



Institut für Biotechnologie

**Untersuchungen zur Bedeutung verschiedener
Enzyme des Glycin-Stoffwechsels
für die Riboflavin-Bildung in *Ashbya gossypii***

Christina Schlüpen

Institut für Biotechnologie

**Untersuchungen zur Bedeutung verschiedener
Enzyme des Glycin-Stoffwechsels
für die Riboflavin-Bildung in *Ashbya gossypii***

Christina Schlüpen

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4093

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-4093

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2003)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Abstract

The filamentous fungus *Ashbya gossypii* is an important riboflavin (vitamin B₂) overproducer used in industrial scale. Productivity of the fungus is limited by glycine, a precursor of the *de novo* purine biosynthesis. Supplementation of the medium with glycine leads to an increase in riboflavin production.

The first objective of this thesis was the characterization of the two serine hydroxymethyltransferase (SHMT) isoenzymes, which are involved in glycine metabolism, in order to improve the glycine supply for the riboflavin production. For a subcellular localization of both SHMT isoenzymes mutants transformed with HA-fusions were used. By immunodetection SHMT1 was localized in the mitochondria and SHMT2 in the cytosol. Disruption of *SHM2* resulted in a significant increase of riboflavin overproduction. The SHMT specific activity decreased about 85 % from 3 mU/mg protein to 0.5 mU/mg protein. After additional inactivation of *SHM1* a remaining SHMT activity of 3 % was detected, which was shown to be a side activity of threonine aldolase. The enhanced riboflavin overproduction of *SHM2* disruptants was explained by a reduced flux from glycine to serine thus leading to an elevated pool of the riboflavin precursor glycine. Evidence was obtained by ¹³C-labeling experiments. When ¹³C₁-threonine was fed, more than 50 % of the label was detected in C₁ of glycine, resulting from threonine aldolase activity. More than 30 % labeling determined in C₁ of serine could be explained by a serine synthesis *via* SHMT. Knockout of *SHM1* had no detectable effect on serine labeling but disruption of *SHM2* led to a decrease in serine (2 – 5 %) and an increase in glycine (59 – 67 %) labeling in position C₁. These data indicate the modified carbon flux. Disruption of *SHM2* led to a reduced growth rate in minimal medium. Supplementation with 1 mM adenine restored wild-type growth, which showed that growth of *AgΔSHM2* is one-carbon limited.

Since overexpression of the threonine aldolase gene had been shown to replace glycine by threonine limitation of riboflavin synthesis, the second objective of this thesis was a deregulation of threonine biosynthesis in *A. gossypii*. By heterologous complementation of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant showing threonine auxotrophy the *AgHOM3* gene encoding a monofunctional aspartate kinase was rescued. In crude extracts of *A. gossypii* an aspartate kinase specific activity of 5 mU/mg protein was detected. A mutant disrupted in *HOM3* lost this enzyme activity and showed homoserine auxotrophy. The riboflavin production of *AgΔHOM3* was significantly increased, when the growth was homoserine limited. Supplementation of the medium with homoserine restored wild-type growth but at the same time reduced production of riboflavin below wild-type level. Presumably an enhanced induction of the *RIB* genes was the reason for the increased riboflavin production of *AgΔHOM3*.

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG	1
1. <i>Ashbya gossypii</i> – Bedeutung in der Natur und in der Landwirtschaft	1
2. Biotechnische Riboflavin-Produktion	2
3. Riboflavin-Biosynthese	4
4. Bedeutung der Glycin-Biosynthese für die Riboflavin-Produktion in <i>A.gossypii</i> ...	6
5. Mögliche Wege der Glycin-Biosynthese	7
6. Bedeutung der Threonin-Biosynthese für die Riboflavin-Produktion	12
7. Aspartatkinase – das Schlüsselenzym des Aspartat-Wegs	13
8. Ziel der Arbeit	15
II. MATERIAL UND METHODEN	16
1. Chemikalien	16
2. Verwendete Stämme und Plasmide	17
3. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	19
4. Molekularbiologische Methoden	21
4.1 Präparation und Reinigung von DNA	21
4.2 Analyse, Rekombination und Modifikation von DNA	23
4.3 Transformationstechniken	24
4.4 RT-PCR	26
4.5 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR	28
4.6 Southern-Blot-Analyse	28
5. Biochemische und zellbiologische Methoden	31
5.1 Herstellung von zellfreien Rohextrakten aus <i>A. gossypii</i>	31
5.2 Bestimmung von Enzymaktivitäten	31
5.3 Proteinbestimmung	34
5.4 Lokalisierung von Enzymen	34
5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
5.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western-Blot)	36
5.7 Quantitative Bestimmung von Biotrockenmasse und Riboflavin	37
5.8 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren	37
5.9 ¹³ C ₁ -Markierungsexperimente	38
5.10 Sporenisolierung aus <i>A. gossypii</i>	38
III. ERGEBNISSE	39
1. Untersuchungen zur Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT) von <i>A.gossypii</i> ...	39
1.1 Sequenzanalyse der Gene <i>SHM1</i> und <i>SHM2</i> von <i>A. gossypii</i>	39
1.2 Subzelluläre Lokalisation von SHMT1 und SHMT2 in <i>A. gossypii</i>	42
1.3 Funktion der SHMTs in <i>A. gossypii</i>	46
1.4 Einfluss der <i>SHM2</i> -Disruption auf die Glycin-Antimetabolit-Resistenz	60

2. Isolierung eines Gens der Threonin-Biosynthese von <i>A. gossypii</i>	64
2.1 Komplementation einer Threonin-auxotrophen <i>S. cerevisiae</i> -Mutante	64
2.2 Sequenz des <i>AgHOM3</i> -Gens	66
2.3 Funktion des <i>AgHOM3</i> -Proteins	68
2.4 Bedeutung der Aspartatkinase für das Wachstum	71
2.5 Bedeutung der Aspartatkinase für die Riboflavin-Überproduktion	72
IV. DISKUSSION	75
1. Bedeutung der SHMT-Isoenzyme im Glycin-Stoffwechsel von <i>A. gossypii</i>	75
2. Zusammenhang zwischen SHMT2 und der Resistenz gegen den Glycin-Antimetaboliten AMPS	86
3. Aspartatkinase als Schlüsselenzym der Threonin-Biosynthese und die Funktion für die Riboflavin-Produktion in <i>A. gossypii</i>	87
V. ZUSAMMENFASSUNG	93
VI. LITERATUR	94

Abkürzungen

<i>A. gossypii</i> / Ag	<i>Ashbya gossypii</i>
Abb.	Abbildung
AGAT	Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase
Amp ^R	Ampicillin-Resistenzkassette
ATTC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	(base pairs) Basenpaare
BSA	(bovine serum albumin) Rinder-Serum-Albumin
C	Kohlenstoff
cDNA	(copy DNA) mit reverser Transkriptase aus mRNA hergestellte DNA
(d)ATP	(Desoxy)Adenosin-5'-triphosphat
(d)CTP	(Desoxy)Cytidin-5'-triphosphat
(d)GTP	(Desoxy)Guanosin-5'-triphosphat
(d)NTP	(Desoxy)nukleosid-5'-triphosphat
(d)TTP	(Desoxy)Thymidin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DIG	Digoxigenin
DNA	(desoxyribonucleic acid) Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
ϵ	Extinktionskoeffizient [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
<i>et al.</i>	(et alii) und andere
EUROSCARF	European <i>Saccharomyces cerevisiae</i> archives for functional analysis
G418 ^R	Geneticin-Resistenzkassette
GARS	Glycinamidribonukleotid-Synthetase
GCV	Glycine cleavage system
GGAT	Glutamat-Glyoxylat-Aminotransferase
GLY1	Gen der Threonin-Aldolase aus <i>A. gossypii</i>
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
<i>HOM3</i>	Gen der Aspartatkinase aus <i>A. gossypii</i>
HPLC	(high performance liquid chromatography) Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
ITS	(internal transcribed spacer) DNA-Sequenz vor bzw. nach der DNA-Sequenz für eine 5,8 S rRNA

min	Minute(n)
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	(messenger ribonucleic acid) Boten-Ribonukleinsäure
n	Datenzahl
nm	Nanometer
NMR	(<i>nuclear magnetic resonance</i>) Kern-Spin-Resonanz
OD ₅₅₀	Extinktion bei 550 nm
OD ₆₀₀	Extinktion bei 600 nm
ori	(origin of replication) Replikationsursprung für <i>E. coli</i> -Plasmide
PCR	(polymerase chain reaction) Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
psi	pounds per square inch
RNA	(ribonucleic acid) Ribonukleinsäure
rpm	(revolutions per minute) Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
Rt	Raumtemperatur
sek	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i> / <i>Sc</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	(sodium dodecyl sulfate) Natriumdodecylsulfat
SHM	Gen der Serin-Hydroxymethyltransferase aus <i>A. gossypii</i>
SHMT	Serin-Hydroxymethyltransferase
Tab.	Tabelle
<i>TEF_P</i>	Promotor des <i>TEF</i> -Gens aus <i>A. gossypii</i>
TG	Trockengewicht
THF	Tetrahydrofolsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität [$\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein) $^{-1}$]
<i>URA3</i>	Gen der Orotidin-5-phosphat Decarboxylase aus <i>S. cerevisiae</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
V _{max}	maximale Umsatzrate
w/v	Gewichtsprozent
x g	-fache Erdbeschleunigung [$9,81 \text{ m (sek}^2\text{)}^{-1}$]
X-Phosphat	5-Brom-4-chlor-3-Indolylphosphat

I. EINLEITUNG

1. *Ashbya gossypii* – Bedeutung in der Natur und in der Landwirtschaft

Ashbya gossypii ist ein filamentöser Pilz, der in der Natur in tropischen und subtropischen Lebensräumen als phytopathogener Mikroorganismus vorkommt (**Abb.1**). Er wurde erstmals 1926 auf den Westindischen Inseln von Baumwolle isoliert (Ashby und Nowell). Auf der Baumwolle ruft er die sogenannte Stigmatomykose oder Samenkapselkrankheit hervor.

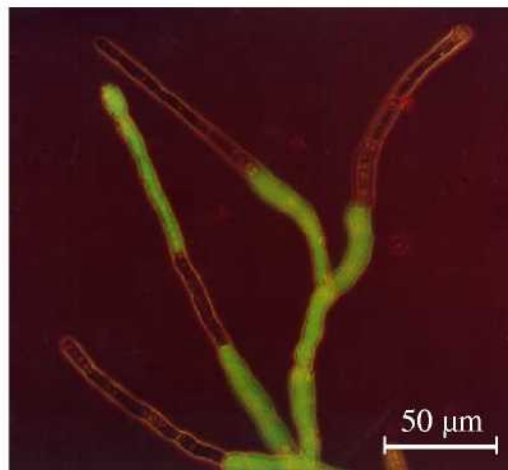


Abb.1 Verzweigtes Myzel des filamentösen Pilzes *A. gossypii*. In einigen Zellen akkumuliert Riboflavin, das unter UV-Licht grün fluoresziert.

Die Krankheit führt zu einer schmutzig-gelben Verfärbung und je nach Zeitpunkt der Infektion zum Vertrocknen der Baumwollfasern oder zum Abwurf der braun gefleckten Baumwollkapseln (Hillocks, 1992). Der Pilz infiziert nicht nur Baumwolle, sondern auch andere Pflanzen, wie z. B. Kaffee, Zitrusarten, Tomaten und verschiedene Leguminosenarten, was auf eine nicht sehr ausgeprägte Wirtsspezifität hinweist (Guillermond, 1928; Pridham und Raper, 1950). Die Infektion erfordert eine Verwundung der Wirtspflanzen, da der Pilz selbst nicht in der Lage ist, die Epidermis des Wirts zu durchdringen. Deshalb übertragen Insekten mit stechend-saugenden Mundwerkzeugen, meist der Ordnung Heteroptera, den Mikroorganismus von Pflanze zu Pflanze. Die Sporen oder das Myzel werden dabei als externe Kontaminierung an den Mundwerkzeugen des Insekts transportiert (Pridham und Raper, 1950). Das Wirtsspektrum des Pilzes beschränkt sich somit auf die von diesen Insekten besuchten Pflanzen. Die Ausbreitung der Stigmatomykose durch *A. gossypii* machte zwischen 1927 und 1944 den Anbau der Baumwolle in vielen afrikanischen Ländern fast unmöglich und auf den Westindischen Inseln betrugen die Verluste bei der Baumwollernte bis zu 100 % (Batra, 1973). Durch Bekämpfung der übertragenden Insekten und der als Zwischenwirt dienenden Unkräuter wurde die

Verbreitung eingedämmt (Dammer und Ravelo, 1990), so dass *A. gossypii* als Schädling heute nur noch eine untergeordnete Rolle spielt. So ist seit 1990 weder in der wissenschaftlichen noch in der Patentliteratur eine Veröffentlichung zur Pathogenität zu finden.

A. gossypii bildet ein septiertes, sich dichotom verzweigendes Myzel, dessen Zellen stets mehrkernig sind (Batra, 1973). Nach mehrtägigem Wachstum bilden sich charakteristische nadelförmige Sporen in interkalar entstehenden Sporangien aus, die in der Literatur als Asci bezeichnet werden. Allerdings wurde bisher nicht gezeigt, dass in diesen Zellen tatsächlich eine Meiose stattfindet (Batra, 1973). Aufgrund morphologischer Kriterien wurde *A. gossypii* ursprünglich von Guillermond (1928) der zu den Ascomyceten gehörenden Familie der Nematosporaceae zugeordnet. Neuere phylogenetische Analysen, die auf dem Vergleich von 18 S und 25 S rDNA (Kurtzman, 1995) sowie ITS1- und ITS2-Sequenzen (Messner *et al.*, 1995; Prillinger *et al.*, 1997) basieren, schlagen eine neue Einordnung vor. *A. gossypii* wird danach einerseits mit den ebenfalls phytopathogenen Gattungen *Eremothecium*, *Holleya* und *Nematospora* der neuen Familie der Eremotheciaceae (Kurtzman, 1995) und andererseits mit den Gattungen *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Nematospora*, *Eremothecium* und *Holleya* der Familie der Saccharomycetaceae zugeordnet. Die enge Verwandtschaft zwischen *Saccharomyces cerevisiae* und *A. gossypii* wird auch aus der Sequenzhomologie des *GLY1*-Gens (Monschau, 1998), des *IDP3*-Gens (Maeting, 1999), des *VMA1*-Gens (Förster *et al.*, 1999), sowie des entsprechenden Gens für den Translationselongationsfaktor 1 α (Steiner und Philippsen, 1994) deutlich. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ARS-Elemente aus *S. cerevisiae* in der Lage sind, die freie Replikation von Plasmiden in *A. gossypii* zu vermitteln (Wright und Philippsen, 1991). Da bisher in keinem anderen filamentösen Pilz eine Funktionalität dieser Elemente erreicht werden konnte (Fincham, 1989), ist dies ein weiterer Beleg für die enge Verwandtschaft der beiden Pilze.

2. Biotechnische Riboflavin-Produktion

Das gelb gefärbte, wasserlösliche Riboflavin (7,8-Dimethyl-10-ribityl-isoalloxazin) ist besser bekannt unter dem Namen Vitamin B₂. Während Pflanzen und Mikroorganismen in der Lage sind, Riboflavin selbst zu synthetisieren, müssen höhere Tiere das Vitamin über die Nahrung aufnehmen (Perkins *et al.*, 1999). Der menschliche Organismus nimmt Riboflavin hauptsächlich durch Fleisch, Eier und Milchprodukte auf. Zur Vermeidung von Mangelerscheinungen wie Dermatitis und Wachstumsstörungen wird eine Ernährung von 0,3 - 1,8 mg/Tag für Menschen und 1 - 4 mg/kg Futtermittel für Nutztiere empfohlen (Cooperman und Lopez, 1984; Eggerdorfer und Adam, 1996). Eine übermäßige Riboflavin-Aufnahme ist harmlos, da Riboflavin effizient über die Niere ausgeschieden werden kann.

In der Zelle liegt Riboflavin meist als Dinukleotid in Form von FAD oder als Phosphorsäureester in Form von FMN vor. Als prothetische Gruppe von Flavinenzymen gehören FAD und FMN zu den wichtigsten Elektronenakzeptoren und –donatoren biologischer Redoxsysteme, wobei das Isoalloxazin-Ringsystem des Riboflavins als Wasserstoffüberträger fungiert (Walpole und Wrigglesworth, 1987).

Eine Vielzahl verschiedener Mikroorganismen synthetisieren Riboflavin in Mengen, die weit über die metabolischen Bedürfnisse des Organismus hinausgehen (Heefner *et al.*, 1988). Neuste Untersuchungen liefern einen Hinweis, welchen Vorteil die Riboflavin-Überproduktion für die Mikroorganismen haben könnte. Es wurde gezeigt, dass Riboflavin die hyalinen Ascosporen des natürlichen Überproduzenten *A. gossypii* vor UV-Licht schützt. Eine *Aspergillus nidulans*-Mutante bildet aufgrund eines Defekts in der Pigment-Synthese weiße statt grüne Konidiosporen. Die Zugabe von Riboflavin führte bei diesen Sporen zu einer 70 %igen Steigerung der UV-Resistenz. Da Riboflavin-Überproduktion und Sporulation bei *A. gossypii* gekoppelt sind, erfüllt Riboflavin wahrscheinlich die Funktion eines UV-Schutz-Pigments (Stahmann *et al.*, 2001).

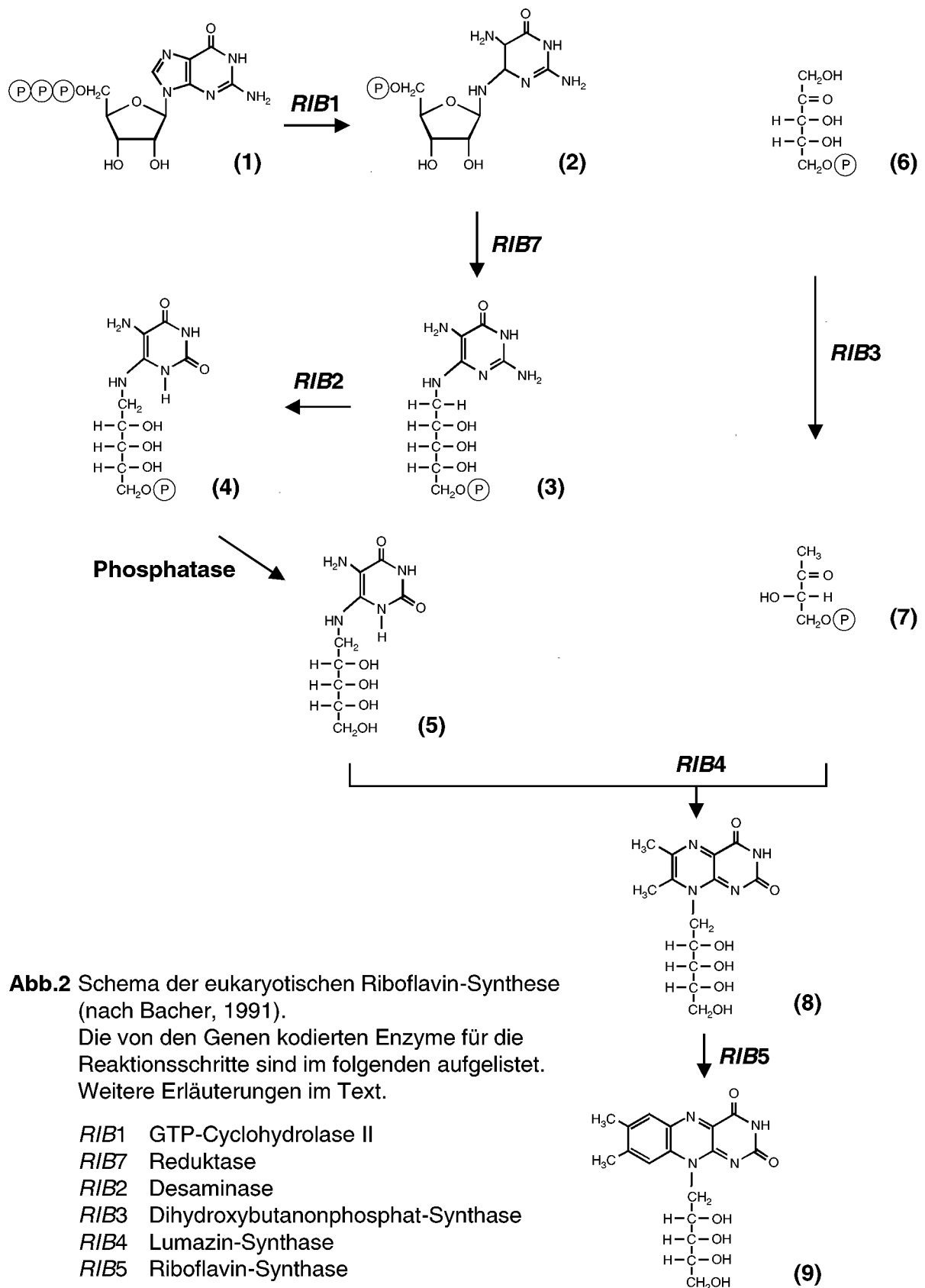
Biotechnische Bedeutung erlangte *A. gossypii* erstmals durch seine von Wickerham *et al.* (1946) beschriebene Fähigkeit zur Überproduktion des Riboflavins. Der nah verwandte Hemiascomycet *Eremothecium ashbyi* ist ebenfalls ein natürlicher Riboflavin-Überproduzent und bildet vergleichbare Mengen an Riboflavin (Özbas und Kutsal, 1986). Jedoch ist *A. gossypii* genetisch stabiler und damit besser für die industrielle Produktion geeignet (Demain, 1972). Mit Hilfe verschiedener Strategien konnte die Riboflavin-Synthese in *A. gossypii* auf mindestens 20 g/l gesteigert werden (Demain, 2000). Dies gelang zum einen durch eine Optimierung der Fermentationsbedingungen, z. B. durch die Verwendung von Sojaöl als Kohlenstoffquelle (Lago und Kaplan, 1981); zum anderen durch eine verbesserte Bereitstellung von Vorstufen der Riboflavin-Biosynthese, z. B. durch Supplementierung mit Purinen, insbesondere Hypoxanthin (Kaplan und Demain, 1970). Fütterung von Glycin, einem der Ausgangsmetabolite der *de novo*-Purinsynthese, erzielte ebenfalls eine gesteigerte Riboflavin-Produktion in *A. gossypii* (Hanson, 1967; Demain, 1972; Kaplan und Demain, 1970; Heefner *et al.*, 1988). Eine weitere Strategie war die gezielte Überexpression von Genen für Enzyme, die an der Riboflavin-Biosynthese direkt beteiligt sind, oder die für die Vorstufen-Bereitstellung notwendig sind. So führte z. B. die Integration zusätzlicher Kopien der Riboflavin-Biosynthese-Gene *RIB3*, *RIB4* und *RIB5* unter einem starken Promotor zu einer gesteigerten Riboflavin-Produktion (Althöfer *et al.*, 1999). Ein weiterer biotechnisch eingesetzter Riboflavin-Überproduzent ist die Hefe *Candida famata* (bei ATTC synonym mit *Candida flarer*). Die Vitamin B₂-Bildung setzt in diesem Mikroorganismus im Verlauf der Kultivierung erst nach Unterschreiten einer Eisen-Konzentration von 10 µg/l im Medium ein (Goodwin, 1959). Die Ursache dafür ist wahrscheinlich die Regulation der

Riboflavin-Biosynthesegene, da die spezifische Aktivität der Enzyme durch Kultivierung mit Eisenionen sinkt (Shavlovskii *et al.*, 1985). Durch die Isolierung Eisenionen-resistenter Mutanten konnte *C. famata* mit einer Riboflavin-Produktion von 20 g/l industriell eingesetzt werden (Heefner *et al.*, 1992). Ein bakterieller Mikroorganismus zur industriellen Produktion von Riboflavin ist *Bacillus subtilis*. Unter natürlichen Bedingungen kommt in diesem Bakterium keine Riboflavin-Überproduktion vor, jedoch bilden die Riboflavin-Biosynthesegene ein Operon, so dass die gute genetische Zugänglichkeit die Konstruktion eines Produktionsstammes erleichterte (Mironov *et al.*, 1990). Die Expression der *rib*-Gene wurde durch Mutation des *ribC*-Gens, das für eine Flavinkinase kodiert, durch Einsatz starker, konstitutiv exprimierender Promotoren und durch große Kopienzahl der Gene erhöht (Perkins *et al.*, 1999). Inzwischen wird mit *B. subtilis*-Stämmen durch Kombination von Selektion und Gentechnik eine Konzentration von 14 g/l Riboflavin erzielt (Perkins *et al.*, 1999). Ein Stamm von *Corynebacterium ammoniagenes* wurde durch 17-fache Integration des Riboflavin-Biosynthese-Operons unter Kontrolle eines starken Promotors zu einem Riboflavin-Produzenten verändert, der dadurch 15 g/l des Vitamins bildet (Koizumi *et al.*, 2000).

