

Biosynthese von Glycosphingolipiden in *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.-Ing. (FH) Tobias Wobbe
aus Starnberg**

Hamburg, 2010

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Priv.-Doz. Dr. D. WARNECKE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. I. FEUSSNER
Tag der Disputation: 13. August 2010

Hamburg, den 29. Juli 2010



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

Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Departments Biologie

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
ZUSAMMENFASSUNG	7
ABKÜRZUNGEN	9
1 EINLEITUNG	12
1.1 Struktur und Biosynthese von Sphingolipiden.....	15
1.2 Lipidomik.....	29
1.3 Biologische Funktionen von Sphingolipiden.....	35
1.4 <i>Pichia pastoris</i> als Modellorganismus	41
1.5 Ziele dieser Arbeit.....	42
2 ERGEBNISSE	44
2.1 Charakterisierung der Ceramidsynthasen aus <i>Pichia pastoris</i>	44
2.2 Ceramid- und GlcCer-Analyse von verschiedenen <i>P. pastoris</i> -Mutanten...	52
2.3 Analyse der GIPC	81
3 DISKUSSION	83
3.1 Bar1 ist für die Bildung von GlcCer-typischen Ceramiden verantwortlich .	83
3.2 $\Delta 4$ -Desaturierung und α -Hydroxylierung sind essentiell für die Biosynthese von GlcCer	88
3.3 Synthese von GlcCer mit verändertem Ceramidgrundgerüst durch die Überexpression der Gcs in <i>P. pastoris</i>	91
3.4 Führt die Überexpression der GCS in GlcCer-freien Mutanten zur Wiederherstellung der GlcCer-Biosynthese?.....	93
3.5 Modell für die GSL-Synthese in <i>Pichia pastoris</i>	96
3.6 Aussagekraft der analytischen Daten.....	99
3.7 Funktionen von Sphingolipiden in <i>Pichia pastoris</i>	103
4 AUSBLICK	107
5 MATERIALIEN UND METHODEN	110
5.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien (Kits)	110
5.2 Geräte	111
5.3 Verwendete Organismen und Stämme	112
5.4 Vektoren.....	112

5.5	Molekularbiologische Methoden	112
5.6	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	120
5.7	Arbeiten mit <i>Pichia pastoris</i>	124
5.8	Lipidanalytik	127
LITERATURVERZEICHNIS		134
ANHANG		145
PUBLIKATIONSLISTE.....		146
DANKSAGUNG		147

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Klassifizierung von Lipiden nach ihrem Grundbaustein	13
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung einer Membranmikrodomäne	14
Abbildung 1-3: Strukturen einiger repräsentativer Sphingolipidkomponenten.	16
Abbildung 1-4: Glycosylceramid-Strukturen von Pilzen, Pflanzen und Säugern	22
Abbildung 1-5: Beispiele für komplexe Glycosphingolipide.....	24
Abbildung 1-6: Nicht-glycosylierte Sphingolipide.	25
Abbildung 1-7: Verteilung von Membranlipiden.....	26
Abbildung 1-8: Eingliederung und Aufgaben der Lipidomik im wissenschaftlichen Kontext.....	30
Abbildung 1-10: Schematische Darstellung eines Flugzeit-Analysators.....	33
Abbildung 1-11: Überblick über die Rolle von Sphingolipiden	36
Abbildung 1-12: Strukturvergleich der Defensine aus Pflanzen, Invertebraten und Vertebraten	40
Abbildung 1-13: Strukturen der GSL in <i>Pichia pastoris</i>	43
Abbildung 2-1: Sequenzvergleich verschiedener Ceramidsynthasen.....	45
Abbildung 2-2: Dünnschichtchromatographische Analyse der Lipidfraktionen des bar1-KO-Stamms.	47
Abbildung 2-3: LCB- und FA-Komposition in Sphingolipiden aus verschiedenen Proben von <i>Pichia pastoris</i> Wildtyp.....	55
Abbildung 2-4: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Glycolipidfraktionen aller analysierten Stämme	57
Abbildung 2-5: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus <i>P. pastoris</i> WT	62
Abbildung 2-6: LCB- und FA-Komposition in Sphingolipiden aus verschiedenen Proben von <i>Pichia pastoris</i> bar1-KO.....	63
Abbildung 2-7: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus <i>P. pastoris</i> bar1-KO	64
Abbildung 2-8: LCB- und FA-Komposition in Sphingolipiden aus verschiedenen Proben..... von <i>Pichia pastoris</i> gcs-KO	65
Abbildung 2-9: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus <i>P. pastoris</i> gcs-KO	66
Abbildung 2-10: LCB- und FA-Komposition in Sphingolipiden aus verschiedenen Proben von <i>Pichia pastoris</i> C9-m-KO	67
Abbildung 2-11: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus <i>P. pastoris</i> C9-m-KO.....	68
Abbildung 2-12: LCB- und FA-Komposition in Sphingolipiden aus verschiedenen Proben von <i>Pichia pastoris</i> Δ 8-KO.....	69
Abbildung 2-13: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus <i>P. pastoris</i> Δ 8-KO.	70
Abbildung 2-14: LCB- und FA-Komposition in Sphingolipiden aus verschiedenen Proben von <i>Pichia pastoris</i> Δ 4-KO.....	71
Abbildung 2-15: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus <i>P. pastoris</i> Δ 4-KO.	72

Abbildung 2-16: LCB- und FA-Komposition in Sphingolipiden aus verschiedenen Proben von <i>Pichia pastoris</i> scs7-KO.....	73
Abbildung 2-17: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus <i>P. pastoris</i> scs7-KO.....	74
Abbildung 2-18: LCB- und FA-Komposition in Sphingolipiden aus verschiedenen Proben von <i>Pichia pastoris</i> gcs-KO-GCS.....	75
Abbildung 2-19: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus <i>P. pastoris</i> gcs-KO-GCS.....	76
Abbildung 2-20: LCB- und FA-Komposition in Sphingolipiden aus verschiedenen Proben von <i>Pichia pastoris</i> Δ 4-KO-GCS.....	77
Abbildung 2-21: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus <i>P. pastoris</i> Δ 4-KO-GCS.....	78
Abbildung 2-22: LCB- und FA-Komposition in Sphingolipiden aus verschiedenen Proben von <i>Pichia pastoris</i> scs7-KO-GCS.....	79
Abbildung 2-23: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus <i>P. pastoris</i> scs7-KO-GCS.....	80
Abbildung 2-24: Verteilung der Ceramide aus den GIPCs in verschiedenen Stämmen.....	82
Abbildung 3-1: <i>Pichia pastoris</i> synthetisiert zwei unabhängige Ceramidpools.....	84
Abbildung 3-2: Präferenz von Bar1 bezüglich der Kettenlänge der Fettsäure.....	86
Abbildung 3-3: Ceramidsynthese durch Bar1 aus verschiedenen Sphingobasen.....	87
Abbildung 3-4: Zusammensetzung der Ceramide und der GlcCer nach Deletion der LCB-modifizierenden Enzyme.....	88
Abbildung 3-5: Ceramid- und GlcCer-Komposition in scs7-KO.....	90
Abbildung 3-6: Ceramide und GlcCer bei Überexpression der GCS.....	92
Abbildung 3-7 Überexpression der Gcs im Δ 4-KO-Stamm und im scs7-KO-Stamm.....	95
Abbildung 3-8: Hypothetischer Biosyntheseweg von GSL in <i>Pichia pastoris</i>	98
Abbildung 3-9: Überblick über die synthetisierte Sphingolipidmenge in verschiedenen <i>P. pastoris</i> -Mutanten.....	101
Abbildung 5-1 Schematische Darstellung der homologen Rekombination.....	119

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Substratspezifität verschiedener Ceramidsynthasen.....	18
Tabelle 2: Übersicht über die im Folgenden untersuchten Stämme.....	52
Tabelle 3: Sensitivität der verschiedenen <i>Pichia</i> -Mutanten gegenüber RsAFP2.....	105

Zusammenfassung

Sphingolipide sind eine Gruppe von Lipiden, die in Biomembranen aller Eukaryoten und mancher Prokaryoten vorkommen. Ihren hydrophoben Kern bildet das Ceramid, bestehend aus einer Sphingobase und einer amidgebundenen Fettsäure. Die hydrophile Kopfgruppe ist oftmals aus verschiedenen Zuckern aufgebaut (Glycosphingolipide). Sie sind Bestandteile spezieller Membranbereiche, den Membranmikrodomänen („*Lipid-rafts*“). Darüberhinaus nehmen Sphingolipide in verschiedenen zellbiologischen Abläufen Funktionen von Signalmolekülen ein.

Nahezu alle eukaryoten Lebewesen synthetisieren verschiedene Klassen von Sphingolipiden, die über distinkte Strukturmerkmale charakterisiert sind. Ziel dieser Arbeit war es aufzuklären, wie die Hefe *Pichia pastoris* zwei unterschiedliche Sphingolipid-Klassen synthetisiert: Glucosylceramid (GlcCer) bestehend aus der Sphingobase 9-Methylsphinga-4,8-dienin und der Fettsäure 2-Hydroxyoctadecansäure als Ceramidgrundgerüst und einer Glucose-kopfgruppe. Die andere Klasse ist Inositolphosphorylceramid (IPC) mit der Sphingobase 4-Hydroxysphinganin verknüpft mit einer 2-Hydroxytetracosansäure und einer Inositolphosphat-Kopfgruppe.

Im ersten Schritt gelang es zu bestimmen, wie die unterschiedlichen Ceramidgrundgerüste separat voneinander synthetisiert werden: *P. pastoris* besitzt zwei Gene für Ceramidsynthasen, *BAR1* und *LAG1*. Durch die Deletion von *Bar1* und anschließende Enzymassays konnte nachgewiesen werden, dass dieses Enzym für die Herstellung der Glucosylceramid-typischen Ceramide verantwortlich ist. Dieses wird durch Substratspezifität für die jeweilige Sphingobase und Fettsäure erreicht. Die Vermutung, dass *Lag1* die IPC-typischen Ceramide synthetisiert, konnte nicht bestätigt werden. Versuche zur Charakterisierung dieses Enzyms deuten darauf hin, dass die Synthese von Inositolphosphorylceramid essentiell für das Wachstum von *P. pastoris* ist.

Im zweiten Schritt sollte festgestellt werden, wie die Umsetzung der unterschiedlichen Ceramide zu den Endprodukten reguliert wird. Hierfür wurde über verschiedene analytische Methoden (HPLC, GC, LC-TOF) die Struktur der gebildeten Sphingolipide in verschiedenen *P. pastoris*-Stämmen bestimmt. In den untersuchten Stämmen war jeweils ein Gen des GlcCer-Biosynthesewegs deletiert: Ceramidsynthase *BAR1*, Fettsäure- α -Hydroxylase (SCS7), Sphingolipid- Δ 4-Desaturase, Sphingolipid- Δ 8-Desaturase, Sphingolipid-C9-Methyltransferase oder Glucosylceramidsynthase (*GCS*).

Es konnte gezeigt werden, dass die Δ 4-Desaturierung der Sphingobase und die α -Hydroxylierung der Fettsäure essentiell für die Bildung von GlcCer sind. Ceramide können auch ohne diese Modifikationen gebildet werden, werden aber nicht zu GlcCer umgesetzt.

Die Analyse von Mutanten, in welchen die Glucosylceramidsynthase überexprimiert wurde, zeigt, dass dieses Enzym substratspezifisch für Δ^4 -desaturierte und α -hydroxylierte Ceramide ist.

Zusätzlich zu diesem Effekt konnte noch ein weiterer Mechanismus für die getrennte Synthese von Glucosylceramid und Inositolphosphorylceramid ausgemacht werden. Bei Überexpression der Gcs werden auch die IPC-typischen Ceramide zu GlcCer umgesetzt. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Gcs nicht spezifisch für die Kettenlänge der Fettsäure ist und zudem nicht zwischen C4-Hydroxylierung und C4-Doppelbindung der Sphingobase unterscheidet. Die getrennte Synthese von GlcCer und IPC wird also nicht durch die Spezifität der Glucosylceramidsynthase für die Ceramidstruktur erreicht. Die Ergebnisse deuten viel mehr darauf hin, dass die Umsetzung der verschiedenen Ceramide zu GlcCer respektive IPC über eine räumliche Trennung der Enzyme (Gcs und IPC-Synthase) geregelt wird. Hierbei wären die Gcs und die IPC-Synthase an verschiedenen Orten in der Zelle lokalisiert und bekämen jeweils nur die entsprechenden Ceramide zugeführt (GlcCer-typische zur Gcs und IPC-typische zur IPC-Synthase). Für dieses Modell ist ein spezifischer Transport der Ceramide zu diesen Enzymen notwendig. Als mögliche Strukturmerkmale, die einen spezifischen Transport der Ceramide regulieren, wurden die Kettenlänge der Fettsäure und/oder die Δ^4 -Desaturierung der Sphingobase sowie α -Hydroxylierung der Fettsäure ausgemacht.

Abkürzungen

A	Adenin
A ₂₆₀ , A ₂₈₀ , A ₃₂₀	Absorption bei 260, 280 und 320 nm
Abs.	absolut
Amp ^K	Ampicillin-Resistenz
AMP	Antimikrobielles Peptid
ANS	Anilinnaphthalinsulfonsäure
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSTFA	N,O-bis(Trimethylsilyl)trifluoracetamid
C	Cytosin
CERT	Ceramid-Transfer-Protein
CHO	Chinese hamster ovary
<i>cis</i>	auf gleicher Seite zur Bezugsebene
ClonNat ^R	Nourseothrecin-Resistenz
C/M	Chloroform/Methanol-Gemisch
CoA	Coenzym A
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribo nucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNP	Dinitrophenol
dNTP-Mix	Desoxyribonukleosidtriphosphat (Mix aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESI	<i>Electrospray ionisation</i>
EtOH	Ethanol
FA	<i>Fatty acid</i> (Fettsäure)
FAMES	<i>fatty acid methyl esters</i> (Fettsäuremethylester)
FID	Flammenionisationsdetektor
G	Guanin
g	Gramm; Erdbeschleunigung
Gal	Galactose
GalCer	Galactosylceramid
GC	Gaschromatographie
GCS	Gen der Glucosylceramidsynthase
GIPC	Glycosylinositolphosphorylceramid
Glc	Glucose
GlcCer	Glucosylceramid
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSL	Glycosphingolipid
His	Histidin
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IPC	Inositolphosphorylceramid
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
Kb	Kilobasenpaare
KDO	2-Keto-3-Desoxy-Octonat
konz.	konzentriert
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LCB	<i>Long chain base</i> (langkettige Sphingobase)
LCFA	<i>Long chain fatty acid</i> (langkettige Fettsäure, C ₁₄ -C ₁₈)
LTP	<i>Lipid transport protein</i>
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionisation</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i> (Multiple Klonierungsstelle), <i>membrane contact site</i>
MeOH	Methanol

MIPC	Mannosylinositolphosphorylceramid
M(IP) ₂ C	Mannosyl-(Inositolphosphoryl) ₂ -Ceramid
MS	Massenspektrometrie
Mut ⁺	<i>methanol utilization plus</i>
Mut ^S	<i>methanol utilization sensitive</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>Open reading frame</i> (Offener Leserahmen)
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PE	Petrolether; Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
pH	Negativer log ₁₀ der Wasserstoffionenkonzentration (lat. <i>potentia hydrogenii</i>)
PI	Phosphatidylinositol
PM	Plasmamembran
Prom	Promoter
PS	Phosphatidylserin
R _f	<i>retention factor</i> (Retentionsfaktor)
RNA	<i>ribo nucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Sterolester
SG	Sterylglucosid
SL	Sphingolipid
SPT	Serin-Palmitoyl-Transferase
T	Thymin
TAG	Triacylglycerol
TMS-	Trimethylsilyl-
TMSE	Trimethylsilylether
TOF	<i>Time of flight</i> (Flugzeit)
<i>trans</i>	auf verschiedenen Seiten der Bezugsebene
U	Uracil
üN	über Nacht
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>
UV	Ultraviolettes Licht
VLCFA	<i>very long chain fatty acid</i> (sehr langkettige Fettsäure, ≥C ₂₀)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse (engl. <i>weight</i>) pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid
Zeo ^R	Zeocin-Resistenz

Trivialnamen und Abkürzungen der Fettsäuren und Sphingobasen

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

C₁₆- und C₁₈-Fettsäuren (mit 0-3 Doppelbindungen) wurden mit ihren Trivialnamen (z.B. Palmitinsäure statt Hexadecansäure und Stearinsäure statt Octadecansäure) bezeichnet. Die verwendeten Bezeichnungen der 2-Hydroxyfettsäuren leiten sich jedoch von der Kettenlänge und nicht vom Trivialnamen ab (also 2-Hydroxyoctadecansäure, nicht 2-Hydroxystearinsäure). Außerdem wurden Kurzformen verwendet: Die Zahl vor dem Doppelpunkt steht für die Kettenlänge, die zweite Zahl gibt die Anzahl der Doppelbindungen

an. Abkürzungen für Sphingobasen werden wie für die Fettsäuren beschrieben gebildet, wobei ein vorangestelltes „d“ oder „t“ für die Anzahl der Hydroxygruppen (zwei oder drei) steht. Die nachstehende Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der verwendeten Bezeichnungen. Ceramide werden in folgender Weise dargestellt: Der erste Ausdruck steht für die Sphingobase und der zweite für die Fettsäure: Sphingobase/Fettsäure (z.B. d18:2-9m/18:0(2-OH)).

Bezeichnung der Fettsäure/Sphingobase	Trivialname	Kurzform	Anzahl der Doppelbindung(en)
Hexadecansäure	Palmitinsäure	16:0	0
2-Hydroxyhexadecansäure	---	16:0(2-OH)	0
Octadecansäure	Stearinsäure	18:0	0
2-Hydroxyoctadecansäure	---	18:0(2-OH)	0
Tetradecansäure	Lignocerinsäure	24:0	0
2-Hydroxytetracosansäure	---	24:0(2-OH)	0
Hexadecansäure	Cerotinsäure	26:0	0
2-Hydroxyhexacosansäure	---	26:0(2-OH)	0
(2S,3R)-D-erythro-2-aminooctadecan-1,3-diol	Sphinganin (Dihydrosphingosin)	d18:0	0
(2S,3R,4E)-D-erythro-2-aminooctadec-4-en-1,3-diol	Sphing-4-enin	d18:1	1
(2S,3R,4E,8E)-D-erythro-2-aminooctadeca-4,8-dien-1,3-diol	---	d18:2	2
(2S,3R,4E,8E)-D-erythro-2-amino-9-methyloctadeca-4,8-dien-1,3-diol	---	d18:2-9m	2
(2S,3S,4R)-D-ribo-2-aminooctadecan-1,3,4-triol	4-Hydroxysphinganin	t18:0	0

Abkürzungen für Gene und Genprodukte

Soweit möglich wurden Gene und Genprodukte in Anlehnung an die Vorschläge des *genetic nomenclature guide*“ (Stewart, 1995) bezeichnet.

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

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

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

knockout: *gcs-KO*

Proteinen aus *Saccharomyces cerevisiae* wird der Konvention entsprechend ein „p“ angehängt (z.B. *Scs7p*).

Die Regioselektivität von Desaturasen wird durch ein vorangestelltes „Δ“ gekennzeichnet.

Beispiel: Sphingolipid-Δ4(*E*)-Desaturase (Desaturase, die eine *trans*-Doppelbindung zwischen C4 und C5 der Sphingobase einfügt)

1 Einleitung

Eine der Grundvoraussetzungen für die Entstehung von Leben war die Generierung eines geschlossenen Systems, das sich von der Umwelt abgrenzt. In jedem lebenden Organismus ist die Zelle der Grundbaustein, welcher diese Voraussetzung erfüllt. Die Abgrenzung des Zellinneren (Cytoplasma und Organelle) gegen die Außenwelt erfolgt über eine semipermeable Barriere, die Plasmamembran. Sie stellt somit das Grundgerüst der Zelle dar.

Die Plasmamembran erfüllt neben dieser Aufgabe noch viele weitere lebenswichtige Funktionen: Durch in die Membran eingebettete Proteine und Kanäle ist ein selektiver Stoffaustausch mit der Umgebung möglich. Auch Signale, die von der Umwelt oder von benachbarten Zellen kommen, erreichen zuerst die Plasmamembran. Eingebettete Proteine und assoziierte Kohlenhydrate erkennen chemische Botenstoffe oder Strukturen angrenzender Oberflächen und starten eine Signaltransduktionskaskade. Die Signale werden so ins Zellinnere weitergeleitet, und die Zelle kann durch Anpassung des Stoffwechsels und Steuerung der Genexpression auf diese Reize reagieren. Eine weitere wichtige Funktion biologischer Membranen ist die Generierung und Aufrechterhaltung des Membranpotentials. Dies entsteht durch eine Ungleichverteilung von Ionen zwischen Zellinnerem und Äußerem und ist für die Signalverarbeitung/Leitung (Aktionspotentiale in tierischen und pflanzlichen Zellen, Synapsen) und andere lebenswichtige Prozesse (z.B. ATP- Synthese) wichtig.

Neben der Plasmamembran gibt es innerhalb der Zellen noch zahlreiche andere Membransysteme. Der Großteil der Zellorganelle (z.B. ER, Mitochondrien, Chloroplasten) ist ebenfalls über Lipiddoppelschichten von der Umgebung abgegrenzt. Diese Kompartimentierung ist notwendig, um die Vielzahl biochemischer Reaktionen, die in einer Zelle gleichzeitig auftreten, zu ordnen und auf einander abzustimmen.

Die Grundbausteine all dieser biologischen Membranen sind Lipide. Sie lassen sich in zwei große Gruppen aufteilen: Lipide, die aus Fettsäurederivaten hervorgehen (Glycerolipide und Sphingolipide), und solche, die auf einem Isoprenoid-Grundgerüst aufbauen (Abbildung 1-1)

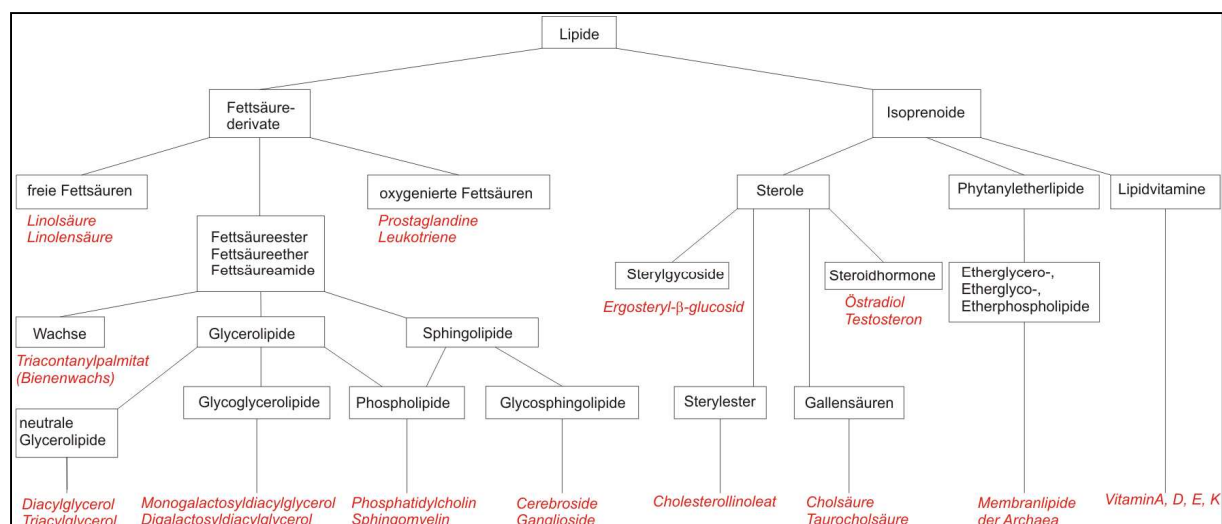


Abbildung 1-1: Klassifizierung von Lipiden nach ihrem Grundbaustein (Fettsäure oder Isoprenoid). Beispiele für die einzelnen Klassen sind kursiv gedruckt und rot markiert [verändert nach[2]]

Das bisher gültige Membranmodell, das „fluid mosaic model“ von Singer und Nicholson [3, 4], wonach die eingelagerten Proteine in einer homogenen Lipiddoppelschicht frei beweglich sind, wurde in den letzten Jahren von einem erweiterten Modell abgelöst: Die Proteindichte in den Membranen ist deutlich höher als ursprünglich angenommen. Die Proteine lagern sich zu Proteinkomplexen zusammen, wodurch ihre Beweglichkeit eingeschränkt wird. Aber nicht nur die Proteinzusammensetzung wurde falsch eingeschätzt, auch die Lipide sind nicht gleichmäßig über die Membran verteilt, sondern lateral und transversal geordnet. In den letzten Jahren wurde die laterale Verteilung der Lipide in biologischen Membranen genauer untersucht. Hierbei ergab sich, dass die Lipide in Clustern, so genannten Membranmikrodomänen („lipid-rafts“) organisiert sind (Abbildung 1-2). Hauptbestandteile dieser Membranmikrodomänen sind Sphingolipide und Sterole, wohingegen Phosphoglycerolipide weitgehend ausgegrenzt sind [5, 6].

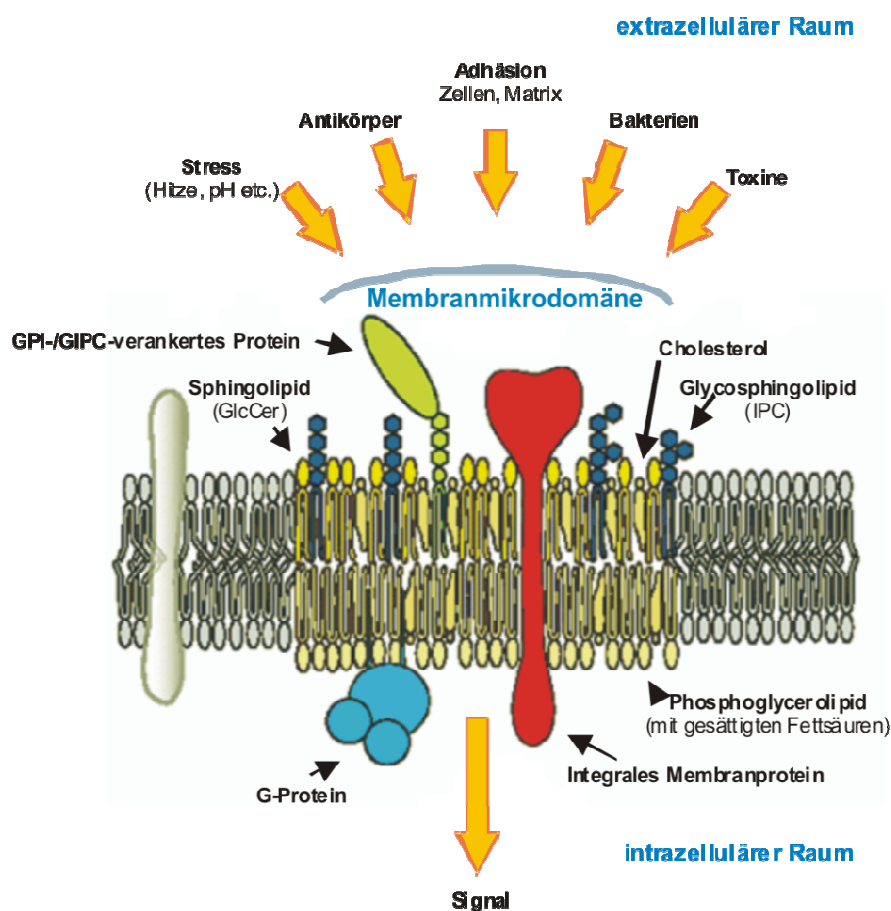


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung einer Membranmikrodomäne [verändert nach [7] und [8]]

Die Membranmikrodomänen sind, anders als es die Bezeichnung *lipid-raft* vermuten lässt, keine starren Gebilde. Man geht davon aus, dass sich die Lipide ständig in die Domänen bewegen und diese auch wieder verlassen [9, 10]. Die Domänen sind auf der Membranoberfläche frei beweglich und können mit anderen Domänen verschmelzen oder kleinere Teile abschnüren.

Der Nachweis der Domänen ist sowohl in natürlichen als auch in künstlichen Membransystemen nicht trivial: Durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen, die bevorzugt mit bestimmten Lipidklassen assoziieren, können die Membrandomänen spektroskopisch sichtbar gemacht werden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Fluoreszenzfarbstoffe auf Grund ihrer eigenen physikalischen Eigenschaften die Membran beeinflussen und somit das Ergebnis verfälschen können. Sterol-Sphingolipid-Domänen sind im Gegensatz zu den Phosphoglycerolipid-Bereichen in nichtionischen Detergenzien (z.B. Triton X-100) bei niedrigen Temperaturen unlöslich. Das unterschiedliche Lösungsverhalten ermöglicht die Trennung der beiden Membrankomponenten. Bestimmte Proteine und Enzymaktivitäten sind nur in der Sterol-Sphingolipid-Fraktion nachweisbar [11, 12]. Auch hier ist es nicht auszuschließen, dass erst durch die Zugabe der Detergenzien die Strukturen in der

Membran entstehen, welche man anschließend nachweist. Zudem ist die Lebensdauer von Membrandomänen begrenzt und liegt im Normalfall deutlich unter der Extraktionszeit, die bei diesen Methoden üblich sind. Dennoch sprechen die Ergebnisse für die Existenz von Bereichen in biologischen Membranen, die eine spezielle Lipidzusammensetzung sowie assoziierte Proteine enthalten.

Typische in den Domänen auftretende Proteine sind über Glycosylphosphatidylinositol (GPI) oder Glycosylinositolphosphorylceramid (GIPC) fest in der Membran verankert. Membranmikrodomänen (bzw. ihre Bestandteile) spielen z.B. eine Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen, der Entstehung einiger Immunkrankheiten, bei der Pathogenabwehr und der Endozytose [13, 14]. Sterolreiche Domänen sind in den Zellspitzen und an Orten, an denen die Zellteilung stattfindet, angereichert, was auf eine Bedeutung für Wachstums- und Differenzierungsprozesse hinweist [15-17].

Die Mechanismen, die der Trennung verschiedener Lipidklassen zugrunde liegen, beruhen zu einem gewissen Teil auf ihren physikalischen Eigenschaften, denn auch künstlich erzeugte Membranen aus nur zwei bis drei Lipidklassen zeigen ein solches Verhalten [18]. Für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Membrandomänen sind in biologischen Membranen auch aktive Transportprozesse nötig. Dies beginnt bei der Synthese beteiligter Lipide und setzt sich über deren Transport innerhalb und zwischen den Membranen fort. Ein kurzer Überblick über die Transportprozesse von Sphingolipiden und ihren Intermediaten folgt in Abschnitt 1.1.4.

1.1 Struktur und Biosynthese von Sphingolipiden

Eine Lipidklasse, die häufig in den eben beschriebenen Membrandomänen vorkommt, sind die Sphingolipide. Im Gegensatz zu Glycerolipiden, deren Grundbaustein der dreiwertige Alkohol Glycerol ist, basieren Sphingolipide auf dem Aminoalkohol 2-Amino-octadecan-1,3-diol, der als Sphingobase (long chain base, LCB) bezeichnet wird.

Den hydrophoben Kern der Sphingolipide bildet das Ceramid, das über zwei lange Kohlenwasserstoffketten in der Membran verankert ist. Das Ceramid besteht aus der Sphingobase und einer langkettigen Fettsäure, die über eine Amidbindung miteinander verknüpft sind. An die C1-Hydroxygruppe des Ceramids ist bei komplexen Sphingolipiden eine polare Kopfgruppe geknüpft. Durch die Kombination verschieden modifizierter Sphingobasen und Fettsäuren sowie die Variation der Kopfgruppen ergeben sich viele verschiedene Sphingolipide, die für jeden Organismus bzw. Zelltyp ein repräsentatives Muster bilden (Abbildung 1-3).

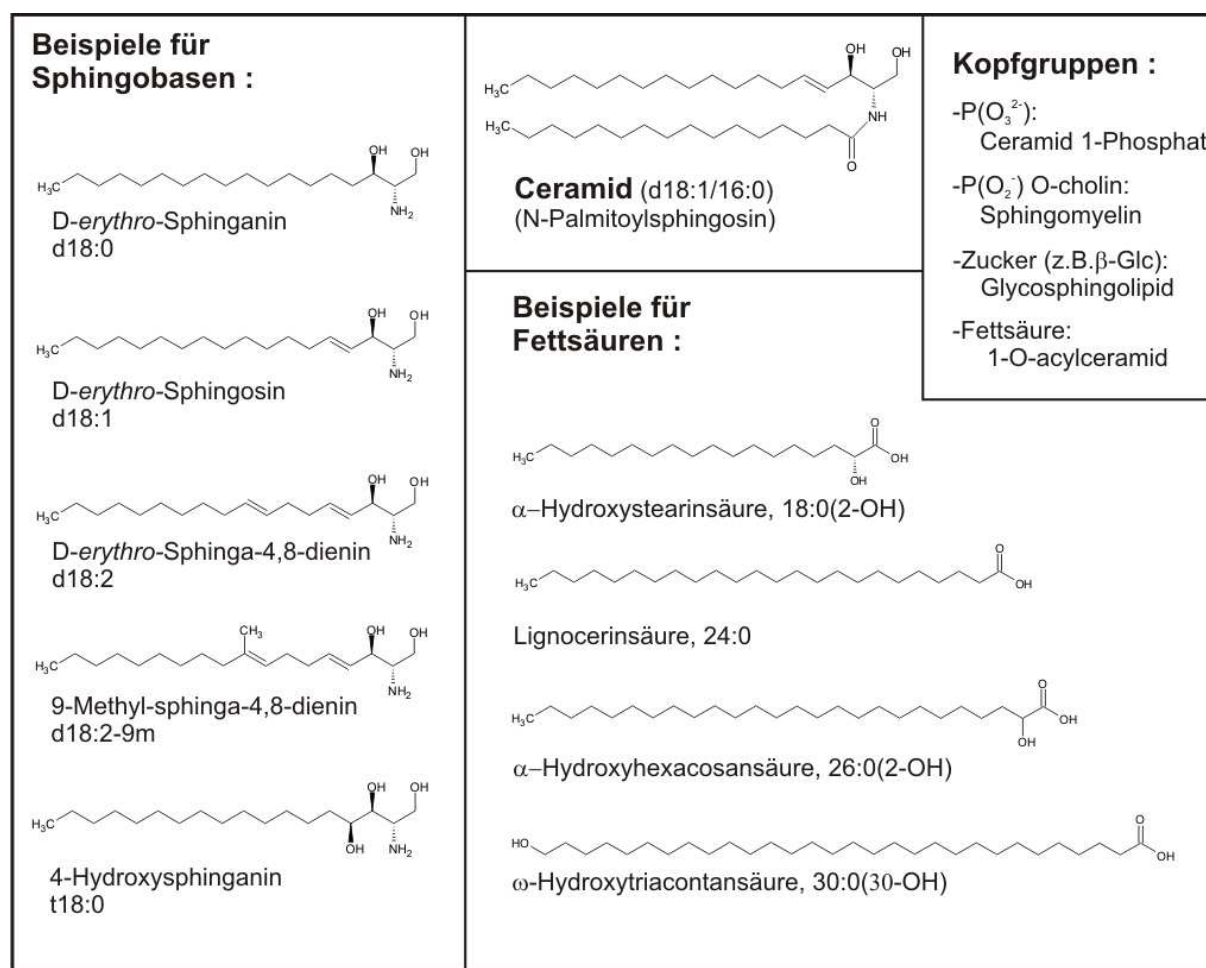


Abbildung 1-3: Strukturen einiger repräsentativer Sphingolipidkomponenten. Eine Sphingobase bildet jeweils verknüpft mit einer Fettsäure das Ceramidgrundgerüst. Durch das Anhängen einer hydrophilen Kopfgruppe entsteht ein amphiphiles Sphingolipid. Glc = Glucose

1.1.1 Ceramide bilden das Grundgerüst der Sphingolipide

Im ersten Schritt der Sphingolipidbiosynthese, der Synthese der Sphingobase, entsteht über die Kondensation der aktivierten Fettsäure Palmitoyl-CoA (C16:0-CoA) und der Aminosäure L-Serin das 3-Ketosphinganine. Diese Reaktion wird durch das Enzym Serin-Palmitoyltransferase (Spt) katalysiert. Die Spt gehört zur Familie der Pyridoxal-5'-phosphat-abhängigen Oxoaminsynthasen (POAS) [19], deren Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum (ER) vermutet wird [20].

Das Produkt wird anschließend vom Enzym 3-Ketosphinganine-Reduktase (3Ksr) unter Verbrauch eines NAD(P)H zur einfachsten Sphingobase D-erythro-Sphinganine (Abbildung 1-3) reduziert. Die 3KSR ist ebenfalls im ER lokalisiert, und ihr aktives Zentrum liegt auf der cytosolischen Seite [21, 22].

Im Ceramid ist die C2-Aminogruppe des Sphinganine über eine Amidbindung mit einer langkettigen Fettsäure verknüpft (Abbildung 1-3). Die Kettenlänge der Fettsäure beträgt

typischerweise 18, 24 oder 26 C-Atome. Die Synthese des Ceramids kann auf drei verschiedenen Wegen erfolgen:

- **Synthese von Ceramid durch Ceramidsynthasen**

Der herkömmliche Weg eines Organismus zur Synthese von Ceramiden ist die direkte Verknüpfung einer Sphingobase mit einer aktivierten Fettsäure. Enzyme, welche diese Reaktion katalysieren, werden Ceramidsynthasen genannt. Sie sind teilweise glycosyliert und im ER lokalisiert [20, 23-25].

Die ersten Gene, die für Ceramidsynthasen codieren, wurden in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert (*LAG1* und *LAC1*) [26, 27]. Lag1p und Lac1p sind sich sehr ähnlich und bilden ein redundantes Paar für die Synthese der Ceramide in *Saccharomyces*. Die Deletion jeweils eines dieser Gene führt zu keiner Veränderung der Lipidkomposition, wohingegen ein Ausschalten beider Gene Mutanten ergibt, die fast kein Ceramid mehr synthetisieren können und im Wachstum stark eingeschränkt sind [26, 28]. In späteren Untersuchungen wurde zudem noch ein relativ kleines Protein, Lip1p, gefunden, das für die Aktivität der beiden Ceramidsynthasen benötigt wird [24]. Die Ceramide in *Saccharomyces*, die durch diese Enzyme synthetisiert werden, sind aus C₂₄-C₂₆-Fettsäuren und der Sphingobase 4-Hydroxysphingonin (t18:0) zusammengesetzt [29]. Im Gegensatz zu *Saccharomyces* wurden in dem filamentösen Pilz *Aspergillus nidulans* zwei Ceramidsynthase-Gene identifiziert, welche eine deutlich geringere Ähnlichkeit zueinander haben als *LAG1* und *LAC1*. Eines davon, *LAGA*, ist homolog zu *LAC1* und *LAG1* aus *S. cerevisiae*, das zweite hingegen, *BARA*, zeigt geringere Sequenzähnlichkeit [30]. Diese beiden Proteine wurden bisher noch nicht auf ihre enzymatische Aktivität hin untersucht. Die Phänotypen von Deletionsmutanten dieser beiden Gene unterscheiden sich. Die Deletion von *BARA* sowie *LAGA* führt zur Bildung von morphologisch veränderten Hyphen, wobei der Effekt bei Ausschalten von *LAGA* deutlich schwerwiegender ausfällt. Die Analyse der Sphingolipidzusammensetzung dieses Pilzes ergab ebenfalls ein anderes Muster als in *S. cerevisiae*, welches auch für die meisten anderen Pilze gilt: *A. nidulans* hat zwei Klassen von komplexen Sphingolipiden mit unterschiedlichen Ceramid-Grundgerüsten [31, 32]: Die eine Klasse ist charakterisiert durch ein t18:0/26:0(2-OH)-Ceramidgrundgerüst mit einer Inositolphosphat-Kopfgruppe (wie in *S. cerevisiae*) und die andere durch ein d18:2-9m/18:0(2-OH)-Grundgerüst verknüpft mit einer Glucoseeinheit.

Die Untersuchung des Genoms von Säugetieren auf homologe Sequenzen zum Lag1-Protein aus *Saccharomyces* ergab eine Familie von sechs Ceramidsynthasen (CerS1 – CerS6, alte Namen LASS1 – LASS6) [33-35]. Nun haben diese Organismen eine deutlich größere Vielfalt von Ceramiden als Pilze, was mit der erhöhten Anzahl von Ceramidsynthasen korreliert. Die Enzyme wurden einzeln in Mausmodellen untersucht und

jeweils ihre Substratspezifität bezüglich der Fettsäure-Kettenlänge bestimmt. Zudem wurde gezeigt, dass die Expression der verschiedenen Gene sowie die Zusammensetzung der Ceramide gewebespezifisch ist [35].

Auch in Pflanzen wurden homologe Gene zu *LAG1* gefunden. In *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* (Reis) wurden drei homologe Gene (LOH1 – LOH3) und in *Lycopersicon esculentum* (Tomate) eines (Asc-1) identifiziert, die für putative Ceramidsynthasen codieren [36].

Die Analyse verschiedener Ceramidsynthasen aus diversen Organismen legt die Vermutung nahe, dass diese Enzyme generell eine Substratspezifität bezüglich der Fettsäure-Kettenlänge haben und somit für die Synthese bestimmter Ceramid-Subspezies verantwortlich sind. Für einige dieser Enzyme wurde die Umsetzung verschiedener Fettsäuren bestimmt (Tabelle 1). Die Vermutung, dass die Synthese der verschiedenen Ceramidspezies in Pilzen von unterschiedlichen Ceramidsynthasen katalysiert wird, konnte bislang nicht im Detail bestätigt werden.

Tabelle 1: Substratspezifität verschiedener Ceramidsynthasen.

Organismus		Ceramidsynthase	Fettsäure	Referenz
Säugetiere		CerS1*	C ₁₈	[37]
		CerS2*	C ₂₄	
		CerS3*	C ₂₄ , C ₂₆	
		CerS4*	C _{20 ±2}	
		CerS5**	C ₁₆	
		CerS6*	C ₁₆	
Pilze	<i>S. cerevisiae</i>	Lac1**	C ₂₄ , C ₂₆	[26]
		Lag1**	C ₂₄ , C ₂₆	
	<i>A. nidulans</i>	LagA	n.d.	[30]
		BarA	n.d.	
Pflanzen	<i>A. thaliana</i>	LOH1	n.d.	[38]
		LOH2	n.d.	
		LOH3	n.d.	

*Ermittlung in vivo über Deletionsmutanten und Überexpression;**Ermittlung in vivo und in vitro über Enzymassays

- **Synthese von Ceramid über Ceramidasen**

Eine zweite Möglichkeit für die Synthese von Ceramiden ist die Nutzung von Ceramidasen. Diese Enzyme katalysieren im Normalfall die Hydrolyse von Ceramiden, doch die Rückreaktion (Ceramidsynthese aus freier Fettsäure und Sphingobase) kann unter bestimmten Bedingungen (z.B. Fehlen der Ceramidsynthasen) durchaus effektiv sein [39, 40]. Diese Reaktion stellt bestimmte Anforderungen bezüglich der Stereochemie der

Sphingobasen (*D-erythro*-LCBs). Die Fettsäuren können gesättigt oder ungesättigt vorliegen und eine Kettenlänge von C₈ bis C₂₂ aufweisen [39, 40].

- **Generierung von Ceramid durch den Abbau komplexer Sphingolipide**

Eine weitere Möglichkeit zur Generierung von Ceramiden ist der Abbau komplexer Sphingolipide. Hierbei werden die Kopfgruppen komplexer Sphingolipide abgespalten und die Ceramide freigesetzt. Die komplexen Sphingolipide können aus dem eigenen Organismus kommen oder aus dem umgebenden Milieu aufgenommen werden. Beispiele hierfür sind Sphingomyelinasen, welche Sphingomyelin hydrolysieren [41-43], die Hydrolyse von Glucosylceramid (GlcCer) und Galactosylceramid (GalCer) durch Glycohydrolasen [44] oder die Dephosphorylierung von Ceramid-1-phosphat mittels Lipid-Phosphatasen [45].

1.1.2 Modifikationen am Ceramidgrundgerüst

Die Sphingobase und die langkettige Fettsäure des Ceramids sind häufig durch funktionelle Gruppen modifiziert. Im Folgenden werden einige typische Modifikationen erläutert.

- **Sphingolipid- Δ 4-Desaturase**

Aus einer Reihe verschiedener Organismen konnten Sphingolipide isoliert werden, die Δ 4-*trans*-ungesättigte Sphingobasen aufweisen. Gene für Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen wurden beispielsweise aus *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* und *Homo sapiens* identifiziert und durch heterologe Expression in *S. cerevisiae* charakterisiert [46-49]. Die Existenz eines entsprechenden Gens in *S. cerevisiae* konnte nicht nachgewiesen werden [50].

In Säugern erfolgt die Δ 4-*trans*-Desaturierung auf der cytosolischen Seite der ER-Membran auf Ceramidebene – freie Sphingobasen und GlcCer werden nicht als Substrat akzeptiert [51-55]. Sphingolipid- Δ 4-Desaturasen gehören zu den membrangebundenen Desaturasen und benötigen NAD(P)H und Sauerstoff als Kofaktoren. Sie sind Teil einer Superfamilie von Enzymen, die durch drei Histidin-Boxen charakterisiert werden [56].

- **Sphingolipid- Δ 8-Desaturase**

Wie die Δ 4-Desaturierung konnte auch keine Δ 8-Desaturierung in Sphingolipiden aus *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Aus Pilzen wie *Pichia pastoris*, *Rhynchosporium secalis*, *Saccharomyces kluveri* und *Kluyveromyces lactis* konnten nur die *trans*-isomeren Formen Δ 8-ungesättigter Sphingobasen isoliert werden [57-59], wohingegen für pflanzliche Sphingolipide eine Mischung aus *cis*- und *trans*-Isomeren charakteristisch ist. Die Gene pilzlicher Δ 8-Desaturasen wurden aus *Kluyveromyces lactis* und *P. pastoris* isoliert und

durch heterologe Expression in *S. cerevisiae* charakterisiert [47, 59]. Pflanzliche Gene, die für $\Delta 8$ -Desaturasen codieren, wurden aus *A. thaliana*, *Brassica napus*, *Helianthus annuus* und *Borago officinalis* funktionell charakterisiert [60-62]. In Tieren konnten keine homologen Gene nachgewiesen werden. Ebenso wie die Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase sind auch die $\Delta 8$ -Desaturasen membrangebunden und zeigen die charakteristischen Histidin-Boxen. Außerdem besitzen sie eine Cytochrom b5-Domäne, die mit dem N-terminalen Ende der Desaturase fusioniert ist. Der grundlegende Reaktionsmechanismus ist dem der $\Delta 4$ -Desaturasen ähnlich, unterscheidet sich aber im Angriff auf die Wasserstoffatome. Bei trans-Isomeren geht man von einem Angriff am C8 in anti-Orientierung aus, während man für die cis-Isomere einen Angriff am C9 in gauche-Orientierung annimmt [63].

- **Sphingolipid-C4-Hydroxylase**

Neben der Möglichkeit der $\Delta 4$ -Desaturierung besitzen Pflanzen, Pilze und Tiere ebenfalls die Möglichkeit der C4-Hydroxylierung, wobei das Produkt der Reaktion 4-Hydroxysphingarin (t18:0) ist. Das Hydroxylasegen *SUR2* wurde aus *S. cerevisiae* kloniert und als nicht essentiell erkannt [64]. Ebenso wie die Sphingolipid-Desaturasen gehört die Sphingolipid-C4-Hydroxylase zu den membrangebundenen Enzymen mit den drei charakteristischen Histidinboxen [56, 65]. *Candida albicans* besitzt ein bifunktionales Enzym, welches Ceramide an der C4-Position sowohl desaturieren als auch hydroxylieren kann [66]. In Säugern erfolgt die C4-Hydroxylierung durch eine bifunktionale Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase/C4-Hydroxylase [48]. Aus *A. thaliana* wurden zwei C4-Hydroxylasegene identifiziert und charakterisiert [67]. Der größte Teil der in Pflanzen synthetisierten hydroxylierten Sphingolipide wird zusätzlich *cis/trans*- $\Delta 8$ -desaturiert. Die Substratspezifität der C4-Hydroxylase ist bisher noch nicht geklärt [68, 69].

- **Sphingolipid-C9-Methyltransferase**

Aus einigen Pilzen und niederen Meerestieren konnten Cerebroside isoliert werden, die neben Desaturierungen und/oder Hydroxylierungen eine zusätzliche Methylverzweigung an der C9-Position aufweisen [70]. Diese konnten in Pflanzen und höheren Tieren nicht nachgewiesen werden. Eine erste Sphingolipid-C9-Methyltransferase wurde aus *P. pastoris* kloniert und durch heterologe Expression in *S. cerevisiae* charakterisiert [47]. Die C9-Methyltransferase-Deletion ist nicht letal [47]. Sphingolipid-C9-Methyltransferasen gehören zu den S-Adenosylmethionin (SAM)-abhängigen Methyltransferasen. Ternes et al. zeigten, dass die Aktivität der C9-Methyltransferase in *Pichia pastoris* eine Doppelbindung zwischen dem C8- und C9-Atom der LCB bedarf [47].

- **Fettsäure- α -Hydroxylase**

Pflanzliche und pilzliche Sphingolipide enthalten gewöhnlich α -hydroxylierte Fettsäuren [50]. Aus *S. cerevisiae* wurde ein nichtessentiell Fettsäurehydroxylasegen (SCS7) identifiziert und charakterisiert [64, 71]. Das resultierende Protein, Scs7p, besitzt sowohl eine Cytochrom *b5*- als auch eine Hydroxylase/Desaturase-Domäne, die ebenfalls die charakteristischen Histidinboxen aufweist [64, 72]. *A. thaliana* besitzt zwei ähnliche Gene, von denen ein erstes bereits als Fettsäure- α -Hydroxylasegen identifiziert wurde [71]. Das zweite Gen sowie Hydroxylasegene aus weiteren Pflanzen sowie Pilzen müssen noch funktionell charakterisiert werden [50]. In *S. cerevisiae* dienen sehr langkettige Fettsäuren (VLCFA) als Substrat für die Scs7, aber ihre Homologen in anderen Pilzen akzeptieren auch Fettsäuren mit 16 oder 18 C-Atomen [73]. Da die pflanzliche Ceramidsynthese keine hydroxylierten Fettsäuren akzeptiert, erfolgt die Hydroxylierung wahrscheinlich nicht an freien oder aktivierten Fettsäuren, sondern auf der Ebene von Ceramiden oder komplexer Sphingolipide [72, 74].

- **Fettsäure- Δ 3-Desaturase**

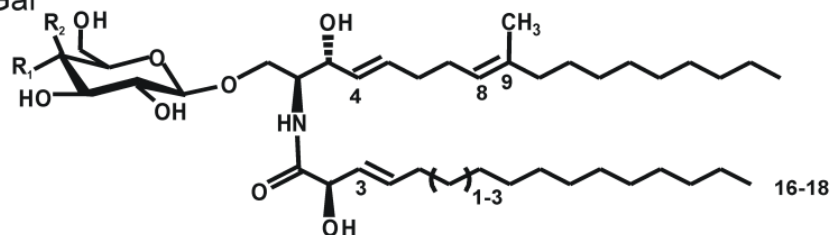
Neben den oben erwähnten Modifikationen kann die amidgebundene Fettsäure noch eine Doppelbindung am C3-Atom aufweisen. Diese findet man jedoch nur in Euasomyceten, einer relativ ursprünglichen Gruppe der Ascomyceten [50, 75].

1.1.3 Komplexe Sphingolipide

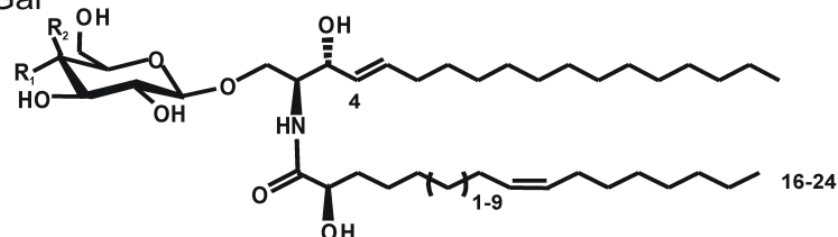
In komplexen Sphingolipiden ist die C1-Hydroxygruppe des Ceramids mit einer polaren Kopfgruppe verknüpft. Lipide, bei welchen mindestens eine Einheit der polaren Gruppe ein Zucker ist, werden Glycosphingolipide genannt. Besteht die Kopfgruppe ausschließlich aus Zuckerderivaten, so spricht man von Cerebrosiden. Ein typisches Cerebrosid mit nur einer Zuckerkopfgruppe ist das Glucosylceramid (GlcCer, Abbildung 1-4).

Pilze

Glc, Gal

**Säuger**

Glc, Gal

**Pflanzen**

Glc

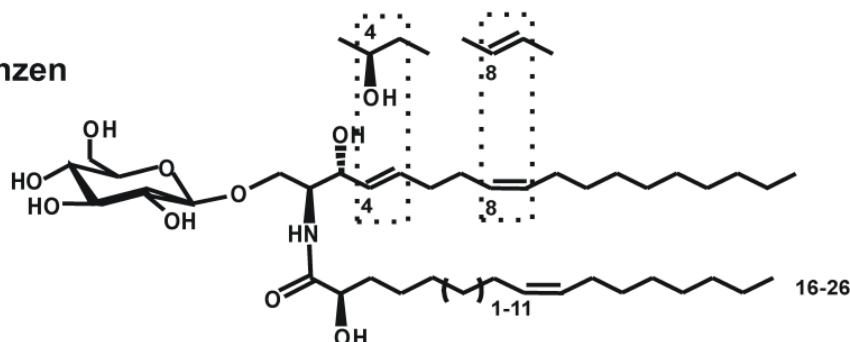


Abbildung 1-4: Glycosylceramid-Strukturen von Pilzen, Pflanzen und Säugern [50]. Glucosyl- und Galactosylceramide von Pilzen (oben) sind relativ einheitlich aufgebaut. Sie bestehen in der Regel aus der Sphingobase (4*E*,8*E*)-9-Methylsphinga-4,8-dienin, die mit einer α -hydroxylierten C₁₆- oder C₁₈-Fettsäure verknüpft ist. In Euascomyceten kann die Fettsäure Δ 3(*E*)-desaturiert sein. Pflanzen zeigen ein breites Spektrum hinsichtlich ihres Ceramid-Grundgerüsts: Neben einer Hydroxylierung oder Desaturierung am C4 der Sphingobase kann diese am C8 *cis*- oder *trans*-desaturiert sein. Da die Modifikationen in verschiedenen Kombinationen auftreten können, ergeben sich daraus insgesamt sieben verschiedene Strukturen der Sphingobase. Diese ist mit einer (meist α -hydroxylierten) Fettsäure verbunden, die verschieden lang (C₁₆-C₂₆) und zudem *n*9-desaturiert sein kann. Die für Säuger charakteristische Sphingobase (*E*)-Sphing-4-enin ist in Pilzen und Pflanzen selten. In Säugern sind sie mit hydroxylierten oder nicht-hydroxylierten Fettsäuren verbunden (C₁₆-C₂₄, in der menschlichen Haut bis C₃₄). Kopfgruppen sind entweder Glucose (Glc; R1 = OH, R2 = H) oder Galactose (Gal; R1 = H, R2 = OH).

Die Verknüpfung der Glucose mit dem Ceramid wird durch das Enzym Glucosylceramid-synthase (Gcs) katalysiert. Der Glucoserest wird hierbei über eine β -(1-1)-glycosidische Bindung mit dem Ceramid verknüpft. Die erste Gcs-codierende cDNA wurde aus *Homo sapiens* isoliert und in Gcs defizienten Maus-Melanomazellen exprimiert [76]. Säuger-Gcs gehören zu den NDP-Zucker-Hexosyltransferasen (EC 2.4.1.x) [77]. Sie sind integrale Membranproteine mit einer einzelnen putativen Transmembrandomäne am *N*-Terminus und einem Segment am *C*-Terminus, das hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren besteht und mit der Membran interagiert. Das Reaktionszentrum und der

C-Terminus liegen dabei auf der cytosolischen Seite der Golgi-Membran [78-80]. In *S. cerevisiae* und *S. pombe* konnten keine homologen Enzyme gefunden werden, während eine Reihe anderer Gcs aus Pilzen und Pflanzen heterolog in *S. cerevisiae* und/oder *P. pastoris* exprimiert wurden [64]. Die bisher gefundenen Sequenzen zeigen einige konservierte Aminosäuren im aktiven Zentrum, besitzen aber ansonsten nur sehr geringe Ähnlichkeit zur Säuger-GCS [50].

In komplexeren Cerebrosiden sind verschiedene Zuckerreste zu einem Oligosaccharid kombiniert. Dabei treten auch Zuckerreste wie N-Acetylglukosamin, N-Acetylgalactosamin und Glukuronsäure auf [81]. Cerebroside kommen in Tieren, Pflanzen und Pilzen vor. Einer der wenigen eukaryoten Organismen, der keine Cerebroside synthetisiert, ist *S. cerevisiae* [29, 82]. Eine bei Tieren häufig vorkommende Variante der Cerebroside sind die Ganglioside (Abbildung 1-5 C). Bei diesen Lipiden enthält das Oligosaccharid der polaren Kopfgruppe mindestens einen der sauren Zuckerderivate N-Acetylneuraminsäure oder N-Glycoylneuraminsäure [81].

Bei einer weiteren großen Klasse der Sphingolipide ist die C1-Hydroxygruppe des Ceramids mit einem Phosphatrest von 1-Phospho-myo-Inositol über eine Esterbindung verknüpft (Phospho-sphingolipid). Die Phosphoinositol-Einheit stammt von Phosphatidylinositol und wird durch das Enzym IPC-Synthase (Phosphatidylinositol:Ceramid-Phosphoinositoltransferase) auf die C1-Hydroxygruppe des Ceramids übertragen [83]. An die C2-Hydroxygruppe des Phosphoinositols können verschiedene Zuckereinheiten (z.B. Mannose) und daran eine weitere Phosphoinositol-Gruppe angehängt werden [84-86]. Vertreter dieser Klasse der Sphingolipide werden als Glycosylinositol-phosphorylceramide (GIPCs) bezeichnet (Abbildung 1-5 A+B). Auch diese Art von Lipiden kommt in Tieren, Pflanzen und Pilzen vor.

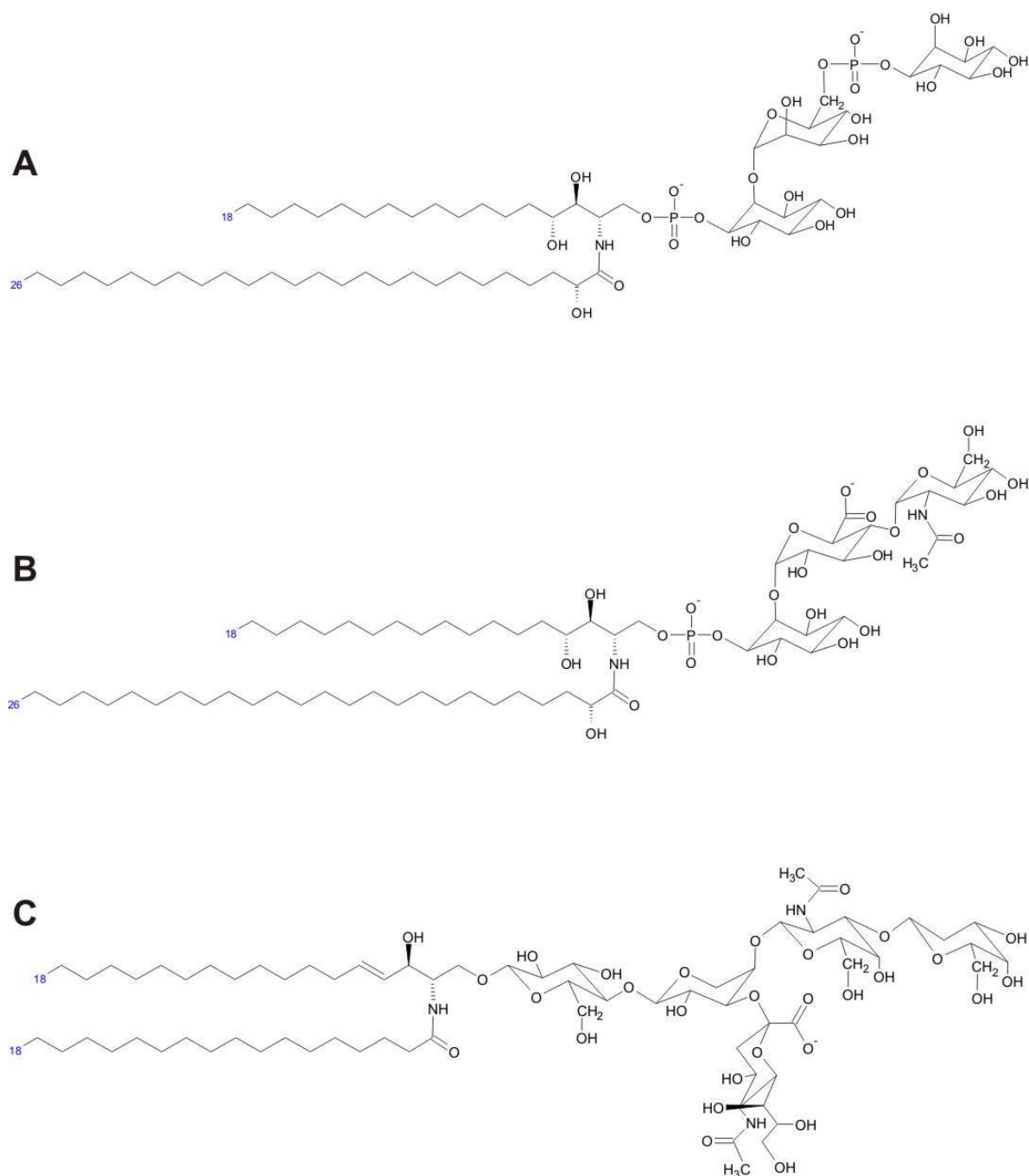


Abbildung 1-5: Beispiele für komplexe Glycosphingolipide. **A** Mannosyl-(Inositolphosphoryl)₂-Ceramid (M(IP)₂C) aus dem Hefepilz *S. cerevisiae*. Das Ceramid besteht aus 4-Hydroxysphinganin (t18:0) und 2-Hydroxyhexacosansäure. Die vollständige Bezeichnung lautet D-myo-Inositolphosphoryl-(1→6)-α-D-Mannosyl-(1→2)-D-myo-inositol-1-O-phosphoceramid. **B** Glycosylinositolphosphorylceramid (GIPC) aus *Nicotiana tabacum* (Tabak). Das Ceramid besteht aus 4-Hydroxysphinganin (t18:0), 2-Hydroxyhexacosansäure und N-Acetylglucosamin, Glucuronsäure sowie Phosphoinositol als Kopfgruppe. Der vollständige Name lautet α-D-N-Acetylglucosamin-(1→4)-α-D-glucuronosyl-(1→2)-D-myo-inositol-1-O-phosphoceramid [87]. **C** humanes Gangliosid GM1 mit einem Oligosaccharid bestehend aus Galactose, Glucose, N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure. Das Ceramid ist aus Sphing-4-enin (d18:1) und Stearinsäure aufgebaut. Die vollständige Bezeichnung ist 4-(β-D-Galaktosyl-(1→3)-β-D-N-acetylgalaktosamin)-3-(α-D-N-acetylneuraminyl)-β-D-galaktosyl-(1→4)-β-D-glucosyl-(1→1)-ceramid.

