629, 2001.
- [193] LEMMON, M. A.: Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochem Soc Trans*, 32(Pt 5):707–711, 2004.
- [194] LEMMON, M. A.: Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides. *Biochem Soc Symp*, 74(74):81–93, 2007.
- [195] LEMMON, M. A.: Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2):99–111, 2008.
- [196] LEMMON, M. A. and FERGUSON, K. M.: Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J*, 350 Pt 1:1–18, 2000.
- [197] LEÃO, A. N. and KIEL, J. A. K. W.: Peroxisome homeostasis in *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res*, 4(2):131–139, 2003.
- [198] LEPAGE, M.: Isolation and characterization of an esterified form of steryl glucoside. *J Lipid Res*, 5:587–592, 1964.
- [199] LIN CEREGHINO, G. P., SUNGA, A. J., LIN CEREGHINO, J., and CREGG, J. M.: Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Genet Eng (NY)*, 23:157–169, 2001.

## Literaturverzeichnis

- [200] LIN CEREGHINO, J. and CREGG, J. M.: Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev, 24(1):45–66, 2000.
- [201] LIU, C. I., LIU, G.Y., SONG, Y., YIN, F., HENSLER, M. E., JENG, W. Y., NIZET, V., WANG, A. H. J., and OLDFIELD, E.: A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. Science, 319:1391–94, 2008.
- [202] LIU, J. and MUSHEGIAN, A.: Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. Protein Sci, 12(7):1418–1431, 2003.
- [203] LIU, X.-H., LU, J.-P., and LIN, F.-C.: Autophagy during conidiation, conidial germination and turgor generation in *Magnaporthe grisea*. Autophagy, 3(5):472–473, 2007.
- [204] LIU, X.-H., LU, J.-P., ZHANG, L., DONG, B., MIN, H., and LIN, F.-C.: Involvement of a *Magnaporthe grisea* serine/threonine kinase gene, MgATG1, in appressorium turgor and pathogenesis. Eukaryot Cell, 6(6):997–1005, 2007.
- [205] LIVERMORE, B. P., BEY, R. F., and JOHNSON, R. C.: Lipid metabolism of *Borrelia hermsi*. Infect Immun, 20(1):215–220, 1978.
- [206] LIVERMORE, B. P. and JOHNSON, R. C.: Lipids of the *Spirochaetales*: comparison of the lipids of several members of the genera *Spirochaeta*, *Treponema*, and *Leptospira*. J Bacteriol, 120(3):1268–1273, 1974.
- [207] LUO, W. and CHANG, A.: Novel genes involved in endosomal traffic in yeast revealed by suppression of a targeting-defective plasma membrane ATPase mutant. J Cell Biol, 138(4):731–746, 1997.
- [208] LY, P. T. T., SINGH, S., and SHAW, C. A.: Novel environmental toxins: steryl glycosides as a potential etiological factor for age-related neurodegenerative diseases. J Neurosci Res, 85(2):231–237, 2007.
- [209] LYNCH, D. V., CRISS, A. K., LEHOCZKY, J. L., and BUI, V. T.: Ceramide glucosylation in bean hypocotyl microsomes: evidence that steryl glucoside serves as glucose donor. Arch Biochem Biophys, 340(2):311–316, 1997.
- [210] LYNCH, D. V. and STEPONKUS, P. L: Plasma Membrane Lipid Alterations Associated with Cold Acclimation of Winter Rye Seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). Plant Physiol, 83(4):761–767, 1987.
- [211] LYNCH-DAY, M. A. and KLIONSKY, D. J.: The Cvt pathway as a model for selective autophagy. FEBS Lett, 2010.
- [212] MACAULEY-PATRICK, S., FAZENDA, M. L., MCNEIL, B., and HARVEY, L. M.: Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast, 22(4):249–270, 2005.
- [213] MACKENZIE, P. I., BOCK, K. W., BURCHELL, B., GUILLEMETTE, C., IKUSHIRO, S., IYANAGI, T., MINERS, J. O., OWENS, I. S., and NEBERT, D. W.: Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. Pharmacogenet Genomics, 15(10):677–685, 2005.
- [214] MACKENZIE, P. I., OWENS, I. S., BURCHELL, B., BOCK, K. W., BAIROCH, A., BÉLANGER, A., FOURNEL-GIGLEUX, S., GREEN, M., HUM, D. W., IYANAGI, T., LANCET, D., LOUISOT, P., MAGDALOU, J., CHOWDHURY, J. R., RITTER, J. K., SCHACHTER, H., TEPHLY, T. R., TIPTON, K. F., and NEBERT, D. W.: The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. Pharmacogenetics, 7(4):255–269, 1997.
- [215] MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., and PARKER, J.: Brock - Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 2nd edition, 2001.
- [216] MADINA, B. R., SHARMA, L. K., CHATURVEDI, P., SANGWAN, R. S., and TULI, R.: Purification and characterization of a novel glucosyltransferase specific to 27beta-hydroxy steroidal lactones from *Withania somnifera* and its role in stress responses. Biochim Biophys Acta, 1774(9):1199–1207, 2007.
- [217] MAEDA, Y., WATANABE, R., HARRIS, C. L., HONG, Y., OHISHI, K., KINOSHITA, K., and KINOSHITA, T.: PIG-M transfers the first mannose to glycosylphosphatidylinositol on the luminal side of the ER. EMBO J, 20:250–261, 2001.
- [218] MAITANI, Y., NAKAMURA, K., and KAWANO, K.: Application of sterylglucoside-containing particles for drug delivery. Curr Pharm Biotechnol, 6(1):81–93, 2005.
- [219] MAJESKI, A. E. and FRED DICE, J.: Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. Int J Biochem Cell Biol, 36(12):2435–2444, 2004.
- [220] MANJITHAYA, R., NAZARKO, T. Y., FARRÉ, J. C., and SUBRAMANI, S.: Molecular mechanism and physiological role of pexophagy. FEBS Lett, 2010.
- [221] MARAIS, A., MENDZ, G. L., HAZELL, S. L., and MÉGRAUD, F.: Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. Microbiol Mol Biol Rev, 63(3):642–674, 1999.

- [222] MARKS, D. L., DOMINGUEZ, M., WU, K., and PAGANO, R. E.: Identification of active site residues in glucosylceramide synthase. A nucleotide-binding catalytic motif conserved with processive  $\beta$ -glucosyltransferases. *J Biol Chem*, 276(28):26492–26498, 2001.
- [223] MATIN, A., ZYCHLINSKY, E., KEYHAN, M., and SACHS, G.: Capacity of *Helicobacter pylori* to generate ionic gradients at low pH is similar to that of bacteria which grow under strongly acidic conditions. *Infect Immun*, 64(4):1434–1436, 1996.
- [224] MAYBERRY, W. R. and SMITH, P. F.: Structures and properties of acyl diglucosylcholesterol and galactofuranosyl diacylglycerol from *Acholeplasma axanthum*. *Biochim Biophys Acta*, 752(3):434–443, 1983.
- [225] MAYER, B. J., REN, R., CLARK, K. L., and BALTIMORE, D.: A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell*, 73(4):629–630, 1993.
- [226] MAYER, C.: Wie Bakterien ihre Verpackung wiederverwerten: Mureinabbau und Recycling. *Biospektrum*, 5:616–619, 2005.
- [227] MCMORRIS, T. C. and WHITE, R. H.: Cholesterol  $\beta$ -D-glucoside-6'-O-palmitate, a metabolite of *Pythium sylvaticum*. *Biochim Biophys Acta*, 486(2):308–312, 1977.
- [228] MENDGEN, K. and HAHN, M.: Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci*, 7(8):352–356, 2002.
- [229] MENGIN-LECREULX, D., TEXIER, L., ROUSSEAU, M., and VAN HEIJENOORT, J.: The murG gene of *Escherichia coli* codes for the UDP-N-acetylglucosamine: N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase involved in the membrane steps of peptidoglycan synthesis. *J Bacteriol*, 173(15):4625–4636, 1991.
- [230] MÜHLHARDT, C.: Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Spektrum Akademischer Verlag, 2006.
- [231] MILLER, G.: Neurodegenerative disease. Guam's deadly stalker: on the loose worldwide? *Science*, 313(5786):428–431, 2006.
- [232] MIROUX, B. and WALKER, J. E.: Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, 260(3):289–298, 1996.
- [233] MIZUSHIMA, N. and KLIONSKY, D. J.: Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr*, 27:19–40, 2007.
- [234] MÜLLER, F.: Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung der Sterolglucosyltransferase aus *Pichia pastoris*. Diploma thesis, University of Hamburg, 1999.
- [235] MÜLLER, W. H., VAN DER KRIFT, T. P., KROUWER, A. J., WÖSTEN, H. A., VAN DER VOORT, L. H., SMAAL, E. B., and VERKLEIJ, A. J.: Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *EMBO J*, 10(2):489–495, 1991.
- [236] MOHAMMADY, N. G.: Total, free and conjugated sterolic forms in three microalgae used in mariculture. *Z Naturforsch C*, 59(9-10):619–624, 2004.
- [237] MONASTYRSKA, I. and KLIONSKY, D. J.: Autophagy in organelle homeostasis: peroxisome turnover. *Mol Aspects Med*, 27(5-6):483–494, 2006.
- [238] MONGRAND, S., MOREL, J., LAROCHE, J., CLAVEROL, S., CARDE, J. P., HARTMANN, M. A., BONNEU, M., SIMON-PLAS, F., LESSIRE, R., and BESSOULE, J. J.: Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem*, 279(35):36277–36286, 2004.
- [239] MUHIUDEEN, I. A., KOERNER, T. A., SAMUELSSON, B., HIRABAYASHI, Y., DEGASPERI, R., LI, S. C., and LI, Y. T.: Characterization of human liver 3-O- $\beta$ -D-glucopyranuronosyl-cholesterol by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Lipid Res*, 25(10):1117–1123, 1984.
- [240] MUKAIYAMA, H., BABA, M., OSUMI, M., AOYAGI, S., KATO, N., OHSUMI, Y., and SAKAI, Y.: Modification of a ubiquitin-like protein Paz2 conducted micropexophagy through formation of a novel membrane structure. *Mol Biol Cell*, 15(1):58–70, 2004.
- [241] MUKAIYAMA, H., NAKASE, M., NAKAMURA, T., KAKINUMA, Y., and TAKEGAWA, K.: Autophagy in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett*, Dec 2009.
- [242] MUKAIYAMA, H., OKU, M., BABA, M., SAMIZO, T., HAMMOND, A. T., GLICK, B. S., KATO, N., and SAKAI, Y.: Paz2 and 13 other PAZ gene products regulate vacuolar engulfment of peroxisomes during micropexophagy. *Genes Cells*, 7(1):75–90, 2002.
- [243] MURAKAMI-MUROFUSHI, K., NAKAMURA, K., OHTA, J., SUZUKI, M., SUZUKI, A., MUROFUSHI, H., and YOKOTA, T.: Expression of poriferasterol monoglucoside associated with differentiation of *Physarum polycephalum*. *J Biol Chem*, 262(34):16719–16723, 1987.

- [244] MURAKAMI-MUROFUSHI, K., NISHIKAWA, K., HIRAKAWA, E., and MUROFUSHI, H.: Heat stress induces a glycosylation of membrane sterol in myxoamoebae of a true slime mold, *Physarum polycephalum*. *J Biol Chem*, 272(1):486–489, 1997.
- [245] MURAKAMI-MUROFUSHI, K. and OHTA, J.: Expression of UDP-glucose: poriferasterol glucosyltransferase in the process of differentiation of a true slime mold, *Physarum polycephalum*. *Biochim Biophys Acta*, 992(3):412–415, 1989.
- [246] MURRAY, W. D., DUFF, S. J. B., and BEVERIDGE, T. J.: Catabolite Inactivation in the Methylo-trophic Yeast *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol*, 56(8):2378–2383, 1990.
- [247] NAKAGAWA, T., INAGAKI, A., ITO, T., FUJIMURA, S., MIYAJI, T., YURIMOTO, H., KATO, N., SAKAI, Y., and TOMIZUKA, N.: Regulation of two distinct alcohol oxidase promoters in the methylo-trophic yeast *Pichia methanolica*. *Yeast*, 23(1):15–22, 2006.
- [248] NAKATOGAWA, H., SUZUKI, K., KAMADA, Y., and OHSUMI, Y.: Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(7):458–467, 2009.
- [249] NAKAYAMA, J., YEH, J. C., MISRA, A. K., ITO, S., KATSUYAMA, T., and FUKUDA, M.: Expression cloning of a human  $\alpha 1, 4$ -N-acetylglucosaminyltransferase that forms GlcNAc $\alpha 1 \rightarrow 4$ Gal $\beta \rightarrow$ R, a glycan specifically expressed in the gastric gland mucous cell-type mucin. *PNAS*, 96(16):8991–8996, 1999.
- [250] NAUMANN, M. and CRABTREE, J. E.: *Helicobacter pylori*-induced epithelial cell signalling in gastric carcinogenesis. *Trends Microbiol*, 12(1):29–36, 2004.
- [251] NAZARKO, T. Y., FARRÉ, J.-C., POLUPANOV, A. S., SIBIRNY, A. A., and SUBRAMANI, S.: Autophagy-related pathways and specific role of sterol glucoside in yeasts. *Autophagy*, 3(3):263–265, 2007.
- [252] NAZARKO, T. Y., FARRÉ, J. C., and SUBRAMANI, S.: Peroxisome size provides insights into the function of autophagy-related proteins. *Mol Biol Cell*, 20(17):3828–3839, 2009.
- [253] NAZARKO, T. Y., POLUPANOV, A. S., MANJITHAYA, R. R., SUBRAMANI, S., and SIBIRNY, A. A.: The requirement of sterol glucoside for pexophagy in yeast is dependent on the species and nature of peroxisome inducers. *Mol Biol Cell*, 18(1):106–118, 2007.
- [254] NAZARKO, V. Y., FUTEJ, K. O., THEVELEIN, J. M., and SIBIRNY, A. A.: Differences in glucose sensing and signaling for pexophagy between the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Autophagy*, 4(3):381–384, 2008.
- [255] NAZARKO, V. Y., THEVELEIN, J. M., and SIBIRNY, A. A.: G-protein-coupled receptor Gpr1 and G-protein Gpa2 of cAMP-dependent signaling pathway are involved in glucose-induced pexophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol Int*, 32(5):502–504, 2008.
- [256] NEMEC, T., JERNEJC, K., and CIMERMAN, A.: Sterols and fatty acids of different *Aspergillus* species. *FEMS Microbiol Lett*, 149:201–5, 1997.
- [257] NES, W. D., XU, S. H., and HADDON, W. F.: Evidence for similarities and differences in the biosynthesis of fungal sterols. *Steroids*, 53:533–558, 1989.
- [258] NIRENBERG, H. I.: A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. *Can J Bot*, 59:1599–1609, 1981.
- [259] NODA, T. and OHSUMI, Y.: Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem*, 273(7):3963–3966, 1998.
- [260] NORRIS, S. and WEINSTOCK, G.: The genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete: will clinicians benefit? *Curr Opin Infect Dis*, 13(1):29–36, 2000.
- [261] OKU, M. and SAKAI, Y.: Pexophagy in *Pichia pastoris*. *Methods Enzymol*, 451:217–228, 2008.
- [262] OKU, M., WARNECKE, D., NODA, T., MÜLLER, F., HEINZ, E., MUKAIYAMA, H., KATO, N., and SAKAI, Y.: Peroxisome degradation requires catalytically active sterol glucosyltransferase with a GRAM domain. *EMBO J*, 22(13):3231–3241, 2003.
- [263] OUTCHKOUROV, N. S., STIEKEMA, W. J., and JONGSMA, M. A.: Optimization of the expression of equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 24(1):18–24, 2002.
- [264] PALMER, R. L. and DUGGER, W. M.: Recovery of glucose from glucolipids in cell wall glucans in cotton fibrils. *Phytochem*, 31:2631–2633, 1992.
- [265] PALTA, J. P., WHITAKER, B. D., and WEISS, L. S.: Plasma Membrane Lipids Associated with Genetic Variability in Freezing Tolerance and Cold Acclimation of *Solanum* Species. *Plant Physiol*, 103(3):793–803, 1993.
- [266] PARKS, L. W.: Metabolism of sterols in yeast. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 6:301–41, 1978.