Obwohl eine chemische Synthese von Riboflavin möglich ist und viele Jahrzehnte wirtschaftlich war, gewinnt die biotechnische Produktion aus Kostengründen zunehmend an Bedeutung (Vandamme, 1992). Zur Zeit liegt die biotechnische Riboflavin-Produktion durch die Marktführer DSM (Niederlande) mit *B. subtilis*, BASF (Deutschland) mit *A. gossypii* und ADM (USA) mit *C. famata* bei mehr als 3000 Tonnen pro Jahr (Stahmann *et al.*, 2000). Davon werden mehr als 80 % als Futtermittelzusatz verwendet. In hochgereinigter Form findet Riboflavin weitere Verwendung als Therapeutikum und als Lebensmittelfarbstoff (E 101).

3. Riboflavin-Biosynthese

Die Riboflavin-Biosynthese erfolgt über sechs spezifische Reaktionen, die in **Abb.2** schematisch dargestellt sind (nach Bacher, 1991). Die Ausgangssubstrate der Riboflavin-Biosynthese sind GTP und Ribulose-5-phosphat. Im ersten Schritt katalysiert die GTP-Cyclohydrolase II (*RIB1*) die Ringöffnung am GTP (1) zu 2,5-Diamino-6-(ribosylamino)-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat (2). Während die erste Reaktion in allen Mikroorganismen vorkommt, verlaufen die zwei folgenden Syntheseschritte in Pro- und Eukaryoten unterschiedlich. Durch Reduktion und Desaminierung entsteht in *A. gossypii* und anderen Eukaryoten 5-Amino-6-(ribitylamino)-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat (4) (Hollander und Brown, 1978). In Prokaryoten dagegen verläuft die Synthese von (4) zuerst über eine Desaminierung, der eine Reduktion folgt (Burrows und Brown, 1978).



Eine Dephosphorylierung führt zur Bildung von 5-Amino-6-(ribitylamino)-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (5), das durch Katalyse der Lumazin-Synthase (*RIB4*) mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (7) kondensiert. (7) wurde nach Abspaltung von Formiat mittels der

Dihydroxybutanonphosphat-Synthase (*RIB3*) aus Ribulose-5-phosphat (6) gebildet. Das Kondensationsprodukt ist 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (8). Zwei dieser Moleküle werden im letzten Schritt durch Katalyse der Riboflavin-Synthase (*RIB5*) zu Riboflavin (9) umgewandelt. Stöchiometrisch betrachtet werden die durch *RIB3*, *RIB4* und *RIB5* kodierten Enzyme, Dihydroxybutanonphosphat-, Lumazin- und Riboflavin-Synthase, für ein Molekül Riboflavin doppelt so häufig benötigt wie die übrigen Enzyme. In diesem Zusammenhang konnte bei *A. gossypii* für *RIB3*, *RIB4* und *RIB5* eine Zunahme der mRNA in der Riboflavin-Produktionsphase gezeigt werden. Für das *RIB3*-Gen, das für das Schlüsselenzym der Riboflavin-Synthase kodiert, wurde eine Initiation der Transkription mittels Reporteranalyse nachgewiesen (Schlösser, 2002).

4. Bedeutung der Glycin-Biosynthese für die Riboflavin-Produktion in *A. gossypii*

Glycin fließt als Vorstufe der *de novo* Purinsynthese in die Riboflavin-Synthase von *A. gossypii* ein. Fütterungsexperimente mit ^{14}C -markiertem Glycin zeigten, dass die markierten C-Atome im Purinring des GTPs zu finden waren und damit auch ins Riboflavin eingebaut wurden (Plaut, 1954) (**Abb.3**).

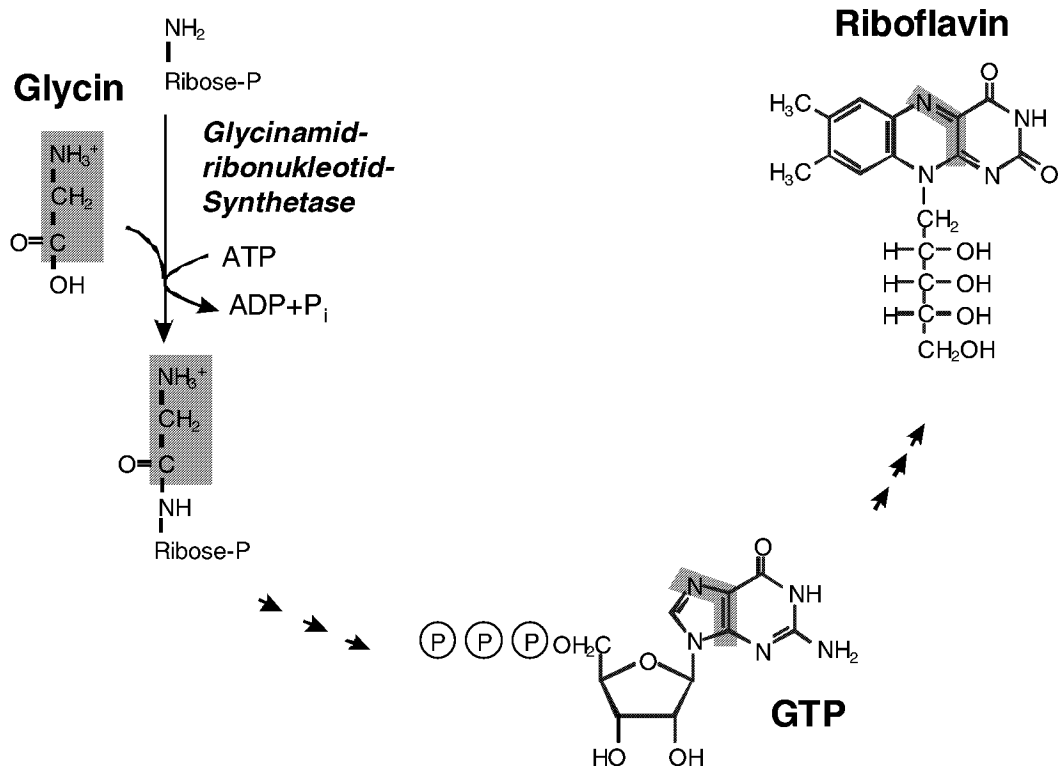


Abb.3 Schematische Darstellung des durch die Glycinamidribonukleotid-Synthetase katalysierten Einbaus von Glycin in das Purin-Ringsystem. Die am Aufbau des Purin-Rings beteiligten Atome des Glycins sind grau unterlegt.

Der Einbau von Glycin in der *de novo* Purinsynthese erfolgt durch Katalyse der Glycinamidribonukleotid-Synthetase. Dabei werden die Carboxylgruppe des Glycins und die Aminogruppe des Phosphoribosylamins unter ATP-Verbrauch zu einer Amidbindung verknüpft. Supplementierung des Mediums mit Glycin steigert die Riboflavin-Überproduktion in *A. gossypii* um 30 % (Hanson, 1967) bis 650 % (Kaplan und Demain, 1970) in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen. Allerdings ist ein hoher Glycin-Überschuss im Medium erforderlich, damit sich der Glycin-Effekt auf die Riboflavin-Synthese auswirken kann, was möglicherweise in einem fehlenden effizienten Glycin-Aufnahmesystem der Zelle begründet liegt. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das Kultivierungsmedium nicht optimal auf eine Glycin-Aufnahme ausgerichtet ist. In *S. cerevisiae* führte das Wachstum in einem typischen Nährmedium zu teilweiser Repression einiger Aminosäure-Permeasen. Die Anwesenheit von Ammonium-Ionen reprimiert die Aktivität der General Amino Acid Permease, wohingegen die Zugabe von Prolin oder Glutamat als Stickstoffquelle die Aktivität der Permease erhöht (Eddy und Hopkins, 1989).

Dass der pH-Wert für die Glycin-Aufnahme ebenfalls eine wesentliche Rolle spielt, zeigen Untersuchungen an der Pflanze *Lolium perenne*. Die Steigerung des pH-Werts der extrazellulären Lösung von 2,1 auf 3,5 führte zu einer 3fach gesteigerten Glycin-Aufnahme. Eine weitere pH-Erhöhung reduzierte die Glycin-Aufnahme. Als Ursache wird angenommen, dass die Glycin-Aufnahme über einen Protonen-Symporter erfolgt (Thornton, 2001). Neben einer ineffizienten Glycin-Aufnahme wäre eine inhomogene Verteilung des Glycins in der Zelle eine andere Erklärung. So wurden 48 % des Glycins in der Vakuole von *Ashbya*-Zellen lokalisiert (Förster *et al.*, 1998). Eine Erhöhung der extrazellulären Glycin-Konzentration wirkt sich möglicherweise nur abgeschwächt auf das Cytosol aus, in dem wahrscheinlich der Glycin-Einbau in der Purinsynthese stattfindet.

5. Mögliche Wege der Glycin-Biosynthese

In der Zelle kann Glycin über vier verschiedene Biosynthesewege synthetisiert werden (**Abb.4**). Entweder ausgehend von Serin über die Serin-Hydroxymethyltransferase oder von Threonin über die Threonin-Aldolase. Glyoxylat wird durch die Glyoxylat-Aminotransferase zu Glycin umgewandelt und die Rückreaktion des Glycine Cleavage System führt zur Glycin-Bildung aus Kohlendioxid und Ammoniak.

Die Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT) ist in der Natur weit verbreitet und kommt in Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Fischen, Vögeln und Säugetieren vor (Barra *et al.*, 1983). Bis auf die SHMT der Mungbohne (Sukanya *et al.*, 1991) benötigen alle bisher untersuchten SHMTs Pyridoxal-5-phosphat (PLP) als Cofaktor (Nakamura *et al.*, 1973; Pascarella *et al.*, 1993).

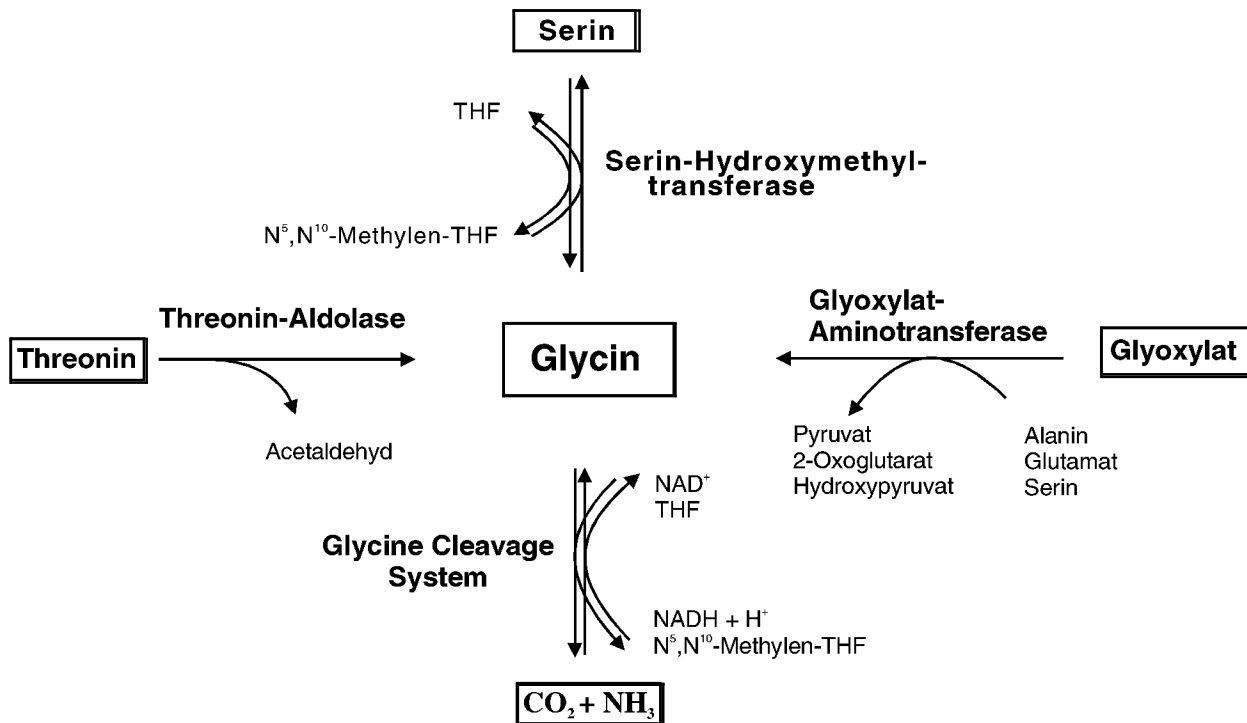


Abb.4 Mögliche Wege der Biosynthese von Glycin über Serin-Hydroxymethyltransferase, Threonin-Aldolase, Glyoxylat-Aminotransferase bzw. Glycine Cleavage System.

Neben seiner physiologischen Reaktion, der reversiblen Umwandlung von Serin zu Glycin, wobei Tetrahydrofolat (THF) als C1-Akzeptor dient (Schirch, 1984), katalysiert die SHMT auch andere Reaktionen, wie Transaminierungen, Decarboxylierungen und Racemisierungen (Pascarella *et al.*, 1993). Serin und Glycin spielen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel. Sie sind Proteinbausteine und bilden die Vorstufen verschiedener Komponenten, wie Phospholipide (Serin) und Purine (Glycin) (Mouillon *et al.*, 1999). Außerdem ist Serin in Pilzen, Pflanzen und Säugerzellen die Hauptquelle von C1-Einheiten (Schirch, 1984) und bildet daher die Grundlage des gesamten C1-Metabolismus (Appling, 1991). Der C1-Stoffwechsel ist in verschiedenste Biosynthesen einbezogen, wie Purin-, Thymidylat- und Methionin-Biosynthese (Cossins und Chan, 1997; Rébeillé und Douse, 1999a). Während Prokaryoten eine einzige SHMT besitzen, treten in eukaryotischen Organismen cytosolische (cSHMT) und mitochondrielle (mSHMT) Isoformen auf (Appling, 1991), die von separaten Genen kodiert werden (Schirch, 1982; Garrow *et al.*, 1993). Eine dritte Isoform existiert in den Chloroplasten von Pflanzen (Besson *et al.*, 1995) und *Euglena gracilis* (Sakamoto *et al.*, 1996). In *Crithidia fasciculata* gibt es ebenfalls drei molekulare Formen der SHMT. Während SHMTIII im Cytosol lokalisiert ist, handelt es sich bei SHMTI um ein mitochondrielles und bei SHMTII sehr wahrscheinlich um ein glykosomales Enzym (Capelluto *et al.*, 1999). Weiterhin wurde eine unterschiedliche Verteilung der SHMT-Isoformen in verschiedenen Geweben festgestellt. So akkumuliert die mitochondrielle Isoform der SHMT in den Blättern, nicht aber in den Wurzeln der Erbse (Turner *et al.*, 1992). Eine gewebespezifische Expression der SHMT konnte auch in menschlichen Zellen

beobachtet werden. Zwar kommt die cytosolische Isoform in allen Geweben vor, ist aber in Niere, Leber und Skelettmuskulatur stark angereichert (Szebenyi *et al.*, 2000). Dazu unterliegt die menschliche cSHMT-mRNA Gewebe-spezifischem alternativen Splicen. In den MCF-7-Zellen existieren mindestens sechs mRNA Splice-Formen, denen Exon 2 und/oder 9 und/oder 10 von 13 Exons fehlt, wohingegen in 5Y-Zellen hauptsächlich die mRNA mit fehlendem Exon 2 vorkommt (Girgis *et al.*, 1998). Die mRNA und Aktivität der menschlichen mSHMT ist dagegen in allen Geweben gleich hoch (Szebenyi *et al.*, 2000). Das gewebespezifische Exon-Splicen könnte ein wichtiger Mechanismus sein, den die Zelle zur Änderung der Enzymaktivität, Reaktionsspezifität oder metabolischen Funktion nutzt. Pfendner und Pizer (1980) beschrieben, dass die cSHMT die Funktion des mitochondrialen Enzyms in CHO (chinese hamster ovary)-Zellen nicht kompensieren kann, was darauf hindeutet, dass die metabolischen Rollen von mSHMT und cSHMT verschieden sind. Die mSHMT-Reaktion ist der einzige Weg zur Glycin-Bildung in CHO-Zellen, da eine Mutation in mSHMT zu Glycin-Auxotrophie führt (Chasin, 1974). Auch in *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum* stellt die SHMT-Reaktion die Hauptquelle für Glycin dar. Während in *E. coli* das Wachstum einer Mutante mit disruptiertem *glyA* stark verlangsamt ist (Liu *et al.*, 1998), resultiert die *glyA*-Disruption in *C. glutamicum* in Glycin-Auxotrophie (Simic *et al.*, 2002). Welche Rolle die SHMT in *A. gossypii* spielt, war nicht bekannt. Bisher konnten zwei Gene, die für SHMTs kodieren, isoliert werden (Revuelta, 1998, 2000). SHMT1 hat eine eher untergeordnete Funktion, da sich die Disruption des *SHM1*-Gens nicht auf die Aktivität des Enzyms auswirkt (Schlüpen *et al.*, 2003). Untersuchungen zur SHMT2 wurden bisher nicht durchgeführt.

Ein nah verwandtes Protein der SHMT ist die Threonin-Aldolase (Contestabile *et al.*, 2001), die einen alternativen Weg zur Glycin-Bildung katalysiert. Threonin-Aldolase-Aktivität wurde in verschiedenen Bakterien (Liu *et al.*, 1997, 1998), Pilzen (Liu *et al.*, 1997; McNeil *et al.*, 2000) und Säugerzellen (Pagani *et al.*, 1991) beobachtet. Zusätzlich zu diesen Organismen wurden putative homologe Proteine in Nematoden, Fliegen und Pflanzen identifiziert (Kielkopf und Burley, 2002). Die Threonin-Aldolase ist ein PLP-abhängiges Enzym, das die Aldolspaltung von Threonin in Glycin und Acetaldehyd katalysiert. Aufgrund Substratspezifischer Unterschiede existieren zweimal drei Variationen der Threonin-Aldolase. Die L-*allo*-Threonin-Aldolase ist spezifisch für L-*allo*-Threonin (Kataoka *et al.*, 1997), die L-Threonin-Aldolase setzt nur L-Threonin um und die gering-spezifische L-Threonin-Aldolase kann sowohl L-Threonin als auch L-*allo*-Threonin als Substrat verwenden (Kumagai *et al.*, 1972; Diaz-diaz *et al.*, 1995). Dazu gibt es die korrespondierenden Enzyme für D-Threonin und D-*allo*-Threonin (Kataoka *et al.*, 1997). Eine L-Threonin-Aldolase wurde aus *Clostridium pasteurianum* gereinigt (Dainty und Peel, 1970); sowie eine L-*allo*-Threonin-Aldolase von *Aeromonas jandaei* beschrieben (Kataoka *et al.*, 1997). Mehrere gering-spezifische

L-Threonin-Aldolasen von *E. coli* (Liu *et al.*, 1998), *Pseudomonas sp.* (Liu *et al.*, 1998), *Thermatoga maritima* (Kielkopf und Burley, 2002), *Candida humicola* (Kumagai *et al.*, 1972; Yamada *et al.*, 1970) und *S. cerevisiae* (Liu *et al.*, 1997) wurden gereinigt und charakterisiert. Die Gene, die für die Threonin-Aldolasen von *E. coli*, *A. jandaei*, *Pseudomonas sp.*, *S. cerevisiae* (Liu *et al.*, 1997, 1998), *Candida albicans* (McNeil *et al.*, 2000) und *A. gossypii* (Monschau, 1998) kodieren, wurden kloniert und sequenziert. ¹⁴C-Fütterungsexperimente mit *Clostridium kluyveri* (Jungermann *et al.*, 1970) sowie *Clostridium pasteurianum* (Dainty und Peel, 1970) zeigten, dass die Threonin-Aldolase vorwiegend eine glycinogene Funktion hat. Auch Wachstumsstudien mit *S. cerevisiae* deuteten darauf hin, dass diese Reaktion bei Wachstum auf Glucose die Hauptglycinquelle darstellt. Hier führte die Disruption des für die Threonin-Aldolase kodierenden *GLY1*-Gens zu einer stark reduzierten Wachstumsrate (Monschau *et al.*, 1997), wohingegen die Disruption der für die SHMT-Isoenzyme kodierenden Gene (*SHM1* und *SHM2*) keinen signifikanten Einfluß auf das Wachstum hatte (McNeil *et al.*, 1994). Dass der Wachstumsphänotyp in diesen *GLY1*-Disruptanten durch einen sekundären Effekt zustande gekommen war, ergeben aktuelle Studien. So zeigten Markierungsexperimente mit ¹³C-Aspartat bzw. ¹³C-Serin, dass im *S. cerevisiae* Wildtyp der Stoffwechselfluss über die Threonin-Aldolase nur ein Drittel der Glycin-Biosynthese einnimmt und damit die SHMT den Hauptweg für Glycin darstellt (Woldman und Appling, 2002). In *E. coli* bildet die Threonin-Aldolase-Reaktion neben der SHMT einen alternativen Weg der Glycin-Synthese. Eine Disruption des für die Threonin-Aldolase kodierenden *ItaE*-Gens im Wildtypstamm hatte keinen Effekt auf die Wachstumsrate (Liu *et al.*, 1998). Auch in *A. gossypii* resultierte die Disruption von *GLY1* nicht in einem Glycin-Mangel. Das bedeutet, dass die Threonin-Aldolase eine geringere Rolle in der Glycin-Biosynthese spielt oder dass ihre Funktion von anderen Enzymen übernommen wird (Monschau, 1998). Aus *C. glutamicum* konnte kein Gen, das für eine Threonin-Aldolase kodiert, isoliert werden. Stattdessen katalysiert die SHMT *in vitro* die Aldolspaltung von Threonin (Simic *et al.*, 2002). Ähnliches wird bei der gereinigten SHMT aus Kaninchen beobachtet (Ogawa *et al.*, 2000). Im Acetaldehyd-Produzenten *Streptococcus thermophilus* ist die SHMT das einzige Enzym mit Threonin-Aldolase-Aktivität. Eine Disruption des *glyA*-Gens, das für SHMT kodiert, führt zu einer Inaktivierung der Threonin-Aldolase-Aktivität und zu reduziertem Wachstum (Chaves *et al.*, 2002). Die Fähigkeit, die Funktion einer Threonin-Aldolase zu übernehmen, ist jedoch keine allgemeine Eigenschaft der SHMT. So ist z.B. die SHMT der Ratte nicht in der Lage, die Aldolspaltung von Threonin zu katalysieren (Masuda *et al.*, 1987). In *E. coli* kann aber die Threonin-Aldolase zum Teil die SHMT-Aktivität *in vitro* ersetzen (Liu *et al.*, 1998).