Eine andere Art von komplexen Sphingolipiden, gänzlich ohne Zuckerkopfgruppe, ist das Sphingomyelin (Abbildung 1-6 A). Hier ist ein Phosphatrest von Phosphocholin über eine Esterbindung mit der C1-Hydroxygruppe des Ceramids verknüpft. Die Phosphocholineinheit stammt von Phosphatidylcholin und wird durch das Enzym Sphingomyelin-Synthase (Phosphatidylcholin:Ceramid-Phosphocholintransferase) auf das Ceramid übertragen [88]. Eine weitere Klasse von Sphingolipiden, welche ausschließlich in Bakterien vorkommt, sind die Sulfosphingolipide. Diese weisen Sulfonsäure als Kopfgruppe auf (Abbildung 1-6 B). Sie sind charakteristische Bestandteile der äußeren Membran der Sphingobacteriales, einer Familie gram-negativer Bakterien, die zur „Cytophaga/Flexibacter Gruppe“ gehören [89]. Im Unterschied zu Glycosphingolipiden besitzen diese eine Sulfonsäure Gruppe anstelle einer Hexose. Über die Synthese dieser Lipide ist wenig bekannt, man geht jedoch davon aus, dass der erste Schritt der Basensynthese aus einer Kondensationsreaktion eines Acyl-CoA mit der Aminosäure Homocysteat besteht [90, 91].

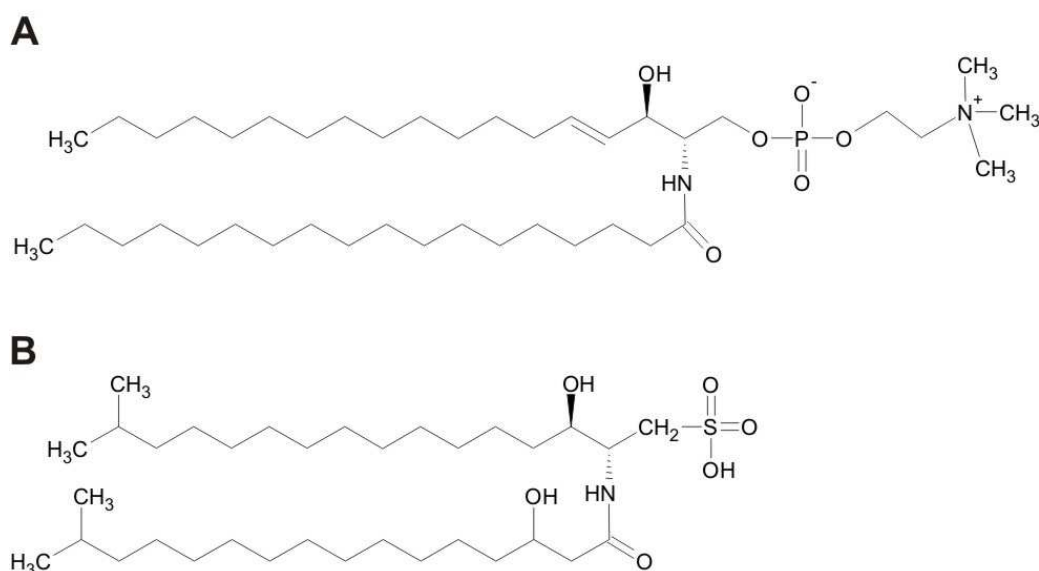


Abbildung 1-6: Nicht-glycosylierte Sphingolipide. **A** Sphingomyelin aus Säugetieren bestehend aus Phosphocholin, Sphing-4-enin und Stearinsäure. **B** Sulfosphingolipid aus Cytophaga. Das dargestellte Lipid ist Sulfobacin A, aufgebaut aus Capnin (2-Amino-3-hydroxy-15-methyl-hexadecansäure) und 3-Hydroxy-15-methyl-hexadecansäure.

Die Komposition der verschiedenen Enzyme, von der Spt über die LCB- und FA-modifizierenden Enzyme bis zur Addition der Kopfgruppe, ist in den Reichen der Tiere, Pflanzen und Pilze jeweils relativ homogen und führt zur Synthese unterschiedlicher, aber spezifischer GSL. Niedere Lebewesen (z.B. Bakterien, Mikroalgen und Korallen) zeigen hingegen kein konserviertes Muster von Enzymen der Sphingolipidsynthese.

1.1.4 Transportprozesse für Sphingolipide und Ceramide

Zu Beginn wurde angedeutet, dass biologische Membranen keine homogenen Gebilde sind, sondern eine Reihe von Asymmetrien aufweisen: Die laterale Verteilung der

Lipide in der Plasmamembran ist inhomogen (Membrandomänen), die beiden Seiten der Doppelmembran sind unterschiedlich zusammengesetzt (transversale Asymmetrie), und auch die Lipidkomposition der Membranen der einzelnen Zellorganelle sind nicht identisch (Abbildung 1-7). Insbesondere für Sphingolipide wurde ein Gradient beobachtet, ein hoher Anteil in der Plasmamembran bei geringem Anteil im ER [92].

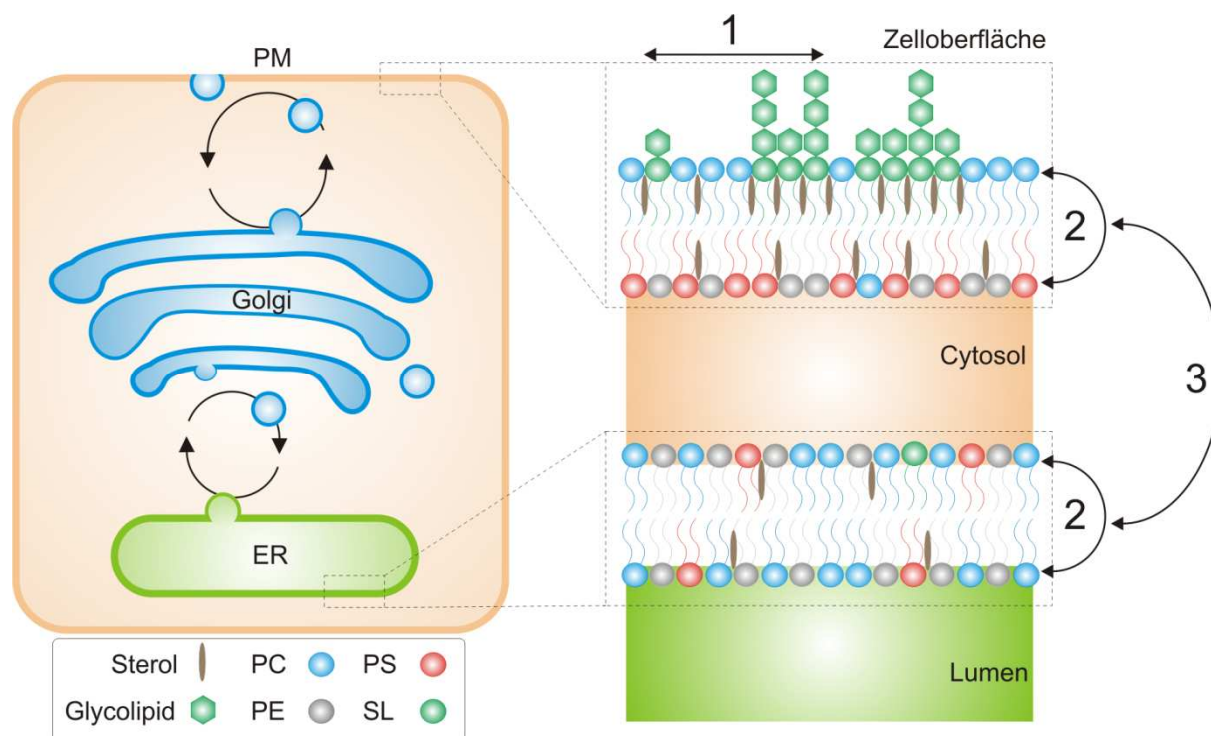


Abbildung 1-7: Verteilung von Membranlipiden. [verändert nach [93]]. Auf der linken Seite ist der Syntheseweg von Membranlipiden schematisch dargestellt. Der Großteil der Synthese findet im ER statt, von wo sie zum Golgi gelangen, hier modifiziert und sortiert werden, um anschließend zur PM transportiert zu werden. Die Membranlipide sind nicht gleichmäßig verteilt, sondern variieren innerhalb und zwischen verschiedenen Membranen: **1)** Die laterale Ungleichverteilung in der Plasmamembran führt zu Sphingolipid- und Sterol-reichen Membranmikrodomänen (siehe Abschnitt 1). **2)** Auch die beiden Seiten der Lipiddoppelschichten sind unterschiedlich zusammengesetzt. Die cytosolische Seite der Plasmamembran besteht hauptsächlich aus Amino-Phospholipiden (PE und PS), wohingegen die exoplasmatische Seite einen großen Sphingolipidanteil aufweist. **3)** Die Lipidzusammensetzung verschiedener Kompartimente (hier ER und PM) ist ebenfalls stark unterschiedlich, so treten beispielsweise Sphingolipide kaum in der ER Membran auf und sind in der Plasmamembran angereichert; PC - Phosphatidylcholin, PE - Phosphatidylethanolamin, PS - Phosphatidylserin, SL - Sphingolipid.

Es stellt sich nun die Frage, mit welchen Mechanismen es die Zelle schafft, die verschiedenen Lipide so zu verteilen, dass sich die beschriebenen Asymmetrien bilden und erhalten bleiben. Im Vergleich zur Sortierung von Proteinen, worüber heutzutage wesentlich mehr Einzelheiten bekannt sind, ergibt sich bei den Lipiden das Problem, dass sie vergleichsweise kleine Moleküle sind und somit nicht mit „Adressschildern“ (z.B. spezielle Lokalisierungsdomänen) versehen werden können. Zusammengefasst ergeben sich drei Arten von Lipid-Bewegungen, welche in einer Zelle reguliert werden müssen: Die laterale Verteilung der Lipide auf der Membranoberfläche, der Transport der Moleküle durch die

Membran von einer Seite zur anderen (beide Intramembran-Transport) und das Austreten von Lipiden aus einer Membran gefolgt von einer Insertion in eine andere Membran (Intermembran-Transport) [94]. Sphingolipide zeigen eine besonders auffallend inhomogene Verteilung, und ihr Syntheseweg unterscheidet sich stark von dem der Glycerolipide und Sterole, was spezielle, für diese Lipidklasse einzigartige Sortier-Mechanismen zur Folge hat.

- **Ceramid-Transport ER → Golgi**

Die Synthese der Ceramide über Ceramidsynthasen erfolgt im Endoplasmatischen Reticulum [20, 23-25] und die Glycosylierung der Ceramide im Golgi [78-80]. Es bedarf also eines Transports der Ceramide vom ER zum Golgi. Hanada et al. zeigten, dass dieser Transport in Säugerzellen zum großen Teil nicht vesikulär abläuft, sondern über ein spezifisches Protein geregelt wird, das als CERT („ceramide transfer protein“) bezeichnet wird [95]. Eine genaue Untersuchung dieses Enzyms zeigte drei Domänen, die zusammen für die Funktion essentiell sind: N-Terminal eine pleckstrin-homologe Domäne (PH-Domäne), eine VAP-Interaktions-Domäne (vesicle-associated protein) in der Mitte, und C-terminal eine START-Domäne (steroidogenic acute regulatory protein) [95-97].

Für die PH-Domäne wurde eine spezifische Interaktion mit Phosphatidylinositol-4'-monophosphat (PI-4P) nachgewiesen. PI-4P ist ein phosphoryliertes Lipid, das in der Membran des Golgi vorkommt und somit eine Bindung der CERT an den Golgi ermöglicht. Die VAP-Interaktionsdomäne bindet an spezifische integrale Proteine des ER und ermöglicht somit eine Bindung an dieses Organell. Die START-Domäne bildet eine hydrophobe Tasche, die spezifisch Ceramide, aber keine anderen Lipide binden kann [98]. Die Untersuchung des genauen Transportsmechanismus ist noch nicht abgeschlossen. Zunächst wurde vermutet, dass das Enzym erst am ER bindet (VAP-Domäne), ein Ceramidmolekül aufnimmt, anschließend zum Golgi wandert, dort mit der PH-Domäne am PI-4P bindet und das Ceramid in die Golgimembran abgibt. Neue Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass dieser Transport an Kontaktstellen zwischen den zwei Organellen (membrane contact sites, MCS) stattfindet. In diesen Regionen sind die Membranen von ER und Golgi nahe beisammen (ca. 10 nm Abstand), und die CERT kann gleichzeitig an beiden Organellen binden. Dadurch werden die Membranen verknüpft, und die Ceramide können sukzessive vom ER in den Golgi transportiert werden. Der eigentliche Prozess des Ceramidtransports ist ATP-abhängig [96].

Ein Test auf Substratspezifität der CERT aus CHO-Zellen ergab, dass dieses Enzym Ceramide mit einer C₁₈-Fettsäure bevorzugt akzeptiert und C₂₄-Ceramide nur sehr schlecht gebunden werden. Die in diesem Versuch getesteten Sphingobasen hatten hingegen weniger Einfluss auf die Aktivität [98]. Homologe Sequenzen zu diesem Gen wurden in allen Vertebraten und Invertebraten gefunden, wohingegen für Pflanzen, einzellige Eukaryoten

und Prokaryoten noch keine entsprechenden Nukleotidsequenzen identifiziert werden konnten [97].

- **Intermembrantransport**

Der Transport von Lipiden von einem Kompartiment in ein anderes (z.B. Golgi → Plasmamembran) kann auf verschiedene Weisen erfolgen. In vielen Fällen geschieht dies über vesikulären Transport. Hierbei werden Vesikel von der Membran eines Kompartiments abgeschnürt, durch die Zelle zum Ziel-Kompartiment befördert, wo sie mit dessen Membranen verschmelzen [99]. Dieser Mechanismus ist unter anderem typisch für den Transport von Sphingolipiden vom *trans*-Golgi zur Plasmamembran über COPI-Vesikel (cytoplasmic coat protein complex). Der energieabhängige Transport (ATP und GTP) verläuft nach den gleichen Prinzipien wie der vesikuläre Transport von Proteinen in der Zelle. Neben dem vesikulären Transport besteht die Möglichkeit des Transfers der Lipide über Lipid-Transfer-Proteine (LTP), bzw. Glycolipid-Transfer-Proteine (GLTP). Diese Proteine haben die Eigenschaft Lipide (bzw. Lipidklassen) spezifisch zu binden und somit einzelne Moleküle durch die wässrige Phase der Zelle transportieren zu können. In den letzten Jahren wurden viele verschiedene putative (G)LPTs identifiziert, die auf Grund ihrer Struktur verschiedene Ziel-Membranen haben [93]. Ähnlich den CERTs ist der Mechanismus für (G)LPTs, die an zwei verschiedene Membransysteme binden können, in MCS (z.B. ER zu Plasmamembran) begünstigt, da hier nur kurze Wege zu überwinden sind [100]. Auch für GlcCer scheint ein solcher Mechanismus zu existieren, da auch bei Inhibierung des vesikulären Transports die Lipide die Plasmamembran erreichen können [101].

- **Intramembrantransport**

Ein Teil der lateralen Asymmetrie in den Membranen (v.a. PM und Golgi) entsteht durch den eben beschriebenen Weg des spezifischen Transports. Aber hierfür müssen die Lipide erstmal im Golgi sortiert werden, bevor sie zur PM gelangen. Für die Ungleichverteilung innerhalb einer Membran (ER, Golgi und PM) sind neben den physikalischen Eigenschaften der Lipide (spontane Domänenbildung) auch aktive Transportprozesse verantwortlich. Diese lassen sich in drei fundamentale Mechanismen aufteilen: Aminophospholipid-Translocasen (Flippasen) sind für die vertikale Ungleichverteilung verantwortlich, indem sie unter ATP-Verbrauch Lipide von einer Seite der Membran auf die andere bringen [102-104]. Der zweite Faktor sind ABC-Transporter (ATP binding cassette). Proteine dieser großen Familie verteilen ATP-abhängig Moleküle über Membranen entgegen Konzentrationsgradienten und können dadurch asymmetrische Strukturen fördern und aufrecht erhalten [105-107]. Bidirektionale Transporter (Scramblasen)

hingegen wirken den ordnenden Mechanismen entgegen, indem sie unspezifisch Lipide über die Membran verteilen [108, 109].

1.2 Lipidomik

In den letzten Jahrzehnten hat sich eine wissenschaftliche Teildisziplin entwickelt, die sich mit der systematischen Analyse von Lipiden und Membransystemen beschäftigt, die Lipidomik (Abbildung 1-8).

Ziel ist es, zunächst die Strukturen aller Lipidklassen mit möglichst wenigen, standardisierten und automatisierten analytischen Methoden detailliert zu beschreiben und alle Lipide eines Organismus zu quantifizieren. Desweiteren soll die Verteilung der Lipide in verschiedenen Geweben, Zellen und subzellulären Membransystemen (z.B. Zellorganelle) beschrieben werden. Auch gilt es zu untersuchen, wie die Lipidmoleküle innerhalb der einzelnen Membranen verteilt sind, das heißt, auf welcher Seite der Biomembran sie sich befinden und wie ihre laterale Organisation in Membranmikrodomänen gestaltet ist. Um Informationen über die biologischen Funktionen zu erhalten, soll zudem bestimmt werden, wie sich die Lipidmuster unter definierten Bedingungen ändern [110, 111].

Parallel dazu wird über genetische Ansätze versucht die Enzyme zu bestimmen, die an der Synthese der Lipide beteiligt sind. Anschließend können über die Deletion und/oder Expression der korrespondierenden Gene Lipide mit veränderten Strukturmerkmalen in dem betreffenden Organismus erzeugt werden („*Lipid remodelling*“). Durch die Analyse der veränderten Organismen können Rückschlüsse auf die biologischen Funktionen der Lipide gezogen werden. Da Sphingolipide schon lange als bioaktive Moleküle bekannt sind, hat sich ein eigener Zweig entwickelt, der sich mit dieser Lipidklasse beschäftigt, die Sphingolipidomik (Ein Überblick über die bisher bekannten Funktionen dieser Lipide folgt in Abschnitt 1.3).

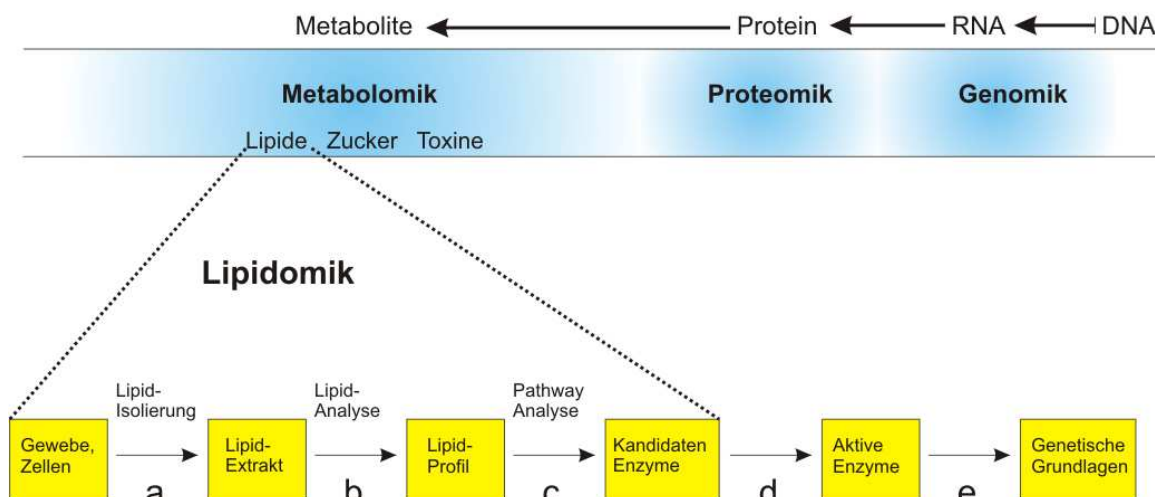


Abbildung 1-8: Eingliederung und Aufgaben der Lipidomik im wissenschaftlichen Kontext (verändert nach [111]): Gene codieren für Proteine, die in ihrer Gesamtheit und im Zusammenspiel mit äußeren Faktoren die Metabolite einer Zelle bestimmen. Mit neuen Techniken ist es möglich die einzelnen Faktoren in den Bereichen der Genomik, Proteomik und Metabolomik qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Die Lipidomik kann als ein Teilaspekt der Metabolomik betrachtet werden, wobei die Zusammensetzung, Verteilung und die Aufgaben der Lipide sowie der gebildeten Membranen untersucht werden. Im unteren Teil der Abbildung ist eine biochemische Vorgehensweise dargestellt: Die Lipide werden mit organischen Lösemitteln aus dem zu untersuchenden Zellmaterial gelöst (a) und anschließend mit analytischen Verfahren, wie beispielsweise Chromatographie und Spektrometrie, untersucht (b). Dadurch erhält man ein Lipid-Profil, ein biochemischer Schnappschuss der Lipidkomposition der untersuchten Probe. Durch die Analyse verschiedener Proben und den Vergleich der Ausgangsmaterialien kann man Rückschlüsse auf eventuell beteiligte Enzyme bzw. Gene herausarbeiten und einen hypothetischen Syntheseweg formulieren (c). Hat man auf diese Weise oder durch Sequenzvergleiche mit Genen bzw. Proteinen aus bekannten Synthesewegen verantwortliche Enzyme und Gene ausfindig gemacht (d,e), so kann man über Methoden der Genomik oder Proteomik die Funktion der Lipide genauer bestimmen.

In den Anfängen der Lipidomik war die Aussagekraft der Untersuchungen vor allem durch die analytische Methodik begrenzt. In den 1970er Jahren wurden für die ersten qualitativen Analysen dünnschichtchromatographische (DC) Ansätze benutzt, um Sphingobasen, ihre Phosphate, Ceramide und komplexe GSLs zu beschreiben [112, 113]. Fortschritte durch die Verwendung spezieller „*high performance*“ DC Systeme verbesserten die Auflösung und führten zur Identifizierung neuer molekularer Spezies [114]. Diese Methode kann auf Grund ihrer beschränkten Trennleistung und Sensitivität jedoch nicht die Trennung und den Nachweis aller Lipide garantieren. Eine Verbesserung der Messeigenschaften brachte die Einführung flüssig-chromatographischer Systeme. Mit einer HPLC (high-performance-liquid-chromatography) lassen sich einfache GSLs (Monohexosylceramide) und deren Bestandteile sauber auftrennen und mit erhöhter Sensitivität nachweisen [115-119]. Dies ist sowohl für komplexe Moleküle mit polarer Kopfgruppe über „*straight-phase*“- als auch für unpolare Bestandteile (LCB, Fettsäure) über „*reversed-phase*“-Systeme möglich. Das Problem dieser Methode ist, dass viele dieser Substanzen mit den üblichen Detektoren (UV, Fluoreszenz) nicht nachweisbar sind, da sie

elektromagnetische Strahlung weder stark absorbieren noch emittieren. Deswegen ist für die Detektion der Moleküle ein vorgelagerter Derivatisierungsschritt erforderlich. Gängige Methoden hierfür sind O-Benzoylierung mit Benzoylchlorid [120, 121] bzw. Benzoessäureanhydrid [122] oder die Derivatisierung von LCBs mit N-[7-(4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol)] (NBD)-Gruppen [123, 124]. Eine ähnliche Methode ist die Gaschromatographie, wobei unpolare und flüchtige Substanzen mit erhöhter Sensitivität nachgewiesen werden können. Sind diese Voraussetzungen nicht gegeben, so müssen die Analyten ebenfalls derivatisiert werden. Bei Fettsäuren wird beispielsweise die Säuregruppe mit einer Methylgruppe verestert (FAMES) oder die Hydroxylgruppen durch Tri-methyl-silyl-gruppen ersetzt (TMS-FAMES).

Bei den eben beschriebenen chromatographischen Methoden sind also oftmals zeitraubende und verlustreiche Derivatisierungsschritte nicht zu vermeiden. Die Identifizierung der einzelnen Analyten erfolgt über einen Vergleich mit Standard-Substanzen, was die Aussagekraft dieser Methoden auf die zur Verfügung stehenden Standards begrenzt. Die Analyten werden lediglich nach dem Verteilungskoeffizienten zwischen einer stationären und einer mobilen Phase aufgetrennt. Diese Verteilung kann bei Analyten mit geringen strukturellen Unterschieden jedoch nahezu identisch sein, wodurch ihre Trennung erschwert wird. Jedoch sind chromatographische Systeme auf Grund ihrer Robustheit, einfachen Bedienbarkeit und den relativ geringen Anschaffungskosten heutzutage standardmäßige Analysewerkzeuge in den meisten Laboren, die bei der Überprüfung bekannter Komponenten täglichen Gebrauch finden.

Für eine detaillierte Strukturaufklärung einzelner Substanzen eignet sich die Aufnahme eines NMR-Spektrums (Kernresonanz). Das Prinzip beruht auf der Absorption messung elektromagnetischer Strahlung im Hochfrequenzbereich (bis ca. 600 MHz) in einem starken Magnetfeld. Im Gegensatz zur ultravioletten, sichtbaren (vis) und Infrarot-Absorption sind nunmehr die Atomkerne (z.B. ^1H) und nicht mehr die kompletten Moleküle am Absorptionsvorgang beteiligt. Dadurch kann die chemische Umgebung der einzelnen (Wasserstoff-)Atome und somit die genaue Struktur des Moleküls bestimmt werden. Für diese aussagekräftige, aber aufwendige Messung bedarf es jedoch größerer Mengen des Analyten (>100 μg), welcher in hoher Reinheit vorliegen muss. Die Vorbereitung der Probe beinhaltet daher Reinigungsschritte (z.B. chromatographische Methoden) und Derivatisierungen (z.B. Peracetylierung). Auch ist die NMR-Technik nicht für die Quantifizierung einzelner Substanzen geeignet.

Heutzutage werden die meisten Proben über massenspektrometrische Verfahren analysiert, da hier unter geringem Material- und Zeitaufwand detaillierte Ergebnisse erzielt werden können. Die experimentellen Grundlagen der Massenspektrometrie sind einfach und leicht zu verstehen. In einem Einlasssystem wird eine kleine Menge der Analyten (<1 μmol) in

gasförmige Ionen überführt und in Richtung eines Massenanalysators beschleunigt. Hier erfolgt eine Auftrennung der Probe nach den Masse/Ladungsverhältnissen (m/z) der einzelnen Bestandteile, die anschließend von Detektoren registriert werden. Aufgrund der hohen Genauigkeit der heutzutage verfügbaren „High-Resolution-Geräte“, die eine Messung der Molekülmasse auf vier Nachkommastellen erlaubt, kann durch die Messung des Masse/Ladungsverhältnisses auf wenige mögliche Summenformeln des Analyten geschlossen werden. Durch die Kombination mit anderen Analytischen Verfahren (z.B. Elementaranalysen, Atomspektroskopie etc.) kann die Zahl der möglichen Summenformeln weiter eingeschränkt werden. Bei Messungen von bekannten Molekülklassen (z.B., Kohlenwasserstoffe, Lipide etc.) oder Molekülen mit geringer Masse (bis ca. 200 DA) können oftmals exakte Summenformeln angegeben werden und kleine Unterschiede in der Zusammensetzung der verschiedenen Analyten bestimmt werden. Beispielsweise ist eine Unterscheidung von $C_4H_3O_2$ ($M=83,0133$ g/mol) und C_5H_7O ($M=83,0497$ g/mol) ohne weiteres möglich.

Dieses Prinzip ist grundlegend für viele Arten von Massenspektrometern, die Ausführung der einzelnen Bauteile ist jedoch weitgefächert. So gibt es eine Reihe verschiedener Ionisierungstechniken, vom Beschuss der Probe mit Elektronen, Ionen, Molekülen oder Photonen bis zur Ionisierung durch thermische oder elektrische Energie. Auch gibt es eine Reihe von Massenanalysatoren verschiedenster Bauweisen, die nach unterschiedlichen Prinzipien jedoch immer nach dem Masse/Ladungsverhältnis auftrennen. Die Detektion der Ionen ist ebenfalls mit den verschiedensten Techniken möglich.

In den letzten Jahren wurden die MS-Techniken immer mehr verfeinert und neue Systeme entwickelt. Ein sehr wirkungsvolles Messprinzip ist die Tandem Massenspektrometrie (MS/MS), bei der zwei Massenspektrometer miteinander gekoppelt werden. Hierbei werden die Molekülionen, die im ersten Massenfilter aufgetrennt werden, einzeln in eine Stoßkammer geleitet, wo sie in kleinere Fragmente zerlegt werden. Diese ionisierten Bruchstücke können in einem zweiten Massenanalysator aufgetrennt und anschließend detektiert werden. Aus der Analyse dieser Fragmentierungsmuster können zusätzliche Strukturinformationen über das Mutterion gewonnen werden. Die heutigen Ausführungen bestehen größtenteils aus Tripelquadrupol-Massefiltern (drei Quadrupol Massefilter in Reihe), wobei der zweite als Stoßkammer fungiert. Die Vorteile dieser Methode liegen darin, dass auch aus einer komplexen Probe (z.B. Lipidohextrakt) einzelne Komponenten detailliert analysiert werden können.

Da die Analyse der eingespritzten Analyten in einem MS-System sehr schnell von statten geht, eignet sich dieses auch als Detektor für flüssigchromatographische Systeme. Die Probe wird zunächst über HPLC oder GC in die einzelnen Bestandteile aufgeschlüsselt, und diese werden anschließend von einem Massenspektrometer analysiert (HPLC-MS, GC-

MS). Diese Art der Detektion hat eine wesentlich höhere Aussagekraft als der Vergleich mit Standardsubstanzen über die Messung von Retentionszeiten, wobei nur das Laufverhalten der Probenbestandteile in mobilen Phasen bestimmt wird. MS-Detektoren liefern zusätzlich Informationen über den Aufbau der Analyten. Ein System, das auch in der Lipidomic Verwendung findet, ist die Detektion mit Flugzeit-Analysatoren (TOF, time of flight), die durch ihren einfachen Aufbau und den theoretisch beliebig großen Erfassungsbereich bestehen. Die Ausgangsprobe wird zunächst über eine Chromatographiesäule in ihre Bestandteile aufgetrennt (vgl. HPLC). Die Analyten werden nach Austritt aus der Säule ionisiert und anschließend durch einen elektrischen Impuls beschleunigt. Die resultierende Geschwindigkeit v ergibt sich aus:

$$e * U = \frac{m * v^2}{2} \quad (\text{mit: } e = \text{Elementarladung, } U = \text{Beschleunigungsspannung, } m = \text{Masse})$$

Die beschleunigten Partikel durchlaufen dann eine feldfreie Driftröhre und treffen an deren Ende auf einen Detektor. Aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Ionen ($\sqrt{v} \sim \frac{1}{m}$) erreichen die Analyten den Detektor zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Abbildung 1-9).

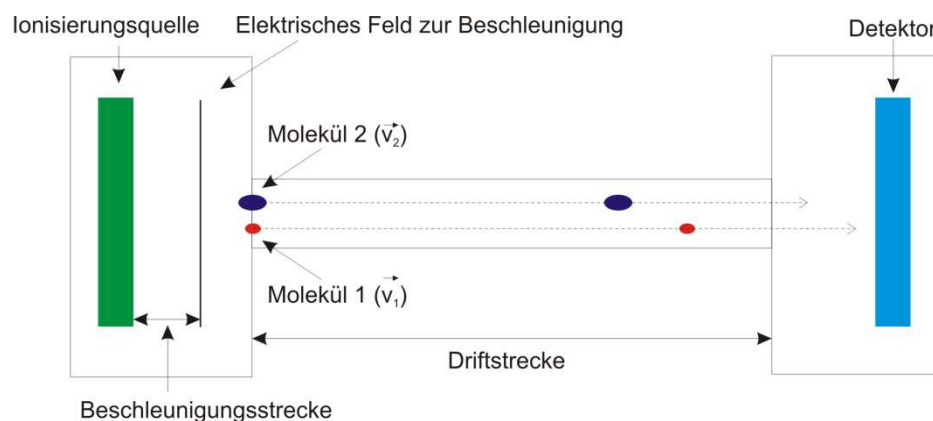


Abbildung 1-9: Schematische Darstellung eines Flugzeit-Analysators (TOF). Die Moleküle werden zunächst ionisiert, anschließend beschleunigt und treten gleichzeitig in eine Driftstrecke ein. Je nach Masse des Moleküls erhalten sie verschiedene Geschwindigkeiten. Molekül 1 ist leichter als Molekül 2 und fliegt somit schneller ($v_1 > v_2$). Daraus ergeben sich unterschiedliche Flugzeiten, Molekül 1 erreicht den Detektor eher als Molekül 2. Über die Flugzeiten kann auf die Masse des Moleküls geschlossen werden.

Die Flugzeit t berechnet sich nach:

$$t = d * \sqrt{\frac{m}{2 * z * U}} \quad (\text{mit } d = \text{Länge der Driftröhre, } z = \text{Anzahl der Ladungen})$$

Die Flugzeit ist demnach proportional zur Wurzel des Masse/Ladungsverhältnisses m/z . Berücksichtigt man, dass auf Grund der kurzen Beschleunigungszeiten alle Ionen zur gleichen Zeit in die Driftröhre gelangen, bedeutet das, dass zu jedem Zeitpunkt nur eine Molekülklasse mit definiertem m/z den Detektor erreicht, leichtere Moleküle früher, schwerere später. Über den Zeitpunkt, an dem der Detektor ein Signal generiert, lässt sich

somit die Masse des Analyten bestimmen. Dieser Prozess wird mit dem Eluat aus der Chromatographiesäule periodisch in kurzen Zeitabständen (μs - ms) wiederholt. Dies resultiert in einem LC-Spektrum mit korrespondierenden Massenspektren, die zu jedem Zeitpunkt die Massenverteilung des Eluats anzeigen.

Was macht nun dieses Verfahren so geeignet für den Einsatz in der Lipidomik? Das häufig angewandte Verfahren der LC-MS (oder LC-MS/MS) hat mehrere entscheidende Vorteile: Zunächst muss man sich vor Augen führen, dass ein LC-MS System die Analyten nach zwei unabhängigen, spezifischen Merkmalen auftrennt, wodurch man auch komplexe Moleküle detailliert untersuchen kann: Die LC trennt nach dem Laufverhalten (Retentionszeit), das MS selektiert nach der Molekülmasse. Beim Einsatz von LC-MS/MS werden zusätzlich Aussagen über die Struktur der Analyten getroffen. Des Weiteren ist die Sensitivität der heutigen MS-Systeme um mehrere Größenordnungen höher als bei den klassischen Nachweisverfahren. Das ermöglicht die Detektion von Komponenten, die nur in sehr kleiner Menge vorliegen ($\sim\text{fmol}$) oder die Untersuchung von sehr kleinen Ausgangsmengen ($\sim 10^6$ Zellen) [111]. Im speziellen Fall der Sphingolipidomik bietet sich die Möglichkeit, den größten Teil der störenden Glycerolipide aus dem Extrakt zu entfernen: Durch milde Verseifung werden die Fettsäuren vom GlycerinGrundgerüst abgespalten, und die stabilen Sphingolipide können aus dem Ansatz extrahiert werden [125]. Durch die Entfernung der Glycerolipide, die ja in weitaus größeren Mengen in den Membranen enthalten sind, steigert sich die Messgenauigkeit für Sphingolipide beträchtlich. Zudem korreliert die Signalintensität der via LC-MS analysierten Sphingolipide mit ihrer Konzentration in der Probe, wodurch eine Quantifizierung möglich ist. Durch die Zugabe von internen Standards (Sphingolipide mit speziellen Strukturen, die in der Probe nicht vorkommen, den Analyten aber bezüglich der Ionisierungseffizienz ähneln) während der Extraktion können Verluste bei den Aufarbeitungsschritten (z.B. Extraktion, Verseifung etc.) sowie Unterschiede in der Ionisierbarkeit und Fragmentierung der verschiedenen Lipidspezies nachvollzogen werden. Durch Normalisierung der Signale auf die Werte der Standards kann eine Quantifizierung der einzelnen Komponenten erfolgen.

Abschließend sei hierzu noch erwähnt, dass die Entwicklung neuer Verfahren zur Messung von Lipidprofilen immer weiter voran schreitet. So können beispielsweise zusätzliche Strukturinformationen über ein zweidimensionales (2D) ESI MS gewonnen werden, wobei die Lipide sowohl im positiven als auch im negativen Modus mit unterschiedlichen Addukten gemessen werden können („Shotgun“ Lipidomik) [126-128]. Ansätze wie die hochauflösende Nanospray-Massenspektrometrie [129] oder ultra-hochauflösende Massenspektrometrie erreichen eine hohe Messgenauigkeit auch bei der Detektion geringster Mengen von Analyten [130, 131]. Ein Problem, das jedoch bei all diesen Methoden bestehen bleibt, ist, dass die Lipide vor der Messung aus dem Zellmaterial

extrahiert werden müssen, und somit aus ihrer biologischen, topologischen und subzellulären Umgebung entfernt werden. Jedoch gerade Informationen über die Lokalisierung der Lipide sind wichtig, um ihre biologischen Funktionen zu verstehen. Die „imaging mass spectrometry“ (SIMS) sowie verfeinerte MALDI Systeme versuchen dieses Problem zu lösen. Hierbei trifft ein stark fokussierter Strahl von Primärionen auf die Oberfläche einer biologischen Probe und erzeugt so einen Strom von Sekundärionen aus dem Material, der anschließend vermessen wird. Der Primärionenstrahl wandert über die Probe (z.B. einen Gewebeschnitt), und so erhält man ein zweidimensionales Lipidprofil der Probe. Mit dieser Methode wurde beispielsweise die Verteilung der Sphingolipide in einem Gewebeschnitt aus einem Gehirn oder der Aortawand aufgeklärt [132, 133].

1.3 Biologische Funktionen von Sphingolipiden

Mit den Fortschritten in der Analyse der Sphingolipidzusammensetzung und der genetischen Grundlage ihrer Synthese wurden auch vermehrt biologische Prozesse gefunden, in welchen Sphingolipide eine wichtige Rolle spielen. Sie übernehmen Aufgaben in der Zell-Zell-Erkennung, Signaltransduktion und der Regelung des Zellzyklus.

- **Funktion in Säugern**

Sphingolipide spielen vielfältige Rollen in Signalprozessen. So sind Ceramid, Ceramid-1-Phosphat (Cer1P), Sphing-4-enin und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) mit zum Teil antagonistischer Wirkung in Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose involviert [134]. Sphing-4-enin, das erste Sphingolipid, dessen bioaktive Wirkung erkannt wurde, beeinflusst Proteinkinasen [135]. Zusammen mit verwandten Sphingobasen spielt Sphing-4-enin eine Rolle in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts, der Endozytose und der Induktion der Apoptose (Abbildung 1-10).

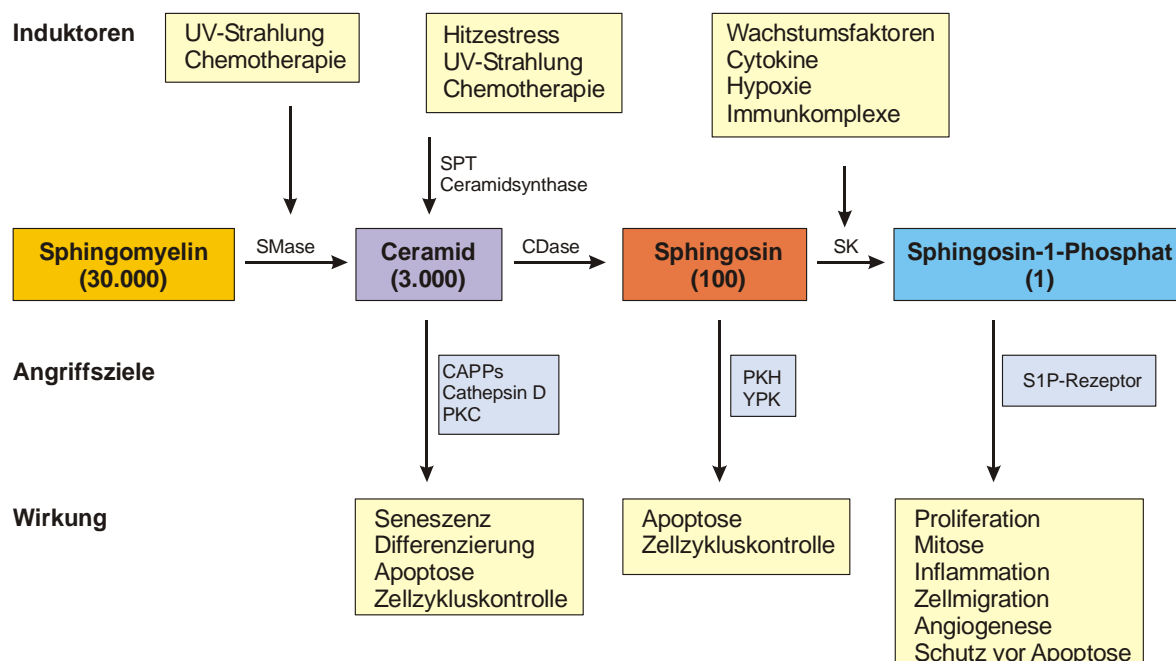


Abbildung 1-10: Überblick über die Rolle von Sphingolipiden [verändert nach [134]]. Das Schema zeigt den möglichen Einfluss der Lipide Ceramid, Sphing-4-enin und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) auf zellbiologische Prozesse. Ceramid kann durch den Abbau komplexer Sphingolipide (z.B. Sphingomyelin, IPCs) entstehen, oder mit Hilfe der Enzyme Serin-Palmitoyl-Transferase (SPT) und Ceramid-Synthase neu synthetisiert werden. Beide Prozesse können durch z.B. Stressfaktoren induziert werden. Ceramidasen (CDasen) und Sphingosin-Kinasen (SKs) sind für die Bildung von Sphing-4-enin und S1P zuständig. Letztere interagieren ihrerseits mit weiteren Kinasen, Phosphatasen oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (S1P-Rezeptoren), die für die Wirkung der Induktoren auf die Zelle(n) verantwortlich sind. Die Zahlen in Klammern stehen für die relativen Mengenverhältnisse der Sphingolipide in Säugerzellen. CAPP - Ceramid-aktivierte Ser-Thr Phosphatase; Cathepsin D – Protease, involviert in intrazellulären Proteinabbau und Pathogenese (Brustkrebs, Alzheimer); PKC - Proteinkinase C; PKH – PKC-homologes Enzym; YPK – Proteinkinase der Hefe.

Ceramide sind wichtige Signalüberträger in der Stressantwort (z.B. bei Hitzestress [136]), einschließlich der Regulation des programmierten Zelltods und der Seneszenz [137, 138], wohingegen S1P eine entscheidende Rolle für die Überlebensrate und die Zell-Migration spielt. Während jedoch Ceramid und Sphing-4-enin die Einleitung des programmierten Zelltodes fördern, wird dies durch S1P verhindert (Abbildung 1-10). Weitere bioaktive Sphingolipide sind Cer1P (das im vesikulären Transport beteiligt ist), GlcCer und Dihydroceramid. Sprong et al. [139] zeigten mit entsprechenden Mutanten, dass GlcCer in melanisierten Säugerzellen notwendig für den Transport der Melanin-Synthese-Enzyme vom Golgi zu den Melanosomen ist. Durch exogene Gabe von GlcCer konnte dieser Defekt wieder komplementiert werden [139, 140], der genaue Mechanismus (einschließlich einer Beteiligung von Membranmikrodomänen) ist jedoch noch nicht bekannt. Die Signalfunktion von Sphingolipiden macht eine strikte Regulation ihrer Synthese notwendig. Beispielsweise ist in GCS-defizienten Zellen die Ceramidmenge nur geringfügig erhöht. Gleichzeitig stellt der Sphingolipid-Metabolismus einen Angriffspunkt für Pathogene dar [141, 142]. Außerdem

spielen Sphingolipide bei der Ausprägung von Krankheiten wie Diabetes [143, 144], verschiedenen Arten von Krebs [145, 146], Alzheimer [147] sowie kardiovaskulärer Krankheiten [148] und neurologischer Syndrome [149] eine Rolle.

- **Funktionen in Pflanzen und Algen**

Über die Funktion von Sphingolipiden in Pflanzen ist bisher wenig bekannt, eine Beteiligung an ähnlichen Prozessen wie in Säugern ist jedoch wahrscheinlich [150, 151]. Die RNAi-vermittelte Reduktion der *LCB2* (Untereinheit der SPT) ist in *Arabidopsis* letal für die Samenentwicklung [152]. Dies zeigt, dass Sphingolipide auch in Pflanzen essentiell für Entwicklungsprozesse und Zell-Zell-Interaktionen sind. Auch Signalfunktionen von Ceramid und S1P im Rahmen der Stressantwort [153] und deren Rolle für die Induktion des programmierten Zelltods [154] wurden nachgewiesen.

Kältesensitive Pflanzen enthalten mehr GlcCer als kältetolerante, und auch die Zusammensetzung der Sphingolipid-Spezies variiert [155]. So ist der relative Anteil C4-hydroxylierter, $\Delta 8$ -desaturierter Sphingolipide in kältetoleranten Pflanzen höher als in kältesensitiven. Weiterhin wurde postuliert, dass Austrocknungsresistenz und Stomataschluss in *Arabidopsis* S1P-abhängig sind [156]. Die Notwendigkeit von S1P für beide eben genannte Prozesse konnte durch Analyse verschiedener Sphingolipid- $\Delta 4$ -Desaturase Mutanten inzwischen widerlegt werden [157]. Jedoch spielt die $\Delta 8$ -Desaturierung der Sphingobase eine Rolle für die Aluminium-Resistenz von Hefe und Pflanzen [158, 159]. Die $\Delta 8$ -Desaturase der Aluminium-toleranten Asteraceae *Stylosanthes hamata* zeigt im Gegensatz zur $\Delta 8$ -Desaturase von Aluminium-sensitiven Pflanzen eine Präferenz, die Doppelbindung am C8 der Sphingobase in *cis*-Konfiguration einzufügen. Ersetzt man die *Arabidopsis*-eigene $\Delta 8$ -Desaturase mit *trans*-Präferenz durch das Peptid aus *Stylosanthes* oder exprimiert das Gen in *Saccharomyces*, erhöht sich dadurch die Toleranz gegenüber Aluminium [159]. Sphingolipide sind möglicherweise auch direkt an dem Transport bestimmter Proteine beteiligt. In einer Sterol-freien *Arabidopsis*-Mutante ist der Transport des Kanalproteins PIN1 unterbrochen [160]. PIN1 ist verantwortlich für den polaren Transport des Phytohormons Auxin in der Wurzel. Die Fusion der PIN1-tragenden Vesikel mit der Plasmamembran ist ebenfalls in der so genannten *pasticcino3*-Mutante von *Arabidopsis* gestört [161], die als Folge des unterbrochenen Auxin-Transportes Wachstumsdefizite aufweist. Genetischer Hintergrund ist eine Punktmutation im Gen, das für die AcetylCoA-Carboxylase codiert. Dadurch können die Zellen kein Malonyl-CoA und somit keine sehr langkettigen Fettsäuren in den Sphingolipiden synthetisieren [162].

Neueste Untersuchungen zeigen einen Effekt, in dem mit Hilfe von Sphingolipiden ein ganzes Ökosystem beeinflusst werden kann: Die marine Kalkalge *Emiliania huxleyi* aus der Ordnung der Coccolithophorida ist für ca. 50% der marinen Kohlenstofffixierung aus der

Atmosphäre verantwortlich (größtenteils über CO₂-Speicherung als CaCO₃ in ihrem Kalkskelett). In den alljährlich auftretenden Algenblüten (bis zu 10⁵ km²) macht diese Algenart bis zu 90% der Biomasse aus. In diesem Stadium kann eine starke Infektion von *E. huxleyi* mit einem lytischen dsDNA-Virus (EhV-86) nachgewiesen werden, die einen Kollaps der Algenpopulation herbeiführt. DNA-Sequenzvergleiche zwischen diesem Virus und *E. huxleyi* ergaben, dass sie beide einen nahezu identischen Satz von Genen haben, die für einen kompletten SL Syntheseweg codieren [163]. Kurze Zeit nach der Infektion werden die viralen Gene exprimiert. Dies führt zur Synthese von GlcCer mit Strukturmerkmalen, die normalerweise nicht in *E. huxleyi* vorkommen. Dadurch ergibt sich ein rascher Anstieg an C₁₆-LCB-haltigen GSL. Dies bedingt zusammen mit einer erhöhten Caspase-Aktivität den Zelltod und schließlich die Lyse der Algen. Nach der Freisetzung aus dem Zellinneren steigt die GSL-Konzentration in der nahen Umgebung auf toxische Werte an und kann zum Abtöten benachbarter Zellen führen und so das Absterben der gesamten Algenblüte beschleunigen [164].

- **Funktionen in Pilzen**

Die Funktion von Sphingolipiden in Pilzen wurde vor allem durch Analyse verschiedener Mutanten der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht [165-167]. Die optimale Wachstumstemperatur für die Hefe *S. cerevisiae* beträgt 30°C. Wird die Temperatur auf 37-39°C erhöht, reagiert die Hefe auf diesen Hitzeschock mit einer vorübergehenden Einstellung des Wachstums. Der Zellzyklus der Hefe wird dabei spezifisch und reversibel in der G1-Phase angehalten. Die Blockade des Zellzyklus ist mit einer geringeren Expression der G1-Zykline Cln1p und Cln2p verbunden [168]. Diese Reaktion wird von einer schnellen und vorübergehenden Zunahme der Menge der freien Sphingobasen Sphingamin und 4-Hydroxysphingamin begleitet, der eine langsamere und länger anhaltende Zunahme der Menge von Ceramid folgt [68, 69, 169]. Die Zunahme der Menge von freien Sphingobasen und Ceramid erfolgt dabei durch Neusynthese. Die freien Sphingobasen, vor allem 4-Hydroxysphingamin, scheinen die eigentlichen Auslöser der Hitzeschockantwort zu sein [170, 171]. Einige Zeit nach der Einstellung des Wachstums wird der Zellzyklus wieder aufgenommen. Für die Wiederaufnahme des Wachstums sind die Sphingobasen-Kinasen Lcb4p und Lcb5p sowie das G1-Zykin Cln3p und das S-Zykin Clb5p notwendig [170, 172].

Durch Inhibierung der IPC-Synthase und der GCS in *Aspergillus nidulans* konnte gezeigt werden, dass Sphingolipide auch in Pilzen essentiell für polares Zellwachstum sind [31, 173]. Insbesondere die Synthese von GIPCs hat für Pilze eine lebenswichtige Rolle. Wie bereits in 1.2 angedeutet, führt die Deletion der Ceramidsynthase, welche für die Produktion der Ceramid-Grundgerüste der GIPCs verantwortlich ist, in *A. nidulans* zu einer Mutante, die sehr kleine und morphologisch veränderte Hyphen bildet [30]. Auch *S. cerevisiae* Mutanten,

welche durch die Deletion von *LAG1* und *LAC1* oder *LIP1* nicht mehr in der Lage sind Ceramide und somit GIPCs zu synthetisieren, sind in ihrem Wachstum stark eingeschränkt [24, 174]. Dieser Phänotyp kann durch die Expression der humanen CerS5 komplementiert werden, was jedoch zur Bildung von GIPCs mit C₁₆ Fettsäuren führt [174]. Glucosylceramide sind außerdem Pathogenitätsfaktoren verschiedener filamentöser Pilze. Die Pathogenität von GCS-*knockout*-Mutanten des phytopathogenen Pilzes *Ustilago maydis* und die des humanpathogenen *Cryptococcus neoformans* ist reduziert [175, 176]. Im Gegensatz zu Säugerzellen sind Teliosporen von *Ustilago maydis* auch bei ausgeschalteter GCS zur Melanin-Synthese befähigt [175]. Eine reduzierte Pathogenität wurde ebenfalls für die *IPC1-knockout*-Mutante von *C. neoformans* nachgewiesen [177]. Das Ausschalten der GCS in *Fusarium graminearum* führt ebenfalls zu einer reduzierten Pathogenität, jedoch nicht in allen potentiellen Wirtsorganismen [178].

- **Glycosphingolipide interagieren mit antimikrobiellen Peptiden**

Alle lebenden Organismen, vom Einzeller bis zu höheren Pflanzen und Tieren, haben Strategien entwickelt, um sich gegen den Angriff von Pathogenen zu verteidigen. Das bekannteste System hierfür ist die adaptive Immunabwehr, bei welcher mittels Antikörpern und spezialisierter Zellen körperfremde Eindringlinge bekämpft werden. Die fremden Zellen werden über spezifische Moleküle (Antigene) erkannt, und die Immunantwort wird in einer Kaskade von biologischen Prozessen in Gang gesetzt. Diese Art der Verteidigung gegen Pathogene ist aber nur in höheren Säugetieren bekannt [179]. Neben der adaptiven Immunität existiert mit dem Mechanismus der angeborenen Immunität eine phylogenetisch alte Verteidigungsstrategie, die unter anderem die Bildung antimikrobieller Peptide (AMP) einschließt [180]. Die AMP haben einen weiten Wirkungsbereich und können in der Verteidigung gegen Viren, Bakterien, Pilze oder Parasiten eingesetzt werden. Die Moleküle besitzen zwar nicht die Fähigkeit der spezifischen Antigenerkennung wie Antikörper, können aber, da sie durch die Expression lediglich eines Genes entstehen, nach erfolgter Infektion relativ schnell und mit weniger Energieaufwand und Biomasse produziert werden [181]. Die Nomenklatur der AMP richtet sich nach dem jeweiligen Zielorganismus, so werden beispielsweise antimykotische Peptide „AFP“ (*anti-fugal-peptide*) genannt. Innerhalb der AMP gibt es eine Klasse konservierter Peptide, die in Pflanzen, Invertebraten und Vertebraten vorkommt, die Defensine. Defensine sind relativ kleine kationische Peptide (ca. 35 – 55 AS), die auf Grund ihres hohen Anteils an Cystein drei bis vier Disulfidbrücken aufweisen.

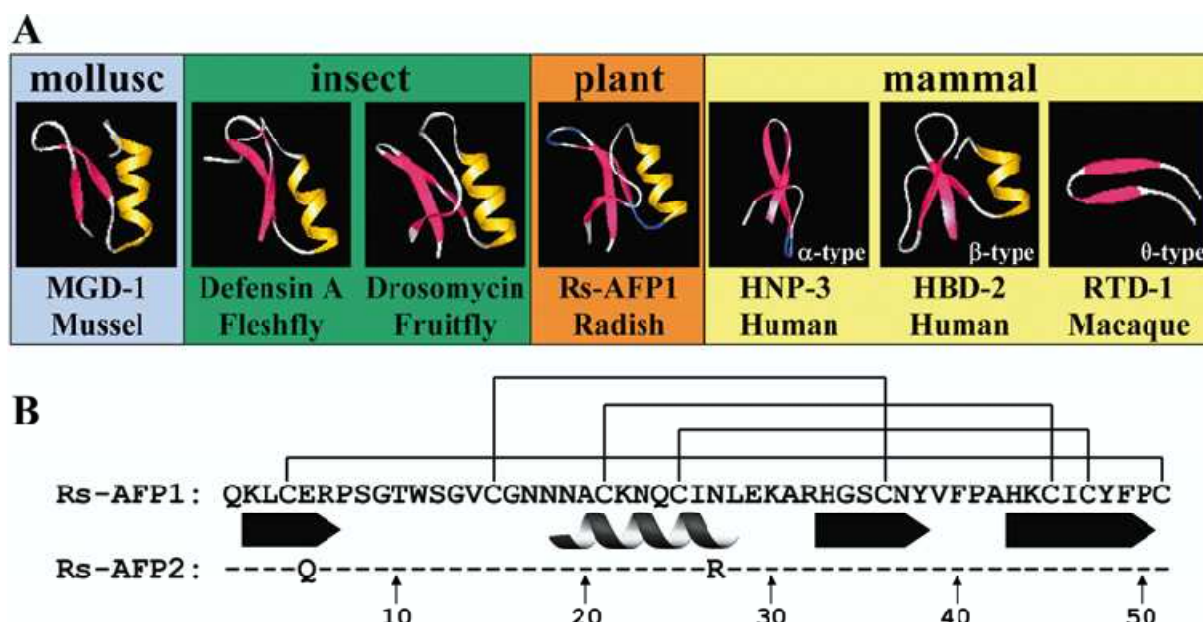


Abbildung 1-11: Strukturvergleich der Defensine aus Pflanzen, Invertebraten und Vertebraten. **A** zeigt die dreidimensionalen Strukturen von Defensinen aus Invertebraten (Mollusk, Insekt), Pflanzen und Vertebraten (Säuger). Die α -Helices sind gelb, die β -Faltblätter rot dargestellt. **B** zeigt die Aminosäuresequenzen der pflanzlichen Defensine Rs-AFP1 und Rs-AFP2 im Vergleich. Die Striche in Rs-AFP2 stehen für identische Aminosäurereste. Die Verbindungslinien zwischen Cysteinresten symbolisieren die Disulfidbrücken im Peptid. Die sekundären Proteinstrukturen sind als Pfeile (β -Faltblätter) bzw. Spirale (α -Helix) den entsprechenden Aminosäureresten zugeordnet [181].

Die Untersuchung der Wirkmechanismen der verschiedenen Arten von AMP gestaltet sich als schwierig, doch gibt es erste Aufschlüsse über die biophysikalischen und biochemischen Vorgänge bei der Interaktion von Defensinen mit dem Zielorganismus. Der erste Schritt, die Bindung an die Membran des Zielorganismus, wird über die Wechselwirkung der kationischen Defensine mit negativ geladenen Lipiden in der Membranaußenseite ermöglicht. Im Falle von Gram-negativen Bakterien wurde gezeigt, dass das Defensin mit den Lipopolysacchariden (LPS) interagiert, die bis zu vier negativ geladene Gruppen in ihrem Grundgerüst haben, zwei Phosphatgruppen im Lipid A und zwei Säuregruppen im 2-Keto-3-desoxy-octonat (KDO) [182, 183]. Bei Pilzen können die $M(IP)_2Cs$ (Abbildung 1-5) als Angriffspunkt für die Defensine dienen, da die Phosphatgruppen die benötigte negative Ladung tragen. Gendeletionsmutanten von *S. cerevisiae*, die kein $M(IP)_2C$ mehr synthetisieren können, sind resistenter gegen das Defensin DmAMP aus Dahlie (*Dahlia merckii*) [184, 185].

Nachdem die Defensine an die Membran gebunden haben, können sie sich beispielsweise in diese einlagern und so für die Bildung von Poren sorgen. Dies führt zu einem erhöhten Calciumfluss in die Zelle, Kaliumfluss aus der Zelle, einem Zusammenbruch des Membranpotentials und schließlich zum Tod der Zelle [186, 187]. Auch hier muss beachtet werden, dass kein allgemeingültiger Mechanismus für die biologische Wirksamkeit

von Defensinen gibt. Ob die Peptide Poren bilden, großflächige Läsionen bewirken, oder durch die Membran ins Zellinnere gelangen, muss für jedes AMP separat bestimmt werden.

Interessanterweise gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass auch ungeladene Lipide an der Sensitivität gegen Defensine beteiligt sein können. Deletionsmutanten der Hefen *Pichia pastoris* und *Candida albicans*, die kein GlcCer (Nettoladung null) bilden können, zeigen eine höhere Toleranz gegen das Defensin RsAFP2 aus Rettich (*Raphanus sativus*) [188]. Bei einem anderen antimycotischem Peptid aus *Aspergillus giganteus* (AgAFP) vermutet man ebenfalls eine Beteiligung von GlcCer [189]. Sensitiv gegen AgAFP sind allerdings nur solche Organismen, die eine $\Delta^3(E)$ -Doppelbindung im GlcCer tragen. Dieser Effekt wurde auch durch die Expression einer Δ^3 -Desaturase in *P. pastoris* bestätigt. Eine Δ^3 -Doppelbindung im GlcCer von *Pichia* erhöht die Sensitivität gegen RsAFP und AgAFP [75]. Auf welche Weise das GlcCer und dessen Modifikationen die Interaktion mit Defensinen beeinflussen, ist bislang noch ungeklärt.