## Literaturverzeichnis

- [267] PARKS, L. W. and CASEY, W. M.: Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu Rev Microbiol*, 49:95–116, 1995.
- [268] PARODI, A. J.: Synthesis of steryl glucoside in Baker's yeast. *Acta Physiol Lat Am*, 26(5):430–433, 1976.
- [269] PATEL, K. R., SMITH, P. F., and MAYBERRY, W. R.: Comparison of lipids from *Spiroplasma citri* and corn stunt spiroplasma. *J Bacteriol*, 136(2):829–831, 1978.
- [270] PATKI, V., LAWE, D. C., CORVERA, S., VIRBASIU, J. V., and CHAWLA, A.: A functional PtdIns(3)P-binding motif. *Nature*, 394(6692):433–434, 1998.
- [271] PAULSON, J. C.: Glycoproteins: what are the sugar chains for? *Trends Biochem Sci*, 14(7):272–276, 1989.
- [272] PAWSON, T.: Protein modules and signalling networks. *Nature*, 373(6515):573–580, 1995.
- [273] PEGEL, K. H.: The importance of sitosterol and sitosterolin in human and animal nutrition. *S Afr J Sci*, 98:263–267, 1997.
- [274] PENG, L., KAWAGOE, Y., HOGAN, P., and DELMER, D.: Sitosterol- $\beta$ -glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. *Science*, 295(5552):147–150, 2002.
- [275] PERIASAMY, A.: Fluorescence resonance energy transfer microscopy: a mini review. *J Biomed Opt*, 6:287–91, 2001.
- [276] PODILA, G. K., ROGERS, L. M., and KOLATTUKUDY, P. E.: Chemical Signals from Avocado Surface Wax Trigger Germination and Appressorium Formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiol*, 103(1):267–272, 1993.
- [277] POLLACK, J. K., HARRIS, S. D., and MARTEN, M. R.: Autophagy in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*, 46(1):1–8, 2009.
- [278] POTOCKA, A. and ZIMOWSKI, J.: Metabolism of conjugated sterols in eggplant. Part 1. UDP-glucose : sterol glucosyltransferase. *Acta Biochim Pol*, 55(1):127–134, 2008.
- [279] PÉREZ-PÉREZ, G. I., SHEPHERD, V. L., MORROW, J. D., and BLASER, M. J.: Activation of human THP-1 cells and rat bone marrow-derived macrophages by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 63(4):1183–1187, 1995.
- [280] PRINS, T. W., TUDZINSKY, P., VON TIEDEMANN, A., TUDZINSKI, B., TEN HAVE, A., and HANSEN, M. E.: Fungal Pathology: Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. Kluwer Academic Press, 2000.
- [281] PRYCE-JONES, E., CARVER, T., and GURR, S. J.: The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f.sp. hordei. *Physiol Mol Plant Pathol*, 55:175–182, 1999.
- [282] RAETZ, C. R. H. and WHITFIELD, C.: Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 71:635–700, 2002.
- [283] RAGGERS, R. J., POMORSKI, T., HOLTHUIS, J. C., KÄLIN, N., and VAN MEER, G.: Lipid traffic: the ABC of transbilayer movement. *Traffic*, 1(3):226–234, 2000.
- [284] RAMOS-PAMPLONA, M. and NAQVI, N. I.: Host invasion during rice-blast disease requires carnitine-dependent transport of peroxisomal acetyl-CoA. *Mol Microbiol*, 61(1):61–75, 2006.
- [285] RAMPOLDI, L., DOBSON-STONE, C., RUBIO, J. P., DANEK, A., CHALMERS, R. M., WOOD, N. W., VERELLEN, C., FERRER, X., MALANDRINI, A., FABRIZI, G. M., BROWN, R., VANCE, J., PERICAK-VANCE, M., RUDOLF, G., CARRÈ, S., ALONSO, E., MANFREDI, M., NÉMETH, A. H., and MONACO, A. P.: A conserved sorting-associated protein is mutant in chorea-acanthocytosis. *Nat Genet*, 28:119–120, 2001.
- [286] READ, S. M. and BACIC, T.: Plant biology. Prime time for cellulose. *Science*, 295(5552):59–60, 2002.
- [287] RECK, D.: Affinitätschromatographische Aufreinigung der Cholesterol- $\alpha$ -Glucosyltransferase von *Helicobacter pylori*. Diploma thesis, University of Hamburg, 2009.
- [288] REGGIORI, F.: The phagophore assembly site (PAS) originates from a novel Atg9-positive membranous compartment. In *Autophagy-Cell Biology, Physiology and Pathology-Conference*, Ascona, Switzerland, 2009.
- [289] REGGIORI, F. and KLIONSKY, D. J.: Autophagosomes: biogenesis from scratch? *Curr Opin Cell Biol*, 17(4):415–422, 2005.
- [290] REIS, H., PFIFFI, S., and HAHN, M.: Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol*, 6:257–67, 2005.
- [291] RIGGS, M. and MCLACHLAN, A.: A simplified screening procedure for large numbers of plasmid mini-preparations. *Biotechniques*, 4:310–13, 1986.



- [292] ROLLAND, F., WINDERICKX, J., and THEVELEIN, J. M.: Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res*, 2(2):183–201, 2002.
- [293] ROSÉN, M. L., EDMAN, M., SJÖSTRÖM, M., and WIESLANDER, A.: Recognition of fold and sugar linkage for glycosyltransferases by multivariate sequence analysis. *J Biol Chem*, 279(37):38683–38692, 2004.
- [294] ROTHBLAT, G. H. and SMITH, P. F.: Nonsaponifiable lipids of representative pleuropneumonia-like organisms. *J Bacteriol*, 82:479–491, 1961.
- [295] ROTTEM, S.: Sterols and acylated proteins in mycoplasmas. *Biochem Biophys Res Commun*, 292(5):1289–1292, 2002.
- [296] RYU, K., LIN, S., SHAO, J., SONG, J., CHEN, M., WANG, W., LI, H., YI, W., and WANG, P. G.: Synthesis of complex carbohydrates and glyconjugates: enzymatic synthesis of globotetraose using  $\alpha$ -1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase LgtD from *Haemophilus influenzae* strain Rd. *Methods Mol Biol*, 310:93–105, 2005.
- [297] SAKAI, Y.: Roles of phosphoinositide signaling during yeast microautophagy. In *Autophagy-Cell Biology, Physiology and Pathology-Conference*, Ascona, Switzerland, 2009.
- [298] SAKAI, Y., KOLLER, A., RANGELL, L. K., KELLER, G. A., and SUBRAMANI, S.: Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: identification of specific steps and morphological intermediates. *J Cell Biol*, 141(3):625–636, 1998.
- [299] SAKAI, Y., OKU, M., VAN DER KLEI, I. J., and KIEL, J. A. K. W.: Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta*, 1763(12):1767–1775, 2006.
- [300] SAKAKI, T., ZÄHRINGER, U., WARNECKE, D. C., FAHL, A., KNOGGE, W., and HEINZ, E.: Sterol glycosides and cerebroside accumulate in *Pichia pastoris*, *Rhynchosporium secalis* and other fungi under normal conditions or under heat shock and ethanol stress. *Yeast*, 18(8):679–695, 2001.
- [301] SAMBROOK, J. and RUSSELL, D. W.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, USA, 3rd edition, 2001.
- [302] SARASTE, M. and HYVÖNEN, M.: Pleckstrin homology domains: a fact file. *Curr Opin Struct Biol*, 5(3):403–408, 1995.
- [303] SAUVAGE, E., KERFF, F., TERRAK, M., AYALA, J. A., and CHARLIER, P.: The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2):234–258, 2008.
- [304] SCHLÖSSER, E.: *Allgemeine Phytopathologie*. Georg Thieme Verlag, 2th, revised edition, 1997.
- [305] SCHMELZLE, T. and HALL, M. N.: TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, 103(2):253–262, 2000.
- [306] SCHOUTEN, S., BOWMAN, J. P., RIJPSTRA, W. I., and SINNINGHE DAMSTÉ, J. S.: Sterols in a psychrophilic methanotroph, *Methylosphaera hansonii*. *FEMS Microbiol Lett*, 186(2):193–195, 2000.
- [307] SCHRADER, M. and DARIUSH FAHIMI, H.: The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochem Cell Biol*, 129(4):421–440, 2008.
- [308] SCHRÖDER, N. W. J., ECKERT, J., STÜBS, G., and SCHUMANN, R. R.: Immune responses induced by spirochetal outer membrane lipoproteins and glycolipids. *Immunobiology*, 213:329–340, 2008.
- [309] SCHRÖDER, N. W. J., SCHOMBEL, U., HEINE, H., GÖBEL, U. B., ZÄHRINGER, U., and SCHUMANN, R. R.: Acylated cholesteryl galactoside as a novel immunogenic motif in *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *J Biol Chem*, 278(36):33645–33653, 2003.
- [310] SCHREIBER, S., KONRADT, M., GROLL, C., SCHEID, P., HANAUER, G., WERLING, H. O., JOSENHANS, C., and SUERBAUM, S.: The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *PNAS*, 101(14):5024–5029, 2004.
- [311] SCHUBERT, K., ROSE, G., WACHTEL, H., HÖRHOLD, C., and IKEKAWA, N.: Some investigations of sterols in bacteria. *Eur J Biochem*, 5(2):246–251, 1968.
- [312] SCHULZ, J. D., HAWKES, E. L., and SHAW, C. A.: Cycad toxins, *Helicobacter pylori* and parkinsonism: Cholesterol glucosides as the common denominator. *Medical Hypotheses*, 66:1222–1226, 2006.
- [313] SCHWAN, T. G., RAFFEL, S. J., SCHRUMPF, M. E., and PORCELLA, S. F.: Diversity and distribution of *Borrelia hermsii*. *Emerg Infect Dis*, 13(3):436–442, 2007.
- [314] SEAY, M., PATEL, S., and DINESH-KUMAR, S. P.: Autophagy and plant innate immunity. *Cell Microbiol*, 8(6):899–906, 2006.
- [315] SEKAR, R. B. and PERIASAMY, A.: Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J Cell Biol*, 160(5):629–633, 2003.

- [316] SESHADRI, R., MYERS, G. S. A., TETTELIN, H., EISEN, J. A., HEIDELBERG, J. F., DODSON, R. J., DAVIDSEN, T. M., DEBOY, R. T., FOUTS, D. E., HAFT, D. H., SELENGUT, J., REN, Q., BRINKAC, L. M., MADUPU, R., KOLONAY, J., DURKIN, S. A., DAUGHERTY, S. C., SHETTY, J., SHVARTSBEYN, A., GEBREGEORGIS, E., GEER, K., TSEGAYE, G., MALEK, J., AYODEJI, B., SHATSMAN, S., MCLEOD, M. P., SMAJS, D., HOWELL, J. K., PAL, S., AMIN, A., VASHISTH, P., MCNEILL, T. Z., XIANG, Q., SODERGREN, E., BACA, E., WEINSTOCK, G. M., NORRIS, S. J., FRASER, C. M., and PAULSEN, I. T.: Comparison of the genome of the oral pathogen *Treponema denticola* with other spirochete genomes. PNAS, 101(15):5646–5651, 2004.
- [317] SGARBI, D. B., DA SILVA, A. J., CARLOS, I. Z., SILVA, C. L., ANGLUSTER, J., and ALVIANO, C. S.: Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. Mycopathologia, 139(1):9–14, 1997.
- [318] SHAO, J., ZHANG, J., KOWAL, P., LU, Y., and WANG, P. G.: Overexpression and biochemical characterization of  $\beta$ -1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase LgtD from *Haemophilus influenzae* strain Rd. Biochem Biophys Res Commun, 295(1):1–8, 2002.
- [319] SHARP, P. M., COWE, E., HIGGINS, D. G., SHIELDS, D. C., WOLFE, K. H., and WRIGHT, F.: Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity. Nucleic Acids Res, 16(17):8207–8211, 1988.
- [320] SHARP, P. M. and LI, W. H.: The codon Adaptation Index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. Nucleic Acids Res, 15(3):1281–1295, 1987.
- [321] SHIMOMURA, H., HAYASHI, S., YOKOTA, K., OGUMA, K., and HIRAI, Y.: Alteration in the composition of cholesteryl glucosides and other lipids in *Helicobacter pylori* undergoing morphological change from spiral to coccoid form. FEMS Microbiol Lett, 237(2):407–413, 2004.
- [322] SHIMOMURA, H., HOSODA, K., HAYASHI, S., YOKOTA, K., OGUMA, K., and HIRAI, Y.: Steroids mediate resistance to the bactericidal effect of phosphatidylcholines against *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol Lett, 2009.
- [323] SIMONS, K. and TOOMRE, D.: Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol, 1(1):31–39, 2000.
- [324] SIMONSEN, A. and TOOZE, S. A.: Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. J Cell Biol, 186(6):773–782, 2009.
- [325] SINGER, S. J. and NICOLSON, G. L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, 175(23):720–731, 1972.
- [326] SINNOTT, M. L.: Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. Chem Rev, 90:1171–1202, 1990.
- [327] SLONCZEWSKI, J. L., MCGEE, D. J., PHILLIPS, J., KIRKPATRICK, C., and MOBLEY, H. L.: pH-dependent protein profiles of *Helicobacter pylori* analyzed by two-dimensional gels. Helicobacter, 5(4):240–247, 2000.
- [328] SMITH, P. F.: Biosynthesis of Cholesteryl-Glucoside by *Mycoplasma gallinarum*. J Bacteriol, 108:986–991, 1971.
- [329] STAGLJAR, I., KOROSTENSKY, C., JOHNSON, N., and TE HEESSEN, S.: A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. PNAS, 95(9):5187–5192, 1998.
- [330] STASYK, O. V., NAZARKO, T. Y., and SIBIRNY, A. A.: Methods of plate pexophagy monitoring and positive selection for ATG gene cloning in yeasts. Methods Enzymol, 451:229–239, 2008.
- [331] STASYK, O. V., NAZARKO, T. Y., STASYK, O. G., KRASOVSKA, O. S., WARNECKE, D., NICAUD, J. M., CREGG, J. M., and SIBIRNY, A. A.: Sterol glucosyltransferases have different functional roles in *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica*. Cell Biol Int, 27(11):947–952, 2003.
- [332] STAVER, M. J., GLICK, K., and BAISTED, D. J.: Uridine diphosphate glucose-sterol glucosyltransferase and nucleoside diphosphatase activities in etiolated pea seedlings. Biochem J, 169(2):297–303, 1978.
- [333] ÖSTBERG, Y., BERG, S., COMSTEDT, P., WIESLANDER, A., and BERGSTRÖM, S.: Functional analysis of a lipid galactosyltransferase synthesizing the major envelope lipid in the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. FEMS Microbiol Lett, 272(1):22–29, 2007.
- [334] STÜBS, G., FINGERLE, V., WILSKE, B., GÖBEL, U. B., ZÄHRINGER, U., SCHUMANN, R. R., and SCHRÖDER, N. W. J.: Acylated cholesteryl galactosides are specific antigens of *Borrelia* causing Lyme disease and frequently induce antibodies in late stages of disease. J Biol Chem, 284(20):13326–13334, 2009.
- [335] STEELE, J. C. and MCGEER, P. L.: The ALS/PDC syndrome of Guam and the cycad hypothesis. Neurology, 70(21):1984–1990, 2008.