Eine weitere Möglichkeit der Glycin-Bildung ist die Rückreaktion des Glycine Cleavage Systems (GCV). Dabei handelt es sich um die reduktive Synthese von Glycin aus CO₂, NH₃

und Methylentetrahydrofolat (Kikuchi, 1973). Das GCV ist ein hochkonserviertes Multienzymsystem (Hayasaka *et al.*, 1993), das in Bakterien und in Mitochondrien verschiedener Tiere und Pflanzen vorkommt (Stauffer *et al.*, 1993, Hayasaka *et al.*, 1993, Oliver *et al.*, 1990b). Es besteht aus vier Proteinen: einem PLP-abhängigen Enzym (P-Protein), einem Hitze-stabilen aziden Protein (H-Protein oder Hydrogen-Carrier-Protein), einem Flavoprotein mit Lipoamid-Dehydrogenase-Aktivität (L-Protein) und einem Protein, das den THF-abhängigen Schritt der Reaktion katalysiert (T-Protein) (Kikuchi, 1973). Ein Defekt in einem der vier Proteine führt zum Verlust der Gesamtaktivität des Enzymkomplexes (Sakata *et al.*, 2001). Obwohl die GCV-Reaktion *in vitro* reversibel ist (Kikuchi und Hiraga, 1982), wird in vielen Organismen nur die Glycin-Spaltung beschrieben. So ist in eukaryotischen Zellen die GCV-Reaktion als Hauptabbauweg von Glycin beschrieben (Yoshida und Kikuchi, 1970). Wachstumsexperimente mit *S. cerevisiae* zeigen, dass das GCV für das Wachstum auf Glycin als einziger Stickstoffquelle essentiell ist (Sinclair und Dawes, 1995). Zudem zeigen genetische Studien an Hefen, dass die Bedeutung des GCV in der Regenerierung von C1-Einheiten liegt (Ogur *et al.*, 1977). In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass das GCV und die SHMT über einen gemeinsamen THF-Pool in den Mitochondrien miteinander verbunden sind (Douce *et al.*, 2001). So liefert die GCV-Reaktion eine C1-Einheit aus Glycin, die dann in der SHMT-katalysierten Reaktion mit einem zweiten Glycin-Molekül zu Serin umgewandelt wird (McNeil *et al.*, 1994; Matthews *et al.*, 1998). In *Arabidopsis thaliana* stellt die Serin-Bildung in den Mitochondrien durch GCV und SHMT die Hauptquelle der Serin-Versorgung dar (Ho, 2001). Inzwischen gibt es aber auch ein Beispiel für die Glycin-bildende Funktion des GCV in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* (Pasternack *et al.*, 1992). So wurde mittels Markierungsexperimenten *in vivo* die Produktion von $^{13}\text{C}_2$ -Glycin und $^{13}\text{C}_{2,3}$ -Serin gezeigt, wenn $^{13}\text{C}_3$ -Serin gefüttert wurde. Außerdem wurde in Stämmen mit fehlender C1-THF-Synthase ^{13}C -Formiat zu $^{13}\text{C}_2$ -Glycin und $^{13}\text{C}_3$ -Serin metabolisiert. Dabei wurde Formiat in den Mitochondrien assimiliert, aktiviert und zu ^{13}C -CH₂-THF durch die mitochondrielle C1-THF-Synthase umgewandelt. Die folgende Glycin-Synthese erfolgte über die Umkehr-Reaktion des GCV. Eine GCV-Enzymaktivität im Rohextrakt von *A. gossypii* konnte noch nicht nachgewiesen werden (Monschau, 1998).

Die vierte Reaktion zur Glycin-Biosynthese wird von der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase (AGAT) katalysiert, welche die PLP-abhängige Umsetzung von Glyoxylat und Alanin zu Glycin und Pyruvat durchführt. Die AGAT ist weit verbreitet und wurde in *S. cerevisiae* und in einer Vielzahl von Tierspezies gefunden (Säuger, Vögel, Reptilien und Fische) (Rowell *et al.*, 1969). Während in *S. cerevisiae* nur eine AGAT existiert, werden in Vertebraten zwei Isoformen beschrieben (Noguchi und Takada, 1978). Das Enzym in *S. cerevisiae* ist hoch spezifisch für L-Alanin und Glyoxylat. Dasselbe gilt für AGAT2 der Säugerzelle. AGAT1

besitzt zusätzlich Serin-Pyruvat-Aminotransferase-Aktivität. In *S. cerevisiae* spielt die AGAT-Reaktion eine wichtige Rolle bei Wachstum auf nicht-fermentativen C-Quellen wie Ethanol oder Acetat. Die Glycin-Biosynthese verläuft dann hauptsächlich über den „gluconeogenetischen“ Weg, bei dem Glyoxylat aus Tricarbonsäure-Zyklus-Intermediaten gewonnen und durch Transaminierung zu Glycin umgesetzt wird (Ulane und Ogur, 1972; Takada und Noguchi, 1985). Diese Reaktion wird durch Glucose reprimiert (Melcher und Entian, 1992; Ulane und Ogur, 1972). In *A. gossypii* wurde eine Glyoxylat-Aminotransferase-Reaktion in den Mitochondrien nachgewiesen, die jedoch im Gegensatz zu *S. cerevisiae* bevorzugt Glutamat als Aminodonor verwendet. Eine Repression durch Glucose als C-Quelle, wie in *S. cerevisiae*, konnte nicht festgestellt werden (Monschau, 1998). Glutamat-Glyoxylat-Aminotransferasen (GGAT) sind bisher aus *Lactobacillus plantarum* (Galas und Florianowicz, 1975), aus Rattenleber (Nakada, 1964) sowie aus verschiedenen Pflanzen (Walton und Butt, 1981; Paszkowski und Niedzielska, 1989) bekannt, wobei die GGAT der Pflanzenzellen in den Peroxisomen lokalisiert ist (Smith, 1985).

6. Bedeutung der Threonin-Biosynthese für die Riboflavin-Produktion

Wie Glycin kann auch Threonin ein limitierender Faktor der Riboflavin-Überproduktion in *A. gossypii* sein. So bringt die Überexpression des Gens der Threonin-Aldolase keine verbesserte Glycin- und damit Riboflavin-Produktion, da Threonin selbst die Glycin-Bildung limitiert. Wird zusätzlich zur Threonin-Aldolase-Überexpression das Medium mit Threonin supplementiert, ist die Riboflavin-Überproduktion bei Wachstum auf Glucose deutlich erhöht (Monschau *et al.*, 1998). Durch Fütterung von Glycin konnte diese starke Riboflavin-Überproduktion im Wildtyp nicht erreicht werden. Vermutlich kam die Steigerung durch eine verbesserte Aufnahme des extrazellulären Threonins und der dann folgenden intrazellulären Umsetzung zu Glycin zustande. Eine erleichterte Threonin-Aufnahme im Vergleich zur Glycin-Aufnahme deutet auf getrennte Transportsysteme für die beiden Aminosäuren hin. Aminosäure-Transportsysteme sind in *A. gossypii* bislang nicht untersucht. In *S. cerevisiae* transportiert die General Amino Acid Permease (Gap), die zur Aminosäure-Transporter-Familie 1 gehört (Wipf *et al.*, 2002), mit niedriger Affinität und Spezifität ein breites Spektrum von Aminosäuren. Während der Glycin-Transport durch Gap1 ermöglicht wird (van der Rest *et al.*, 1995), ist bisher nicht bekannt, ob auch Threonin darüber in die Zelle aufgenommen wird. In *E. coli* werden Glycin und Threonin über unterschiedliche Carrier transportiert. Die Aufnahme von Glycin, D-Alanin und D-Serin erfolgt über einen Transporter, dessen Gen konstitutiv transkribiert wird (Robbins und Oxender, 1973; Ghrist und Stauffer, 1995). Threonin gelangt entweder über ein Transportsystem für Alanin, Cystein, Homoserin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Threonin, Tyrosin und Valin in die Zelle oder alternativ über einen Carrier, der spezifisch für Threonin und Serin ist (Templeton und Savageau, 1974). Es

wäre daher denkbar, dass auch in *A. gossypii* Glycin und Threonin über unterschiedliche Transporter aufgenommen werden. Die Threonin-Supplementierung könnte auch durch die Entwicklung einer Mutante mit erhöhter Threonin-Produktion umgangen werden. In diesem Zusammenhang ergaben Fütterungsexperimente mit Threoninvorstufen, dass neben Threonin auch Homoserin in der Lage ist, die Riboflavin-Produktion zu steigern. Aspartat dagegen zeigt keinen Effekt, obwohl nachgewiesen werden konnte, dass das extrazellulär angebotene Aspartat aufgenommen wurde (Monschau, 1998). Demnach könnte die Umwandlung von Aspartat in Homoserin einen für die Riboflavin-Produktion limitierenden Schritt in der Threonin-Biosynthese darstellen.

7. Aspartatkinase – das Schlüsselenzym des Aspartat-Wegs

Der Aspartat-Weg nutzt Aspartat als Vorstufe für die Biosynthese der Aminosäuren Lysin, Methionin, Isoleucin und Threonin (Cohen, 1983). In Pflanzen und Mikroorganismen wird über diesen Stoffwechselweg ein Viertel der Aminosäuren gebildet, die für die Protein-Biosynthese benötigt werden (Viola, 2001). Die Aminosäuren, die von Aspartat abgeleitet werden, sind in Tieren essentiell, da ihnen die Enzyme des Aspartat-Wegs fehlen.

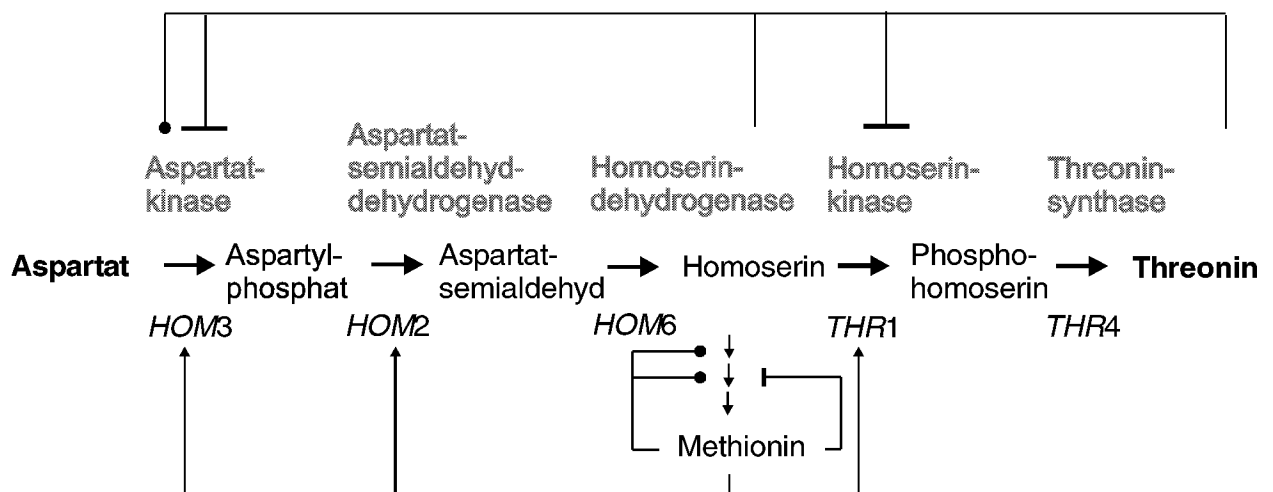


Abb.5 Schema der Threonin-Biosynthese in *S. cerevisiae*. Die Schlüsselenzyme Aspartatkinase und Homoserinkinase bzw. deren Gene unterliegen sowohl der Inhibition als auch der Repression. (—| Inhibition; —● Repression; —> Induktion)

Die erste enzymatische Reaktion ist die Phosphorylierung von Aspartat zu β -Aspartylphosphat durch die Aspartatkinase (**Abb.5**). Die anschließende Umwandlung von β -Aspartylphosphat zu β -Aspartyl-Semialdehyd wird durch die Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase katalysiert. In Pflanzen und Bakterien teilt sich der Weg von diesem Punkt einerseits in Richtung Lysin-Biosynthese, andererseits in Richtung Methionin-, Threonin- und Isoleucin-Bildung. In Pilzen wird Lysin nicht über den Aspartat-Weg gewonnen, sondern von α -Ketoglutarat ausgehend über den α -Amino adipinsäure-Weg gebildet (Zubay, 1973). Zur

Threonin- und Methionin-Synthese wird zunächst durch die Homoserin-Dehydrogenase β -Aspartyl-Semialdehyd zu Homoserin reduziert. Die Homoserinkinase katalysiert dann die Phosphorylierung von Homoserin zu Homoserinphosphat, das im letzten Schritt zu Threonin durch die Threonin-Synthase umgesetzt wird. Isoleucin wird aus Threonin über fünf enzymatische Reaktionen gebildet. Die Synthese der Aminosäure Methionin verläuft ausgehend von Homoserinphosphat über drei enzymatische Reaktionen (Azevedo *et al.*, 1997; Höfgen *et al.*, 2001).

Verzweigte Stoffwechselwege erfordern eine strikte Regulation. Im Aspartat-Weg spielt die Aspartatkinase eine wichtige regulatorische Rolle. Viele Bakterien besitzen mehrere Isoformen der Aspartatkinase, von denen einige bifunktionell sind (Cohen, 1969). So existieren in *E. coli* drei Aspartatkinasen. Die bifunktionelle Isoform I (Aspartatkinase/Homoserin-Dehydrogenase) besteht aus einer N-terminalen Aspartatkinase-Domäne und einer C-terminalen Homoserin-Dehydrogenase-Domäne (Truffa-Bachi *et al.*, 1968). Das Enzym wird durch Threonin sowohl inhibiert als auch reprimiert. Isoform II ist auch eine bifunktionelle Aspartatkinase/Homoserin-Dehydrogenase, deren Bildung aber durch Methionin reprimiert wird, während Isoform III ein monofunktionelles Enzym ist, das durch Lysin inhibiert wird (Cohen und Dauntry-Varsat, 1980). In *Bacillus sp.* gibt es zwei Aspartatkinasen, von denen eine durch den Diaminopimelat-Level reguliert, die andere sowohl durch Threonin als auch durch Lysin inhibiert wird (Rosner und Paulus, 1971). In *C. glutamicum* wurde nur eine Aspartatkinase detektiert, die durch die zwei Endprodukte L-Lysin und L-Threonin gehemmt wird (Pfefferle *et al.*, 2003). Mindestens zwei Isoenzyme wurden in Pflanzen beobachtet: eine Lysin-sensitive und eine Threonin-sensitive Aspartatkinase (Azevedo *et al.*, 1997). Molekularbiologische Untersuchungen an Karotte und Mais zeigten, dass es sich bei dem Threonin-sensitiven Isoenzym um eine bifunktionelle Aspartatkinase/Homoserin-Dehydrogenase handelt (Wilson *et al.*, 1991; Azevedo *et al.*, 1992b). Da in Pilzen die Aminosäure Lysin nicht über den Aspartat-Weg gebildet wird (Zubay, 1973), werden multiple Formen der Aspartatkinase nicht benötigt. Auch die Regulation dürfte nicht so komplex sein wie in Bakterien und höheren Pflanzen (Rafalski und Falco, 1988). So existiert in *S. cerevisiae* nur eine monofunktionelle Aspartatkinase, die durch Threonin gehemmt wird (Stadtman *et al.*, 1961, Ramos *et al.* 1991) (**Abb.5**). Delgado *et al.* (1982) beobachteten neben der Feedback-Hemmung durch Threonin auch eine durch Homoserin. Eine Feedback-resistente Aspartatkinase führt in *S. cerevisiae*-Mutanten zu deutlicher Threonin-Überproduktion (Farfan und Calderon, 2000). Zusätzlich zur Regulation auf Proteinebene wird die Aspartatkinase durch Threonin oder Homoserin reprimiert (de Robichon-Szulmajster und Corrivaux, 1963, 1964; de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1966). Neben der Kontrolle der Aspartatkinase findet am Verzweigungspunkt des Threonin- und Methionin-Synthese-Wegs eine Regulation der Homoserinkinase statt. Dadurch wird nicht nur der Gesamtfluss über den Aspartat-Weg kontrolliert, sondern auch die Bildung jeder einzelnen Aminosäure (Viola, 2001).

8. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Charakterisierung der an der Glycin-Biosynthese beteiligten Serin-Hydroxymethyltransferasen in *A. gossypii*. Dazu sollte die subzelluläre Lokalisation der beiden Enzyme geklärt werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob durch Veränderung der SHMT-Aktivität eine verbesserte Glycin-Bereitstellung und damit eine Steigerung der Riboflavin-Überproduktion möglich ist. Die Kenntnis der Rolle dieser beiden Enzyme sollte es anschließend ermöglichen, die gesteigerte Riboflavin-Bildung einer Glycin-Antimetabolit-resistenten Mutante zu erklären. Da bei Überexpression des Gens für die Threonin-Aldolase nicht mehr Glycin sondern Threonin limitierend für die Riboflavin-Synthese ist, sollte weiterhin die Threonin-Bereitstellung verbessert werden. Das Schlüsselenzym der Threonin-Biosynthese ist die Aspartatkinase. Das entsprechende Gen sollte aus *A. gossypii* isoliert, sowie dessen Bedeutung für die Riboflavin-Bildung untersucht werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim) oder Sigma (Deisenhofen) in p.A. Qualität bezogen. Ausnahmen sind nachfolgend aufgelistet.

Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK:	ECL™ Western Blotting Analysis System
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg:	L-[3- ¹⁴ C]-Serin
	Hybond-N+ Membran
Difco Laboratories, Detroit, USA:	Bacto Pepton
	Bacto Yeast Nitrogen Base
Euriso-top, Gif-sur-Yvette, Frankreich:	L-Threonin [1- ¹³ C]
	L-Serin [1- ¹³ C]
Invitrogen, Karlsruhe:	SuperScript II Reverse Transkriptase
	ThermoScript RT-PCR System
	Geneticin (G418)-Sulfat
Meylip, Herford:	Sojola Soja-Öl
Millipore, Eschborn:	Ultrafiltrationmembran (Ø 6,2 cm, YM10)
	Nitrozellulosefilter (Ø 4,5 cm; 0,22 µm)
	(Ø 2,5 cm; 0,08 µm)
Novo Industrie, Mainz:	Glucanex
Q-BIOgene, Heidelberg:	Felix 500 bp Molecular Weight Marker
Qiagen, Hilden:	RNeasy Mini Kit
	RNase-Free DNase Set
	Oligotex mRNA Mini Kit
	HiSpeed Plasmid Midi Kit
	DNeasy Plant Maxi Kit
	QIAquick Nucleotide Removal Kit
	QIAquick Gel Extraction Kit
Roth, Karlsruhe:	Roti®-Phenol/Chloroform
Schleicher und Schuell, Dassel:	Nitrocellulose Transfermembran (BA85)
	Rundfilter (Schwarzband, Ø 55 mm)
	Whatman 3 MM Filterpapier
	Faltenfilter (595½, Ø 185 mm)
Serva, Heidelberg:	Agarose für DNA-Elektrophorese
	Coomassie Brilliant Blue G 250

2. Verwendete Stämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme von *E. coli*, *S. cerevisiae* und *A. gossypii*, sowie ihre Eigenschaften sind in **Tab. 1** zusammengestellt. **Tab. 2** zeigt die verwendeten Plasmide.

Tab. 1 Liste der verwendeten Stämme

Stamm	relevanter Geno-/Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1</i> <i>relA1</i>	Hanahan (1985)
<i>S. cerevisiae</i>		
Y00000	MATa <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0	EUROSCARF
Y00187	MATa <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0 YER052::kanMX4	EUROSCARF
<i>A. gossypii</i>		
ATCC 10895	Wildtyp	ATCC
<i>AgSHM1</i> -HA	ATCC 10895 transformiert mit dem 1,8 kb-Fragment, 3HA - <i>S.cerevisiae</i> <i>ADH_T</i> - kanMX6, zur Integration vor <i>SHM1_T</i>	Revuelta (2001)
<i>AgSHM2</i> -HA	ATCC 10895 transformiert mit dem 1,8 kb-Fragment, 3HA - <i>S.cerevisiae</i> <i>ADH_T</i> - kanMX6, zur Integration vor <i>SHM2_T</i>	Revuelta (2001)
<i>AgTEFpSHM1</i>	ATCC 10895 transformiert über REMI mit pAGTGT <i>SHM1</i>	Schlüpen (2000)
<i>Ag</i> Δ <i>SHM1</i> -1; <i>Ag</i> Δ <i>SHM1</i> -2	zwei unabhängige Transformanten von ATCC 10895 transformiert mit pJR1550 <i>SHM1</i> Δ 769::kan	Böddecker (1998)
<i>Ag</i> Δ <i>SHM2</i> -1; <i>Ag</i> Δ <i>SHM2</i> -2	zwei unabhängige Transformanten von ATCC 10895 transformiert mit pJR2427	diese Arbeit
<i>Ag</i> Δ <i>SHM1</i> Δ <i>SHM2</i> -1; <i>Ag</i> Δ <i>SHM1</i> Δ <i>SHM2</i> -2	zwei unabhängige Transformanten von <i>Ag</i> Δ <i>SHM2</i> transformiert mit pJR1550 <i>SHM1</i> Δ 769::kan	diese Arbeit

- Fortsetzung auf Seite 18 -

Tab. 1 Verwendete Stämme -Fortsetzung-

Stamm	relevanter Geno-/Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>A. gossypii</i>		
<i>AgpAG203GLY1</i>	ATCC 10895 transformiert mit pAG203GLY1	Monschau (1998)
<i>AgΔGLY1</i>	ATCC 10895 transformiert mit pUC18Δg/y1::G418 ^R	Monschau (1998)
<i>AgAMPS-NM-01</i>	Aminomethylphosphonsäure ^R , erhöhte Riboflavin-Überproduktion	Monschau (1998)
<i>AgAMPS-NM-01ΔSHM2</i>	<i>AgAMPS-NM-01</i> transformiert mit pJR2427	diese Arbeit
<i>AgΔHOM3</i>	ATCC 10895 transformiert mit pUC18ΔHOM3::G418 ^R	diese Arbeit

Tab. 2 Liste der verwendeten Plasmide und deren Eigenschaften

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pUC18	Amp ^R , <i>lacZ'</i>	Vieira und Messing (1982)
pAG100	Amp ^R , <i>TEF_PG418^R</i> , <i>URA3</i>	Kurth <i>et al.</i> (1992), Steiner und Philippsen (1994)
pJR1742	Bluescript SK+ Vektor mit <i>AgLEU2_P-Hyg^R-AgLEU2_T</i> <i>Bam</i> HI/ <i>Kpn</i> I	Revuelta (2000)
pJR2417	Bluescript SK+ Vektor mit <i>AgSHM2</i> <i>Eco</i> RI/ <i>Eco</i> RV	Revuelta (2000)
pJR2427	pJR2417 <i>Sal</i> I/ <i>Eco</i> RV mit 1,6 kb <i>Hyg^R</i> -Fragment aus pJR1742 <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	diese Arbeit
pJR1550 <i>SHM1Δ768::kan</i>	Bluescript SK+ Vektor mit <i>AgSHM1Δ769::kan</i>	Böddecker (1998)
YEp352	Amp ^R , <i>URA3</i> , <i>lacZ'</i>	Hill <i>et al.</i> (1986)
YEp352-Genbank	YEp352 mit partiell <i>Sau</i> 3A-geschnittenen, in die <i>Bam</i> HI-Stelle klonierten Fragmenten chromosomaler <i>A. gossypii</i> -DNA	Maeting <i>et al.</i> (1999)

- Fortsetzung auf Seite 19 -

Tab. 2 Liste der verwendeten Plasmide und deren Eigenschaften -Fortsetzung-

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
YEp352 GB-28-1-1	YEp352 mit <i>AgHOM3</i> auf einem 6,5 kb-Fragment	diese Arbeit
pUC18 <i>HOM3</i>	pUC18 + 3,4 kb-Fragment aus YEp352 GB-28-1-1 <i>Bst</i> XI/ <i>Eco</i> RI	diese Arbeit
pUC18 Δ <i>HOM3</i> ::G418 ^R	pUC18 <i>HOM3</i> <i>Pst</i> I/ <i>Bcl</i> I mit 2,1 kb <i>TEF</i> _p G418 ^R -Fragment aus pAG100 <i>Sal</i> I	diese Arbeit

3. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien sind nachfolgend aufgelistet. Zur Herstellung von Agarplatten wurden die Nährmedien mit 20 g/l Agar ergänzt. Zur Selektion wurde dem autoklavierten Medium 400 µg/ml G418 (*A. gossypii* und *S. cerevisiae*) bzw. 50 µg/ml Ampicillin oder Kanamycin (*E. coli*) zugesetzt. Eine Stammlösung der Antibiotika wurde dazu steril filtriert (Acrodisc, Ø 25 mm; 0,2 µm; Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor, USA) und dem auf 50 °C abgekühlten Medium zugefügt.