Auf der Suche nach neuen Antibiotika sind in den letzten Jahren die AMP immer mehr in den Vordergrund gerückt. Aufgrund ihrer Eigenschaft, direkt mit Komponenten der Membran der Pathogenen zu interagieren, sowie ihres breiten Wirkspektrums wären sie eine Alternative zu den heute gängigen Verbindungen. Denn eine Resistenzbildung der Zielorganismen durch eine spontane Änderung der Zusammensetzung der Membranlipide konnte bislang noch nicht beobachtet werden [190-192].

1.4 *Pichia pastoris* als Modellorganismus

Die Aufklärung der Funktionsweisen von Proteinen in eukaryoten Organismen kann auf Grund fehlender Modifikationen der beteiligten Enzyme (z.B. Glycosylierung, Faltung) nicht in prokaryoten Standardsystemen wie *Escherichia coli* durchgeführt werden. Aus diesem Grund hat sich der Organismus *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus für die Beschreibung eukaryoter Stoffwechselwege etabliert. Von *S. cerevisiae* sind daher viele verschieden modifizierte Stämme erwerblich, und es existieren auch etliche molekularbiologische und biochemische Werkzeuge. Auch die Stoffwechselwege für die Synthese von Glycosphingolipiden in *Saccharomyces* sind schon detailliert beschrieben [166]. Wie jedoch schon in 1.1 beschrieben, ist *S. cerevisiae* kein repräsentativer Modellorganismus für die Biosynthese von Glycosphingolipiden, denn sein Sphingolipidmuster ist eine Ausnahme im Reich der Pilze. Im Gegensatz zu den meisten anderen Pilzspezies synthetisiert *S. cerevisiae* nur GIPCs, aber keine Glycosylceramide [29, 128, 166]. Das Vorhandensein nur einer Klasse von Sphingolipiden und somit auch nur einer Klasse von Ceramidgrundgerüsten simplifiziert die Biosynthese. Die Lipidzusammensetzung der Modellhefe *Pichia pastoris* hingegen ist repräsentativ für das Reich der Pilze, denn es

werden sowohl GlcCer als auch GIPCs produziert [50]. Die Struktur der beiden GSL Spezies ist in Abbildung 1-12 dargestellt. Der Mechanismus, wie ein Organismus verschiedene komplexe Sphingolipide mit jeweils definierter Zusammensetzung aus Sphingobase, Fettsäure und Kopfgruppe synthetisieren kann, soll untersucht werden.

Pichia pastoris ist eine methylo-trophe Hefe, die oft als Expressionssystem verwendet wird. Daher sind auch für *Pichia* einige molekularbiologische Methoden etabliert, und das vollständige Genom ist ebenfalls verfügbar [193]. Im Gegensatz zu *Saccharomyces* werden Expressionskonstrukte in *Pichia* stabil ins Genom integriert und liegen nicht als extrachromosomale Plasmide vor. Unter optimalen Wachstumsbedingungen ist die Generationszeit mit ca. 2h äußerst kurz, was eine schnelle Anzucht ermöglicht. Dieser Organismus eignet sich daher bestens für die Aufklärung der Biosynthese von Glycosphingolipiden in eukaryoten Organismen. Zusätzlich dazu bietet *P. pastoris* auch die Möglichkeit neue Einsichten in die Wirkungsweise von Defensinen zu gewinnen.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Nahezu alle eukaryoten Lebewesen besitzen verschiedene Typen von glycosylierten Sphingolipiden. In dieser Arbeit soll geklärt werden, wie es die Modellhefe *Pichia pastoris* bewerkstelligt die Synthesewege von GlcCer und IPC (Abbildung 1-12) zu trennen. Die Ausgangssubstrate sind großteils identisch (Acyl-CoA), die Produkte hingegen unterscheiden sich in vielen Punkten (Fettsäure, Sphingobase und Kopfgruppe) und treten jeweils strikt getrennt auf.

Über Sequenzvergleiche mit anderen Organismen sollen zunächst Gene für Ceramidsynthasen in *Pichia pastoris* ermittelt und die korrespondierenden Enzyme charakterisiert werden. Es soll geklärt werden, ob diese Enzyme schon vor dem Anhängen der Kopfgruppe für eine Trennung verschiedener Ceramidspezies verantwortlich sind.

Anschließend werden die Ceramid- und Sphingolipid-Muster von zehn verschiedenen *Pichia pastoris* Mutanten, die Veränderungen im GlcCer Syntheseweg unterworfen sind, über verschiedene analytische Methoden bestimmt. Dadurch sollen neue Erkenntnisse gewonnen werden, wie die GSL-Synthese durch die Modifikationen der Ceramidgrundgerüste geregelt wird (Abbildung 1-12).

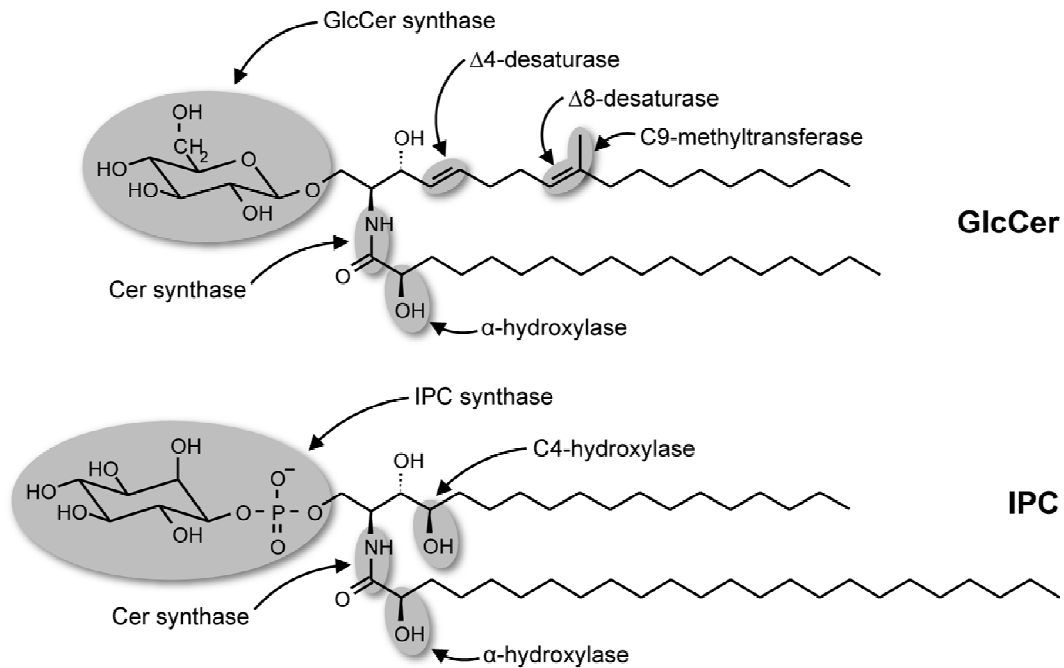


Abbildung 1-12: Strukturen der GSL in *Pichia pastoris*. *Pichia* synthetisiert zwei verschiedene Arten von glycosylierten Sphingolipiden. Glucosylceramid (GlcCer) mit einer d18:2-9m LCB und einer α -hydroxylierten C₁₈ Fettsäure und IPC mit einer t18:0 LCB und einer C₂₄-C₂₆ Fettsäure. Das IPC wird weiterhin zu MIPC und M(IP)₂C modifiziert. Die beteiligten Enzyme sind den jeweiligen Modifikationen zugeordnet.

Die Zusammenfassung aller Erkenntnisse ermöglicht es einen hypothetischen Syntheseweg für die Produktion von GlcCer und IPC in *Pichia pastoris* anzugeben.

2 Ergebnisse

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente teilen sich in zwei Vorgehensweisen auf: Zunächst sollten über bioinformatische Methoden mögliche Gene für Ceramidsynthasen aus *Pichia pastoris* auffindig gemacht werden. Die entsprechenden Enzyme sollten anschließend über molekularbiologische und analytische Methoden charakterisiert werden.

Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Analyse der Sphingolipidzusammensetzung verschiedener *Pichia pastoris*-Mutanten (HPLC, GC, LC-TOF). Mit Hilfe dieser Messungen sollen neue Erkenntnisse über die Biosynthese der verschiedenen Sphingolipidklassen (GlcCer und GIPC) gewonnen werden.

2.1 Charakterisierung der Ceramidsynthasen aus *Pichia pastoris*

Die Untersuchung der humanen Ceramidsynthasen (CerS1 – CerS6) ergab, dass jede von ihnen substratspezifisch bezüglich der Fettsäure-Kettenlänge ist und somit für die Synthese einer definierten Ceramidspezies verantwortlich ist. Bei Pilzen wurde festgestellt, dass die Anzahl von Sphingolipiden mit unterschiedlichen Ceramidgrundgerüsten mit der Anzahl verschiedener Ceramidsynthasen korreliert: *S. cerevisiae* synthetisiert nur GIPC und hat lediglich eine Klasse von Ceramidsynthasen (Lag1p/Lac1p). *A. nidulans* produziert GIPC und GlcCer und exprimiert zwei unterschiedliche Ceramidsynthasen (LagA und BarA). Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch in Pilzen die Synthese von unterschiedlichen Ceramiden (Ceramidpools) über spezifische Ceramidsynthasen geregelt wird: Ein Ceramidpool aus (4*E*,8*E*)-9-Methylsphinga-4,8-dienin und 2-Hydroxy-octadecansäure (d18:2-9m/18:0(2-OH)) für die Synthese von GlcCer, dessen Synthese von BarA-verwandten Enzymen katalysiert wird. Der andere Ceramidpool, der für GIPCs charakteristisch ist, wird von LagA-ähnlichen Enzymen synthetisiert und setzt sich aus 4-Hydroxysphinganin und 2-Hydroxyhexacosansäure (t18:0/26:0(2-OH)) zusammen.

2.1.1 *Pichia pastoris* besitzt zwei verschiedene Ceramidsynthase-Gene

Es sollte zunächst geklärt werden, ob die Modellhefe *Pichia pastoris* zwei unterschiedliche putative Ceramidsynthase-Gene hat. Hierfür wurden die Sequenzen der beiden Gene *LAGA* und *BARA* aus *A. nidulans* mit dem Genom von *P. pastoris* verglichen. Der Vergleich wurde von Dr. Cregg, Keck Graduate Institute, Claremont, CA, durchgeführt. Das Ergebnis zeigte tatsächlich zwei unterschiedliche Gene für putative Ceramidsynthasen. Das eine Gen, homolog zu *LAGA*, ist 1212 bp groß, und wird im Folgenden als *LAG1* bezeichnet. Das andere Gen, homolog zu *BARA*, ist 1137 bp lang und wird *BAR1* genannt.

In Abbildung 2-1 sind die Sequenzähnlichkeiten von Ceramidsynthasen aus verschiedenen Organismen dargestellt. Die beiden Enzyme sollten im Folgenden durch Deletion und Expression charakterisiert werden. Im Zuge dieser Sequenzvergleiche wurde zudem nach einem homologen Gen zu *LIP1* gesucht, der essentiellen Untereinheit von *LAG1/LAC1*, aus *S. cerevisiae*, dies blieb aber ohne positives Resultat.

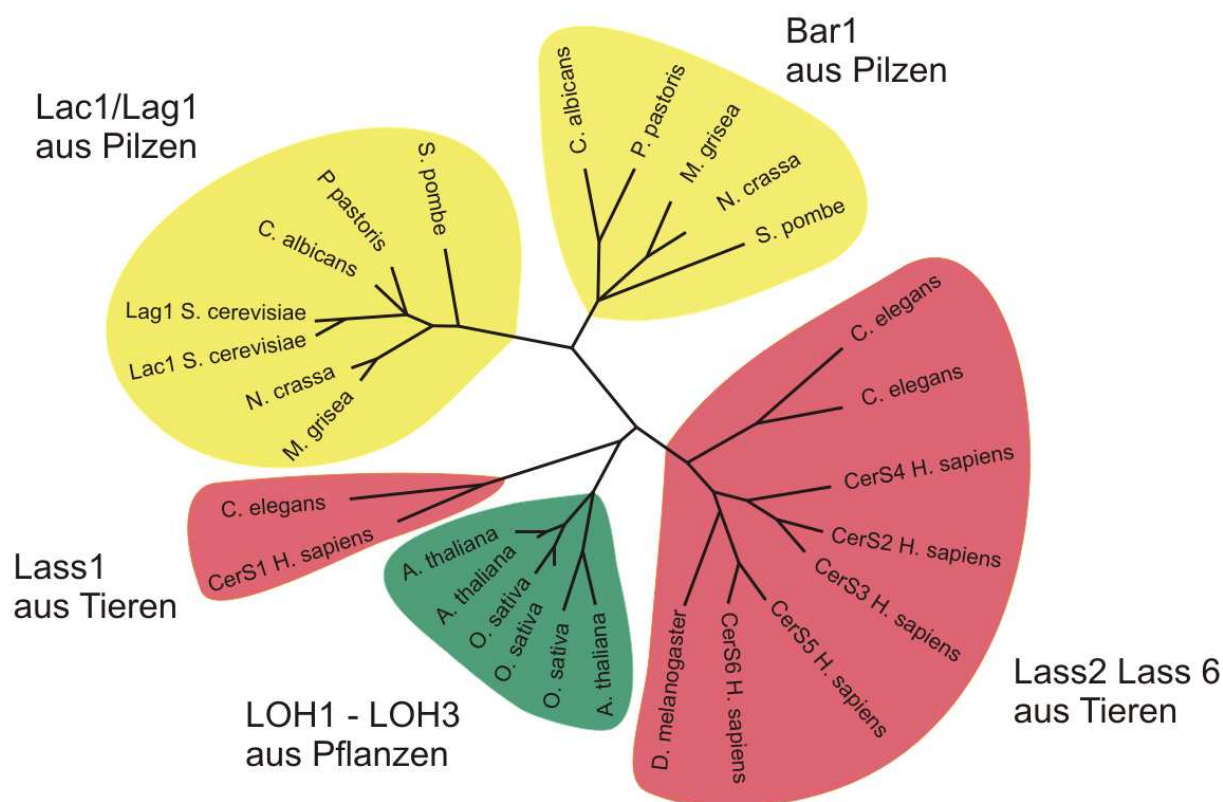


Abbildung 2-1: Sequenzvergleich verschiedener Ceramidsynthasen, verändert nach Ternes [194]. Die verschiedenen Ceramidsynthasen sind nach Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz gruppiert. Die Ceramidsynthasen aus Pflanzen bilden eine eigene Gruppe und sind bisher noch nicht funktionell charakterisiert. Bei den Ceramidsynthasen aus Tieren gibt es zwei Gruppen. Die Lass1-Enzyme sind sehr unterschiedlich zu Lass2 – Lass 6. Die pilzlichen Ceramidsynthasen lassen sich ebenfalls in zwei Gruppen einteilen. Eine mit großer Ähnlichkeit zu Lac1/Lag1 aus *S. cerevisiae* und eine Gruppe mit geringerer Verwandtschaft (Bar1).

2.1.2 Verlust von Glucosylceramid durch die Deletion von *BAR1* in *P. pastoris*

Für die Deletion der putativen Ceramidsynthase *BAR1* wurde die in 4.5 beschriebene Strategie angewandt. Die Sequenzen und Karten der im Folgenden beschriebenen Plasmide und Primer sind im Anhang zu finden.

Zunächst wurden über einen PCR-Ansatz die flankierenden Bereiche des *BAR1*-ORF amplifiziert. Als Template für diese Reaktionen diente genomische DNA aus *P. pastoris* GS115 Wildtyp. Die Reaktion wurde mit der PWO-Polymerase durchgeführt, da die Fehlerrate dieses Enzyms sehr gering ist. Für den 5'-Bereich sollte mit den Primern „5'-UTR-Bar1Pp_NotI-R“ und „5'-UTR-Bar1Pp_SacI-F“ ein Ampifikat von 715 bp hergestellt werden.

Die Amplifikation des 3'-Bereichs sollte mit den Primern „3'-UTR-Bar1Pp_NotI-F“ und „3'-UTRBar1Pp_EcoRI-R“ (532 bp Produkt) erfolgen. Eine Gelelektrophorese der PCR-Ansätze zeigte in beiden Fällen ein Amplifikat der gewünschten Größe. Die Produkte wurden über eine präparative Gelelektrophorese aus dem Ansatz gereinigt und nach Anfügen eines 3'-A-Überhangs separat in den Vektor pGEM-T kloniert (Plasmide 5'-UTR-Bar1Pp-pGem-T und 3'-UTR-Bar1Pp-pGEM-T). Anschließend wurden *E. coli*/XL1-Blue-tet^R-Zellen mit je einem dieser Plasmide transformiert, positive Klone (Ampicillin-resistent, blau-weiß-Screening) vereinzelt und die Plasmide über eine Minipräparation extrahiert. Aus je einem Plasmid mit korrekter Sequenz wurden die flankierenden Bereiche des *BAR1*-ORFs mittels Restriktion (NotI und SacI für 5'-Bereich sowie EcoRI und NotI für 3'-Bereich) separiert und zusammen in den Vektor pBluescript-KSII (mit SacI und EcoRI linearisiert) kloniert (5'+3'-UTR_Bar1_Pp pBSII). Anschließend wurden wiederum *E. coli*-Zellen mit diesem Plasmid transformiert und positive Klone (Amp-resistent) vereinzelt. Die Überprüfung auf korrekte Integration erfolgte über Restriktionsverdau von Plasmid-Minipräparationen mit verschiedenen Enzymen. Ein Plasmid, in welchem die beiden flankierenden Bereiche integriert waren, wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym NotI linearisiert. Dieses Plasmid wurde mit einer ClonNat-Resistenzkassette ligiert, welche mit dem Restriktionsenzym NotI aus dem Vektor pSLNat geschnitten wurde. Anschließend wurden *E. coli* mit diesem Plasmid transformiert. Die Selektion auf eine Aufnahme dieses Plasmids erfolgte wiederum über eine Ampicillin-Resistenz. Um sicher zu stellen, dass das Deletionskonstrukt korrekt vorliegt (5'-UTR_*BAR1* – ClonNat-Resistenzkassette – 3'-UTR_*BAR1*), wurden die Plasmide aus positiven Klonen vermehrt (Minipräparation) und über Restriktionsverdau mit verschiedenen Enzymen getestet.

Das Deletionskonstrukt konnte mit SacI/XhoI aus dem Plasmid (Bar1-KO-pBSII) geschnitten werden. Anschließend erfolgte die Transformation von *P. pastoris* GS115 Wildtyp mit dem Konstrukt. Um etwaige Probleme durch die Expression eines ungewollten Genabschnitts zu vermeiden, wurde der Versuch sowohl mit der Resistenzkassette in vorwärtiger (Bar1-KO-pBSII-ClonNat-fw) als auch in rückwärtiger (Bar1-KO-pBSII-ClonNat-rev) Orientierung durchgeführt. Die transformierten Zellen wurden auf Nourseothrecin-haltigen Agarplatten (15µg/ml) ausgestrichen und für ein bis zwei Tage bei 30°C inkubiert. Positive Klone (ClonNat-resistent) wurden anschließend auf selbigem Medium vereinzelt. Die Überprüfung auf Insertion des Konstrukts erfolgte auf genomischer Ebene mittels Kolonie-PCR. Zu diesem Zweck sollte aus der genomischen DNA der transformierten Zellen mit dem Primerpaar „Test-BarA-KO-ClonNat-rev-F“ und „Test-BarA-KO-ClonNat-rev-R“ (Resistenzkassette in gegenläufiger Orientierung) ein Produkt von 1115 bp amplifiziert werden. Die Durchführung dieses Versuchs ergab mehrere Klone, die dieses Produkt zeigten und in welchen zudem eine Amplifikation des ursprünglichen *Bar1*-ORFs (Primer

„BarAPp_BamHI-F“ und „BarA Pp_NotI_R“) kein Produkt lieferte. Dieses Muster zeigt, dass der *BAR1*-ORF nicht mehr vorliegt und durch das Deletionskonstrukt ersetzt wurde.

Um Veränderungen in der Lipidzusammensetzung dieser Klone zu bestimmen, wurden von jeweils zwei positiven Klonen 100 ml üN-Kulturen in Vollmedium angezogen (30°C, 200 rpm). Die Lipide wurden mit Chloroform/Methanol extrahiert und über eine Silica-Säule in Neutrallipide, Glycolipide und Phospholipide fraktioniert. Anschließend konnten die Lipide über DC getrennt und angefärbt (Abbildung 2-2) werden.

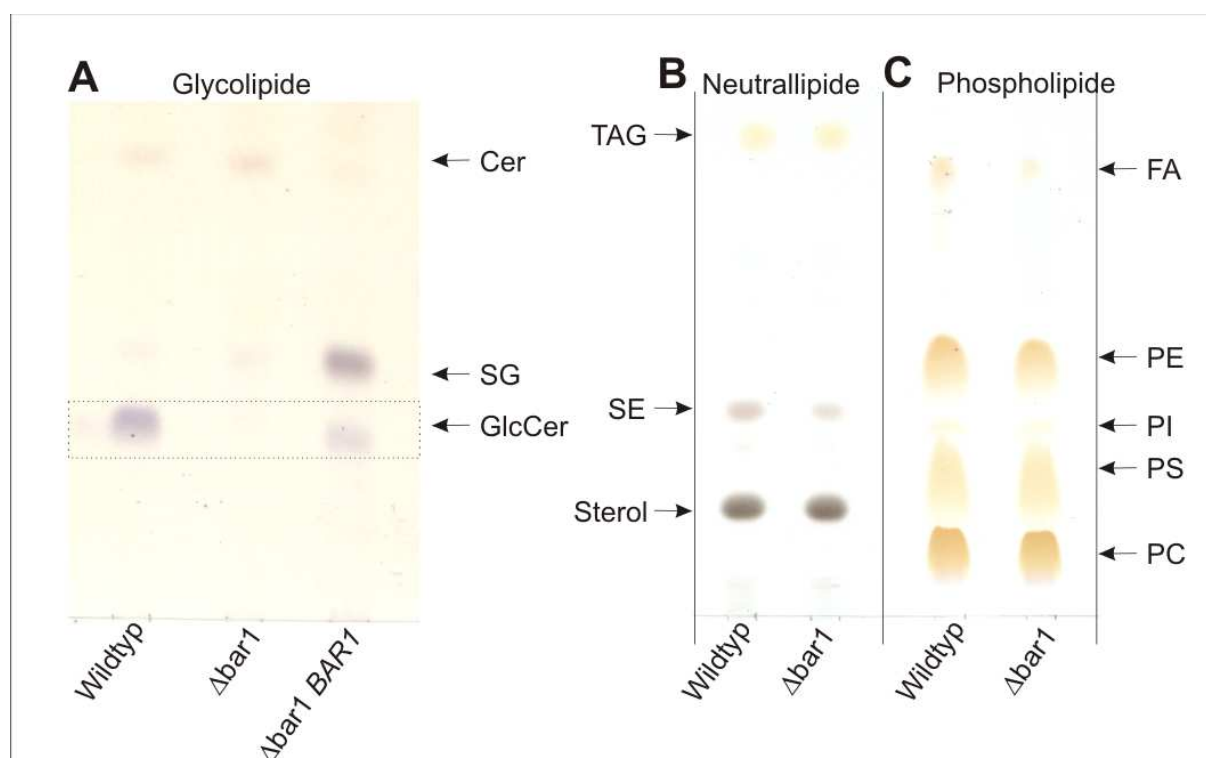


Abbildung 2-2: Dünnschichtchromatographische Analyse der Lipidfraktionen des *bar1*-KO-Stamms: A) Glycolipide: Wie erwartet synthetisiert der *bar1*-KO-Stamm kein GlcCer. Die Expression von *BAR1* in diesem Stamm lässt die GlcCer Bande wieder erscheinen. Die Bande im oberen Teil entspricht den freien Ceramiden. **B) Neutrallipide** und **C) Phospholipide:** Durch die Deletion von *BAR1* ergeben sich keine Unterschiede in der Zusammensetzung dieser Lipide. Laufmittel: A) Chloroform/Methanol 85:15 B) Petrolether/Diethylether/Essigsäure 70:30:0,5 C) Chloroform/Methanol/Essigsäure 65:28:8; Färbereagenz: A) α -Naphthol in 50% H_2SO_4 B) und C): 50% H_2SO_4 ;

Wie erwartet fehlt in den Glycolipidfraktionen des *bar1*-KO-Klons die GlcCer-Bande (Abbildung 2-2). Die anderen Lipide bleiben von der Veränderung im Genom weitgehend unberührt. Das gilt auch für die andere Art der Sphingolipide, die GIPCs. Diese Lipide sind weiterhin in unveränderter Menge und Struktur in den Zellen enthalten (Abschnitt 2.3). Ob der Verlust des GlcCer auch wirklich auf das Fehlen der Ceramide zurückzuführen ist, wird in Abschnitt 2.2 genauer untersucht, da die Analysen über DC nicht spezifisch genug sind, um Veränderungen im Muster aller Ceramidklassen detailliert darzustellen.

Um sicher zu stellen, dass die Veränderungen im Lipidmuster nur von der Deletion dieses Gens herrühren, sollte das *BAR1*-Gen in die *bar1*-KO-Mutante integriert werden. Für

die Komplementation wurde das *BAR1*-Gen mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert. Ein PCR-Ansatz (PWO-Polymerase) mit den Primern „BarApp_BamHI-F“ und „BarApp_NotI-R“ lieferte wie erwartet ein Fragment von 1153 bp. Nach Extraktion des Amplifikats über eine präparative Gelelektrophorese wurde ein 3'-A-Überhang angefügt und das Produkt in den Vektor pGEM-T kloniert (Bar1_Expr_pGEM-T). Anschließend wurden *E. coli* XL1-Blue tet^R-Zellen damit transformiert, positive Klone vereinzelt und die Plasmide isoliert. Die Überprüfung auf Richtigkeit der Sequenz erfolgte durch eine Sequenzierung des insertierten DNA-Fragments. Für die Expression des amplifizierten Produkts wurde dieses aus dem Plasmid über Restriktionsverdau (BamHI und NotI) isoliert und in den Expressionsvektor pPIC3.5 (BamHI, NotI-linearisiert) ligiert (Bar1_Expr_pPIC3.5). Nach Transformation von *E. coli*-Zellen und Selektion auf Ampicillin-Resistenz folgte die Überprüfung auf Insertion des *BAR1*-ORFs in den Expressionsvektor über Restriktionsverdau mit unterschiedlichen Enzymen.

Ein Plasmid mit intakter Sequenz des *BAR1*-ORFs wurde mit BglIII linearisiert und *bar1*-KO-Zellen damit transformiert (*bar1*-KO-*BAR1*). Positive Klone wurden über ein Methanol-Screening der transformierten Zellen gewonnen. Dem phänotypischen Screening folgte eine Überprüfung auf Insertion des Gens auf genetischer Ebene. Dafür wurde eine Kolonie-PCR sowohl mit dem Primerpaar „Test Expr BarA Fw“ und „3'AOX“ als auch mit dem Paar „Test Expr BarA R“ und „5'AOX“ durchgeführt. Beide Ansätze ergaben die erwarteten Produkte (562 bp, bzw. 566 bp). Damit ist sicher gestellt, dass das *BAR1*-Gen im Genom integriert ist und der Kontrolle des starken AOX-Promotors unterliegt. Positive Klone wurden in 100 ml YPD angezogen, gewaschen und in 100 ml MMM resuspendiert und weitere 20h bei 30°C inkubiert. Die Lipide wurden extrahiert, fraktioniert und analysiert. Wie erwartet entspricht das Sphingolipidmuster dieses Klons wieder dem des Wildtyps, GlcCer wird wieder synthetisiert (Abbildung 2-2). Die erhöhte Biosynthese von Sterylglucosid im *bar1*-KO-*BAR1* beruht auf der Kultivierung in Mangelmedium (Minimal-Methanol-Medium). Dieses Verhalten ist typisch für *Pichia pastoris* und kann auch für den Wildtyp beobachtet werden [57].

2.1.3 Versuche zur Charakterisierung von Lag1 in *Pichia pastoris*

Die Charakterisierung der zweiten putativen Ceramidsynthase (Lag1) sollte auf die gleiche Art und Weise erfolgen wie die von Bar1. Die Herstellung des Deletionskonstrukts entsprach dem in 2.1.1 beschriebenen Vorgehen. Die flankierenden Bereiche des *LAG1*-ORF wurden über einen PCR-Ansatz aus genomischer DNA amplifiziert: Der Ansatz für den 5'-Bereich mit den Primern „5'-URT-Lag1-Pp_PstI-R“ und „5'-UTR-Lag1-Pp_SacII-F“ ergab ein Fragment von 642 bp Länge. Der Ansatz für den 3'-Bereich unter Verwendung des Primerpaars „3'-UTR-Lag1-Pp_KpnI-R“ und „3'-UTR-Lag1-Pp_PstI-F“ brachte ein Produkt von 525 bp Länge. Nach Zwischenklonierung der Amplifikate in pGEM-T und Überprüfung der Sequenz wurden die Produkte in den Vektor pBluescript-SKII⁺ kloniert (5'+3'-UTR_Lag1_Pp pBSII, Klonierungsschnittstellen KpnI und PstI).

Im Gegensatz zur Deletion von Bar1 wurde bei diesem Konstrukt eine Zeocin-Resistenzkassette statt einer ClonNat-Kassette zwischen die homologen Bereiche eingefügt, um eine Zweifachdeletion beider Ceramidsynthase-Gene zu ermöglichen. Hierfür wurde das Plasmid „5'+3'-UTR_Lag1_Pp pBSII“ mit PstI linearisiert und mit der Resistenzkassette, welche mittels Restriktion (PstI) aus dem Vektor pGAPZ/B gewonnen wurde, ligiert. Die resultierenden Plasmide „Lag1-KO-pBSII-Zeo-fw“ (Zeocin-Kassette vorwärts) bzw. „Lag1-KO-pBSII-Zeo-rev“ (Zeocin-Kassette rückwärts) wurden mit Restriktionsverdau auf Richtigkeit der integrierten Abschnitte getestet (5'-UTR_LAG1 – Zeocin-Resistenzkassette – 3'-UTR_LAG1). Zudem wurde die komplette Sequenz des Deletionskonstrukts überprüft (DNA-Cloning-Service), wobei keine Fehler gefunden wurden. Trotzdem blieb eine Deletion des Gens in *P. pastoris* WT erfolglos. Auch nach zweiwöchiger Inkubation von transformierten *P. pastoris*-Zellen zeigten sich nur wenige Kolonien, welche mittels Kolonie-PCR überprüft und für falsch-positiv befunden wurden: Mit den Test-Primerpaaren „Test-LagA-KO-Zeo_fw-R“ und „Test-LagA-KO-Zeo_fw-F“ (Zeocin-Kassette vorwärts, Soll 956 bp) bzw. „Test-LagA-KO-Zeo_rev-R“ und „Test-LagA-KO-Zeo_rev-F“ (Zeocin-Kassette rückwärts, Soll 965 bp) konnte kein Produkt gewonnen werden. Das Primerpaar „LagA-Pp_NotI-R“ und „LagA-Pp_BamHI-F“ ergab jedoch in allen Kolonien ein Produkt von 1229 bp, was dem ursprünglichen ORF des *LAG1*-Gens entspricht. Ein Transformationsansatz mit einem Kontrollvektor brachte schon nach kurzer Zeit zahlreiche Transformanten, wodurch systematische Fehler in diesem Versuch ausgeschlossen werden konnten.

Eine mögliche Erklärung für dieses Problem wäre, dass *LAG1* essentiell für das Wachstum von *Pichia pastoris* ist. In diesem Fall könnte die Aufgabe des Enzyms von einer der humanen Ceramidsynthasen übernommen werden. Zu diesem Zweck wurde jeweils eine der humanen Ceramidsynthasen *CERS2* (spezifisch für C₂₄-FA) und *CERS5* (spezifisch für C₁₆-FA) in *P. pastoris* WT exprimiert. Hierfür eignet sich jedoch die induzierbare Expression

mit dem pPic3.5-System nicht, da die Zellen das Gen nur exprimieren, wenn sie mit Methanol als einziger Energiequelle wachsen. Hierbei ist das Wachstum jedoch langsam (im Vergleich zu Glucosemedium), was eine Selektion auf den Resistenzmarker erschwert. Deshalb wurde ein konstitutives Expressionssystem ausgewählt (pGapZ-Vektor). Der ORF von CerS2 wurde mit dem Primerpaar „CerS2_FW_XhoI“ und „CerS2_Rev_SacII“, der von CerS5 mit dem Paar „CerS5_FW_PmlI“ und „CerS5_Rev_XhoI“ amplifiziert. Als Template dienten die Plasmide „CerS2-pCMV 2b“ bzw. „CerS5-pCMV 2b“, die freundlicherweise von Herrn Dr. Anthony Futerman, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, zur Verfügung gestellt wurden. Die Amplifikate (1143 bp für CerS2 und 1179 bp für CerS5) wurden mit einem 3'-A-Überhang versehen, in pGEMT-T zwischenkloniert („CerS2-pGEMT“, bzw. „CerS5-pGEMT“) und die Sequenz überprüft (DNA-Cloning-Service). Die ORFs konnten anschließend über Restriktionsenzyme (XhoI, SacII für CerS2 und PmlI, XhoI für CerS5) freigesetzt und in den Vektor pGAPZ/B kloniert werden (CerS2-pGAPZ bzw. CerS5-pGAPZ). Die Selektion von *E. coli* geschah bei den Klonierungsschritten über die Zeocin-Resistenz des pGAPZ-Vektors. Die resultierenden Plasmide wurden mit dem Enzym AvrII linearisiert und *P. pastoris* GS115 Wildtyp damit transformiert. Die Überprüfung auf Insertion des Konstrukts in das Genom von *P. pastoris* erfolgte über Kolonie-PCR. Für CerS2 wurden die Primer „GapF“ und „CerS2-int-rev“ (Soll 847 bp) verwendet. Die Überprüfung der Insertion von CerS5 erfolgte über das Primerpaar „GapF“ und „CerS5-int-rev“ (Soll 781 bp). Es wurden Klone identifiziert, in welchen jeweils eines der gewünschten PCR-Produkte amplifiziert werden konnte (P.p_CERS2, bzw. P.p_CERS5)

Diese Klone dienten nun als Ausgangsorganismen für die Deletion der putativen Ceramidsynthase Lag1 aus *P. pastoris*. Das Deletionskonstrukt wurde wie oben beschrieben linearisiert und P.p_CERS2 bzw. P.p_CERS5-Zellen damit transformiert. Trotz erfolgreicher Insertion der humanen Ceramidsynthasen ergab sich das gleiche Ergebnis wie bei der Deletion von Lag1 in *P.pastoris* Wildtyp. Die wenigen Klone, die nach längerer Zeit anwachsen, wurden wie oben beschrieben auf genetischer Ebene überprüft und für falsch positiv befunden. Aus zeitlichen Gründen konnte nicht festgestellt werden, ob die humanen Ceramidsynthasen in diesen Klonen auch exprimiert werden und die gewünschte Aktivität zeigen.

Um das Enzym dennoch charakterisieren zu können, sollte das Gen kloniert und in *S. cerevisiae* lac1-KO/lag1-KO exprimiert werden. Die Amplifikation des LAG1-ORFs aus genomischer DNA von *P. pastoris* mit den Primern „LagA-Pp_NotI-R“ und „LagA-Pp_BamHI-F“ (1229 bp-Produkt) gestaltete sich problemlos. Die Zwischenklonierung in pGem-T zeigte hingegen nicht das gewünschte Resultat. Es ergaben sich Klone, welche nach Überprüfung mittels Restriktionsverdau ein Plasmid mit einem Insert in richtiger Größe beinhalteten. Die Überprüfung der integrierten Genabschnitte (DNA-Cloning-Service) ergab jedoch

ausnahmslos fehlerhafte Sequenzen. Das Ergebnis dieses Versuchs besserte sich auch nicht durch andere Klonierungsstrategien. So zeigte die Verwendung anderer Plasmide (TOPO, pPIC3.5, pPuc) ähnliche Ergebnisse. Auch die Amplifikation eines längeren Abschnitts aus genomischer DNA von *P. pastoris* („LagA Expr V2-Rev“ und „LagA V2 BamHI-F“, 1789 bp Produkt) führte zu keiner Verbesserung. Jedes Plasmid zeigte einen der folgenden Fehler im klonierten Abschnitt:

- Fehlen von 50 – 200 bp am Anfang oder am Ende
- Fehlen eines Stückes von ca. 20 bp in der Mitte des DNA-Fragments
- Fehlerhafte Nukleotide, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führen
- Fehlen einzelner Nukleotide, was einen Frame-shift zur Folge hat

Nach etlichen Versuchen, dieses Gen auf verschiedene Weisen zu klonieren, wurde dieser Versuchsansatz eingestellt.

2.2 Ceramid- und GlcCer-Analyse von verschiedenen *P. pastoris*-Mutanten

Für eine weitergehende Charakterisierung der Ceramidsynthese Bar1 und für die detaillierte Beschreibung der GlcCer-Synthese in *P. pastoris* inklusive aller beteiligter Enzyme sollte in verschiedenen Stämmen die Struktur des GlcCer und der freien Ceramide bestimmt werden. In Tabelle 2 sind alle Stämme, die im Laufe dieser Arbeit analysiert wurden, aufgelistet und die jeweiligen genetischen Veränderungen kurz umrissen. In der dritten Spalte ist angegeben, ob diese Mutanten noch in der Lage sind GlcCer zu synthetisieren.

Tabelle 2: Übersicht über die untersuchten *Pichia pastoris* Stämme.

Name	Beschreibung	GlcCer	Referenz
<i>P.p.</i> WT	<i>Pichia pastoris</i> GS115 Wildtyp dient als Ausgangsorganismus für alle weiteren Mutanten	vorhanden	Invitrogen
<i>P.p.</i> bar1-KO	Deletion der putativen Ceramidsynthese <i>BAR1</i>	nicht vorhanden	Diese Arbeit
<i>P.p.</i> gcs-KO	Deletion der Glucosylceramidsynthese	nicht vorhanden	[175]
<i>P.p.</i> C9-m-KO	Deletion der Ceramid-C9-Methyltransferase	verändert vorhanden	[47]
<i>P.p.</i> Δ8-KO	Deletion der LCB-Δ8-Desaturase	verändert vorhanden	[48]
<i>P.p.</i> Δ4-KO	Deletion der LCB-Δ4-Desaturase	nicht vorhanden	[8, 48]
<i>P.p.</i> scs7-KO	Deletion der Fettsäure-α-Hydroxylase	nicht vorhanden	[8]
<i>P.p.</i> gcs-KO-GCS	Überexpression der Glucosylceramidsynthese im gcs-KO-Stamm	verändert vorhanden	[175]
<i>P.p.</i> Δ4-KO-GCS	Überexpression der Glucosylceramidsynthese im Δ4-KO-Stamm	verändert vorhanden	[8]
<i>P.p.</i> scs7-KO-GCS	Überexpression der Glucosylceramidsynthese im scs7-KO-Stamm	verändert vorhanden	[8]
<i>P.p.</i> Bar1 KO- <i>BAR1</i>	Komplementation der deletierten Ceramidsynthese Bar1	verändert vorhanden	Diese Arbeit
<i>P.p.</i> <i>CERS2</i>	Konstitutive Expression der humanen Ceramidsynthese CerS2 in <i>P.p.</i> Wildtyp	nicht bestimmt	Diese Arbeit
<i>P.p.</i> <i>CERS5</i>	Konstitutive Expression der humanen Ceramidsynthese CerS5 in <i>P.p.</i> Wildtyp	nicht bestimmt	Diese Arbeit

* Die Lipidzusammensetzung der weiß unterlegten Stämme wurde über verschiedene analytische Methoden (GC, HPLC, UPLC-TOF) untersucht. Die Lipidzusammensetzung der grau unterlegten Stämme wurde nicht detailliert untersucht.

2.2.1 *Pichia pastoris* Wildtyp

Im Folgenden wird die Analyse der Ceramide und des GlcCer des Wildtyps beschrieben. Die Ergebnisse werden zum Vergleich mit den verschiedenen Mutanten herangezogen.

Der erste Schritt war eine qualitative Analyse der Sphingobasen über ein HPLC-System. Da die freien Sphingobasen in den Hefezellen nur einen geringen Anteil ausmachen, können die Ergebnisse für die Beschreibung der Basenkomposition aus den Ceramid, GlcCer und GIPC herangezogen werden.

Zu diesem Zweck wurden wie folgt vier Proben generiert und vermessen: Die Zellen wurden über Nacht in 1,6 L YPD-Amp₁₀₀ angezogen (OD \approx 3-5) und anschließend durch Zentrifugation pelletiert. Ein Teil des Pellets wurde abgenommen und bildete die erste Probe („ganze Zellen“). Die Analyse dieser Probe sollte die Komposition der gesamten Sphingobasen im Organismus aufzeigen. Um zu ermitteln, wie sich die Basen auf die verschiedenen Sphingolipide verteilen, wurden aus dem restlichen Pellet weitere Proben gewonnen: Zunächst wurden die Zellen zweimal mit H₂O dest. gewaschen, abgekocht, anschließend pelletiert und mit insgesamt 32 ml Chloroform/Methanol extrahiert. Der Überstand nach Zentrifugation bildet den Rohlipidextrakt (Probe „Lipidextrakt“), in welchem alle Ceramide und GlcCer enthalten sind, wohingegen ein Teil der polareren GIPCs (va. M(IP)₂C) nicht mit Chloroform/Methanol extrahierbar sind. In dieser Probe sollte somit der Anteil der Sphingobasen aus Ceramiden und GlcCer erhöht und der aus GIPCs verringert sein. Der Rohextrakt wurde anschließend gegen Wasser ausgeschüttelt und über Silica-Säulen fraktioniert. Aus der Glycolipidfraktion konnte das GlcCer über präparative Dünnschichtchromatographie isoliert und als Reinsubstanz analysiert werden (Probe „GlcCer“). Die vierte Probe stellt der Extraktionsrückstand dar (Probe „Extraktionsrückstand“). Der nach der Extraktion verbleibende Rückstand wurde mit Chloroform/Methanol 85:15 gewaschen um eventuelle Reste von Chloroform/Methanol-extrahierbaren Lipiden komplett zu entfernen. Die Sphingobasen, die in dieser Probe nachgewiesen werden, sollten somit ausschließlich aus den nicht Chloroform/Methanol-extrahierbaren GIPCs kommen.

Die Sphingobasen aus den vier Proben („Ganze Zellen“, „Lipidextrakt“, „GlcCer“ und „Extraktionsrückstand“) wurden über alkalische Hydrolyse (gesättigte Ba(OH)₂ Lösung, 110 °C, 20h) isoliert und anschließend zu DNP-Derivaten überführt. Die Analyse der Proben erfolgte anschließend über ein reversed-Phase-HPLC-System. Die Zuordnung der angegebenen Sphingobasen zu den Retentionszeiten erfolgte über einen Vergleich mit Standardsubstanzen. Die Identität der einzelnen Peaks wurde zusätzlich durch eine HPLC-

MS-Messung ausgewählter Proben bestätigt. Diese Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Stephan Franke an der Universität Hamburg, Abteilung Chemie, durchgeführt.

Die gaschromatographische Messung der Fettsäuren war auf die Proben Extraktionsrückstand und das GlcCer beschränkt. In den Proben der „ganzen Zellen“ und des „Lipidextrakts“ sind die Phosphoglycerolipide zu dominant, wodurch eine Zuordnung der Fettsäuren zu den Sphingolipiden nicht möglich ist. Die Fettsäuren wurden mittels methanolischer Schwefelsäure in Methylester (FAMES) überführt und gaschromatographisch vermessen. Auch hier wurde die Zuordnung der einzelnen Peaks/Retentionszeiten zu den jeweiligen Fettsäurespezies über massenspektrometrische Messungen gesichert. Diese GC-MS-Messungen von ausgewählten Proben wurden von Herrn Hermann Moll am Forschungszentrum Borstel in der Abteilung von Herrn Prof. Ullrich Zähringer durchgeführt.

Die Generierung der Proben für die *P. pastoris*-Stämme, welche im Anschluss vermessen wurden, erfolgte auf die gleiche Weise. Bei Mutanten, welche kein GlcCer synthetisieren, wurde das Kultur- und Extraktionsvolumen auf ein Viertel reduziert.

In Abbildung 2-3 sind die Ergebnisse der chromatographischen LCB- und FA-Analysen der verschiedenen Fraktionen aus *P. pastoris* GS115 Wildtyp zu sehen.

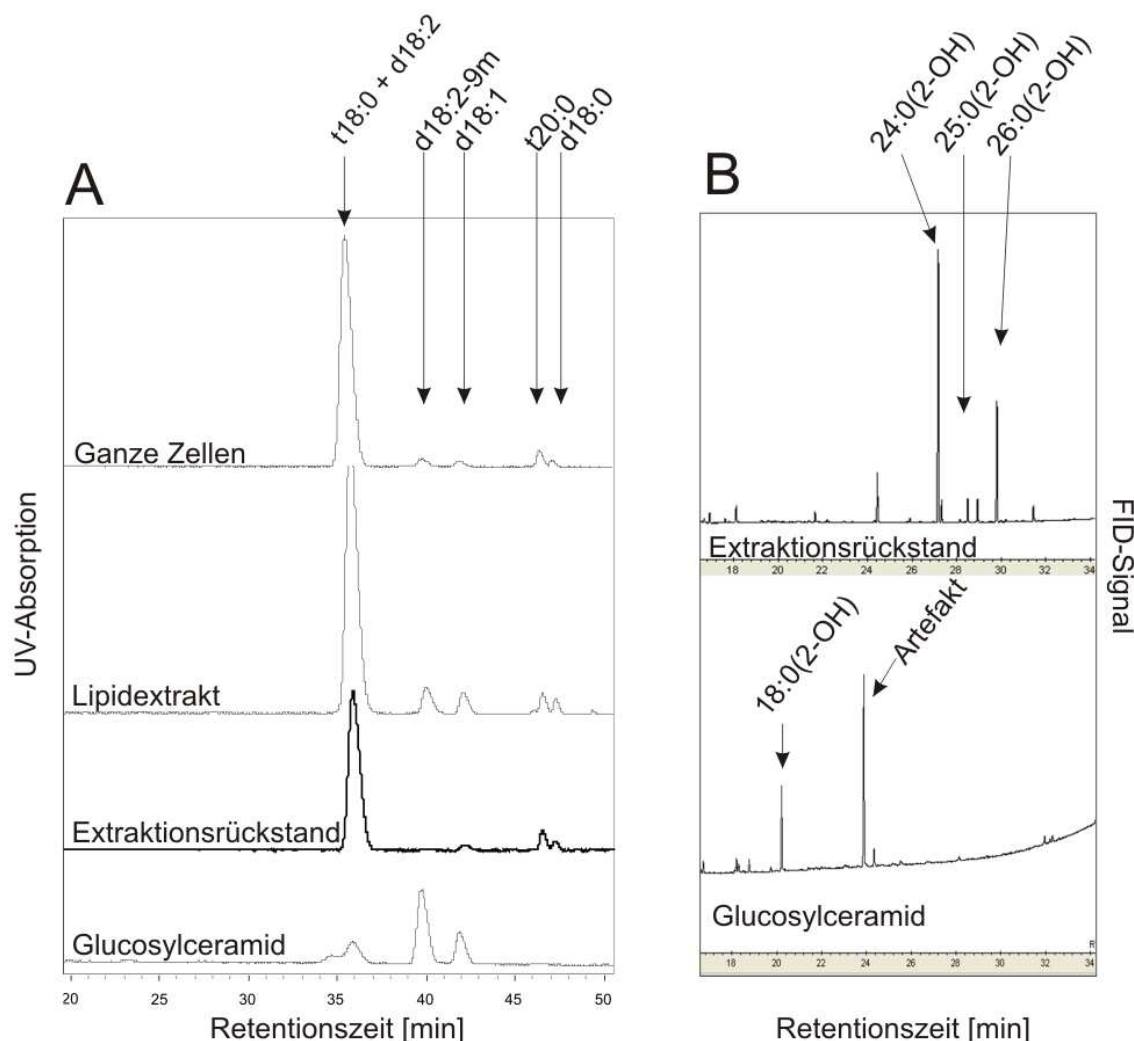


Abbildung 2-3: LCB- und FA-Komposition in Sphingolipiden aus verschiedenen Proben von *P. pastoris* Wildtyp. **A) HPLC-Analyse von derivatisierten LCB:** Die Probe der ganzen Zellen beschreibt das Verhältnis der LCB aus Sphingolipiden: $t_{18:0}$ (aus GIPC) ist in deutlich höherer Menge enthalten als dihydroxy-LCB (aus GlcCer). Im Lipidextrakt ist der Anteil von $d_{18:2-9m}$ deutlich höher, da die polaren GIPC-Spezies nicht vollständig C/M-extrahierbar sind. Im Rückstand ist keine Glycerotypische Sphingobase enthalten, sondern nur das $t_{18:0}$ der GIPCs. **B) GC-Analyse von derivatisierten FA:** Die Fettsäureanalyse zeigt im Extraktionsrückstand die hydroxylierten VLCFAs der nicht extrahierbaren GIPCs. Kleinere Peaks stehen für nicht hydroxylierte und zweifachhydroxylierte VLCFAs. Im GlcCer ist der Peak der repräsentativen $C_{18:0}(2-OH)$ Fettsäure zu erkennen. Der Peak bei 24 min ist ein Artefakt, was über MS bestätigt wurde.

In den Proben aus den ganzen Zellen stellt 4-Hydroxysphingarin ($t_{18:0}$) die dominierende Komponente dar, dihydroxy-Sphingobasen ($d_{18:X}$) machen einen viel geringeren Anteil aus. Im Lipidextrakt sind diese Spezies hingegen in deutlich größerem Anteil vorhanden, da sie typisch für das quantitativ extrahierbare GlcCer stehen, wohingegen im Extraktionsrückstand die nicht extrahierbaren Komponenten (hydrophile GIPC, $t_{18:0}$) stark angereichert sind. Die Analyse des gereinigten GlcCers ergab die bekannte Komposition der LCBs: $d_{18:2-9m}$ (ca. 60%), $d_{18:2}$ (ca. 20%) und $d_{18:1}$ (ca. 20%) [57]. Mit dem verwendeten System ist es nicht möglich, die Sphingobasen $t_{18:0}$ und $d_{18:2}$ voneinander zu trennen. Somit überlagern sich die Peaks dieser Komponenten in den

Chromatogrammen der verschiedenen Proben. In einer Probe aus ganzen Zellen wurde per HPLC-MS (durchgeführt von Dr. Stephan Franke, Abteilung Chemie der Universität Hamburg) nachgewiesen, dass d18:2 in etwa 5% des Peaks bei 36 min ausmacht. Im Lipidextrakt liegt der Anteil etwas höher (ca. 10%), wohingegen diese LCB-Spezies im Extraktionsrückstand kaum enthalten ist. Man kann den Anteil von d18:2 in den Chromatogrammen auch abschätzen, wenn man den Peak von d18:2-9m zum Vergleich heranzieht. Dieser weist ungefähr die doppelte Fläche von d18:2 auf (siehe auch quantitative Daten in Abbildung 2-5).

Die Fettsäurezusammensetzung, bei der für GlcCer 2-Hydroxyoctadecansäure (C18:0(2-OH)) als Hauptbestandteil gefunden wurde, entspricht ebenfalls den Erwartungen. Für die nicht extrahierbaren Komponenten konnten großteils C24:0(2-OH) und C26:0(2-OH) nachgewiesen werden. Dies passt zusammen mit der Sphingobase t18:0 zu der Struktur der hydrophileren GIPCs [29]. In der Probe der Fettsäuren aus dem Rückstand sind noch große Mengen von nicht hydroxylierten C18- und C16-Fettsäuren enthalten, welche aus im Rückstand verbliebenen Phosphoglycerolipiden resultieren (siehe Diskussion). Für den Wildtyp wurde nachgewiesen, dass sich diese Komponenten bei der Extraktion entfernen lassen, wenn die Zellen zuvor mechanisch aufgebrochen werden (Daten nicht gezeigt).

Mit Hilfe dieser Methoden erhält man einen Überblick über die Zusammensetzung der LCB und Fettsäuren in den jeweiligen Fraktionen. Eine Analyse der freien Ceramide ist jedoch nicht möglich, da diese in zu geringer Menge für die Untersuchung über HPLC-Systeme vorliegen. Durch die getrennte Analyse der Bestandteile ist die Zuordnung von LCB und Fettsäuren zu den jeweiligen Ceramidmolekülen unmöglich. Um nun alle Ceramid- und GlcCer-Spezies als intakte Moleküle zu untersuchen und um die relevanten Bestandteile zu quantifizieren, folgte eine Analyse über ein UPLC-TOF-System. Von allen Stämmen wurden je drei 100 ml Kulturen angezogen (üN in YPD-Amp₁₀₀), die Zellen geerntet und die Lipide mit Chloroform/Methanol extrahiert. Für die Quantifizierung der Bestandteile wurden zu jedem Extrakt sowohl 15 nmol GlcCer (β -D-glucosyl-d18:1/12:0) als auch 15 nmol Ceramid (d18:1/15:0) als interne Standards zugesetzt. Die Extrakte wurden verseift und anschließend über Säulen fraktioniert. In Abbildung 2-4 ist eine Test-DC der Glycolipidfraktion aller untersuchter Mutanten zu sehen. Die Glycolipidfraktion, welche GlcCer und die Ceramide enthält, konnte über ein LC-TOF System analysiert werden. Die Entwicklung dieser Methode und die Messung der Lipidextrakte über ein UPLC-TOF-System wurden freundlicherweise von Frau Dr. Kirstin Feussner an der Universität Göttingen, Abteilung Biochemie der Pflanze, durchgeführt.

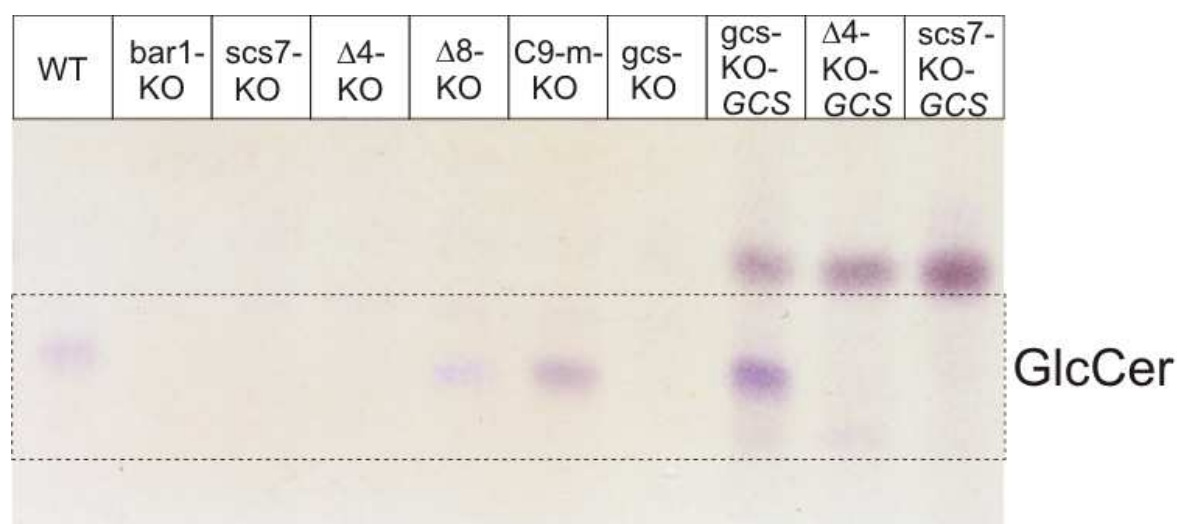


Abbildung 2-4: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Glycolipidfraktionen aller analysierten Stämme: Die Lipidextrakte wurden in Chloroform/Methanol 85:15 aufgetrennt und mit α -Naphthol/ H_2SO_4 angefärbt. Im markierten Bereich befinden sich die nativen und veränderten GlcCer. Diese Bande verschwindet bei der Deletion von *BAR1*, *SCS7*, $\Delta 4$ -Desaturase und *GCS*. Eine Überexpression der *GCS* führt zur Biosynthese untypischer GlcCer. Die Banden direkt über diesem Bereich stehen für Sterylglucosid.

Die resultierenden Chromatogramme wurden auf ca. 200 mögliche Sphingolipidspezies bzw. deren korrespondierende Massen untersucht (siehe Tabelle „Summenformeln Ceramide und GlcCer Pichia“ im Anhang). Die Quantifizierung erfolgte über die Zugabe interner Standards.

Bei der Quantifizierung der Daten kann es zu Abweichungen der aus den Messwerten berechneten Lipidgehalten von den tatsächlichen Gehalten kommen, da nur zwei interne Standards zugegeben wurden, ein Ceramid-Standard und ein GlcCer-Standard (siehe oben). Mit dieser Kombination ist es möglich, den Einfluss der Glucose-Kopfgruppe auf die Sensitivität der Detektion zu ermitteln. Diese Standards repräsentieren aber nicht alle strukturellen Eigenschaften des Ceramidrückgrats, die einen Einfluss auf die Ionisierbarkeit haben können (z.B. trihydroxy-LCB). Die Analyse liefert also keine absoluten Quantitäten der untersuchten Sphingolipide. Da alle Proben unter den gleichen Bedingungen gewonnen und analysiert wurden, ist ein Vergleich der relativen Quantitäten der unterschiedlichen Sphingolipidspezies in den verschiedenen Mutanten möglich. Somit konnte das Hauptziel dieser Analyse, der Vergleich bestimmter Ceramid bzw. GlcCer-Spezies in den verschiedenen Stämmen, erreicht werden. Die Standardabweichung dieser semiquantitativen Daten bezieht sich auf die Messung von drei biologisch unabhängigen Replikaten pro untersuchtem Stamm. Um systematische Fehler in der Analyse auszuschließen, wurden sämtliche Proben zweimal gemessen.

Über die UPLC-TOF-Analyse werden lediglich die genauen Massen, d.h. Summenformeln, der einzelnen Komponenten bestimmt und nicht ihre Struktur. Die qualitative Zuordnung dieser Massen zu einzelnen Ceramidstrukturen, wie sie in den

folgenden Abbildungen angegeben sind, erfolgte über die Kombination mit anderen analytischen Methoden: Die Struktur des komplexesten GlcCer, β -D-glucosyl-d18:2-9m/18:0(2-OH), in dem auch in dieser Arbeit verwendeten Stamm *P. pastoris* GS115 wurde von Sakaki et al. [57] mittels NMR-Spektroskopie bestimmt. Dadurch sind die Lokalisierungen der Doppelbindungen, der Hydroxygruppen und der Methylgruppe bekannt. Da in der vorliegenden Arbeit in allen Stämmen auch jeweils die Sphingobasen und die Fettsäuren getrennt analysiert wurden, können die einzelnen Modifikationen, insbesondere die Anzahl der Hydroxygruppen, jeweils der Fettsäure oder der LCB zugeordnet werden.

Der Abgleich der Massen mit den GIPC-typischen Strukturen erfolgte unter Verwendung von Daten, welche aus der Analyse von GIPCs aus *S. cerevisiae* herrühren [29, 128, 195-197]. Diese Strukturen und damit auch die der Vorläuferceramide wurde in *P. pastoris* separat über ein MS/MS-System bestätigt (siehe Abschnitt 2.3).

Allgemein gilt für die folgenden Abbildungen, dass Lipidspezies mit zweifach-ungesättigter-LCB (d18:2) als (4*E*,8*E*)-Sphinga-4,8-dienin interpretiert wurden [57]. Einfach ungesättigte Spezies (d18:1) wurden als (4*E*)-Sphing-4-enin angesehen, da sie im Δ 4-KO-Stamm fehlen, im Δ 8-KO-Stamm aber vorhanden sind. Die Zuordnung der Hydroxygruppen zur LCB oder Fettsäure wurde neben der oben genannten Kombination mit GC bzw. HPLC-Analysen durch zusätzliche Effekte abgesichert. Die Einführung einer Hydroxygruppe führt, je nachdem, ob sie an der C4-Position der LCB oder der C2-Position der Fettsäure geschieht, zu unterschiedlichen Veränderungen der Retentionszeit (siehe unten). Zudem kann die Identität der Peaks, die Ceramide mit α -hydroxylierter Fettsäure repräsentieren, mit Hilfe des scs7-KO-Stamms überprüft werden, da diese hier nicht mehr vorhanden sein sollten. Ein weiterer Anhaltspunkt ist, dass eine Doppelbindung am C4-Atom der LCB nicht gleichzeitig mit einer C4-Hydroxylierung vorliegen kann.

Die in geringem Anteil vorkommenden Sphingobasen mit 20 Kohlenstoffatomen (t20:0), welche in den HPLC-Diagrammen angegeben sind, wurden in den Darstellungen nicht berücksichtigt. Diese LCB-Spezies wurden zu weniger als 5% der häufigsten Komponente (t18:0) bestimmt. Sie sollte nur in den GIPCs auftreten, da es sich immer um eine dreifach-hydroxylierte-LCB handelt (t20:0). Es gilt auch zu beachten, dass in diesem Fall verschiedene Strukturen identische Massen aufweisen können: So hat beispielsweise ein Ceramid mit einer C₂₀-LCB und einer C₁₆-Fettsäure die gleiche Masse wie ein Ceramid mit einer C₁₈-LCB verknüpft mit einer C₁₈-Fettsäure, sofern in beiden Molekülen die gleichen Modifikationen vorliegen.