## Literaturverzeichnis

- [336] STEERE, A. C.: Lyme disease. *N Engl J Med*, 321(9):586–596, 1989.
- [337] STEERE, A. C.: Lyme disease. *N Engl J Med*, 345(2):115–125, 2001.
- [338] STEERE, A. C.: Lyme disease - Questions & Answers. 2007.
- [339] STEIM, J. M.: Monogalactosyl diglyceride: a new neurolipid. *Biochim Biophys Acta*, 144(1):118–126, 1967.
- [340] STENMARK, H. and AASLAND, R.: FYVE-finger proteins—effectors of an inositol lipid. *J Cell Sci*, 112 ( Pt 23):4175–4183, 1999.
- [341] STENMARK, H., AASLAND, R., TOH, B. H., and D'ARRIGO, A.: Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J Biol Chem*, 271(39):24048–24054, 1996.
- [342] STRAHL-BOLSINGER, S., IMMERSVOLL, T., DEUTZMANN, R., and TANNER, W.: PMT1, the gene for a key enzyme of protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS*, 90(17):8164–8168, 1993.
- [343] STRØMHAUG, P. E. and KLIONSKY, D. J.: Approaching the molecular mechanism of autophagy. *Traffic*, 2(8):524–531, 2001.
- [344] STUDIER, F. W., ROSENBERG, A. H., DUNN, J. J., and DUBENDORFF, J. W.: Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, 185:60–89, 1990.
- [345] SUBRAMANI, S.: Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu Rev Cell Biol*, 9:445–478, 1993.
- [346] SUBRAMANI, S.: Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiol Rev*, 78(1):171–188, 1998.
- [347] SWEIGARD, J. A., CARROLL, A. M., FARRALL, L., CHUMLEY, F. G., and VALENT, B.: *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. *MPMI*, 11(5):404–412, 1998.
- [348] TAKAHASHI, M., INOUE, N., OHISHI, K., MAEDA, Y., NAKAMURA, N., ENDO, Y., FUJITA, T., TAKEDA, J., and KINOSHITA, T.: PIG-B, a membrane protein of the endoplasmic reticulum with a large luminal domain, is involved in transferring the third mannose of the GPI anchor. *EMBO J*, 15(16):4254–4261, 1996.
- [349] TAKAISHI, Y., UDA, M., OHASHI, T., NAKANO, K., MURAKAMI, K., and TOMIMATSU, T.: Glycosides of ergosterol derivatives from *Hericum erinacens*. *Phytochemistry*, 30:4117–20, 1991.
- [350] TAKANO, Y., ASAKURA, M., and SAKAI, Y.: Atg26-mediated pexophagy and fungal phytopathogenicity. *Autophagy*, 5:1041–2, 2009.
- [351] TAKAYAMA, K., ROTHENBERG, R. J., and BARBOUR, A. G.: Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*, 55(9):2311–2313, 1987.
- [352] TAKEI, T., YOSHIDA, M., OHNISHI-KAMEYAMA, M., and KOBORI, M.: Ergosterol peroxide, an apoptosis-inducing component isolated from *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. *Biosci Biotechnol Biochem*, 69(1):212–215, 2005.
- [353] TALBOT, N. J. and KERSHAW, M. J.: The emerging role of autophagy in plant pathogen attack and host defence. *Curr Opin Plant Biol*, 12(4):444–450, 2009.
- [354] TALLÓCZY, Z., VIRGIN, H. W., and LEVINE, B.: PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy*, 2(1):24–29, 2006.
- [355] TANAHASHI, Y. and TAKAHASHI, T.: Sterol Constituents of *Daedalea quercina* L. (Fr.). *Bull Chem Soc Japan*, 39:848–849, 1966.
- [356] TANIGUCHI, N. and MAKITA, A.: Purification and characterization of UDP-N-acetylgalactosamine: globotriaosylceramide beta-3-N-acetylgalactosaminyltransferase, a synthase of human blood group P antigen, from canine spleen. *J Biol Chem*, 259(9):5637–5642, 1984.
- [357] TANNAES, T., GRAV, H. J., and BUKHOLM, G.: Lipid profiles of *Helicobacter pylori* colony variants. *APMIS*, 108(5):349–356, 2000.
- [358] TARBOURIECH, N., CHARNOCK, S. J., and DAVIES, G. J.: Three-dimensional structures of the Mn and Mg dTDP complexes of the family GT-2 glycosyltransferase SpsA: a comparison with related NDP-sugar glycosyltransferases. *J Mol Biol*, 314(4):655–661, 2001.
- [359] TERPE, K.: Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60(5):523–533, 2003.
- [360] TESTERMAN, T. L., MCGEE, D. J., and MOBLEY, H. L.: *Helicobacter pylori* growth and urease detection in the chemically defined medium Ham's F-12 nutrient mixture. *J Clin Microbiol*, 39(11):3842–3850, 2001.

## Literaturverzeichnis

- [361] THAMINY, S., MILLER, J., and STAGLJAR, I.: The split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol*, 261:297–312, 2004.
- [362] THIELE, S.: Affinitätschromatographische Reinigung der rekombinanten Cholesterol- $\alpha$ -Glucosyltransferase und der Cholesteryl- $\alpha$ -Glucosid-Acyltransferase von *Helicobacter pylori*. Diploma thesis, University of Hamburg, 2009.
- [363] THINES, E., WEBER, R. W., and TALBOT, N. J.: MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*, 12(9):1703–1718, 2000.
- [364] TOMB, J. F., WHITE, O., KERLAVAGE, A. R., CLAYTON, R. A., SUTTON, G. G., FLEISCHMANN, R. D., KETCHUM, K. A., KLENK, H. P., GILL, S., DOUGHERTY, B. A., NELSON, K., QUACKENBUSH, J., ZHOU, L., KIRKNESS, E. F., PETERSON, S., LOFTUS, B., RICHARDSON, D., DODSON, R., KHALAK, H. G., GLODEK, A., MCKENNEY, K., FITZGERALD, L. M., LEE, N., ADAMS, M. D., HICKEY, E. K., BERG, D. E., GOCAYNE, J. D., UTTERBACK, T. R., PETERSON, J. D., KELLEY, J. M., COTTON, M. D., WEIDMAN, J. M., FUJII, C., BOWMAN, C., WATTHEY, L., WALLIN, E., HAYES, W. S., BORODOVSKY, M., KARP, P. D., SMITH, H. O., FRASER, C. M., and VENTER, J. C.: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388(6642):539–547, 1997.
- [365] TUTTLE, D. L. and DUNN, W. A.: Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Cell Sci*, 108 ( Pt 1):25–35, 1995.
- [366] TUTTLE, D. L., LEWIN, A. S., and DUNN, W. A.: Selective autophagy of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *Eur J Cell Biol*, 60(2):283–290, 1993.
- [367] TYÖRINOJA, K., NURMINEN, T., and SUOMALAINEN, H.: The cell-envelope glycolipids of baker's yeast. *Biochem J*, 141(1):133–139, 1974.
- [368] UEMURA, M., JOSEPH, R. A., and STEPONKUS, P. L.: Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on Plasma Membrane Lipid Composition and Freeze-Induced Lesions). *Plant Physiol*, 109(1):15–30, 1995.
- [369] UEMURA, M. and STEPONKUS, P. L.: A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Tolerance. *Plant Physiol*, 104(2):479–496, 1994.
- [370] UENO, S., MARUKI, Y., NAKAMURA, M., TOMEMORI, Y., KAMAE, K., TANABE, H., YAMASHITA, Y., MATSUDA, S., KANEKO, S., and SANO, A.: The gene encoding a newly discovered protein, chorein, is mutated in chorea-acanthocytosis. *Nat Genet*, 28(2):121–122, 2001.
- [371] ULLMANN, P., BOUVIER-NAVÉ, P., and BENVENISTE, P.: Regulation by Phospholipids and Kinetic Studies of Plant Membrane-Bound UDP-Glucose Sterol  $\beta$ -D-Glucosyl Transferase. *Plant Physiol*, 85(1):51–55, 1987.
- [372] ULLMANN, P., URY, A., RIMMELE, D., BENVENISTE, P., and BOUVIER-NAVÉ, P.: UDP-glucose sterol  $\beta$ -D-glucosyltransferase, a plasma membrane-bound enzyme of plants: enzymatic properties and lipid dependence. *Biochimie*, 75(8):713–723, 1993.
- [373] URY, A., BENVENISTE, P., and BOUVIER-NAVÉ, P.: Phospholipid-Dependence of Plant UDP-Glucose Sterol beta-d-Glucosyl Transferase : IV. Reconstitution into Small Unilamellar Vesicles. *Plant Physiol*, 91(2):567–573, 1989.
- [374] VAN DEN BOSCH, H., SCHUTGENS, R. B., WANDERS, R. J., and TAGER, J. M.: Biochemistry of peroxisomes. *Annu Rev Biochem*, 61:157–197, 1992.
- [375] VAN DER KLEI, I. J. and VEENHUIS, M.: Yeast peroxisomes: function and biogenesis of a versatile cell organelle. *Trends Microbiol*, 5(12):502–509, 1997.
- [376] VAN KAN, J. A. L.: Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci*, 11(5):247–253, 2006.
- [377] VAN MEER, G., VOELKER, D. R., and FEIGENSON, G. W.: Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2):112–124, 2008.
- [378] VANCE, D. E. and VAN DEN BOSCH, H.: Cholesterol in the year 2000. *Biochim Biophys Acta*, 1529:1–8, 2000.
- [379] VELAYOS-BAEZA, A., VETTORI, A., COPLEY, R. R., DOBSON-STONE, C., and MONACO, A. P.: Analysis of the human VPS13 gene family. *Genomics*, 84(3):536–549, 2004.
- [380] VENAULT-FOURREY, C., BAROOAH, M., EGAN, M., WAKLEY, G., and TALBOT, N. J.: Autophagic fungal cell death is necessary for infection by the rice blast fungus. *Science*, 312(5773):580–583, 2006.
- [381] VENAULT-FOURREY, C. and TALBOT, N. J.: Autophagic cell death and its importance for fungal developmental biology and pathogenesis. *Autophagy*, 3(2):126–127, 2007.

## Literaturverzeichnis

- [382] VERGNE, I., ROBERTS, E., ELMAOUED, R. A., TOSCH, V., DELGADO, M. A., PROIKAS-CEZANNE, T., LAPORTE, J., and DERETIC, V.: Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase jumpy. *EMBO J*, 28(15):2244–2258, 2009.
- [383] VERHOEK, B., HAAS, R., WRAGE, K., LINSCHIED, M., and HEINZ, E.: Lipids and enzymatic activities in vacuolar membranes isolated via protoplasts from oat primary leaves. *Z Naturforsch*, 38c:770–777, 1983.
- [384] VIKSTRÖM, S., LI, L., KARLSSON, O. P., and WIESLANDER, A.: Key role of the diglycosyldiacylglycerol synthase for the nonbilayer-bilayer lipid balance of *Acholeplasma laidlawii* membranes. *Biochemistry*, 38(17):5511–5520, 1999.
- [385] VIKSTRÖM, S., LI, L., and WIESLANDER, A.: The nonbilayer/bilayer lipid balance in membranes. Regulatory enzyme in *Acholeplasma laidlawii* is stimulated by metabolic phosphates, activator phospholipids, and double-stranded DNA. *J Biol Chem*, 275(13):9296–9302, 2000.
- [386] VINH, T. U., SHI, M. H., ADLER, B., and FAINE, S.: Characterization and taxonomic significance of lipopolysaccharides of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *J Gen Microbiol*, 135(10):2663–2673, 1989.
- [387] VOEGELE, R. and MENDGEN, K.: Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytol*, 159:93–100, 2003.
- [388] VOLKMAN, J. K.: Sterols in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60(5):495–506, 2003.
- [389] VÉRON, B., BILLARD, C., DAUGUET, J. C., and HARTMANN, M. A.: Sterol composition of *Phaeodactylum tricoratum* as influenced by growth temperature and light spectral quality. *Lipids*, 31(9):989–994, 1996.
- [390] WALDHERR, M., RAGNINI, A., SCHWEYER, R. J., and BOGUSKI, M. S.: MRS6 - yeast homologue of the choroideraemia gene. *Nat Genet*, 3(3):193–194, 1993.
- [391] WALHOUT, A. J., BOULTON, S. J., and VIDAL, M.: Yeast two-hybrid systems and protein interaction mapping projects for yeast and worm. *Yeast*, 17(2):88–94, 2000.
- [392] WANG, Z. Y., SOANES, D. M., KERSHAW, M. J., and TALBOT, N. J.: Functional analysis of lipid metabolism in *Magnaporthe grisea* reveals a requirement for peroxisomal fatty acid beta-oxidation during appressorium-mediated plant infection. *MPMI*, 20(5):475–491, 2007.
- [393] WARNECKE, D., ERDMANN, R., FAHL, A., HUBE, B., MÜLLER, F., ZANK, T., ZÄHRINGER, U., and HEINZ, E.: Cloning and functional expression of UGT genes encoding sterol glucosyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*, and *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem*, 274(19):13048–13059, 1999.
- [394] WARNECKE, D. and HEINZ, E.: Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cell Mol Life Sci*, 60(5):919–941, 2003.
- [395] WARNECKE, D. and HEINZ, E.: Glycolipid headgroup replacement: A new approach for the analysis of specific functions of glycolipids *in vivo*. *Eur J Cell Biol*, 89(1):53–61, 2010.
- [396] WARNECKE, D. C.: Analyse der Biosynthese und der Funktionen von Sterylglucosiden und Glucosylceramiden durch "Glycolipid-Engineering" von Pflanzen, Pilzen und Bakterien. Habilitation thesis, University of Hamburg, 2007.
- [397] WARNECKE, D. C., BALTRUSCH, M., BUCK, F., WOLTER, F. P., and HEINZ, E.: UDP-glucose:sterol glucosyltransferase: cloning and functional expression in *Escherichia coli*. *Plant Mol Biol*, 35(5):597–603, 1997.
- [398] WARNECKE, D. C. and HEINZ, E.: Purification of a Membrane-Bound UDP-Glucose:Sterol [beta]-D-Glucosyltransferase Based on Its Solubility in Diethyl Ether. *Plant Physiol*, 105(4):1067–1073, 1994.
- [399] WATERHAM, H. R., DIGAN, M. E., KOUTZ, P. J., LAIR, S. V., and CREGG, J. M.: Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, 186(1):37–44, 1997.
- [400] WEBB, M. S., IRVING, T. C., and STEPONKUS, P. L.: Effects of plant sterols on the hydration and phase behavior of DOPE/DOPC mixtures. *Biochim Biophys Acta*, 1239(2):226–238, 1995.
- [401] WEBER, K.: Aspects of Lyme borreliosis in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 20(1):6–13, 2001.
- [402] WEBER, N.: Metabolism of sitosteryl  $\beta$ -D-glucoside and its nutritional effects in rats. *Lipids*, 23(1):42–47, 1988.
- [403] WEEKS, O. B. and FRANCESCONI, M. D.: Occurrence of squalene and sterols in *Cellulomonas dehydrogenans* (Arnaudi 1942) comb. nov. Hester 1971. *J Bacteriol*, 136(2):614–624, 1978.