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

10	g/l	Trypton
10	g/l	NaCl
5	g/l	Hefeextrakt

2 x TY-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

16	g/l	Trypton
10	g/l	Hefeextrakt
5	g/l	NaCl

YPD-Medium (Sherman *et al.*, 1986)

10	g/l	Hefeextrakt
20	g/l	Pepton
20	g/l	Glucose

SD-Medium (Sherman *et al.*, 1986)

6,7	g/l	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
je 20	mg/l	L-Histidin, L-Methionin, Uracil
30	mg/l	L-Leucin
200	mg/l	L-Threonin
20	g/l	Glucose

HA-Vollmedium (Stahmann *et al.*, 1994)

10	g/l	Hefeextrakt
10	g/l	Glucose bzw. Sojaöl

MA2-Vollmedium (Steiner, 1991)

10	g/l	Pepton
10	g/l	Glucose
1	g/l	Hefeextrakt
0,3	g/l	<i>myo</i> -Inosit

Mineralsalz-Medium (MM) (Monschau *et al.*, 1998)

Lösung A: 200 g/l KH_2PO_4 pH 6,7 mit KOH
(100fach)

Lösung B: 15 g/l NH_4Cl
(10fach) 5 g/l L-Asparagin-Monohydrat
4 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
2,5 g/l Nikotinsäureamid
2 g/l Hefeextrakt
2 g/l NaCl
1 g/l *myo*-Inosit
0,5 g/l $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
0,4 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
25 g/l Glucose

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte bei 37 °C entweder in Reagenzgläsern mit 3 ml 2 x TY-Medium bei 170 rpm (ISF-4-W, Kühner, Birsfelden, CH) oder in 500 ml Schikanekolben mit 100 ml 2 x TY-Medium bei 120 rpm (Certomat R, B. Braun Biotech, Melsungen). Die Stämme wurden auf LB-Stammhaltungsplatten bei 4 °C gelagert.

S. cerevisiae wurde in 500 ml Schikanekolben mit 100 ml YPD- oder SC-Medium bei 30 °C und 120 rpm (ISF-4-W, Kühner) kultiviert. Die Lagerung der Stämme erfolgte auf Stammhaltungsplatten bei 4 °C oder in Form von Glycerin-Kulturen (30 % Glycerin-Endkonzentration) bei -70°C.

Die Kultivierung von *A. gossypii* erfolgte in 500 ml-Kolben mit Schikanen mit 100 ml HA-Vollmedium oder Minimalmedium bei 30 °C und 120 rpm (Pilot-Shake, B. Braun, Melsungen). Vorkulturen zur Bereitstellung von Myzel als Inokulum wurden über Nacht in HA-Vollmedium gezüchtet. Um homogene Vorkulturen zu erhalten, wurde das Myzel von Stammhaltungsplatten mit Hilfe von Glasperlen ($\varnothing$ 3 mm) in Medium zerkleinert. Die Hauptkulturen wurden immer mit 1 % ihres Volumens angeimpft. Die Lagerung der

A. gossypii-Stämme erfolgte auf Stammhaltungsplatten, die bei 4 °C gelagert und alle 28 Tage neu überimpft wurden. Zusätzlich lagerten die Stämme in Form von Glycerin-Kulturen (30 % Glycerin-Endkonzentration) bei -70 °C.

4. Molekularbiologische Methoden

4.1 Präparation und Reinigung von DNA

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

Mini-Plasmidpräparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde eine modifizierte Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979) verwendet. Eine 3 ml-Übernachtskultur (2 x TY-Medium + 50 µg/ml Ampicillin) wurde durch Zentrifugation (2 min, 20.000 x g) geerntet. Das Zell-Pellet wurde in 100 µl Lösung A vollständig resuspendiert und für 5 min im Schüttler (Thermomixer 4536, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung B (1 min Schütteln, 5 min Eisbad) wurden die Zellen lysiert. Zur Proteinfällung wurde das Lysat mit 150 µl Lösung C gründlich durchmischt (1 min Schütteln) und 5 min im Eisbad inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 20.000 x g, 4 °C) wurde der Überstand mit 450 µl Roti-Phenol/Chloroform versetzt (5 min Schütteln) und zur Phasentrennung 5 min bei 12.000 rpm erneut zentrifugiert (Tischzentrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg). Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde die obere Phase mit 800 µl absolutem Ethanol vermischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugation (5 min, 20.000 x g) pelletiert und zur Entfernung von Salzresten mit 70 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend in 50 µl TE+-Puffer gelöst. Die Mini-Plasmidpräparationen führten zu DNA-Konzentrationen von etwa 100 ng/µl.

<u>Lösung A:</u>	50	mM	Glucose	
	25	mM	Tris/HCl	pH 8,0
	10	mM	EDTA	
<u>Lösung B:</u>	0,2	N	NaOH	
	1	%(w/v)	SDS	
<u>Lösung C:</u>	5	M	Kaliumacetat	
	1,8	M	Essigsäure	
<u>TE+-Puffer:</u>	10	mM	Tris/HCL	pH 8,0
	1	mM	EDTA	
	20	µg/ml	RNase A	

Midi-Plasmidpräparation

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des *HiSpeed Plasmid Midi Kits* isoliert. Dazu wurden 50 ml einer Übernachtskultur (2 x TY-Medium + 50 µg/ml Ampicillin) als Ausgangsmaterial verwendet. Nach der Elution der Plasmid-DNA wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech, Cambridge, GB) durchgeführt. Die DNA-Konzentrationen dieser Plasmid-Präparation lagen bei 200 bis 400 µg/ml.

4.1.2 Isolierung genomischer DNA aus *A. gossypii*

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *A. gossypii* wurde der *DNeasy Plant Maxi Kit* verwendet. Durch Filtration (Rundfilter, Schwarzband) wurde 1 g Myzel (Feuchtgewicht) geerntet und in flüssigem Stickstoff pulvrig gemahlen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Mit dieser Methode wurden durchschnittliche DNA-Mengen von 400 µg erhalten.

4.1.3 Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Mit dieser Methode werden neben der chromosomalen DNA auch frei replizierende Plasmide aus *S. cerevisiae* erhalten. Mit einer Impföse wurden die Zellen von einer Agarplatte abgekratzt und anschließend in 200 µl Lösung A suspendiert. Nach Zugabe von sterilen Glaskugeln (Ø 0,5 mm) wurden die Zellen durch starkes Vortexen aufgeschlossen (2 min, Rt). Zur Aufreinigung der DNA wurde eine doppelte Phenol/Chloroform- (je 300 µl Roti-Phenol/Chloroform) und eine einfache Chloroform/Isoamylalkohol- (24:1; 250 µl) Extraktion durchgeführt. Die Fällung der DNA erfolgte mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,0) und 2,5 Volumen absolutem Ethanol bei -20 °C für 15 min. Die DNA wurde durch Zentrifugation (15 min, 20.000 x g, 4 °C) pelletiert und das Pellet mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Die DNA wurde bei Rt getrocknet und in 20 µl Lösung B gelöst.

<u>Lösung A:</u>	100	mM	NaCl
	10	mM	Tris/HCl pH 8,0
	1	mM	EDTA
	0,1	%	SDS
<u>Lösung B:</u>	100	µl	H ₂ O
	20	µl	RNase A-Lösung (2 mg/ml)

4.2 Analyse, Rekombination und Modifikation von DNA

4.2.1 Restriktion von DNA

DNA wurde zur Charakterisierung und Klonierung mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Entsprechend den Herstellerangaben (Roche) wurden Inkubationspuffer und Reaktionstemperaturen für die einzelnen Restriktionsenzyme gewählt. Ein 10 µl Standardansatz enthielt 100 – 200 ng DNA, 0,1 Volumen 10fach Reaktionspuffer und 10 U des jeweiligen Restriktionsenzym. Nach 3 h Inkubation wurde ein 6fach konzentrierter DNA-Ladepuffer zugegeben. Die gelelektrophoretische Trennung der DNA-Fragmente erfolgte in 0,8 bis 2 %igen (w/v) Agarosegelen unter Verwendung eines TAE-Puffersystems (Sambrook *et al.*, 1989).

<u>TAE-Puffer:</u>	40	mM	Tris/HCl	pH 8,0
	10	mM	Natriumacetat	
	1	mM	EDTA	
<u>Ladepuffer:</u>	0,25	%(w/v)	Bromphenolblau	
	30	%(v/v)	Glycerin	

4.2.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Dabei wurden die DNA-Fragmente durch Bindung an eine Säule konzentriert.

4.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden in linearisierte Vektoren mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Roche) eingebracht. Die linearisierte Vektor-DNA wurde gegebenenfalls zuvor mit alkalischer Phosphatase (Roche) behandelt, um die Rezirkularisierung des Plasmids bei der Ligation zu minimieren. Ein 20 µl Ligationsansatz enthielt 25 – 100 ng linearisierte, dephosphorylierte Vektor-DNA, im fünffachen Überschuss Fragment-DNA (50 – 300 ng), 0,1 Volumen 10fach Ligationspuffer sowie 1 U T4-DNA-Ligase. Nach einer Inkubationsdauer von 16 h bei 16 °C wurde der Ligationsansatz direkt zur *E. coli*-Transformation eingesetzt.

4.2.4 Abbau überhängender DNA-Enden mit Klenow-Polymerase

Die Klenow-Polymerase besitzt als carboxyterminales Teilfragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* sowohl 5'-3'-DNA-Polymerase- als auch 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Somit können zum einen durch Restriktionsverdau entstandene überhängende 5'-Enden unter

Zugabe der entsprechenden freien Desoxynukleotide zu glatten Enden aufgefüllt, zum anderen überhängende 3'-Enden zu glatten Enden abgebaut werden. Der 10 µl Standardansatz nach Sambrook *et al.* (1989) mit linearisierter Plasmid-DNA, 0,1 Volumen 10fach Reaktionspuffer, 0,1 Volumen dNTP-Mix (je 2 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP) und 2 U Klenow-Fragment wurde 30 min bei 37 °C inkubiert.

<u>Reaktionspuffer:</u>	500	mM	Tris/HCl	pH 7,5
(10fach)	100	mM	MgSO ₄	
	1	mM	DTT	
	0,5	mg/ml	BSA	

4.2.5 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA-Fragmenten nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase oder auch nach Behandlung mit Klenow-Polymerase erfolgte mit Hilfe des *QIAquick Nucleotide Removal Kits* (Qiagen). Es wurde den Angaben des Herstellers entsprechend vorgegangen.

4.3 Transformationstechniken

4.3.1 Transformation von *E. coli*

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine modifizierte Methode von Sambrook *et al.* (1989) verwendet. Eine 100 ml *E.coli*-Kultur (LB-Medium) wurde bei einer OD₅₅₀ zwischen 0,4 und 0,5 durch Zentrifugation für 10 min bei 3.000 rpm und 4 °C (Multifuge 3 S-R, Kendro, Osterode) geerntet. Das Zellpellet wurde in 30 ml eiskalter Lösung A resuspendiert und 15 min im Eisbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert, das Pellet in 4 ml Lösung B aufgenommen und anschließend in 200 µl-Fraktionen bei -70 °C eingefroren.

<u>Lösung A:</u>	100	mM	RbCl ₂	
	50	mM	MnCl ₂	
	30	mM	Kaliumacetat	
	10	mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	
	15	%(v/v)	Glycerin	pH 5,8 mit Acetat
<u>Lösung B:</u>	75	mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	
	10	mM	MOPS	pH 7,0 mit NaOH
	10	mM	RbCl ₂	
	15	%(v/v)	Glycerin	

Zur Transformation wurden die kompetenten Zellen bei Rt aufgetaut und 5 min auf Eis gelagert. Jeweils 100 µl der Zellsuspension wurden anschließend mit 10 µl eines Ligationsansatzes für 20 min im Eisbad inkubiert. Nach einem 90 s Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad wurden die Zellen 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium erfolgte die Regeneration der Zellen für 50 min bei 37 °C unter ständigem Schütteln (Thermomixer 4536). Die Zellen wurden 5 min bei 2.000 rpm (5415C Eppendorf, Hamburg) pelletiert und nach Abnahme von 500 µl Überstand in den verbleibenden 200 µl resuspendiert. Die gesamte Suspension wurde auf Selektionsmedium ausplattiert.

4.3.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach einer Methode von Dohmen *et al.* (1991). Hierzu wurden Hefezellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,7 in 50 ml YPD-Vollmedium kultiviert, durch 5 min Zentrifugation bei 2.000 rpm (Multifuge 3 S-R) geerntet, mit 25 ml Lösung A gewaschen und in 1 ml dieser Lösung resuspendiert. In Aliquots von 200 µl konnte die Zellsuspension bis zur Transformation bei –70 °C aufbewahrt werden. Je Transformationsansatz wurde ein Aliquot mit 0,1 - 5 µg der zu transformierenden DNA und 50 µg Heringssperma-DNA (Sigma) zur Erhöhung der Transformationseffizienz versetzt. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C unter Schütteln (Thermomixer 5436, Eppendorf) wurde der Ansatz mit 1 ml Lösung B gemischt und 1 h bei 30 °C inkubiert. Nach Pelletierung durch Zentrifugation (5 min, 3.000 rpm) wurden die Zellen mit 1 ml Lösung C gewaschen und anschließend in 100 µl dieser Lösung aufgenommen. Der gesamte Ansatz wurde danach auf einer Selektionsplatte ausgestrichen.

<u>Lösung A:</u>	1	M	Sorbit	
	10	mM	Bicin/NaOH	pH 8,35
	3	%	Polyethylenglycol 1000	
<u>Lösung B:</u>	200	mM	Bicin/NaOH	pH 8,35
	40	%	Polyethylenglycol 1000	
<u>Lösung C:</u>	150	mM	NaCl	
	10	mM	Bicin/NaOH	pH 8,35

4.3.3 Transformation von *A. gossypii*

Die Transformation von *A. gossypii* erfolgte durch Elektroporation des Myzels mit linearisierten DNA-Fragmenten (Monschau, 1998). Zur Anzucht der Zellen wurden 100 ml HA-Medium im 500 ml-Kolben mit Schikanen angeimpft und über Nacht inkubiert (30 °C, 120 rpm). Das Pilzmyzel wurde durch Filtration geerntet, mit 40 ml Lösung A gewaschen und in 40 ml Lösung A resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 30 min im 27 °C-Wasserbad.

Das geerntete Myzel wurde mit 40 ml eiskalter Lösung B gewaschen. Die Zellen wurden danach so lange mit Lösung B versehen, bis eine dickflüssige Suspension entstand. 150 µl dieser Zellsuspension wurden mit 5 bis 10 µg der zu transferierenden DNA vermischt und in 2 mm Elektroporationsküvetten eingefüllt. Die Elektroporation erfolgte mit einem *Gene Pulser* (Bio-Rad, München), unter den unten aufgeführten Bedingungen. Nach dem Elektropuls wurden sofort 500 µl MA2-Medium zugefügt und der Ansatz durchmischt. Anschließend wurde die Suspension auf MA2-Platten ausplattiert und diese zur Regeneration der Zellen und zur Ausprägung des Resistenzgens für 6 h bei 30 °C inkubiert. Zur Selektion wurden die Platten anschließend mit 6 ml Topagar überschichtet. Transformanten konnten nach 3 bis 7 Tagen Inkubation bei 30 °C isoliert werden.

<u>Transferbedingungen:</u>	Spannung:	1,5 kV/cm; Kapazität:	25 µF
<u>Lösung A:</u>	50 mM	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	pH 7,5
	25 mM	DTT	
<u>Lösung B:</u>	270 mM	Saccharose	
	10 mM	Tris/HCl	pH 7,5
	1 mM	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	
<u>Topagar:</u>	6 ml	MA2-Vollmedium	
	60 mg	low melting Agarose	
	9 mg	G418	

4.4 RT-PCR

4.4.1 Isolierung von total-RNA aus *A. gossypii*

Mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* wurde total-RNA isoliert. Das Myzel wurde nach Kultivierung im HA-Vollmedium geerntet. Ein Ansatz zur Isolierung von total-RNA enthielt 0,2 g Myzel (Feuchtgewicht), 1 ml Glaskugeln (Ø 0,5 mm) und 1 ml des Lysepuffers (*RLT-Puffer*) in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß. Die Zellen wurden per Kugelmühle (Typ MM2, Retsch, Haan) in 5 min bei maximaler Intensität aufgeschlossen. Anschließend wurde der Ansatz bei 4 °C für 5 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes (ca. 600 µl) wurde 1 Volumen 70 % (v/v) Ethanol zugegeben und weiter nach Herstellerangaben des *RNeasy Kits* vorgegangen. Zusätzlich erfolgte eine DNase-Behandlung mit einem zum Kit kompatiblen System des gleichen Herstellers (*RNase-Free DNase Set*). Die total-RNA wurde mit 50 µl H₂O von der Säule eluiert. Diese Methode erzielte durchschnittliche total-RNA-Mengen von 80 µg.

4.4.2 Reverse Transkriptions-Reaktion

Zunächst wurde die total-RNA 10 min bei 65 °C im Wasserbad erhitzt. 5 µg total-RNA wurden mit 1 µl Oligo(dT₁₅)-Primer (500 µg/ml) und H₂O auf 12 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach Inkubationen für 10 min bei 65 °C und 3 min auf Eis erfolgte die Zugabe folgender Lösungen:

4 µl	5 x	Erst Strang Puffer
2 µl	100 mM	DTT
1 µl	10 mM	dNTP-Mix

Der Ansatz wurde 2 min bei 44 °C im Wasserbad erhitzt. Dann wurden 200 U *SuperScript II* (Promega) reverse Transkriptase zugegeben und 90 min bei 44 °C inkubiert. Abschließend wurde der Ansatz erhaltene cDNA mit 80 µl H₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt.

4.4.3 PCR mit *A. gossypii*-cDNA

Die Amplifikation der cDNA mittels PCR ist ein indirekter Nachweis der entsprechenden mRNA. In einem 50 µl Reaktionsansatz wurden zwei Primerpaare verwendet, die zum einen spezifisch für die mRNA eines konstitutiv exprimierten Gens (*ACT1*) und zum anderen spezifisch für die *SHM1*- oder *SHM2*-mRNA waren. Als Matritze diente die cDNA einer RT-Reaktion. Ein PCR-Ansatz enthielt folgende Reagenzien:

2 µl	cDNA	
5 µl	PCR-Puffer	(10fach)
je 2 µl	Primerpaar <i>ACT1</i>	(je 10 pmol/µl)
je 2 µl	Primerpaar <i>SHM1</i> oder <i>SHM2</i>	(je 10 pmol/µl)
1 µl	dNTP-Mix	(10 mM)
0,8 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (Roche)	(4 U)
33,2 µl	H ₂ O	

Die Amplifikation wurde im PTC-100TM Programmable Thermal Controller der Firma MJ Research (Watertown, USA) durchgeführt. Die PCRs erfolgten nach folgendem Temperaturprofil:

Start:	94 °C	1 min
23 Zyklen:	94 °C	30 s
	57 °C	30 s
	72 °C	30 s
Ende:	72 °C	10 min

II. MATERIAL UND METHODEN

Nach den PCRs wurden 10 µl von jedem Ansatz mit 2 µl 6 x DNA-Ladepuffer vermischt und die Reaktionsprodukte mit einem 2 %igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt.

Tab.3 Nukleotidsequenzen der RT-PCR-Oligonukleotide

Bezeichnung		Sequenz (5'- 3')	Position	EMBL Accession Number	PCR- Produkte [bp]
ACT	for	CTTCTACGTGTCCATTCAGG	126 - 145	AJ131713	654
	rev	AGAGAGGCCAAGATAGAACC	779 - 760		
RTSHM1	for	CGTACATCTCCAAGTACTTCC	526 - 546	AJ438778	593
	rev	ATAGCAGATGTGTATCAGTTCC	1119 - 1098		
RTSHM2	for	ATCAAGGATGAAATTGACAGGC	81 - 102	AJ438779	578
	rev	CATGTCGACCATCAGGTACG	659 - 640		

4.5 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten und zur Modifizierung von Plasmiden wurde eine PCR mit Hilfe des *Expand Long Template PCR Systems* (Roche) durchgeführt. Der 50 µl Standardansatz bestand aus 1 – 5 ng der zu amplifizierenden DNA, 0,1 Volumen 10fach PCR-Puffer, 0,02 Volumen dNTP-Mix (je 2 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP), je 10 pmol/µl Primer und 1,5 U *Expand Long Template PCR Polymerase*. Die PCR-Bedingungen wurden der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes angepasst. Sämtliche für die PCR verwendeten Oligonukleotide sind in **Tab.4** aufgelistet.

Tab.4 Nukleotidsequenzen der bei der PCR verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'- 3')
SHM2afor	CCAGCATCAACGAGCGAAGTA
SHM2arev	CTGATTGCGTCGGAGAACTTGA
SHM1-UP	AAGCCGCACAGTGTTGCACGAAGGCGTATG
SHM1-DOWN	TGTTTCTGGCCCTGTAACCAATAATTCATG
ΔHOM3-for	GGTGATACGATACCATAACC
ΔHOM3-rev	GCAGCAGTGCGCAACTGC
SondeΔHOM3for	GCTGGTGGGACCTAGTGC
SondeΔHOM3rev	GGATTCAGTCGTCACATCATGG

4.6 Southern-Blot-Analyse

Zur Untersuchung der *A. gossypii*-Transformanten wurden DNA:DNA-Hybridisierungen nach Southern (1975) durchgeführt. Dazu wurde die restringierte genomische DNA zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert, immobilisiert und mit

spezifischen Sonden hybridisiert. Die DNA:DNA-Hybride konnten anschließend durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden.

4.6.1 Vakuumunterstützter Transfer genomischer DNA

Der Transfer der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) erfolgte durch vakuumunterstützte Diffusion (Gross *et al.*, 1988) mit einem VacuGen Blotting System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Das Gel wurde nacheinander für jeweils 20 min mit Depurinierungslösung, Denaturierungslösung und 5 min mit Neutralisierungslösung behandelt. Der DNA-Transfer auf die Membran erfolgte für 40 min mit 20 x SSC. Anschließend wurde die Nylonmembran zwischen *Whatman 3MM Filterpapier* (Schleicher und Schuell) getrocknet. Die DNA wurde zur Fixierung auf der Membran mit UV-Licht (1,2 Joule; Stratalinker, Stratagene, Amsterdam, NL) bestrahlt.