Dieses Problem, das Auftreten von unterschiedlichen Ceramidstrukturen mit identischer Masse, kann auch in anderen Fällen vorliegen: Die Fettsäure der Ceramide kann, wie für *S. cerevisiae* nachgewiesen, zu einem geringen Teil zweifach-hydroxyliert vorliegen, was die Zuordnung der der Anzahl von Hydroxygruppen zur Fettsäure und/oder LCB

erschwert [195]. GC-MS-Analysen von Proben aus *P. pastoris* ergaben, dass die GIPC-typischen VLCFA (C_{24} - C_{26}) zu weniger als 5% α - β -hydroxyliert sind. Für die GlcCer-typischen Fettsäuren (C_{16} , C_{18}) konnte keine zweifach-Hydroxylierung nachgewiesen werden. Zudem können Ceramide teilweise Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl von C-Atomen enthalten und müssen von Ceramiden mit methylierter LCB unterschieden werden. In den GC-MS-Analysen wurden einen Anteil von C_{25} -Fettsäuren im Extraktionsrückstand (Abbildung 2-3, nicht extrahierbare GIPCs) bestimmt, der 5-10 % der Fettsäuren in dieser Probe ausmacht. In den Analysen des gereinigten GlcCers konnten sehr geringe Mengen (kleiner 1% der gesamten Fettsäuren) von C_{17} -Fettsäuren nachgewiesen werden, C_{19} -Fettsäuren wurden nicht gefunden.

Ziel der Analysen war es jedoch Ceramide und GlcCer mit definierten Strukturen einzeln zu quantifizieren und nicht Gemische aus verschiedenen Molekülen. Mit der verwendeten UPLC-TOF-Analyse ist es auch möglich einer Masse mehrere Ceramidstrukturen zuzuordnen und diese zu quantifizieren: Die unterschiedlichen Moleküle mit identischer Masse werden vor der Detektion im MS in der UPLC-Säule aufgetrennt. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Retentionszeiten und jede Ceramidstruktur ist durch einen separaten Peak in dem resultierenden Chromatogramm vertreten. Durch den Vergleich der Retentionszeiten mit anderen Chromatogrammen, bei welchen die Struktur der Analyten bekannt ist, kann man die Peaks einzelnen Ceramidstrukturen zuordnen und diese quantifizieren. Die Probleme, die durch diese Effekte bei der Auswertung der Daten entstanden sind, werden in Punkt 3.6 beschrieben und diskutiert.

Die Zuordnung der Masse/Retentionszeit-Paare zu Ceramidstrukturen wurde anhand der folgenden Regeln vorgenommen:

- Jedes zusätzliche C-Atom in der Sphingobase oder Fettsäure verlängert die Retentionszeit um ca. 0,4 min.
- Die C4-Hydroxylierung der LCB verringert die Retentionszeit um ca. 1,0 min.
- Jede Doppelbindung verkürzt die Retentionszeit um ca. 0,5 min.
- Eine Hydroxygruppe der Fettsäure verringert die Retentionszeit um ca. 0,5 min, also hat bei gleicher Gesamtzahl von Hydroxygruppen eine Ceramidspezies mit α -hydroxylierter Fettsäure eine längere Retentionszeit als eine mit C4-hydroxylierter Sphingobase.
- Für die LCB wurde durchgehend eine Länge von 18 C-Atomen angenommen. Die Länge der Fettsäure in Ceramiden ergibt sich aus der Differenz von C-Atomen im gesamten Molekül und C-Atomen der LCB. Bei GlcCer ergibt sich die FA-Kettenlänge aus der Differenz von der Gesamtanzahl der C-Atome und der Summe der C-Atome aus LCB und Glucose.

- Desaturierungen treten ausnahmslos in der LCB auf und nicht in der Fettsäure.
- Einfach-ungesättigten Molekülen wurde (4*E*)-Sphing-4-enin als LCB zugeordnet (d18:1).
- Doppelt-ungesättigte Spezies wurden als Ceramide bzw. GlcCer mit (4*E*,8*E*)-Sphinga-4,8-dienin als LCB interpretiert (d18:2).
- Doppelt-ungesättigten Molekülen mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen, wurde (4*E*,8*E*)-9-Methyl-sphinga-4,8-dienin als LCB zugeordnet (d18:2-9m).
- Die Zuordnung der Hydroxygruppen zur LCB oder Fettsäure geschah über Analyse der Retentionszeiten, den Vergleich mit HPLC- und GC-Daten, den Abgleich mit den Daten der Messung des α -Hydroxylase-KO-Stammes und unter Beachtung der Tatsache, dass sich LCB-C4-Hydroxylierung und LCB- Δ 4-Desaturierung gegenseitig ausschließen.
- Dreifach-hydroxylierte Sphingobasen wurden als 4-Hydroxysphinganin interpretiert (t18:0).
- Die Hydroxylierung in der Fettsäure wurde der C2-Position zugeordnet (α -Hydroxylierung).

Die in den folgenden Abbildungen angegebenen Daten beziehen sich auf strukturelle Eigenschaften, deren Identität durch die Kombination verschiedener analytischer Verfahren abgesichert wurde. Somit werden durch die oben genannten Probleme die später getroffenen Kernaussagen nicht in Frage gestellt.

In diesen Darstellungen werden die häufig vorkommenden Ceramid- und GlcCer-Spezies für jeden Stamm zusammengefasst. Hierbei werden alle relevanten Parameter beschrieben. Diese sind:

- Kettenlänge der Fettsäure (C₁₆, C₁₈, C₂₄, C₂₆) als farbliche Balken aufsummiert
- Hydroxylierung der LCB (dihydroxy d18:X, trihydroxy t18:X)
- Hydroxylierung der Fettsäure (non-hydroxy, α -hydroxy)
- Sättigungsgrad und Methylierung der LCB (0 ; 1 ; 2 ; 2-9m)

Eine Reduzierung der Parameter auf die jeweils relevanten Größen erfolgt in der Diskussion, die folgenden Abbildungen sollen jedoch den gesamten Datensatz der Messungen widerspiegeln. Eine ausführliche Auflistung der Ergebnisse mit allen gemessenen Spezies ist im Anhang zu finden. Die Messwerte der einzelnen Balken sind in jedem Stamm jeweils auf die Gesamtmenge des Ceramids, respektive GlcCers, im Wildtyp bezogen, um Veränderungen gegenüber dem nativen Syntheseweg möglichst gut erkennen zu können. Der Anteil der Ceramide beträgt im Wildtyp ca. 70 nmol/g Frischgewicht und das GlcCer macht in etwa 30 nmol/g Frischgewicht aus (\equiv jeweils 100%). Da nicht alle

unterschiedlichen Ceramid- und GlcCer-Spezies exakt quantifiziert werden konnten, gelten diese Werte nur als grobe Anhaltspunkte, um die Quantitäten der dargestellten Lipide abschätzen zu können.

Abbildung 2-5 zeigt die massenspektrometrische Analyse der Ceramide und des GlcCer im Wildtyps. Die Analyse der Ceramide bestätigt die Hypothese, dass es zwei verschiedene Gruppen von Ceramiden gibt (Ceramidpools): Die eine Gruppe besteht aus einer dihydroxy-LCB (verschiedene Sättigungsstufen und Methylierung möglich), verknüpft mit einer gesättigten C₁₆ bzw. C₁₈ Fettsäure, und macht ca. 30% der Ceramide aus (rot/grüne Balken). Die andere Gruppe (ca. 70%) ist charakterisiert durch 4-Hydroxysphingarin (t18:0), welches an eine VLCFA (C₂₄ und C₂₆) gekoppelt ist (dunkel/hell-blaue Balken). Die Fettsäure der beiden Pools kann an der C2-Position hydroxyliert sein (α -Hydroxylierung) oder nicht hydroxyliert vorliegen.

Von diesen beiden Gruppen werden jedoch nur Ceramide mit einer dihydroxy-LCB und C₁₈-C₁₆ Fettsäure zu GlcCer umgesetzt. Dennoch sind die Muster der dihydroxy-LCB-Ceramide und des GlcCer nicht deckungsgleich. Während bei den Ceramiden die Fettsäuren großteils nicht hydroxyliert sind, treten im GlcCer ausnahmslos α -hydroxylierte Fettsäuren auf. Hinzu kommt, dass die LCB der Ceramide hauptsächlich gesättigt oder einfach ungesättigt sind, wobei sie im GlcCer zu mehr als 70% zweifach ungesättigt und zudem großteils noch an der C9-Position methyliert sind. Die Fettsäurekettenlänge des GlcCer entspricht zu ca. 80-90% C₁₈ und zu 10-20% C₁₆.

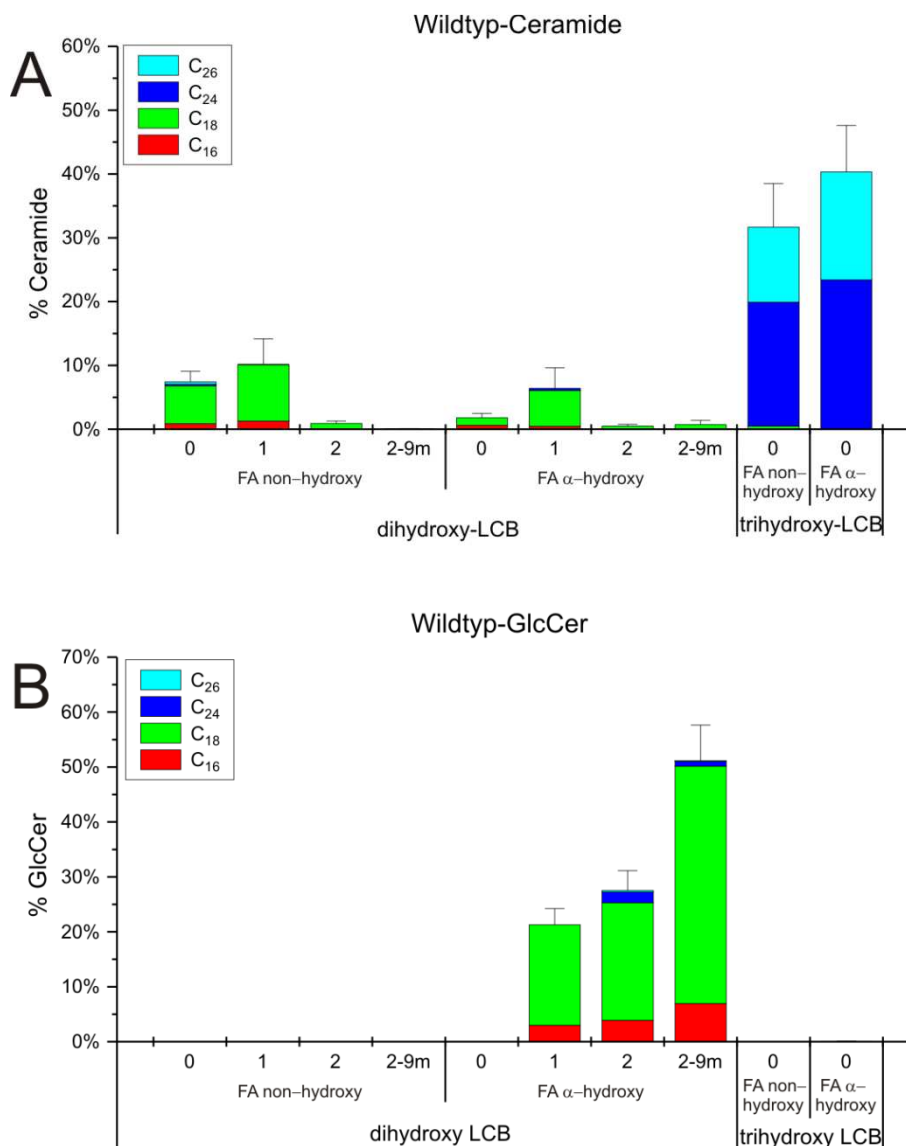


Abbildung 2-5: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus *P. pastoris* WT. Die prozentualen Werte beziehen sich jeweils auf die Summe der jeweiligen Substanzklasse (Cer; GlcCer). Auf der X-Achse sind die verschiedenen Strukturmerkmale der Ceramide aufgetragen: Die Hydroxylierung der Fettsäure (non-hydroxy, α -hydroxy), der Hydroxylierungsgrad der LCB (dihydroxy, trihydroxy) und die Desaturierung sowie Methylierung der LCB (null, eine oder zwei Doppelbindungen sowie C9-Methylierung). Die Kettenlänge der Fettsäuren ist durch unterschiedliche Farben dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von drei biologisch unabhängigen Replikaten (alle Proben zweimal gemessen). Sie beziehen sich auf die Schwankung der prozentualen Werte in der jeweiligen Substanzklasse (Ceramide bzw. GlcCer) **A**) Die Ceramide im Wildtyp lassen sich in zwei Klassen unterteilen: dihydroxy-LCB-Ceramide mit C₁₆-C₁₈-FA (grün/rote Balken) und trihydroxy-LCB-Ceramide mit C₂₄-C₂₆-FA (blaue Balken). **B**) Nur Ceramide mit bestimmten Strukturmerkmalen werden zu GlcCer umgesetzt. Diese haben eine dihydroxy LCB mit mindestens einer Doppelbindung und eine hydroxylierte C₁₆-C₁₈-FA.

2.2.2 *P.p. bar1*-KO-Stamm

Wie in 2.1 beschrieben, führt die Deletion der putativen Ceramidsynthase *BAR1* zum Verlust von GlcCer. Mit Hilfe der folgenden Analysen soll die Hypothese bestätigt werden, dass dieser Verlust auf das Fehlen der entsprechenden Ceramide zurückzuführen ist. In Abbildung 2-6 ist zu erkennen, dass in allen Fraktionen dieses Stammes nur noch GIPC-typisches 4-Hydroxysphingarin ($t_{18:0}$) enthalten ist, wohingegen die dihydroxy-LCB weitgehend fehlen. Die Menge der trihydroxy-LCB im Extraktionsrückstand ist von der Deletion von *BAR1* ebenso wenig betroffen wie die der damit korrespondierenden C_{24} - und C_{26} -Fettsäuren. Eine Erklärung hierfür wäre, dass nach der Deletion von *BAR1* keine GlcCer-typischen Ceramide synthetisiert werden können, die GIPC-typischen aber weiterhin gebildet werden.

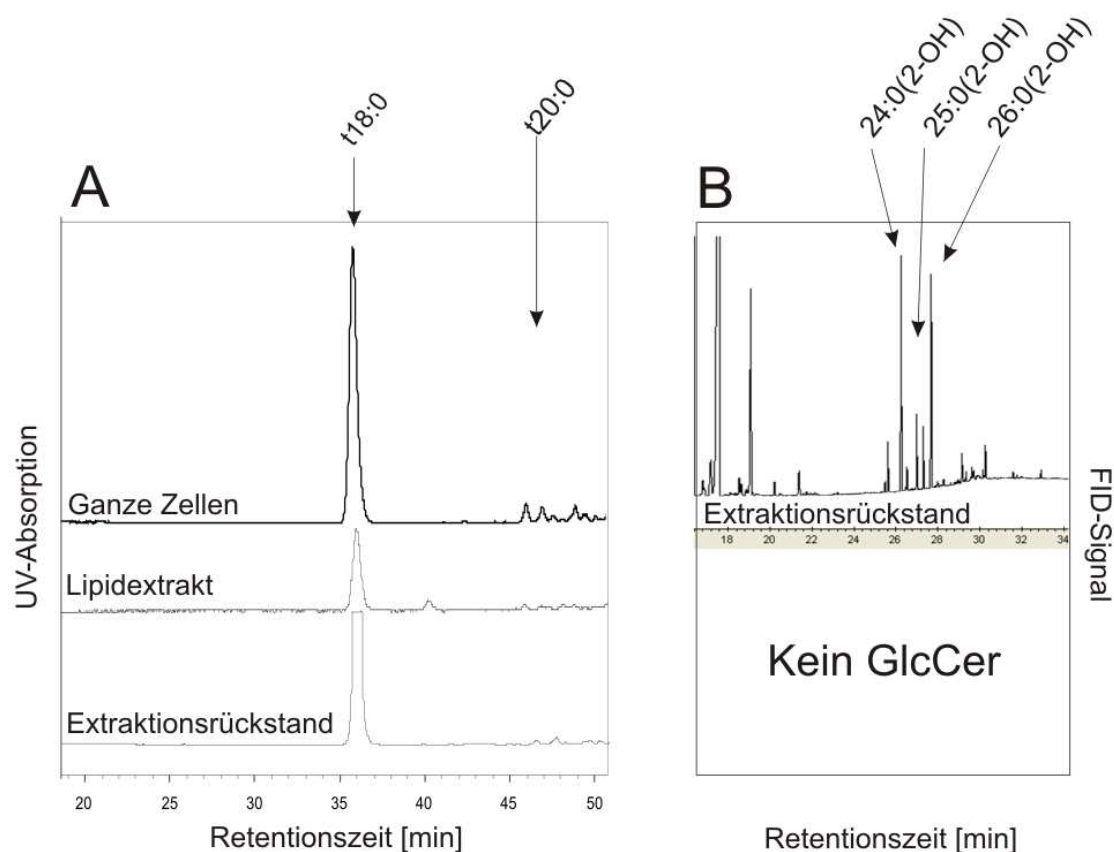


Abbildung 2-6: LCB- und FA-Komposition in Sphingolipiden aus verschiedenen Proben von *P. pastoris bar1*-KO. Da dieser Stamm kein GlcCer synthetisiert, fehlen diese Messungen **A) HPLC der LCB**: Durch das Fehlen der Ceramidsynthase Bar1 fehlen die Peaks für die GlcCer-typischen dihydroxy-LCBs. Die GIPC-typischen trihydroxy-LCBs sind weiterhin vorhanden. **B) GC der FA**: Die Fettsäuren der nicht extrahierbaren Lipide sind unverändert C_{24} - C_{26} (größtenteils α -hydroxyliert).

Ein genaues Bild der Ceramidzusammensetzung konnte mit den LC-TOF Messungen wiedergegeben werden (Abbildung 2-7). Wie vermutet fehlen sämtliche GlcCer-typischen Ceramide und deren Vorläufer, d.h. dihydroxy-LCB verknüpft mit C₁₆-C₁₈-Fettsäuren. Die trihydroxy-LCB-haltigen Ceramide, die wahrscheinlich von der anderen Ceramidsynthese (Lag1) gebildet werden, sind in gleicher Menge wie im Wildtyp enthalten. Da die dihydroxy-LCB-haltigen Ceramide in diesem Stamm nicht mehr synthetisiert werden, kann auch kein GlcCer gebildet werden. Die Analyse ergab dennoch eine kleine Menge an GlcCer mit einer dihydroxy-LCB und einer hydroxylierten C₂₄-Fettsäure. Diese GlcCer-Spezies konnte in keinem anderen Stamm in dieser Menge nachgewiesen werden. Auf mögliche Mechanismen, die zu dieser Synthese führen, wird in der Diskussion eingegangen.

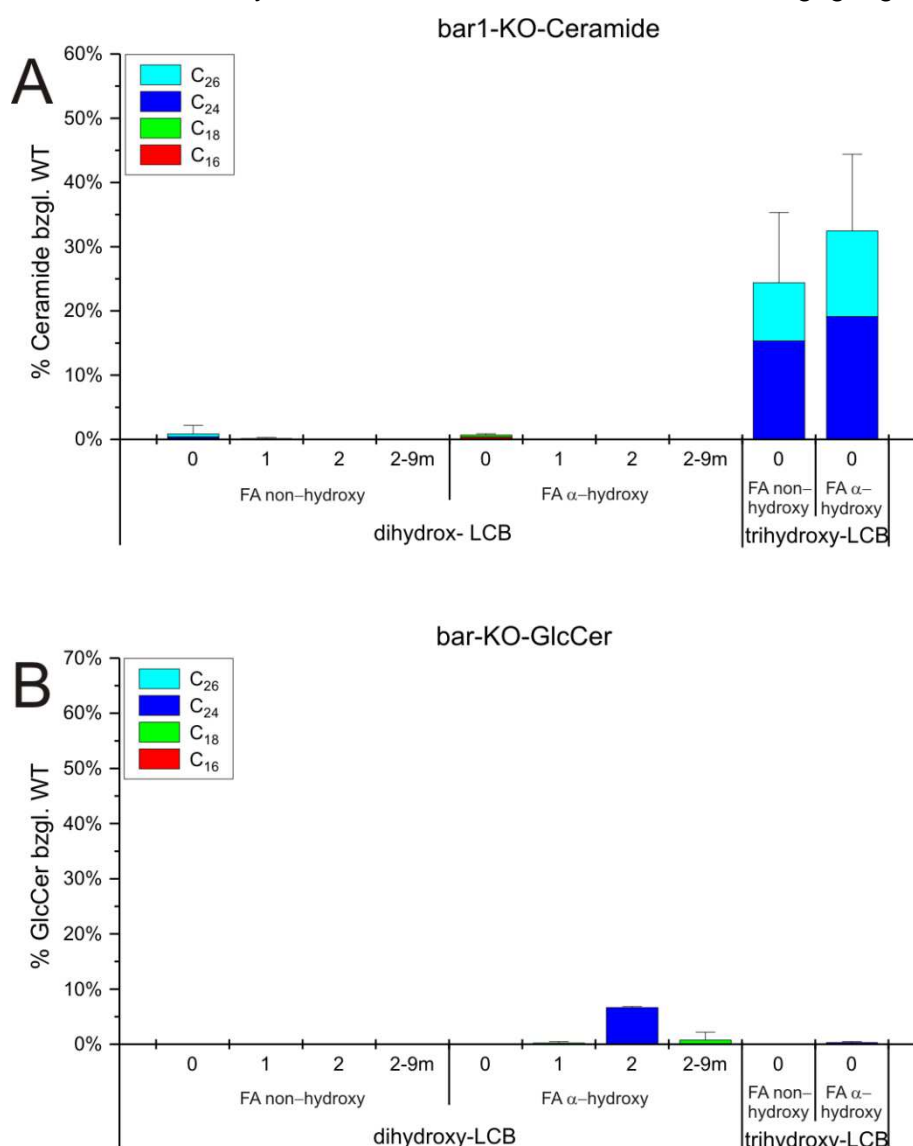


Abbildung 2-7: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus *P. pastoris* bar1-KO. **A)** In diesem Stamm wird nur noch eine Gruppe von Ceramiden synthetisiert, nämlich solche mit t18:0 LCB und C₂₄-C₂₆ FA **B)** Die LCFA-haltigen GlcCer, die im Wildtyp die Hauptkomponenten bilden, fehlen komplett; Es wird lediglich eine kleine Menge VLCFA-haltiges GlcCer synthetisiert.

2.2.3 *P.p.* gcs-KO-Stamm

Die Deletion der GCS führt erwartungsgemäß zum Verlust von GlcCer. Die strukturelle Zusammensetzung der Ceramidpools sollte jedoch nicht beeinflusst werden. Die Analyse der LCB (Abbildung 2-8 A) bestätigt diese Vermutung. In den ganzen Zellen sowie im Lipidextrakt sind weiterhin die GlcCer-typischen LCB zu erkennen, die in diesem Fall aber auf nicht glycosylierte Ceramide zurückzuführen sind. Das Muster der GIPC-typischen Sphingobasen und Fettsäuren (Abbildung 2-8 B) ist im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert.

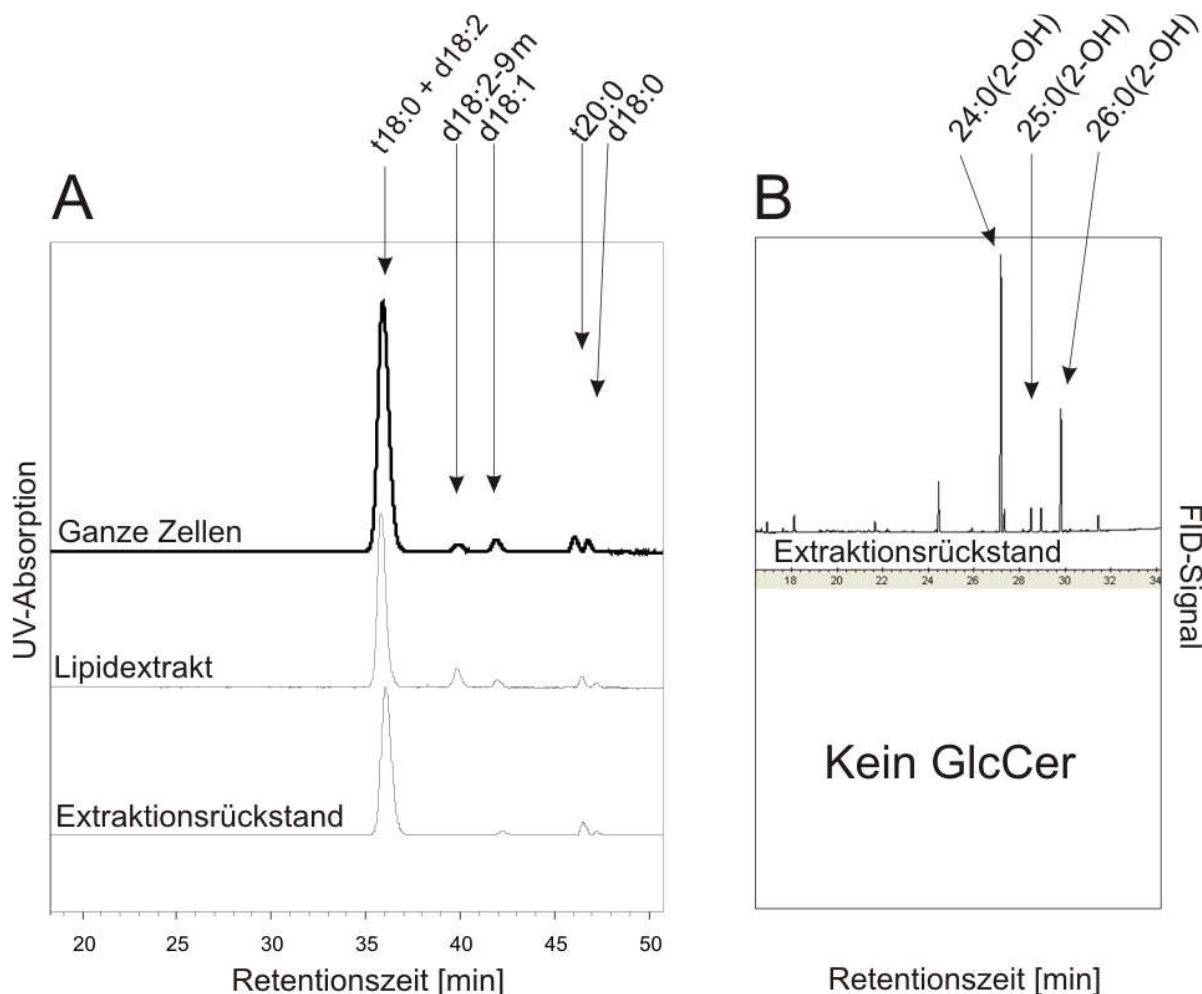


Abbildung 2-8: LCB- und FA-Komposition in Sphingolipiden aus verschiedenen Proben von *P. pastoris* gcs-KO. Da dieser Stamm kein GlcCer synthetisiert, fehlen sie in diesen Messungen **A) HPLC der LCB:** Das Muster der LCB in diesem Stamm ist qualitativ unverändert zu dem des Wildtyps. Die Peaks resultieren aus den freien Ceramiden, denn diese können nicht zu GlcCer umgesetzt werden. **B) GC der FA:** Die Fettsäuren der nicht extrahierbaren Lipide sind unverändert C₂₄-C₂₆ (größtenteils α -hydroxyliert).

In Abbildung 2-9 ist zu erkennen, dass die im Wildtyp vorkommenden Ceramide auch hier vorhanden sind. Wohingegen im Wildtyp aber hauptsächlich nicht-hydroxylierte Fettsäuren und gesättigte oder einfach ungesättigte Ceramide (d18:0/18:0 und d18:1/18:0) vorkommen, konnten in diesem Stamm die direkten Vorläufer des GlcCer (d18:1/18:0(2-OH) und d18:2-9m/18:0(2-OH)) nachgewiesen werden. Durch die Deletion der GCS werden die so modifizierten Ceramide nicht mehr zu GlcCer umgesetzt und reichern sich in der Zelle an. Das Fehlen von nicht methylierter zweifach ungesättigter LCB (d18:2/18:0(2-OH)) deutet darauf hin, dass die C9-Methyltransferase eine starke Affinität zu diesem Substrat aufweist, so dass es sofort umgewandelt wird und sich nicht anreichern kann. Dieses Ergebnis deutet auch darauf hin, dass die Gcs Ceramide mit einer d18:2-9m LCB besonders gut glucosylieren kann.

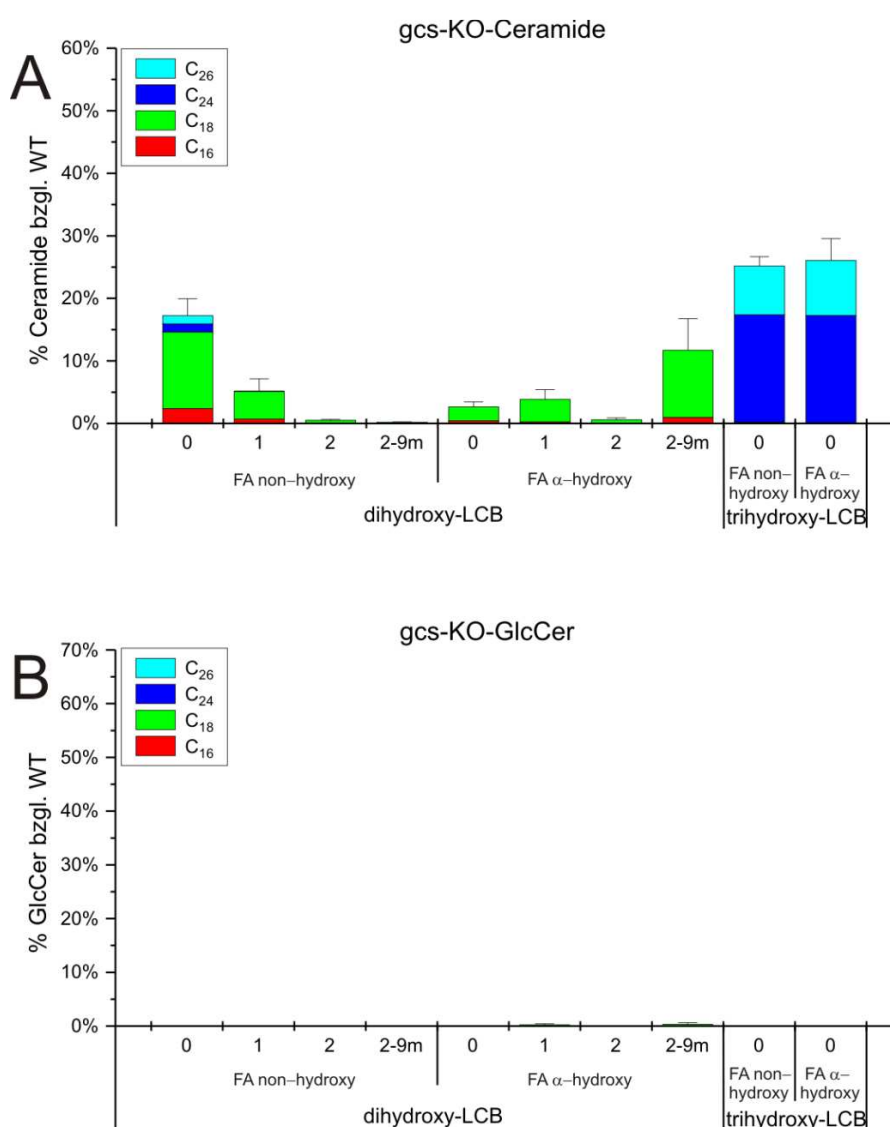


Abbildung 2-9: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus *P. pastoris* gcs-KO. A) Durch das Fehlen der Gcs reichern sich die GlcCer-typischen Ceramide an. In diesem Stamm ist eine große Menge an d18:2-9m/18:0(2-OH)-haltigen Ceramiden, der Hauptkomponente des GlcCer im Wildtyp, vorhanden. **B)** Da die GlcCer-Synthese ausgeschaltet wurde, können auch keine Ceramide glucosyliert werden.

2.2.4 *P.p.* C9-Methyltransferase-KO-Stamm

Die Deletion der C9-Methyltransferase in *P. pastoris* hat keinen Verlust von GlcCer zur Folge. Es wird weiterhin gebildet, wobei die LCB an der C9 Position nicht methyliert ist. In Abbildung 2-10 ist dies deutlich zu erkennen: In allen GlcCer enthaltenden Fraktionen fehlt der Peak für d18:2-9m, wohingegen die Peaks für d18:2 und d18:1 vorhanden sind. Die Fettsäure des GlcCer ist unverändert C18:0(2-OH). Die GIPCs sind von dieser Veränderung nicht betroffen, sowohl auf LCB-Ebene als auch auf FA-Ebene.

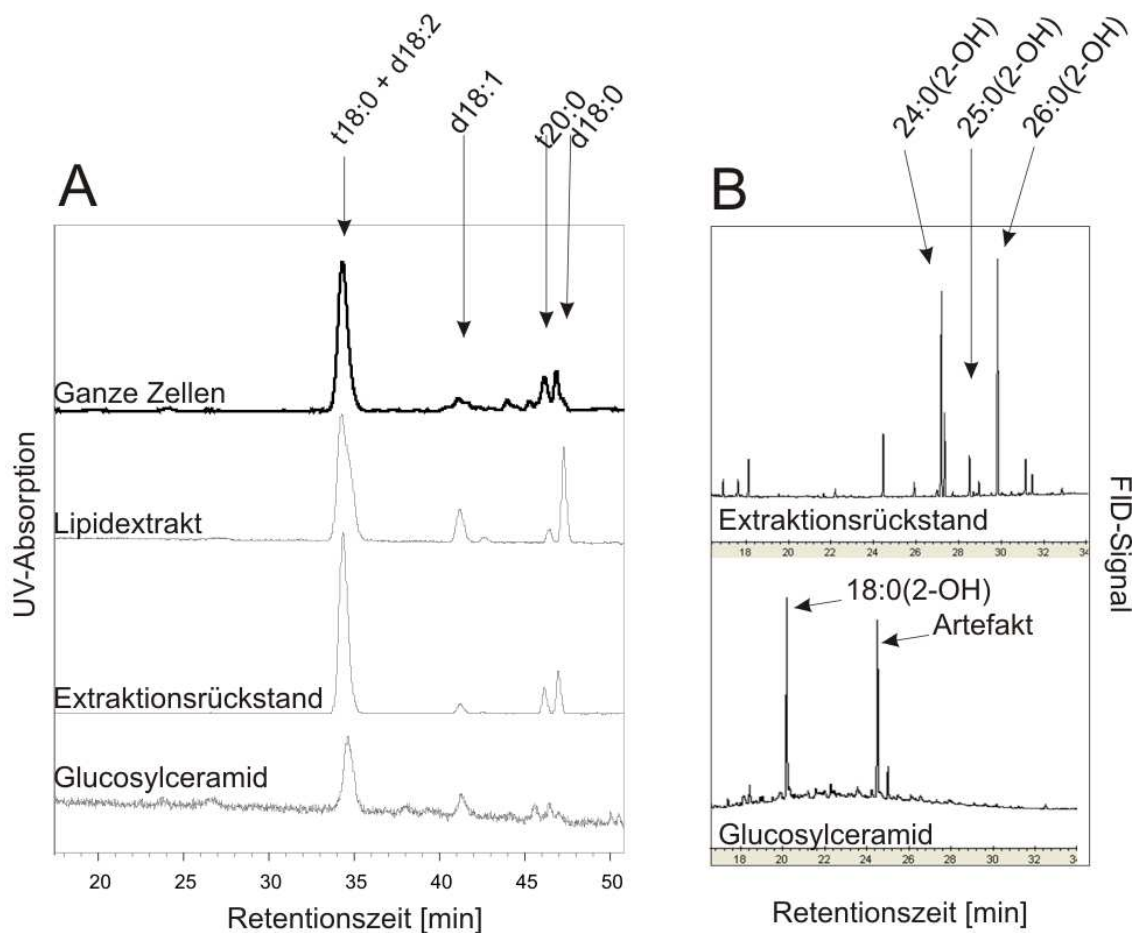


Abbildung 2-10: LCB- und FA-Komposition in Spingolipiden aus verschiedenen Proben von *P. pastoris* C9-m-KO. A) HPLC der LCB: Im LCB-Profil aller Proben fehlt der Peak für (4*E*,8*E*)-9-Methylsphinga-4,8-dienin (d18:2-9m), wohingegen die Vorstufen (d18:0, d18:1, d18:2) weiterhin vorhanden sind. Die Verteilung zwischen extrahierbaren und nicht extrahierbaren LCBs bleibt unverändert. **B) GC der FA:** Im Muster der Fettsäuren treten durch die Deletion der C9-Methyltransferase keine Veränderungen auf.

Die Analyse der Ceramide (Abbildung 2-11) zeigt, dass sich in diesem Stamm die Vorläuferceramide für die Methylierung (d18:2/18:0(2-OH)) anhäufen. Im Gegensatz zum Wildtyp sind hier Ceramide mit hydroxylierter Fettsäure angereichert. Die Zusammensetzung des GlcCer ist in diesem Stamm verändert: Der Teil, der im WT als d18:2-9m/18:0(2-OH) vorliegt, wird durch d18:2/18:0(2-OH) ersetzt. Die relative Menge von GlcCer mit einfach ungesättigter LCB ist nicht signifikant verändert. Trotz der Deletion der C9-Methyltransferase wurde ein GlcCer mit der gleichen Masse wie die von d18:2-9m/16:0(2-OH) nachgewiesen. Dies kann auf das Auftreten einer C₁₇-Fettsäure zurückzuführen sein, denn die Methylierung der Sphingobase resultiert in der gleichen Massenzunahme, wie sie bei der Verlängerung der Fettsäure um eine CH₂-Einheit auftritt (d18:2/17:0(2-OH), siehe Diskussion).

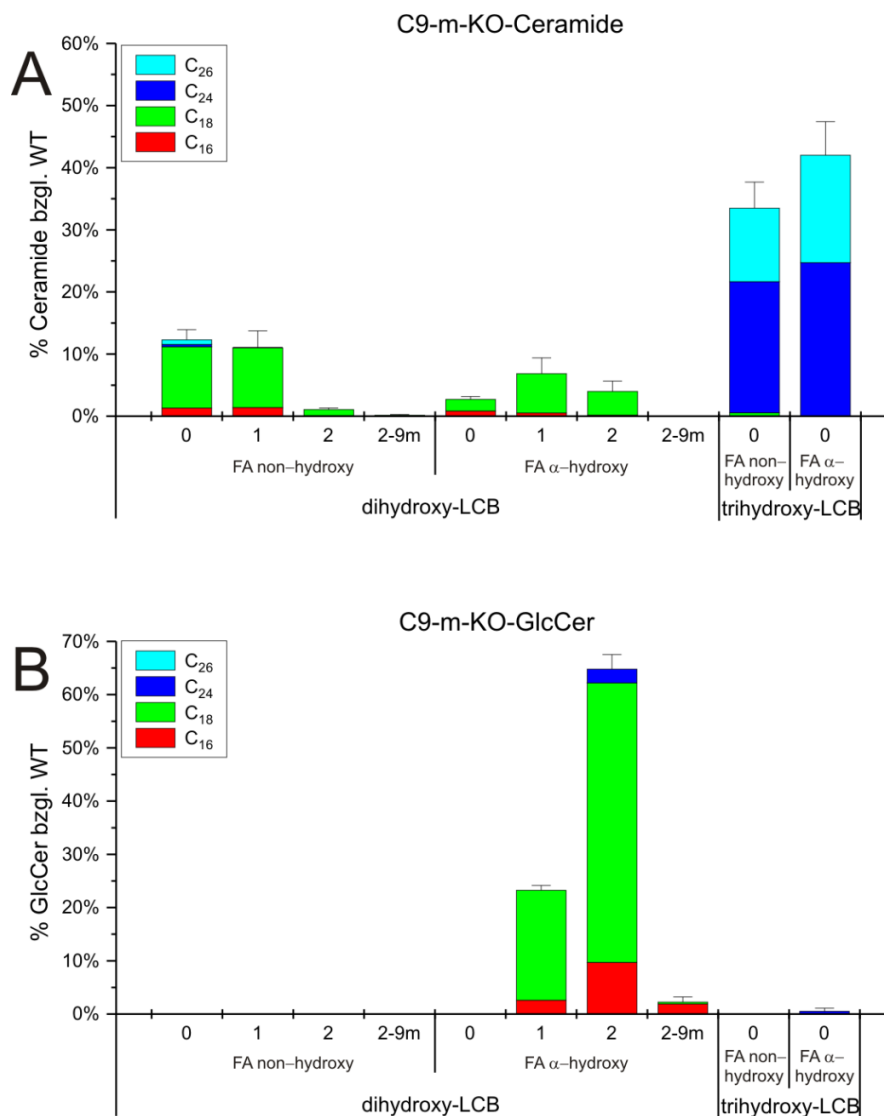


Abbildung 2-11: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus *P. pastoris* C9-m-KO. A) Die Deletion der C9-Methyltransferase führt zur Bildung von Ceramiden, die diese Modifikation nicht zeigen. Alle anderen Spezies werden weiterhin synthetisiert (d18:0, d18:1, d18:2, jeweils mit (nicht-)hydroxylierter C₁₆-C₁₈ Fettsäure). Die 4-Hydroxysphingarin-haltigen Ceramide werden auch hier nicht beeinflusst. **B)** Dieser Stamm synthetisiert weiterhin GlcCer. Die Hauptspezies enthält im Vergleich zum Wildtyp d18:2 statt d18:2-9m als Sphingobase, d18:1 haltiges GlcCer wird in gleicher Menge synthetisiert.

2.2.5 *P.p.* $\Delta 8$ -Desaturase-KO-Stamm

Die Deletion der $\Delta 8$ -Desaturase sollte zu maximal einfach ungesättigten Ceramiden führen. Ternes et al. zeigten, dass der Reaktionsmechanismus der C9-Methyltransferase einer Doppelbindung am C8 Atom der Sphingobase bedarf [47]. Aus diesem Grund fehlen nicht nur d18:2-9m und d18:2, sondern es kommt auch nicht zur Synthese von d18:1-9m. Im gereinigten GlcCer konnte somit ausschließlich d18:1 als LCB bestimmt werden, die Fettsäure bleibt weiterhin C18:0(2-OH) (Abbildung 2-12). An der Verteilung von GIPC-typischen LCB (t18:0) und Fettsäuren ändert sich auch in diesem Fall nichts.

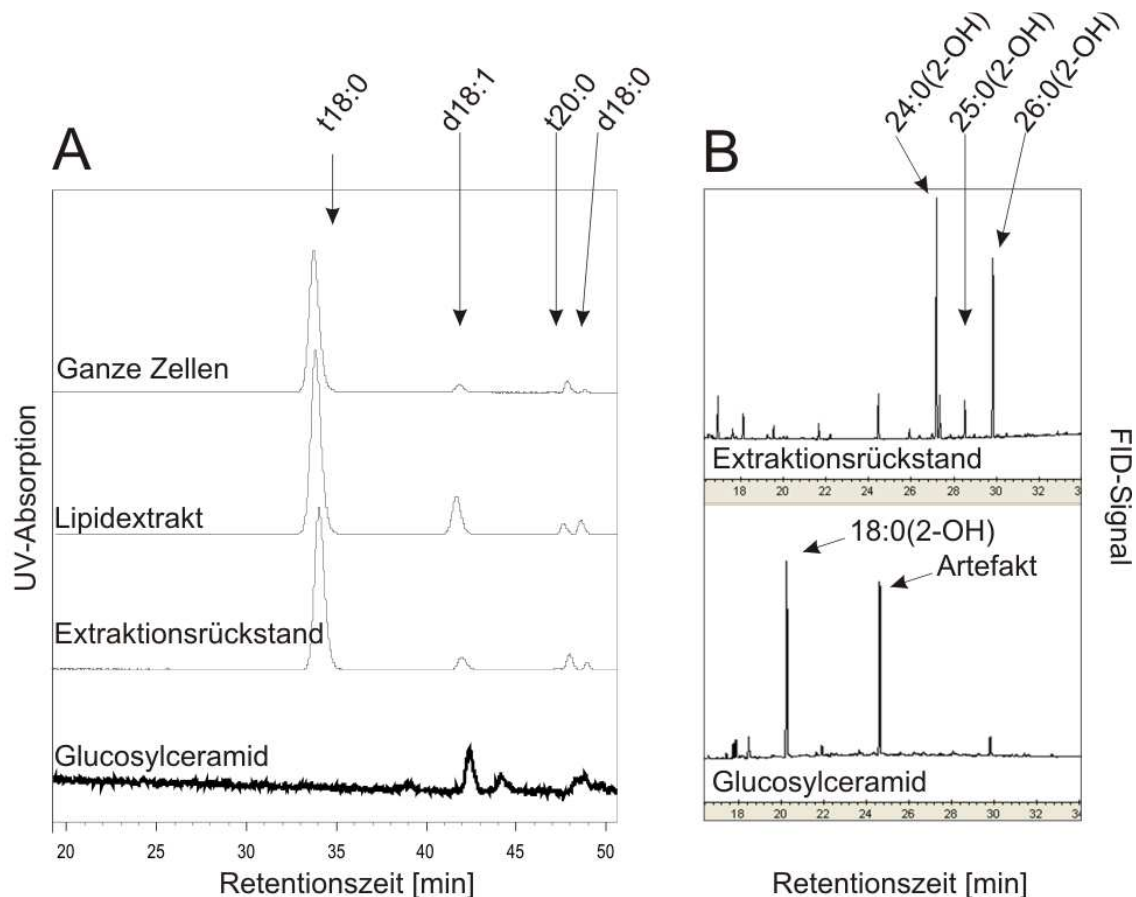


Abbildung 2-12: LCB- und FA-Komposition in Sphingolipiden aus verschiedenen Proben von *P. pastoris* $\Delta 8$ -KO. A) HPLC der LCB: Im Gegensatz zum C9-m-KO fehlt hier nicht nur d18:2-9m, sondern auch d18:2. Im GlcCer ist nur noch ein Signal für d18:1 und d18:0 zu finden. Die Verteilung zwischen extrahierbaren und nicht extrahierbaren LCB bleibt unverändert. **B) GC der FA:** Im Muster der Fettsäuren treten durch die Deletion der $\Delta 8$ -Desaturase ebenfalls keine Veränderungen auf. Die Fettsäuren der nicht extrahierbaren Komponenten und des GlcCer bleiben bestehen.

Die Analyse der freien Ceramide (Abbildung 2-12) bestätigt die Messungen der LCBs und Fettsäuren. Der Großteil der Ceramide besteht weiterhin aus den GIPC-typischen Spezies (t18:0/24:0). Ceramide mit einer dihydroxy-LCB liegen jedoch nur einfach ungesättigt oder gesättigt vor. Diese Ceramide werden sowohl mit einer nicht hydroxylierten als auch mit einer α -hydroxylierten Fettsäure synthetisiert. Das GlcCer hat in diesem Fall nur zwei mögliche Ceramidgrundgerüste: Eine einfach ungesättigte dihydroxy-LCB (d18:1) mit einer hydroxylierten C₁₆- oder C₁₈-Fettsäure.

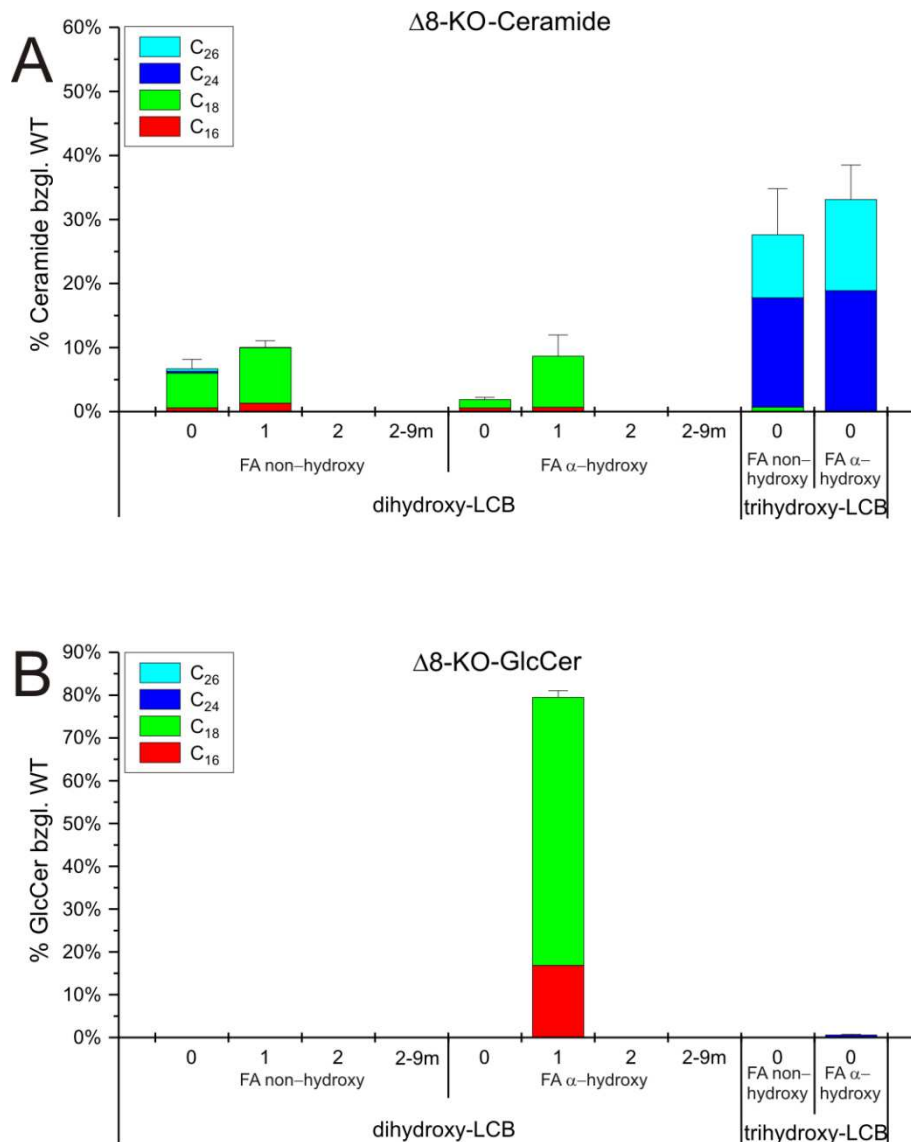


Abbildung 2-13: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus *P. pastoris* $\Delta 8$ -KO. **A)** Nach Ausschalten der $\Delta 8$ -Desaturase enthalten die dihydroxy-Ceramide ausschließlich gesättigte oder einfach ungesättigte LCB. Trihydroxy-Ceramide sind nicht beeinflusst **B)** Das in diesem Stamm gebildete GlcCer enthält nur d18:1/18:0(2-OH) und d18:1/16:0(2-OH) Ceramide, diese jedoch in erhöhter Menge.

2.2.6 *P.p.* $\Delta 4$ -Desaturase-KO-Stamm

Das Ceramidmuster im Wildtyp und in den bisher untersuchten Deletionsmutanten zeigte immer mindestens einfach ungesättigte LCB im Grundgerüst des GlcCer. Bei der Deletion der $\Delta 4$ -Desaturase besteht die Möglichkeit, dass die Doppelbindung am C4-Atom fehlt, am C8-Atom aber vorhanden ist, was ebenfalls einfach ungesättigte LCBs zur Folge hätte. Die Untersuchung der Sphingobasen ergab aber, dass nur noch gesättigte Spezies vorliegen (Abbildung 2-14). Dies deutet darauf hin, dass die $\Delta 8$ -Desaturase nur $\Delta 4$ -ungesättigte Substrate umsetzen kann. Ohne diese Modifikation ist *Pichia pastoris* auch nicht mehr in der Lage GlcCer zu synthetisieren, wohingegen die Synthese von GIPC nicht beeinträchtigt wird.

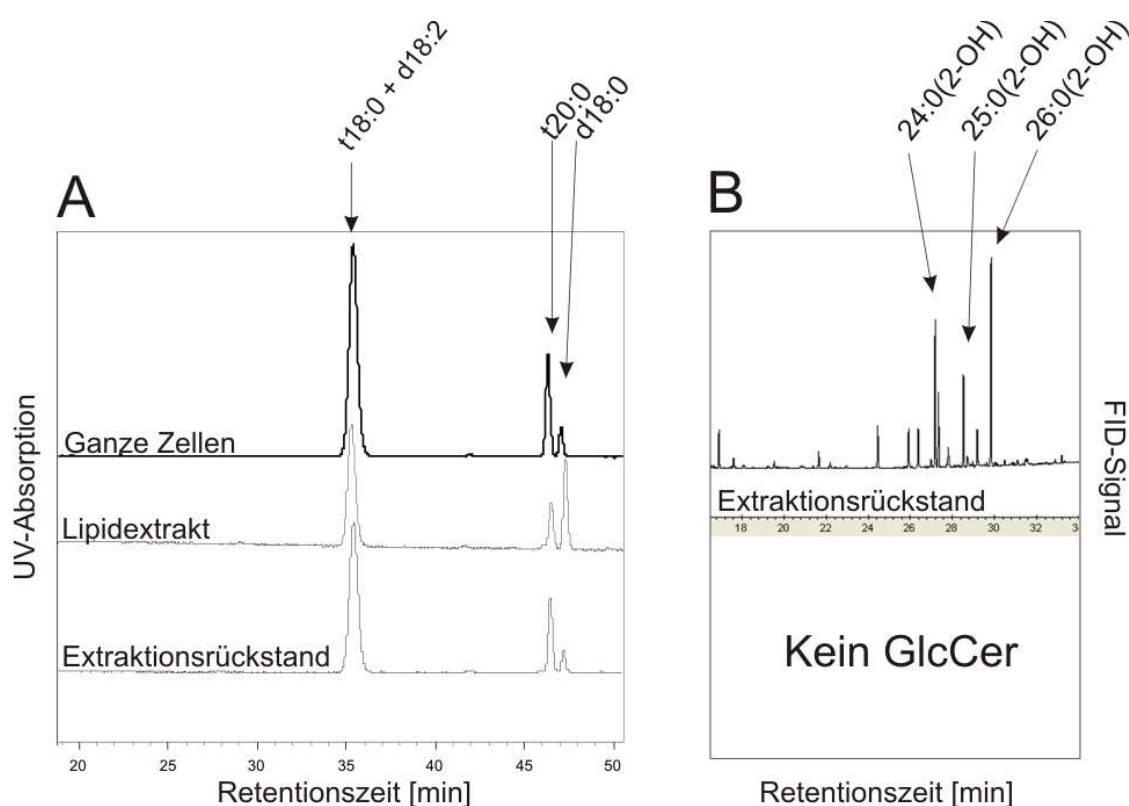


Abbildung 2-14: LCB- und FA-Komposition in Sphingolipiden aus verschiedenen Proben von *P. pastoris* $\Delta 4$ -KO. Da kein GlcCer gebildet wird, fehlen diese Messwerte. **A) HPLC der LCB:** In diesem Stamm ist lediglich die dihydroxy-LCB d18:0 zu finden, die trihydroxy-LCB sind nicht verändert. **B) GC der FA:** Im Extraktionsrückstand sind nach wie vor C₂₄-C₂₆-Fettsäuren in hydroxylierter Form die Hauptkomponenten.

Das Fehlen des GlcCers in diesem Stamm ist nicht darauf zurückzuführen, dass die Ceramidsynthase Bar1 nicht in der Lage ist, ungesättigte Ceramide zu produzieren. Wie in allen vorher untersuchten Stämmen wurde jeweils das entsprechende Ceramid (d18:0/18:0) nachgewiesen (Abbildung 2-15). Die gesättigten Ceramide werden synthetisiert (mit α -hydroxylierter oder nicht-hydroxylierter Fettsäure), aber nicht zu GlcCer umgesetzt.

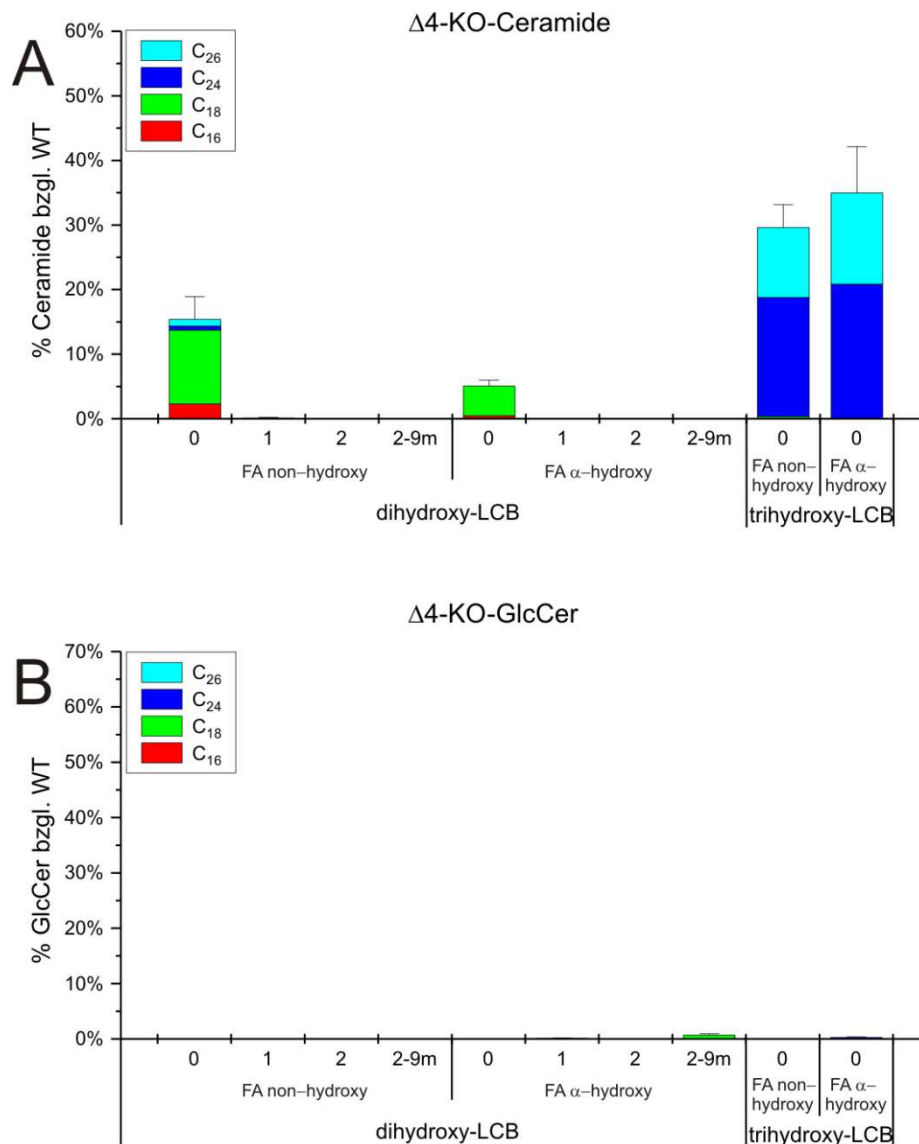


Abbildung 2-15: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus *P. pastoris* $\Delta 4$ -KO. A) In diesem Stamm werden ausschließlich dihydroxy-LCB-Ceramide mit gesättigter LCB produziert (Fettsäure (nicht-)hydroxyliert.). Trihydroxy-LCB-Ceramide sind nicht beeinflusst. **B)** Durch die Deletion der $\Delta 4$ -Desaturase kann kein GlcCer mehr gebildet werden. Die synthetisierten Ceramide mit gesättigter LCB können nicht glycosyliert werden.

2.2.7 *P.p. scs7*-KO-Stamm

Die Fettsäure- α -Hydroxylase (Scs7) ist das einzige hier betrachtete Enzym, das an der Synthese beider GSL-Spezies beteiligt ist. Die Fettsäuren des GlcCer und der GIPC liegen im WT jeweils in hydroxylierter Form vor. Die Synthese von GlcCer ist in diesem Stamm nicht möglich. In dieser Mutante ist eine Veränderung der GIPCs zu sehen: Die LCB ist weiterhin 4-Hydroxysphinganin (t18:0), aber die Fettsäuren liegen ohne Hydroxylierung vor (Abbildung 2-16). Die Menge der so beschaffenen GIPCs ist nicht signifikant verändert, die Signale der LCB und Fettsäuren liegen auf dem gleichen Niveau wie in den anderen Stämmen.

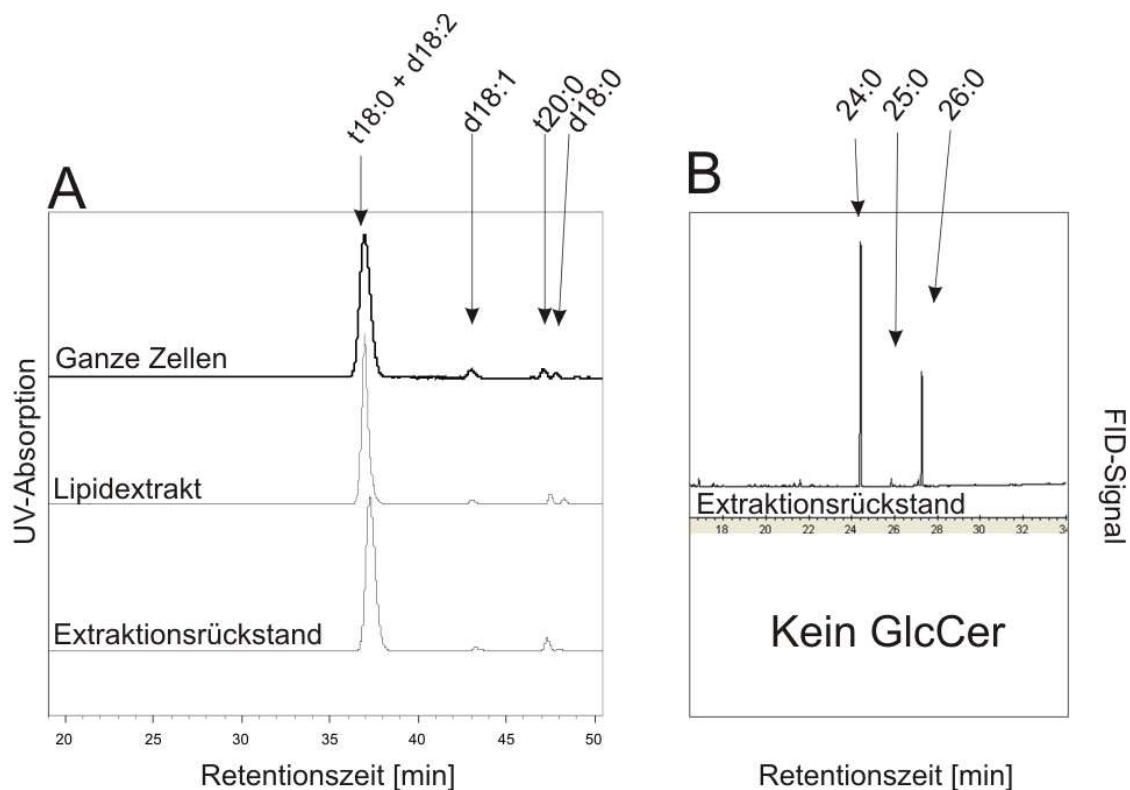


Abbildung 2-16: LCB- und FA-Komposition in Spingolipiden aus verschiedenen Proben von *P. pastoris scs7*-KO. Da kein GlcCer gebildet wird, fehlen diese Messwerte. **A) HPLC der LCB:** Die Deletion der α -Hydroxylase sollte die Verteilung der LCB nicht verändern. Es konnte jedoch mit chromatographischen Methoden keine Methylierung der Sphingobase festgestellt werden. **B) GC der FA:** Das Fettsäuremuster der nicht extrahierbaren Fettsäuren ist hier erstmals verändert. Das Fehlen der α -Hydroxylase führt zur Bildung von Komponenten mit nicht hydroxylierten C₂₄-C₂₆-Fettsäuren.