## Literaturverzeichnis

- [404] WEENING, E. H., PARVEEN, N., TRZECIAKOWSKI, J. P., LEONG, J. M., HÖÖK, M., and SKARE, J. T.: *Borrelia burgdorferi* lacking DbpBA exhibits an early survival defect during experimental infection. *Infect Immun*, 76(12):5694–5705, 2008.
- [405] WEETE, J. D.: Sterols of the fungi: Distribution and Biosynthesis. *Phytochemistry*, 12:1843–64, 1973.
- [406] WERTZ, P. W., STOVER, P. M., ABRAHAM, W., and DOWNING, D. T.: Lipids of chicken epidermis. *J Lipid Res*, 27(4):427–435, 1986.
- [407] WIELAND, P. and PRELOG, V.: Über die Isolierung von Ergosterin, Ergosterin-palmitat und Ergosterin-peroxyd aus dem Mycel von *Aspergillus fumigatus*, mut. helvola, Yuill. *Helv Chim Acta*, 30:1028–30, 1947.
- [408] WIESLANDER, A., RILFORS, L., DAHLQVIST, A., JONSSON, J., HELLBERG, S., RÄNNAR, S., SJÖSTRÖM, M., and LINDBLÖM, G.: Similar regulatory mechanisms despite differences in membrane lipid composition in *Acholeplasma laidlawii* strains A-EF22 and B-PG9. A multivariate data analysis. *Biochim Biophys Acta*, 1191(2):331–342, 1994.
- [409] WIGGINS, C. A. and MUNRO, S.: Activity of the yeast MNN1  $\alpha$ -1,3-mannosyltransferase requires a motif conserved in many other families of glycosyltransferases. *PNAS*, 95(14):7945–7950, 1998.
- [410] WIKSTRÖM, M., KELLY, A. A., GEORGIEV, A., ERIKSSON, H. M., KLEMENT, M. R., BOGDANOV, M., DOWHAN, W., and WIESLANDER, A.: Lipid-engineered *Escherichia coli* membranes reveal critical lipid headgroup size for protein function. *J Biol Chem*, 284(2):954–965, 2009.
- [411] WIKSTRÖM, M., XIE, J., BOGDANOV, M., MILEYKOVSKAYA, E., HEACOCK, P., WIESLANDER, A., and DOWHAN, W.: Monoglucosyldiacylglycerol, a foreign lipid, can substitute for phosphatidylethanolamine in essential membrane-associated functions in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 279(11):10484–10493, 2004.
- [412] WILSON, J. M. B., KHABAZIAN, I., WONG, M. C., SEYEDALIKHANI, A., BAINS, J. S., PASQUALOTTO, B. A., WILLIAMS, D. E., ANDERSEN, R. J., SIMPSON, R. J., SMITH, R., CRAIG, U. K., KURLAND, L. T., and SHAW, C. A.: Behavioral and neurological correlates of ALS-parkinsonism dementia complex in adult mice fed washed cycad flour. *Neuromolecular Med*, 1(3):207–221, 2002.
- [413] WOJCIECHOWSKI, Z. A.: Biochemistry of Phytosterol Conjugates. In: *Physiology and Biochemistry of Sterols*. American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois, 1991.
- [414] WOJCIECHOWSKI, Z. A., ZIMOWSKI, J., ZIMOWSKI, J. G., and LYZNIK, A.: Specificity of sterol glucosylating enzymes from *textitSinapis alba* and *Physarum polycephalum*. *Biochim Biophys Acta*, 570:363–370, 1979.
- [415] WOO, J. H., LIU, Y. Y., MATHIAS, A., STAVROU, S., WANG, Z., THOMPSON, J., and NEVILLE, D. M.: Gene optimization is necessary to express a bivalent anti-human anti-T cell immunotoxin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 25(2):270–282, 2002.
- [416] WRIESSNEGGER, T., GÜBITZ, G., LEITNER, E., INGOLIC, E., CREGG, J., DE LA CRUZ, B. J., and DAUM, G.: Lipid composition of peroxisomes from the yeast *Pichia pastoris* grown on different carbon sources. *Biochim Biophys Acta*, 1771(4):455–461, 2007.
- [417] WU, J. M., LIN, J. C., CHIENG, L. L., LEE, C. K., and HSU, T. A.: Combined use of GAP and AOX1 promoter to enhance the expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 33:453–59, 2003.
- [418] WU, K., MARKS, D. L., WATANABE, R., PAUL, P., RAJAN, N., and PAGANO, R. E.: Histidine-193 of rat glucosylceramide synthase resides in a UDP-glucose- and inhibitor (D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholinopropan-1-ol)-binding region: a biochemical and mutational study. *Biochem J*, 341 ( Pt 2):395–400, 1999.
- [419] WUNDER, C., CHURIN, Y., WINAU, F., WARNECKE, D., VIETH, M., LINDNER, B., ZÄHRINGER, U., MOLLENKOPF, H. J., HEINZ, E., and MEYER, T. F.: Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by *Helicobacter pylori*. *Nat Med*, 12(9):1030–1038, 2006.
- [420] XIE, J., BOGDANOV, M., HEACOCK, P., and DOWHAN, W.: Phosphatidylethanolamine and monoglucosyldiacylglycerol are interchangeable in supporting topogenesis and function of the polytopic membrane protein lactose permease. *J Biol Chem*, 281(28):19172–19178, 2006.
- [421] XIE, Z. and KLIONSKY, D. J.: Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*, 9(10):1102–1109, 2007.
- [422] XIONG, Y., PATANA, A. S., MILEY, M. J., ZIELINSKA, A. K., BRATTON, S. M., MILLER, G. P., GOLDMAN, A., FINEL, M., REDINBO, M. R., and RADOMINSKA-PANDYA, A.: The first aspartic acid of the DQxD motif for human UDP-glucuronosyltransferase 1A10 interacts with UDP-glucuronic acid during catalysis. *Drug Metab Dispos*, 36(3):517–522, 2008.

- [423] YAMAGUCHI, M. and KASAMO, K.: Modulation of proton pumping across proteoliposome membranes reconstituted with tonoplast H(+)-ATPase from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. Boro) cells by acyl steryl glucoside and steryl glucoside. *Plant Cell Physiol*, 43(7):816–822, 2002.
- [424] YAMASHITA, S., OKU, M., and SAKAI, Y.: Functions of PI4P and sterol glucoside are necessary for the synthesis of a nascent membrane structure during pexophagy. *Autophagy*, 3(1):35–37, 2007.
- [425] YAMASHITA, S., OKU, M., WASADA, Y., ANO, Y., and SAKAI, Y.: PI4P-signaling pathway for the synthesis of a nascent membrane structure in selective autophagy. *J Cell Biol*, 173(5):709–717, 2006.
- [426] YAMASHITA, S., YURIMOTO, H., MURAKAMI, D., YOSHIKAWA, M., OKU, M., and SAKAI, Y.: Lag-phase autophagy in the methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *Genes Cells*, 14(7):861–870, 2009.
- [427] YANAGIHARA, Y., KAMISANGO, K., YASUDA, S., KOBAYASHI, S., MIFUCHI, I., AZUMA, I., YAMAMURA, Y., and JOHNSON, R. C.: Chemical compositions of cell walls and polysaccharide fractions of spirochetes. *Microbiol Immunol*, 28(5):535–544, 1984.
- [428] YEN, W.-L. and KLIONSKY, D. J.: Atg27 is a second transmembrane cycling protein. *Autophagy*, 3(3):254–256, 2007.
- [429] YEN, W.-L., LEGAKIS, J. E., NAIR, U., and KLIONSKY, D. J.: Atg27 is required for autophagy-dependent cycling of Atg9. *Mol Biol Cell*, 18(2):581–593, 2007.
- [430] YOSHIDA, S. and UEMURA, M.: Lipid Composition of Plasma Membranes and Tonoplasts Isolated from Etiolated Seedlings of Mung Bean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiol*, 82(3):807–812, 1986.
- [431] YOSHIMOTO, K., TAKANO, Y., and SAKAI, Y.: Autophagy in plants and phytopathogens. *FEBS Lett*, 584:1350–1358, 2010.
- [432] YOUNT, B. A., LIN CEREGHINO, J., LIN CEREGHINO, G. P., and FOX, M. M.: Preparation of the Yeast *Pichia pastoris* for Transmission Electron Microscopy. *Micros Today*, 14(5):36–37, 2006.
- [433] YU, J. W., MENDROLA, J. M., AUDHYA, A., SINGH, S., KELETI, D., DEWALD, D. B., MURRAY, D., EMR, S. D., and LEMMON, M. A.: Genome-wide analysis of membrane targeting by *S. cerevisiae* pleckstrin homology domains. *Mol Cell*, 13(5):677–688, 2004.
- [434] YUAN, W., STRØMHAUG, P. E., and DUNN, W. A.: Glucose-induced autophagy of peroxisomes in *Pichia pastoris* requires a unique E1-like protein. *Mol Biol Cell*, 10(5):1353–1366, 1999.
- [435] YUE, J. M., CHEN, S. N., LIN, Z. W., and SUN, H. D.: Sterols from the fungus *Lactarium volemus*. *Phytochemistry*, 56(8):801–806, 2001.
- [436] ZANK, T.: Klonierung und Expression neuartiger Sterol-Glucosyltransferasen. Diploma thesis, University of Hamburg, 1998.
- [437] ZAPUN, A., CONTRERAS-MARTEL, C., and VERNET, T.: Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2):361–385, 2008.
- [438] ZASLAWSKI, A.: Identifizierung von Sterol- $\beta$ -Glucosyltransferase-Genen aus dem phytopathogenen Pilz *Fusarium graminearum* Schwabe. Diploma thesis, University of Hamburg, 2008.
- [439] ÖZCAN, S., DOVER, J., and JOHNSTON, M.: Glucose-sensing and -signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 17(9):2566–2573, 1998.
- [440] ZINSER, E. and DAUM, G.: Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 11(6):493–536, 1995.

# Anhang

**Anhang 1.** Informationen zur SDM-Strategie: Mögliche AS-Austausche und Screening-Möglichkeiten mittels Restriktionsanalyse.

**Anhang 2.** Ausschnitt eines Nukleotid- und AS-Sequenzalignment des nativen pCFP-ugt51b1-FL-Vektors und der drei durch SDM-modifizierten pCFP-ugt51b1-Vektoren.

**Anhang 3.** Klonierungsstrategien für die Expression synthetischer Gene (art*Bb0572*, art*Bb0767* und art*Bh0572*) in *P. pastoris* und *E. coli*.

**Anhang 4.** Nukleotidsequenzen der nativen und synthetischen Gene *Bb0572* und *Bb0767*.

**Anhang 5.** *BLAST2Seq*-Analysen von *Bh0572* und *Bb0572* auf Nukleotid- und Proteinebene.

**Anhang 6.** Nukleotidsequenzen des nativen und des synthetischen Gens von *Bh0572*.

**Anhang 7.** Reaktionskits.

**Anhang 8.** Verwendete Mikroorganismen.

**Anhang 9.** Verwendete Vektoren.

**Anhang 10.** In dieser Arbeit generierte Konstrukte.

**Anhang 11.** In dieser Arbeit generierte Stämme.

**Anhang 12.** Generierte und verwendete Primerpaare.



**Anhang 1.** Informationen zur SDM-Strategie: Mögliche AS-Austausche und Screening-Möglichkeiten mittels Restriktionsanalyse.

Ursprungs-AS	Eigenschaften	ersetzt mit	neue AS	Eigenschaften	generierte Site	zerstörte Site	Sites in pCFP-ug51FL*
Phe	aromatisch, hydrophob	t > g - tgt	Cys	hydrophil, polar	BsrGI tgtaca		4
Thr	polar, hydrophil	a > g - gaa	Ala	neutral	BsrGI gaaatg		7
		c > a - aaa	Lys	basisch	EcoRI tttaaa		4
		c > g - aga	Arg	basisch	BamI gaatgc		6
		c > t - att	Ile	hydrophob	PstI ttttaa		2
Ile	polar, hydrophob	a > c - atg	Leu	hydrophob	BstI tcaatg		5
		a > t - ttg	Leu	hydrophob	BsrDI tcaatg		7
Pro	neutral	c > a - aca	Thr	polar, hydrophil		NcoI ccaatg	2
		c > g - gca	Ala	neutral, unipolar		NcoI ccaatg	2
		c > t - tca	Ser	polar, hydrophil		NcoI ccaatg	2
		c > a - caa	Gln	polar, hydrophil	BsrDI tcaaatg	NcoI ccaatg	4/2
		c > g - cga	Arg	basisch		NcoI ccaatg	2
		c > t - cta	Leu	hydrophob		NcoI ccaatg	2

**Mutation A** F T H P  
Phe Thr IleI Pro  
schon vorhandene Sites: Met

\* mit jeweiligem Fragment, ohne Mutation

Ursprungs-AS	Eigenschaften	ersetzt mit	neue AS	Eigenschaften	generierte Site	zerstörte Site	Sites in pCFP-ug51FL*
His	basisch, hydrophil	c > g - gat	Arg	sauer, hydrophil	BspHI tcaatg		4
Gly	neutral, unipolar	g > a - gat	Arg	sauer, hydrophil	BspHI tcaatg		4
ChC	neutral, unipolar	g > a - aga	Arg	basisch	BglI agatct		2

**Mutation B** H G G  
His Gly Gly  
schon vorhandene Sites: Met

\* mit jeweiligem Fragment, ohne Mutation

Ursprungs-AS	Eigenschaften	ersetzt mit	neue AS	Eigenschaften	generierte Site	zerstörte Site	Sites in pCFP-ug51FL*
Asp	sauer, hydrophil	g > t - tat	Tyr	aromatisch, polar	EcoRV tatatc		0
		a > c - cct	Ala	neutral, unipolar	BsdI gaaatc, Eco136II gagctc		1/1
Gln	polar, hydrophil	c > g - gaa	Glu	sauer, hydrophil	EcoRI gaaatc		3
		a > g - cga	Arg	basisch	ClaI atgat		8
		a > t - da	Leu	hydrophob	BglI atgat		2
			His		keine neue Site mögl.		