<u>Depurinierungslösung:</u>	0,3	M	HCl	
<u>Denaturierungslösung:</u>	1,5	M	NaCl	
	0,5	M	NaOH	
<u>Neutralisierungslösung:</u>	2	M	NaCl	
	1	M	Tris/HCl	pH 5,0
<u>20 x SSC:</u>	3	M	NaCl	
	0,3	M	Natriumcitrat/HCl	pH 7,0

4.6.2 Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden

DNA-Sonden wurden mit dem *DIG DNA Labeling and Detection Kit* (Roche) basierend auf der *random-primed*-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983) markiert. Diese Markierungsmethode beruht auf dem Einbau von Digoxigenin-desoxy-11-uridinmonophosphat in die Proben-DNA mit anschließendem Nachweis des Hybrides durch einen Enzym-Immunoassay. Zunächst wurde die Matrizen-DNA (0,1 - 1 µg) durch 10 min Inkubation bei 95 °C und Abkühlen auf Eis denaturiert. Der Standardansatz (20 µl) enthielt neben der Matrizen-DNA einen Hexanukleotid-Mix sowie einen dNTP-Markierungs-Mix mit je 0,1 mM dATP, dCTP, dGTP sowie 0,065 mM dTTP und 0,035 mM DIG-UTP sowie 2 U Klenow-Enzym. Nach Inkubation des Reaktionsansatzes über Nacht bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 Volumen 0,2 M EDTA (pH 8,0) abgestoppt und die DNA mit 2,5 Volumen Ethanol in Gegenwart von 0,1 Volumen 5 M LiCl in 2 h bei -20 °C gefällt. Das Präzipitat wurde durch 10 min Zentrifugation bei 13.000 rpm sedimentiert, mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und nach Trocknung an der Luft in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

4.6.3 Hybridisierung der genomischen DNA mit einer markierten DNA-Sonde

Für die folgenden beschriebenen Prähybridisierungen, Hybridisierungen und Waschschrte wurde die Membran mit der jeweiligen Lösung in einem Glasröhrchen inkubiert. Das Glasröhrchen wurde dazu in einem Hybridisierungssofen gedreht. Bei der Hybridisierung bindet die einzelsträngige DNA-Sonde an homologe DNA-Sequenzen auf der Membran. Um unspezifische Bindungen der Sonde zu verhindern, wurde die Membran zunächst für 6 h bei 68 °C mit Hybridisierungslösung inkubiert. 20 ml dieser Lösung wurden dann zur Hybridisierung über Nacht mit der DIG-markierten, für 10 min bei 95 °C denaturierten DNA-Sonde, versetzt. Unspezifisch gebundene DNA wurde nachfolgend durch je zweimaliges Waschen mit 100 ml Waschlösung I bei Rt und mit 100 ml Waschlösung II bei 68 °C entfernt.

<u>Hybridisierungslösung:</u>	1	%(w/v)	Blocking Reagenz
(in 5 x SSC)	0,1	%(w/v)	Natrium-Lauroylsarcosin
	0,02	%(w/v)	SDS

<u>Waschlösung I:</u>	0,1	%(w/v)	SDS
(in 2 x SSC)			

<u>Waschlösung II:</u>	0,1	%(w/v)	SDS
(in 0,1 x SSC)			

4.6.4 Detektion von DNA-DNA-Hybriden

Die Detektion der Hybridisierungsbanden erfolgte mit Hilfe des *DIG DNA Labeling and Detection Kits* (Roche) nach den Produktinformationen des Herstellers. Die Membran wurde zunächst 1 min mit Puffer A gewaschen und dann 30 min bei Rt in Puffer B inkubiert. Anschließend wurde der Filter wiederum 1 min mit Puffer A gewaschen und daraufhin 30 min bei Rt mit der Antikörper-Konjugat-Lösung (150 mU Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugat in Puffer A) inkubiert. Nach zwei 15 min Waschschrten mit je 100 ml Puffer A bei Rt wurde die Membran 2 min in Puffer C äquiliert. Zur Farbdetektion wurde der Filter mit 10 ml Färbelösung im Dunkeln inkubiert und die Reaktion durch Waschen in TE-Puffer abgestoppt.

<u>Puffer A:</u>	150	mM	NaCl	
	100	mM	Tris/HCl	pH 7,5

<u>Puffer B:</u>	0,5	%(w/v)	Blocking Reagenz in Puffer A
------------------	-----	--------	------------------------------

<u>Puffer C:</u>	100	mM	NaCl	
	100	mM	Tris/HCl	pH 9,5
	50	mM	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	

<u>Färbelösung:</u>	10	ml	Puffer C
	45	µl	4-Nitroblautetrazoliumchlorid (75 mg/ml in Dimethylformamid)
	35	µl	X-Phosphat-Lösung (50 mg/ml in Dimethylformamid)

5. Biochemische und zellbiologische Methoden

5.1 Herstellung von zellfreien Rohextrakten aus *A. gossypii*

Zur Herstellung der Rohextrakte wurde Myzel durch Filtration über einen Papier-Rundfilter geerntet und in Aufschlußpuffer im Verhältnis 1:2 bis 1:5 (Feuchtgewicht : Puffervolumen) resuspendiert. Die Zellen wurden nach Cooper (1981) per French Press (Aminco, Silver Spring, USA) unter einem Druck von 20.000 psi (138.000 kPa) aufgeschlossen. Nach 20 min Zentrifugation des Homogenats bei 20.000 g und 4 °C konnte der Überstand zur Bestimmung der Enzymaktivitäten eingesetzt werden.

5.2 Bestimmung von Enzymaktivitäten

5.2.1 Enzymaktivitäten von Hexokinase, Katalase, Fumarase und Cytochrom c Oxidase

Die Aktivitäten der Marker-Enzyme zur subzellulären Lokalisation wurden in kontinuierlichen Enzymtests photometrisch (Ultrospec®3100, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England) bestimmt. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und die Messbedingungen sind in **Tab. 5** zusammengefaßt.

Tab.5 Testansätze und Messbedingungen der photometrischen Enzymtests.

Enzym	Testansatz	Substrat	Wellenlänge Temperatur Extinktions- koeffizient	Referenz
Hexokinase (EC 2.7.1.1)	50 mM Tris/HCl pH 7,5 30 mM MgCl ₂ 2,5 mM NADP 5 mM ATP pH 7,5 0,35 U G-6P-DH	50 mM Glucose	340 nm 30 °C 6,3 mM ⁻¹ cm ⁻¹	Easterby, Quadri (1982)
Katalase (EC 1.11.1.6)	50 mM Kaliumphosphat pH 7,0	300 mM H ₂ O ₂	240 nm 30 °C 40 mM ⁻¹ cm ⁻¹	Aebi (1974)

II. MATERIAL UND METHODEN

Fumarase (EC 4.2.1.2)	100 mM Tris/HCl pH 7,5	50 mM L-Malat	240 nm 30 °C 40 mM ⁻¹ cm ⁻¹	Wells, Lees (1991)
Cytochrom c Oxidase (EC 1.9.3.1)	50 mM Kaliumphosphat pH 7,2	0,038 mM Cytochrom c (reduziert mit Natrium- dithionit)	550 nm 30 °C 21,1 mM ⁻¹ cm ⁻¹	Smith, L. (1955)

5.2.2 Enzymaktivität der SHMT

Der radioaktive Enzymtest nach Geller und Kotb (1989) beruht auf der Fähigkeit von Tetrahydrofolsäurederivaten an DEAE-Ionenaustauscherpapier zu binden (Blakley, 1969). Das im Verlauf der SHMT-Reaktion aus [3-¹⁴C]-Serin gebildete N⁵, N¹⁰-[¹⁴C]-Methylen-THF wurde durch Auftragen des Reaktionsansatzes auf DEAE-Cellulose-Filter, anschließendes Waschen zur Entfernung des markierten Serins und Bestimmung der an den Filter gebundenen Radioaktivität quantifiziert.

Reaktionsansätze mit der nachfolgend angegebenen Zusammensetzung und einem Gesamtvolumen von 100 µl wurden 10 min bei 30 °C inkubiert. Bei t = 0 und t = 10 min wurde je ein 25 µl Aliquot der Reaktionsansätze auf einen DEAE-Cellulose-Filter (Ø 3 cm, *Whatman DE 81*) aufgetragen. Die Filter wurden anschließend 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und 4 x 5 min sowie 2 x 30 min mit je 150 ml *Aqua dest.* gewaschen. Nach erneuter Trocknung der Filter (45 min, 75 °C) wurde die gebundene Radioaktivität in 5 ml Szintillationscocktail (Ultima Gold XR, Packard, Frankfurt/Main) in einem Szintillationszähler der Firma Packard, Frankfurt/Main (Tri-Carb 4530) bestimmt.

<u>Reaktionsansatz:</u>	50	mM	Tris/HCl	pH 8,0
(100 µl)	0,2	mM	Serin	
	0,024	mM	[3- ¹⁴ C]-Serin	
	2	mM	Tetrahydrofolat	
	0,25	mM	Pyridoxal-5'-phosphat	
	2,5	mM	EDTA	pH 8,0
	3	mM	1,4-Dithiothreitol	
	0,25-1	mg/ml	Protein (aus Rohextrakt)	

Die spezifische Aktivität des eingesetzten [3-¹⁴C]-Serins betrug 54 mCi/mmol. Zum Einsatz im Reaktionsansatz wurde eine 2 %ige alkoholische Lösung des [3-¹⁴C]-Serins zuvor in einem *Speed Vac Concentrator* (Bachofen, Reutlingen) getrocknet.

Bis zu einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml im Testansatz bestand bei diesem Test ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter Proteinmenge und Enzymaktivität. Um eine zu starke Verdünnung des eingesetzten [3-¹⁴C]-Serins durch unmarkiertes Substrat zu

vermeiden, wurde die Serinkonzentration in diesem Enzymtest jedoch weit unterhalb der Substratsättigung gehalten, so dass es sich bei den so ermittelten Enzymaktivitäten nicht um $v_{\max}$ -Werte handelte.

5.2.3 Enzymaktivität der Aspartatkinase

Zum Einsatz im Aspartatkinase-Test wurde der Rohextrakt zunächst auf 0,1 Volumen mit Hilfe der Ultrafiltrationsmembran YM10 (molekulare Ausschlussmasse von 10 kDa) im Modell 202 (Amicon, Eschborn) unter 2 bar Argon aufkonzentriert. Das Konzentrat wurde anschließend über eine Sephadex® G-25-Säule (NAP-10, Pharmacia Biotech, Uppsala, S) entsalzt. Die spezifische Aktivität der Aspartatkinase wurde in einem diskontinuierlichen Test nach einer modifizierten Methode von Black and Wright (1955) ermittelt. In den 900 µl-Reaktionsansatz wurden zum Rohextrakt Lösungen der Substrate ATP (Lösung B) und Aspartat (Lösung C) auf Eis zupipettiert. Durch Zugabe einer konzentrierten Hydroxylamin-Lösung (Lösung A) wurde das gebildete instabile L-Aspartyolphosphat in das stabile L-Aspartyldihydroxamat umgewandelt (Lipman und Tuttle, 1945). Nach 10 min Reaktionszeit bei 30 °C wurde das Dihydroxamat im Probenansatz durch Zugabe von 600 µl eines Farbreagens (Lösung D) derivatisiert. Nach Zentrifugation (10 min, 13.000 rpm) wurde die Extinktion des gebildeten Produkts bei 546 nm gegen einen Blindwert gemessen. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität wurde eine Kalibrierungsgerade erstellt (Lösung E), die definierte Mengen an L-Aspartyldihydroxamat (0; 0,2; 0,4; 0,6; 1,0 µmol) enthielt.

Reaktionsansatz:

<u>Lösung A:</u>	614	mM	Hydroxylamin	
(400µl)	100	mM	Tris/HCl	pH 7,5
	430	mM	Ammoniumsulfat	
	42	mM	Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	
<u>Lösung B:</u>	13	mM	ATP	
(50 µl)	50	mg/ml	Natriumhydrogencarbonat	
<u>Lösung C:</u>	40	mM	Asparaginsäure	
(300 µl)	1,1	ml	1N NaOH/5ml	
<u>Lösung D:</u>	33	mg/ml	Eisen III-chlorid x 6 H ₂ O	
(600 µl)	5	mg/ml	Trichloressigsäure	
	12,5	ml	konz. HCl-Lösung	
<u>Lösung E:</u>	20	mM	Aspartyldihydroxamat	

5.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung in Rohextrakten wurde photometrisch nach Bradford (1976) durchgeführt. Dabei wurden 100 µl einer entsprechend verdünnten Probe des Rohextraktes mit 1 ml Bradford-Reagenz vermischt und 5 min bei Rt inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Der Proteingehalt wurde anhand einer mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellten Kalibrierungsgerade ermittelt (0, 20, 40, 60, 80 und 100 µg/ml BSA).

<u>Bradford-Reagenz:</u>	85	ml	H ₂ O
	10	ml	<i>ortho</i> -Phosphorsäure
	5	ml	Ethanol
	5	mg	Coomassie Brilliant Blue G 250

Um zu vermeiden, dass ungelöste Partikel die photometrische Messung beeinflussen, wurde die Lösung durch einen Faltenfilter (Schleicher und Schuell) filtriert.

5.4 Lokalisierung von Enzymen

5.4.1 Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Lokalisierung von Enzymen in Zellkompartimenten von *A. gossypii* wurden zunächst aus Protoplasten Organellen isoliert und diese anschließend über Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt. Um ausreichend Myzel zu gewinnen, wurden zwei 1 l Kolben mit Schikanen mit je 300 ml HA-Medium mit Sojaöl gefüllt und jeweils 1 %ig angeimpft. Nach ca. 24 h Wachstum bei 100 rpm und 30 °C wurde das Myzel durch Filtration über Papierfilter geerntet, mit Puffer A gewaschen und in diesem Puffer im Verhältnis 1:5 (w/v) resuspendiert. Protoplasten wurden aus dem Myzel durch ca. 20 min Inkubation mit 2 mg/ml Lysing Enzymes (Sigma) bei 30 °C und 70 rpm (Certomat R, B. Braun, Melsungen) freigesetzt. Um den Zeitpunkt der vollständigen Protoplastierung abzugleichen, wurde die Protoplastenbildung im Mikroskop verfolgt. Die Protoplasten wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 3.000 rpm pelletiert und mit 50 ml Puffer A mit 0,65 M Sorbit gewaschen. Anschließend wurden die Protoplasten in Puffer A mit 0,5 M Sorbit und dem Proteaseinhibitormix Complete® (Roche) resuspendiert und mit einem Potter-Elvehjem Homogenisator (B. Braun, Melsungen) 5 min bei 1.000 rpm geschert. Danach wurden die intakten Protoplasten und Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 5.000 rpm für 10 min abgetrennt und anschließend aus dem Überstand die Organellen durch einen zweiten Zentrifugationsschritt bei 27.000 g für 15 min sedimentiert. Dieses Organellpellet wurde nach Resuspension in 14 ml Puffer B mit einer Spritze in ein Zentrifugenröhrchen (Beckman, München) überführt. Während der Ultrazentrifugation für 75 min bei 29.000 g (L8-70M Ultrazentrifuge, Beckman, München), bildete sich der Gradient

selbst aus. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient durch Anstechen des Zentrifugenröhrchens von oben in je 1 ml Fraktionen mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (LKB Pharmacia, Freiburg) entnommen. In den einzelnen Fraktionen wurden die Enzymaktivitäten gemessen.

<u>Puffer A:</u>	50	mM	MES/KOH	pH 6,4
	1	M	Sorbit	
	1	mM	KCl	
	0,5	mM	EDTA	
<u>Puffer B:</u>	50	mM	MES/KOH	pH 7,2
	230	mM	Saccharose	
	33	%(v/v)	Percoll (Sigma)	
	1	mM	KCl	
	0,5	mM	EDTA	
	2	Tabl.	Complete® (Roche)	

5.4.2. Selektive Permeabilisierung der zellulären Membranen von *A. gossypii*

Mit selektiver Membranpermeabilisierung wird die Lokalisation von cytosolischen im Vergleich zu Organell-lokalisierten Enzymen untersucht. Dies erfolgt durch Behandlung des Myzels mit Digitonin. Digitonin permeabilisiert durch Bindung an Sterole die Membranen der Zellen, so dass zuerst die cytosolischen, dann die peroxisomalen und zuletzt die mitochondriellen Enzyme extrazellulär meßbar werden. Für jeden zu untersuchenden Stamm wurden 10 Kolben mit Schikanen mit je 100 ml HA-Medium mit Glucose 1 %ig angeimpft. Die Kultivierung erfolgte für 16 h bei 120 rpm und 30 °C. Anschließend wurde das Myzel durch Filtration über Papierfilter geerntet und mit 50 ml Aufschlußpuffer gewaschen. Als nächstes wurde in zwei Ansätzen weitergearbeitet.

Im Vergleich zu den permeabilisierten Proben wurde ein Ansatz hergestellt, der für eine 100 %ige Äquilibration der Enzymaktivität stand. Dazu wurde 1 g des Myzels in 2 ml Aufschlußpuffer resuspendiert und mit der French Press aufgeschlossen. Um zu kontrollieren, ob alle Zellen aufgeschlossen worden sind, wurden die Proben unter dem Mikroskop untersucht. Erst nach vollständigem Aufschluß wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (20 min, 15.000 rpm) pelletiert und der Überstand zur Enzymmessung eingesetzt.

Zur Permeabilisierung wurde das gewonnene Myzel in der 10fachen Menge Inkubationspuffer aufgenommen und in Aliquots mit einem Volumen von 10 ml aufgeteilt. Die Aliquots wurden mit 0,01 % und 0,16 % Digitonin (Sigma) versetzt. Die Zellen wurden im Wasserbad bei 30 °C und 180 rpm 10 min permeabilisiert. Nach erfolgter Inkubation wurden

die Zellen durch Filtration (Nitrocellulosefilter $\varnothing$ 2,5 cm, 0,08 μ m; Millipore, Eschborn) abgetrennt. Mit den einzelnen Permeabilisierungsfiltraten wurden Enzymmessungen durchgeführt.

Aufschluss- bzw.

<u>Inkubationspuffer:</u>	50	mM	$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$,	pH 7,4
	1	mM	1,4-Dithiothreitol	
	1	mM	Phenylmethylsulfonylfluorid	
	0,02	mM	Pyridoxal-5'-phosphat	

5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden nach ihrer Größe im denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel im elektrischen Feld aufgetrennt (Laemmli, 1970). In einer Gelelektrophorese-Apparatur (Hoefer SE 400, Serva, Heidelberg) wurde das Trenngel (Acrylamid-Konzentration: 12,5 %) mit dem Sammelgel (Acrylamid-Konzentration: 5 %) überschichtet. Die zu untersuchenden Proben wurden vor dem Auftragen in 5 x Laemmli-Puffer aufgenommen und zur Denaturierung 10 min bei 95 °C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer über Nacht bei 10 mA.

<u>Trenngel (12,5 %):</u>	12,5	ml	Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8)	
(30 ml)	7,5	ml	1,5 M	Tris/HCl pH 8,8
	6,2	ml	H_2O	
	3,2	ml	87 %	Glycerin
	0,3	ml	10 %	SDS
	0,3	ml	10 %	Ammoniumpersulfat
	0,02	ml	TEMED	

<u>Sammelgel (5 %):</u>	2,5	ml	Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8)	
(15 ml)	3,75	ml	0,5 M	Tris/HCl pH 6,8
	8,45	ml	H_2O	
	0,15	ml	10 %	SDS
	0,15	ml	10 %	Ammoniumpersulfat
	0,02	ml	TEMED	

<u>Laufpuffer:</u>	28,86	g	Glycin
(1000 ml)	6,08	g	Tris
	1	g	SDS

5.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western-Blot)

Die zu untersuchenden Proteine wurden vor der Übertragung auf Nitrocellulose-Membran (BA85, Schleicher und Schuell) im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Sämtliche

verwendeten Filterpapiere (*Whatman 3MM*) sowie die Nitrocellulose-Membran wurden vor Gebrauch kurz im Transferpuffer getränkt. Das Acrylamidgel wurde ebenfalls 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Die anschließende Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte für 1,5 h bei 0,8 mA/cm² Gel in der Blot-Apparatur von Pharmacia/LKB. Die Detektion der Proteine wurde mit Hilfe des ECLTM *Western Blotting Analysis System Kits* durchgeführt. Der Antikörper Anti-HA-Peroxidase High Affinity (3F10, Roche) wurde gegen das Zielprotein HA (Häm-Agglutinin) zu einer Endkonzentration von 50 mU/ml eingesetzt. Die detektierten Proteine wurden mit Hilfe des Luminescent Image Analyzer (Fujifilm) sichtbar gemacht.

<u>Transferpuffer:</u>	14,4	g/l	Glycin
	3	g/l	Tris
	10	%	Methanol

5.7 Quantitative Bestimmung von Biotrockenmasse und Riboflavin

Zur Quantifizierung der Biotrockenmasse wurden 50 ml einer Kultur über tarierte Papier-Rundfilter filtriert und mit H₂O gewaschen. Das Myzel wurde auf dem Filter bis zur Gewichtskonstanz bei 110 °C im Trockenschrank getrocknet und anschließend gewogen.

Zur quantitativen Bestimmung des während der Kultivierung sowohl intrazellulär gespeicherten als auch in das Medium ausgeschiedenen Riboflavins wurden 0,5 ml der Kultur mit 2,5 mg Glucanex, einem Enzymcocktail aus Glucanasen und Chitinasen, versetzt und 1 h bei 30 °C unter leichtem Schütteln (Thermomixer 5436) inkubiert. Die durch den Abbau der Zellwand freigesetzten Protoplasten lysierten nach Zugabe von 450 µl H₂O. Das resultierende Homogenat wurde filtriert (Acrodisc, Ø 25 mm; 0,2 µm) und der Riboflavin-Gehalt über HPLC (Merck, Darmstadt) unter den nachfolgend beschriebenen Trennbedingungen gemessen (Schmidt *et al.*, 1996).

Säule:	LiCrospher 100RP-18 (5 µm) (Merck, Darmstadt)		
Laufmittel:	50	mM	NaH ₂ PO ₄ (pH 3,0 mit H ₃ PO ₄ eingestellt)
	1	mM	Tetramethylammoniumchlorid
	12	%(v/v)	Acetonitril
Fluss:	1 ml/min		
Elution:	isokratisch		
Detektion:	270 nm (Merck/Hitachi L-4200 UV-VIS Detektor)		

5.8 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren

Die quantitative Aminosäurebestimmung in Kulturmedien sowie in enzymatischen Testansätzen erfolgte mittels *Reversed-Phase*-Chromatographie. Verwendet wurde eine HPLC-Anlage der Firma Agilent Technologies (Waldbronn) vom Typ Agilent 1100 Series. Die

Aminosäuren wurden über eine automatische Vorsäulenderivatisierung mit *ortho*-Phtaldialdehyd zu stark fluoreszierenden Isoindolen umgesetzt (Sternson *et al.*, 1984). Die unterschiedliche Hydrophobizität der Aminosäurederivate ermöglichte deren Auftrennung durch eine Basen-deaktivierte Kieselgelsäule (Jones und Gilligan, 1983) unter den nachfolgend beschriebenen Bedingungen:

Säule: Hypersil ODS 5 μ (CS Chromatographie Service, Langerwehe)

Laufmittel (Puffer A): 0,1 M Na-Acetat pH 7,2 mit Acetat
 3 % Natriumazid

Puffer B: Methanol

Fluß: 0,8 ml/min

Elution: Gradient von 80 % bis 25 % Puffer A

Detektion: fluorometrisch

Anregungswellenlänge: 243 nm

Emissionswellenlänge: 436 nm

5.9 $^{13}\text{C}_1$ -Markierungsexperimente

A. gossypii wurde auf Medium mit 500 μM $^{13}\text{C}_1$ -Serin oder $^{13}\text{C}_1$ -Threonin kultiviert. Jedes Experiment bestand pro Stamm aus neun Schüttelkolben (500 ml) mit je 100 ml Minimalmedium. Während des Wachstums wurde die Aminosäure-Aufnahme durch HPLC verfolgt. Nach 72 h wurden alle neun Schüttelkolben vereint, das Myzel durch Filtration geerntet und anschließend lyophilisiert. Es folgte eine saure Hydrolyse von 200 mg Biomasse durch 6 M HCl für 12 h bei 105 °C. Der Extrakt wurde lyophilisiert und die Aminosäuren des Zellproteins wurden über eine FPLC (Synkam, Gilching) aufgereinigt. Die ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit Hilfe des Bruker AMX 400-WB Spektrometer Systems (Karlsruhe) bei 100,61 MHz gewonnen (Wendisch *et al.*, 1997).