Abbildung 2-17 zeigt, dass dihydroxy-LCB-haltige Ceramide in der Form d18:0/18:0, d18:1/18:0 und d18:2/18:0 gebildet werden. Diese werden jedoch aufgrund der fehlenden Fettsäure-Hydroxylierung nicht zu GlcCer umgesetzt. Durch das Ausbleiben der Glucosylierung reichern sich diese Ceramide an (der Maximalwert der Y-Achse ist in diesem Diagramm verdoppelt). Sie liegen, verglichen mit dem Wildtyp, in ca. doppelter Menge vor. Außerdem scheint die Methylierung von d18:2 ohne eine hydroxylierte Fettsäure nicht so effektiv wie mit dieser Modifikation. d18:2-9m/18:0 wird nur in geringen Mengen produziert. Die GIPC-typischen Ceramide werden insgesamt in unveränderter Menge produziert, ihre Fettsäure ist jedoch nicht hydroxyliert.

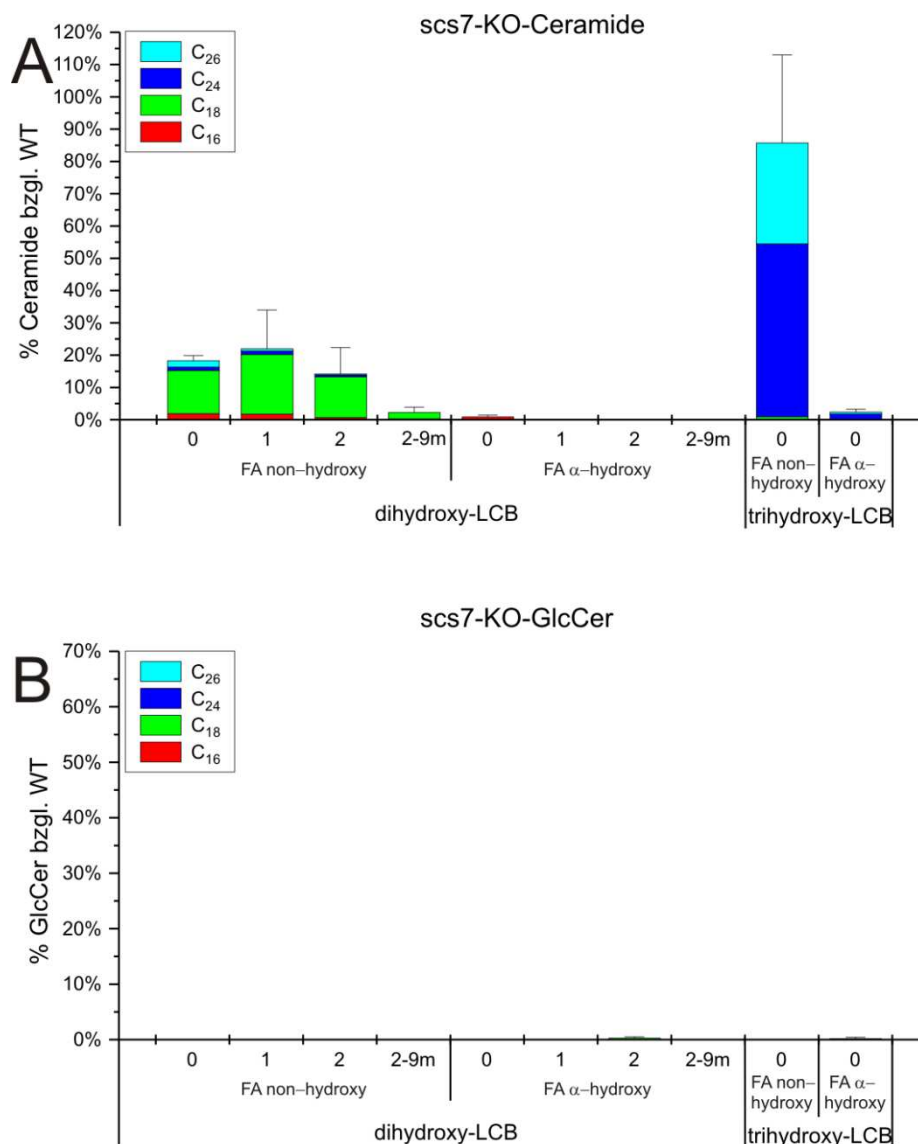


Abbildung 2-17. Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus *P. pastoris* scs7-KO. A) Die dihydroxy-Ceramide liegen mit allen LCB Modifikationen vor. Ihre Fettsäure ist jedoch stets nicht hydroxyliert. Dies gilt auch für die Ceramide mit 4-Hydroxysphingarin (t18:0) als LCB. Der Maximalwert der Y-Achse ist in diesem Diagramm verdoppelt **B)** Obwohl nach Deletion der α -Hydroxylase noch verschiedene Ceramide gebildet werden, so können diese nicht zu GlcCer umgesetzt werden.

2.2.8 *P.p.* gcs-KO-GCS-Stamm

Um weitere Einblicke zu gewinnen, mit Hilfe welcher Mechanismen es *Pichia pastoris* gelingt, die beiden unterschiedlichen GSL-Synthesewege (GlcCer und GIPC) voneinander zu trennen, wurde eine Mutante untersucht, in welcher die Glucosylceramid-Synthase unter der Kontrolle eines starken Promotors (AOX1 Promotor) überexprimiert ist. Die chromatographische Messung der verschiedenen Proben ergab weiterhin 4-Hydroxysphingarin als dominierende LCB. Im Lipidextrakt scheint der Anteil an dihydroxy-LCB im Vergleich zum Wildtyp jedoch leicht erhöht. Nach einer dünnschichtchromatographischen Auftrennung wurden zwei verschiedene Banden für GlcCer ausgemacht. Diese wurden getrennt analysiert. Die Messwerte sind aufgrund der geringen Menge des veränderten GlcCers nicht auswertbar (Abbildung 2-18).

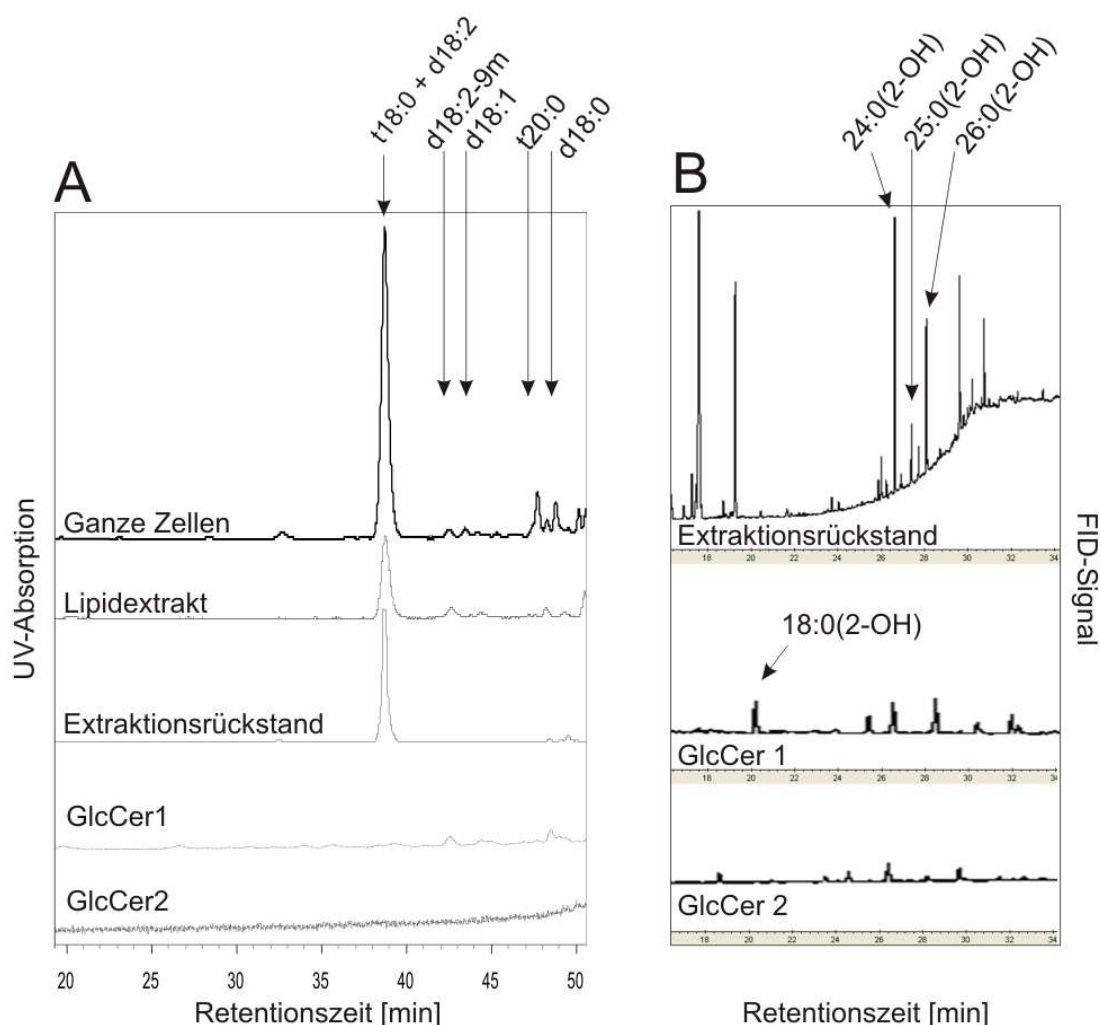


Abbildung 2-18: LCB- und FA-Komposition in Spingolipiden aus verschiedenen Proben von *P. pastoris* gcs-KO-GCS. A) HPLC der LCB: In den Proben der ganzen Zellen, dem Lipidextrakt und dem Extraktionsrückstand dominieren weiterhin die trihydroxy-LCB. Durch die Überexpression der GCS ist der Anteil an d18:2-9m im Lipidextrakt erhöht. Es wurden zwei verschiedene GlcCer-Banden analysiert, die Proben sind jedoch nicht auswertbar **B) GC der FA:** Im Rückstand sind weiterhin hydroxylierte VLCFA dominant. GlcCer1 hat 18:0(2-OH) als FA. In GlcCer2 ist die Messung nicht eindeutig, es sind aber hydroxylierte C₂₄₋₂₆ FA enthalten

Die Messung über massenspektrometrische Methoden liefert auf Grund der erhöhten Empfindlichkeit genauere Aussagen. Durch die starke Expression kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Menge von GlcCer (ca. verdreifacht) und zu einer Abnahme an freien Ceramiden, da diese effektiv glucosyliert werden (Abbildung 2-19). Das GlcCer weist wie im Wildtyp ausnahmslos hydroxylierte Fettsäuren auf, Ceramide mit nicht hydroxylierten FAs werden nicht glucosyliert. Ceramide mit einer gesättigten LCB (d18:0) werden nur in sehr geringen Mengen umgesetzt. Das erstaunlichste an dieser Mutante ist jedoch die Synthese von WT-unüblichen GlcCer-Spezies. Ungefähr ein Viertel des GlcCer besitzt das Ceramidgrundgerüst, das sonst nur in den GIPC auftritt: t18:0/24:0(2-OH) und t18:0/26:0(2-OH). Die Glucosylierung ist auch hier auf Ceramide mit hydroxylierter Fettsäure beschränkt.

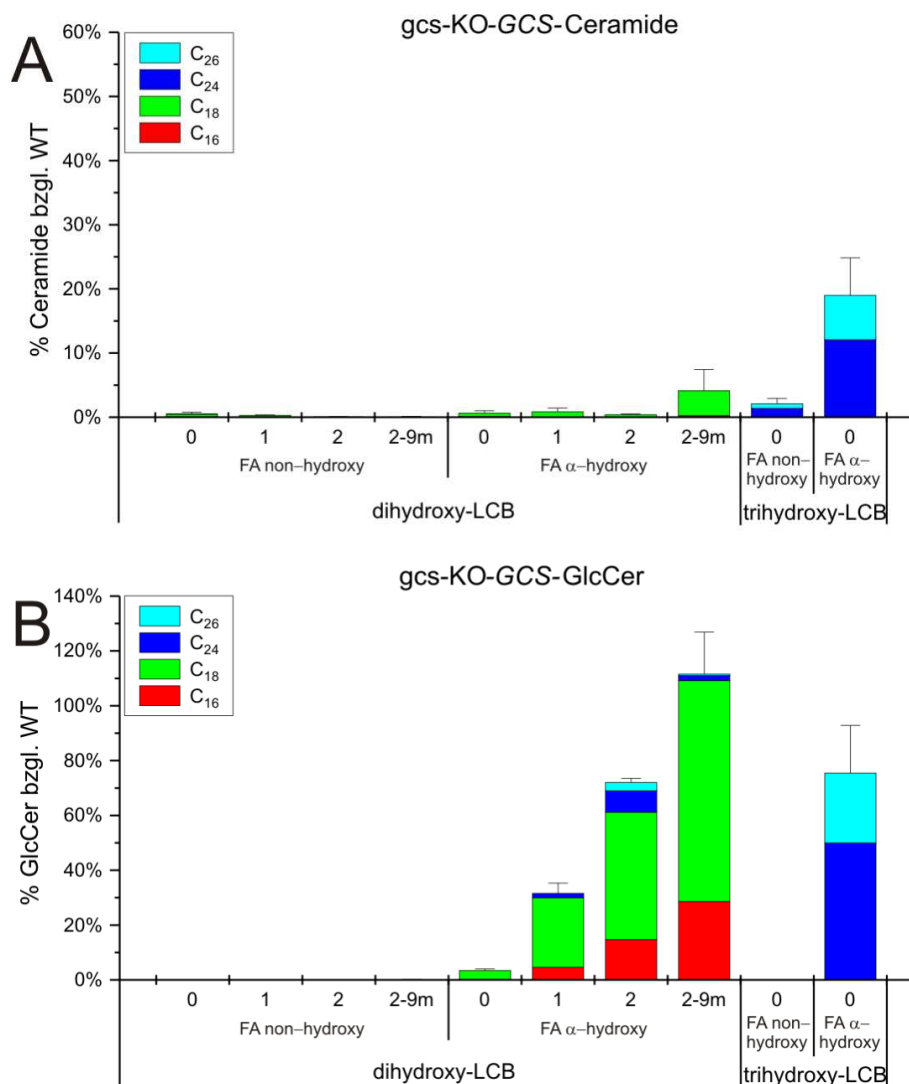


Abbildung 2-19: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus *P. pastoris* gcs-KO-GCS. A) Die Überexpression der Gcs führt zu einer Verringerung der Ceramidmenge. Es liegen aber noch alle Spezies wie im Wildtyp vor. **B)** Das Muster der gebildeten dihydroxy-LCB-haltigen GlcCer entspricht dem des Wildtyps, die Gesamtmenge ist jedoch erhöht (Der Maximalwert der Y-Achse ist in diesem Diagramm verdoppelt). Hier kommt es auch erstmals zu einer geringen Synthese von GlcCer mit gesättigter dihydroxy-LCB. In diesem Stamm wird aber auch ein Teil der t18:0-haltigen Ceramide zu GlcCer umgesetzt. Diese Spezies haben wie die dihydroxy-LCB-Klassen durchgehend eine hydroxylierte Fettsäure.

2.2.9 *P.p.* $\Delta 4$ -Desaturase-KO-GCS-Stamm

Um zu überprüfen, ob der Verlust des GlcCer im $\Delta 4$ -KO-Stamm durch die Überexpression der GCS kompensiert werden kann, wurde das Gen auch in diesem Stamm unter Kontrolle des AOX1-Promotors exprimiert. Wie in Abbildung 2-20 zu erkennen ist, wird die Synthese der GIPC nicht beeinflusst: Die 4-Hydroxysphingarin-Peaks dominieren weiterhin in den Fraktionen der ganzen Zellen, im Lipidextrakt und im Rückstand. Wie im $\Delta 4$ -KO-Stamm sind auch hier keine Peaks für ungesättigte LCBs nachzuweisen. Die dünnschichtchromatographische Analyse der Lipide aus diesem Stamm ergab zwei schwache Banden auf Höhe des nativen GlcCer. Diese Banden wurden einzeln analysiert und zeigten, dass auch hier zwei grundsätzlich verschiedene GlcCer-Spezies synthetisiert werden: Eine mit einer d18:0 LCB und einer C18:0(2-OH) FA und die andere mit dem GIPC-typischen t18:0 und 24:0(2-OH) bzw. 26:0(2-OH) Grundgerüst.

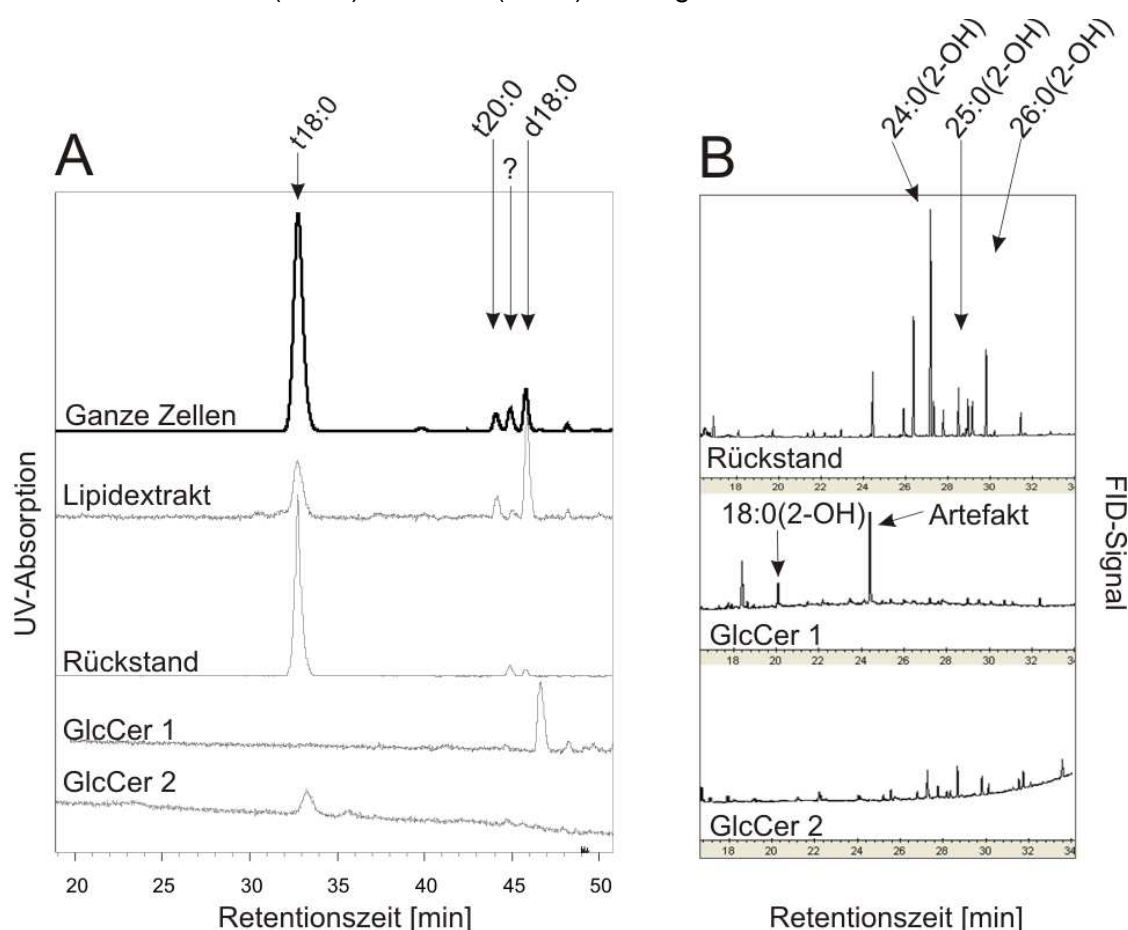


Abbildung 2-20: LCB- und FA-Komposition in Sphingolipiden aus verschiedenen Proben von *P. pastoris* $\Delta 4$ -KO-GCS. A) HPLC der LCB: Wie im $\Delta 4$ -KO fehlen die Peaks für ungesättigte LCBs. Trihydroxy-LCB sind wie im Wildtyp vorhanden. GlcCer1 enthält d18:0 und GlcCer2 t18:0. **B) GC der FA:** Im Rückstand sind weiterhin hydroxylierte VLCFA dominant. GlcCer1 enthält 18:0(2-OH). In GlcCer2 ist die Messung nicht eindeutig, es sind aber hydroxylierte C₂₄₋₂₆ FA enthalten.

Die Gesamtmenge von Ceramiden ist in diesem Stamm verringert, und sie enthalten ausschließlich gesättigte Sphingobasen. Anders als im $\Delta 4$ -KO-Stamm werden die Ceramide mit einer gesättigten dihydroxy-LCB zu GlcCer umgesetzt, sofern die Fettsäure α -hydroxyliert ist (d18:0/18:0(2-OH)). Die hierbei produzierte Menge macht aber lediglich ca. 10% des im Wildtyp vorkommenden GlcCer aus. Die GCS kann dieses Ceramid also in GlcCer umsetzen, allerdings nur mit geringer Effektivität. Da die $\Delta 4$ -Desaturierung die GIPC-typischen Ceramide nicht beeinflusst, wird das unübliche GlcCer mit GIPC-typischen Ceramiden in gleicher Menge wie im gcs-KO-GCS synthetisiert, auch hier erneut nur mit hydroxylierten Fettsäuren.

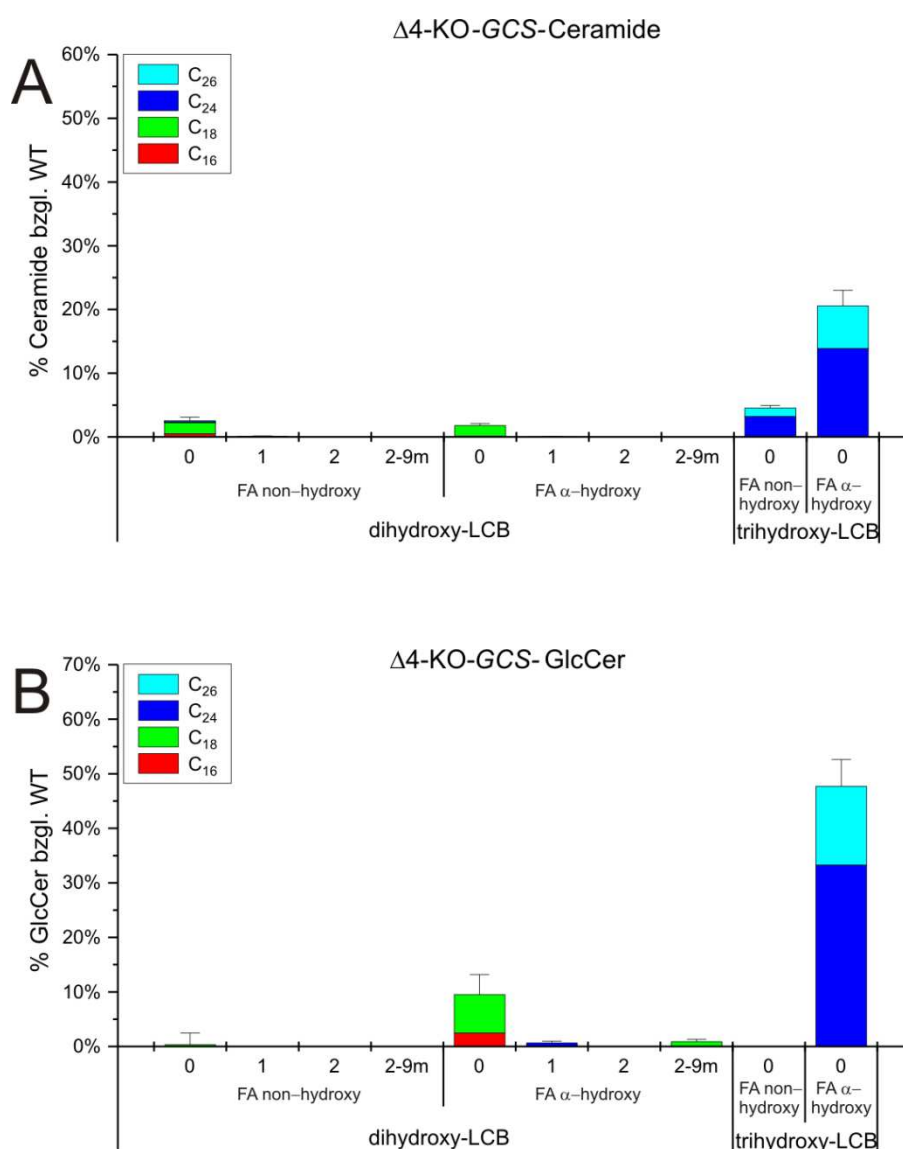


Abbildung 2-21: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus *P. pastoris* $\Delta 4$ -KO-GCS. A) Wie im $\Delta 4$ -KO werden hier nur noch dihydroxy-LCB-Ceramide mit gesättigter LCB gebildet. Die Menge von Ceramiden ist durch die Überexpression der Gcs wiederum verringert. **B)** Die starke Expression der Gcs führt in diesem Stamm aber zu einer geringen Umsetzung der dihydroxy-LCB-Ceramide mit gesättigter LCB, was im korrespondierenden knock out nicht der Fall war. Auch hier werden 4-Hydroxysphingarin-haltige Ceramide mit hydroxylierten C₂₄-C₂₆-Fettsäuren zu GlcCer verarbeitet.

2.2.10 *P.p. scs7-KO-GCS*

Auch im *scs7-KO* sollte überprüft werden, ob sich der Verlust von GlcCer durch die Überexpression der GCS kompensieren lässt. Die LCB der GIPC ist unverändert 4-Hydroxysphinganin. Die korrespondierenden C₂₄- bis C₂₆-Fettsäuren sind wie im *scs7-KO* nicht hydroxyliert (Abbildung 2-22). Über Dünnschichtchromatographie konnten auch hier zwei Banden auf Höhe des GlcCer isoliert werden. Die LCB dieser Lipide ist d18:2 oder t18:0. Diese Basen können mit diesem System nicht aufgetrennt werden. Die Analyse der Fettsäuren war auf Grund der geringen Menge des GlcCer nicht auswertbar.

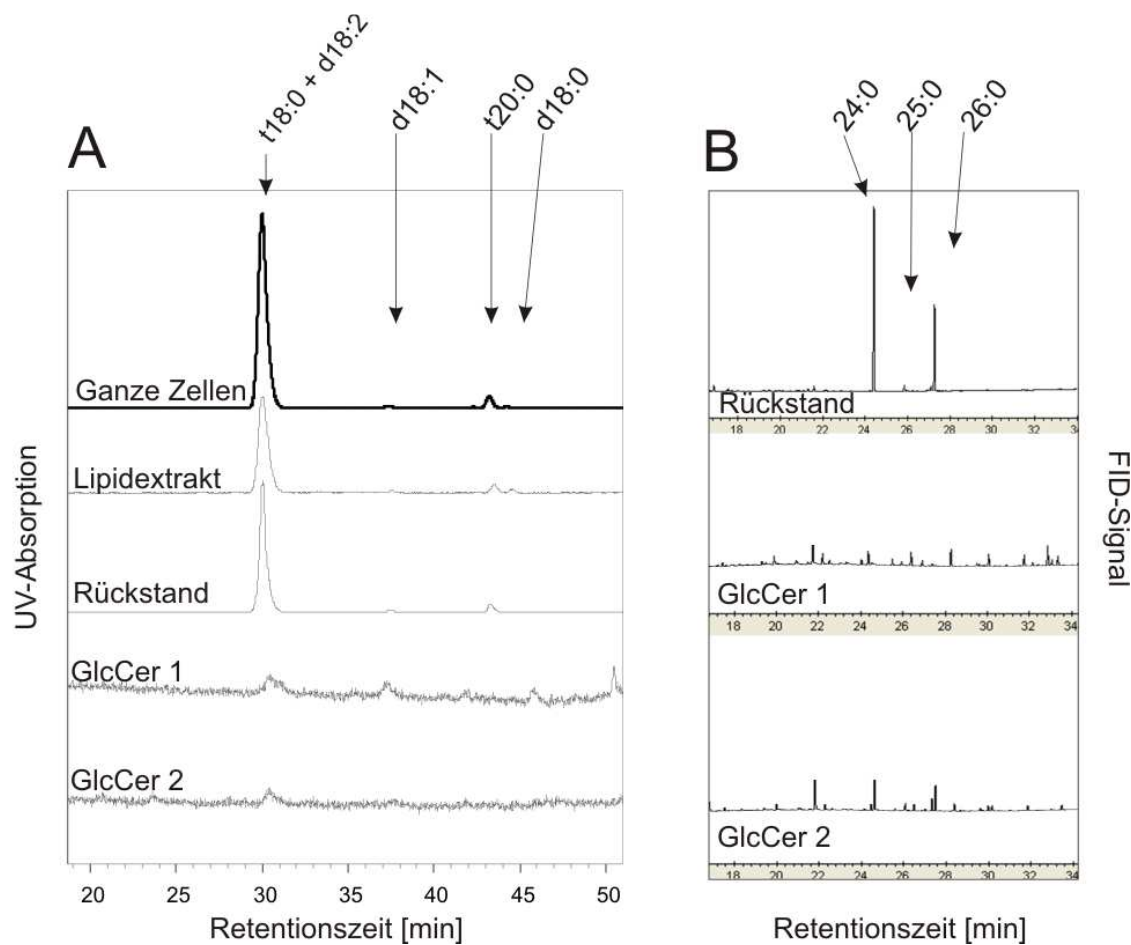


Abbildung 2-22: LCB- und FA-Komposition in Sphingolipiden aus verschiedenen Proben von *P. pastoris scs7-KO-GCS*. A) HPLC der LCB: Korrespondierend zum *scs7-KO* fehlen die Peaks für methylierte-LCB. Trihydroxy-LCB sind wie im Wildtyp vorhanden. GlcCer1 und GlcCer2 haben die Sphingobase d18:2 bzw. t18:0. B) GC der FA: Im Rückstand sind ausschließlich nicht hydroxylierte VLCFA zu finden. Die Analysen der Fettsäuren der GlcCer waren nicht auswertbar.

Die Analyse dieses Stammes über UPLC-TOF brachte auf Grund der erhöhten Sensitivität eindeutigere Ergebnisse. Dihydroxy-LCB-haltige Ceramide sind in diesem Stamm kaum vorhanden, wohingegen eine große Menge t18:0/C24:0 und t18:0/C26:0 nachgewiesen werden konnte. Diese GIPC-typischen Ceramide können jedoch nicht zu GlcCer umgesetzt werden. Die Messung ergab weiterhin eine geringe Menge von GlcCer mit dihydroxy-LCB und einer im Gegensatz zum Wildtyp nicht hydroxylierten Fettsäure. Die Umsetzung dieser Ceramide ist jedoch nicht effektiv, die gebildete Menge ergibt weniger als 10% der GlcCer im Wildtyp. Der hier gemessene Anteil von GlcCer mit hydroxylierter Fettsäure und einer trihydroxy-LCB muss auf andere Art entstanden sein, da die *Scs7* ja nicht aktiv ist. Denkbar ist eine Aufnahme aus dem Medium (Hefeextrakt aus *S. cerevisiae*) oder die Hydroxylierung durch ein anderes Enzym (siehe Diskussion).

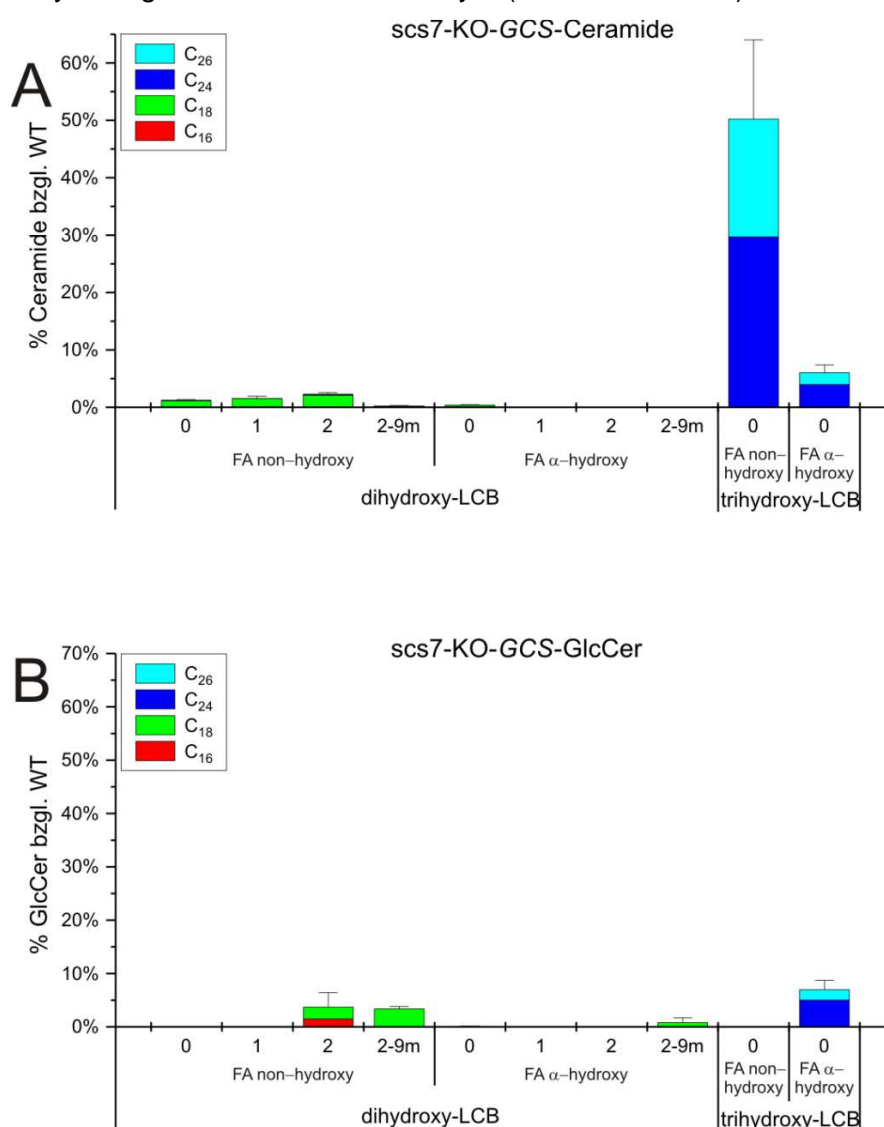


Abbildung 2-23: Massenspektrometrische Analyse der Ceramide und GlcCer aus *P. pastoris* scs7-KO-GCS. A) Die Deletion der α -Hydroxylase führt zur Bildung von Ceramiden mit nicht hydroxylierter Fettsäure. **B)** Die Messung des GlcCer dieses Stammes zeigte entgegen dem *scs7*-KO-Stamm eine geringe Umsetzung der dihydroxy-LCB-Ceramide mit nicht hydroxylierter Fettsäure. Die Glucosylierung der trihydroxy-LCB-Ceramide ist auf solche mit hydroxylierter Fettsäure beschränkt.

2.3 Analyse der GIPC

Die obigen Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Zusammensetzung der Ceramide und des GlcCer in allen Stämmen darzustellen. Die Messung der GIPC ist mit dieser Methode nicht möglich, da sie nicht extrahiert oder bei der Fraktionierung nicht quantitativ eluiert werden können. Sämtliche Enzyme mit Ausnahme der Scs7 sollten die Synthese der GIPCs nicht beeinflussen. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden die GIPC in einigen Stämmen mit einer veränderten Methode nachgewiesen. Hierfür wurden drei Kulturen á 100 ml über Nacht angezogen und die Lipide mit Ethanol/Wasser/Diethylether/Pyridin/Ammoniumhydroxid (15:15:5:1:0,018) extrahiert. Die Messung der GIPC aus diesen Extrakten erfolgte in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Howard Riezman, Université de Genève, Schweiz, über ein Tandem-MS-System. Die Durchführung der Extraktion sowie die Messung und Auswertung der Daten wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Philipp Ternes (Universität Göttingen) und Frau Dr. Isabelle Riezman (Université de Genève) übernommen (siehe 5.8.6). Als Kopfgruppen konnten Inositolphosphat (\rightarrow IPC), Mannosyl-inositolphosphat (\rightarrow MIPC) und Mannosyl-di(inositolphosphat) (\rightarrow M(IP)₂C) bestimmt werden. Die Messwerte der Lipide mit den verschiedenen Kopfgruppen wurden aufaddiert und so die Zusammensetzungen der Ceramidgrundgerüste untersucht (Abbildung 2-24). Die Verteilung der Ceramide ist in allen Stämmen außer scs7-KO nicht signifikant gegenüber dem Wildtyp verändert. Die Deletion der α -Hydroxylase führt zur Bildung von GIPC mit nicht hydroxylierten Fettsäuren, wohingegen alle anderen Stämme überwiegend hydroxylierte Fettsäuren in den GIPCs besitzen.

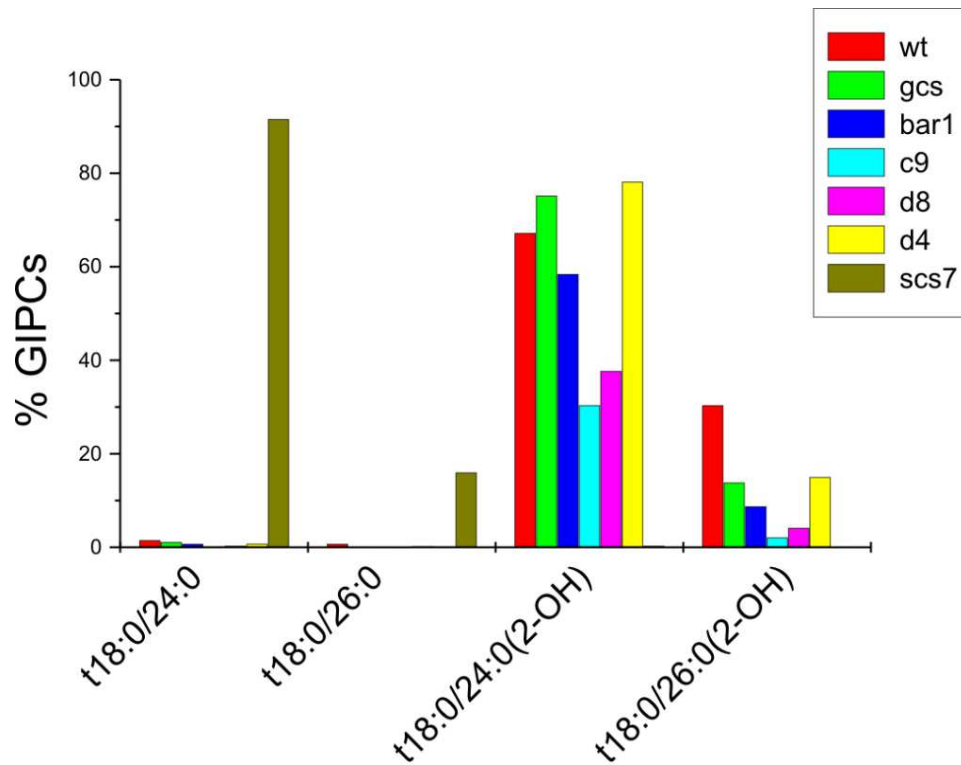


Abbildung 2-24: Verteilung der Ceramide aus den GIPCs in verschiedenen Stämmen. Die Angabe der Namen in der Legende beschreibt, welches Gen deletiert wurde. In allen Stämmen (außer *scs7*-KO) sind die Fettsäuren der Ceramide hydroxyliert (C_{24} oder C_{26}). Nach Deletion der α -Hydroxylase im Stamm *P.p scs7*-KO sind die Fettsäuren jedoch nicht hydroxyliert, die Lipide werden weiterhin in gleicher Menge produziert. Die Daten unterliegen keiner exakten Quantifizierung.

3 Diskussion

In den geschilderten Versuchen wurden die Sphingolipidzusammensetzungen von Mutanten, die verschiedenen Eingriffen in den GSL-Syntheseweg unterliegen, beschrieben. Im Folgenden werden über den Vergleich der Ceramid bzw. GlcCer-zusammensetzung in bestimmten Mutanten Mechanismen ausgemacht, welche die getrennte Biosynthese von GIPCs und GlcCer ermöglichen. Zu diesem Zweck werden aus den bereits gezeigten Daten neue Abbildungen erzeugt, die nur für die jeweilige Aussage relevante Strukturmerkmale berücksichtigen und irrelevante Merkmale ausblenden. Es sollen hierbei folgende Fragen beantwortet werden:

- Wie werden die unterschiedlichen Ceramidgrundgerüste (GlcCer bzw. IPC) synthetisiert?
- Welchen Einfluss haben die Modifikationen der Fettsäure und der Sphingobase auf die GlcCer-Biosynthese?
- Wie erfolgt die spezifische Umsetzung der verschiedenen Ceramide zu komplexen Sphingolipiden?

Nach Beantwortung dieser Fragen wird ein Modell für die GSL-Biosynthese in *P. pastoris* vorgestellt. Abschließend sollen noch offene Fragen beantwortet werden:

- Welche Probleme können bei der Bewertung der Messwerte auftreten?
- Welches sind die Funktionen der GSL in *P. pastoris*?

3.1 Bar1 ist für die Bildung von GlcCer-typischen Ceramiden verantwortlich

Der erste Schritt in der Biosynthese von GSL ist die Synthese der Ceramidgrundgerüste. Die Analyse der verschiedenen Stämme zeigte, dass in *P. pastoris* zwei verschiedene Gruppen von Ceramiden existieren. In Abbildung 3-1 ist dies verdeutlicht, wobei hier nur die für die Unterscheidung der zwei Ceramidpools wichtigen Merkmale verglichen werden: Die Hydroxylierung der LCB und die Kettenlänge der Fettsäure. Die eine Gruppe (rote Balken) besitzen eine dihydroxy-LCB, verknüpft mit einer C₁₆ (ca. 15%)- oder einer C₁₈ (ca. 85%)-Fettsäure. Die andere Gruppe ist charakterisiert durch eine trihydroxy-LCB und einer C₂₄ (ca. 60%)- oder C₂₆ (ca. 40%)-Fettsäure (blaue Balken). Die Analyse des GlcCer macht deutlich, dass nur der erste Ceramidpool in GlcCer umgesetzt wird, die trihydroxy-LCB-Ceramide hingegen werden nicht glucosyliert, sondern zu IPC umgesetzt. Durch die Deletion der Ceramidsynthase Bar1 verschwindet der GlcCer-typische Ceramidpool der durch eine dihydroxy-LCB und C₁₆-C₁₈-Fettsäuren charakterisiert ist. Der andere Ceramidpool, der für IPC typisch ist, bleibt erhalten. Die Deletion der GCS hat zur

Folge, dass die Bar1-abhängigen Ceramide nicht mehr zu GlcCer umgesetzt werden können, selbst aber erhalten bleiben.

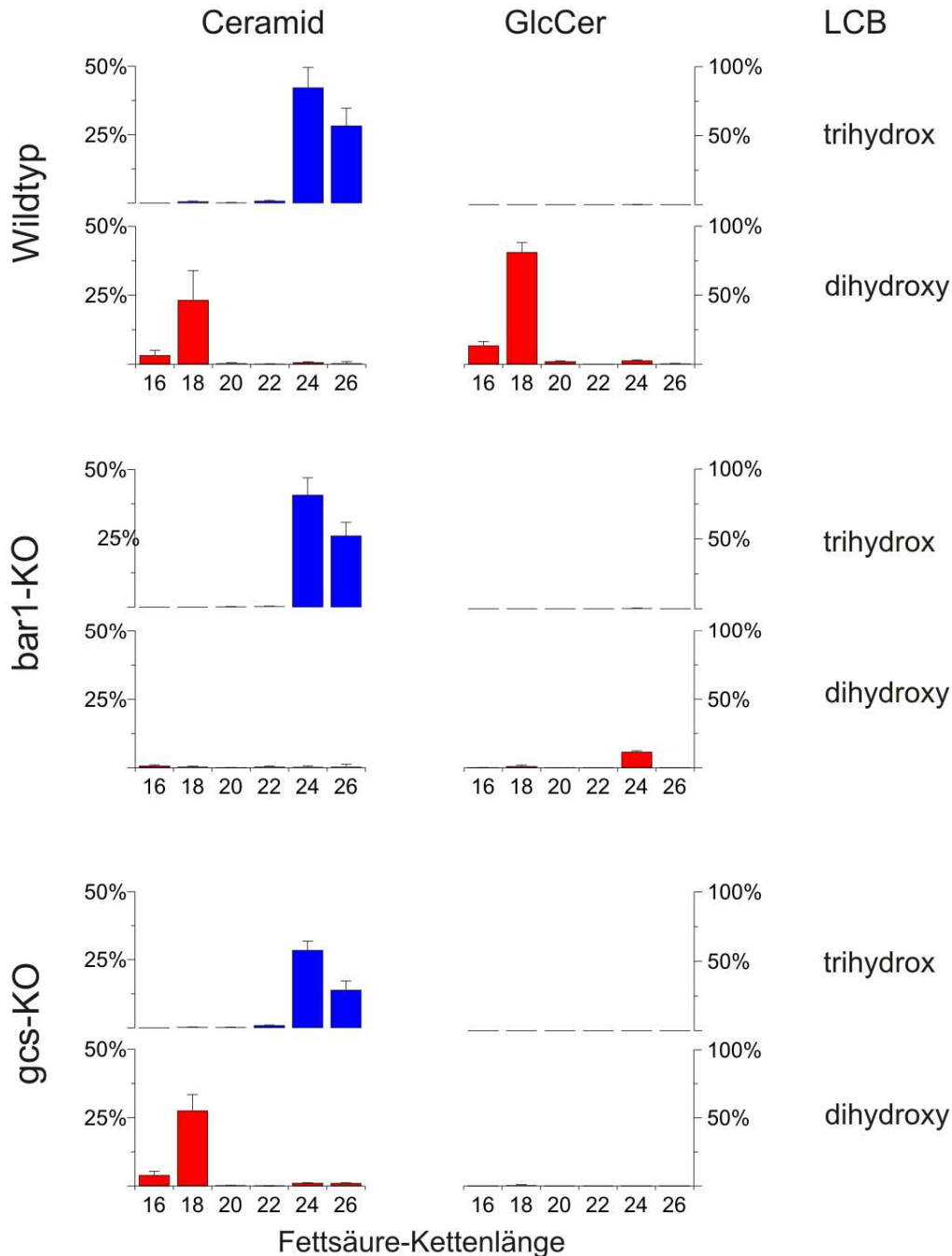


Abbildung 3-1: *Pichia pastoris* synthetisiert zwei unabhängige Ceramidpools: Auf der X-Achse ist die Kettenlänge der Fettsäure aufgetragen. Der Hydroxylierungsgrad der Sphingobase (dihydroxy-LCB oder trihydroxy-LCB) ist jeweils durch ein eigenes Diagramm repräsentiert. Die prozentualen Werte beziehen sich jeweils auf die Summe der Komponenten im Wildtyp. Dieser bildet zwei Ceramidpools, von denen nur einer in GlcCer umgesetzt wird. Die Deletion der GCS führt zum Verlust des GlcCer, wohingegen beide Ceramidpools erhalten bleiben. Mit dem Ausschalten der Ceramidsynthese *BAR1* geht der Verlust des Ceramidpools einher, welcher im Wildtyp in GlcCer umgesetzt wird.

Es konnte somit gezeigt werden, dass in *Pichia pastoris* zwei unterschiedliche Ceramidpools auftreten, die von wenigstens zwei Ceramidsynthasen gebildet werden. Die

Ceramidsynthase Bar1 katalysiert die Bildung von dihydroxy-LCB und C₁₆-C₁₈-FA-haltigen Ceramiden, die als Vorläufer für die GlcCer-Produktion dienen. Der Bar1-unabhängige Pool, der als Grundgerüst für IPCs dient, wird aller Voraussicht nach von der putativen Ceramidsynthase Lag1 gebildet. Auf die Probleme, die bei der Charakterisierung dieses Enzyms auftraten, wird später eingegangen.

Nun stellte sich die Frage, wie die Trennung der Ceramidpools durch die beiden Ceramidsynthasen erreicht werden kann. Denkbar wäre hierfür eine räumliche Trennung der Enzyme, wobei jedes einzelne nur die Substrate zugeführt bekommt, die spezifisch für die jeweilige Ceramidspezies sind. Ein anderer Mechanismus könnte auf einer Substratspezifität der Ceramidsynthasen beruhen. Um dies zu testen, wurde in Kooperation mit Herrn Dr. Philipp Ternes und Frau Dipl. Biol. Marnie Schwarz, Georg-August-Universität Göttingen, Abteilung Prof. Ivo Feussner (Biochemie der Pflanze), die Substratspezifität von Bar1 bestimmt.

Für diesen Zweck wurde das Gen *BAR1* in einem Ceramidsynthase-freien *S.cerevisiae*-Stamm (*lag1-KO/lac1-KO*) unter Kontrolle eines starken Promotors exprimiert. Somit ist zum Einen garantiert, dass das Enzym in ausreichender Menge produziert wird, und zum Anderen, dass das Ergebnis nicht durch *Saccharomyces*-eigene Ceramidsynthasen verfälscht wird. Die Zellen wurden aufgebrochen, eine Membranpräparation hergestellt und diese mit Sphinganin (d18:0) sowie aktivierten Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge (C₁₆-C₂₆-Acyl-CoAs) versetzt. Das von Bar1 synthetisierte Ceramid wurde aus dem Ansatz extrahiert und per MS vermessen. Abbildung 3-2 zeigt die Spezifität (FA jeweils einzeln zugegeben) und Selektivität (verschiedene FA gleichzeitig zugegeben) des Enzyms bezüglich der Fettsäuren-Kettenlänge.

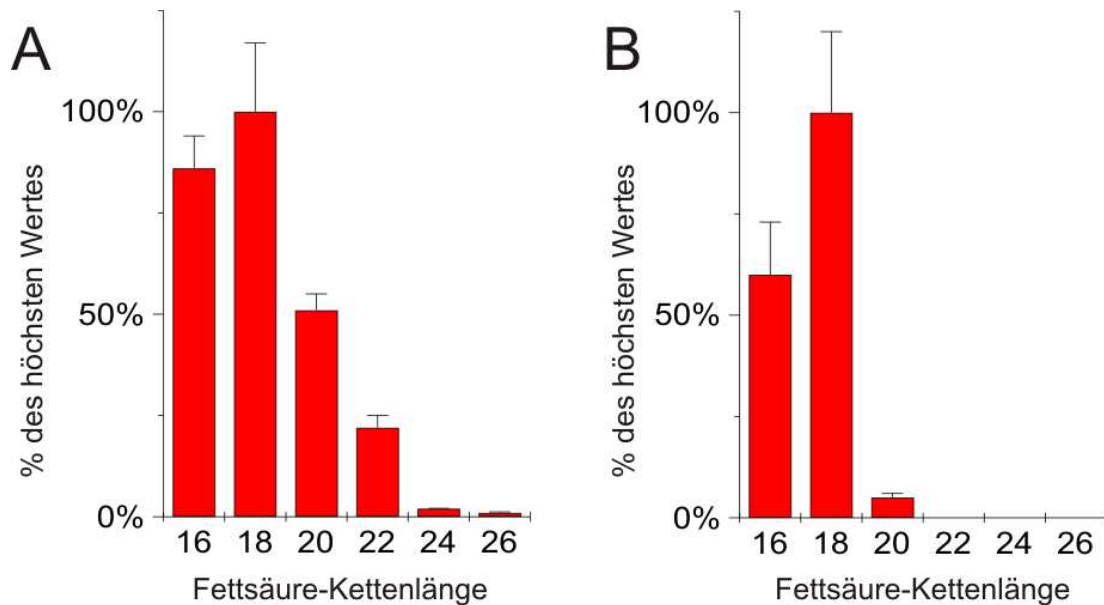


Abbildung 3-2: Präferenz von Bar1 bezüglich der Kettenlänge der Fettsäure: A) Spezifität: In Kombination mit der LCB Sphinganin ist eine Präferenz von Bar1 für Fettsäure-Kettenlängen von 16 und 18 Kohlenstoffatomen zu erkennen. Die in vivo selten vorkommenden C₂₀- und C₂₂-Fettsäuren werden auch noch relativ effizient umgesetzt. **B) Selektivität:** Stehen Fettsäuren verschiedener Kettenlängen in äquimolaren Mengen zur Verfügung, so werden fast ausschließlich C₁₈ und C₁₆ zu Ceramid umgesetzt.

Die Ergebnisse zeigen also eine Präferenz von Bar1 für jene Fettsäuren, die auch im Bar1-abhängigen Ceramidpool vorliegen. Die VLCFAs der IPC-typischen Ceramide werden nicht umgesetzt. Es konnte zudem gezeigt werden, dass dieses Enzym keine Spezifität für die α -Hydroxylierung aufweist. Sofern jedoch sowohl hydroxylierte als auch nicht-hydroxylierte Fettsäuren gleichzeitig als Substrat vorliegen, werden die hydroxylierten bevorzugt umgesetzt (Daten nicht gezeigt). Die Selektivität der Ceramidsynthase Bar1 für hydroxylierte Fettsäuren könnte bedeuten, dass bei der Synthese von Ceramiden der Prozess des Fettsäure-Recyclings (hydroxylierte Fettsäuren aus dem Abbau von Sphingolipiden) Vorrang vor der Verwendung von neu synthetisierten, nicht-hydroxylierten Fettsäuren hat.

Mit diesen Erkenntnissen lässt sich dieses Enzym in die Liste der untersuchten Ceramidsynthasen einordnen, die zum großen Teil eine Spezifität bezüglich der Fettsäure-Kettenlänge aufweisen (siehe Tabelle 1 Einleitung) [26, 37]. Bei allen bisherigen Charakterisierungen von Ceramidsynthasen wurde die Spezifität bezüglich der Fettsäuren untersucht. Um einen Schritt weiter zu gehen, sollte für Bar1 auch die Spezifität bezüglich verschiedener Sphingobasen bestimmt werden. Hierfür wurden der Membranpräparation C18-Acyl-CoA und verschiedene Sphingobasen zugegeben: Sphinganin (d18:0), (*E*)-Sphing-4-enin (d18:1) und 4-Hydroxysphinganin (t18:0). Das gebildete Ceramid wurde extrahiert und per LC-TOF analysiert (Abbildung 3-3).

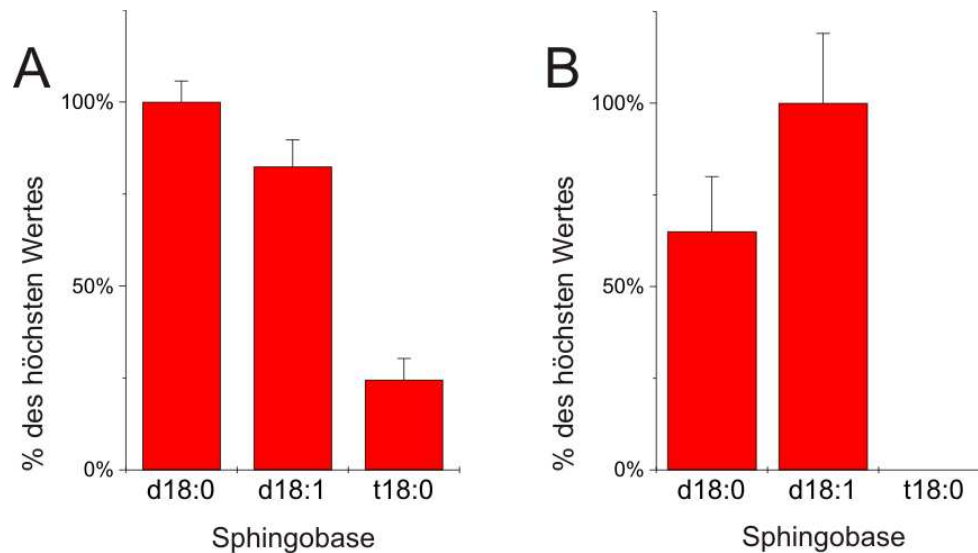


Abbildung 3-3: Ceramidsynthese durch Bar1 aus verschiedenen Sphingobasen. Spezifität A) Zweifachhydroxylierte Sphingobasen werden etwa gleich gut als Substrat akzeptiert. Die Effizienz bei der Umsetzung von 4-Hydroxysphingonin (trihydroxy-LCB) hingegen liegt nur bei ca. 20% der anderen Basen. **Selektivität B)** Liegen mehrere Sphingobasen in äquimolaren Mengen gleichzeitig vor, so werden nur dihydroxy-Spezies umgesetzt, 4-Hydroxysphingonin wird nicht als Substrat verwendet.

Dieser Versuch zeigt, dass die Ceramidsynthese Bar1 nicht nur spezifisch hinsichtlich der Fettsäurekettenlänge ist, sondern auch bestimmte Sphingobasen bevorzugt umsetzt. Die größte Effizienz wird bei den LCB Spezies erzielt, die im Bar1-abhängigen Ceramidpool vorkommen. Dihydroxy-Sphingobasen werden unabhängig von der Δ^4 -Desaturierung gleich gut akzeptiert. Die GIPC-typische Sphingobase 4-Hydroxysphingonin wird in Anwesenheit von dihydroxy-LCB nicht umgesetzt. Es macht also für die Ceramidsynthese Bar1 einen deutlichen Unterschied, ob das C4-Atom der Sphingobase desaturiert oder hydroxyliert ist. Die Ergebnisse der Assays konnte auch in vivo bestätigt werden: Der eben beschriebene Stamm (*S. cerevisiae* lag1-KO/lac1-KO *ppBAR1*) synthetisiert ausschließlich GlcCer-typische Ceramide (d18:0/18:0(2-OH)), auch wenn die GIPC-typischen Vorläufersubstanzen t18:0 und C26:0(2-OH) vorliegen. Die Präferenz von Ceramidsynthasen für bestimmte LCB wurde vor dieser Arbeit noch nicht nachgewiesen, könnte aber auch für Enzyme aus anderen Organismen die Synthese bestimmter Ceramidspezies begünstigen.

Ein Blick zurück auf Abbildung 3-1 zeigt, dass die Deletionsmutante von *BAR1* eine kleine Menge GlcCer mit einer dihydroxy-LCB und einer C₂₄ Fettsäure synthetisiert. Eine genauere Betrachtung ergibt, dass das Ceramidgrundgerüst aus einer d18:2-Sphingobase und einer hydroxylierten C₂₄-Fettsäure zusammengesetzt ist. Da Bar1 aber nicht mehr exprimiert wird, ist dieses Molekül wohl ein Nebenprodukt von Lag1. Das würde bedeuten, dass Lag1 zwar trihydroxy-LCB bevorzugt umsetzt, aber teilweise auch dihydroxy-LCB als Substrat akzeptieren kann. Ob die Desaturierung vor oder nach der Ceramidsynthese stattfindet, kann nicht angegeben werden.

3.2 $\Delta 4$ -Desaturierung und α -Hydroxylierung sind essentiell für die Biosynthese von GlcCer

Aus den Analysen ist ersichtlich, dass auch die Modifikationen des Ceramidgrundgerüsts einen Einfluss auf die GlcCer-Synthese haben. Einerseits sind dies die Modifikationen in der GlcCer-typischen Sphingobase: C9-Methylierung, $\Delta 8$ -Desaturierung und $\Delta 4$ -Desaturierung. In Abbildung 3-4 ist die Verteilung der Ceramide und GlcCer für die korrespondierenden drei Deletionsmutanten zusammengefasst. Um die Darstellung übersichtlicher zu gestalten, wurden die t18:0-haltigen Moleküle, die in diesen Stämmen unverändert vorliegen, nicht gezeigt.