**Mutation C** D G  
Asp - Gln  
schon vorhandene Sites: -

\* mit jeweiligem Fragment, ohne Mutation

Ursprungs-AS	Eigenschaften	ersetzt mit	neue AS	Eigenschaften	generierte Site	zerstörte Site	Sites in pCFP-ug51FL*
Arg	basisch	c > g - gga	Gly	neutral, polar	BpmI ctggag	XbaI ctggag	12/2
		g > a - aaa	Gln	polar, hydrophil	BpuEI ctcaag	XbaI ctggag	12/2
		g > c - cca	Pro	neutral	BpmI ctcaag	XbaI, BseRI gagggag	12/2/8
		g > t - da	Leu	basisch		XbaI, BseRI gagggag	2/8
Gly	neutral, polar	g > a - aga	Arg	basisch	EcoI gaaatg	XbaI, BsrGI	7/2/4
		g > c - cga	Arg	basisch		XbaI, BsrGI	2/4
		g > a - gaa	Glu	sauer, hydrophil		BseRI gagggag	8
		g > c - gca	Ala	neutral		BseRI gagggag	8
		g > t - gla	Val	hydrophob		BseRI gagggag	8
Asp	sauer, hydrophil	g > a - aat	Asn	polar, hydrophil		BseRI	8
		g > c - cat	His	basisch, hydrophil	PstI acaatg	BseRI	8
		g > t - tat	Tyr	aromatisch, polar		BseRI	8
		t > g - gag	Glu	sauer, hydrophil		BsrGI tttaca	4
Gln	polar, hydrophil	c > a - aaa	Lys	basisch		BsrGI	4
		c > g - gag	Glu	sauer, hydrophil		BsrGI	4
		a > c - cca	Pro	neutral		BsrGI	4
		a > g - cga	Arg	basisch		BsrGI	4
		a > t - da	Leu	hydrophob		BsrGI	4

**Mutation D** R G D (K) Q P  
Arg Gly Asp (K) Gln Pro  
schon vorhandene Sites: XbaI, BseRI, BsrGI

\* mit jeweiligem Fragment, ohne Mutation

Abbildung 4.1: Übersicht über mögliche AS-Austausche und Screening-Möglichkeiten mittels Restriktion.

Alle vorgefundenen Möglichkeiten in Bezug auf AS-Wechsel und eine Übersicht über vorhandene, erzeugte bzw. deletierte Restriktionsschnittstellen (Sites) können dieser Abbildung entnommen werden. Die in dieser Arbeit ausgewählten Modifikationen können ebenfalls Abbildung 2.1 (S.48) entnommen werden.

**Anhang 2.** Ausschnitt eines Nukleotid- und AS-Sequenzalignment des nativen pCFP-ugt51b1-FL-Vektors und der drei durch SDM-modifizierten pCFP-ugt51b1-Vektoren.

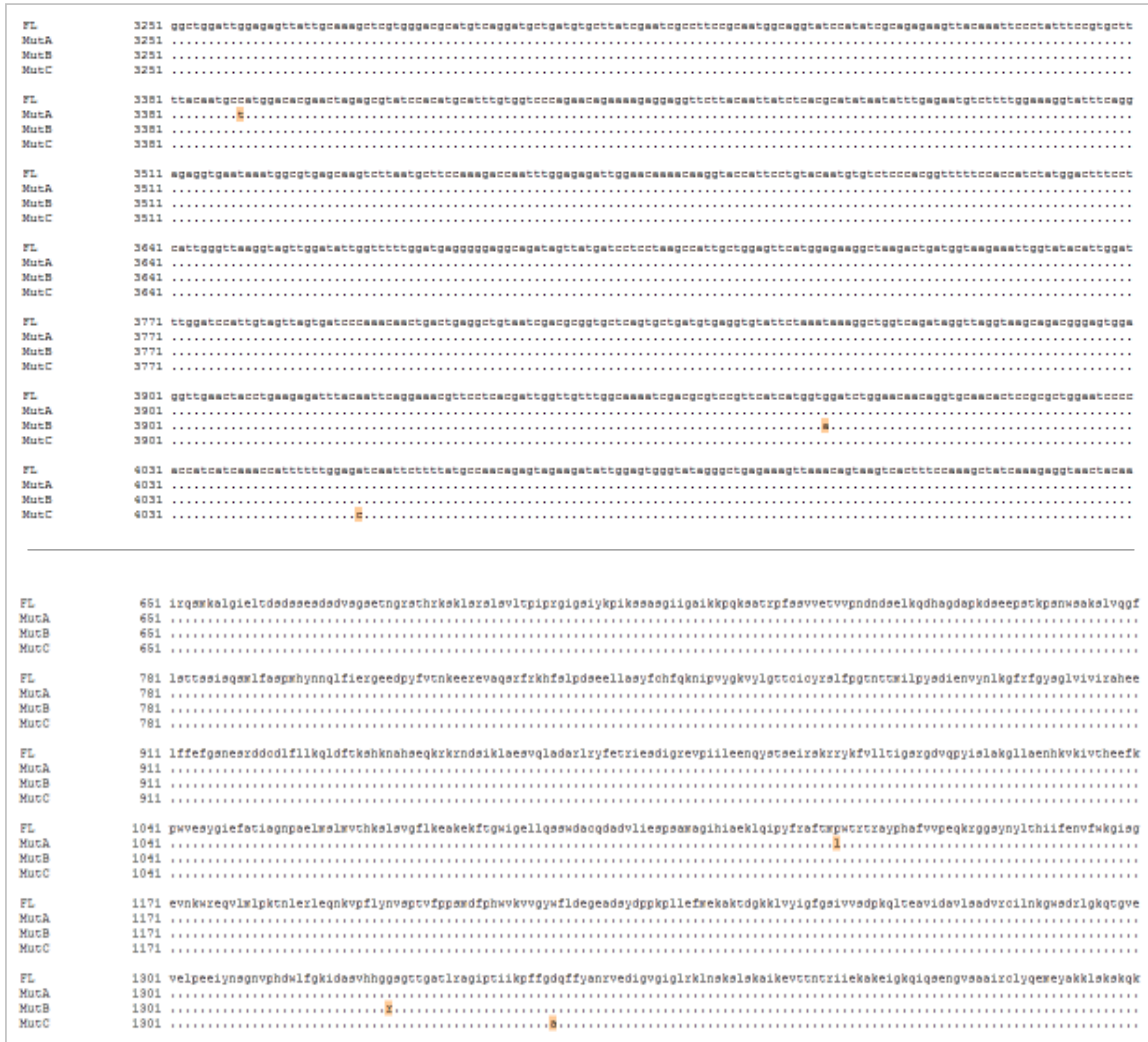


Abbildung 4.2: Übersicht über die eingefügten Mutationen in pCFP-ugt51b1.

Sequenzalignment eines Ausschnitts der Nukleotidsequenzen (oben) und der Proteinsequenzen (unten). Bei MutA wurde das Triplet cca zu cta und somit Prolin zu Leucin, bei MutB gga zu aga und Glycin zu Arginin und bei MutC gat zu gct und Aspartat zu Alanin. (s. auch Abb.2.1, S.48)

**Anhang 3.** Klonierungsstrategien für die Expression synthetischer Gene (art *Bb0572*, art *Bb0767* und art *Bh0572*) in *P. pastoris* und *E. coli*.

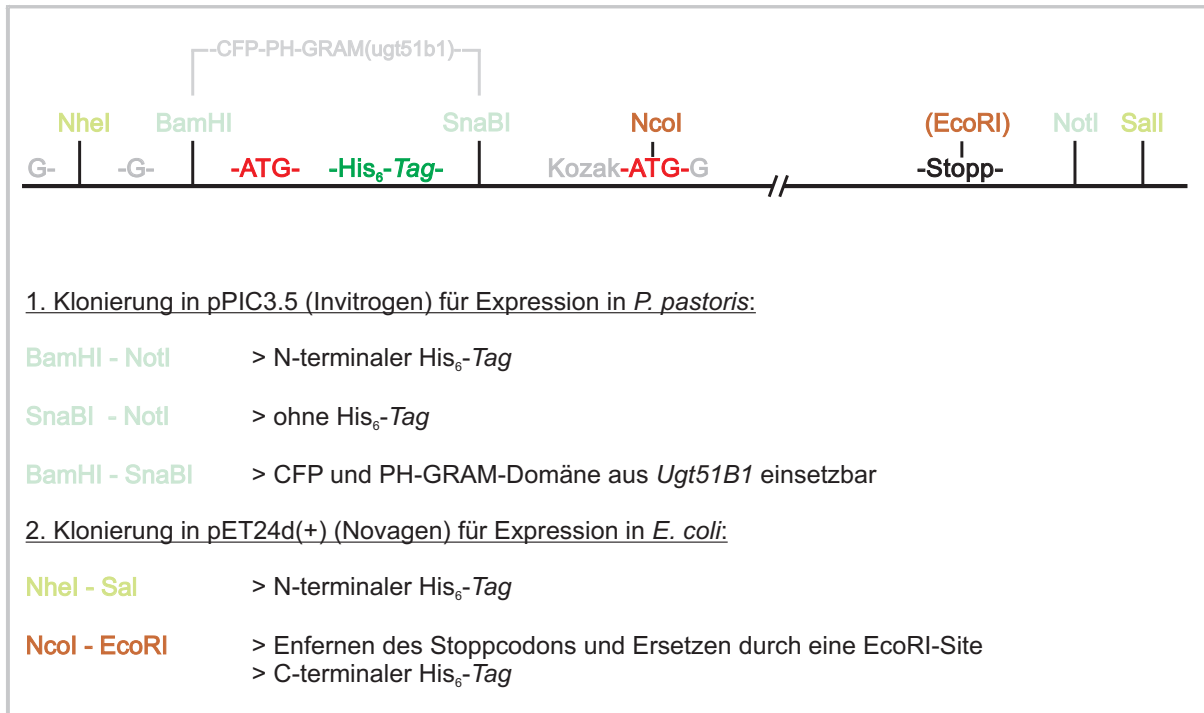


Abbildung 4.3: Übersicht über die erstellte Klonierungsstrategie der synthetischen Gene für die Kandidaten Bb0572, Bb0767 und Bh0572.

## Anhang

### Anhang 4. Nukleotidsequenzen der nativen und synthetischen Gene *Bb0572* und *Bb0767*.

<b><u>Nativ:</u></b>					
1	<b>ttg</b> gaggata	ttgtgcataa	gtataaaagt	tctgttatta	tttgtttttt
51	taattcggt	gaaactcttg	atgcaatgat	aaaggatgct	gttaatcaaa
101	cattaaaga	taaagaaatt	atattaattg	atgatgggtc	ttatgatggt
151	agtttagaga	tagcagaaaa	atagccaat	aagtatagct	ttattaagat
201	ttttagtcaa	aaaaatgg	gtctttctgc	ttctagagac	aagggacttt
251	ctgaggctca	aggggaatat	gttatttatt	gggatgggtg	tgattctgta
301	gagagcacca	tgcttgaagt	tctatataac	agagcaaaag	cagataattc
351	tgatattggt	gtttctcaat	tttatattta	ttttcttgca	ataaatgtaa
401	aaagaaaatc	tctacttct	tttcttaatt	atccattaac	aggcaaggag
451	gcgtttaaaa	atttgctttt	tactgtttat	gcgacttttg	gaaggaaaaa
501	ttttgttgtt	ggaacgttat	gggataaatt	gattagacgg	gaattaattt
551	taaagaataa	tattcgctcag	caaaaatgtag	tatttgaaga	tatagttttt
601	gttatgcaaa	tttttttaa	agcttctaaa	gtttcttttg	taaataatta
651	ttttataact	aatttccaaa	gaatgggaag	catgagtctt	tctattagtg
701	ttttacataa	atctaaatta	tctcttaata	caatggaaac	tttataaaaa
751	agagaaggt	tttttaacga	atgtcaaaat	ttgtataaaa	aatttttctt
801	gcaattttat	tattttattt	cttttaagca	aatttatatt	attagttgga
851	atatctctga	taagcttgtt	tatagggctt	ataaagaaaa	gcttatttct
901	gttcttgatg	agattaaagg	attatctgaa	tttcaagatt	gttatgaata
951	tgcaaaaagt	tttggattta	atgaaattca	aattttacct	agaattatgc
1001	taaaaatttg	gaatttttagc	tcaagacttt	atgtaaat	ttctatattt
1051	atttataagt	ttttcataaa	aaat <b>tga</b>		
<b><u>Artifiziell:</u></b>					
1	<b>gctagcggga</b>	<b>tccatgcatc</b>	<b>atcatcacca</b>	<b>tcac</b> tacgta	<b>gccatg</b> gagg
51	acattgttca	caagtacaag	gtttccgtta	tcatctgttt	cttcaactcc
101	gctgagactt	tgacgctat	gatcaaggac	gctgttaacc	agactttgaa
151	ggacaaagag	atcatcttga	tcgacgacgg	ttcttacgat	ggttccttgg
201	agattgctga	gaagtacgct	aacaagtact	ccttcatcaa	gattttctcc
251	cagaaaaaca	tgggtttgtc	cgcttctaga	gacaaggggt	tgctgaaagc
301	tcagggtgag	tacgttatct	actgggatgg	tgacgactct	gttgagtcca
351	ctatgttga	ggtttgttac	aacagagcta	aggctgacaa	ctccgacatt
401	gtttgttccc	agttctacat	ctactttttg	gctatcaacg	ttaagagaaa
451	gtccttggtg	ccattcccaa	actaccatt	gactggtaaa	gaggctttca
501	agaacttggt	gttactgtt	tacgctactt	tcggtagaaa	gaatttcggt
551	gttggtactt	tgtgggacaa	gttgatcaga	agagagtgtg	tcttgaagaa
601	caacatcaga	cagcagaacg	ttgttttoga	ggacatcggt	ttcgttatgc
651	aaatcttctt	gaaggcttcc	aaggtttctt	tcgttaacaa	ctacttctac
701	acaaaacttc	agagaatggg	ttctatgtcc	tcctccatct	ccgttttgca
751	caagtccaag	ttgtccttga	acactatgga	aactttgttg	aagagagag
801	gaatcttcaa	cgagtgtcag	aacttgtaca	agaagttctt	cttgacgttc
851	tactacttca	tctccttcaa	gcaaatctac	atcatctctt	ggaacatctc
901	cgacaagttg	gtttacagag	cttacaaga	gaagttgatt	tcogttttgg
951	acgagatcaa	gggattgtcc	gagttccaag	actgttacga	gtacgctaag
1001	tccttcggtt	tcaacgagat	ccaaatcttg	ccaagaatca	tgttgaagat
1051	ttggaacttc	tcatccagac	tttatgttaa	cttctccatc	ttcatctaca
1101	agttcttcat	caaaaact <b>tag</b>	<b>gcggccgcgt</b>	<b>cgac</b>	
<b>g/ctagc</b> - NheI		<b>gg/atcc</b> - BamHI		<b>tac/gta</b> - SnaBI	
<b>cc/atgg</b> - NcoI		<b>gc/ggccgc</b> - NotI		<b>g/tcgac</b> - SalI	
<b>ttg</b> bzw. <b>atg</b> - Startcodon			<b>tga</b> bzw. <b>tag</b> - Stoppcodon		
<b>gccatgg</b> - Kozak-Sequenz					
<b>cat cat cat cac cat cac</b> - Polyhistidin-Markierung					

Abbildung 4.4: Native und synthetische Nukleotidsequenz von *Bb0572*.