5.10 Sporenisolierung aus *A. gossypii*

Zur Isolierung der Sporen wurde *A. gossypii* 4 - 5 Tage auf HA-Vollmedium-Platten bei 30 °C kultiviert. Das Myzel wurde von der Platte abgenommen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in 1 ml Glucanex-Lösung (10 mg/ml in 0,9 % (v/v) NaCl) resuspendiert. Zur Freisetzung der Sporen aus den Asci wurde die Suspension eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 min bei 3.000 rpm zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde dreimal mit 0,9 % (v/v) NaCl gewaschen und dann in 1 ml der gleichen Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 1 Volumen Paraffin wurden die beiden Phasen gründlich durchmischt. Nach der Phasentrennung reicherten sich die hydrophoben Sporen in der Paraffinphase an und konnten dann zur Gewinnung homokaryotischer Stämme auf Selektionsmedium vereinzelt werden.

III. ERGEBNISSE

1. Untersuchungen zur Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT) von *A.gossypii*

Da Glycin-Supplementierung des Kultivierungs-Mediums die Riboflavin-Überproduktion von *A. gossypii* steigert, sollte die Bedeutung der am Glycin-Stoffwechsel beteiligten SHMT aufgeklärt werden. Neben dem Gen *SHM1*, das für ein Enzym mit eher untergeordneter Funktion kodiert, konnte vom Kooperationspartner (Arbeitsgruppe Revuelta, Salamanca) ein weiteres Gen (*SHM2*) isoliert und zur Analyse bereitgestellt werden, das vermutlich für ein SHMT-Isoenzym kodiert (Schlüpen *et al.*, 2003). Die Existenz von Isoenzymen deutet auf eine unterschiedliche Lokalisation und/oder Rolle im Glycin-Stoffwechsel hin. Um gezielte Veränderungen in der Glycin-Biosynthese vornehmen zu können, sollte die Funktion und Lokalisation der SHMTs untersucht werden.

1.1 Sequenzanalyse der Gene *SHM1* und *SHM2* von *A. gossypii*

Die Translation der ORFs (open reading frames) von *AgSHM1* (1491 bp) und *AgSHM2* (1407 bp) ergab, dass *SHM1* für ein Protein von 497 Aminosäuren und *SHM2* für ein putatives Protein von 469 Aminosäuren kodiert. Cytosolische und mitochondrielle SHMTs wurden schon von *Saccharomyces cerevisiae* (McNeil *et al.*, 1994) und *Candida albicans* (McNeil *et al.*, 2000) isoliert. In einem Alignment (**Abb.6**) wurden die Aminosäure-Sequenzen dieser SHMT-Isoformen mit Hilfe des Computerprogramms CLUSTALW miteinander verglichen. Dieser Homologievergleich zeigte, dass alle sechs von den DNA-Sequenzen abgeleiteten Proteine in etwa gleich lang sind. Des weiteren war die Ähnlichkeit der Proteine über die gesamte Länge sehr hoch. Höchste Identitäten zeigte *AgSHMT2* zu der cytosolischen SHMT2 von *S. cerevisiae* (85 % identische Aminosäuren) und dem cytosolischen Enzym von *C. albicans* (80 % identische Aminosäuren) (**Tab.6**). Ebenfalls hohe Übereinstimmung war zwischen *AgSHMT1* und den mitochondriellen Isoenzymen von *S. cerevisiae* (68 % identische Aminosäuren) und *C. albicans* (67 % identische Aminosäuren) erkennbar. In allen Sequenzen wurde ein Tetrapeptid (TTHK) identifiziert, das in allen eukaryotischen und prokaryotischen SHMT-Proteinen der SWISS-PROT Protein-Datenbank konserviert ist. Diese Konsensus-Sequenz enthält an Position 248 in *AgSHMT2* und an Position 272 in *AgSHMT1* einen Lysin-Rest, der äquivalent zum Lysin-Rest an Position 257 der menschlichen SHMT und an Position 229 der *E. coli* SHMT ist. Biochemische Untersuchungen mit aufgereinigten Enzymen ergaben, dass dieser Lysin-Rest in die PLP-Bindung involviert ist (Schirch *et al.*, 1993). Durch genetische Studien der menschlichen SHMT-Proteine konnten 15 weitere Aminosäure-Reste identifiziert werden, die an der Katalyse beteiligt sind. Davon traten 14 auch in den untersuchten SHMTs der Pilze auf (**Abb.6**).

III. ERGEBNISSE

Ag SHMT1	1	MFIRRLHTSSRRLTCGEALRACQQTGARSANGQMLSHVQEFDPENYDILTK--ERSRQ
Sc SHMT1	1	-----MFPRASALAKCMATVHRRGLTSGAQSLVSKPVSEGDPEFDILQFTQERHRQ
Ca SHMT1	1	-MLSSTLRRSVRAQSKNLPFAFRRTYAVSPSAQALISKSVQDVDPFTMDILNQEFTRQ
Ag SHMT2	1	-----MPYHLSSEHKKLISSHLSESDPEVDATIKDEIDRQKH
Sc SHMT2	1	-----MPYTLSDAHHKLITSHLVDTDPVDSIIKDEIERQKH
Ca SHMT2	1	-----MSAYALSQSHRQLTEGHLKDTDPVDQIIKDEIDRQKH
Ag SHMT1	59	KRSITLIPSENFTSVAVMNLGSEMQNKYSERYPCQRYGGNQYID--MAESLCQKRALE
Sc SHMT1	54	KHSITLIPSENFTSKAVMDLGSSEMQNKYSEGYPCERYGGNEIIDKSESLCQFTARALE
Ca SHMT1	60	KNSITLIPSENFTSKAVMDLGSSEMQNKYSEGYPCERYGGNEIIDKFTAEALCQKRALE
Ag SHMT2	38	SIVLIASEN--LTSTAVFDALGTPMCNKYSEGYPGARYGGNHIDR--MELLCCORALE
Sc SHMT2	38	SIDLIASEFTNFTSTSVFDALGTPLSNKYSEGYPGARYGGNEHIDR--MEILCQORALK
Ca SHMT2	39	SIVLIASFTEFTTAVFDALGTPMCNKYSEGYPGARYGGNEHIDR--MELLCCORALK
Ag SHMT1	117	LYGLDPAKWGVN--VQSLSGAPANLYAYSAIMVGRMGLDLPHGHLSHGYQLQNGN-
Sc SHMT1	114	LYGLDPAKWGVN--VQPLSGAPANLYVYSAIMNVGERLMGLDLPDGGHLSHGYYQLFTSG
Ca SHMT1	120	AFGLDPSQWGVN--VQPLSGAPANLYAYSAILVGRIMGLDLPHGHLSTHGYQTIT-
Ag SHMT2	94	AFHVTTPDRWGVN--VQSLSGSPANLQVYQAIMKPHERLMGLHLPDGGHLSHGYYQETRK-
Sc SHMT2	96	AFHVTTPDKWGVFTNVQTLSSSPANLQVYQAIMKPHERLMGLYLPDGGHLSHGYYATENRK-
Ca SHMT2	97	AFGLTPDKWGVFTNVQTLSSSPANLQVYQAIMKPHERLMGLDLPHGHLSTHGYQTDNRK-
Ag SHMT1	174	-KISYISKYFQTMAYR--VDPATGLVDYDTLSETSKLFRPKVIVAGTSAYARVIDYKR-
Sc SHMT1	172	TPISFISKYFQSMYPH--VDHTTGLIDYDNLVLAKAFRPKVIVAGTSAYSRLIDYARFF
Ca SHMT1	177	TKISYISKYFQTMPYR--LNEETCTIDYDTLEKNAQLFRPKVIVAGTSAYSRVIFTDYKR
Ag SHMT2	151	--ISAVSTYFESFPYR--VDPETCTIDYDTLEKNAVLYRPKILVAGTSAYCRLIDYKR--
Sc SHMT2	155	--ISAVSTYFESFPYFTRVNPETCTIDYDTLEKNAILYRPKVLVAGTSAYCRLIDYKR--
Ca SHMT2	156	--ISAVSTYFETMPFTYRVDLETGLIDYDMLEKTAVLYRPKVLVAGTSAYCRLIDYKR--
Ag SHMT1	229	FREIADACGAYLLSDMAHVSGL--LVAAGVHPSPFEYSDIVTTTTTHKSLRGPRGAMIFYRK
Sc SHMT1	230	TKEISQGCAYLLSDMAHISGL--LVAANVPSPFHSDIVTTTTTHKSLRGPRGAMIFFRK
Ca SHMT1	235	MRQLSIRLGAYLLSDMAHISGL--LVSAAVTDSPFEYSDIVTTTTTHKSLRGPRGAMIFFTF
Ag SHMT2	205	MREIADKVGAYLMVDMAHISGL--LVAAGVIPSPFEYADIVTTTTTHKSLRGPRGAMIFFRR
Sc SHMT2	211	MREIADKCGAYLMVDMAHFTISGLLAAGVIPSPFEYADIVTTTTTHKSLRGPRGAMIFFRR
Ca SHMT2	212	MREIADKVGAYLMVDMAFTHISGLLAAGVIPSPFEYADIVTTTTTHKSLRGPRGAMIFFRR
Ag SHMT1	287	--GIRKVTKKCTEIMYDLDK--RINFSVFPFHQGGPHNHTISALAVALKQAAATPEFKNYQ
Sc SHMT1	288	GIFTKSVTKKKEIPYELEK--KINFSVFPFHQGGPHNHTIGAMAVALKQAAATPEFKEYQ
Ca SHMT1	293	RKGIRKVTTKKKEIPYELER--KINFLVFPFHQGGPHNHTISALAVALKQCTEPEYVKYQ
Ag SHMT2	263	-GVRSVHPKTCFVMYDLEG--PINFSVFPFHQGGPHNHTISALATALKQAAATPEFKEYQ
Sc SHMT2	271	-GVRVINPKTKGVLYDLENFTNPINFSVFPFHQGGPHNHTIAALATALKQAAATPEFKEYQ
Ca SHMT2	272	-GVRSVNPKTCGEILYDLEFTNPINFSVFPFHQGGPHNHTIAALATALKQAAATPEFKEYQ
Ag SHMT1	343	TAVVEN--AKVFGBELSKRGTSLSVSGG--TDTHLLILDLSPMGIDGSRLETILERLNIAA
Sc SHMT1	346	QKIVDFTNSKWFAQELTKMGYKLVSOGG--TDNHLIVIDLSTQVDGARVETILSALNIAA
Ca SHMT1	351	FTQEVVSNKHFADALVSKGFKLVSDG--TDTHLLILDLSRNDGARVEAVLERANIAA
Ag SHMT2	320	ELVLKKN--AKVLETEFKKINYLVSOGG--TDSHMLVLSLREKGVGDGARVEHVCEKINIAL
Sc SHMT2	330	TQVLKKN--AKALESEFKNLGYLFTVSNGTDSHMLVLSLREKGVGDGARVEYICERINIAL
Ca SHMT2	331	EQVLKKN--AKALESEFTKKGYKFTLVSDGTDHMLVLSLKDQDGDGARVETVCEKINIAL
Ag SHMT1	399	NKNTIPG--DKSALVPSGLRVGTPAMTT--RGFGPAEFGRVAAYINBAVKLAIGKSQE-
Sc SHMT1	404	NKNTIPGDFTKSALFPSGLRIGTPAMTT--RGFGREFFSQVAKYIDSAVKLAENKTLEP
Ca SHMT1	409	NKNFTTVPGDVSAFPSGLRVGTPAMTT--RGFGPEEFDKVAEFDQAVNIAIEIKAQE-
Ag SHMT2	376	NKNSIPG--DKSALVPGGVRIQAPAMTT--RGMGEEDFARIVGYINRAVEIARSTQQSLEP
Sc SHMT2	388	NKNSIPG--DKSALVPGGVRIQAPAMFTTTRGMGEEDFHRIVQYINKAVEFAQQVQQLP
Ca SHMT2	389	NKNSIPG--DKSALVPGGVRIQAPAMFTTTRGLGEEDFKKIVSYIDFAVNYAKEVQSLEP
Ag SHMT1	454	-PVDADAKTRLAHFKSFCAE--SEQVTKLANEVADWVAQYVPVPGEL-----
Sc SHMT1	462	TTKLDARSRLNFTFKKLCNE--SSEVAALSGETSKWVGQYVPVPGDI-----
Ca SHMT1	466	-QGKVPKEFTLLASFKKLADE--SDKVKQLDKVSWVSKYPVPGEL-----
Ag SHMT2	432	-----KEANRLKDFKAKVED--CTDEIAQLAQEYISWTEEYPLPV-----
Sc SHMT2	446	-----KDACLRLKDFKAKVDE--GSDVLNTWKKEIFTYDWAGEYPLAV-----
Ca SHMT2	447	-----KDANKLKDFFKNAVSG--DSEKLKAVRDEFTYQWAGSFPLAV-----

Abb.6 Alignment von SHMT-Proteinen verwandter Hemiascomyceten. CLUSTALW-Analyse abgeleiteter Aminosäure-Sequenzen der SHM-Gene von *Ashbya gossypii* (Ag) [AJ438778 (SHMT1) und AJ438779 (SHMT2)], *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) [P37292 (SHMT1) und P37291 (SHMT2)] sowie *Candida albicans* (Ca) [O13425 (SHMT1) und O13426 (SHMT2)]. Identische Aminosäuren sind schwarz, konservierte

Substitutionen grau unterlegt. Das in allen eukaryotischen und prokaryotischen SHMT-Proteinen konservierte Tetrapeptid ist doppelt unterstrichen. Aminosäure-Reste, die an der Enzym-Katalyse beteiligt sind, wurden eingerahmt. Der für die Bindung mit PLP verantwortliche Lysin-Rest ist mit einem Stern gekennzeichnet. Die unterstrichenen Aminosäure-Sequenzen an den N-Termini stellen die putativen mitochondrialen Target-Sequenzen dar.

Die Zuordnung des Alignments wurde bestätigt durch die Identifizierung der ersten 27 Aminosäuren von *AgSHMT1* als putatives mitochondrielles Target-Signal mit Hilfe des PSORT II Prediction Programms. Die Sequenzdaten prognostizieren, dass *AgSHM1* für eine in den Mitochondrien und *AgSHM2* für eine im Cytosol lokalisierte SHMT kodieren.

Neben den Homologievergleichen der SHMTs der Pilze wurden in **Tab.6** auch die Aminosäure-Identitäten von Säugern (Mensch und Kaninchen), Pflanze (Erbse) und Bakterien (*Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*) miteinander verglichen.

Tab.6 Vergleich von *A. gossypii* SHMT1 und SHMT2 mit SHMTs aus Datenbanken, die mitochondrial (M) oder cytosolisch (C) lokalisiert sind. Die Zahlen bedeuten % identische Aminosäuren der vom Gen abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen. Die acht höchsten Identitäten sind fett gedruckt.

		<i>A.gossypii</i> SHMT	<i>S.cerevisiae</i> SHMT	<i>C.albicans</i> SHMT	Mensch SHMT	Kaninchen SHMT	Erbse SHMT	<i>E.coli</i> SHMT
		1 2	M C	M C	M C	M C	M	
<i>A.gossypii</i> SHMT	1 2	58						
<i>S.cerevisiae</i> SHMT	M C	68 59 57 85	59					
<i>C.albicans</i> SHMT	M C	67 59 58 80	66 57 59 82	59				
Mensch SHMT	M C	50 54 51 54	50 53 52 55	50 55 50 55	62			
Kaninchen SHMT	M C	48 53 52 55	48 53 51 55	50 54 52 57	94 61 61 92	61		
Erbse SHMT	M	52 57	52 56	56 58	56 56	55 56		
<i>E.coli</i> SHMT		46 42	46 44	46 44	47 47	47 47	47	
<i>B.subtilis</i> SHMT		44 44	46 44	46 45	46 45	45 45	43	57

Auffällig war, dass die Aminosäuren der SHMT in allen Organismen zu 42 – 68 % identisch sind. Eine Ausnahme stellte der bereits erwähnte Vergleich zwischen AgSHMT2 und den cytosolischen SHMTs von *S. cerevisiae* und *C. albicans* mit 85 % bzw. 80 % dar. Mit der cytosolischen SHMT aus *S. cerevisiae* stimmte die cytosolische SHMT aus *C. albicans* in 82 % der Aminosäuren überein. Die höchsten Identitäten waren bei den Säugerzellen zu beobachten. Zwischen der cytosolischen SHMT von Mensch und Kaninchen bestanden 92 % und zwischen den mitochondriellen SHMTs sogar 94 % Identität.

1.2 Subzelluläre Lokalisation von SHMT1 und SHMT2 in *A. gossypii*

Aufgrund der hohen Ähnlichkeiten der SHMT-Isoenzyme hätte der Nachweis der Lokalisation durch direkte Detektion mit Antikörpern gegen SHMT1 bzw. SHMT2 wenig Aussicht auf Erfolg gehabt. Deshalb wurden Stämme konstruiert, in denen die Gene *SHM1* und *SHM2* mit HA, dem Häm-Agglutinin-Epitop, fusioniert vorlagen. HA sollte dann mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden. Cytosolische Proteine wurden über die Diffusionskinetik nach Permeabilisierung der Zellmembran mit Digitonin nachgewiesen. Dazu wurden die Stämme Wildtyp, AgSHM1-HA und AgSHM2-HA mit 0,01 % bzw. 0,16 % Digitonin permeabilisiert.

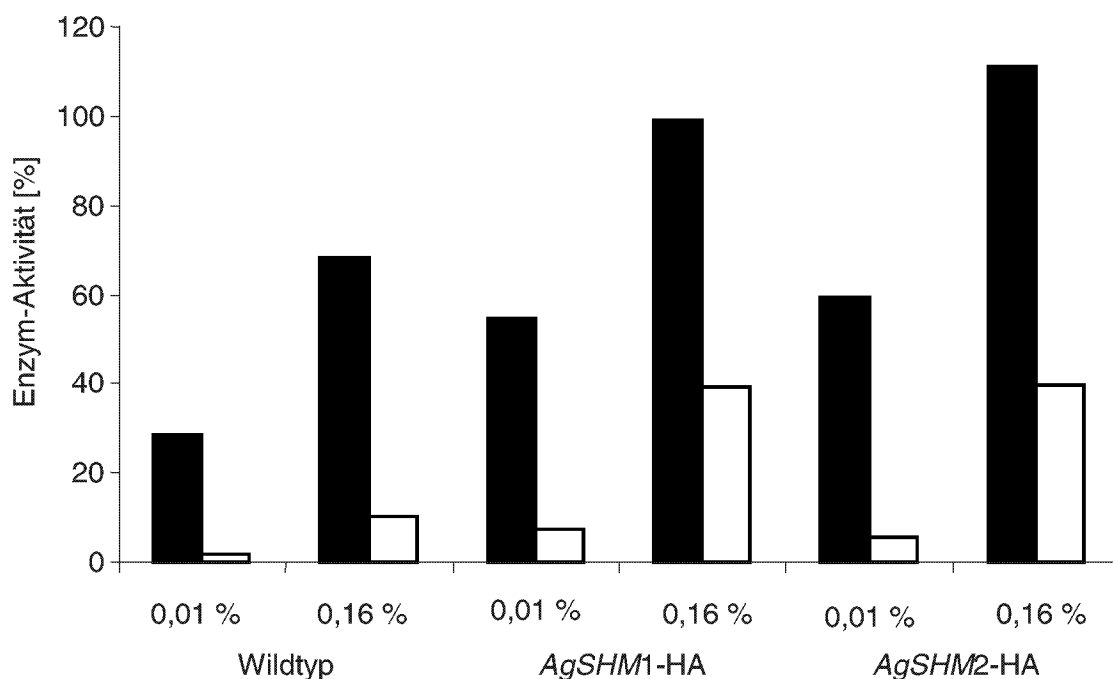


Abb.7 Extrazelluläre Aktivität der Markerenzyme Hexokinase und Fumarase nach Permeabilisierung von Wildtyp, AgSHM1-HA und AgSHM2-HA mit 0,01 % und 0,16 % Digitonin.
(■ Hexokinase [cytosolischer Marker]; □ Fumarase [mitochondrieller Marker])

Die Aktivität der Markerenzyme Hexokinase (Cytosol) und Fumarase (Mitochondrien) ist ein Maß dafür, wie gut die Permeabilisierung der Zellen funktioniert hatte. Dabei wurde zunächst

die Aktivität der Marker im Rohextrakt bestimmt und als 100 % festgesetzt. Die Aktivität in den permeabilisierten Proben wurde auf diese 100 % bezogen. Das Ergebnis der Permeabilisierung ist in **Abb.7** dargestellt. Während bei niedriger Digitonin-Konzentration die Hexokinase bis zu 60 % und die Fumarase bis zu 10 % extrazellulär messbar waren, führte 0,16 % Digitonin zu 100 %iger Hexokinase-Aktivität und bis zu 40 % Fumarase-Aktivität außerhalb der Zellen. Da somit ein deutlicher Unterschied zwischen cytosolischen und mitochondrialen Enzymen bestand, wurden die Proben zur Western-Blot-Analyse eingesetzt (**Abb.8**).

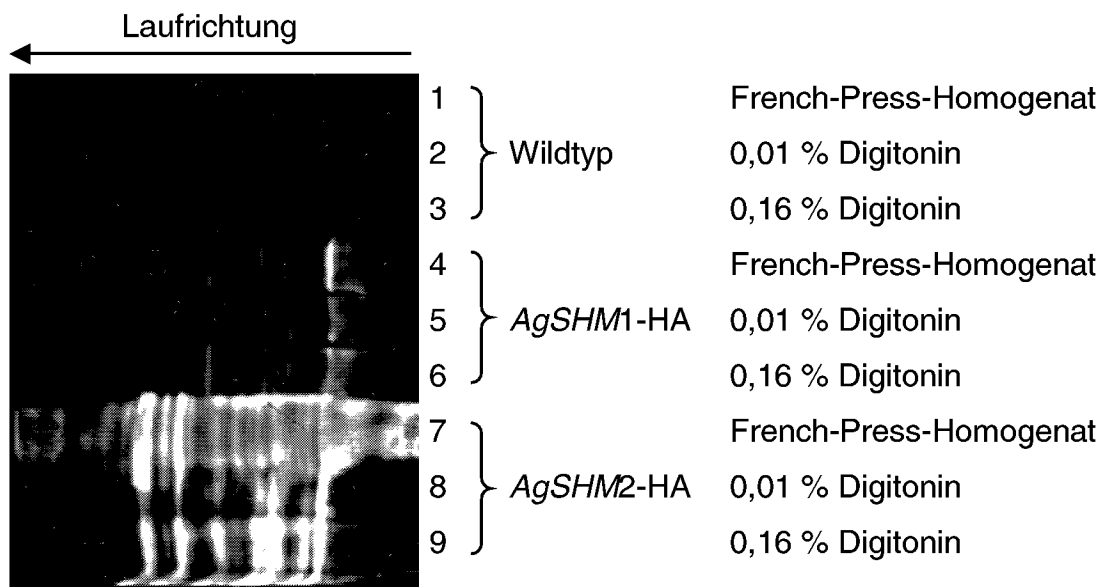


Abb.8 Nachweis der Lokalisation von SHMT1 und SHMT2 mittels Western-Blot-Analyse. Das SDS-Gel wurde mit jeweils 60 µl der Proben French-Press-Homogenat, Permeabilisierung mit 0,01 % bzw. 0,16 % Digitonin von den Stämmen Wildtyp und *AgSHM1*-HA und mit 15 µl der Proben von *SHM2*-HA beladen. Zur Detektion wurde der Antikörper Anti-HA-Peroxidase zu einer Endkonzentration von 50 mU/ml eingesetzt.