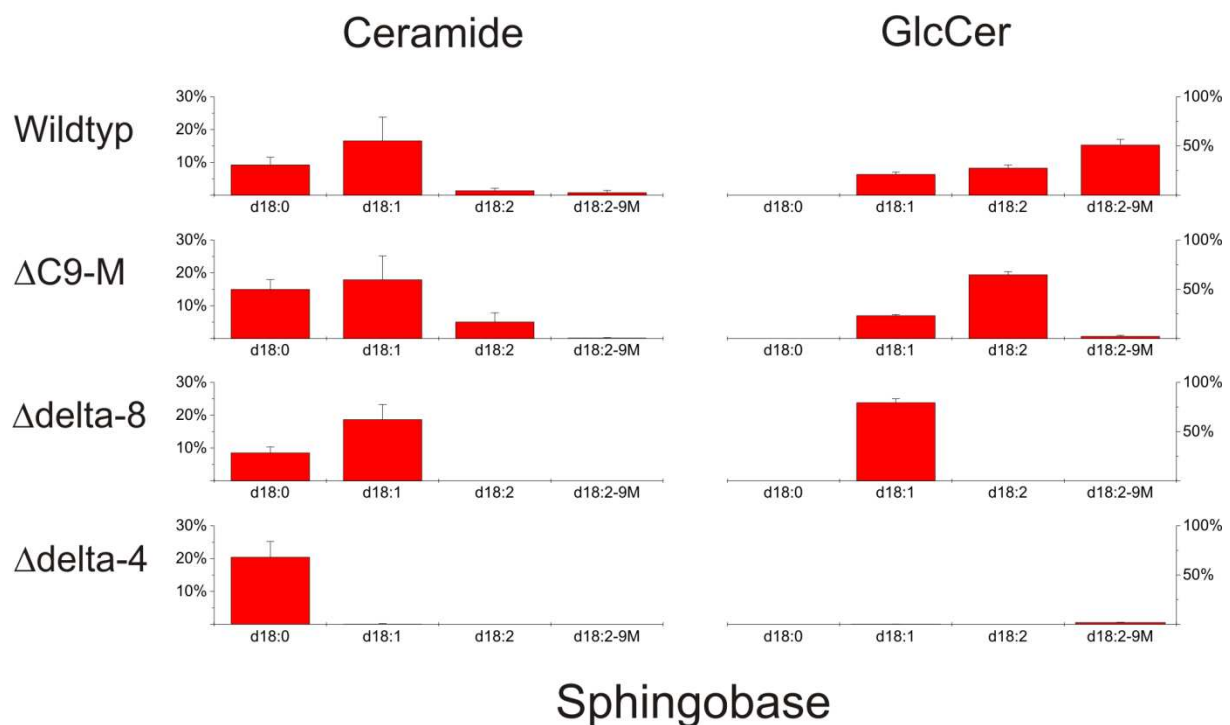


Abbildung 3-4: Zusammensetzung der Ceramide und der GlcCer nach Deletion der LCB-modifizierenden Enzyme. Im Wildtyp werden Ceramide mit vier unterschiedlichen LCB-Modifikationen gebildet: d18:0, d18:1, d18:2 und d18:2-9m. Davon werden die Spezies mit einer mindestens einfach ungesättigten LCB zu GlcCer umgesetzt. Im C9-m-KO fehlt die Methylgruppe in den Ceramiden und im GlcCer. Der $\Delta 8$ -KO Stamm kann nur noch gesättigte und einfach ungesättigte Ceramide bilden, wovon nur letztere zu GlcCer umgesetzt werden können. Fehlt die $\Delta 4$ -Desaturase, so sind ausschließlich Ceramide mit einer gesättigten LCB nachweisbar. Diese werden nicht zu GlcCer umgesetzt.

Der Vergleich dieser vier Stämme verdeutlicht zwei grundlegende Mechanismen der GlcCer Synthese. Zum Einen ist zu sehen, dass sowohl die C9-Methylierung als auch die Einführung der Doppelbindung am C8-Atom der LCB nicht essentiell für die Biosynthese von GlcCer sind. In diesen beiden Deletionsmutanten werden die Ceramide weiterhin glucosyliert, lediglich die entsprechenden Modifikationen der LCB fehlen. Weiterhin fällt auf, dass in allen Stämmen nur Ceramide mit ungesättigten Sphingobasen umgesetzt werden. Sphinganin (d18:0) kann in keiner Mutante im GlcCer nachgewiesen werden, wobei aber

immer ein beträchtlicher Teil des Bar1-abhängigen Ceramidpools (ca.30%) diese LCB enthält. In der Deletionsmutante der $\Delta 4$ -Desaturase ist nur noch Ceramid mit gesättigter LCB vorhanden, und es wird nicht zu GlcCer umgesetzt. Die Doppelbindung am C4-Atom der LCB ist somit essentiell für die Synthese von GlcCer.

Zum Anderen kann man aus Abbildung 3-4 entnehmen, in welcher Reihenfolge die Modifikationen in die LCB eingeführt werden. Die C9-Methylierung ist der dritte und letzte Schritt. Diese Reaktion ist von einer Doppelbindung der LCB am C8-Atom abhängig [47]. Die $\Delta 8$ -Desaturierung ist der vorletzte Schritt. Ein überraschender Fund ist das Fehlen von $\Delta 8$ -ungesättigten LCB im $\Delta 4$ -KO. Auch hier scheint eine direkte Abhängigkeit vorzuliegen: die $\Delta 8$ -Desaturierung bedarf einer vorherigen $\Delta 4$ -Desaturierung. Diese stellt somit die erste Modifikation dar. Markham et al. zeigten, dass die Abhängigkeit der $\Delta 8$ -Desaturase von der Anwesenheit einer $\Delta 4$ -Doppelbindung in Pflanzen nicht existiert. Bei *A. thaliana* werden in entsprechenden Messungen einfach hydroxylierte Sphingobasen im GlcCer nachgewiesen und zwar sowohl d18:1(4E) als auch d18:1(8E) [198]. Ob diese Reihenfolge der Desaturierung in *P. pastoris* aufgrund einer Substratspezifität der $\Delta 8$ -Desaturase bezüglich einer $\Delta 4$ -Doppelbindung der LCB oder eines anderen Mechanismus festgelegt ist, konnte im Laufe dieser Arbeit nicht bestimmt werden. Denkbar wäre, dass die $\Delta 4$ -Desaturase und die $\Delta 8$ -Desaturase an verschiedenen Orten des ER oder Golgi lokalisiert sind. Für die Einhaltung der Reihenfolge der Desaturierung wäre demnach ein Transport der LCB/Ceramide von dem Standort des einen Enzyms zum Standort des anderen erforderlich. Hierbei würden die Moleküle erst zur $\Delta 4$ -Desaturase gelangen und dort modifiziert werden. Daran schließt sich ein Transportprozess an, der spezifisch nur LCB/Ceramide mit einer $\Delta 4$ -Doppelbindung zur $\Delta 8$ -Desaturase leitet. Diese Vermutung soll in nachfolgenden Projekten überprüft werden. Hierfür würde sich eine Überexpression der $\Delta 8$ -Desaturase im $\Delta 4$ -Desaturase-KO-Stamm eignen. Durch die starke Expression der $\Delta 8$ -Desaturase könnten die Mechanismen, die für die Lokalisierung dieses Enzyms verantwortlich sind, überlastet sein. Dadurch würde das Enzym auch in Subkompartimente gelangen, in welchen es unter natürlichen Bedingungen nicht auftritt. Dazu könnten Bereiche des ER/Golgi gehören, an welchen LCB/Ceramide ohne $\Delta 4$ -Doppelbindung vorliegen, was zur Synthese von d18:1(8E)-haltigen Ceramiden führen würde. Wäre die $\Delta 8$ -Desaturase aber spezifisch für $\Delta 4$ -desaturierte Substrate, würde keine Umsetzung erfolgen.

Wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, fehlt das GlcCer nicht nur im $\Delta 4$ -KO, es wird auch nach Deletion der Fettsäure- α -Hydroxylase (SCS7) nicht mehr gebildet. Abbildung 3-5 zeigt, dass im *scs7*-KO Ceramide mit einer hydroxylierten Fettsäure sowohl im Bar1-abhängigen als auch im unabhängigen Pool fehlen. Im gleichen Maße, wie diese Spezies zurückgeht, nimmt die Menge an Ceramiden mit nicht hydroxylierter Fettsäure zu. Diese Art von Ceramiden kann aber von der Gcs nicht zu GlcCer umgesetzt werden.

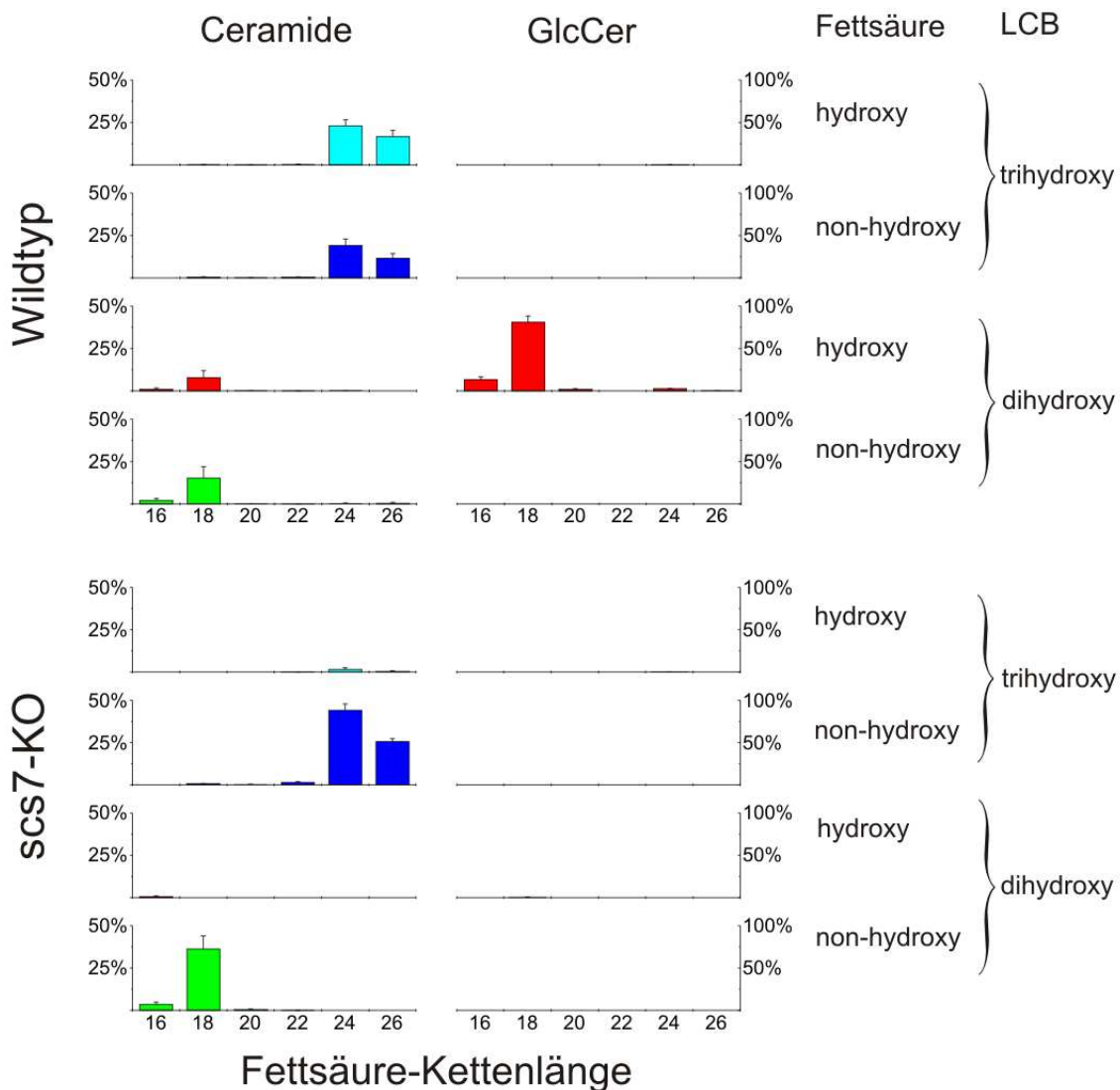


Abbildung 3-5: Ceramid- und GlcCer-Komposition in *scs7-KO*. Im Wildtyp liegt die Fettsäure aller Ceramide sowohl mit als auch ohne Hydroxylgruppe vor. Das GlcCer besteht ausschließlich aus dihydroxy-LCB und hydroxylierten Fettsäuren. Im *scs7-KO* werden nur noch Ceramide mit nicht hydroxylierten Fettsäuren gebildet, es wird kein GlcCer synthetisiert.

Die Hydroxylierung der Fettsäure ist also, ähnlich wie die $\Delta 4$ -Desaturierung, eine essentielle Modifikation des Ceramidgerüsts für die Umsetzung zu GlcCer. Die Synthese der Ceramidpools ist hingegen nicht beeinträchtigt. Ebenso wie die Synthese der Ceramide setzt auch die Umsetzung des Bar1-unabhängigen Pools zu IPC keine α -Hydroxylierung der Fettsäure voraus. Wie bei der Deletion der *scs7* in *S. cerevisiae* werden IPCs mit derselben Effizienz produziert, nur eben mit einer nicht-hydroxylierten VLCFA (Abbildung 2-24) [64].

Diese Betrachtung zeigt, dass es in *Pichia pastoris* für die Umsetzung der Bar1-abhängigen Ceramide zu GlcCer zwei essentielle Modifikationen am Ceramidgerüst gibt: Eine $\Delta 4$ -Desaturierung an der LCB und eine Fettsäure- α -Hydroxylierung. Interessanterweise sind in fast allen Eukaryoten, die GlcCer produzieren, Enzyme zu finden, welche diese

Reaktionen katalysieren. Das deutet darauf hin, dass der Mechanismus der spezifischen Zufuhr bestimmter Ceramide zur GlcCer-Synthese über die $\Delta 4$ -Desaturierung und die Fettsäure- α -Hydroxylierung im Laufe der Evolution konserviert wurde. Organismen hingegen, die kein GlcCer bilden (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*) haben in der Regel die $\Delta 4$ -Desaturase verloren. Die $\Delta 8$ -Desaturase und die C9-Methyltransferase bilden jeweils kleinere Genfamilien. Die $\Delta 8$ -Desaturase ist, bis auf einige Ausnahmen, auf Pilze und Pflanzen, die C9-Methyltransferase auf Pilze beschränkt

3.3 Synthese von GlcCer mit verändertem Ceramidgrundgerüst durch die Überexpression der Gcs in *P. pastoris*

Mit der Substratspezifität der Ceramidsynthase kann erklärt werden, wie die zwei unterschiedlichen Ceramidpools synthetisiert werden. Es stellt sich nun die Frage, wie diese Moleküle zu den unterschiedlichen GSL-Typen umgesetzt werden: Die Bar1-abhängigen Ceramide werden glucosyliert, während die Bar1-unabhängigen mit einer Inositolphosphat-Gruppe versehen werden. Eine einfache Möglichkeit hierfür wäre eine Substratspezifität der entsprechenden Enzyme bezüglich der Ceramidstruktur, so dass die Gcs beispielsweise nur die Bar1-abhängigen Ceramide als Substrat akzeptiert. Durch die Überexpression der GCS im gcs-KO konnte aber gezeigt werden, dass dies nicht der Fall ist. Wird die GCS überexprimiert, so werden auch die Bar1-unabhängigen Ceramide glucosyliert (Abbildung 3-6, GlcCer, rote Balken).

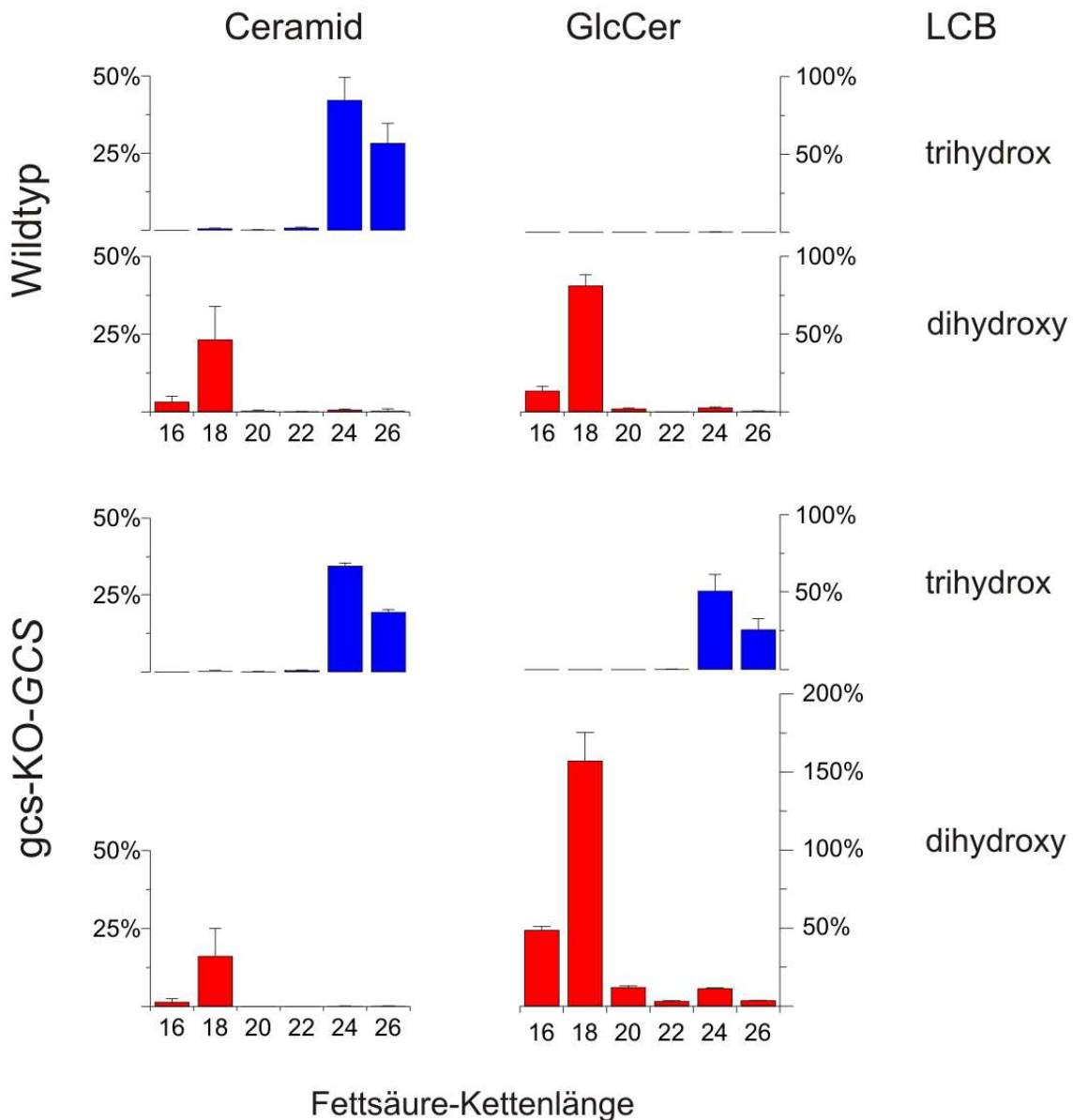


Abbildung 3-6: Ceramide und GlcCer bei Überexpression der GCS: Bei Überexpression der GCS in *Pichia pastoris* entstehen neuartige Glucosylceramide. Im Gegensatz zum Wildtyp wird hier nicht nur der Bar1-abhängige Ceramidpool (rote Balken) glucosyliert, sondern auch die Ceramide, die im Wildtyp zu GPCs prozessiert werden (blaue Balken).

Im Gegensatz zur Ceramidsynthese erfolgt die Umsetzung der Ceramide zu GlcCer nicht über eine Substratspezifität der Gcs für die Struktur der Bar1-abhängigen Ceramide. Dennoch liegen die fertigen Lipide im Wildtyp streng getrennt vor. Ein Mechanismus, der diesen Befund erklären würde, wäre eine räumliche Trennung von GlcCer- und IPC-Synthese. Der Ort der Ceramidsynthese und der anschließenden Modifikationen ist in vielen Organismen (Tiere, *S. cerevisiae*) das ER, die Glycosylierung findet aber im Golgi-Apparat statt [27, 199, 200]. Es wäre also denkbar, dass die Synthese von GlcCer durch die Gcs und die Produktion von IPC durch die IPC-Synthase in verschiedenen Subkompartimenten des Golgi geschieht und jedes Enzym nur eine Klasse von Ceramiden zugeführt bekommt. Durch

die starke Expression der Gcs könnte die Sortierungsmaschinerie der Zelle überfordert sein und das Enzym an Membransysteme in der Zelle gelangen, an welchen es sonst nicht vorkommt. Dazu könnte auch das Golgi-Subkompartiment der IPC-Synthese gehören. Hier liegen die Bar1-unabhängigen Ceramide vor, die dann glucosyliert werden können.

Für dieses Modell wäre demnach ein spezifischer Transport der Ceramide vom ER zum Golgi erforderlich, wodurch die Ceramidpools getrennt zur Gcs respektive IPC-Synthase geleitet werden („Substrat-*channelling*“). In Vertebraten und Invertebraten gibt es Transportproteine (CERT), welche diese Aufgabe erfüllen. Für diese wurde eine Spezifität bezüglich der Fettsäure-Kettenlänge in den Ceramiden nachgewiesen [96-98, 201, 202]. Für Pilze wurden keine homologen Sequenzen gefunden, jedoch gibt es Vertreter einer verwandten Gruppe von Transportenzymen, die als OSBP (Oxysterol-binding-protein) bzw. ORP (OSBP-related-protein) bezeichnet werden [203]. Diese Proteine haben die gleichen bindenden Domänen wie die CERTs, eine für das ER und eine für den Golgi [204]. Die Funktionen dieser Enzymfamilie sind noch weitgehend unbekannt, jedoch wurde ein Einfluss auf die Sterol- und GSL-Biosynthese nachgewiesen [205, 206]. Es wäre demnach denkbar, dass auch in Pilzen ein ähnlicher Mechanismus für den Transport von Ceramiden vorliegt. Die strukturelle Eigenschaft, die einen getrennten Transport der beiden Ceramidpools ermöglicht, könnte auch hier in der Kettenlänge der Fettsäure zu finden sein. Ceramide mit C₁₈-Fettsäuren werden zur Gcs geleitet, wohingegen solche mit 24 Kohlenstoffatomen zur IPC-Synthase gelangen. Es wäre aber in diesem Fall auch denkbar, dass die $\Delta 4$ -Desaturierung der LCB und die α -Hydroxylierung der FA Einfluss auf den Transport der Ceramide haben. In den beiden entsprechenden Deletionsmutanten liegen die Ceramide mit der richtigen Fettsäure-Kettenlänge vor, werden aber nicht zu GlcCer umgesetzt. Mögliche Effekte dieser beiden Modifikationen werden im folgenden Abschnitt untersucht.

3.4 Führt die Überexpression der GCS in GlcCer-freien Mutanten zur Wiederherstellung der GlcCer-Biosynthese?

Nachdem gezeigt wurde, dass die $\Delta 4$ -Desaturierung der LCB und die α -Hydroxylierung der Fettsäure Voraussetzungen für die Umsetzung des Bar1-abhängigen Ceramidpools zu GlcCer sind, stellt sich die Frage, wie sie die GlcCer Synthese beeinflussen. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen: Entweder die Gcs ist aufgrund ihrer Substratspezifität nicht in der Lage Ceramide ohne diese funktionellen Gruppen umzusetzen. Oder diese Modifikationen sind Signale, die für den Transport der Ceramide vom Syntheseort (ER) zur Gcs (Golgi) notwendig sind. Falls letzteres zutrifft, könnte die Überexpression der Gcs den Verlust des GlcCer kompensieren. Durch die starke Expression dieses Enzyms gelangt es nicht nur in die Membransysteme der IPC-Synthase, sondern

auch an den Ort der Ceramidsynthese, ins ER. Hier liegen die Ceramide vor, welche auf Grund fehlender Modifikationen nicht zum Golgi transportiert werden und können zu GlcCer umgesetzt werden.

Ceramide mit einer gesättigten dihydroxy-LCB (d18:0) konnten in allen Stämmen nachgewiesen werden, im GlcCer trat diese Base jedoch nicht auf. In der $\Delta 4$ -KO-Mutante wurde ausschließlich d18:0 im Ceramid gefunden, GlcCer fehlt komplett. Die Überexpression der GCS in diesem Stamm führt zur Bildung von GlcCer mit einer gesättigten Sphingobase, d18:0/18(2-OH) (Abbildung 3-7). Die Umsetzung dieses Ceramids zu GlcCer ist aber nicht effektiv, es entstehen nur ca. 10% im Vergleich zu den Spezies aus dem Wildtyp.

Wie bei der Überexpression im Wildtyp sind auch hier wieder relativ große Mengen des GlcCers mit GIPC typischen Ceramiden (t18:0/24:0(2-OH)) zu finden. Die Umsetzung der t18:0-haltigen Ceramide ist demnach effektiver als die der Spezies mit d18:0. Das deutet darauf hin, dass die Gcs nicht spezifisch für die Struktur der Sphingobase im Ceramid ist, aber solche mit einer Modifikation am C4-Atom bevorzugt umsetzt, egal ob an dieser Position eine Doppelbindung (d18:1, d18:2, d18:2-9m) oder eine Hydroxylgruppe (t18:0) eingeführt wurde.

Für die α -Hydroxylase gelten dieselben Überlegungen: Ist diese Modifikation ein Signal für einen Transport, so sollte der Verlust von GlcCer durch die Überexpression der Gcs kompensiert werden. Die Bar1-abhängigen Ceramide liegen nach Deletion der SCS7 mit einer nicht hydroxylierten Fettsäure vor. Diese Spezies wird nach Überexpression der Gcs zu GlcCer umgesetzt, so dass erstmals Spezies mit einer nicht hydroxylierten Fettsäure nachgewiesen werden konnten. Die Sphingobase ist wie im Wildtyp hauptsächlich d18:2-9m (Abbildung 3-7). Jedoch ist auch hierbei die Menge der gebildeten Lipide relativ gering. Der Verlust des GlcCer kann nicht effektiv kompensiert werden. Der Bar1-unabhängige Pool liegt ebenfalls mit nicht hydroxylierten Fettsäuren vor, diese Ceramide können jedoch auch nach Überexpression der Gcs nicht glucosyliert werden.

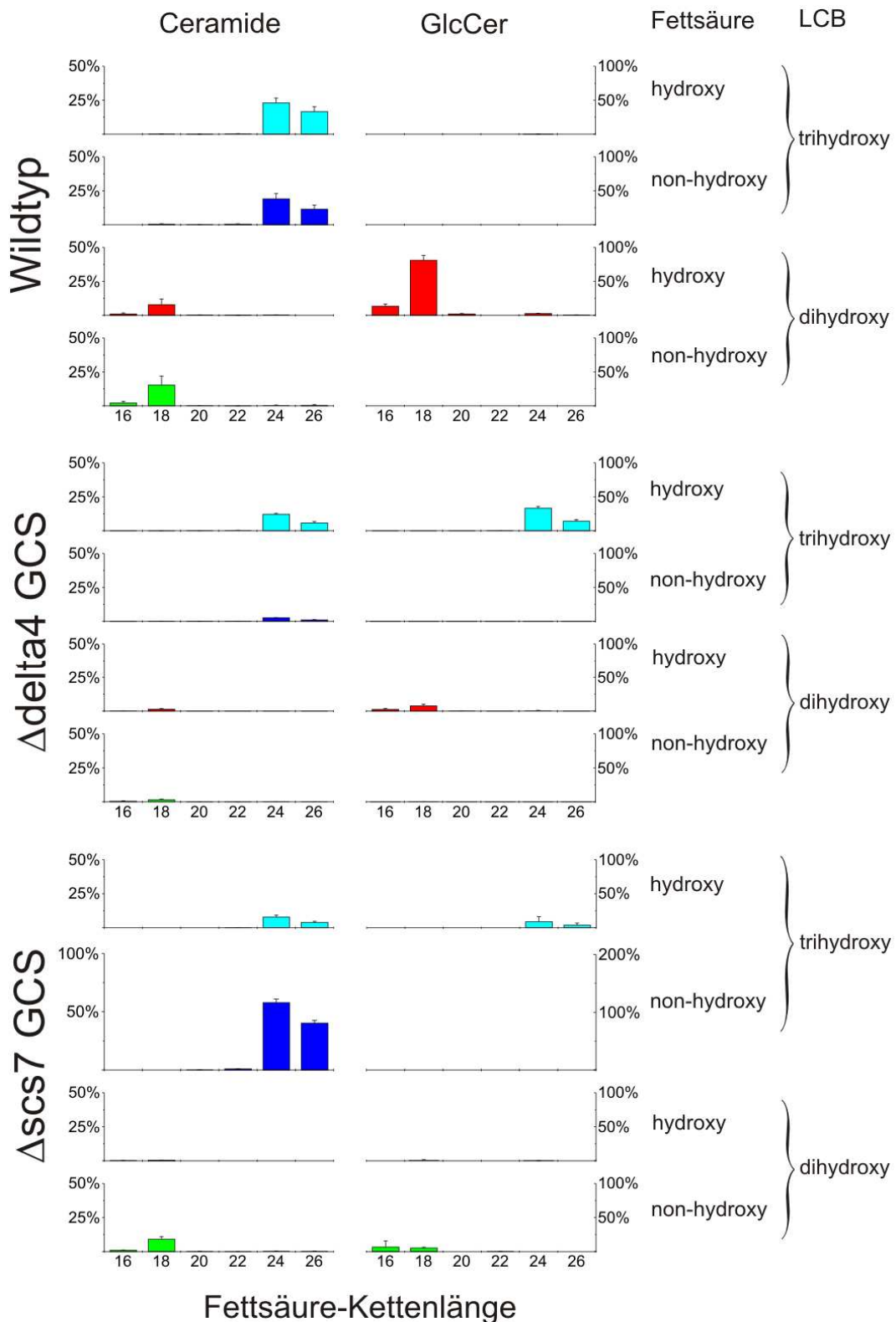


Abbildung 3-7 Überexpression der Gcs im $\Delta 4$ -KO-Stamm und im $scs7$ -KO-Stamm. Im Wildtyp werden verschiedene Arten von Ceramiden gebildet, jedoch sind im GlcCer nur dihydroxy-LCB und hydroxylierte Fettsäuren zu finden. Die Deletion der $\Delta 4$ -Desaturase führt zur Bildung von Ceramiden mit einer gesättigten LCB. Diese können auch nach Überexpression der Gcs nicht effektiv zu GlcCer umgesetzt werden. Wird die α -Hydroxylase deletiert, so haben alle Ceramide eine nicht-hydroxylierte Fettsäure. Die Produktion von GlcCer aus diesen Spezies für dihydroxy-LCB-haltige Ceramide ist äußerst ineffektiv und trihydroxy-LCB-haltige Ceramide ohne α -hydroxylierte FA werden nicht mehr glucosyliert.

Es scheint in *Pichia pastoris* also einen Mechanismus zu geben, der sicher stellt, dass das GlcCer sowohl eine Δ^4 -Doppelbindung in der Sphingobase als auch eine α -Hydroxylierung in der Fettsäure aufweist. Dieser kann nicht durch eine Überexpression der Gcs umgangen werden, da die Umsetzung der Ceramide ohne diese Modifikationen äußerst ineffektiv ist. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in einer Substratspezifität der Gcs für Ceramide mit diesen Modifikationen liegen. Es ist dennoch nicht auszuschließen, dass diese Modifikationen zusätzlich Signale für den Transport sind.

3.5 Modell für die GSL-Synthese in *Pichia pastoris*

An diesem Punkt sollen alle Schlussfolgerungen zusammengefasst werden, um ein Arbeitsmodell für die Biosynthese von GlcCer und GIPCs in der Hefe *Pichia pastoris* erstellen zu können. Im ersten Schritt werden die zwei unterschiedlichen Ceramidpools für GlcCer und IPC synthetisiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Spezies, die zu GlcCer umgesetzt wird, spezifisch von der Ceramidsynthase Bar1 gebildet wird. Der IPC-typische Pool wird wahrscheinlich von der putativen Ceramidsynthase Lag1 synthetisiert. Die Generierung dieser distinkten Ceramide kann durch eine Substratspezifität von Lag1 für trihydroxy-LCBs und VLCFAs erreicht werden.

Zwischen der anschließenden Modifikation der Fettsäure (Hydroxylierung) und der LCB (Desaturierung, Methylierung) konnte keine eindeutige Abhängigkeit bestimmt werden. Die Hydroxylierung tritt parallel zu allen LCB-Modifikationen auf. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die Methylierung der LCB bei Ceramiden mit nicht-hydroxylierter Fettsäure ineffizienter ist als bei solchen mit α -hydroxylierter Fettsäure. Sie scheint auf Ebene der Ceramide zu geschehen, denn die Ceramide ohne Hydroxylierung werden zwar gebildet, können aber nicht zu GlcCer umgesetzt werden. Sie würden sich entweder in der Zelle anreichern oder müssten wieder abgebaut werden.

Die Modifikationen der Sphingobase haben eine feste Reihenfolge: Δ^4 -Desaturierung \rightarrow Δ^8 -Desaturierung \rightarrow C9-Methylierung. Ob die Δ^8 -Desaturase eine Substratspezifität bezüglich LCBs mit einer Doppelbindung am C4-Atom hat oder ob vor der Δ^8 -Desaturierung ein von der Δ^4 -Doppelbindung abhängiger Transportprozess integriert ist, konnte mit diesen Analysen nicht bestimmt werden.

Für die Synthese von GlcCer mit den spezifischen Strukturmerkmalen scheint es zwei Mechanismen zu geben. Der erste garantiert, dass nur der Bar1-abhängige Ceramidpool zu GlcCer umgesetzt wird, wohingegen der Bar1-unabhängige nicht glucosyliert werden kann. Dieser Mechanismus kann nicht auf einer Substratspezifität der Gcs für die Ceramide des Bar1-abhängigen Ceramidpools beruhen, da er durch Überexpression umgangen werden kann. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre ein spezifischer Transportmechanismus der

Ceramide vom ER zu verschiedenen Subkompartimenten des Golgi. Die von Bar1 gebildeten Ceramide müssten hierbei gerichtet zu den Kompartimenten transportiert werden, in welchen die Gcs lokalisiert ist. Ein mögliches Signal der Bar1-abhängigen Ceramide kann hierbei die Fettsäure-Kettenlänge sein.

Der zweite Mechanismus stellt sicher, dass die gebildeten Lipide sowohl eine α -hydroxylierte Fettsäure als auch eine am C4-Atom desaturierte Sphingobase haben. Fehlen diese Merkmale, so ist die Glucosylierung der Bar1-abhängigen Ceramide deutlich ineffizienter. Dieser Befund kann durch eine Substratspezifität der Gcs für Ceramide mit diesen Modifikationen erklärt werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese Modifikationen auch Signale für den eben beschriebenen Transportmechanismus sind.

Für die Synthese der IPC mit einem definierten Ceramidgrundgerüst wären zwei Mechanismen denkbar: Eine Möglichkeit bestünde darin, dass die IPC-Synthese in einem separaten Subkompartiment lokalisiert ist und nur Zugriff auf die trihydroxy-LCB Ceramide hat. Dieser Mechanismus wäre analog zu dem eben beschriebenen GlcCer-Syntheseweg. Das Signal für den spezifischen Transport der Bar1-unabhängigen Ceramide könnte hierbei die Fettsäuren-Kettenlänge sein, wodurch nur Bar1-unabhängige Ceramide zur IPC-Synthese gelangen. Dieser Transport wäre unabhängig von der α -Hydroxylierung, denn auch Ceramide mit einer nicht-hydroxylierten Fettsäure werden zu IPC umgesetzt. Die Rolle der C4-Hydroxylierung der LCB (Sur2) konnte in diesen Experimenten nicht näher beschrieben werden. In *S. cerevisiae* wurde diese Modifikation jedoch als nicht essentiell für die IPC-Synthese bestimmt. Die andere Möglichkeit könnte sein, dass die IPC-Synthese eine Art „default pathway“ ist, das heißt der Transportweg aller Ceramide, die nicht spezielle Lokalisierungssignale tragen, wie z.B. Δ^4 -Doppelbindung oder eine Fettsäurekettenlänge von 18 C-Atomen. Hierbei wäre die Produktion von t18:0/24:0(2-OH)-Ceramiden und die Umsetzung zu IPC der vorrangige Weg der GSL-Synthese. Die LCB und Fettsäuren für die GlcCer-Synthese würden durch Bar1 von dem „default-pathway“ abgezweigt und die resultierenden Ceramide anschließend zur Gcs geleitet werden. Genauere Informationen über die IPC-Synthese sollen in Folgeprojekten erbracht werden. In Abbildung 3-8 ist ein schematischer Syntheseweg dargestellt, der all diese Schlussfolgerungen einschließt.

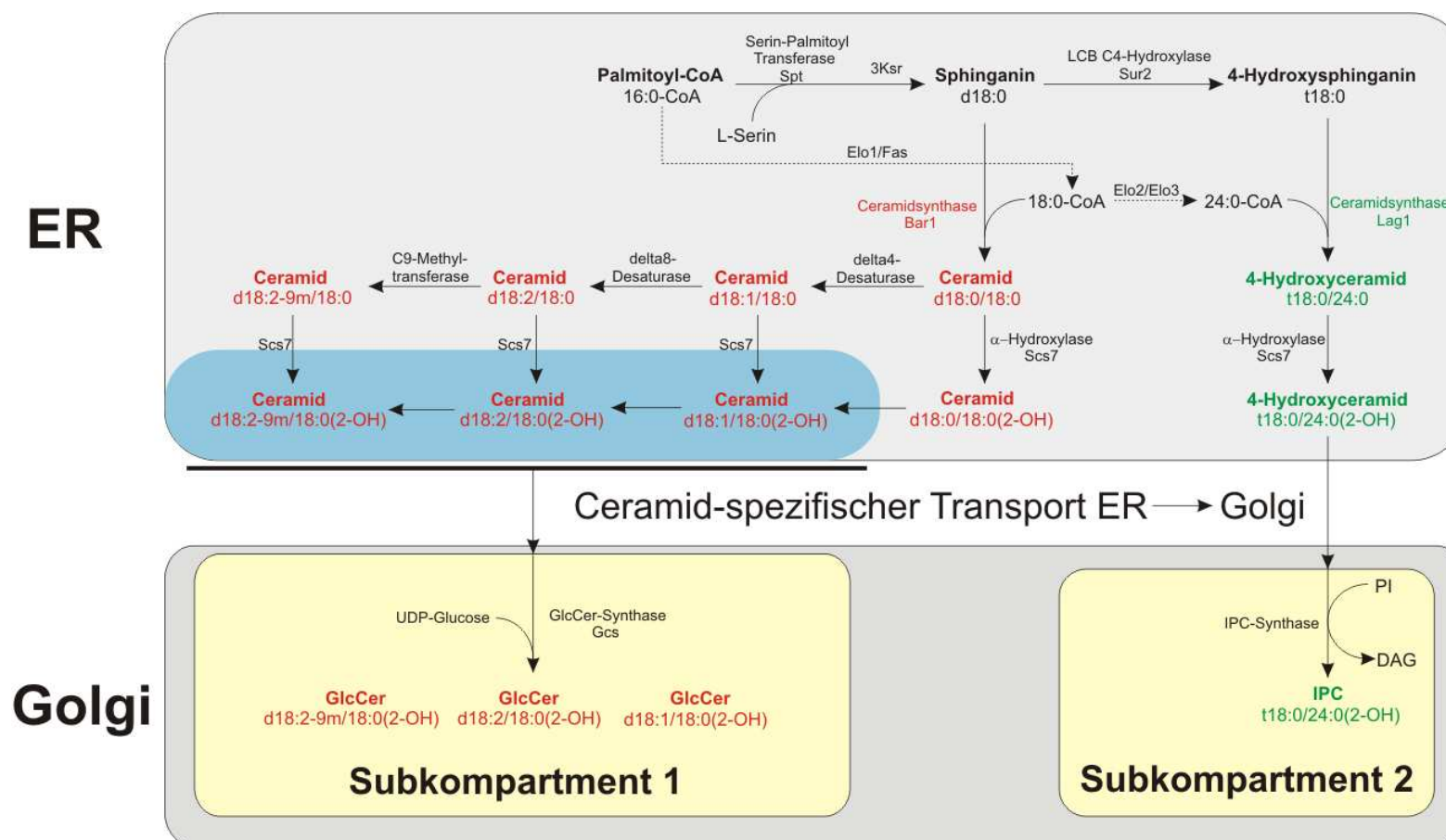


Abbildung 3-8: Hypothetischer Biosyntheseweg von GSL in *Pichia pastoris*. Ausgehend von einer aktivierten Palmitinsäure (Palmitoyl-CoA) werden die Komponenten der Ceramide gebildet. Die Spt und die 3Ksr synthetisieren die einfachste Sphingobase Sphingamin. Ein Teil davon wird durch die Sur2 an der C4-Position zu 4-Hydroxysphingamin hydroxyliert. Die Fettsäuren der GSL entstehen durch Addition einer oder mehrerer Acetyl-CoA-Einheiten an Palmitoyl-CoA. Diese Reaktion wird von verschiedenen Elongasen (Elo1- Elo3) katalysiert. Durch die Substratspezifität der Ceramidsynthasen entstehen zwei getrennte Ceramidpools: Bar1 verknüpft Sphingamin mit einer Stearinsäure zu d18:0/18:0 (rot) und Lag1 4-Hydroxysphingamin mit einer Lignocerinsäure zu t18:0/24:0 (grün). Die Sphingobase des Bar1-abhängigen Ceramidpools kann in einer festgelegten Reihenfolge weiter modifiziert werden: $\Delta 4$ -Desaturierung \rightarrow $\Delta 8$ -Desaturierung \rightarrow C9-Methylierung. Die Fettsäure der Ceramide wird zudem an der C2-Position hydroxyliert (α -Hydroxylase scs7). Aus der Gruppe von acht verschiedenen Ceramiden mit einer dihydroxy-LCB können nur drei zu GlcCer umgesetzt werden, nämlich d18:1/18:0(2-OH), d18:2/18:0(2-OH) und d18:2-9m/18:0(2-OH). Das t18:0-haltige 4-Hydroxyceramid wird zu IPC umgesetzt. PI - Phosphatidylinositol, DAG - Diacylglycerol, FAS - Fatty-acid-synthase.

3.6 Aussagekraft der analytischen Daten

In diesem Punkt werden die Probleme bei der Generierung und Auswertung der analytischen Daten dargestellt. Diese sind zweifelsohne vorhanden, stellen aber in keinem Fall die eben beschriebenen Kernaussagen in Frage. Zunächst muss noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die Ergebnisse der chromatographischen Analysen (HPLC und GC) nicht für eine Quantifizierung der einzelnen Analyten herangezogen werden können. Hierfür sind die Ausbeuten, insbesondere bei den Derivatisierungsschritten, nicht genügend reproduzierbar. Besonders die Freisetzung der LCBs aus dem GlcCer zeigte geringe Ausbeuten. Außerdem wurde festgestellt, dass die Addition der UV-absorbierenden DNP-Gruppe an die LCB nicht linear mit der eingesetzten Menge an LCBs wuchs und erst ab einer Menge von ca. 200 µg Signale gemessen werden konnten.

Bei der gaschromatographischen Analyse der Fettsäuren ergab sich das Problem, dass in den Proben der Rückstände noch Fettsäuren aus Phosphoglycerolipiden enthalten waren. Das Hauptziel der durchgeführten Extraktionen war die Isolierung des GlcCer, was mit den beschriebenen Methoden auch quantitativ gelang (keine GlcCer-typischen LCBs im Rückstand). Für die quantitative Extraktion aller löslicher Lipide (inklusive PL) ist jedoch vor der Extraktion das Aufbrechen der Zellen erforderlich [207]. Um zu überprüfen, ob sich diese unerwünschten Lipide aus dem Extraktionsrückstand entfernen lassen und wirklich nur noch nicht extrahierbare Lipide gemessen werden, wurde versucht, die *Pichia pastoris*-Zellen vor der Extraktion aufzubrechen. Da diese Hefespezies eine besonders rigide Zellwand besitzt, die deutlich schwerer zu zerstören ist als beispielsweise die von *Saccharomyces* oder *Candida* [208], gelang dies nur mit Hilfe eines Hochdruckzellaufschlusssystems („French press“) und anschließender Ultrazentrifugation (105000 g, 1h) der freigesetzten Vesikel. Die Analyse des Extraktionsrückstands von *Pichia pastoris* GS115 Wildtyp zeigte nach dieser Behandlung auch das gewünschte Bild, nämlich ausschließlich die GIPC-typischen hydroxylierten VLCFAs. Da dies eine aufwändige und verlustreiche Methode ist, wurden die Lipidextraktionen der Stämme mit der unkomplizierteren Methode (ohne quantitativen Zellaufschluss) durchgeführt und die nicht-hydroxylierten Fettsäuren aus den Phosphoglycerolipiden in der Interpretation der Daten ignoriert.

Um eine genauere Aussage über die Zusammensetzung des GlcCer zu erhalten und um diese auch von den freien Ceramiden unterscheiden zu können, wurden die Stämme anschließend per LC-TOF untersucht. Hierbei sollten die einzelnen Komponenten auch quantifiziert werden. Um das zu erreichen, wurde eine definierte Menge d18:1/15:0-Ceramid und β-D-glucosyl-d18:1/12:0-GlcCer als interne Standards zur Extraktion hinzugefügt und die Messwerte auf deren Signal normalisiert. Die Angabe der quantitativen Werte (Seite 59) in nmol/g Zellen ist nur ein ungefährender Wert, da mit den verwendeten Standards nur eine

zuverlässige Quantifizierung sehr ähnlicher Analyten sinnvoll ist. Komponenten mit abweichenden Strukturmerkmalen, wie z.B. einer trihydroxy-LCB (t18:0) oder einer hydroxylierten Fettsäure, können verschieden effektiv ionisiert werden und im MS bei gleicher Menge unterschiedliche Signale ergeben. Dieses Problem könnte nur mit Hilfe einer Reihe zusätzlicher interner Standards gelöst werden, jedoch sind Substanzen mit allen Merkmalen, die in den Proben vorkommen, kommerziell nicht erwerblich. Es ist aber dennoch davon auszugehen, dass die Ionisierbarkeit der verschiedenen Sphingolipide in der gleichen Größenordnung liegt, was den Vergleich der verschiedenen Komponenten erlaubt, auch wenn sie nicht exakt quantifiziert werden können. Im Anhang ist eine Tabelle mit allen nachgewiesenen Substanzen zu finden, in welcher auch die quantitativen Werte angegeben sind, die jedoch aus eben erwähnten Gründen mit Vorsicht zu genießen sind. Ein Überblick über die Menge der gebildeten Substanzen ist in Abbildung 3-9 zu sehen.

Es zeigte sich noch eine weitere Auffälligkeit, die eine zellbezogene Quantifizierung der untersuchten Lipide erschwerte. Die gesamte Menge von Ceramiden korrelierte nicht mit der eingesetzten Zellmasse: Zwischen den einzelnen biologischen Replikaten konnte trotz ähnlicher Zellmasse der Messwert für die Summe aller Ceramide bis zu einem Faktor von ca. drei schwanken (Standardabweichungen in Abbildung 3-9). Alle anderen Ergebnisse hingegen zeigten Standardabweichungen in einer üblichen Größenordnung von <10%. Dies beinhaltet die Messung der internen Standards und des GlcCers, zudem konnten alle Messwerte über eine Zweifachbestimmung der Proben reproduziert werden. Damit lassen sich Fehler in der Probenvorbereitung und der eigentlichen Messung ausschließen. Die große Variation der Ceramidmengen muss somit auf biologischen Effekten beruhen. Eine Messung relevanter Ceramidspezies unter variierenden Kulturbedingungen kann in zukünftigen Projekten herangezogen werden, um mehr über die biologische Funktion dieser Moleküle herauszufinden.

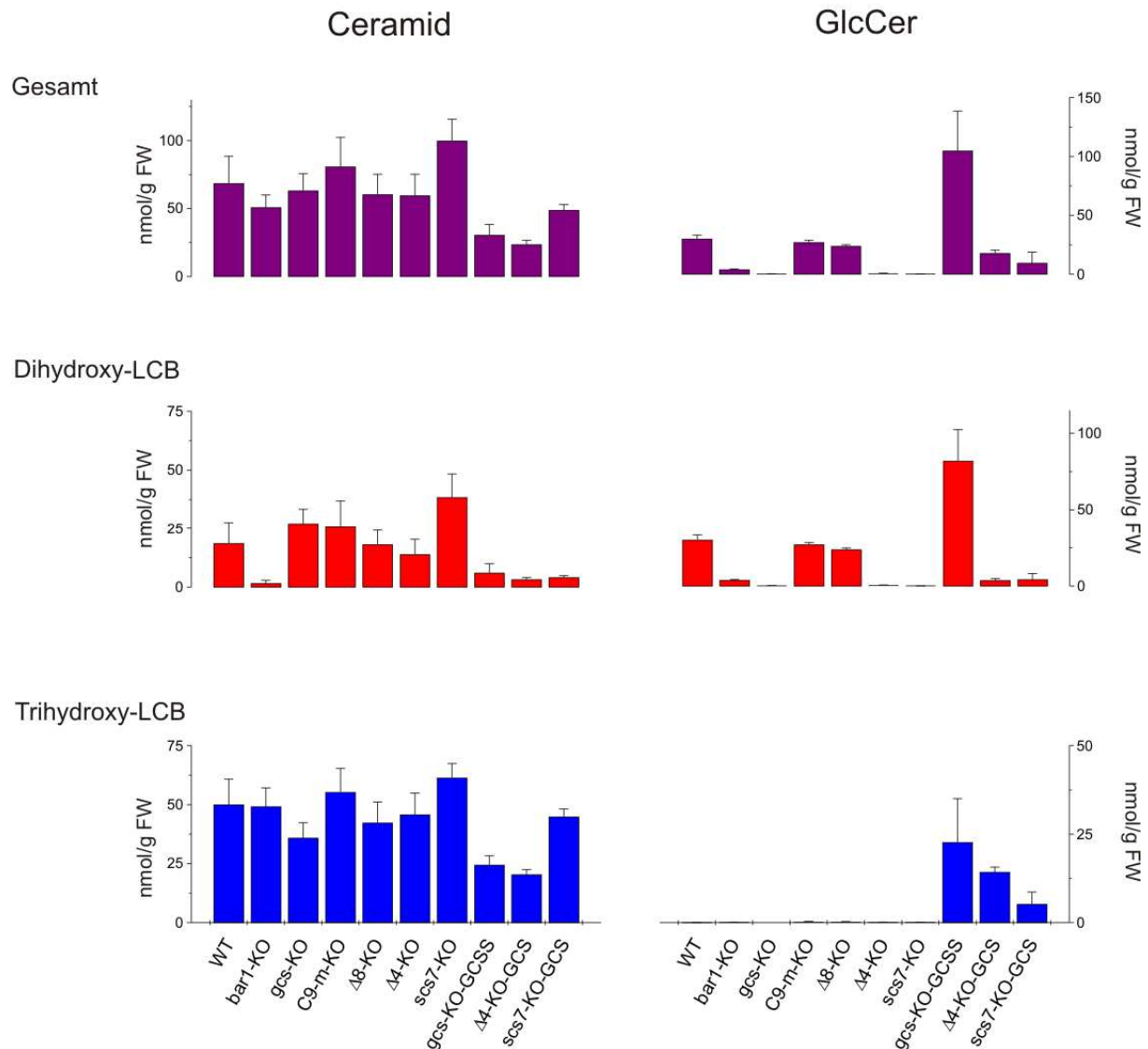


Abbildung 3-9: Überblick über die synthetisierte Sphingolipidmenge in verschiedenen *P. pastoris*-Mutanten: In der ersten Zeile ist die Summe aller Ceramide (links) und GlcCer (rechts) dargestellt. Die zweite Zeile gibt die Werte der Sphingolipide mit einer dihydroxy-LCB (Bar1-abhängig) wieder. Die dritte Zeile bezieht sich auf die Bar1-unabhängigen Sphingolipide.

Um die Übersichtlichkeit der Analysedaten in Punkt 2.2 zu gewährleisten, wurden in den Abbildungen nicht alle gemessenen Lipidspezies berücksichtigt. Die folgenden Modifikationen konnten in allen Stämmen nachgewiesen werden, liegen aber jeweils nur in geringem Prozentsatz vor.

- **Sphingobasen mit 20 Kohlenstoffatomen**

Mittels LC-TOF können nur die Massen der intakten Lipide gemessen werden. Die Summenformel kann genau bestimmt werden, aber es werden keine zusätzlichen Informationen über die Struktur gewonnen. In den gezeigten Daten wird beispielsweise grundsätzlich von einer Sphingobase mit 18 Kohlenstoffatomen ausgegangen (C_{18} -LCB). Massenspektrometrische Analysen von DNP-derivatisierten LCBs des GlcCer ergaben jedoch auch einen geringen Anteil (<5%) an C_{20} -LCBs. Nun hat aber beispielsweise ein

(Glucosyl-)Ceramid mit einer C₂₀-LCB und einer C₁₆-Fettsäure die identische Masse wie eines bestehend aus einer C₁₈-LCB und einer C₁₈-Fettsäure. Diese Moleküle können mit einem nicht-fraktionierenden MS nicht unterschieden werden, die C₂₀-LCB haltigen Sphingolipide liegen aber in so geringer Anzahl vor, dass dieser Fehler ignoriert werden kann.

- **Lokalisation der Hydroxylierung**

Eine identische Masse haben ebenfalls Moleküle, bei welchen eine OH-Gruppe an verschiedenen Positionen im Molekül lokalisiert ist. Dies ist der Fall bei Ceramiden mit einer zweifach hydroxylierten LCB und einer hydroxylierten Fettsäure (z.B. d18:0/18:0(2-OH)) verglichen mit einer dreifach hydroxylierten LCB (4-Hydroxysphingarin) und einer nicht hydroxylierten Fettsäure (t18:0/18:0). Die Unterscheidung dieser durchaus relevanten Spezies konnte über die Retentionszeit der UPLC erreicht werden. Dieses Problem vergrößert sich noch dadurch, dass die Fettsäuren der (Glucosyl-) Ceramide auch zweifach hydroxyliert vorliegen können (an C2- und C3-Position, α - β -hydroxyliert). Wie diese Zweifachhydroxylierung zustande kommt, ist noch nicht geklärt. In *Pichia* wurde sie zu weniger als fünf Prozent verglichen mit den einfach hydroxylierten Fettsäuren gemessen. Bei den zweifach hydroxylierten Spezies gilt es wiederum dihydroxy-LCB verknüpft mit einer α - β -hydroxy-FA von trihydroxy-LCB verknüpft mit einer α -hydroxy-FA zu unterscheiden (beide 4 OH-Gruppen). Auch hier wurde versucht, die Unterscheidung über veränderte Retentionszeiten zu gewährleisten. Für die β -Hydroxylierung gibt es zwei denkbare Mechanismen: Bei der Hydroxylierung durch die α -Hydroxylase können zu einem geringen Anteil auch zweifachhydroxylierte Fettsäuren entstehen. Denkbar wäre auch, dass neben der Scs7 noch ein weiteres Enzym existiert, das an der C3 Position der Fettsäure eine Hydroxygruppe einführt. Diese zweite Möglichkeit würde mit den Ergebnissen korrelieren, denn sowohl im scs7-KO als auch im scs7-KO-GCS Stamm wird noch ein kleiner Peak für einfach hydroxylierte FA der GIPC-Ceramide nachgewiesen. Andererseits kann das Auftreten der einfach hydroxylierten Fettsäuren in den scs7-KO Stämmen auch darauf beruhen, dass die Zellen auf Vollmedium angezogen wurden. Dieses Medium enthält Hefeextrakt (10g/L), der entsprechende Fettsäuren oder komplexe Lipide enthalten kann, welche die Zellen teilweise aufnehmen können.

- **Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl von Kohlenstoffatomen**

Aus den gaschromatographischen Messungen der Fettsäuren ist zu entnehmen, dass ein geringer Anteil der VLCFAs (ca. %5) als C₂₅ vorliegt (über MS bestätigt). Im Ceramid kann zudem ein kleiner Teil der Fettsäuren eine Masse von 17 Kohlenstoffatomen besitzen. Es gilt hierbei, diese Ceramide von solchen mit einer C₁₆-Fettsäure und einer methylierten LCB zu unterscheiden. Bevor jedoch Vermutungen über das Zustandekommen dieser

Spezies gemacht werden können, muss zunächst die Struktur dieser Fettsäuren bestimmt werden. Es ist aus diesen Messungen nicht ersichtlich, ob es sich tatsächlich um eine Kohlenstoffkette von 25, respektive 17 C-Atomen handelt, oder ob an einer anderen Position im Molekül eine Verzweigung angebracht ist. Die Verlängerung von Fettsäureketten wird in Hefen von drei Enzymen (Fettsäure-Elongasen) geregelt [209, 210]: Elo1 ($C_{14} \rightarrow C_{18}$), Elo2 ($C_{16} \rightarrow C_{24}$) und Elo3 ($C_{22} \rightarrow C_{26}$). Die Elongation der Fettsäuren erfolgt im Normalfall über die Addition eines Acetyl-CoAs (C_2), was nicht zu ungeradzahligen Kettenlängen führen kann. Denkbar wäre hier, dass ein kleiner Teil der Elongation durch die Addition von Propionyl-CoA geschieht, was einer Verlängerung um drei Kohlenstoffmoleküle entspräche.

3.7 Funktionen von Sphingolipiden in *Pichia pastoris*

- Ceramide

Es ist bekannt, dass die Ceramide eine zentrale Rolle in der Antwort auf verschiedene Arten von Stress einnehmen [211, 212]. Um zu sehen, ob die Ceramide auch in *Pichia* ähnliche Funktionen erfüllen, wird der bar1-KO-Stamm im Labor von Steve Harris, Abteilung „Plant Pathology, Center for Plant Science Innovation“, Universität von Nebraska, auf zellbiologischer Ebene untersucht.

Erste Tests, die von Dr. Philipp Ternes und Frau Marnie Schwarz (Universität Göttingen) durchgeführt wurden, zeigen, dass die Synthese des Bar1-abhängigen Ceramidpools einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen unter verschiedenen Bedingungen hat. Hierbei wurden verschiedene Verdünnungen von *P. pastoris*-Wildtyp und bar1-KO-Stämmen auf Agarplatten getropft und das Wachstum in Anwesenheit verschiedener Komponenten gemessen. Es stellte sich heraus, dass die bar1-KO-Zellen in Anwesenheit von Coffein (10mM), Rapamycin (200ng), Miconazol (1µg/ml) sowie 4-Hydroxysphinginin (20µM) besser wuchsen als der Wildtyp. Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 37°C zeigte in einer Flüssigkultur keinen Einfluss. Plattenverdünnungstests unter den gleichen Bedingungen (37°C) zeigten jedoch ebenfalls ein stärkeres Wachstum der bar1-KO-Zellen. Um zu verstehen, wie diese Veränderungen zustande kommen und ob sie durch das Fehlen des bar1-abhängigen Ceramidpools oder des GlcCer bedingt sind, müssen weitere Tests durchgeführt werden. Dies beinhaltet die Untersuchung anderer *P. pastoris*-Mutanten und die Bestätigung dieser Effekte in verwandten Organismen.

- Funktionen von GIPCs

Im Gegensatz zu *BAR1*, dessen Deletion problemlos durchführbar war, sind alle Versuche, *LAG1* auszuschalten, gescheitert. Für *Saccharomyces cerevisiae* wurde nachgewiesen, dass die Synthese von t18:0/26:0(2-OH)-Ceramiden essentiell ist [24, 27].

Das Ausschalten der Ceramidsynthasen *LAG1* und *LAC1* stoppt das Wachstum der Zellen. Durch die Expression von humanen Ceramidsynthasen kann dieser Phänotyp komplementiert werden. Das Wachstum der Zellen ist ebenfalls bei der Deletion von *AUR1*, ein Gen, welches in *Saccharomyces* für die IPC-Synthase codiert [83], stark verlangsamt. Dies deutet darauf hin, dass GIPCs essentiell für die Organismen sind, jedoch die Ceramide nicht. Es wäre jedoch auch denkbar, dass der Verlust der IPC-Synthase zu einer Anhäufung der Vorgänger-Ceramide führt, was das Wachstum der Zellen einschränken kann [213]. Auch Versuche, *LAG1*-Gene in anderen Pilzen auszuschalten, gestalteten sich als äußerst schwierig. In *Kluyveromyces lactis* gelang nur die Deletion einer *BAR1*-ähnlichen Ceramidsynthase, die *LAG1*-ähnliche konnte ebenfalls nicht ausgeschaltet werden [214]. Ein ganz ähnliches Bild ergab sich in *Aspergillus nidulans*, wo die Deletion von *LAG1* nur über einen induzierbaren Promotor gelang und zu Mutanten führte, die im Wachstum sehr stark eingeschränkt waren [30].

Für die Funktion dieser Lipide sind wohl mehrere Struktureigenschaften verantwortlich. Gaigg et al. zeigten, dass für die Bildung von Membrandomänen und der damit verknüpften Assoziation einer Protonenpumpe die Anwesenheit von C_{26} -Fettsäuren erforderlich ist. Diese müssen hierfür nicht in einem Ceramid/GSL enthalten sein [215]: In *Saccharomyces* wurden Lipide erzeugt, die Phosphatidyl-inositol-haltige Kopfgruppen besitzen, welche an ein C_{26}/C_{18} -Diacylglycerol (DAG) geknüpft waren. Eine andere Untersuchung ergab hingegen, dass auch die Fettsäure-Kettenlänge in den GSL nicht alleine ausschlaggebend ist. In einer Ceramidsynthase-freien Mutante von *S. cerevisiae* wurde CerS5 aus Mäusen exprimiert. Dies führte zur Bildung von GIPCs mit C_{16} -Fettsäuren. In dieser Mutante waren einige Phänotypen des Ceramidsynthase-freien Stammes kompensiert [174]. In *Pichia pastoris* gelang jedoch die Deletion von *LAG1* auch nicht nach Expression der humanen Ceramidsynthasen CerS2 und CerS5. Es scheint, dass diese Enzyme nicht in der Lage sind, Lag1 in *Pichia* ersetzen zu können. Aus zeitlichen Gründen wurde jedoch nicht überprüft, ob die Gene exprimiert werden und ob die humanen Enzyme in diesem Organismus überhaupt aktiv sind.