Die native Nukleotidsequenz kann ebenfalls Genbank (AAC66931.1) entnommen werden. Die synthetische Sequenz wurde von GENEART generiert.

## Anhang

<b><u>Nativ:</u></b>					
1	<b>atg</b> tcaaata	aaaaataat	atTTTTtaca	gggggaggaa	ctgggggtca
51	cgtatttcca	ggaatttcca	tcatacaaaa	atTaaaagaa	tttgataatg
101	aaattgaatt	TTTTTggata	ggTaaaaaaa	attctataga	agaaaaacta
151	ataaaagaac	agataatat	taaattttatt	tcgattccat	gcggaaaact
201	tagacgctat	TTTTctttta	aaaatttttac	tgactttttc	aaagtaatac
251	ttggaataat	aaaaagcttt	tacgTtttaa	aaaaatataa	acctcagctt
301	atTtAcgcaa	cgggaggatt	Tgtttcaact	cctgcaatta	ttgcatccag
351	cttgctaaaa	ataaaaagca	taacccatga	aatggatcta	gatcccggaac
401	ttgcaacaaa	aatTaaactct	aaattcgcaa	ataacataca	cataagcttt
451	aaagaagtg	aaaaaactt	caaaaattac	aaaaacatta	tttacacag
501	atctcctata	agaagagaat	TTTTaaatcc	agatcccaaa	ataatcaaac
551	aattgacaca	aaacactaac	aaaccaatta	ttagcatact	Tgggggatct
601	cttgcgctaa	atgctttaaa	caaccttgca	ctctgcatta	aaaaggatgc
651	tgaatctac	ttcatccatc	aatcggggaa	aaattTaaat	gacctaagcg
701	aaaagaatta	ccttagaagg	caatttttta	acgcagaaga	aatggcaagt
751	atagtTaaat	tttctaactc	aataataagc	agagccggag	ctggagcaat
801	aaaggaaTtt	gcaaTgctg	gtgcatgtgc	aatTTtgatt	ccattTaaaa
851	aaggctctag	aggagatcaa	atTaaaaatg	caaaaattact	aacaatcaa
901	aatgcctgca	tttatataga	tgaagatgaa	atTTTaaata	taaatatTTt
951	aaaaattata	aaaaaaactt	taaaagatag	agaaaaaatc	aactctctca
1001	aagaaaatat	caaaaaattc	aataataagc	attcttcaac	tttaatagcc
1051	aaattgctaa	taaaagatat	taaggagaca	aaatctaaat	<b>ga</b>
<b><u>Artifiziell:</u></b>					
1	gctagcggga	tccatgcatc	atcatcacca	tcactacgta	gccatggcaa
51	acaagaaaat	catcttcttc	actggTggTg	gtactggTg	tcatgttttc
101	cctggTatct	ccatcatcca	gaagTtgaaa	gagTtgcaca	acgagatcga
151	gttcttctg	atcggaaa	agaactccat	cgaagagaag	ttgatcaaa
201	agcaggacaa	catcaagTtc	atctccatcc	catgtggTaa	gttgagaaga
251	tacttctcct	tcaaaaactt	tactgacttc	ttcaaggTta	tctTgggtat
301	catcaagTtc	ttctacgttt	tgaagaagta	caagccacag	ttgatctacg
351	ctactggTg	tttcgtttcc	actccagcta	ttatcgcttc	ctcattgttg
401	agatcaagt	ccatcactca	cgaaatggat	ttggaccag	gattggctac
451	taagatcaac	tccaagTtcg	ctaacaacat	ccacatctca	ttcaaagagt
501	ccgagaagta	cttcaagaac	tacaagaaca	tcactacac	tggttcccc
551	atcagaagag	agTtcttgaa	cccagaccca	aagatcatca	agcagTtgac
601	tcagaacact	aacaagccaa	tcactctccat	ttTgggagga	tctTgggtg
651	ctaacgcttt	gaacaacttg	gctTtTgtgta	tcaagaagga	cgctgaaatc
701	tacttcattc	accagTccgg	aaagaacttg	aacgactTgt	ccgagaagaa
751	ctacttgaga	agacagTtct	tcaacgctga	agagatggct	tccatcgTta
801	agTtctccaa	cttgatcatic	tctagagctg	gtgctggTgc	tattaaagag
851	ttcgctaacg	ctggagcttg	tgctatTttg	atcccattca	agaagggttc
901	cagaggagat	caaatcaaga	acgctaagTt	gttgactaac	cagaacgctt
951	gtatctacat	tgacgaggac	gaaatcttga	acatcaacat	cttgaagatc
1001	atcaaaaaga	ctTtgaagga	cagagagaag	attaactcct	tgaaagagaa
1051	catcaagaag	ttcaacaaca	agcactcctc	cactTtgatc	gctaattgt
1101	tgatcaagga	catcaaaag	actaagtcca	agTaaGgggc	cgctcgac
<span style="color: green;">g/ctagc</span> - NheI	<span style="color: blue;">gg/atcc</span> - BamHI	<span style="color: black;">tac/gta</span> - SnaBI			
<span style="color: red;">cc/atgg</span> - NcoI	<span style="color: blue;">gc/ggccgc</span> - NotI	<span style="color: black;">g/tcgac</span> - SalI			
<span style="color: red;">atg</span> - Startcodon	<span style="color: black;">tga</span> bzw. <span style="color: black;">taa</span> - Stoppcodon				
<span style="color: green;">gccatgg</span> - Kozak-Sequenz					
<span style="color: green;">cat cat cat cac cat cac</span> - Polyhistidin-Markierung					

Abbildung 4.5: Native und synthetische Nukleotidsequenz von *Bb0767*.

Die native Nukleotidsequenz kann ebenfalls Genbank (AAC67113.1) entnommen werden. Die synthetische Sequenz wurde von GENEART generiert.

Anhang 5. *BLAST2Seq*-Analysen von Bh0572 und Bb0572 auf Nukleotid- und Proteinebene.



Abbildung 4.6: Alignment der Nukleotidsequenzen von Bh0572 und Bb0572.

Auf Nukleotidebene konnte eine Identität von 76% nach Alignment der Nukleotidsequenzen von Bh0572 (Genbank: AAX17079.1) und Bb0572 (AAC66931.1) nachgewiesen werden.

## Anhang

		Query: Bh0572
		Subject: Bb0572
Score = 514 bits (1325), Expect = 9e-151, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 246/354 (69%), Positives = 304/354 (85%), Gaps = 0/354 (0%)		
Query	1	MYKYKVSIIICFFNSDSTILEVIKNAVNTLRDKEIILVNDGSDNSLKIAQKYADKYDF 60
		++KYKVSIIICFFNS TL+ +IK+AVNQTIL+DKEIIL++DGSYD SL+IA+KYA+KY F
Sbjct	5	VHKYKVSIIICFFNSAETLDAMIKDAVNQTILKDKKEIILIDDGSDSLEIAEKYANKYSF 64
Query	61	VKIINQKNMGIAASRNNGLEKSEGEYIVYWDSDSDSVENTMLEVLYNRAKADNSDIVCSQF 120
		+KI +QKNMG++ASR+ GL +++GEY++YWD DDSVE+TMLEVLYNRAKADNSDIVCSQF
Sbjct	65	IKIFSQKNMGLSASRDKGLSEAQGEYVIYWDGSDSVESTMLEVLYNRAKADNSDIVCSQF 124
Query	121	YIYFLAKNIKRRSALPPFPNYPITGEEAFRNLLLTVEASFCKRNFVVGILWDMIRRDLLI 180
		YIYFLA N+KR+S LPFPNYP+TG+EAF+NL L TV+A+F ++NFVVGILWDK+IRR+LI+
Sbjct	125	YIYFLAINVKRKSLLPPFPNYPITGKEAFKNLLFTVYATFGRKNFVVGILWDKLIRRELIL 184
Query	181	KNNIRVNDVILEDIVFMIHAFKADKVSFVNYYFYTNFQRMGRASSISVISKINSSLKV 240
		KNNIR +V+ EDIVF++ FLKA KVSFVNYYFYTNFQRMG SSSISV+ K SL
Sbjct	185	KNNIRQQNVVFEDIVFVMQIFLKASKVSFVNYYFYTNFQRMGSMSSSISVLHKSLSLNT 244
Query	241	VENFLKEEGLFEKYFEYKFFYLQLYYYISFKQIYIINWHIKDRLIYKAHKEKLISVLNE 300
		+E LK EG+F + YKKE+LQ YY+ISFKQIYII+W+I D+L+Y+A+KEKLISVL+E
Sbjct	245	METLLKREGIFNECQNLKFKFLQFYFYISFKQIYIISWNISDKLVYRAYKEKLISVLDE 304
Query	301	VQNSKEFQSYASLKGSRFSELQILPKIMLKIWNFSSGLVNFSSIFIFYSFLKN 354
		++ EFQ Y K F+E+QILP+IMLKIWNFSS LYVNFSSIFIFY+ F+KN
Sbjct	305	IKGLSEFQDCYEAKSFGFNEIQILPRIMLKIWNFSSRLYVNFSSIFIFYKFIKN 358

Abbildung 4.7: Alignment der Proteinsequenzen von Bb0572 und Bh0572.

Auf Proteinebene konnte eine Identität von 69% und eine Ähnlichkeit von 85% nach Alignment der AS-Sequenzen von Bh0572 (Uniprot: B2S0S3) und Bb0572 (O51519) nachgewiesen werden.

## Anhang

### Anhang 6. Nukleotidsequenzen des nativen und des synthetischen Gens von *Bh0572*.

<b><u>Nativ:</u></b>					
1	<b>atg</b> tataagt	acaaggtctc	tgtgattatt	tgttttttta	attctgatag
51	tacccttgaa	gtgattataa	aaaatgctgt	taatcaaaca	ttaagagata
101	aagaaattat	attgggtgaat	gatggttcct	atgataatag	cttgaagata
151	gctcagaaat	atgctgataa	gtatgatttt	gttaaaatta	ttaatcagaa
201	aaatatggga	atagctgcct	ctaggaataa	tggacttgaa	aagtctgaag
251	gagaatatat	agtttattgg	gatagtgatg	attctgttga	gaatactatg
301	cttgagggat	tatataatag	ggcaaaggcc	gataattcag	atattgtttg
351	ttctcagttt	tatatttact	ttcttgcaaa	aaatattaaa	aggagatctg
401	cgcttccttt	tccaaattat	ccaataactg	gagaagaagc	ttttaggaat
451	ttattattaa	ctgtttttgc	tagcttttgt	aagagaaatt	ttgttgtggg
501	tacattgtgg	gataaaatga	ttagaagaga	ttaaattata	aagaataata
551	ttagagtaaa	tgatgtaata	ttagaagaca	tagttttcat	gattcatgct
601	tttttgaagg	cagataaggt	ttcttttgta	aataattatt	tttactactaa
651	cttcacgcyg	atggggaggg	ccagttcatc	aattagccta	ataagtaaga
701	ttaattcatc	ccttaaggtt	gtagaaaatt	ttctaagga	agaaggactt
751	tttgagaaat	attttgaata	ttataagaag	ttttatttgc	agctttatta
801	ttatatttct	tttaagcaga	tttatattat	aaattggcac	attaaggatc
851	gacttattta	taaggcacat	aaagaaaaac	ttatttctgt	tcttaatgaa
901	gttcaaaat	ctaaggagtt	ccaaagttat	tatgcaagtc	ttaagggttc
951	caggtttagt	gagcttcaaa	ttttgcaaaa	aattatgttg	aaaatttggg
1001	attttagttc	gggactttat	gttaattttt	ctatatttat	ttatagatct
1051	tttttaaaaa	at <b>tag</b>			
<b><u>Artifiziell:</u></b>					
1	<b>gctagcggga</b>	<b>tccatgcacc</b>	<b>accaccacca</b>	<b>ccactacgta</b>	<b>gccatggata</b>
51	agtacaaggt	ttcogttatc	atctgtttct	tcaactccga	ctccactttg
101	gaggttatca	tcaagaacgc	tgtaaccag	actttgagag	acaagagat
151	catcttggtt	aacgacggtt	cttacgacaa	ctccttgaag	atcgctcaaa
201	agtacgctga	caagtacgac	ttcgttaaga	tcatcaacca	gaaaaacatg
251	ggatocgctg	cttctagaaa	caacggtttg	gagaagtctg	agggtgagta
301	catcgtttac	tgggattctg	acgactctgt	tgagaacact	atgttggagg
351	tcttgtaaca	cagagctaag	gctgacaact	ccgacatcgt	ttgttcccag
401	ttctacatct	actttttggc	taagaacatc	aagagaagat	ccgctttgcc
451	attccaaaac	tacccaatca	ctgggtgaaga	ggctttcaga	aacttgttgt
501	tgactgtttt	cgcttcattc	tgtaagagaa	atctcgttgt	ttgtactttg
551	tgggacaaga	tgatcagaag	agacttgatt	atcaagaaca	acatcagagt
601	taacgacggt	atcttgagg	acatcgtttt	catgatccac	gctttcttga
651	aggctgacaa	ggtttccttc	gttaacaact	acttctacac	taacttccag
701	agaatgggta	gagcttcttc	ctccatctcc	gttatctcca	agatcaactc
751	ctcattgaag	gttggtgaga	acttcttgaa	agaagagggt	ttgttcgaga
801	agtacttcca	gtactacaag	aagttctact	tcagattgta	ctactacatc
851	tccttcaagc	aaatctacat	catcaactgg	cacatcaagg	acagattgat
901	ctacaaggct	cacaaagaga	agttgatctc	cgttttgaac	gaggttcaga
951	actccaaaga	gttccagctc	tactacgctt	ctttgaaggg	ttctagattc
1001	tccgagttgc	aaatcttgcc	aaagatcatg	ttgaagattt	ggaacttctc
1051	ctccggtctt	tatgttaact	tctccatctt	catctacaga	tcctttttga
1101	agaac <b>taggc</b>	<b>ggccgcgctgc</b>	<b>ac</b>		
<b>g/ctagc</b> - NheI		<b>gg/atcc</b> - BamHI		<b>tac/gta</b> - SnaBI	
<b>cc/atgg</b> - NcoI		<b>gc/ggccgc</b> - NotI		<b>g/tcgac</b> - SalI	
<b>atg</b> - Startcodon		<b>tag</b> - Stoppcodon			
<b>gccatgg</b> - Kozak-Sequenz					
cac cac cac cac cac cac - Polyhistdin-Markierung					

Abbildung 4.8: Native und synthetische Nukleotidsequenz von *Bh0572*.