Obwohl nur ein Viertel der Menge im Vergleich zu *AgSHM1*-HA auf das Gel aufgetragen wurde, waren die Signale der Proben von *AgSHM2*-HA signifikant stärker. Das deutet darauf hin, dass der intrazelluläre SHMT2-Anteil weitaus größer ist, als die Menge der SHMT1-Proteine in der Zelle. Der Wildtyp zeigte, wie zu erwarten, kein Signal, da der verwendete Antikörper HA-spezifisch war. Das French-Press-Homogenat zeigte ein deutliches Signal für *AgSHM1*-HA. Dagegen war die Antwort der 0,01 % Digitonin-Probe nur schwach zu erkennen und bei der 0,16 % Digitonin-Probe nur geringfügig stärker. Der Vergleich der Immunodetektion mit den Enzymaktivitäten von Hexokinase und Fumarase ergab, dass die Signal-Intensitäten mit der Aktivität der mitochondrialen Fumarase korrelierten. Da das Gel mit den Proben von *AgSHM2*-HA stark überladen war, wurde ein neuer Blot durchgeführt (**Abb.9**). Das *SHM2*-HA-Fusionsprotein besitzt eine molekulare Masse von 57 kDa und

entspricht damit der oberen Bande. Es wurden zusätzliche Banden detektiert, bei denen es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte des Fusionsproteins handelte. Während beim 100 %igen Zellaufschluss von *AgSHM2*-HA die gleiche Signal-Intensität zu beobachten war wie bei der Probe mit 0,16 % Digitonin, war das Signal der Probe mit 0,01 % Digitonin um die Hälfte reduziert. Die Signal-Intensitäten von *SHM2*-HA korrelierten mit den Aktivitäten der cytosolischen Hexokinase. Der Versuch zeigte, dass *SHM2* im Cytosol lokalisiert ist. *SHM1* befindet sich nicht im Cytosol, sondern im Organell.

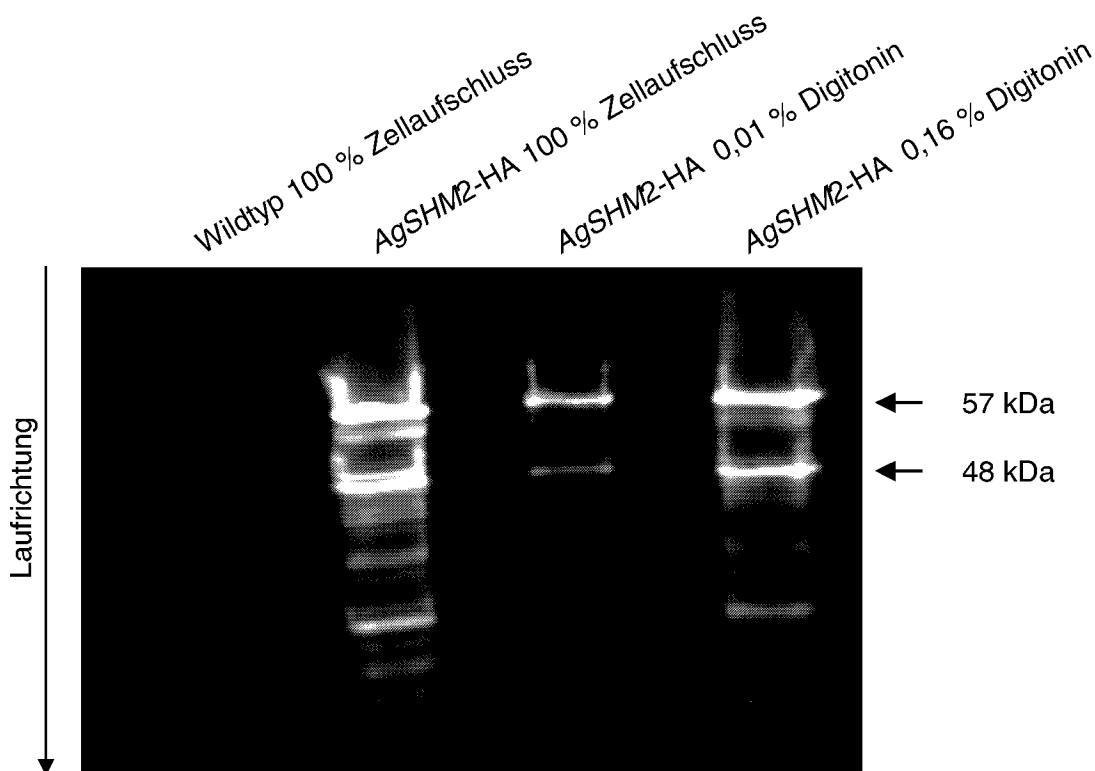


Abb.9 Nachweis der Lokalisation von *SHM2*. Das SDS-Gel wurde mit jeweils 10 µl der Proben 100 % Zellaufschluss, Permeabilisierung mit 0,01 % bzw. 0,16 % Digitonin *AgSHM2*-HA beladen. Zur Kontrolle wurden 10 µl des 100 %igen Zellaufschlusses des Wildtyps eingesetzt. Zur Detektion wurde der Antikörper Anti-HA-Peroxidase zu einer Endkonzentration von 50 mU/ml verwendet.

Da durch die Permeabilisierung mit Digitonin nur zwischen Proteinen, die im Cytosol oder im Organell lokalisiert sind, unterschieden werden kann, sollte die Frage, in welchem Organell sich *SHM1* befindet, durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation und anschließende Immunodetektion beantwortet werden. Während der Dichtegradienten-Zentrifugation sollten sich Peroxisomen und Mitochondrien des Stammes *AgSHM1*-HA entsprechend ihrer Dichte im Gradienten anordnen. **Abb.10A** zeigt, dass sich die Mitochondrien, identifiziert durch das Markerenzym Cytochrom c Oxidase, zum größten Teil in den Fraktionen 4, 5 und 6 befanden, deutlich getrennt von den durch die Katalase charakterisierten Peroxisomen, die

in den Fraktionen 11 und 12 lokalisiert waren. Die Signal-Intensitäten der Western-Blot-Analyse waren in den mitochondrialen Fraktionen 5 und 6 am stärksten (**Abb.10B**). Im Gegensatz dazu wurde in der peroxisomalen Fraktion nur ein schwaches Signal detektiert.

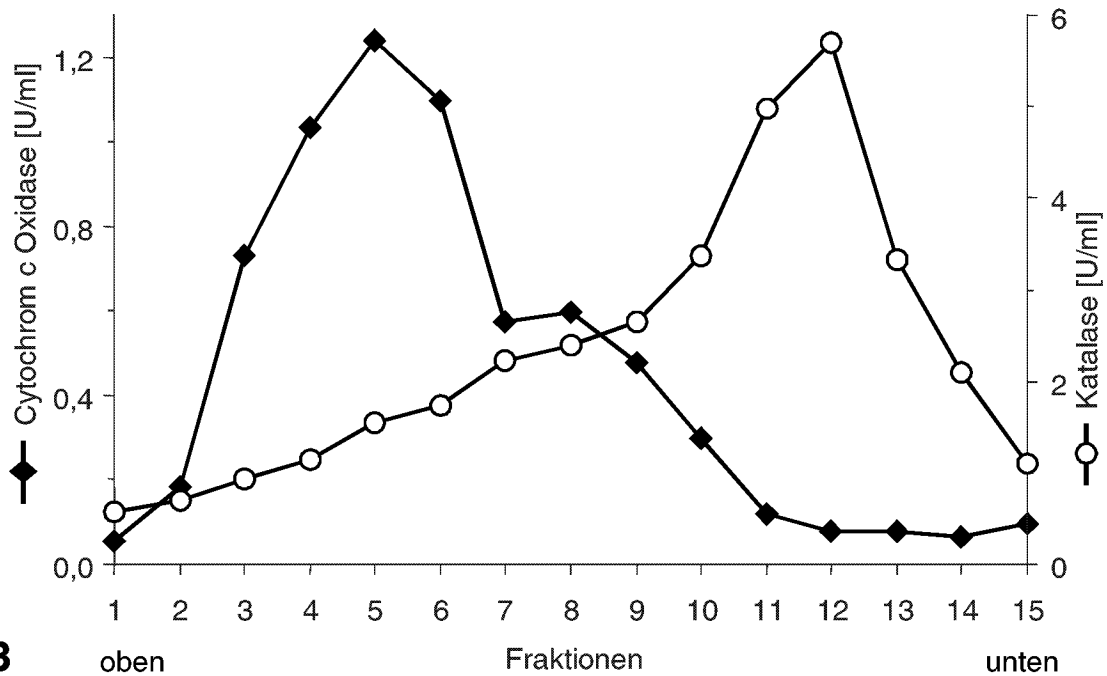
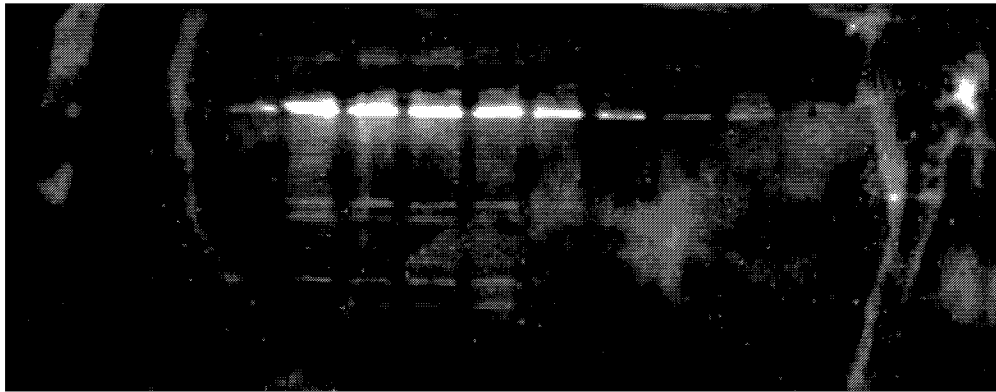
A**B**

Abb.10 A Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation mit Organellen von *AgSHM1*-HA. Die Aktivitäten der Markerenzyme Katalase (Peroxisomen) und Cytochrom c Oxidase (Mitochondrien) wurden in den einzelnen Fraktionen bestimmt.

B Nachweis der Lokalisation von SHMT1. Fraktionen des Percoll-Dichtegradienten wurden mittels Western-Blot untersucht. Dazu wurden 80 µl von jeder Fraktion auf das SDS-Gel aufgetragen. Zur Immunodetektion wurde der Antikörper Anti-HA-Peroxidase zu einer Endkonzentration von 50 mU/ml eingesetzt.

Wie aufgrund der putativen MTS am Aminoterminus der Aminosäure-Sequenz vermutet wurde, stellt *AgSHMT1* somit ein mitochondrielles Enzym dar. Dagegen ist *AgSHMT2* im Cytosol lokalisiert.

1.3 Funktion der SHMTs in *A. gossypii*

1.3.1 Disruption des *AgSHM2*-Gens

Zur Klärung der Bedeutung von SHMT2 für die Glycin-Biosynthese, sollte das *SHM2*-Gen von *A. gossypii* durch Genaustausch-Mutagenese disruptiert werden. Das Plasmid pJR2417 enthält das intakte *SHM2*-Gen. Für die Konstruktion des für die Genaustausch-Mutagenese verwendeten Vektors pJR2427 wurden 1,3 kb des *SHM2*-Gens durch *SalI*/*EcoRV*-Restriktion deletiert und durch ein 1,6 kb Fragment, welches das Hygromycin-Resistenzgen trägt, ersetzt (**Abb.11**).

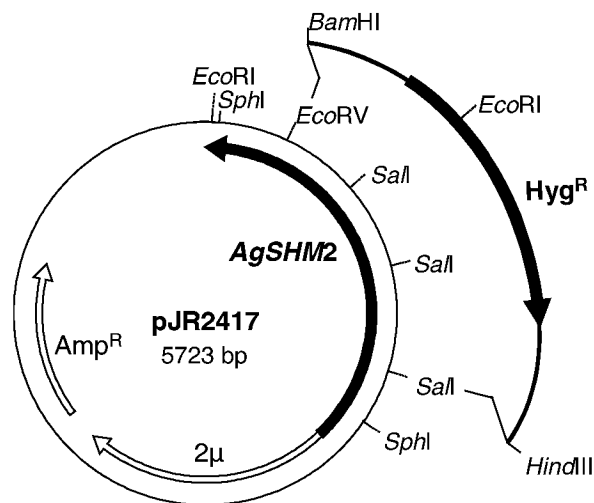


Abb.11 Schematische Darstellung des Vektors pJR2427 für den Genaustausch des intakten *SHM2*-Gens.

Zur Transformation von *A. gossypii* wurde das *SphI*-Fragment, bestehend aus der Hygromycin-Resistenzkassette mit flankierenden *SHM2*-DNA-Sequenzen, eingesetzt (**Abb.12A**). Nach Selektion auf Hygromycin-Resistenz konnten stabile Klone erhalten werden. Da eine homologe Integration des Fragments in *A. gossypii* wahrscheinlich ist (Steiner *et al.*, 1995), war zu erwarten, dass durch ein Doppel-Crossover-Ereignis ein Austausch des intakten *SHM2*-Gens gegen die durch Deletion von 1,3 kb inaktivierte Kopie stattgefunden hatte. Gleichzeitig führte dies zur Integration der Hygromycin-Resistenzkassette in das Genom. Mittels Southern-Blot-Analyse wurden die Hygromycin-resistenten Stämme überprüft. Zur Konstruktion der Sonde wurde der Vektor pJR2417 mit *EcoRI* und *EcoRV* geschnitten, so dass das Fragment aus einem Teil des intakten *SHM2*-Gens bestand. Die DNA der zu untersuchenden Transformante und die DNA des Wildtyps als Kontrolle wurden mit *EcoRI* geschnitten. Bei Hybridisierung der Sonde mit der DNA sollte im Falle einer *SHM*-Disruption ein Fragment mit einer Größe von 800 bp entstehen. Da die nächste *EcoRI*-Schnittstelle, die dem *SHM2*-Gen benachbart ist, nicht bekannt ist, sollte das

Wildtyp-Signal in jedem Fall größer als 800 bp sein. Das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse ist in **Abb.12B** dargestellt.

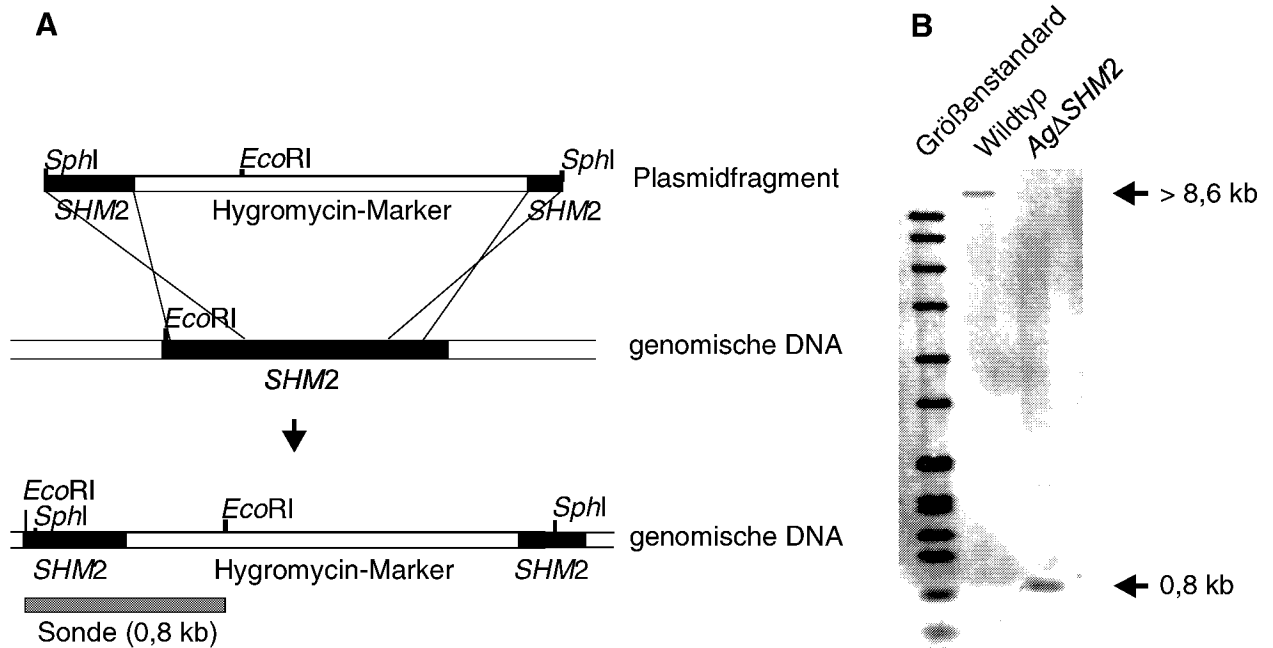


Abb.12 Disruption von *AgSHM2*.

A Schematische Darstellung des homologen Austauschs am *SHM2*-Lokus gegen die Disruptionskassette. Zum Nachweis der Integration mittels Southern-Blot-Analyse wurde eine Sonde verwendet, die ein 0,8 kb-*EcoRI*-Fragment der Disruptionskassette detektiert.

B Southern-Blot-Analyse. Genomische DNA von Wildtyp und *AgΔSHM2* wurde mit *EcoRI* geschnitten. Die nächste *EcoRI*-Schnittstelle benachbart zum *SHM2*-Gen ist nicht bekannt. Die Pfeile kennzeichnen die detektierten Signale.

Bei dem zu überprüfenden Stamm *AgΔSHM2* konnte ein Fragment mit der Größe von 0,8 kb detektiert werden, wohingegen beim Wildtyp ein Signal oberhalb des 8,6 kb-Markers nachgewiesen werden konnte. Somit war die Insertions-Deletion am *SHM2*-Lokus erfolgreich. Da im $\Delta SHM2$ -Stamm keine weiteren Signale detektiert werden konnten, war gezeigt, dass keine zusätzliche ektopische Integration der Disruptionskassette in das Genom stattgefunden hatte. Die Disruption des *SHM1*-Gens hatte keine Auswirkung auf die spezifische SHMT-Aktivität (Schlüpen *et al.*, 2003). Interessant war nun, ob die *SHM2*-Disruption zu einem detektierbaren Verlust der SHMT-Aktivität führte. Dazu wurde ein sensitiver radioaktiver Enzymtest durchgeführt und die spezifischen Aktivitäten der SHMT in *AgΔSHM2* im Vergleich zum Wildtyp und *AgΔSHM1* gemessen (**Abb.13**). Die Disruption von *SHM2* verursachte eine 85 %ige Verringerung der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Demnach kodiert *SHM2* für eine funktionelle SHMT, die den größeren Anteil zur *in vitro* Aktivität beiträgt.

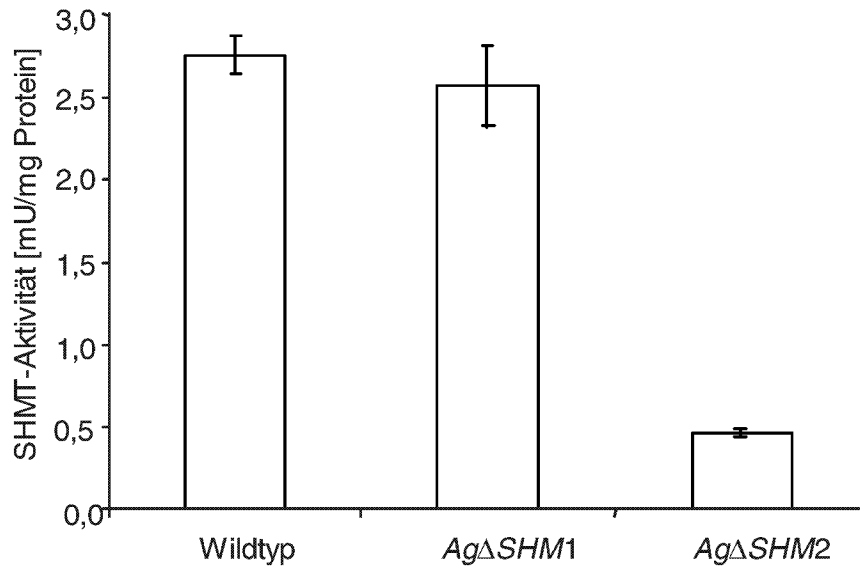


Abb.13 Vergleich der SHMT-Aktivitäten von *SHM*-Disruptanten mit dem Wildtyp nach 24 h Kultivierungszeit. Die Balken stellen die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichungen) von Dreifach-Bestimmungen dar.

Die Restaktivität von 0,5 mU/mg, die in *AgΔSHM2* detektiert wurde, könnte von der Aktivität des Isoenzym SHMT1 stammen, welches nur zu einem geringen Anteil an der spezifischen SHMT-Aktivität beteiligt ist. Aufgrund der großen Streuung der Messung bei *AgΔSHM1* konnte kein signifikanter Unterschied zur Wildtyp-Aktivität detektiert werden.

1.3.2 Konstruktion von *AgΔSHM1ΔSHM2*

Die Konstruktion von Stämmen in denen sowohl *SHM1*, als auch *SHM2* disruptiert vorliegt, sollte Aufschluß darüber geben, ob die SHMT-Restaktivität in *AgΔSHM2* von SHMT1 stammt oder ob es möglicherweise noch ein weiteres Isoenzym gibt. So wurden in *S. cerevisiae* drei Glutamat-Dehydrogenasen isoliert (DeLuna *et al.*, 2001). Die Gene *GDH1* und *GDH3* kodieren für NADP⁺-GDH-Isoenzyme, die die Synthese von Glutamat aus Ammonium und α -Ketoglutarat katalysieren. Die Rückreaktion wird von der NAD⁺-abhängigen Glutamat-dehydrogenase katalysiert, die von dem *GDH2*-Gen kodiert wird. Zur Herstellung der *SHM2*-Doppeldisruptanten in *A. gossypii* sollte das *SHM1*-Gen in *AgΔSHM2* disruptiert werden. Im Plasmid pJR1550 *SHM1*Δ769::kan wurden 769 bp des *SHM1*-Gens deletiert und durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt. Das *Bam*HI/*Kpn*I-Fragment dieses Vektors, bestehend aus der Kanamycin-Resistenzkassette mit flankierenden *SHM1*-DNA-Bereichen, wurde zur Transformation von *AgΔSHM2* eingesetzt. Es konnten G418-resistente Transformanten isoliert werden, in denen eine über die *SHM1*-flankierenden homologen Bereiche vermittelte Integration am *SHM1*-Lokus stattgefunden haben sollte. Zum Nachweis der *SHM1*-Disruption mittels PCR wurden Primer aus Sequenzen abgeleitet, die 351 bp

upstream vom Start bzw. 463 bp downstream vom Stopcodon des *SHM1*-Gens lagen. Als Matrize wurde die genomische DNA des Wildtyps bzw. die DNA der zu untersuchenden Transformante verwendet. **Abb.14A** zeigt die Auftrennung der einzelnen PCR-Produkte im Agarosegel.