Für die biologische Bedeutung der GIPCs spricht, dass sie ubiquitär in Tieren, Pflanzen und Pilzen vorkommen. Eine Ausnahme bilden *Zygomyceten*: Hier wird das Ceramid aus 4-Hydroxysphinganin und C_{24} - C_{26} -hydroxy-Fettsäuren mit zwei bis fünf Galactose-Einheiten anstatt Inositolphosphat als Kopfgruppe versehen, was zu ungeladenen GSL führt [216]. Ob diese Lipide aber die Funktionen von GIPCs ausfüllen, ist unbekannt. Um die genauen Funktionen der GIPCs und der einzelnen Strukturmerkmale zu verstehen, müssen noch viele Untersuchungen angestellt werden. Die Charakterisierung von Lag1 in *Pichia pastoris* kann auch hier einen Beitrag leisten und sollte mit angepassten Methoden in Zukunft auch möglich sein.

- Glucosylceramid

In vielen Organismen konnten auch Funktionen für GlcCer nachgewiesen werden. Es stellt sich nun die Frage, welche Phänotypen die untersuchten *Pichia*-Mutanten mit den Veränderungen im GlcCer-Syntheseweg zeigen. Bei filamentösen Pilzen wurde für GlcCer ein Einfluss auf die Regelung von morphologischen Prozessen nachgewiesen (z.B. Hyphenbildung [30, 217]). Da es sich bei *Pichia pastoris* um einen Hefepilz handelt, müssen jedoch derartige Prozesse nicht reguliert werden.

Wie in 1.3 beschrieben, ist das GlcCer auch an der Sensitivität gegen AMP (antimikrobielle Peptide) beteiligt. Im Zuge dieser und vorheriger Arbeiten wurde die Sensitivität der verschiedenen Deletionsmutanten gegenüber dem pflanzlichen Defensin RsAFP2 untersucht (Tabelle 3). Diese Versuche zeigten, dass die Sensitivität von *P. pastoris* vom GlcCer abhängt: Wird kein GlcCer gebildet, so steigt die Resistenz gegen das Defensin. Dieser Effekt ist insofern erstaunlich, als dass der Organismus ohne GlcCer eine erhöhte Resistenz hat, wodurch es sinnvoller wäre, dieses Lipid nicht zu synthetisieren. Da *P. pastoris* aber kein pflanzenpathogener Pilz ist, haben die Zellen in ihrer natürlichen Lebensweise dadurch keinen Nachteil. Phytopathogene Pilze, die allesamt GlcCer synthetisieren, haben jedoch dadurch einen Nachteil. Daher liegt die Vermutung nahe, dass das GlcCer in diesen Organismen wichtige Aufgaben erfüllt. Gcs-KO-Stämme von *F. graminearum*, *C. neoformans* und *U. maydis* zeigen allesamt eine verringerte Pathogenität bzw. Virulenz [176, 178]. Diese Funktionen müssen jedoch in zukünftigen Projekten für die jeweiligen Organismen bestimmt werden. Tabelle 3 zeigt, dass auch die Struktur der LCB einen Einfluss auf die Interaktion zwischen Zelle und AMP hat.

Tabelle 3 Sensitivität der verschiedenen *Pichia* Mutanten gegenüber RsAFP2.

<i>P. pastoris</i> -Stamm	Reaktion auf RsAFP2	GlcCer vorhanden	Quelle
WT (GS115)	sensitiv	ja	[218]
gcs-KO	erhöhte Resistenz (ca.10 x)	nein	[218]
bar1-KO	erhöhte Resistenz (ca.10 x)	nein	diese Arbeit
$\Delta 4$ -KO	erhöhte Resistenz (ca.10 x)	nein	[8]
$\Delta 8$ -KO	erhöhte Resistenz (ca.4 x)	ja	[8]
C9-m-KO	erhöhte Resistenz (ca.2 x)	ja	[8]
scs7-KO	erhöhte Resistenz (ca.10 x)	nein	[8]
Pp- $\Delta 3$ Fg*	stärker sensitiv	ja	[219]

* In diesem Stamm wurde eine Fettsäure- $\Delta 3$ -Desaturase aus *Fusarium graminearum* exprimiert

Die biochemischen Vorgänge, die diesen Effekten zugrunde liegen, sind noch nicht bekannt. Die Wirkmechanismen anderer AMPs gegen verschiedene Organismen wurden teilweise detailliert beschrieben [220-225]. Hierbei waren jedoch in der Regel negativ

geladene Lipide wie GIPCs oder Lipid-A für die Interaktion mit den kationischen AMPs verantwortlich. Sollte es eine direkte Interaktion zwischen dem ungeladenen GlcCer und RsAFP2 geben, so wäre diese eine Ausnahme. Auch ist es schwer die Einflüsse der LCB Modifikationen einzuordnen. Diese sind allesamt in der hydrophoben Schicht der Membran enthalten und könnten erst nach Insertion des AMP mit diesem interagieren. Denkbar wäre auch ein indirekter Einfluss des GlcCer auf die physikalischen Eigenschaften der Membran, was zu veränderten Sensitivitäten gegenüber RsAFP2 führen könnte.

Mit Hilfe der verschiedenen Mutanten kann in zukünftigen Projekten versucht werden, neue Einblicke in den Wirkmechanismus von AMPs gegen eukaryotische Zellen zu gewinnen. In zukünftigen Projekten gilt es, diese Stämme systematisch auf ihre Sensitivität hin zu untersuchen, um so genauere Daten zu erhalten. Über biophysikalische Methoden kann mittels artifizierender Membranen die Interaktion zwischen RsAFP2 und dem GlcCer genauer analysiert werden.

Für die C9-Methylierung von Lipiden wurde festgestellt, dass sie einen ähnlichen Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften der Membran hat wie die Einführung einer *cis*-Doppelbindung. Die Methylierung einer Fettsäure von Phosphatidylcholin verringert die Phasenübergangstemperatur in Abhängigkeit von ihrer Position. Wie bei einer *cis*-Doppelbindung ist die Verringerung der Schmelztemperatur bei der Methylierung der Fettsäure in mittlerer Position (C9-Position bei einer C₁₈-Fettsäure) am höchsten (bis zu 40K Unterschied) und nimmt zu beiden Seiten hin ab [226]. Auch für Sphingolipide kann die C9-Methylierung ein Mittel sein, um die Fluidität der Membran(-domänen) zu regulieren. Es ist jedoch anzunehmen, dass die C9-Methylierung in Sphingolipiden einen geringeren Einfluss auf die Schmelztemperatur hat. Die Selbstorganisation und Stabilität der Membranmikrodomänen ist hauptsächlich durch die Hydroxylierung der Fettsäure und LCB bedingt [92]. In dem Kopfgruppen-nahen Bereich der Lipide kann sich ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden (ein oder zwei Hydroxy-Gruppen der LCB und α -Hydroxylierung der Fettsäure), das die Grundlage für den Zusammenhalt der Lipide bildet. Es ist daher nicht anzunehmen, dass C9-methyliertes GlcCer aus den Domänen austritt und mit den Phosphoglycerolipiden assoziiert. Es wäre jedoch denkbar, dass sich diese Modifikation unter optimalen Bedingungen (30°C) nicht auf das Zellwachstum auswirkt, aber bei veränderten Temperaturen einen größeren Einfluss hat.

4 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die GSL-Biosynthese in *Pichia pastoris* untersucht und ein hypothetischer Syntheseweg erstellt. Mit Hilfe dieses Schemas kann die Sphingolipidzusammensetzung in allen untersuchten Mutanten erklärt werden. Diese Hypothesen dienen als Grundlage für zukünftige Projekte. Ziel weiterer Untersuchungen soll es sein, die beschriebenen Mechanismen zu verifizieren und noch offene Fragen zu klären. Im Folgenden sind einige Ansätze beschrieben, mit deren Hilfe weitere Details der Biosynthese von GSL in Pilzen gewonnen werden können:

Auf welcher Ebene finden die Modifikationen der LCB und FA statt?

Für die Einführung der drei LCB-Modifikationen konnte eine feste Reihenfolge nachgewiesen werden: $\Delta 4$ -Desaturierung \rightarrow $\Delta 8$ -Desaturierung \rightarrow C9-Methylierung. Die Hydroxylierung der Fettsäure scheint unabhängig davon zu sein. In der Summe ergibt das acht verschiedene Grundtypen von GlcCer-spezifischen Ceramiden. Diese acht Typen konnten in den verschiedenen Mutanten nachgewiesen werden. Es ist jedoch mit den vorliegenden Messungen nicht möglich, zu bestimmen, auf welcher Ebene (Ceramide oder freie LCB bzw. Fettsäure) diese Modifikationen eingeführt werden. Auffällig ist jedoch, dass in nahezu allen Messungen ein großer Teil der Bar1-abhängigen Ceramide als d18:0/18:0 vorliegt. Dies deutet darauf hin, dass alle Modifikationen auf Ceramid-Ebene zumindest möglich sind. Die nicht-modifizierten Ceramide können nicht zu GlcCer prozessiert werden, wären somit in einer „Sackgasse“ und müssten wieder abgebaut werden. Eine Antwort auf diese Frage könnte die Messung der freien LCB in den verschiedenen Stämmen bringen. Sollten ausschließlich nicht-modifizierte LCB (d18:0) vorliegen, würde das für eine Modifikation auf Ceramid-Ebene sprechen. Falls modifizierte LCB nachgewiesen werden können, so kann das auf zwei Arten erklärt werden: Erstens, die Modifikationen werden schon auf Ebene der freien Sphingobasen eingeführt. Zweitens könnten diese Moleküle durch den Abbau von Sphingolipiden entstehen, welche auf Ceramid-Ebene modifiziert wurden. Für diese Experimente müsste die Extraktionsmethode angepasst werden und zusätzliche interne Standards zum Extrakt addiert werden.

Ist die $\Delta 8$ -Desaturase spezifisch für $\Delta 4$ -desaturierte LCB?

Wie bereits erwähnt, kann im $\Delta 4$ -KO-Stamm kein Ceramid mit einer einfach ungesättigten d18:1(8E) Sphingobase nachgewiesen werden. Es wäre interessant zu überprüfen, ob dieser Effekt auf einer Substratspezifität der $\Delta 8$ -Desaturase beruht oder ob hier andere Mechanismen greifen. Denkbar wäre neben einer Substratspezifität auch ein

Transportschritt, in welchem spezifisch nur $\Delta 4$ -desaturierte Ceramide zu dem Ort gelangen, an welchem die $\Delta 8$ -Desaturase lokalisiert ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wäre die Generierung einer weiteren Mutante sinnvoll: Es würde sich empfehlen, die $\Delta 8$ -Desaturase unter der Kontrolle des starken AOX1-Promotors im $\Delta 4$ -KO zu exprimieren. Sollten auch hier keine d18:1(8E)-Ceramide gebildet werden, so wäre dies ein Hinweis auf eine Substratspezifität des Enzyms für $\Delta 4$ -desaturierte Ceramide. Wird diese Ceramidspezies jedoch synthetisiert, so muss die Reihenfolge der Desaturierungen durch andere Mechanismen geregelt werden. Die starke Expression dieses Enzyms könnte dazu führen, dass die Sortierungsmaschinerie für die $\Delta 8$ -Desaturase überlastet ist und sie an Orte gelangt, an welchen Ceramide ohne $\Delta 4$ -Desaturierung vorliegen.

Welches sind die Mechanismen der IPC-Synthese?

Die vorliegenden Ergebnisse zielen in erster Linie darauf ab, die GlcCer-Biosynthese möglichst detailliert zu beschreiben. Für die Darstellung der IPC-Biosynthese fehlen noch weitere Untersuchungen. Insbesondere wäre die Charakterisierung der Ceramidsynthase Lag1 wichtig, denn damit könnte die Trennung der beiden Ceramidpools durch Spezifität der Ceramidsynthasen endgültig bewiesen werden. Da mit konventionellen Methoden kein Erfolg erzielt werden konnte, müssen neue Ansätze gefunden werden, um das Enzym zu charakterisieren. Eine Möglichkeit wäre die Einführung eines induzierbaren Promotors vor das Gen in *P. pastoris* WT. Induzierende Bedingungen sollten keinen Einfluss auf das Wachstum eines solchen Stamms haben. Sollte die Kultur unter reprimierenden Bedingungen nicht mehr wachsen, wäre dies ein Nachweis, dass das Enzym essentiell für das Wachstum der Hefezellen ist.

Die Aktivität von Lag1 in Membranpräparationen des *P.p* bar1-KO-Stamms ist zu gering, um dieses Enzyms zu charakterisieren. Daher muss die Klonierung des Gens gelingen, um die Substratspezifität des Enzyms nach Überexpression mit in vitro Assays nachweisen zu können. Auch hierfür muss die Strategie im Vergleich zur Charakterisierung von Bar1 abgeändert werden. Denkbar wäre die Einführung eines Introns im LAG1-ORF, um somit die Probleme bei der Subklonierung des Gens in *E.coli* zu umgehen.

Nach erfolgreicher Charakterisierung dieses Enzyms bietet es sich an, auch die folgenden Schritte zu untersuchen. Hierzu gehören Experimente bezüglich der Sphingobasen-C4-hydroxylase Sur2 und der IPC-Synthase. Das Problem bei diesen Untersuchungen könnte jedoch darin bestehen, dass das Endprodukt IPC essentiell für das Wachstum der Hefe ist, was die Deletion der einzelnen Gene erschwert. Über angepasste Methoden, wie z.B. die für die Charakterisierung von Lag1 beschriebenen Ansätze, sollte es jedoch auch hier möglich sein, diese Enzyme zu charakterisieren.

Wo sind die Enzyme lokalisiert?

Eine Kernaussage der vorliegenden Arbeit ist, dass mindestens der letzte Schritt in der Biosynthese des GlcCer bzw. IPC räumlich getrennt ist. Diese Vermutung erklärt alle Effekte, die durch die Messung der Ceramide und des GlcCer auftreten. Um diese Hypothese zu prüfen, ist es notwendig, die Lokalisation der einzelnen Enzyme zu bestimmen. Hierfür können die Proteine mit einem Marker versehen werden (z.B. GFP, RFP) und ihre intrazelluläre Lokalisierung über Fluoreszenzmikroskopie bestimmt werden. Sobald die Enzyme lokalisiert wurden, kann mittels paarweiser Markierung von verschiedenen Enzymen festgestellt werden, ob diese innerhalb des jeweiligen Kompartiments unterschiedlich lokalisiert sind. In erster Linie ist ein Vergleich zwischen den Ceramidsynthasen Bar1 und Lag1 sowie zwischen Gcs und IPC-Synthase notwendig, um die hier getroffenen Aussagen zu bestätigen. Aber auch die Lokalisation der anderen Enzyme (LCB-modifizierende, Hydroxylase, Elongasen) kann neue Einsichten in die Synthese der GSL bringen.

5 Materialien und Methoden

5.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien (Kits)

Allgemeine Chemikalien

Salze, Säuren und Lösungsmittel	Carl Roth, Merck
Nährmedien (Bacto-Trypton, <i>Yeast Nitrogen Base</i> , Agar etc.)	Duchefa
Aminosäuren und DNA-Oligoprimer	Sigma Aldrich
Fettsäuren und div. Lipide (Standards)	Sigma Aldrich
Fettsäuremethylester (2OH-18:0 und 3OH-18:0)	Matreya (Biotrend)
ANS, α -Naphthol, Phosphatidreagenz	Merck

Antibiotika

Ampicillin, Kanamycin,	Applichem, Carl Roth
Nourseothricin	Carl Roth
Zeocin	Invitrogen, Duchefa

Polymerasen

Go <i>Taq</i> -Flexi DNA-Polymerase	Promega
Herculase II® Fusion DNA-Polymerase	Stratagene
<i>Taq</i> -Polymerase	DNA Cloning Service
<i>Pwo</i> -Polymerase	peqlab

Sonstige Enzyme

Ligasen, Antarktische Phosphatase, Klenow, etc.	NEB
Restriktionsenzyme	NEB

Kits

NucleoBond Xtra Midi Plus	Macherey Nagel
Nucleospin Extract II	Macherey Nagel
PCR-Purification Kit	Qiagen

5.2 Geräte

Brutschränke	Binder, Heraeus
Elektroporator	Eppendorf
Elektroporationsküvetten	peqlab
Gaschromatographie-Zubehör	Varian
Gaschromatograph „CP3900“	
Autosampler „CP8410“	
Polare Säule „Select® FAME“	
Geldokumentationsgerät	Biometra
Gelkammer „Horizon 11-14“	BRL
Glasgeräte	VWR
HPLC-Zubehör	TSP
Degaser „SCM1000“	
Pumpe „P4000“	
Autosampler „AS3000“	
Detektor „UV6000“	
Säule „Multospher 100PR 18-5µ“	Chromatography service
Kieselgel 60-Platten	VWR
Kieselgel-Säulen „Strata SI-2“	Phenomenex
Magnetrührer „IKAMAG“	Janke und Kunkel
Mikroliterspritzen	Hamilton
pH-Meter „761-Calimatic“	Knick
Photometer „20 Genesys™“	Spectronic
Rotationsverdampfer „Rotavapor RE 120“	Büchi
Schüttelinkubatoren „Multitron“	Infors
Sterilbank „DLF/BSS4“	Clean Air
Sterilfilter	Millipore
Stickstoffgenerator	Domnick Hunter
Thermoblock	Eppendorf und Biometra
Thermocycler Trio-Thermoblock-TB1 und T-Gradient	Biometra
UV-Photometer „GeneQuant II“	Pharmacia Biotech
Vortex „Paramix“	Julabo Labortechnik
Wasserstoffgenerator	Domnick Hunter
Zentrifugen	Eppendorf, Heraeus

5.3 Verwendete Organismen und Stämme

Organismus	Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue tet ^R	$\Delta(mcrA) 183, \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F'proAB, lacIqZ\Delta M15, Tn10 (tet^r)]$	Stratagene
<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue kan ^R	$\Delta(mcrA) 183, \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F'proAB, lacIqZ\Delta M15, Tn10 (kan^r)]$	DNA Cloning Service (Hamburg)
<i>Pichia pastoris</i>	GS115	<i>his4</i>	Invitrogen
<i>Pichia pastoris</i>	Pp scs7-KO	<i>his4 scs7::Zeo^R</i>	S. Albrecht
<i>Pichia pastoris</i>	Pp $\Delta 8Des$ -KO	<i>his4 \Delta 8Des::Zeo^R</i>	P. Ternes
<i>Pichia pastoris</i>	Pp Gcs-KO	<i>his4 gcs::Zeo^R</i>	P. Ternes
<i>Pichia pastoris</i>	Pp C9Methyltransferase - KO	<i>his4 C9m::Zeo^R</i>	P. Ternes
<i>Pichia pastoris</i>	Pp $\Delta 4Des$ -KO	<i>his4 \Delta 4Des::Zeo^R</i>	S. Albrecht
<i>Pichia pastoris</i>	Pp $\Delta 4Des$ -KO-GCS	<i>his4 \Delta 4Des::Zeo^R</i>	S. Albrecht
<i>Pichia pastoris</i>	Pp scs7-KO-GCS	<i>his4 scs7::Zeo^R</i>	S. Albrecht
<i>Pichia pastoris</i>	Pp gcs-KO-GCS	<i>his4 gcs::Zeo^R</i>	I. Hillig
<i>Pichia pastoris</i>	JC308 Δ ugt51B1	<i>ade1 arg4 his4 ura3 ugt51B1::URA3</i>	I. Hillig
<i>Pichia pastoris</i>	Pp bar1-KO	<i>his4 bar1::ClonNat^R</i>	Diese Arbeit
<i>Pichia pastoris</i>	Pp bar1-KO-BAR1	<i>his4 bar1::ClonNat^R</i>	Diese Arbeit
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BY4741		K. Theviessen

5.4 Vektoren

pBluescript-KSII ⁻	(Amp ^R)	Stratagene
pGAPZ/B	(Zeo ^R)	Invitrogen
pGEM [®] -T	(Amp ^R)	Promega
pPIC3.5	(Amp ^R /HIS4)	Invitrogen
pSLNat	(Amp ^R /ClonNat ^R)	Christoph Basse (MPI Marburg)

5.5 Molekularbiologische Methoden

5.5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht eine schnelle Vervielfältigung eines definierten DNA-Bereichs mit Hilfe von Oligonukleotidprimern und einer hitzestabilen DNA-Polymerase. In Kombination mit dem Enzym *Reverse Transkriptase*, welches RNA in cDNA „rückübersetzt“, ist auch die Amplifikation von RNA-Fragmenten möglich

Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA durch Hitzedenaturierung in die beiden Einzelstränge zerlegt. Anschließend wird die Probe soweit abgekühlt, dass die Primer binden können. Zuletzt wird der Doppelstrang durch die DNA-Polymerase wieder vervollständigt.

Auswahlkriterien für die Primer

Bei der Wahl der Oligoprimer wurden nach Möglichkeit folgende Kriterien beachtet:

- Länge (des bindenden Abschnitts): 18-30 bp (ergibt sich aus Schmelztemperatur)
- GC-reiche Sequenz am 3'-Ende (ca. 2-4 Nukleotide)
- möglichst keine Hairpin-Strukturen/Dimere innerhalb des Primers bzw. des Primerpaares
- möglichst geringe intramolekulare Wechselwirkungen

Die beiden letztgenannten Kriterien wurden mit Hilfe des Programms „Clone Manager“ sowie des Online-Programms „Oligo-calculator“ (Sigma-Aldrich) überprüft.

Um die amplifizierten Konstrukte möglichst gerichtet klonieren zu können, wurden die Primer i.d.R. am 5'-Ende um einige Basen erweitert, die als Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme dienen konnten.

Bei Expressionskonstrukten für *Pichia* und *Saccharomyces* musste außerdem auf das Vorhandensein einer Kozak-Sequenz [[227], ein A-Nukleotid in der dritten Position vor dem Startcodon ATG; z.B. 5'-ACC ATG G] geachtet werden, da diese für eine effektive Initialisierung der Translation in eukaryotischen Organismen benötigt wird.

Die Schmelztemperatur (T_M) eines Primers sollte möglichst 55°C bis maximal 70°C betragen und bei einem Primerpaar um höchstens 4°C differenzieren. Sie kann mit Hilfe der folgenden Formel grob abgeschätzt werden:

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

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

Durchführung der PCR

Zur Überprüfung der Expressionskonstrukte wurde die jeweilige Plasmid-DNA (psDNA) mit einer *Taq*-Polymerase (New England Biolabs) isoliert. Für die Herstellung der Expressions- und Deletionskonstrukte erfolgte die Amplifikation der Fragmente mit Hilfe einer *Pwo*-Polymerase (peqlab) bzw. der Herculase®II-Fusion (Stratagene), da diese beiden eine 3'-Exonukleaseaktivität und Proofreading-Funktion besitzen. Die Synthesegeschwindigkeit der *Pwo*-Polymerase ist im Vergleich zur *Taq*-Polymerase deutlich geringer, die Genauigkeit ist

jedoch mehr als eine Zehnerpotenz höher. Das Enzym Herculase II wurde vor allem zur Herstellung größerer Expressionskonstrukte (>1,5 kb) verwendet, die Synthesegeschwindigkeit ist mit ≈ 10 sec/kb noch höher als die der *Taq*-Polymerase.

Standardansatz PCR:

X μ l Probe (X = 1 ng psDNA, 2 μ l eines cDNA-Ansatzes oder ≈ 50 ng gDNA)

1 μ l *antisense-Primer* (50 pmol/ μ l)

1 μ l *sense-Primer* (50 pmol/ μ l)

1 μ l dNTP-Mix (10 mM je Nukleotid)

5 μ l 10 x Puffer (enthält 25 mM MgCl₂ oder MgSO₄)

0,25 μ l *Taq*-Polymerase (5 Units/ μ l) oder

1,0 μ l *Pwo*-Polymerase (1 Unit/ μ l) oder

auf 50 μ l mit sterilem destilliertem H₂O (SDW) auffüllen

Da in der Regel ein Thermocycler ohne Heizdeckel verwendet wurde, mussten die Proben mit einem Tropfen Mineralöl als Verdunstungsschutz überschichtet werden.

Thermoprogramm:

Initiale Denaturierung	95°C	3 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	← 29 x
Annealing (5-10°C unter T _M)	55 - 65°C	30 sec	
Elongation	72°C	1-3 min	
Finale Elongation (Auffüllen abgebrochener Fragmente)	72°C	10 min	

Als Faustregel für die Elongation gelten 30-60 sec pro 1000 bp für die *Taq*-Polymerase, und 90 sec/kb für die *Pwo*-Polymerase.

Kolonie-PCR

Um bakterielle und Hefe-DNA zu amplifizieren (z.B. zu Kontrollzwecken nach erfolgter Transformation), war eine Isolierung genomischer DNA nicht nötig: Mit Hilfe eines Zahnstochers wurde etwas Koloniematerial in 50 μ l TE-Puffer suspendiert und die Probe 50-60 Sekunden in der Mikrowelle erhitzt. Pro Reaktion wurde 1 μ l als Matrize eingesetzt.

Der Reaktionsansatz enthielt zudem Dimethylsulfoxid (DMSO), das DNA-Sekundärstrukturen (der gDNA) aufbricht und somit die PCR erleichtert. Zudem wurde die für Kolonie-PCR besonders effektive *GoTaq-Flexi*-DNA-Polymerase (Promega) verwendet. Der Puffer enthält mit Bromphenolblau und Orange-G bereits zwei Farbstoffe; der Reaktionsansatz konnte nach erfolgter PCR direkt auf das Agarosegel aufgetragen werden (kein Ladepuffer nötig).

Ansatz Kolonie-PCR:

- 31 µl SDW
- 1 µl *antisense Primer* (50 pmol/µl)
- 1 µl *sense Primer* (50 pmol/µl)
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM je Nukleotid)
- 10 µl 5 x Green Go *Taq-Flexi-Puffer* (ohne MgCl₂)
- 5 µl MgCl₂ (25 mM)
- 1 µl DMSO
- 0,2 µl Go *Taq-Polymerase* (5 Units/µl)
- 1 µl Hefesuspension (s.o.)

Das Thermogramm wurde wie folgt verändert:

Initiale Denaturierung	94°C	4 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	← 35 x
Annealing (10-15°C unter T _M)	50 - 60°C	30 sec	
Elongation	72°C	1-3 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	

5.5.2 Agarosegel-Elektrophorese

Die mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente (RNA musste zunächst mit Hilfe des Enzyms *Reverse Transkriptase* in DNA umgeschrieben werden) wurden elektrophoretisch über ein Agarosegel nach ihrer Größe getrennt. Durch Vergleich mit einem geeigneten Standard konnte die Größe der Fragmente bestimmt werden.

Lösungen nach Sambrook und Russell, 2001:

5 x TBE-Puffer (Stammlösung):

- 54 g Tris
- 27,5 g Borsäure
- 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
- SDW ad 1 l

Ladepuffer (6 x):

- 30 % (v/v) Glycerol
- 1 % (w/v) Bromphenolblau
- 1 % (w/v) Xylencyanol
- 100 µl 5 x TBE-Puffer
- SDW ad 1 ml
- Lagerung bei -20°C

Probenvorbereitung:

Jede Probe wurde vor dem Auftragen mit 1/6 Vol Auftragspuffer gemischt. Da der „Green GoTaq-Puffer“ bereits Auftragspuffer enthielt, konnten diese Proben direkt auf das Gel geladen werden.

Agarosekonzentration:

Bei DNA-Auftrennung (psDNA, PCR-Produkte) 1,0 % Agarose

Als Puffer für das Agarosegel und als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Die angelegte Spannung variierte in Abhängigkeit von der Nukleinsäure:

Testgele (30 ml Fassungsvermögen)	80 V
Testgele (100 ml Fassungsvermögen)	100-120 V
Präparative Gele	80-90 V
Gele für Southern Blots	120-140 V

Unmittelbar vor dem Gießen des Gels wurde Ethidiumbromid (10 mg/ml, Endkonzentration 0,005 %) zum Ansatz hinzugefügt. Ethidiumbromid interkaliert mit Nukleinsäuren und macht so deren Position im Gel unter UV-Licht sichtbar. Das resultierende Bandenmuster wurde fotografisch dokumentiert. Da Southern-Blot-Gele generell in einer Ethidiumbromid-Lösung nachgefärbt werden mussten, wurde diesen Gelen kein Farbstoff zugesetzt.

5.5.3 Methoden zur DNA-Klonierung

Anfügen eines 3'-A-Überhangs

Taq-Polymerasen hängen ein Adenin-Nukleotid am 3'-Ende von etwa 90 % aller PCR-amplifizierten Fragmente an. Dieser Überhang wird bei der Ligation mit dem Zwischenklonierungsvektor pGEM-T (der selbst komplementäre 5'-T-Enden besitzt) benötigt. Durch die Exonukleaseaktivität der Proofreading-Polymerase (*Pwo*- und *Herculase*[®]II-) fehlen diese Überhänge. Um die Ligation der Expressionskonstrukte in pGEM-T dennoch zu ermöglichen, mussten diese nach der eigentlichen PCR (und nach der Gelreinigung) angefügt werden:

16 µl gereinigter PCR-Ansatz
1 µl dNTP-Mix (bzw. 10 mM dATP)
2 µl 10 x ThermoPol-Puffer (NEB)
1 µl Taq-Polymerase (NEB)
<hr/>
20 µl Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde für 30 min bei 72°C inkubiert. Eine Reinigung war nicht erforderlich, der Ansatz konnte direkt in die Ligation eingesetzt werden.

Ligation

Die Ligation von PCR-Produkten (mit 3'-A-Überhang) in pGEM-T (5'-T-Überhang) erfolgte mit der T4-DNA-Ligase von Promega (liegt dem pGEM-T-Kit bei) nach folgendem Schema:

- 5 µl 2 x Rapid-Ligation-Puffer
- 1 µl T4-DNA-Ligase
- 0,5 µl pGEM-T-Vektor (50 ng)
- 2-3 µl PCR-Produkt mit A-Überhängen
- SDW ad 10 µl

Die Reaktion fand üN im Kühlschrank oder 2 Stunden bei 22°C (RT) statt. 2 µl des Ansatzes wurden anschließend für die Transformation von *E. coli* eingesetzt.

Restringierte DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (NEB) in den entsprechenden Expressionsvektor bzw. das entsprechende Konstrukt kloniert:

- 1 µl 10 x T4-DNA-Ligase-Puffer
- 2 µl geschnittener Vektor
- 4 µl gereinigtes Insert
- SDW ad 10 µl

Die Reaktion fand wahlweise üN bei 16°C oder 2 Stunden bei 22°C statt.

Restriktion

Restriktionsendonukleasen des Typs II erkennen spezifische palindrome DNA-Sequenzen von meist 6-8 bp und spalten diese. Dabei produzieren sie je nach Enzym entweder *sticky ends* („klebrige Enden“; 5'- oder 3'-Überhänge) oder *blunt ends* („glatte Enden“ ohne Überhang).

Verwendet wurden (wenn nicht anders angegeben) Enzyme der Firma NEB. War der Verdau mit mehreren Enzymen nötig, wurde die DNA bzw. das Plasmid nach Möglichkeit mit beiden Enzymen gleichzeitig inkubiert. In einigen Fällen war ein sequentieller Verdau nötig (z.B. bei verschiedenen optimalen Inkubationstemperaturen der beteiligten Enzyme oder einer Pufferunverträglichkeit). Dabei wurde das erste verwendete Enzym entweder durch Hitze inaktiviert (20 min bei 65°C oder 80°C, abhängig vom Enzym) oder durch Chloroformextraktion entfernt. Musste auch der Puffer gewechselt werden, wurde die DNA mit 3 M NaAc pH 5,2 gefällt.

Die Restriktion eines (leeren) Expressionsvektors erfolgte immer sequentiell, da sich die Enzyme aufgrund ihrer Größe gegenseitig stören, wenn die Schnittstellen zu nah (< 40 bp) beieinander liegen.

Für Testrestriktionen nach einer Plasmidpräparation wurden je 3 µl psDNA mit 1 Unit des entsprechenden Enzyms 60 min inkubiert. Eine Unit ist dabei definiert als die Enzymmenge, die 1 µg DNA in 60 min vollständig schneidet. Präparative Restriktionsansätze wurden in der Regel 2 Stunden (pro Enzym - falls sequentiell) inkubiert. Die eingesetzte Enzymmenge lag dabei ca. 10 % über der Mindestmenge (z.B. 11 Units pro 10 µg DNA).

Dephosphorylierung

Um die Selbstligationsrate (besonders bei *blunt end* Klonierungen) niedrig zu halten, wurden die 5'-Phosphatreste der geschnittenen DNA mit Hilfe des Enzyms *Antarktische Phosphatase* entfernt. Im Gegensatz zur üblicherweise verwendeten CIP (*calf intestinal phosphatase*) ist diese hitzeinaktivierbar, der Ansatz musste also vor der Ligation nicht mehr gereinigt werden.

Der (*blunt end*) geschnittene Ansatz wurde mit 1/10 Vol 10 x Puffer (Antarctic Phosphatase Puffer; NEB) und 1 µl Antarktischer Phosphatase (5 U/µl) ca. 60 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym konnte durch 5 min Inkubation bei 75°C inaktiviert werden.

Reinigung der DNA

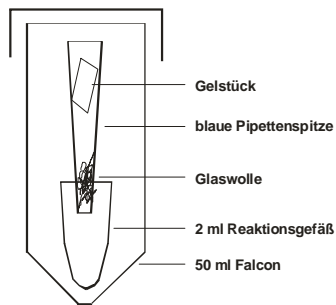
Um Proteine (z.B. RNase oder Restriktionsenzyme) aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen, musste die DNA mit 1 Vol Chloroform versetzt, geschüttelt und kurz (ca. 10 sec) zentrifugiert werden (13.000 rpm). Proteine sammeln sich in der Interphase, die wässrige Oberphase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde mindestens 1 x wiederholt (so lange, bis die Oberphase völlig klar war). Die DNA wurde anschließend präzipitiert.

Alternativ konnte die DNA auch mit Hilfe eines „*PCR purification Kits*“ gereinigt werden (nach Angaben des Herstellers, hier Qiagen oder Macherey-Nagel), es war anschließend keine DNA-Präzipitation nötig. Vorteile dieser Methode sind die hohe Reinheit und der geringe Zeitaufwand. Allerdings war die DNA-Ausbeute deutlich niedriger als mit herkömmlichen Methoden. Auf diese Weise wurde psDNA behandelt, die entweder sequenziert oder zur Transformation von *Pichia pastoris* durch Elektroporation verwendet werden sollte.

Nukleinsäure-Präzipitation

Wenn nicht anders angegeben, wurde Nukleinsäure durch Zugabe von 1/10 Vol 3 M NaAcetat pH 5,2 und 2 Vol Ethanol_{abs} (RNA: 2,5 Vol Ethanol) gefällt. Anschließend wurde die Probe 10 min bei 13.000 rpm sedimentiert. Das Nukleinsäure-Pellet wurde ein Mal mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen (je nach Größe des Pellets 10-30 min bei 37°C) in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 oder in SDW gelöst.

Reinigung von DNA aus Agarosegelen



Zunächst wurde mit einer stabilen, mit Glaswolle gestopften blauen Pipettenspitze ein 2 ml Reaktionsgefäß durchstochen. In die Spitze wurde nun das ausgeschnittene Gelstück platziert und das ganze Konstrukt (Reaktionsgefäß mit Spitze; s. Abb. oben) in einem 50 ml Falcon für 5 min bei 4.000 rpm (3.200 g) zentrifugiert. Die Glaswolle hält die Agarose zurück, TBE-Puffer und DNA werden durchgelassen. Die Fällung erfolgte mit 1/10 Vol. 3 M NaAc pH 5,2 und 2 Vol Ethanol (gut geschüttelt, 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert). Danach wurde die DNA 1 x mit 500 μ l 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20-30 μ l 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) oder SDW gelöst.

Sequenzierung von DNA Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde vom DNA-Cloning-Service, Ohnhorststrasse 18, 22609 Hamburg, durchgeführt. Für die Gewinnung der Sequenzen aus Zwischenklonierungsschritten (pGEM-T) wurden die Standardprimer M13-F und M13-R verwendet.

5.5.4 Herstellung der Deletionskonstrukte

Um die Ceramid Synthasen aus *Pichia* auszuschalten, wurden jeweils flankierende Bereiche der codierenden Region getrennt amplifiziert und mit einer Resistenzkassette versehen. Die Integration in die Genome erfolgte durch doppelt homologe Rekombination, dargestellt in Abbildung 5-1.

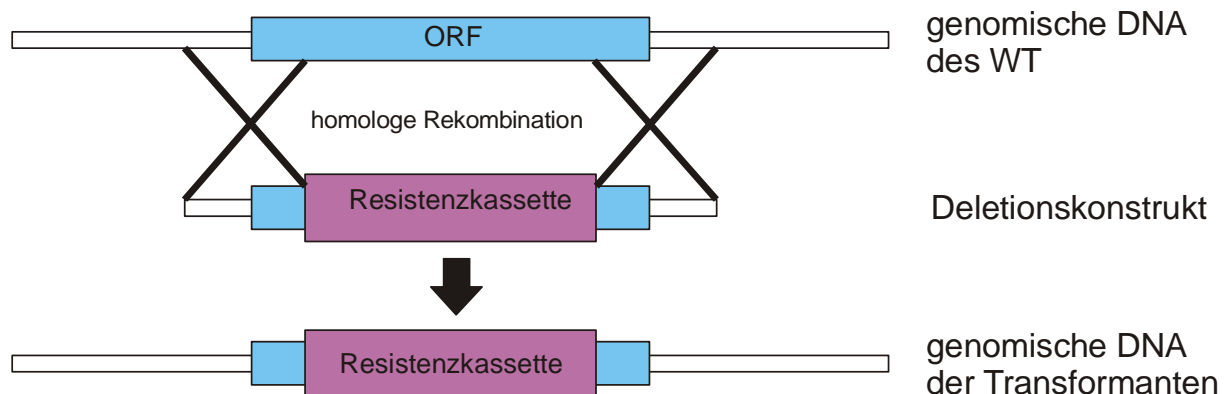


Abbildung 5-1 Schematische Darstellung der homologen Rekombination und der daraus resultierenden KO-Mutanten. Sofern die homologen Bereiche eine ausreichende Länge besitzen (500-1000 bp), kann es in vielen Organismen zur Integration des linearen extrachromosomalen Konstruktes kommen. Dabei geht die ursprüngliche DNA an dieser Stelle verloren.

Herstellung der Deletionskonstrukte für Ceramidsynthasen

Zunächst wurden ca. 500 bp große Fragmente der flankierenden Bereiche des auszuschaltenden ORFs mittels PCR amplifiziert. Hierbei wurde stets die PWO Polymerase verwendet, da diese eine sehr geringe Fehlerquote aufweist. Die Enden der Primer wurden mit Schnittstellen versehen, die die Klonierung in die entsprechenden Vektoren ermöglichen. Die Amplifikate wurden in den Vektor pGEM-t easy zwischenkloniert und in *E. coli* vermehrt. Nach Überprüfung der Sequenz (DNA cloning service) wurden die Fragmente mittels Restriktionsverdau aus dem Vektor geschnitten und gerichtet in den Vektor pBluescript-SKII kloniert. Der Vektor wurde linearisiert und eine Resistenzkassette zwischen die beiden flankierenden Bereiche eingefügt.

5.5.5 Herstellung der Expressionskonstrukte

Induzierbare Expression in *Pichia pastoris*

Um die Ceramidsynthase aus *Pichia pastoris* funktionell zu charakterisieren, sollte das Gen in *Pichia pastoris* bar1-KO exprimiert werden. Als Expressionsvektor wurde pPIC3.5 (Invitrogen) benutzt. Die Genexpression steht hier unter der Kontrolle des starken AOX1-Promotors, der durch Methanol (bei gleichzeitiger Abwesenheit von Glucose) induziert werden kann.

Die PCR-Amplifikation aller codierenden Sequenzen erfolgte mit Hilfe der *Pwo*-Polymerase. Als Vorlage diente genomische DNA aus *Pichia pastoris* Wildtyp. Das erhaltene PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel gereinigt, mit einem 3'-Adenosin versehen und in pGEM-T zwischenkloniert. Nach der Transformation von *E. coli* wurde die isolierte psDNA sequenziert (1-2 Klone; normale Sequenzierung bis ca. 700 bp wurden beim DNA-Cloning-Service in Hamburg durchgeführt; für längere Sequenzierungen wurden die Proben zu AGOWA, Berlin, geschickt). Nun erfolgte die Umklonierung in den Vektor pPIC3.5: Die sequenzierten ORFs wurden mit Hilfe der durch die PCR-Primer künstlich eingebrachten Schnittstellen restringiert, über ein Agarosegel gereinigt und mit dem sequentiell aufgeschnittenen Vektor ligiert. Die erhaltenen Plasmide wurden in *E. coli* vermehrt und für die Transformation von *Pichia* linearisiert. Die Linearisierung erfolgte vorzugsweise mit dem Enzym BglII.

5.6 Arbeiten mit *E. coli*

5.6.1 Medien für *E. coli*

LB-Medium (High Salt) 10 g Bacto-Trypton
 5 g Hefeextrakt
 10 g NaCl

 H₂O_{dest} ad 1 l; pH 7.2

Nach dem Autoklavieren wurde eines der folgenden Antibiotika hinzugefügt:

- 100 µg/ml Ampicillin (sterilfiltriert)
- 50 µg/ml Kanamycin (sterilfiltriert),
- 25 µg/ml Tetracyclin (sterilfiltriert) oder

Zur Blau-Weiß-Selektion bei Vektoren mit dem *LacZ*-Gen zusätzlich zu Ampicillin:

- 0,5 mM IPTG (sterilfiltriert)
- 80 µg/ml X-Gal in DMF (sterilfiltriert)

Für Platten wurden vor dem Autoklavieren 15 g Agar pro 1 l Medium zugegeben.

Low Salt LB-Medium 10 g Bacto-Trypton
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl

 H₂O_{dest} ad 1 l; pH 7,5

Selektion: 25 µg/ml Zeocin (sterilfiltriert, Zugabe nach Autoklavieren)

Für Platten wurden vor dem Autoklavieren 15 g Agar pro 1 l Medium zugegeben.

SOB-Medium 10 g Bacto-Trypton
 5 g Hefeextrakt
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 10 mM MgCl₂ (sterilfiltriert, Zugabe nach Autoklavieren)
 10 mM MgSO₄ (sterilfiltriert, Zugabe nach Autoklavieren)

 H₂O_{dest} ad 1 l; pH 7,2

5.6.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen [228]

TB-Puffer: 10 mM PIPES pH 6,7 (sterilfiltriert)
 55 mM MnCl₂ (autoklaviert)
 15 mM CaCl₂ (autoklaviert)
 250 mM KCl (autoklaviert)
 (immer frisch angesetzt)

2 ml SOB-Medium wurden mit *E. coli*-Zellen angeimpft und üN bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die komplette Vorkultur in 200 ml SOB-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,5 unter den gleichen Bedingungen wie oben kultiviert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend sedimentiert (400 rpm, 4°C). Das Pellet

wurde nun in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und wie oben zentrifugiert. Die erneute Resuspendierung erfolgte anschließend in 15 ml eiskaltem TB-Puffer. Nun wurden 1,2 ml (= 7 %) DMSO hinzugefügt, und nach weiteren 10 min Inkubation auf Eis konnte die Zellsuspension in 100 µl-Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren werden. Die Zellen konnten für mehrere Monate bei -80°C gelagert werden.

5.6.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen [229]

100 µl chemisch kompetente XL1-blue-Zellen wurden 10 min auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit 2 µl Ligationsansatz oder ≈ 20-50 ng psDNA gemischt und 20 min auf Eis inkubiert.

Nach einem Hitzeschock von 60 sec bei 42°C wurden die Zellen in 400 µl LB-Medium regeneriert (60 min bei 37°C im Schüttler). Anschließend wurden die Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert.

Für „schwierige“ Konstrukte (z.B. Drei-Fragment-Ligationen, Konstrukte > 9 kb) wurden „superkompetente *E. coli*-XL 1-blue-Zellen“ von H. Schmidt (DNA Cloning Service, Hamburg) verwendet: 50 µl auf Eis aufgetaute kompetente Zellen wurden mit 5 µl Ligationsansatz gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nun folgten 30 sec. Hitzeschock (42°C) und 30 min Regeneration in 200 µl LB (37°C im Schüttler). Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben ausplattiert und inkubiert.

5.6.4 Plasmid-Minipräparation

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach dem folgenden Protokoll [verändert nach [230]] isoliert.

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten (falls nicht anders angegeben) bei 13.000 rpm und RT:

BF-Puffer:	Saccharose	8 %
	Triton X-100	0,5 %
	EDTA (pH 8,0)	50 mM
	Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
IS-Mix:	Isopropanol	400 µl
	5 M NH ₄ Ac	80 µl
	(immer frisch angesetzt)	

2 ml einer üN-Kultur wurden 20 sec in einem 2 ml Reaktionsgefäß sedimentiert. Die Zellen wurden in 190 µl BF-Puffer und 10 µl Lysozym (20 mg/ml) resuspendiert, 1 min abgekocht und kurz auf Eis abgekühlt. Nach 10 min Zentrifugation konnte das Pellet (enthält Zelltrümmer und genomische DNA) mit einem Zahnstocher entfernt und die psDNA (und RNA) durch Zugabe von 480 µl IS-Mix gefällt werden (30 min bei RT). Nun wurde 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Nukleinsäure mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen (kurz geschwenkt und 3 min zentrifugiert). Nach dem Trocknen (ca. 30 min bei 37°C) konnte die DNA in 100 µl Tris-HCl (10 mM, pH 8,0) gelöst und die RNA durch Zugabe von je 3 µl

RNase A (10 mg/ml) verdaut werden (30 min bei 37°C). Anschließend wurden 3 µl aus jedem Ansatz mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen testverdaut. Die psDNA konnte direkt weiterverwendet werden, zum Sequenzieren musste sie jedoch noch gereinigt werden.

5.6.5 Plasmid-Midi- und Maxipräparation

Die erforderlichen Präparationen wurden nach einem der folgenden Protokolle durchgeführt:

a) Maxi-Präparation [229]:

STE-Puffer:	NaCl	100 mM
	Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM

Lösung 1:	Glucose	50 mM
	Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM
	EDTA (pH 8,0)	10 mM

Lösung 2:	NaOH	0,2 N
	SDS	1 %
	(frisch angesetzt)	

Lösung 3:	5 M KAc	60 ml
	Eisessig	11,5 ml
	SDW	28,5 ml

Eine *E. coli*-ÜN-Kultur (250 ml) wurde in 50 ml-Falcons sedimentiert (15 min bei 4.000 rpm) und das Pellet in 50 ml STE-Puffer suspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (wie oben) wurde das Pellet in 10 ml Lösung 1 resuspendiert. Sofort danach erfolgte die Zugabe von 20 ml frisch angesetzter Lösung 2. Das Falcon wurde mehrmals vorsichtig invertiert und für 5-10 min bei RT inkubiert, bis die Lösung klar und viskos war. Zum Abstoppen der Lyse wurden 15 ml eiskalte Lösung 3 zugegeben, mehrmals vorsichtig invertiert und weiter 10 min auf Eis inkubiert. Das Bakterienlysate wurde 15 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert und durch 4 Lagen Filterpapier in ein neues Falcon filtriert. Das Filtrat konnte nun (auf 2 Falcons verteilt) mit 0,6 Vol (je 24 ml) Isopropanol gefällt werden (10 min bei RT). Die DNA-Präzipitation erfolgte bei 4000 rpm (RT) für 20 min. Das Pellet wurde anschließend mit wenig 70 % Ethanol gespült, getrocknet und in 3 ml 10 mM Tris-HCl pH 8,0 gelöst (DNA-Ausbeute ≈ 1-2 µg/µl).

- b) Midipräparationen wurden bei Low-Copy-Plasmiden (alle Expressionsvektoren) mit dem „NucleoBond Xtra Midi Plus Kit“ (Macherey Nagel) durchgeführt: Hier wurde nach Angaben des Herstellers verfahren (DNA-Ausbeute meist 0,5-1 µg/µl).

5.7 Arbeiten mit *Pichia pastoris*

5.7.1 Medien für *Pichia pastoris*

20 x YNB 134 g Yeast Nitrogen Base (mit (NH₄)₂SO₄, ohne Aminosäuren)
H₂O_{dest} ad 1 l; sterilfiltrieren

YPD 20 g Bacto-Trypton
10 g Hefeextrakt
H₂O_{dest} ad 950 ml; autoklavieren

nach dem Abkühlen Zugabe von 50 ml 40 % Glucose und 100 µg/ml Ampicillin

MMD (Minimal-Glucose) 850 ml H₂O autoklavieren

nach dem Abkühlen Zugabe von:

100 ml 20 x YNB (sterilfiltriert)
50 ml 40 % D-Glucose (sterilfiltriert)
2 ml 0,02 % Biotin (sterilfiltriert)
2 ml 10 mg/l Histidin (nur für *his*⁻-Stämme)

MMM (Minimal-Methanol) 900 ml H₂O autoklavieren

nach dem Abkühlen Zugabe von:

100 ml 20 x YNB (sterilfiltriert)
5 ml Methanol
2 ml 0,02 % Biotin (sterilfiltriert)
2 ml 10 mg/l Histidin (nur für *his*⁻-Stämme)

Für Platten wurden 20 g granulierter Agar mit dem Wasser autoklaviert. Da sich das Methanol nach ca. 14 Tagen verflüchtigte, wurden die Platten ohne Methanol gegossen und jede Platte etwa 4 Stunden vor der Verwendung mit 200 µl Methanol überschichtet (bei RT einziehen lassen).

MMGy (Minimal-Glycerol) 1,155 g *drop out powder* (Zusammensetzung siehe unten)
H₂O ad 830 ml

nach dem Abkühlen ($T \leq 60^\circ\text{C}$) Zugabe von:

- 100 ml 20 x YNB
- 50 ml 20 % Glycerol (v/v)
- 10 ml 2mg/ml Uracil (Endkonzentration 20 mg/l)
- 6 ml 10mg/ml Leucin (Endkonzentration 60 mg/l)
- 4 ml 10mg/ml Tryptophan (Endkonzentration 40 mg/l)
- 2 ml 10mg/ml Histidin (nur für his⁻-Stämme)
- 2 ml 0,02 % Biotin

Zusammensetzung *drop out powder*

Adenin (Hemisulfat)	2,5 g
L-Arginin (HCl)	1,2 g
L-Aspartat	6,0 g
L-Glutamat (Na ⁺)	6,0 g
L-Lysin (HCl)	1,8 g
L-Methionin	1,2 g
L-Phenylalanin	3,0 g
L-Serin	22,5 g
L-Threonin	12,0 g
L-Tyrosin	1,8 g
L-Valin	9,0 g

5.7.2 Herstellung elektrokompetenter *P. pastoris*-Zellen

Einer üN Kultur (100 ml) wurde bei einer OD₆₀₀ von 1,2 bis 1,5 geerntet (3 min, 1500 g, 4°C) und das Pellet in 100 ml eiskaltem SDW suspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (wie oben) erfolgte die Resuspendierung in 50 ml eiskaltem SDW. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und in 8 ml eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert. Nach einer letzten Zentrifugation konnten die Zellen in 400 µl eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert werden. Da die Transformationsrate der Zellen bei Lagerung sehr schnell sinkt, mussten für jede Transformation frische kompetente Zellen hergestellt werden.

5.7.3 Transformation von *P. pastoris* mittels Elektroporation

Pro Transformation wurden 80 µl elektrokompetente Zellen vorsichtig mit 5-10 µg (max. 20 µl) linearisierter psDNA (in SDW) gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 1500 V für \approx 5 ms (Feldstärke 7500 V/cm). Sofort danach wurde 1 ml 1 M Sorbitol hinzugefügt und die Zellsuspension für 2 Stunden bei 30°C ohne Schütteln aufbewahrt. Die Zellsuspension wurde in 100 µl-Aliquots auf Selektionsmedium ausplattiert und für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert (bei Selektion auf Zeocin betrug die Inkubationszeit häufig 1-2 Tage länger, auf Nourseothricin ca. 7-10 Tage).

5.7.4 Methanol-Screening

Bei Transformation mit dem pPIC3.5-Vektorsystem ergeben sich zwei Integrationsmöglichkeiten ins Genom: Zum einen kann das Konstrukt doppelt homolog in den *AOX1*-Lokus integriert haben, was den Verlust der Alkoholoxidase(-Aktivität) zur Folge hat. Andererseits kann auch ein einfach homologes Rekombinationsereignis im (punktmutierten) *his4*-Lokus stattgefunden haben. In diesem Fall wären die Zellen HIS^+ , gleichzeitig aber immer noch in der Lage, mit Methanol als einziger Kohlenstoffquelle gut zu wachsen. Für diese Arbeit mussten Mut^+ -(*methanol utilization plus*) und Mut^S -(*methanol utilization slow*) Transformanten unterschieden werden. Daher wurden pro Transformation 50-100 *Pichia*-Kolonien parallel auf MMM- und MMD-Platten ausgestrichen und für 1-2 Tage bei 30°C inkubiert. Mut^S -Kolonien (also solche, die auf MMM deutlich schlechter wuchsen als auf MMD) wurden vor einer Lipidanalyse zusätzlich mit Kolonie-PCR überprüft.

5.7.5 Induktion der heterologen Genexpression in *Pichia pastoris*

Genexpression mit Hilfe des pPIC3.5-Systems steht unter Kontrolle des *AOX1*-Promotors, der durch Methanol bei gleichzeitiger Abwesenheit von Glucose induziert wird.

Die Zellen einer 100 ml üN-Kultur (YPD oder MMD; $OD_{600} \approx 1-3$) wurden sedimentiert (3 min, 1500 g), 1- bis 2-Mal mit MMM gewaschen und in 100 ml MMM resuspendiert. Die Induktion der Genexpression erfolgte üN (16-24 Stunden) bei 30°C. Anstelle von Glucose konnte auch Glycerol als Kohlenstoffquelle für die Anzucht verwendet werden: Da der *AOX1*-Promotor nicht durch Glycerol gehemmt wird, entfiel der Waschschrift. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 500 µl Methanol pro 100 ml Kulturvolumen (Inkubation wie oben). Ein Nachteil ist allerdings die längere Generationszeit der *Pichia*-Zellen.

5.7.6 Aufbrechen der *Pichia pastoris*-Zellen

Um die Lipide von Hefen wie *Pichia* quantitativ extrahieren zu können, muss zunächst ihre äußerst rigide Zellwand aufgebrochen werden. Dies wurde teilweise über Vortexen des Zellpellets mit Glasperlen erreicht. Hierfür wird das Zellpellet mit dem entsprechenden Lösemittel versetzt und zu diesem Ansatz 10 – 50 vol% Glasperlen (0,4 mm Durchmesser)

gegeben und das ganze für 30 min gevortext. Eine andere Art des Zellaufbruchs wurde über ein Hochdruckaufbruchsystem (french press) durchgeführt. Die Kultur wurde bei 2000g abzentrifugiert und das Pellet in einem geringen Volumen 0,45% NaCl resuspendiert. Diese Suspension wurde anschließend in eine Hochdruckkammer überführt. Nach Einführen des Stempels wurde die Kammer in eine Hochdruckpresse gesellt, das Ventil geschlossen, und ein statischer Druck von 1000 bar erzeugt. Durch leichtes Öffnen des Ventils kann die Zellsuspension in ein 50-ml Falcon ausgelassen werden, ohne dass der Druck im Inneren abnimmt. Durch die rasche Entspannung der Zellen im Umgebungsdruck platzen diese auf. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt, bis nahezu alle Zellen aufgebrochen sind.

Eine dritte Möglichkeit ist die Benutzung einer Schlagmühle. Hierbei wird die Zellsuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß umgefüllt und mit 5-10 Stahlkugeln (2-5mm Durchmesser) befüllt. Durch Einspannen in eine Kugelmühle werden die Kugeln im Inneren des Reaktionsgefäßes stark beschleunigt. Durch die dabei auftretenden Scherkräfte werden die Zellwände der Hefezellen zerrissen.

5.8 Lipidanalytik

5.8.1 Extraktion der Gesamtlipide

50-100 ml (induzierte) Zellkultur wurde durch Zentrifugation (5 min, 2000 g) geerntet und das Frischgewicht des Sediments bestimmt. Die Zellen wurden in 5-10 ml SDW resuspendiert (Vortex oder blaue Pipettenspitze) und im Falcon 15-20 min abgekocht. Nach der Überführung in mittlere (= 20 ml) Schliffgläschen (Falcons mit 5 ml H₂O nachgespült) mussten die Zellreste erneut sedimentiert werden (5 min, 1000 g). Die erste Lipidextraktion erfolgte durch Zugabe von 8 ml Chloroform/Methanol (C/M) 1:2 für 4-5 Stunden bei 4°C (Schüttler). Der Zellrückstand wurde sedimentiert, der Überstand in ein großes Schliffglas (40 ml Fassungsvermögen) dekantiert der Zellrest erneut üN mit in 8 ml C/M 2:1 nachextrahiert. Der Zellrest wurde 5 min bei 1000 g sedimentiert und der Überstand mit dem ersten Extrakt vereint (abhängig von der Konsistenz der Zellpellets musste der Extrakt evtl. durch eine mit Watte gestopfte Pasteurpipette filtriert werden). Der Lipidextrakt wurde nun mit 8 ml Chloroform und 6 ml 0,45 % NaCl versetzt, um ein Verhältnis Chloroform/Methanol/H₂O von 2:1:0,75 einzustellen. Die Phasentrennung (Chloroform-/wässrige Phase) konnte durch eine kurze Zentrifugation bei 1000 g beschleunigt werden. Die (untere) Chloroformphase wurde durch eine gestopfte Pasteurpipette in ein kleines Schliffglas filtriert, unter Argonstrom zur Trockene eingengt und der Lipidrückstand in 300-600 µl Chloroform (je nach Lipidmenge) gelöst.

Für eine qualitative Analyse wurden ca. 10 µl Lipidextrakt punktförmig auf eine Kieselgelplatte aufgetragen und in Chloroform/Methanol 85:15 (Glycolipide) oder

Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser 85:15:10:3,5 (Phosphoglycerolipide) entwickelt. Die Detektion erfolgte durch Besprühen mit α -Naphthol-Schwefelsäure und Veraschen.

5.8.2 Reinigung der Lipide und Vorbereitung für die Analyse

Fraktionierung der Lipide

Größere Mengen Lipidextrakt konnten mit Hilfe von Strata SI-1 Säulen (6 ml) in Neutrallipide (freies Sterol, TAG, DAG, Sterolester), Glycolipide (GlcCer, SG) und Phosphoglycerolipide fraktioniert werden. Die Säule wurde zunächst mit ca. 6 ml Chloroform äquilibriert, der Lipidextrakt auf die Säule gegeben und die Fraktion der Neutrallipide durch mehrmaliges Spülen mit Chloroform (ca. 30 ml) eluiert. Die Glycolipide wurden nun mit Aceton/Isopropanol 9:1 ausgewaschen (ca. 30 ml) und die verbleibenden Phospholipide schließlich durch Zugabe von Methanol (ca. 30 ml) eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden zur Trockene eingengt und in jeweils einem kleinen Volumen Chloroform oder Chloroform/Methanol 2:1 gelöst.

Für die Herstellung einer Glycolipidfraktion, welche auch die freien Ceramide enthält, die mittels MS analysiert werden sollen, mussten jedoch folgende Änderungen vorgenommen werden: Für die Quantifizierung der Bestandteile wurden zu jedem Extrakt vor der Fraktionierung sowohl 15 nmol GlcCer (β -D-glucosyl-d18:1/12:0) als auch 15 nmol Ceramid (d18:1/15:0) als interne Standards zugesetzt. Des Weiteren wurde eine Strata SI-1 Säulen mit 1 ml Füllungsvolumen verwendet und zunächst mit 1 ml Chloroform äquilibriert. Anschließend wurde die Säule mit 2 ml Chloroform, gefolgt von 4 ml Aceton/Isopropanol 10:1, und letztendlich mit 2 ml MeOH gewaschen. Nach einer erneuten Äquilibrierung mit 1 ml Chloroform wurde die Probe aufgetragen und mit ebendiesen Lösemitteln in identischen Volumina die Fraktionen eluiert.

Alkalische Verseifung von Lipiden

Für die Verseifung wurde ein Teil des Lipidextraktes (bis 100 μ l Kultur) oder ein gereinigtes Lipid in einem Sovirell-Gläschen eingedampft und anschließend in 2 ml 0,2 M NaOH in MeOH resuspendiert. Der Ansatz wurde fest verschlossen, gevortext und für 90 min bei 40 °C inkubiert. Durch Zugabe von 4 ml Chloroform und 1,5 ml H₂O wurde ein Verhältnis von Chloroform/MeOH/Wasser von 2:1:0,75 eingestellt. Nach kurzer Zentrifugation wurde der untere organische Teil abgenommen, die wässrige Phase mit 4 ml Chloroform nachextrahiert und die vereinigten Extrakte unter Argon vollständig eingedampft.

Reinigung der Cerebroside

Für die präparative DC wurden 200 μ l Lipidextrakt (oder die Glycolipidfraktion) 6-8 cm breit auf Kieselgelplatten aufgetragen und in Chloroform/Methanol 85:15 entwickelt. Die Lipid-

banden wurden mit ANS (8-Anilino-naphthalinsulfonat) besprüht und unter UV-Licht markiert. Nachdem der markierte Bereich des Kieselgels vollständig in ein Sovirell-Gläschen abgekratzt worden war, erfolgte die Zugabe von 6 ml C/M 2:1 und 1,5 ml 0,45 % NaCl, um die Cerebroside aus dem Kieselgel zu lösen. Nach Einstellung der Phasentrennung (kurze Zentrifugation bei 1000 g) sammelten sich Kieselgelreste an der Phasengrenze). Die CHCl_3 -Phase (unten) wurde vorsichtig entnommen und durch eine gestopfte Pasteurpipette in ein neues Sovirell filtriert. Die wässrige Phase wurde erneut mit 4 ml CHCl_3 versetzt, geschüttelt, kurz zentrifugiert und die CHCl_3 -Phase mit dem ersten Extrakt vereinigt. Die Cerebroside wurden unter Argon zur Trockene eingedampft.