Die native Nukleotidsequenz kann ebenfalls Genbank (AAX17079.1) entnommen werden. Die synthetische Sequenz wurde von GENEART generiert.



## Anhang 7. Reaktionskits.

Tabelle 4.1: In dieser Arbeit verwendete Reaktionskits.

<b>Verwendungszweck/Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Plasmid-Minipräparation:	
QIAprep <sup>®</sup> Miniprep	QIAGEN GmbH (Hilden, D)
NucleoBond Xtra Midi Plus	MACHEREY-NAGEL (Düren, D)
Aufreinigung von DNA:	
NucleoSpin <sup>®</sup> Extract II	MACHEREY-NAGEL
Gesamt-RNA-Präparation:	
Total RNA Isolation NucleoSpin RNA II	MACHEREY-NAGEL
cDNA-Synthese/Reverse Transkription:	
Cloned AMV First Strand cDNA Synthesis	INVITROGEN (Karlsruhe, D)
(blunt) Klonierung von DNA-Fragmenten:	
pGEM-T Vector System	PROMEGA (Mannheim, D)
pCR 2.1-TOPO TA Cloning	INVITROGEN
Immunodetektion:	
VisGlow Plus Chemiluminescent Substrate, HRP	VISUAL PROTEIN (Taipeh, Taiwan)

## Anhang 8. Verwendete Mikroorganismen.

Tabelle 4.2: Verwendete Organismen und Stämme.

Organismus	Stamm	Herkunft	Form
<i>Borrelia burgdorferi</i>	B31	Ulrike Schulte-Spechtel (Max-Pettikofer-Institut, LMU München, D)	gDNA
<i>Borrelia hermsii</i>	HS1 (tick isolate) #5251 (DSMZ)	Gunthard Stübs <sup>1</sup> (Charite, Berlin, D) G. Stübs	hitze-inaktiv. Zellen hitze-inaktiv. Zellen
<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue <sup>2</sup>	STRATAGENE (tetR) (Heidelberg, D)	Zellen
	C41(DE3)	DNA-CLONING-SERVICE (kanR) (Hamburg, D) Miroux und Walker [232]	Zellen
<i>Fusarium graminearum</i>	8/1	Wilhelm Schäfer (Universität Hamburg, D)	Konidien & gDNA
	PH-1	W. Schäfer	Konidien & gDNA
<i>Pichia pastoris</i>	PPY12 <sup>3</sup>	Yasuyoshi Sakai (Universität Kyoto, JP)	Zellen
	PPY12 $\Delta$ ugt51b1 <sup>4</sup>	Y. Sakai	Zellen
	GS115 <sup>5</sup>	INVITROGEN (Karlsruhe, D)	Zellen
	GS115 $\Delta$ ugt51b1 <sup>6</sup>	Frank Müller (Universität Hamburg, D; [234])	Zellen

<sup>1</sup> urspr. vertrieben von ATCC (Manassas, VA, USA), s. auch [334]

Genotyp: <sup>2</sup> *recA endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F'proAB lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15 Tn10 (tet<sup>R</sup> bzw. kan<sup>R</sup>)]*, <sup>3</sup> *his4, arg*, <sup>4</sup> *his4, arg, ZeoR*, <sup>5</sup> *his4*; <sup>6</sup>: *his4, ZeoR* oder *HIS4, ZeoS*

## Anhang 9. Verwendete Vektoren.

Tabelle 4.3: Verwendete Vektoren.

Vektor	Merkmale	Herkunft
<i>Zwischenklonierungsvektoren:</i>		
pCR 2.1-TOPO	AmpR, KanR, LacZ	INVITROGEN (Karlsruhe, D)
pGEM-T	AmpR, LacZ	PROMEGA (Mannheim, D)
pBluescript-SK+	AmpR, LacZ	AGILENT/STRATAGENE (Böblingen, D)
<i>E. coli</i> -Expressionsvektoren:		
pET24c(+)	KanR	NOVAGEN/MERCK (Darmstadt, D)
pET24d(+)	KanR	NOVAGEN/MERCK
<i>P. pastoris</i> -Expressionsvektoren:		
pGAPz-B	ZeoR, GAP-Prom.	INVITROGEN
pPIC3.5	AmpR, HIS4, AOX-Prom.	INVITROGEN
<i>Fluoreszenzprotein</i> -Vektoren:		
p123-CFP	CFP, AmpR	Matthias Hahn (TU Kaiserslautern, D)
p123-GFP	GFP, AmpR	M. Hahn
<i>Sonstige</i> -Vektoren:		
pET24d(+)-Hp0421	Hp0421, KanR	Anne-Hélène Lebrun (Univ. Hamburg, D; [186])
pGEM-T-Bb0732	Bb0732, AmpR	Thomas F. Meyer (MPI für Infektionsbiologie, Berlin, D)
TOPO-Bb0454	Bb0454, AmpR, KanR	Janosch Hildebrand (Univ. Hamburg, D)
TOPO-Bb0572	Bb0572, AmpR, KanR	J. Hildebrand
TOPO-Bb0767	Bb0767, AmpR, KanR	J. Hildebrand
pMA-PpartBb0572	artBb0572, AmpR	GENEART (Regensburg, D)
pMA-PpartBb0767	artBb0767, AmpR	GENEART
pMA-PpartBh0572	artBh0572, AmpR	GENEART
pCFP-Ugt51b1-FL	P <sub>aox</sub> , CFP, Ugt51B1, AmpR	Yasuyoshi Sakai (Univ. Kyoto, JP)

Merkmale schließen Angaben über den Promotor, den Terminator oder eine vorliegende Resistenzkassette bzw. ein Fluoreszenzprotein mit ein.

LacZ weist auf die Möglichkeit eines Blau-Weiß-Screenings hin.

**Anhang 10.** In dieser Arbeit generierte Konstrukte.

Tabelle 4.4: Generierte Konstrukte.

Konstrukt	Insert	Insert kloniert aus	kloniert über
pGEM-T-P <sub>nat(ugt51b1)</sub>	<i>Ugt51b1</i> -Promotor-codierende Region	(PCR)	-
pPIC3.5-P <sub>nat(ugt51b1)</sub> -Hp0421	<i>Ugt51b1</i> -Promotor- <i>Hp0421</i> -codierende Region	pCFP-ugt51b1-FL	5' AatII-BamHI 3'
pGEM-T-Bb0572	<i>Bb0572</i> -codierende Region	(PCR)	-
pPIC3.5-Bb0572	<i>Bb0572</i> -codierende Region	pGEM-T-Bb0572	5' ZraI-NotI 3'
pPIC3.5-Bb0767	<i>Bb0767</i> -codierende Region	TOPO-Bb0767	5' BamHI-NotI 3'
pGAPzB-Bb0732	<i>Bb0732</i> -codierende Region	pGEM-T-Bb0732	5' SacII-NotI 3'
pET24d(+)-Bb0572	<i>Bb0572</i> -codierende Region	pGEM-T-Bb0572	5' NcoI-BamHI 3'
pET24d(+)-Bb0767	<i>Bb0767</i> -codierende Region	TOPO-Bb0767	5' NcoI-BamHI 3'
pET24c(+)-Bb0732	<i>Bb0732</i> -codierende Region	pGEM-T-Bb0732	5' NdeI-BamHI 3'
pPIC3.5-PpartBb0572 (+His <sub>6</sub> )	<i>Bb0572</i> -codierende Region	pMA-PpartBb0572	5' BamHI/SnaBI-NotI 3'
pPIC3.5-PpartBb0767 (+His <sub>6</sub> )	<i>Bb0767</i> -codierende Region	pMA-PpartBb0767	5' BamHI/SnaBI-NotI 3'
pET24d(+)-PpartBb0572	<i>Bb0572</i> -codierende Region	pMA-PpartBb0572	5' BamHI-NotI 3'
pET24d(+)-PpartBh0572	<i>Bh0572</i> -codierende Region	pMA-PpartBh0572	5' BamHI-NotI 3'
pBS-SK+-ugt51b1-CAT	Part der CAT von <i>Ugt51b1</i>	pCFP-ugt51b1-FL	5' XhoI-XhoI 3'
pBS-SK+-CAT-MutA	Part der <i>Ugt51B1</i> -CAT mit MutA	(SDM-PCR)	-
pBS-SK+-CAT-MutB	Part der <i>Ugt51B1</i> -CAT mit MutB	(SDM-PCR)	-
pBS-SK+-CAT-MutC	Part der <i>Ugt51B1</i> -CAT mit MutC	(SDM-PCR)	-
pCFP-ugt51b1-MutA	Einfügen von MutA Pro>Leu	(SDM-PCR)	-
pCFP-ugt51b1-MutB	Einfügen von MutB Gly>Arg	(SDM-PCR)	-
pCFP-ugt51b1-MutC	Einfügen von MutC Asp>Ala	(SDM-PCR)	-
pET24d(+)-CFP/GFP	CFP- o. GFP-codierende Region	p123-CFP/GFP	5' NcoI-NotI 3'
pPIC3.5-CFP/GFP	CFP- o. GFP-codierende Region	p123-CFP/GFP	5' BamHI-NotI 3'

**Anhang 11.** In dieser Arbeit generierte Stämme.

Alle Konstrukte liegen ebenfalls in *E. coli*-XL1-Blue vor, werden an dieser Stelle jedoch nicht extra aufgelistet! *E. coli*-C41(DE3)-Zellen wurden immer nach Bedarf transformiert.

Tabelle 4.5: Generierte Hefestämme.

Stamm	Eigenschaften	Ausgangsstamm	“Insert”
PpGS115-pPIC3.5	HIS, ZeoR	PpGS115 $\Delta$ <i>ugt51b1</i>	pPIC3.5
PpGS115-Hp0421	HIS, ZeoR	PpGS115 $\Delta$ <i>ugt51b1</i>	pPIC3.5-Hp0421
PpGS115-P <sub><i>ugt51b1</i></sub> -Hp0421	HIS, ZeoR	PpGS115 $\Delta$ <i>ugt51b1</i>	pPIC3.5-P <sub><i>ugt51b1</i></sub> -Hp0421
PpGS115-Bb0572	HIS, ZeoR	PpGS115 $\Delta$ <i>ugt51b1</i>	pPIC3.5-Bb0572
PpGS115-Bb0767	HIS, ZeoR	PpGS115 $\Delta$ <i>ugt51b1</i>	pPIC3.5-Bb0767
PpGS115-Bb0732	HIS, ZeoR	PpGS115 $\Delta$ <i>ugt51b1</i>	pGAPzb-Bb0732
PpGS115-artBb0572 (+His <sub>6</sub> )	HIS, ZeoR	PpGS115 $\Delta$ <i>ugt51b1</i>	pPIC3.5-PpartBb0572
PpGS115-artBb0767 (+His <sub>6</sub> )	HIS, ZeoR	PpGS115 $\Delta$ <i>ugt51b1</i>	pPIC3.5-PpartBb0767
PpGS115-artBh0572 (+His <sub>6</sub> )	HIS, ZeoR	PpGS115 $\Delta$ <i>ugt51b1</i>	pPIC3.5-PpartBh0572
PpPPY12-ugt51b1-MutA	HIS, arg, ZeoR	PpPPY12 $\Delta$ <i>ugt51b1</i>	pCFP-ugt51b1-MutA
PpPPY12-ugt51b1-MutB	HIS, arg, ZeoR	PpPPY12 $\Delta$ <i>ugt51b1</i>	pCFP-ugt51b1-MutB
PpPPY12-ugt51b1-MutC	HIS, arg, ZeoR	PpPPY12 $\Delta$ <i>ugt51b1</i>	pCFP-ugt51b1-MutC
PpPPY12-ugt51b1-FL	HIS, arg, ZeoR	PpPPY12 $\Delta$ <i>ugt51b1</i>	pCFP-ugt51b1-FL

## Anhang 12. Generierte und verwendete Primerpaare.

Tabelle 4.6: Bezeichnung, Sequenz und Produktgrößen von in dieser Arbeit verwendeter Primerpaare.

Name	Sequenz 5'>3'	Verwendung	Produktgröße [bp]
int-AOX1-for int-AOX1-rev	CGCCAATGGTACTGGTCCTC TCGTCCCTCCTCGTCGTAATC	(1)	621
5' AOX 3' AOX	GACTGGTTCCAATTGACAAGC GCAAATGGCATTCTGACATCC	(1)	220 (ohne Insert) 220+x (Insert im <i>Aox</i> -Locus)
Bb0572-BamHI*/NcoI-for Bb0572-BamHI/NotI-rev	GTACGGATCCACCATGGAGGATATTGTGCATAAGTATAAAAGTTTCTG ACGTGGATCCCCTGCGGCGGCATTTTTTATGAAAACTTATAAATAAATATAG	(2)	1084
int-Bb0572-for int-Bb0572-rev	AATATGGGTCTTTCTGCTTCTAGAG AGCCCTATAAACAAGCTTATCAGAG	(1)	666
int-Bb0767-for int-Bb0767-rev	GTATTTCCAGGAATTTCCATCATAAC CCGGCTCTGCTTATTATTAGATTAG	(1)	737
int-Bb0732-for int-Bb0732-rev	TCAGAAATTGTCCCTGTAGTAGATG GCTCTGTCTTCAATGTATCTTATCC	(1)	767
int-PpartBb0572-for int-PpartBb0572-rev	TGATCGACGACGGTTCTTAC TGTCGGAGATGTTCCAAGAG	(1)	738
int-PpartBb0767-for int-PpartBb0767-rev	ACAAGCCACAGTTGATCTAC AGATTTTCGTCCCTCGTCAATG	(1)	648
Bh0572-for Bh0572-rev	GGCCATGTATAAGTACAAGGTCTCTGTGATTATTTG CCGCGGGGCTAATTTTTTAAAAAAGATCTATAAATAAATATAG	(2)	1065
int-Bh0572-for int-Bh0572-rev	ATAGCTGCCTCTAGGAATAATG GACTTGCATAATAACTTTGG	(1)	719
int-PpartBh0572-for int-PpartBh0572-rev	AAGAACGCTGTTAACCAGAC TGTGCCAGTTGATGATGTAG	(1)	771
PpartBb0572-BamHI-for PpartBb0572-NotI-rev	AGCTGGATCCATGGAGGACATTGTTTC TAGCGGCGCGCTTTTTGATGAAGAA	(2)	ca. 1100
PpartBh0572-BamHI-for PpartBh0572-NotI-rev	AGCTGGATCCATGGATAAGTACAAGG TAGCGGCGCGCTTCTTCAAAAAGGA	(2)	ca. 1100

Name	Sequenz 5'>3'	Verwendung	Produktgröße [bp]
int-Hp0421-for int-Hp0421-rev	AGGGCATGTGATGAGAGTGGG CCACGCTAATGGCCTCTAAG	(1)	800
nat(ugt51b1)P-AatII-for nat(ugt51b1)P-BamHI-rev	CCGACGTCCAGTTTCGTCCGATGAGCTA CGGATCCTGGTTAGAGGAAGATAAGAG	(2)	717
pPIC-nat(ugt51b1)-Hp0421-Seq-for pPIC-nat(ugt51b1)-Hp0421-Seq-rev	CATGAGCGGATACATATTG GAAGTGCCATTACTGGTGTC	(3)	-
FgUgt51G3-RT-for FgUgt51G3-RT-rev	CAAGGACGATCCATCCAAAC GTTTCGTCTCTTCCGACAAAC	(4)	503
FgUgt54A2-RT-for FgUgt54A2-RT-rev	TTCTCAGCAGCGCGATTGTG GCTCCTTCTCTAGCCCTTTC	(4)	472
FgUgt54C2-RT-for FgUgt54C2-RT-rev	GAAGCCGCTATGCGTGAAAG CTTCTCTGGGCGGTAGTGAC	(4)	331
FgUgt54E5-RT-for FgUgt54E5-RT-rev	TTGGCGATGTCTTCAAGACC TACATCGACACGCTGTTTCC	(4)	446
FgUgt54E6-RT-for FgUgt54E6-RT-rev	GCAGTCGCGATTCATCTGAG CGACAATTCCGTGCGCAAAG	(4)	372
FgUgt54E7-RT-for FgUgt54E7-RT-rev	GGATCGCAGACTTCTGTAGG GATAAGCGAGCAACCCAAAC	(4)	373
FgUgt54F2-RT-for FgUgt54F2-RT-rev	GGAGAAGCAGCGTGGTATCG CTGGCGCGGTCAATCTATCC	(4)	332
FgUgt54H1-RT-for FgUgt54H1-RT-rev	ACTCGCTTGCTGGGAGGATG ATTCTGGCGGTGACCCTGAC	(4)	394
FgUgt54J1-RT-for-1 FgUgt54J1-RT-rev-1 FgUgt54J1-RT-for-2 FgUgt54J1-RT-rev-2	CGACTCAGCAACAGCAAAGG TCGACTCTTTGCGGTCTTAC GCGACTCAGCAACAGCAAAG TGAATGCTCCGCTGAAGTCC	(4) (4) (4)	553 397
Fg-Beta-Tub-for Fg-Beta-Tub-rev	TGCTGTTCTGGTCGATCTTG GACGGAAGTTTGGACGTTG	(4)	873
int-PpUgt51CAT-for int-PpUgt51CAT-rev	AACGAAAGCCGGGATGATTG CAGCTCGAGACTAGTGATTG	(1)	1628

Name	Sequenz 5'>3'	Verwendung	Produktgröße [bp]
int-PpUgt51CAT-for-2 int-PpUgt51CAT-rev-2	TTTCCCGGCACAAACACAAC ACGCTGTCGTCGCTAATATC	(1)	1719
MutA-Pro>Leu-for MutA-Pro>Leu-rev	P-TGCTTTTACAATGc <sub>t</sub> ATGGACACGAACTA P-CGGAAATAGGGAATTTGTAAC <sub>t</sub> TTCTCT	(5)	10147
MutB-Gly2>Arg-for MutB-Gly2>Arg-rev	P-CCGTTTCATCATGGT <sub>a</sub> GATCTGGAACAACA P-ACGCGTCGATTTTGCCAAACAACC	(5)	10147
MutC-Asp>Ala-for MutC-Asp>Ala-rev	P-ACCATTTTTTTGGAG <sub>c</sub> TCAATTCTTTTATG P-TTGATGATGGTGGGGATTCCAG	(5)	10147
pCFP-ugt51b1-500-for	GGGCACAAGCTGGAGTACAA	(3)	-
pCFP-ugt51b1-1000-for	CCAAGTCGCTGGCTACCAT	(3)	-
pCFP-ugt51b1-1500-for	CCTTCAAGGTCACATCTACAT	(3)	-
pCFP-ugt51b1-2000-for	CAACAACGGAGACCAGGTTCTA	(3)	-
pCFP-ugt51b1-2500-for	CCCCTATGCATTACAACAATCA	(3)	-
pCFP-ugt51b1-3000-for	CGACGCAAGACTCAGGTATTT	(3)	-
pCFP-ugt51b1-3500-for	GACACGAACTAGAGCGTATCC	(3)	-
pPIC3.5-CFP/GFP-Seq-for	GCGACTGGTTCCAATTGACAAG	(3)	-
pPIC3.5-CFP/GFP-Seq-rev	GTGCCCAACTTGAAC <sub>t</sub> TGAGG	(3)	-
pET24d-CFP/GFP-Seq-for	TTGTGAGCGGATAACAATTC	(3)	-
pET24d-CFP/GFP-Seq-rev	TTCCTTTCGGGCTTTGTTAG	(3)	-

\* Bei der Primersynthese wurde die BamHI-Schnittstelle zerstört!

Für Primer mit hohem AT-Anteil wurde die Annealing-Temperatur in der PCR auf 50°C gesenkt und das Anlagern für 45 sek durchgeführt.

(1): *Screening*-Primer, (2): Amplifikationsprimer, (3): Sequenzierungsprimer, (4): RT-Primer, (5): Mutagenese-Primer



# Publikationsliste

## Teile der vorliegenden Arbeit gingen in die folgende Publikation ein:

The functions of steryl glycosides come to those who wait: Recent advances in plants, fungi, bacteria and animals.

Grille S., Zaslowski A., Thiele S., Plat J., Warnecke D.

Prog Lipid Res. 49(3):262-288, July 2010 (accepted Feb 2010)

## Konferenz- bzw. Kolloquiumsteilnahmen und -beiträge:

1. SFB470-Meeting (10.11.2006, Borstel)

Vortrag: S. Grille, Functions of Glycolipids in Plants, Fungi and Bacteria.

2. 125 Jahre Deutsche Botanische Gesellschaft, Botanikertagung (03.-07.09.2007, Hamburg)

3. 8th VAAM Symposium "Molecular Biology of Fungi" (23.-26.09.2007, Hamburg)

4. 12th International Congress of Yeasts (11.-15.08.2008, Kiew, Ukraine)

Kurzvortrag: S. Grille, Functions of sterol glycosides in the degradation of peroxisomes in *Pichia pastoris*.

Posterpräsentation: S. Grille and D. Warnecke, Functions of sterol glycosides in the degradation of peroxisomes in *Pichia pastoris*.

5. Yeast Lipid Conference (21.-23.05.2009, Berlin)

Posterpräsentation: S. Grille and D. Warnecke, Functions of sterol glycosides in the degradation of peroxisomes in *Pichia pastoris*.

6. SFB470-Abschlusskolloquium (28.-29.05.2009, Hamburg)

Posterpräsentation: S. Grille and D. Warnecke, Functions of sterol glycosides in the degradation of peroxisomes in *Pichia pastoris*.

7. Hausinternes Kolloquium BZ Klein-Flottbek (16.09.2009, Hamburg)

Vortrag: S. Grille, Glycolipids are required for autophagy in yeasts & filamentous fungi.

8. Autophagy-EMBO Conference Series (18.-22.10.2009, Ascona, Schweiz)

Posterpräsentation: S. Grille, M. Oku, Y. Sakai and D. Warnecke, Ergosteryl  $\beta$ -glucosides are required for micropexophagy in *Pichia pastoris*.

# Beteiligungen an dieser Arbeit

## Im Rahmen des UGT51B1-SDM-Projektes:

1. Masahide Oku und Yasuyoshi Sakai (Kollaboration; Universität Kyoto, JP):
  - Überlassung des *P. pastoris*-Stammes PPY12 $\Delta$ *ugt51b1* und des Expressionskonstruktes pCFP-ugt51b1-FL sowie des Anti-AOX1-Antiserums
  - Ausführung der fluoreszenzmikroskopischen Analysen
2. Elke Woelken (Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg, D):
  - Unterstützung bei den TEM-Analysen

## Im Rahmen des *B. burgdorferi* bzw. *B. hermsii*-Projektes:

1. Jessica van Lengerich (DAAD-RISE-Studentin, University of Minneapolis, USA):
  - Klonierung und Expression der nativen *B. burgdorferi*-Kandidatengene
2. Daniel Maag (Projekt-Student, Universität Würzburg, D):
  - Expression der synthetischen Gene der Kandidaten Bb0572 und Bh0572 in *E. coli*
  - (Erzeugung der GALE-überexprimierenden Ppart*Bb0572*-*P. pastoris*-Stämme sowie der Hybridkonstrukte aus Bb0572 und Bh0572 und entsprechender Transformanten zur Identifizierung der Zuckerbindestelle)
3. Thomas Koop (Auszubildender zum Chemielaboranten, Universität Hamburg, D):
  - Isolierung der SGs nach Expression der Borrelien-Gene in *P. pastoris*
4. Olga Topko (TA-Schülerin, Staatliche Gewerbeschule 13, Hamburg, D):
  - Weiterführung der Isolierung der SGs nach Expression der Borrelien-Gene in *P. pastoris*
  - (IMAC-Aufreinigung von Bb0572p und Bh0572p zur Verbesserung der Charakterisierungsstudien)
5. Prof. Dr. Ulrich Zählinger und Mitarbeiter (Forschungszentrum Borstel, D):
  - Durchführung der NMR- und MS-Analysen sowie die Interpretation der jeweiligen Spektren

## Beteiligungen an der Identifizierung von SGT-Genen aus *F. graminearum*:

- Anna Zaslowski (Universität Hamburg, D):
- Fortsetzung der Identifizierung der  $\beta$ -SGTs aus *F. graminearum* im Rahmen ihrer Diplomarbeit

## An allen Projekten beteiligt gewesen:

1. Wiebke Hellmeyer (Technische Angestellte, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg, D)
  - Unterstützung bei Klonierungen, Lipidanalysen, radioaktiven Enzymassays, Isolierung von SG für NMR- und MS-Analysen etc.
2. Praktikanten im Rahmen des Blockpraktikums "Molekularbiologie und Biochemie pflanzlicher und pilzlicher Lipide"
  - Generation von diversen Konstrukten, Erzeugung von Transformanten mit beginnender Analyse

ANMERKUNGEN: In () dargestellte Beteiligungen bzw. Versuche sind im Ausblick dargestellt und werden zur Zeit noch fortgesetzt.

**Bei allen Beteiligten möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bedanken!**

# Danksagung

Bei PD Dr. Dirk Warnecke möchte ich mich herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Vergabe eines Promotionsthemas bedanken, welches mich in die Welt der Sterylglycoside und der Peroxisomendegradation entführte. Ebenfalls möchte ich mich für seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. Dr. Peter Dörmann möchte ich herzlich für die Begutachtung meiner Arbeit danken.

Für die Bereitstellung von Gerätschaften, Materialien sowie Hilfestellung bei methodischen und jeglichen anderen aufgetretenen Problemen möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Gruppe von PD Dr. Sabine Lüthje (Claudia Meisrimler und Liljana Menckhoff) und der Gruppe von Herrn Prof. Wilhelm Schäfer (insbesondere Peter Ilgen, Cathrin Kröger und Birgit Hadel) bedanken.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Warnecke danke ich von ganzen Herzen für die schöne Zeit. Allen voran Anna Zaslowski, Swantje Thiele und Wiebke Hellmeyer. Ich danke Euch Mädels sehr für die schöne Zeit, inklusive der vielen Kaffeestunden, in denen nicht nur über die alltäglichen Probleme mit Methoden und der Interpretation von Resultaten "getratscht" wurde ;-). DANKE für Eure immerwährende Unterstützung und Freundschaft :) Auch möchte ich mich sehr gerne bei Simone Zäuner bedanken, die uns schon vor einem Jahr gen USA verlassen hat. Lange Zeit durfte ich mir mit ihr ein Büro und damit auch die Leiden des Doktorandendaseins teilen. Sie war zur Stelle als ich meine ersten "Gehversuche" im Hamburger Labor unternommen habe. DANKE dir!

Ebenfalls nicht vergessen für die schöne Zeit zu danken möchte ich Tobias Wobbe (besonders für geteiltes Leid während der Zusammenschreibung), Denise Reck, Jessica van Lengerich und Daniel Maag.

Ein ganz großes DANKE SCHÖN geht ebenfalls an Hartwig Lüthen, Sabine Lüthje und alle anderen Mitarbeiter der ehemaligen Bö-Gruppe. Sowie eine Etage tiefer an Peter Ilgen und Cathrin Kröger, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und um die Stockwerke zu vervollständigen, noch einen herzlichen Dank in den dritten Stock zu Nele Ilmberger, besonders wenn die Gel-Doku mal wieder streikte! Letzteren danke ich auch für schöne Stunden in der schönsten Stadt der Welt auch außerhalb des Instituts :)

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich bei Swantje, Anna und Wiebke bedanken, die trotz widriger Umstände (eigene Promotion, von Stavanger aus und fehlendem PC-Angebot oder einfach nebenbei) ganz viel Zeit zum Kommentieren gefunden haben.... DANKE SCHÖN!!!!

Überhaupt für die schöne Zeit und die immerwährende Unterstützung, ob vor Ort oder von weiter her möchte ich mich bedanken bei: Peter Ilgen, Sabrina Grüner, Sabine Kunz, Alexandra Pardow, Swantje Thiele, Anna Zaslowski, Wiebke Hellmeyer, Nele Ilmberger, Manti Schwarzkopf, Janine Diwo, Sara Mazzotta, Anja Schöffler und vielen vielen mehr....

Ganz besonders DANKE sagen möchte ich meinem Vater, der mich soweit er konnte, immer in meinen Vorhaben unterstützte und ohne den schon das Studium nicht möglich gewesen wäre. DANKE für die Unterstützung, die weit über die letzten 3,5 Jahre hinaus ging! DANKE DANKE DANKE!!!