Die Cerebroside konnten nun in $\approx 500 \mu\text{l}$ CHCl_3 gelöst und bis zur weiteren Verwendung (Analyse der Fettsäure oder der Sphingobase) bei -20°C gelagert werden.

5.8.3 Analyse der Fettsäurezusammensetzung

Herstellung von Fettsäure-Methylestern (FAME-Synthese)

FAME-Reagens: 1 N H_2SO_4 in trockenem Methanol mit 2 % 2,2-Dimethoxypropan

Um Fettsäuren analysieren zu können, mussten sie zunächst in ihre Methylester umgewandelt werden. Hierzu wurden gereinigte, getrocknete Lipide oder trockene Zellpellets (für die Analyse der Fettsäuren aus den GIPCs) in Sovirell-Gläschen mit 2 ml FAME-Reagens versetzt und ≈ 20 h für GlcCer, 60 min für PG) auf 80°C erhitzt. Die Deckel mussten fest verschlossen sein. Nach dem Abkühlen wurde die Probe mit 2 ml H_2O und 3 ml Petrolether (PE) versetzt, geschüttelt und bis zur Phasentrennung zentrifugiert. Die (obere) PE-Phase wurde in ein neues Sovirell überführt und die wässrige Phase mit 3 ml PE nachextrahiert. Da die PE-Phase Säurereste enthält, die die nachfolgende Gaschromatographie (GLC) stören würden, musste 1 x mit 4 ml H_2O gewaschen werden. Die Probe wurde anschließend durch Zugabe von 2-3 Spatelspitzen Na_2SO_4 getrocknet („Schneekugeleffekt“), in ein neues Sovirell-Gläschen filtriert und unter Argon getrocknet.

TMSE-Derivatisierung

Da *Pichia pastoris* fast ausschließlich hydroxylierte Fettsäuren im Glucosylceramid enthält, mussten die FAMES zusätzlich trimethylsilyliert werden. Hierzu wurden die getrockneten FAMES in $100 \mu\text{l}$ PE gelöst und mit gleichem Volumen BSTFA (Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid mit 1 % Trichlorsilan; von Sigma oder Supelco) versetzt und 60 min bei 70°C inkubiert. Die Proben konnten direkt in GLC-Gläschen abgefüllt und chromatographiert werden.

Fettsäureanalyse mittels GC

Die Gaschromatographie-Analyse erfolgte auf einer polaren Säule („Select FAME“, 50 m; Varian) mit Hilfe eines FID-Detektors und Helium als Trägergas. Dabei wurde der folgende Temperaturgradient verwendet: 100°C für 1 min, mit 3°C pro min bis auf 200°C und mit einer

Heizrate von 10°C/min auf 275°C. Die letzte Temperatur wurde bis zu einer Gesamtlaufzeit von 50 min gehalten.

Fettsäureanalyse mittels GC/MS

Um die Peaks/Retentionszeiten in den Chromatogrammen eindeutig einer Struktur zuordnen zu können, wurden ausgewählte Proben massenspektrometrisch analysiert. Die GLC/MS-Analysen wurden im Forschungszentrum Borstel von Herrn Herrmann Moll über einen HP 5975 XL *mass selective detector* (Agilent Technologies) mit einer HP-5 MS Silica-Säule (30 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,25 µm Schichtdicke) und folgendem Temperaturgradienten durchgeführt: 150°C für 3 min gehalten und mit einer Heizrate von 5°C/min auf 320°C erhöht. Die Massenspektren wurden bei 70 eV erzeugt. In den GlcCer-Proben wurden C16:0(2-OH) und C18:0(2-OH) als Hauptkomponenten bestimmt. Die zweifach-hydroxylierten Fettsäuren 16:0(2,3-OH) und C18:0(2,3-OH) sowie die Fettsäuren mit ungeradzahlicher Kettenlänge C17:0(2-OH) und C19:0(2-OH) konnten in manchen Proben jeweils nur in Spuren nachgewiesen werden. In den Fraktionen der nicht-extrahierbaren Lipide wurden C24:0(2-OH), C25:0(2-OH) und C26:0(2-OH) als größte Bestandteile ausgemacht werden. Die korrespondierenden α-β-hydroxylierten Spezies konnten in geringer Menge detektiert werden.

5.8.4 Analyse der Sphingobasenkomposition

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

Boratpuffer: 2M Borsäure/KOH pH10,5

Hydrolyse der Sphingolipide

Um die Komposition der Sphingobasen bestimmen zu können, musste diese zunächst aus den Sphingolipiden freigesetzt werden. Dies wurde über eine basische Hydrolyse bewerkstelligt. Der Lipidextrakt bzw. das gereinigte Lipid wurde in einem Sovirell-Gläschen vollkommen getrocknet. Der Extrakt wurde anschließend in 4 ml H₂O resuspendiert und danach 1,5 ml 1,4-Dioxan sowie 3 kleine Löffelspatel Bariumhydroxid (Ba(OH)₂•2H₂O) zugegeben. Der pH-Wert sollte nun >12 liegen, was mit einem Indikatorpapier überprüft werden kann. Die Gläschen wurden gasdicht verschlossen (Teflondichtung im Deckel) und gevortext. Die Inkubation erfolgte unter gelegentlichem Vortexen bei 110°C für mindestens 20h. Hierbei wird zunächst die Kopfgruppe abgespalten (innerhalb der ersten Stunde) und anschließend die Amidbindung zwischen Fettsäure und Sphingobase gelöst. Nach Abkühlen des Ansatzes wurden weitere 4 ml Chloroform zugegeben, so dass sich ein Verhältnis Chloroform/Dioxan/Wasser von 8:3:8 einstellt. Anschließend wurde die Probe gevortext und mittels Zentrifugation (3 min @ 1000xg) eine Phasentrennung herbeigeführt. Die untere organische Phase wurde mit einer Pasteurpipette in ein 20 ml Schliffgläschen überführt und

die wässrige Phase mit 4 ml Chloroform nachextrahiert. Auf Grund des basischen pH-Wertes der wässrigen Phase verbleiben die deprotonierten Fettsäuren in dieser. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 8 ml 0,1 M KOH + 0,5 M KCl gewaschen. Die organische Phase wurde wiederum abgenommen und in ein neues Sovirell Gläschen überführt und unter Argon eingedampft.

DNP-Derivatisierung der Sphingobase

Da die freie Sphingobase keine für übliche HPLC-Detektoren wahrnehmbare Strukturen trägt, musste diese mit einer UV-absorbierenden Gruppe derivatisiert werden. Hierfür wurden die hydrolysierten Lipide in 200 µl FDNB (2-Fluordinitrobenzol)-Lösung resuspendiert und anschließend unter Vortexen 800µl Boratpuffer zugegeben. Das Sovirellgläschen wurde gasdicht verschlossen (Teflondichtung) und für 30 min bei 60 °C inkubiert. Hierbei lagert sich die Dinitrophenol-Gruppe des FDNB an die freie Aminogruppe der Sphingobase. Das so entstandene Produkt wird als DNP-Derivat (Dinitrophenol) bezeichnet. Nach Abkühlen des Ansatzes wurde durch die Zugabe von 1,2 ml H₂O, 1,8 ml MeOH und 4 ml Chloroform ein Verhältnis von Chloroform/MeOH/Wasser von 2:1:1 eingestellt. Nach Durchmischung der Probe und kurzer Zentrifugation (3min @ 1000xg) wurde die untere organische Phase abgenommen, in ein frisches Sovirell-Gläschen überführt und der wässrige Teil mit 4 ml Chloroform nachextrahiert. Die vereinigten Chloroform-Phasen wurden mit ein paar Tropfen Isopropanol versetzt und unter Argon eingedampft und in 50 – 200 µl MeOH aufgenommen.

Detektion mittels HPLC

Da in der so vorbereiteten Probe noch ein relativ großer Anteil freier FDNBs und derivatisierter Nebenprodukte enthalten sein können, wurde die Probe in manchen Fällen (bei viel Ausgangsmaterial) zunächst über DC gereinigt. Hierfür wurde der Ansatz ca. 10 cm breit auf eine Glas-DC-Platte aufgetragen und mit DNP-derivatisierten Standards flankiert. Der Bereich, in welchem die Sphingobasen laufen, wurde mit Wasser besprüht und großzügig abgekratzt. Das Kieselgel wurde mit 6 ml Chloroform/Methanol 2:1 und 2 ml KOH versetzt und der Ansatz anschließend gevortext (3x1min). Nach einer Zentrifugation (3min@1000xg) sammelt sich das Kieselgel in der Interphase, und die untere organische Phase wurde abgenommen, eingedampft und erneut in 50 – 200 µl MeOH aufgenommen. Die so vorbereiteten Proben wurden sodann in für den Autosampler der HPLC-Anlage geeignete Gefäße überführt.

Die anschließende Analyse der Proben erfolgte in einer HPLC-Anlage. Die einzelnen Komponenten der Probe wurden in einer Multospher 100 RP 18-5, 250 x 4 mm inklusive Vorsäule aufgetrennt. Als Laufmittel wurde Wasser (Laufmittel A) und eine Mischung aus MeOH/Acetonitril/2-Propanol im Verhältnis 10:3:1 (Laufmittel B) verwendet. Das Programm durchlief einen Gradienten von 84% B auf 100% B in 55 min und anschließender Elution für

15 min bei 100% B bei einem Volumenfluss von 0,8 ml/min und einer Temperatur von 30°C. Die anschließende Detektion erfolgte in einem UV-Detektor bei 260nm Wellenlänge. Als externe Standards wurden DNP-derivatisiertes Sphinganin (d18:0), Sphing-4-enin(d18:1^{4E}) und 4-Hydroxysphinganin (t18:0) verwendet.

Detektion mittels HPLC-MS

Die massenspektrometrische Analyse der DNP-derivatisierten Sphingobasen wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Stephan Franke durchgeführt (Universität Hamburg, Fachbereich Chemie). Dies geschah für ausgewählte Proben, um die Peaks/Retentionszeiten den einzelnen Sphingobasen zuordnen zu können. Die HPLC/MS- und ESI/MS/MS-Analyse wurde auf einem MAT 95XL-Trap-Massenspektrometer (Thermoquest, San Jose, California, U.S.A.) durchgeführt. Das Gerät verfügte über ein Einspritzsystem mit Electrospray-Ionisation (ESI), einen hochauflösenden Quadrupol und eine nachgeschaltete Ionenfalle. Alle Messungen wurden im negativen Ionen-Modus durchgeführt. Die DNP-derivatisierten Sphingobasen wurden über ein HPLC-System (Hitachi, Düsseldorf) aufgetrennt und über ein Splitventil in das Massenspektrometer eingespritzt. Während des HPLC-Laufs wurden in Echtzeit das Massenspektrum im Bereich $m/z = 300$ bis 1200 sowie der Gesamtionenstrom bestimmt. Die HPLC-Säule und die Laufbedingungen waren identisch mit den zuvor beschriebenen Einstellungen. Als Referenzsubstanzen wurden DNP-derivatisiertes Sphinganin (d18:0), Sphing-4-enin(d18:1^{4E}) und 4-Hydroxysphinganin (t18:0) verwendet. In diesen Messungen konnten die in den Abbildungen beschriebenen Sphingobasen d18:0, d18:1, d18:2, d18:2-9m, t18:0 und t20:0 nachgewiesen werden.

5.8.5 Messung der Ceramide und GlcCer mittels UPLC-TOF MS

Die Messung der Ceramide und der Glucosylceramide wurde freundlicherweise von Frau Dr. Kirstin Feussner durchgeführt (Universität Göttingen, Abteilung Biochemie der Pflanze). Die Analyse der vorgereinigten Extrakte (siehe 5.8.1, 5.8.2) wurde mittels Ultra Performance LC™ (ACQUITY UPLC™ System, Waters Corporation, Milford, USA) gekoppelt mit Flugzeitanalysator-MS (TOF-MS, LCT Premier™, Waters Corporation, Milford, USA) durchgeführt.

Die chromatographische Auftrennung der Proben erfolgte in einer ACQUITY UPLC™ BEH SHIELD RP18 Säule (1 x 100 mm, 1,7 µm Partikelgröße, Waters Corporation, Milford, USA) bei einer Temperatur von 50 °C und einer Flussrate von 0,2 ml/min mit folgenden Laufmitteln: Laufmittel A: H₂O_{dest}/Methanol/Acetonitril/Ameisensäure (90:5:5:0,1 v/v/v/v) und Laufmittel B: Acetonitril/Ameisensäure (100:0,1 v/v). Die Elution erfolgte entsprechend des Gradienten: 0-0,5 min 80 % Laufmittel B, 0,5 – 7 min von 80 % Laufmittel B auf 100 % Laufmittel B, 7 – 11 min 100 % Laufmittel B und 11 – 13 min 80 % Laufmittel B.

Die Detektion der eluierten Substanzen erfolgte durch Elektrosprayionisations-MS (ESI-MS) im positiven W-Modus in einem Massenbereich (m/z) von 500 – 1000 Da mit einer Massenauflösung größer als 10000.

Vor den Messungen wurde das LCT Premier™ durch Injektion von 0,01 % (v/v) Phosphorsäure in Acetonitril/H₂O_{dest} (50:50, v/v) kalibriert. Die Analyse der Proben erfolgte bei einer Kapillar- und Conespannung von 2700 V bzw. 30 V, einer Desolvations- und Sourcetemperatur von 250 °C bzw. 80 °C und einem Cone- und Desolvationsgasfluss von 30 bzw. 600 l/h. Daten wurden im Centroid-Modus mit einer Scanzeit von 0,5 sec und einem Interscan-Delay von 0,1 sec unter Nutzung des DRE (Dynamic Range Enhancement) aufgezeichnet.

Zur Gewährleistung einer Massengenauigkeit besser als 3 mDa wurde der LockSpray™-Modus zur Analyten-unabhängigen Messung einer internen Kalibrierungsmasse genutzt. Hierbei diente 0,5 µg/ml Leucin-Enkephaline ([M+H]⁺ 556,2771 m/z sowie das doppelte C13 Isotopomer [M+H]⁺ 558,2828 m/z , Sigma-Aldrich, Deisenheim, Germany) als Kalibrierungsmasse in Acetonitril/H₂O_{dest} (50:50 v/v). Die kontinuierliche Injektion des Locksprays mit einer Flussrate von 30 µl/min erfolgte über eine externe Pumpe (515 HPLC Pump, Waters Corporation, Milford, USA). Dabei wurde für die Lockmasse eine durchschnittliche Intensität von 400 Counts/Scan im Centroid-Modus erreicht.

5.8.6 Analyse der GIPCs

Für die Durchführung der Analyse danke ich Herrn Dr. Philipp Ternes (Georg-August-Universität Göttingen) und Frau Dr. Isabelle Riezman (Université de Genève). Die Lipide wurden wie von Guan und Wenk (2006) beschrieben mit einem Gemisch aus Ethanol/Wasser/Diethylether/Pyridin/Ammoniumhydroxid (15:15:5:1:0,018) extrahiert. Die Glycerolipide wurden durch schwach alkalische Hydrolyse in einer Mischung aus Methanol/Wasser/1-Butanol/33% Methylamin in Ethanol (4:3:1:5) für eine Stunde bei 53°C entfernt. Die hydrolysierten Lipidextrakte wurden unter Stickstoff getrocknet, in wassergesättigtem 1-Butanol aufgenommen und durch Ausschütteln mit Wasser gereinigt. Die organische Phase wurde abgenommen, unter Stickstoff getrocknet und bis zur Messung bei -80°C gelagert.

Die Massenspektrometrie wurde mit einem Varian 320-MS-Triple-Quadrupol-Massenspektrometer gekoppelt an eine Varian 212-LC-HPLC-Einheit durchgeführt. Für die Flüssigkeitschromatographie wurde eine Phenomenex-Synergy-HPLC-Säule mit einem Gradienten Methanol/Acetonitril (60:40) gegen Wasser verwendet. Ein der Sphingobase entsprechendes Fragment von IPC wurde durch Multiple-Reaction-Monitoring im positiven Modus detektiert und durch Vergleich mit Sphingomyelin als internem Standard quantifiziert.

Literaturverzeichnis

1. **Chester, M.A.**, *IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) – Nomenclature of glycolipids. Recommendations 1997*. Eur J Biochem, 1998. **257**: p. 293-298.
2. **Lottspeich, F.E., JW**, *Bioanalytik, Zweite Auflage*. 2006.
3. **Singer, S.J.**, *A fluid lipid-globular protein mosaic model of membrane structure*. Ann N Y Acad Sci, 1972. **195**: p. 16-23.
4. **Singer, S.J. and G.L. Nicolson**, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 1972. **175**(23): p. 720-31.
5. **Engelman, D.M.**, *Membranes are more mosaic than fluid*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 578-80.
6. **Simons, K. and E. Ikonen**, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 569-72.
7. **Hirabayashi, Y. and S. Osuga**,
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/glycolipid/GLD01E.html>.
8. **Albrecht, S.**, *Funktionsanalyse von Glycosphingolipiden durch gentechnologische Manipulation ihres Metabolismus in Pilzen und Pflanzen*. . Dissertation, Department Biologie, Universität Hamburg, 2005.
9. **Kusumi, A. and Y. Sako**, *Cell surface organization by the membrane skeleton*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(4): p. 566-74.
10. **Morrow, M.R., et al.**, *Glycosphingolipid fatty acid arrangement in phospholipid bilayers: cholesterol effects*. Biophys J, 1995. **68**(1): p. 179-86.
11. **Borner, G.H., et al.**, *Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts*. Plant Physiol, 2005. **137**(1): p. 104-16.
12. **Mongrand, S., et al.**, *Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane*. J Biol Chem, 2004. **279**(35): p. 36277-86.
13. **Brown, D.A. and E. London**, *Functions of lipid rafts in biological membranes*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998. **14**: p. 111-36.
14. **Luo, C., et al.**, *The functional roles of lipid rafts in T cell activation, immune diseases and HIV infection and prevention*. Cell Mol Immunol, 2008. **5**(1): p. 1-7.
15. **Wachtler, V. and M.K. Balasubramanian**, *Yeast lipid rafts?--an emerging view*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(1): p. 1-4.
16. **Wachtler, V., S. Rajagopalan, and M.K. Balasubramanian**, *Sterol-rich plasma membrane domains in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 5): p. 867-74.
17. **Alvarez, F.J., L.M. Douglas, and J.B. Konopka**, *Sterol-rich plasma membrane domains in fungi*. Eukaryot Cell, 2007. **6**(5): p. 755-63.
18. **Wesolowska, O., et al.**, *Giant unilamellar vesicles - a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems*. Acta Biochim Pol, 2009. **56**(1): p. 33-9.
19. **Hanada, K.**, *Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1632**(1-3): p. 16-30.
20. **Mandon, E.C., et al.**, *Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver*. J Biol Chem, 1992. **267**(16): p. 11144-8.
21. **Kihara, A. and Y. Igarashi**, *FVT-1 is a mammalian 3-ketodihydrosphingosine reductase with an active site that faces the cytosolic side of the endoplasmic reticulum membrane*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 49243-50.
22. **Beeler, T., et al.**, *The Saccharomyces cerevisiae TSC10/YBR265w gene encoding 3-ketosphinganine reductase is identified in a screen for temperature-sensitive*

- suppressors of the Ca²⁺-sensitive *csg2Delta* mutant. *J Biol Chem*, 1998. **273**(46): p. 30688-94.
23. **Hirschberg, K., J. Rodger, and A.H. Futerman**, *The long-chain sphingoid base of sphingolipids is acylated at the cytosolic surface of the endoplasmic reticulum in rat liver*. *Biochem J*, 1993. **290 (Pt 3)**: p. 751-7.
 24. **Vallee, B. and H. Riezman**, *Lip1p: a novel subunit of acyl-CoA ceramide synthase*. *EMBO J*, 2005. **24**(4): p. 730-41.
 25. **Kageyama-Yahara, N. and H. Riezman**, *Transmembrane topology of ceramide synthase in yeast*. *Biochem J*, 2006. **398**(3): p. 585-93.
 26. **Guillas, I., et al.**, *C26-CoA-dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* is operated by *Lag1p* and *Lac1p**. *EMBO J*, 2001. **20**(11): p. 2655-65.
 27. **Schorling, S., et al.**, *Lag1p and Lac1p are essential for the Acyl-CoA-dependent ceramide synthase reaction in *Saccharomyces cerevisiae**. *Mol Biol Cell*, 2001. **12**(11): p. 3417-27.
 28. **Barz, W.P. and P. Walter**, *Two endoplasmic reticulum (ER) membrane proteins that facilitate ER-to-Golgi transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins*. *Mol Biol Cell*, 1999. **10**(4): p. 1043-59.
 29. **Ejsing, C.S., et al.**, *Collision-induced dissociation pathways of yeast sphingolipids and their molecular profiling in total lipid extracts: a study by quadrupole TOF and linear ion trap-orbitrap mass spectrometry*. *J Mass Spectrom*, 2006. **41**(3): p. 372-89.
 30. **Li, S., et al.**, *Distinct ceramide synthases regulate polarized growth in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans**. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(3): p. 1218-27.
 31. **Leverly, S.B., et al.**, *Disruption of the glucosylceramide biosynthetic pathway in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus* by inhibitors of UDP-Glc:ceramide glucosyltransferase strongly affects spore germination, cell cycle, and hyphal growth*. *FEBS Lett*, 2002. **525**(1-3): p. 59-64.
 32. **Bennion, B., et al.**, *Glycosphingolipids of the model fungus *Aspergillus nidulans*: characterization of GIPCs with oligo-alpha-mannose-type glycans*. *J Lipid Res*, 2003. **44**(11): p. 2073-88.
 33. **Venkataraman, K., et al.**, *Upstream of growth and differentiation factor 1 (*uog1*), a mammalian homolog of the yeast longevity assurance gene 1 (*LAG1*), regulates N-stearoyl-sphinganine (C18-(dihydro)ceramide) synthesis in a fumonisin B1-independent manner in mammalian cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(38): p. 35642-9.
 34. **Riebeling, C., et al.**, *Two mammalian longevity assurance gene (*LAG1*) family members, *trh1* and *trh4*, regulate dihydroceramide synthesis using different fatty acyl-CoA donors*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(44): p. 43452-9.
 35. **Mizutani, Y., A. Kihara, and Y. Igarashi**, *Mammalian *Lass6* and its related family members regulate synthesis of specific ceramides*. *Biochem J*, 2005. **390**(Pt 1): p. 263-71.
 36. **Brandwagt, B.F., et al.**, *A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins and fumonisin B1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(9): p. 4961-6.
 37. **Zheng, W., et al.**, *Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1758**(12): p. 1864-84.
 38. **Teufel, A., et al.**, *The longevity assurance homologue of yeast *lag1* (*Lass*) gene family (review)*. *Int J Mol Med*, 2009. **23**(2): p. 135-40.
 39. **Okino, N., et al.**, *The reverse activity of human acid ceramidase*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(32): p. 29948-53.
 40. **He, X., et al.**, *Purification and characterization of recombinant, human acid ceramidase. Catalytic reactions and interactions with acid sphingomyelinase*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(35): p. 32978-86.
 41. **van Helvoort, A., et al.**, *Conversion of diacylglycerol to phosphatidylcholine on the basolateral surface of epithelial (*Madin-Darby* canine kidney) cells. Evidence for the reverse action of a sphingomyelin synthase*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(3): p. 1763-9.

42. **Kudoh, T., M.A. Velkoff, and D.A. Wenger**, *Uptake and metabolism of radioactively labeled sphingomyelin in cultured skin fibroblasts from controls and patients with Niemann-Pick disease and other lysosomal storage diseases*. *Biochim Biophys Acta*, 1983. **754**(1): p. 82-92.
43. **Spence, M.W., J.T. Clarke, and H.W. Cook**, *Pathways of sphingomyelin metabolism in cultured fibroblasts from normal and sphingomyelin lipidosis subjects*. *J Biol Chem*, 1983. **258**(14): p. 8595-600.
44. **Tettamanti, G.**, *Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts*. *Glycoconj J*, 2004. **20**(5): p. 301-17.
45. **Boudker, O. and A.H. Futerman**, *Detection and characterization of ceramide-1-phosphate phosphatase activity in rat liver plasma membrane*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(29): p. 22150-5.
46. **Garton, S., et al.**, *The dihydroceramide desaturase is not essential for cell viability in Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett*, 2003. **538**(1-3): p. 192-6.
47. **Ternes, P., et al.**, *Identification of fungal sphingolipid C9-methyltransferases by phylogenetic profiling*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(9): p. 5582-92.
48. **Ternes, P., et al.**, *Identification and characterization of a sphingolipid delta 4-desaturase family*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(28): p. 25512-8.
49. **Michaelson, L.V., et al.**, *Functional characterization of a higher plant sphingolipid Delta4-desaturase: defining the role of sphingosine and sphingosine-1-phosphate in Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2009. **149**(1): p. 487-98.
50. **Warnecke, D. and E. Heinz**, *Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi*. *Cell Mol Life Sci*, 2003. **60**(5): p. 919-41.
51. **Causeret, C., et al.**, *Further characterization of rat dihydroceramide desaturase: tissue distribution, subcellular localization, and substrate specificity*. *Lipids*, 2000. **35**(10): p. 1117-25.
52. **Merrill, A.H., Jr. and E. Wang**, *Biosynthesis of long-chain (sphingoid) bases from serine by LM cells. Evidence for introduction of the 4-trans-double bond after de novo biosynthesis of N-acylsphinganine(s)*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(8): p. 3764-9.
53. **Rother, J., et al.**, *Biosynthesis of sphingolipids: dihydroceramide and not sphinganine is desaturated by cultured cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **189**(1): p. 14-20.
54. **Michel, C. and G. van Echten-Deckert**, *Conversion of dihydroceramide to ceramide occurs at the cytosolic face of the endoplasmic reticulum*. *FEBS Lett*, 1997. **416**(2): p. 153-5.
55. **Kok, J.W., et al.**, *Dihydroceramide biology. Structure-specific metabolism and intracellular localization*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(34): p. 21128-36.
56. **Shanklin, J., E. Whittle, and B.G. Fox**, *Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase*. *Biochemistry*, 1994. **33**(43): p. 12787-94.
57. **Sakaki, T., et al.**, *Sterol glycosides and cerebrosides accumulate in Pichia pastoris, Rhynchosporium secalis and other fungi under normal conditions or under heat shock and ethanol stress*. *Yeast*, 2001. **18**(8): p. 679-95.
58. **Batrakov, S.G., et al.**, *Unusual fatty acid composition of cerebrosides from the filamentous soil fungus Mortierella alpina*. *Chem Phys Lipids*, 2002. **117**(1-2): p. 45-51.
59. **Takakuwa, N., et al.**, *Isolation and characterization of the genes encoding delta(8)-sphingolipid desaturase from Saccharomyces kluyveri and Kluyveromyces lactis*. *Curr Microbiol*, 2002. **45**(6): p. 459-61.
60. **Sperling, P., U. Zahringer, and E. Heinz**, *A sphingolipid desaturase from higher plants. Identification of a new cytochrome b5 fusion protein*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(44): p. 28590-6.
61. **Sperling, P., et al.**, *Further characterization of Delta(8)-sphingolipid desaturases from higher plants*. *Biochem Soc Trans*, 2000. **28**(6): p. 638-41.

62. **Sperling, P., et al.**, *Functional identification of a delta8-sphingolipid desaturase from Borago officinalis*. Arch Biochem Biophys, 2001. **388**(2): p. 293-8.
63. **Sperling, P. and E. Heinz**, *Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1632**(1-3): p. 1-15.
64. **Haak, D., et al.**, *Hydroxylation of Saccharomyces cerevisiae ceramides requires Sur2p and Scs7p*. J Biol Chem, 1997. **272**(47): p. 29704-10.
65. **Sperling, P., H. Schmidt, and E. Heinz**, *A cytochrome-b5-containing fusion protein similar to plant acyl lipid desaturases*. Eur J Biochem, 1995. **232**(3): p. 798-805.
66. **Beckmann, C., et al.**, *Stereochemistry of a bifunctional dihydroceramide delta 4-desaturase/hydroxylase from Candida albicans; a key enzyme of sphingolipid metabolism*. Org Biomol Chem, 2003. **1**(14): p. 2448-54.
67. **Sperling, P., et al.**, *Functional characterization of sphingolipid C4-hydroxylase genes from Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett, 2001. **494**(1-2): p. 90-4.
68. **Dickson, R.C., et al.**, *Sphingolipids are potential heat stress signals in Saccharomyces*. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30196-200.
69. **Jenkins, G.M., et al.**, *Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1997. **272**(51): p. 32566-72.
70. **Tan, R.X. and J.H. Chen**, *The cerebrosides*. Nat Prod Rep, 2003. **20**(5): p. 509-34.
71. **Mitchell, A.G. and C.E. Martin**, *Fah1p, a Saccharomyces cerevisiae cytochrome b5 fusion protein, and its Arabidopsis thaliana homolog that lacks the cytochrome b5 domain both function in the alpha-hydroxylation of sphingolipid-associated very long chain fatty acids*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28281-8.
72. **Dunn, T.M., et al.**, *Synthesis of monohydroxylated inositolphosphorylceramide (IPC-C) in Saccharomyces cerevisiae requires Scs7p, a protein with both a cytochrome b5-like domain and a hydroxylase/desaturase domain*. Yeast, 1998. **14**(4): p. 311-21.
73. **Bromley, P.E., et al.**, *Complex sphingolipid synthesis in plants: characterization of inositolphosphorylceramide synthase activity in bean microsomes*. Arch Biochem Biophys, 2003. **417**(2): p. 219-26.
74. **Lynch, D.V.**, *Enzymes of sphingolipid metabolism in plants*. Methods Enzymol, 2000. **311**: p. 130-49.
75. **Zauner, S., et al.**, *Identification and functional characterization of the 2-hydroxy fatty N-acyl-Delta3(E)-desaturase from Fusarium graminearum*. J Biol Chem, 2008. **283**(52): p. 36734-42.
76. **Ichikawa, S., et al.**, *Expression cloning of a cDNA for human ceramide glucosyltransferase that catalyzes the first glycosylation step of glycosphingolipid synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12654.
77. **Campbell, J.A., et al.**, *A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities*. Biochem J, 1997. **326 (Pt 3)**: p. 929-39.
78. **Marks, D.L., et al.**, *Oligomerization and topology of the Golgi membrane protein glucosylceramide synthase*. J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 451-6.
79. **Futerman, A.H. and R.E. Pagano**, *Determination of the intracellular sites and topology of glucosylceramide synthesis in rat liver*. Biochem J, 1991. **280 (Pt 2)**: p. 295-302.
80. **Jeckel, D., et al.**, *Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions*. J Cell Biol, 1992. **117**(2): p. 259-67.
81. **Sud, M., et al.**, *LMSD: LIPID MAPS structure database*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(Database issue): p. D527-32.
82. **Daum, G., et al.**, *Systematic analysis of yeast strains with possible defects in lipid metabolism*. Yeast, 1999. **15**(7): p. 601-14.
83. **Nagiec, M.M., et al.**, *Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a mutant strain of Saccharomyces cerevisiae by the AUR1 gene*. J Biol Chem, 1997. **272**(15): p. 9809-17.
84. **Beeler, T.J., et al.**, *SUR1 (CSG1/BCL21), a gene necessary for growth of Saccharomyces cerevisiae in the presence of high Ca2+ concentrations at 37*

- degrees C, is required for mannosylation of inositolphosphorylceramide. *Mol Gen Genet*, 1997. **255**(6): p. 570-9.
85. **Uemura, S., et al.**, *Csg1p and newly identified Csh1p function in mannosylinositol phosphorylceramide synthesis by interacting with Csg2p*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(46): p. 45049-55.
86. **Beeler, T., et al.**, *A novel protein, CSG2p, is required for Ca²⁺ regulation in Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(10): p. 7279-84.
87. **Hsieh, T.C., et al.**, *Structure of a major glycoposphoceramide from tobacco leaves, PSL-I: 2-deoxy-2-acetamido-D-glucopyranosyl(alpha1 leads to 4)-D-glucuronopyranosyl(alpha1 leads to 2)myoinositol-1-O-phosphoceramide*. *Biochemistry*, 1978. **17**(17): p. 3575-81.
88. **Huitema, K., et al.**, *Identification of a family of animal sphingomyelin synthases*. *EMBO J*, 2004. **23**(1): p. 33-44.
89. **Godchaux, W. and E.R. Leadbetter**, *Sulfonolipids Are Localized in the Outer-Membrane of the Gliding Bacterium Cytophaga-Johnsonae*. *Archives of Microbiology*, 1988. **150**(1): p. 42-47.
90. **White, R.H.**, *Biosynthesis of the sulfonolipid 2-amino-3-hydroxy-15-methylhexadecane-1-sulfonic acid in the gliding bacterium Cytophaga johnsonae*. *J Bacteriol*, 1984. **159**(1): p. 42-6.
91. **Abbanat, D.R., et al.**, *Biosynthesis of a sulfonolipid in gliding bacteria*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985. **130**(2): p. 873-8.
92. **Holthuis, J.C., et al.**, *The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport*. *Physiol Rev*, 2001. **81**(4): p. 1689-723.
93. **Holthuis, J.C. and T.P. Levine**, *Lipid traffic: floppy drives and a superhighway*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(3): p. 209-20.
94. **van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson**, *Membrane lipids: where they are and how they behave*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(2): p. 112-24.
95. **Hanada, K., et al.**, *Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide*. *Nature*, 2003. **426**(6968): p. 803-9.
96. **Yamaji, T., et al.**, *Two sphingolipid transfer proteins, CERT and FAPP2: their roles in sphingolipid metabolism*. *IUBMB Life*, 2008. **60**(8): p. 511-8.
97. **Hanada, K., et al.**, *CERT-mediated trafficking of ceramide*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1791**(7): p. 684-91.
98. **Kumagai, K., et al.**, *CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(8): p. 6488-95.
99. **Young, W.W., Jr., M.S. Lutz, and W.A. Blackburn**, *Endogenous glycosphingolipids move to the cell surface at a rate consistent with bulk flow estimates*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(17): p. 12011-5.
100. **Loewen, C.J., A. Roy, and T.P. Levine**, *A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP*. *EMBO J*, 2003. **22**(9): p. 2025-35.
101. **van Meer, G., et al.**, *Transport of (glyco)sphingolipids in and between cellular membranes; multidrug transporters and lateral domains*. *Biosci Rep*, 1999. **19**(4): p. 327-33.
102. **Menon, A.K., W.E.r. Watkins, and S. Hrafnisdottir**, *Specific proteins are required to translocate phosphatidylcholine bidirectionally across the endoplasmic reticulum*. *Curr Biol*, 2000. **10**(5): p. 241-52.
103. **Kol, M.A., et al.**, *Phospholipid flop induced by transmembrane peptides in model membranes is modulated by lipid composition*. *Biochemistry*, 2003. **42**(1): p. 231-7.
104. **Helenius, J., et al.**, *Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein*. *Nature*, 2002. **415**(6870): p. 447-50.
105. **Pohl, A., P.F. Devaux, and A. Herrmann**, *Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1733**(1): p. 29-52.
106. **Kaminski, W.E., A. Piehler, and J.J. Wenzel**, *ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1762**(5): p. 510-24.

107. **Takahashi, K., et al.**, *ABC proteins: key molecules for lipid homeostasis*. *Med Mol Morphol*, 2005. **38**(1): p. 2-12.
108. **Zhou, Q., et al.**, *Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(29): p. 18240-4.
109. **Zwaal, R.F., P. Comfurius, and E.M. Bevers**, *Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells*. *Cell Mol Life Sci*, 2005. **62**(9): p. 971-88.
110. **van Meer, G.**, *Cellular lipidomics*. *EMBO J*, 2005. **24**(18): p. 3159-65.
111. **Wenk, M.R.**, *The emerging field of lipidomics*. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. **4**(7): p. 594-610.
112. **Pollack, J.D., D.S. Clark, and N.L. Somerson**, *Four-directional-development thin-layer chromatography of lipids using trimethyl borate*. *J Lipid Res*, 1971. **12**(5): p. 563-9.
113. **Pollet, S., et al.**, *Microanalysis of brain lipids: multiple two-dimensional thin-layer chromatography*. *J Lipid Res*, 1978. **19**(7): p. 916-21.
114. **Urban, P.F., et al.**, *Brain and retinal ganglioside composition from different species determined by TLC and HPTLC*. *Adv Exp Med Biol*, 1980. **125**: p. 149-57.
115. **Jungalwala, F.B., et al.**, *Analysis of sphingoid bases by reversed-phase high performance liquid chromatography*. *J Lipid Res*, 1983. **24**(10): p. 1380-8.
116. **Nishimura, K. and A. Nakamura**, *High performance liquid chromatographic analysis of long chain bases in intestinal glycolipids of adult and embryonic Japanese quails*. *J Biochem*, 1985. **98**(5): p. 1247-54.
117. **Lester, R.L. and R.C. Dickson**, *High-performance liquid chromatography analysis of molecular species of sphingolipid-related long chain bases and long chain base phosphates in *Saccharomyces cerevisiae* after derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate*. *Anal Biochem*, 2001. **298**(2): p. 283-92.
118. **Smith, M., P. Monchamp, and F.B. Jungalwala**, *Separation of molecular species of sphingomyelin and ceramide by argentation and reversed-phase HPLC*. *J Lipid Res*, 1981. **22**(4): p. 714-9.
119. **Suzuki, A., S. Handa, and T. Yamakawa**, *Separation of molecular species of glucosylceramide by high performance liquid chromatography of their benzoyl derivatives*. *J Biochem*, 1976. **80**(5): p. 1181-3.
120. **Yamazaki, T., et al.**, *Consecutive analysis of sphingoglycolipids on the basis of sugar and ceramide moieties by high performance liquid chromatography*. *J Biochem*, 1979. **86**(3): p. 803-9.
121. **McCluer, E.H. and J.E. Evans**, *Quantitative analysis of brain galactosylceramides by high performance liquid chromatography of their perbenzoyl derivatives*. *J Lipid Res*, 1976. **17**(4): p. 412-8.
122. **McCluer, R.H. and J.E. Evans**, *Preparation and analysis of benzoylated cerebroside*. *J Lipid Res*, 1973. **14**(6): p. 611-7.
123. **Lipsky, N.G. and R.E. Pagano**, *Sphingolipid metabolism in cultured fibroblasts: microscopic and biochemical studies employing a fluorescent ceramide analogue*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. **80**(9): p. 2608-12.
124. **Martin, O.C. and R.E. Pagano**, *Normal- and reverse-phase HPLC separations of fluorescent (NBD) lipids*. *Anal Biochem*, 1986. **159**(1): p. 101-8.
125. **Merrill, A.H., Jr., et al.**, *Sphingolipidomics: high-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *Methods*, 2005. **36**(2): p. 207-24.
126. **Han, X. and R.W. Gross**, *Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics*. *J Lipid Res*, 2003. **44**(6): p. 1071-9.
127. **Han, X., et al.**, *Toward fingerprinting cellular lipidomes directly from biological samples by two-dimensional electrospray ionization mass spectrometry*. *Anal Biochem*, 2004. **330**(2): p. 317-31.
128. **Ejsing, C.S., et al.**, *Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(7): p. 2136-41.

129. **Ekroos, K., et al.**, *Quantitative profiling of phospholipids by multiple precursor ion scanning on a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer*. *Anal Chem*, 2002. **74**(5): p. 941-9.
130. **McFarland, M.A., et al.**, *Structural characterization of the GM1 ganglioside by infrared multiphoton dissociation, electron capture dissociation, and electron detachment dissociation electrospray ionization FT-ICR MS/MS*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005. **16**(5): p. 752-62.
131. **Ivleva, V.B., et al.**, *Coupling thin-layer chromatography with vibrational cooling matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry for the analysis of ganglioside mixtures*. *Anal Chem*, 2004. **76**(21): p. 6484-91.
132. **Woods, A.S. and S.N. Jackson**, *Brain tissue lipidomics: direct probing using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. *AAPS J*, 2006. **8**(2): p. E391-5.
133. **Malmberg, P., et al.**, *Localization of lipids in the aortic wall with imaging TOF-SIMS*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1771**(2): p. 185-95.
134. **Hannun, Y.A. and L.M. Obeid**, *Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(2): p. 139-50.
135. **Smith, E.R., et al.**, *Effects of sphingosine and other sphingolipids on protein kinase C*. *Methods Enzymol*, 2000. **312**: p. 361-373.
136. **Jenkins, G.M.**, *The emerging role for sphingolipids in the eukaryotic heat shock response*. *Cell Mol Life Sci*, 2003. **60**(4): p. 701-10.
137. **Obeid, L.M., et al.**, *Programmed cell death induced by ceramide*. *Science*, 1993. **259**: p. 1769-1771.
138. **Venable, M.E., et al.**, *Role of ceramide in cellular senescence*. *J Biol Chem*, 1995. **270**: p. 30701-30708.
139. **Sprong, H., et al.**, *Glycosphingolipids are required for sorting melanosomal proteins in the Golgi complex*. *J Cell Biol*, 2001. **155**: p. 369-380.
140. **van Meer, G., J. Wolthoorn, and S. Degroote**, *The fate and function of glycosphingolipid glucosylceramide*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2003. **358**(1433): p. 869-73.
141. **Heung, L.J., et al.**, *The role and mechanism of diacylglycerol-protein kinase C1 signaling in melanogenesis by *Cryptococcus neoformans**. *J Biol Chem*, 2005. **280**: p. 28547-28555.
142. **Rawat, S.S., B.T. Johnson, and A. Puri**, *Sphingolipids: modulators of HIV-1 infection and pathogenesis*. *Biosci Rep*, 2005. **25**: p. 329-343.
143. **Summer, S.A. and D.H. Nelson**, *A role for sphingolipids in producing the common features of type 2 diabetes, metabolic syndrome X, and Cushing's syndrome*. *Diabetes*, 2005. **54**: p. 591-602.
144. **Unger, R.H. and L. Orci**, *Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1585**: p. 202-212.
145. **Modrak, D.E., D.V. Gold, and D.M. Goldenberg**, *Sphingolipid targets in cancer therapy*. *Mol Cancer Ther*, 2006. **5**: p. 200-208.
146. **Ogretman, B. and Y.A. Hannun**, *Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment*. *Cancer*, 2004. **4**: p. 604-616.
147. **Han, X.**, *Lipid alterations in the earliest clinically recognizable stage of Alzheimer's disease: Implication of the role of lipids in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. *Curr Alzheimer Res*, 2005. **2**: p. 65-77.
148. **Park, T.S., et al.**, *Modulation of lipoprotein metabolism by inhibition of sphingomyelin synthesis in *ApoE* knockout mice*. *Atherosclerosis*, 2006. **online, nachschlagen**.
149. **Ginzburg, L., Y. Kacher, and A.H. Futerman**, *The pathogenesis of glycosphingolipid storage disorders*. *Semin Cell Dev Biol*, 2004. **15**: p. 417-431.
150. **Dunn, T.M., et al.**, *A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana**. *Ann Bot (Lond)*, 2004. **93**(5): p. 483-97.
151. **Sperling, P., D. Warnecke, and E. Heinz**, *Plant sphingolipids*. In: *Lipid Metabolism and Membrane Biogenesis*, Daum G (ed) Springer Verlag Berlin Heidelberg, . *Topics Curr Genet* 2004: p. 6:337-381.

152. **Dietrich, C.R., et al.**, *Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability.* Plant J, 2008. **54**(2): p. 284-98.
153. **Gechev, T.S., I.Z. Gadjev, and J. Hille**, *An extensive microarray analysis of AAL-toxin-induced cell death in Arabidopsis thaliana brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants.* Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(10): p. 1185-97.
154. **Worrall, D., C.K. Ng, and A.M. Hetherington**, *Sphingolipids, new players in plant signaling.* Trends Plant Sci, 2003. **8**(7): p. 317-20.
155. **Lynch, D.V. and T.M. Dunn**, *An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function.* New Phytologist, 2004. **161**: p. 677.
156. **Ng, C.K., et al.**, *Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate.* Nature, 2001. **410**(6828): p. 596-9.
157. **Michaelson, L.V., et al.**, *Functional characterisation of a higher plant sphingolipid $\Delta 4$ -desaturase: defining the role of sphingosine and sphingosine-1-phosphate in Arabidopsis thaliana.* Plant Physiology, 2008. DOI:10.1104/pp.108.129411.
158. **da Silva, A.L., et al.**, *A possible role of sphingolipids in the aluminium resistance of yeast and maize.* J Plant Physiol, 2006. **163**(1): p. 26-38.
159. **Ryan, P.R., et al.**, *A higher plant delta8 sphingolipid desaturase with a preference for (Z)-isomer formation confers aluminum tolerance to yeast and plants.* Plant Physiol, 2007. **144**(4): p. 1968-77.
160. **Willemsen, V., et al.**, *Cell polarity and PIN protein positioning in Arabidopsis require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function.* Plant Cell, 2003. **15**(3): p. 612-25.
161. **Baud, S., et al.**, *gurke and pasticchino3 mutants affected in embryo development are impaired in acetyl-CoA carboxylase.* EMBO Rep, 2004. **5**(5): p. 515-20.
162. **Bach, L., et al.**, *The very-long-chain hydroxy fatty acyl-CoA dehydratase PASTICCINO2 is essential and limiting for plant development.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(38): p. 14727-31.
163. **Monier, A., et al.**, *Horizontal gene transfer of an entire metabolic pathway between a eukaryotic alga and its DNA virus.* Genome Res, 2009. **19**(8): p. 1441-9.
164. **Vardi, A., et al.**, *Viral glycosphingolipids induce lytic infection and cell death in marine phytoplankton.* Science, 2009. **326**(5954): p. 861-5.
165. **Cowart, L.A. and L.M. Obeid**, *Yeast sphingolipids: recent developments in understanding biosynthesis, regulation, and function.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(3): p. 421-31.
166. **Dickson, R.C.**, *Thematic review series: sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast.* J Lipid Res, 2008. **49**(5): p. 909-21.
167. **Dickson, R.C. and R.L. Lester**, *Sphingolipid functions in Saccharomyces cerevisiae.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1583**(1): p. 13-25.
168. **Rowley, A., et al.**, *Heat shock-mediated cell cycle blockage and G1 cyclin expression in the yeast Saccharomyces cerevisiae.* Mol Cell Biol, 1993. **13**(2): p. 1034-41.
169. **Wells, G.B., R.C. Dickson, and R.L. Lester**, *Heat-induced elevation of ceramide in Saccharomyces cerevisiae via de novo synthesis.* J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7235-43.
170. **Jenkins, G.M. and Y.A. Hannun**, *Role for de novo sphingoid base biosynthesis in the heat-induced transient cell cycle arrest of Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 8574-81.
171. **Chung, N., et al.**, *Phytosphingosine as a specific inhibitor of growth and nutrient import in Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem, 2001. **276**(38): p. 35614-21.
172. **Li, X. and M. Cai**, *Recovery of the yeast cell cycle from heat shock-induced G(1) arrest involves a positive regulation of G(1) cyclin expression by the S phase cyclin Clb5.* J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 24220-31.
173. **Cheng, J., et al.**, *Cell cycle progression and cell polarity require sphingolipid biosynthesis in Aspergillus nidulans.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(18): p. 6198-209.

174. **Cerantola, V., et al.**, *Yeast sphingolipids do not need to contain very long chain fatty acids*. *Biochem J*, 2007. **401**(1): p. 205-16.
175. **Hillig, I.**, *Funktionale Charakterisierung der Glucosylceramid-Synthase aus Pflanzen und dem phytopathogenen Pilz Ustilago maydis*. Dissertation, Department Biologie, Universität Hamburg, 2005.
176. **Rittershaus, P.C., et al.**, *Glucosylceramide synthase is an essential regulator of pathogenicity of Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(6): p. 1651-1659.
177. **Luberto, C., et al.**, *Roles for inositol-phosphoryl ceramide synthase 1 (IPC1) in pathogenesis of C. neoformans*. *Genes Dev*, 2001. **15**(2): p. 201-12.
178. **Ramamoorthy, V., et al.**, *Glucosylceramide synthase is essential for alfalfa defensin-mediated growth inhibition but not for pathogenicity of Fusarium graminearum*. *Mol Microbiol*, 2007. **66**(3): p. 771-86.
179. **Matsunaga, T. and A. Rahman**, *What brought the adaptive immune system to vertebrates?--The jaw hypothesis and the seahorse*. *Immunol Rev*, 1998. **166**: p. 177-86.
180. **Boman, H.G.**, *Peptide antibiotics and their role in innate immunity*. *Annu Rev Immunol*, 1995. **13**: p. 61-92.
181. **Thomma, B.P., B.P. Cammue, and K. Thevissen**, *Plant defensins*. *Planta*, 2002. **216**(2): p. 193-202.
182. **Lehrer, R.I., et al.**, *Interaction of human defensins with Escherichia coli. Mechanism of bactericidal activity*. *J Clin Invest*, 1989. **84**(2): p. 553-61.
183. **Sawyer, J.G., N.L. Martin, and R.E. Hancock**, *Interaction of macrophage cationic proteins with the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 1988. **56**(3): p. 693-8.
184. **Thevissen, K., et al.**, *A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of Saccharomyces cerevisiae to an antifungal plant defensin from dahlia (Dahlia merckii)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(17): p. 9531-6.
185. **Thevissen, K., et al.**, *DmAMP1, an antifungal plant defensin from dahlia (Dahlia merckii), interacts with sphingolipids from Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*, 2003. **226**(1): p. 169-73.
186. **Thevissen, K., F.R. Terras, and W.F. Broekaert**, *Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth*. *Appl Environ Microbiol*, 1999. **65**(12): p. 5451-8.
187. **Thevissen, K., et al.**, *Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(25): p. 15018-25.
188. **Thevissen, K., et al.**, *Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(6): p. 3900-5.
189. **Theis, T., et al.**, *The antifungal protein from Aspergillus giganteus causes membrane permeabilization*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. **47**(2): p. 588-93.
190. **Ge, Y., et al.**, *In vitro antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. **43**(4): p. 782-8.
191. **Zhang, L., et al.**, *Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(7): p. 2921-7.
192. **Steinberg, D.A., et al.**, *Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997. **41**(8): p. 1738-42.
193. **De Schutter, K., et al.**, *Genome sequence of the recombinant protein production host Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol*, 2009. **27**(6): p. 561-6.
194. **Ternes, P., et al.**, *Pichia pastoris Bar1p Produces Ceramides Destined for Glucosylceramide Biosynthesis*. Posterbeitrag, 2009. **Yeast Lipids 2009, Berlin**.
195. **Smith, S.W. and R.L. Lester**, *Inositol phosphorylceramide, a novel substance and the chief member of a major group of yeast sphingolipids containing a single inositol phosphate*. *J Biol Chem*, 1974. **249**(11): p. 3395-405.
196. **Becker, G.W. and R.L. Lester**, *Biosynthesis of phosphoinositol-containing sphingolipids from phosphatidylinositol by a membrane preparation from Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1980. **142**(3): p. 747-54.

197. **Steiner, S., et al.**, *Isolation and partial characterization of a major inositol-containing lipid in baker's yeast, mannosyl-diinositol, diphosphoryl-ceramide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1969. **64**(3): p. 1042-8.
198. **Markham, J.E., et al.**, *Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves*. J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 22684-94.
199. **Futerman, A.H.**, *Intracellular trafficking of sphingolipids: relationship to biosynthesis*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(12): p. 1885-92.
200. **Pewzner-Jung, Y., S. Ben-Dor, and A.H. Futerman**, *When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis*. J Biol Chem, 2006. **281**(35): p. 25001-5.
201. **Hanada, K. and M. Fukasawa**, *[Biosynthesis and intracellular trafficking of sphingolipids in mammalian cells]*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 1999. **44**(8 Suppl): p. 1200-6.
202. **Kudo, N., et al.**, *Structural basis for specific lipid recognition by CERT responsible for nonvesicular trafficking of ceramide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(2): p. 488-93.
203. **Olkkonen, V.M., et al.**, *The OSBP-related proteins (ORPs): global sterol sensors for co-ordination of cellular lipid metabolism, membrane trafficking and signalling processes?* Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 3): p. 389-91.
204. **Yan, D. and V.M. Olkkonen**, *Characteristics of oxysterol binding proteins*. Int Rev Cytol, 2008. **265**: p. 253-85.
205. **Mattjus, P.**, *Glycolipid transfer proteins and membrane interaction*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(1): p. 267-72.
206. **Neumann, S. and G. van Meer**, *Sphingolipid management by an orchestra of lipid transfer proteins*. Biol Chem, 2008. **389**(11): p. 1349-60.
207. **Schneider R, D.G.**, *Extraction of yeast lipids*. Methods in molecular biology, 2006. **313**(41-45).
208. **Coss, G.**, *Pharmaceutical Materials Processing Using A High Pressure Disrupter*. Biochemical Engineering Research Group, University of Wales, Swansea, 1997. **Report 6**.
209. **Toke, D.A. and C.E. Martin**, *Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1996. **271**(31): p. 18413-22.
210. **Oh, C.S., et al.**, *ELO2 and ELO3, homologues of the Saccharomyces cerevisiae ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation*. J Biol Chem, 1997. **272**(28): p. 17376-84.
211. **Rizzieri, K.E. and Y.A. Hannun**, *Sphingolipid metabolism, apoptosis and resistance to cytotoxic agents: can we interfere?* Drug Resist Updat, 1998. **1**(6): p. 359-76.
212. **Futerman, A.H. and Y.A. Hannun**, *The complex life of simple sphingolipids*. EMBO Rep, 2004. **5**(8): p. 777-82.
213. **Funato, K., B. Vallee, and H. Riezman**, *Biosynthesis and trafficking of sphingolipids in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry, 2002. **41**(51): p. 15105-14.
214. **Takakuwa, N., M. Ohnishi, and Y. Oda**, *Significance of the KILAC1 gene in glucosylceramide production by Kluyveromyces lactis*. FEMS Yeast Res, 2008. **8**(6): p. 839-45.
215. **Gaigg, B., A. Toulmay, and R. Schneider**, *Very long-chain fatty acid-containing lipids rather than sphingolipids per se are required for raft association and stable surface transport of newly synthesized plasma membrane ATPase in yeast*. J Biol Chem, 2006. **281**(45): p. 34135-45.
216. **Aoki, K., et al.**, *Newly discovered neutral glycosphingolipids in aureobasidin A-resistant zygomycetes: Identification of a novel family of Gala-series glycolipids with core Gal alpha 1-6Gal beta 1-6Gal beta sequences*. J Biol Chem, 2004. **279**(31): p. 32028-34.
217. **Li, S., et al.**, *basA regulates cell wall organization and asexual/sexual sporulation ratio in Aspergillus nidulans*. Genetics, 2007. **176**(1): p. 243-53.

218. **Thevissen, K., et al.**, *Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides*. J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 3900-5.
219. **Zaeuner, S., et al.**, *Identification and functional characterization of the 2-hydroxy fatty N-acyl-Delta3(E)-desaturase from Fusarium graminearum*. J Biol Chem, 2008. **283**(52): p. 36734-42.
220. **Bohling, A., et al.**, *Lipid-specific membrane activity of human beta-defensin-3*. Biochemistry, 2006. **45**(17): p. 5663-70.
221. **Wiese, A., T. Gutsmann, and U. Seydel**, *Towards antibacterial strategies: studies on the mechanisms of interaction between antibacterial peptides and model membranes*. J Endotoxin Res, 2003. **9**(2): p. 67-84.
222. **Wiedemann, I., et al.**, *The mode of action of the lantibiotic lacticin 3147--a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II*. Mol Microbiol, 2006. **61**(2): p. 285-96.
223. **Bierbaum, G. and H.G. Sahl**, *Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering*. Curr Pharm Biotechnol, 2009. **10**(1): p. 2-18.
224. **Pieters, R.J., C.J. Arnusch, and E. Breukink**, *Membrane permeabilization by multivalent anti-microbial peptides*. Protein Pept Lett, 2009. **16**(7): p. 736-42.
225. **Carvalho Ade, O. and V.M. Gomes**, *Plant defensins--prospects for the biological functions and biotechnological properties*. Peptides, 2009. **30**(5): p. 1007-20.
226. **Marsh, D.**, *Structural and thermodynamic determinants of chain-melting transition temperatures for phospholipid and glycolipids membranes*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1798**(1): p. 40-51.
227. **Kozak, M.**, *At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells*. J Mol Biol, 1987. **196**(4): p. 947-50.
228. **Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama**, *High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids*. Gene, 1990. **96**(1): p. 23-8.
229. **Sambrook and Russell**, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition*. 2001.
230. **McLachlan, A. and M.G. Riggs**, *A simplified screening procedure for large numbers of plasmid minipreparations*. Biotechniques 1986. **4**: p. 310-313.

Anhang

In der beiliegenden CD sind folgende Dateien enthalten:

- **Primerliste**
(Sequenzen aller verwendeten Primer in Paaren geordnet, kurze Beschreibung der Art und Länge der Amplifikate und Klonierungsschnittstellen)
- **Sequenzen**
(Sequenzen aller Vektoren, der erzeugten Plasmide (ohne Zwischenklonierungen) und der Primer als .cm5 (Clone-manager) und .txt-Dateien)
- **Massentabelle der Ceramide und Glucosylceramide**
(Auflistung und Zustandekommen von allen untersuchten Massen der Ceramide und GlcCer)
- **Massen der untersuchten Zellpellets**
(Feuchtgewichte der Pellets aller verwendeten Anzuchten, aus welchen die Proben für die LC-TOF-Analyse gewonnen wurden)
- **Messwerte der Ceramide**
(Detaillierte Auflistung der Messwerte aller Ceramidspezies, die in den Proben nachgewiesen wurden)
- **Messwerte der Glucosylceramide**
(Detaillierte Auflistung der Messwerte aller GlcCer-spezies, die in den Proben nachgewiesen wurden)

Publikationsliste

Konferenzbeiträge

- **T. Wobbe**, S. Zäuner, S. Albrecht, P. Ternes, V. Meyer, K. Thevissen, U. Zähringer, E. Heinz, P. Sperling und D. Warnecke
Fungal glycosphingolipids interact with antifungal peptides
Botanikertagung 2007 Hamburg– **Posterpräsentation**
- **T. Wobbe**, S. Zäuner, S. Albrecht, P. Ternes, V. Meyer, K. Thevissen, U. Zähringer, E. Heinz, P. Sperling und D. Warnecke
Fungal glycosphingolipids interact with antifungal peptides
Gordon Research Conference on Glycolipid & Sphingolipid Biology 2008, in Lucca, Italien – **Posterpräsentation**
- **T. Wobbe**, S. Albrecht, P. Ternes, U. Zähringer, E. Heinz, P. Sperling and D. Warnecke
Dissecting two pathways of glycosphingolipid biosynthesis in fungi
Gordon Research Conference on Glycolipid & Sphingolipid Biology 2008, in Lucca, Italien – **Posterpräsentation**
- **T. Wobbe**, S. Zäuner, S. Albrecht, P. Ternes, V. Meyer, K. Thevissen, U. Zähringer, E. Heinz, P. Sperling und D. Warnecke
Fungal glycosphingolipids interact with antifungal peptides
Yeast Lipids conference, Berlin 2009 – **Posterpräsentation**
- **T. Wobbe**, S. Albrecht, P. Ternes, U. Zähringer, E. Heinz, P. Sperling and D. Warnecke
Dissecting two pathways of glycosphingolipid biosynthesis in fungi
Yeast Lipids conference, Berlin 2009 – **Posterpräsentation**
- **T. Wobbe**, P. Ternes, D. Warnecke, E. Heinz
Who makes the lipids that raft the plasma membrane?
Kolloquium Biozentrum Klein Flottbek – **Vortrag**

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Promotion unterstützt haben. Mein Dank gilt in erster Linie Herrn PD. Dr. Dirk Warnecke für die interessante Themenstellung, die vielen, wertvollen Diskussionen und die intensive Betreuung. Bei Herrn Prof. Dr. Ivo Feussner (Universität Göttingen) bedanke ich mich für die Anfertigung des Zweitgutachtens und die Kooperation bei der Gewinnung wichtiger analytischer Daten.

Des Weiteren danke ich auch allen anderen Kooperationspartnern für die viele Mühe und sorgfältige Arbeit. Insbesondere Herrn Dr. Philipp Ternes (Universität Göttingen) gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Auswertung und Interpretation der Daten und die vielen aufschlussreichen Diskussionen und Ideen. Auch bei Frau Dr. Kirstin Feussner (Universität Göttingen) möchte ich mich besonders für die Entwicklung einer Methode, der Aufnahme und Hilfe bei der Auswertung und Interpretation der UPLC-TOF-Spektren bedanken. Außerdem danke ich Frau Dipl. Biol. Marnie Schwarz (Universität Göttingen), die in ihrer Diplomarbeit die Enzymatik der Ceramidsynthese untersucht und somit wichtige Erkenntnisse zu dieser Arbeit beigesteuert hat.

Für die Aufnahme vieler GC- und GC-MS-Spektren danke ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Zähringer, Herrn Hermann Moll, Frau Dr. Sandra Albrecht und Frau Ursula Schombel vom Forschungszentrum Borstel. Herrn Dr. Stephan Franke (Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg) danke ich für die Durchführung der HPLC/MS- und ESI/MS/MS-Analyse und die Interpretation der Daten. Mein Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. Howard Riezman (Universität Genf, Schweiz) für die Aufnahme von LC-MS/MS Spektren der widerspenstigen GIPCs und Herrn Dr. Anthony Futerman (Weizmann Institute of science, Rehovot, Israel) für die Bereitstellung der humanen Ceramidsynthese-Gene.

Mein besonderer Dank gilt auch allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Böttger/Warnecke für die gute und kameradschaftliche Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich Frau Wiebke Hellmeyer, Frau Dr. Simone Zäuner und Frau Dipl. Biol. Sandra Grille erwähnen, die mir stets im Laboralltag zur Seite standen. Auch Herrn Prof. Dr. Ernst Heinz möchte ich für die vielen Diskussionen und Ideen sowie die die Hilfe bei der Erstellung diverser Arbeiten und Anträge danken.

Nicht zuletzt möchte ich meinen besonderen Dank meiner Familie und allen meinen Freunden aussprechen, die mir in den letzten Jahren den Rücken gestärkt und mir geholfen haben alle Durststrecken zu überstehen.