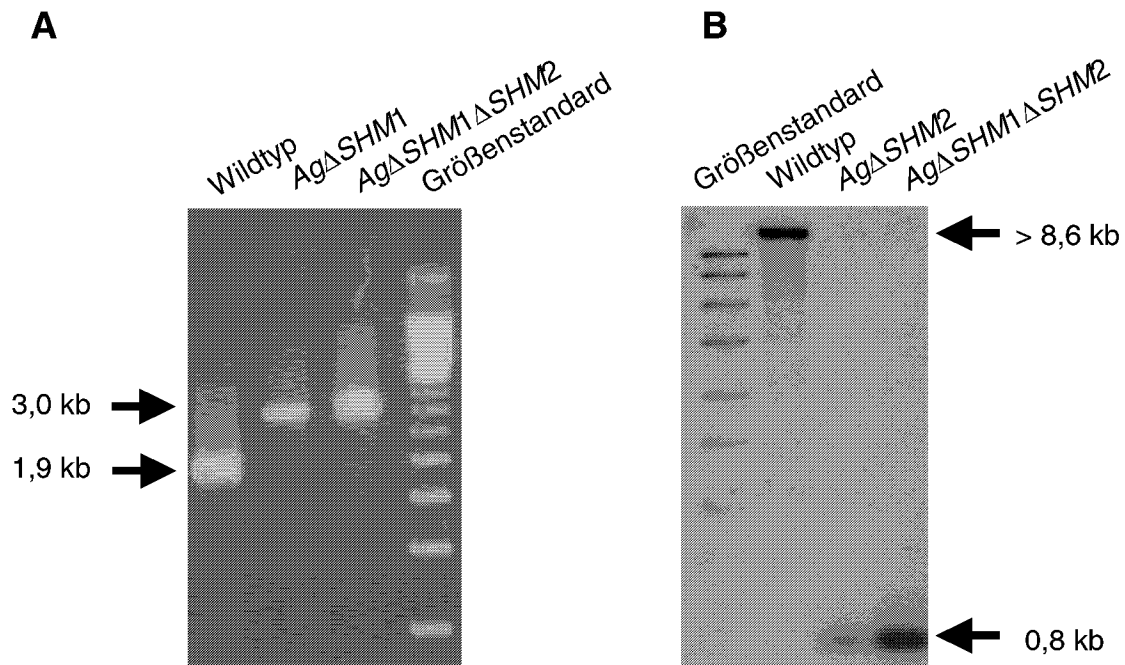


Abb.14 PCR-Analyse (A) und Southern-Blot (B) chromosomaler DNA von Wildtyp, *AgΔSHM1* bzw. *AgΔSHM2* und der Doppeldisruptante *AgΔSHM1ΔSHM2*. Für die PCR wurden die Primer SHM1-UP und SHM1-DOWN verwendet. Zum Nachweis mittels Southern-Blot wurde die *EcoRI* geschnittene genomische DNA gegen das *EcoRI/EcoRV*-Fragment des Vektors pJR2417 hybridisiert.

Während beim Wildtyp ein Fragment mit einer Größe von 1850 bp entstand, führte der korrekte Genaustausch zu einem 3011 bp großen Signal. Aufgrund der hier nicht näher beschriebenen Schwierigkeit, Doppeldisruptanten herzustellen, wurde die *SHM2*-Disruption mittels Southern-Blot-Analyse überprüft. Dabei wurde wie bei der Untersuchung der *AgΔSHM2*-Stämme vorgegangen (siehe III.1.3.1) (**Abb.14B**). Mittels PCR und Southern-Blot-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass in den Stämmen *AgΔSHM1ΔSHM2* sowohl der *SHM1*-, als auch der *SHM2*-Lokus disruptiert vorlag. Durch Bestimmung der spezifischen SHMT-Aktivität in *AgΔSHM1ΔSHM2* wurde nun untersucht, ob die *SHM*-Doppeldisruption zu einem vollständigen Verlust der Enzymaktivität führte. Der Enzymtest bestätigte die Ergebnisse bezüglich *AgΔSHM2* (**Abb.15**). Bei *AgΔSHM1ΔSHM2* war im Vergleich zum Wildtyp immer noch 3 % Aktivität meßbar. Das ließe sich damit erklären, dass noch ein weiteres Isoenzym existierte, oder aber, dass es sich bei der gemessenen Aktivität um eine Nebenaktivität der Threonin-Aldolase handelte.

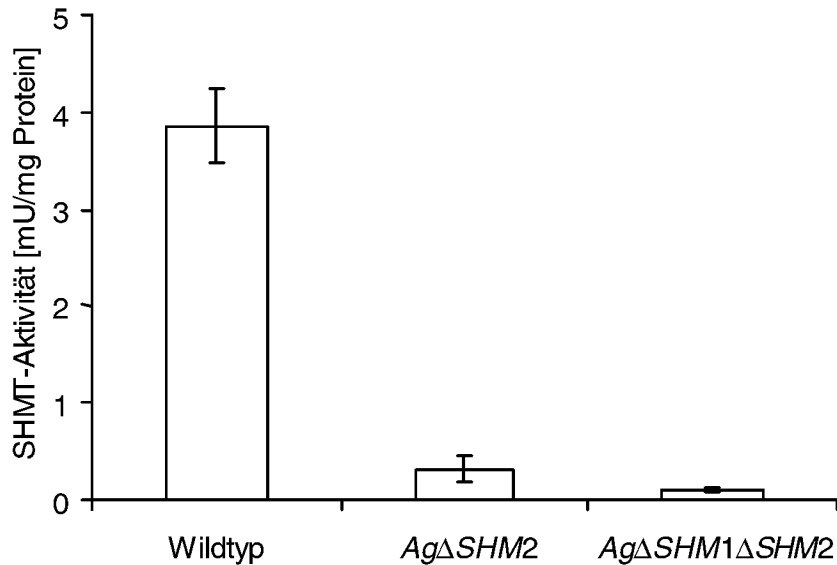


Abb.15 Spezifische SHMT-Aktivität von Wildtyp, *AgΔSHM2* und einer *SHM*-Doppel-disruptante.

Schirch und Gross (1968) fanden heraus, dass gereinigte SHMT aus Kaninchenleber Threonin-Aldolase-Aktivität besaß. Die Glycin-Bildung aus Threonin wurde auch *in vitro* durch die SHMT aus *C. glutamicum* nachgewiesen (Simic *et al.*, 2002). Demnach wäre eine SHMT-Nebenaktivität der Threonin-Aldolase nicht auszuschließen. Um dies zu untersuchen, wurde zum SHMT-Test ein Stamm eingesetzt, der die Threonin-Aldolase überexprimiert (*AgpAG203GLY1*). Wenn die durch *GLY1* kodierte Threonin-Aldolase auch SHMT-Aktivität besitzt, sollte *AgpAG203GLY1* mehr Aktivität zeigen als der Wildtyp.

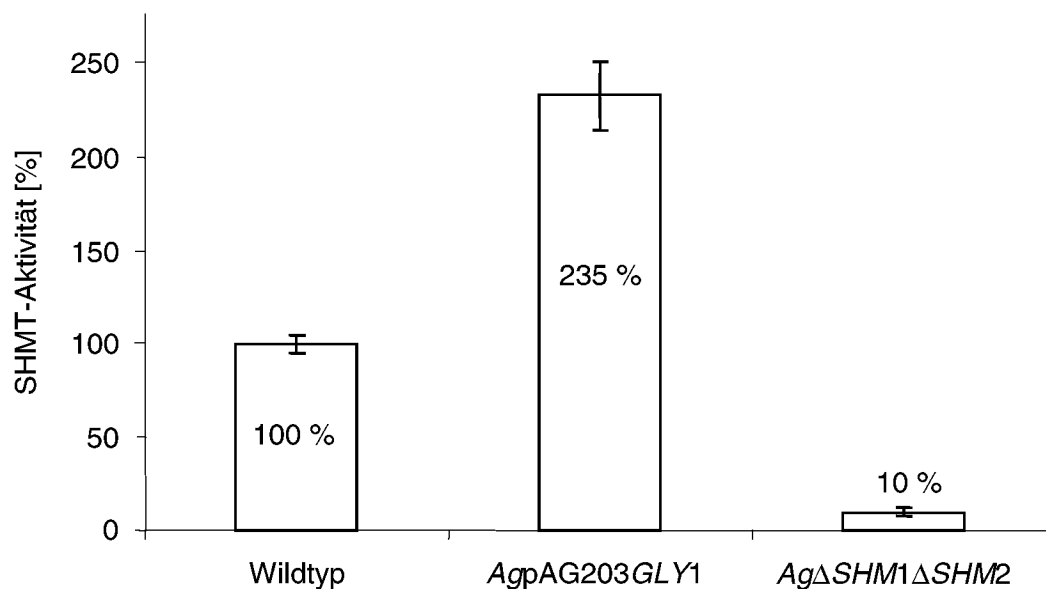


Abb.16 Bestimmung der spezifischen SHMT-Aktivität von Wildtyp, *AgpAG203GLY1* und einer *SHM*-Doppeldisruptante *AgΔSHM1ΔSHM2*.

Aus **Abb.16** geht hervor, dass die spezifische Aktivität der SHMT in *AgpAG203GLY1* im Vergleich zum Wildtyp mehr als doppelt so groß war. Damit war die Vermutung, dass die Threonin-Aldolase in der Lage ist, die SHMT-Reaktion zu katalysieren, durch ein wichtiges Argument gestützt und die Restaktivität in *Ag Δ SHM1 Δ SHM2* erklärt.

1.3.3 Bedeutung der cytosolischen SHMT2 für die Riboflavin-Überproduktion

Um den Effekt der *SHM2*-Disruption auf die Riboflavin-Produktion zu untersuchen, wurden die Stämme Wildtyp, *Ag Δ SHM1*, *Ag Δ SHM2* und die *SHM*-Doppeldisruptante *Ag Δ SHM1 Δ SHM2* auf HA-Vollmedium und Mineralsalzmedium mit 1 g/l Hefeextrakt und 20 g/l Glucose als C-Quelle 60 Stunden kultiviert.

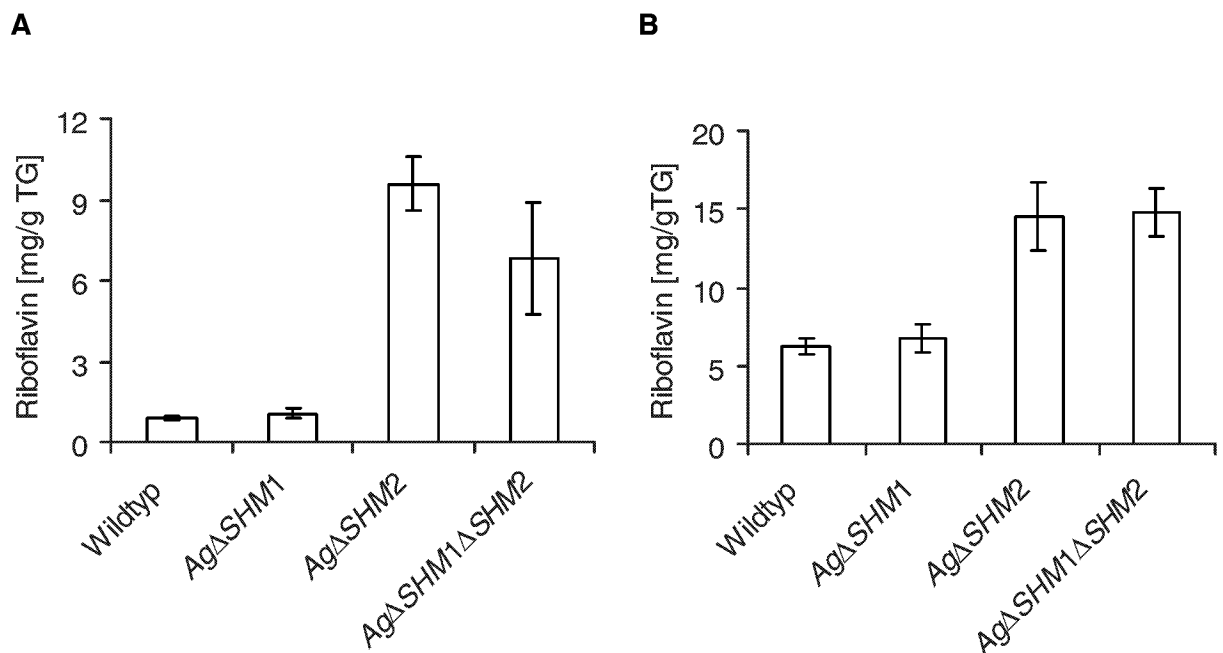


Abb.17 Vergleich der Riboflavin-Produktion von Wildtyp, den *SHM*-Einfachdisruptanten und einer *SHM*-Doppeldisruptante nach 60 h Kultivierung auf **(A)** HA-Vollmedium bzw. **(B)** Mineralsalzmedium

Die *SHM2*-Disruption hatte eine positive Auswirkung auf die Riboflavin-Synthese (**Abb.17**). So produzierten *Ag Δ SHM2* und *Ag Δ SHM1 Δ SHM2* auf Vollmedium 8 – 10mal mehr Riboflavin als der Wildtyp und *Ag Δ SHM1*. Auf Mineralsalzmedium wurde immerhin eine 2,5fache Produktivität erreicht.

Weiterhin war eine Abhängigkeit der Riboflavin-Überproduktion vom Kultivierungsmedium festzustellen. Wurden die Stämme auf dem modifizierten Mineralsalzmedium, das die Riboflavin-Biosynthese förderte, indem die Wachstumsphase verkürzt wurde, kultiviert, so erhielt man die stärkste Überproduktion. Mit den Stämmen *Ag Δ SHM2* und *Ag Δ SHM1 Δ SHM2* konnten dadurch Riboflavin-Produktivitäten von 15 mg/g TG erzielt werden. Wildtyp und

AgΔSHM1 produzierten auf diesem Mineralsalzmedium 6 mg Riboflavin/g TG, wohingegen die Riboflavin-Synthese auf Vollmedium lediglich bei 1 mg Riboflavin/g TG lag.

Die gesteigerte Überproduktion in den *SHM2*-Disruptanten legte die Vermutung nahe, dass in diesen Stämmen die intrazelluläre Glycin-Bereitstellung für die Riboflavin-Biosynthese verbessert wurde. Um dies zu klären, wurden die Glycin-Konzentrationen in Vollmedium und Mineralsalzmedium vor und nach der Kultivierung von Wildtyp und *AgΔSHM2* untersucht. Die berechnete Glycin-Zunahme ist in **Tab.7** dargestellt.

Tab.7 Konzentration der Glycin-Zunahme im Medium nach dreitägiger Kultivierung von Wildtyp und *AgΔSHM2* auf Voll- bzw. Mineralsalzmedium. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen sind das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

Stamm	Glycin-Zunahme [μM]	
	Vollmedium	Mineralsalzmedium
Wildtyp	550 ± 30	41 ± 4
<i>AgΔSHM2</i>	940 ± 50	141 ± 6

Sowohl bei Wachstum auf Vollmedium als auch auf Mineralsalzmedium zeigte sich, dass die Glycin-Konzentration im Stamm *AgΔSHM2* im Vergleich zum Wildtyp deutlich angestiegen war. In wie weit die gesteigerte Glycin-Konzentration im Kulturmedium mit einer *in vivo*-Änderung des Kohlenstoffflusses zum Glycin in Zusammenhang steht, sollte durch ¹³C-Markierungsexperimente herausgefunden werden.

1.3.4 Bedeutung der SHMT *in vivo*

Da die Glycin-Umwandlung zu Serin durch SHMT mit der Glycinamidribonukleotid-Synthetase-Reaktion um die Riboflavin-Vorstufe Glycin konkurriert, könnte die Inaktivierung der SHMT die Steigerung der Produktivität in *AgΔSHM2* erklären. Um die *in vivo* Funktion von SHMT1 und SHMT2 zu untersuchen, wurden ¹³C-Markierungsexperimente durchgeführt. Im ersten und zweiten Experiment wurde 500 μM ¹³C₁-Serin gefüttert, um die Umwandlung zu Glycin zu analysieren. Die reduzierten Markierungen im Serin, von 55,1 % bis 64,6 %, deuteten auf eine *de novo* Serin-Synthese, da 99 % ¹³C₁ in die Kultur zugegeben wurde (**Tab.8**). Eine Verdünnung der Markierung durch die Aufnahme unmarkierten Serins konnte vernachlässigt werden, da dessen Konzentration im Medium unterhalb von 10 μM war. Im Wildtyp wurden 89 % und 71 % der Markierung im Glycin detektiert. Demnach trägt die SHMT-Reaktion zum größten Teil, jedoch nicht allein, zum Glycin-Pool der Zelle bei. Im C₁ von Threonin konnte keine Markierung detektiert werden, was den Hinweis liefert, dass die

Threonin-Aldolase-Reaktion nicht reversibel ist. In Bezug auf *AgΔSHM1* und *AgTEFpSHM1* konnte kein signifikanter Unterschied im Markierungsmuster im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Das bedeutet, dass SHMT1 nur in einem geringen, d. h. nicht meßbaren, Ausmaß am Serin-Glycin-Fluss beteiligt ist, oder dass SHMT2 in der Lage ist, das inaktivierte Enzym zu kompensieren.

Tab.8 Umsetzung von $^{13}\text{C}_1$ -Serin zu Glycin und Threonin in *SHM1*-Mutanten. Die Markierungen im C_1 von Serin, Glycin und Threonin wurden aus dem Zellprotein nach Wachstum auf Mineralsalzmedium (0,05 g/l Hefeextrakt, 1 g/l Glucose) erhalten. Die Supplementierung von Wildtyp, *AgΔSHM1* und *AgTEFpSHM1* mit $^{13}\text{C}_1$ -Serin wurde in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt, dargestellt als 1. und 2. Experiment. Die detektierten Markierungen im C_1 von Serin wurden als 100 % festgesetzt (in Klammern angegeben).

Stamm	C_1 - ^{13}C -Markierung [%]					
	Serin		Glycin		Threonin	
	1. Exp.	2. Exp.	1. Exp.	2. Exp.	1. Exp.	2. Exp.
Wildtyp	64,6 (100)	60,0 (100)	46,5 (71)	53,3 (89)	1,1 (2)	1,1 (2)
<i>AgΔSHM1</i>	55,1 (100)	60,5 (100)	36,3 (65)	45,2 (75)	1,1 (2)	1,2 (2)
<i>AgTEF_pSHM1</i>	61,9 (100)	56,9 (100)	47,6 (76)	46,3 (81)	1,3 (2)	1,0 (2)

Wenn das jeweilige Experiment im einzelnen betrachtet wird, führte die *SHM1*-Disruption zu einer geringeren Markierung im Glycin. Die Streuung der Daten konnte diesen Trend jedoch nicht stützen.

In einem dritten und vierten Experiment wurden *AgΔSHM2*-Stämme und *AgΔSHM1ΔSHM2*-Stämme untersucht (**Tab.9**). Aufgrund der auffallenden Steigerung der Riboflavin-Überproduktion, die nach der *SHM2*-Disruption zu beobachten war, wurde jeweils eine weitere unabhängige Mutante (*AgΔSHM2-2*; *AgΔSHM1ΔSHM2-2*) mit untersucht. Bei diesen Mutanten war die Abnahme der Markierung im $^{13}\text{C}_1$ -Glycin signifikant. Während der Wildtyp 82 % und 83 % C_1 -Glycin-Markierung zeigte, war in den *AgΔSHM2*-Mutanten nur 47 % und 50 % detektiert worden, was bedeutet, dass die vorhandene SHMT die inaktivierte SHMT2 nicht kompensieren konnte. Im Hinblick auf die *SHM*-Doppeldisruptanten kann beobachtet werden, dass beide Stämme mit 23 % bzw. 6 % weniger Markierung im Glycin zeigen als *AgΔSHM2*. Demnach sind SHMT1 und SHMT2 beide an der Glycin-Bildung beteiligt. Dennoch konnte Restmarkierung im Glycin detektiert werden, obwohl gemäß der Erwartung keine Markierung festgestellt werden sollte. Die Restmarkierung paßt allerdings zu dem

gemessenen Rest an Enzym-Aktivität in den *AgΔSHM1ΔSHM2*-Stämmen. Da gezeigt werden konnte, dass die Restaktivität von der Threonin-Aldolase stammt, kann auch die detektierte Restmarkierung durch die Nebenaktivität der Threonin-Aldolase erklärt werden.

Tab.9 Metabolisierung von $^{13}\text{C}_1$ -Serin durch *SHM2*-Disruptanten und *SHM*-Doppeldisruptanten. Die Markierungen im C_1 von Serin, Glycin und Threonin wurden aus dem hydrolisierten Zellprotein nach Wachstum auf Mineralsalzmedium (0,05 g/l Hefeextrakt, 1 g/l Glucose) erhalten. Wildtyp, zwei *AgΔSHM2*-Stämme und zwei *AgΔSHM1ΔSHM2*-Stämme wurden mit $^{13}\text{C}_1$ -Serin supplementiert. Die detektierten Markierungen im Serin wurden als 100 % festgesetzt (in Klammern angegeben).

Stamm	C_1 - ^{13}C -Markierung [%]					
	Serin		Glycin		Threonin	
	3. Exp.	4. Exp.	3. Exp.	4. Exp.	3. Exp.	4. Exp.
Wildtyp	69,0 (100)	73,7 (100)	56,9 (82)	61,6 (83)	0,8 (1)	2,2 (3)
<i>AgΔSHM2-1</i>	63,1 (100)		29,9 (47)		0,9 (1)	
<i>AgΔSHM2-2</i>		71,0 (100)		35,7 (50)		0,5 (1)
<i>AgΔSHM1ΔSHM2-1</i>		65,8 (100)		15,3 (23)		0,6 (1)
<i>AgΔSHM1ΔSHM2-2</i>		63,2 (100)		3,7 (6)		1,3 (2)

Um den *in vivo* Fluß von Glycin zu Serin zu untersuchen, wurden drei weitere Markierungs-Experimente (5. – 7. Experiment) durchgeführt. Diesmal wurden 500 μM $^{13}\text{C}_1$ -Threonin gefüttert. Im Gegensatz zu den $^{13}\text{C}_1$ -Serin-Experimenten, war die Markierung in der supplementierten Aminosäure höher (bis zu 98,4 %). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Threonin-Biosynthese durch die Supplementierung inhibiert und reprimiert wurde (**Tab.10**). Im Wildtyp wurden 52 – 57 % der Markierung im Glycin detektiert. Interessanterweise waren 31 – 35 % des C_1 -Kohlenstoffs im Serin ^{13}C -markiert. Ursache dafür war die *in vivo* Katalyse der SHMT2, da in den *AgΔSHM2*-Stämmen eine deutlich reduzierte Serin-Markierung gezeigt werden konnte. Nur 2 %, 4 % bzw. 5 % wurden jeweils detektiert. Demnach korrelierten diese Markierungen in *AgΔSHM2* mit der gesteigerten Riboflavin-Überproduktion, was die signifikante Rolle von SHMT2 als Glycin-verbrauchendes Enzym bestätigt.

Tab.10 Umwandlung von $^{13}\text{C}_1$ -Threonin zu Glycin und Serin in *SHM*-Mutanten. Die Markierungen im C_1 von Serin, Glycin und Threonin wurden nach Isolierung der Aminosäuren aus auf Mineralsalzmedium (0,05 g/l Hefeextrakt, 1 g/l Glucose) gewachsener Biomasse erhalten. Die Supplementierung von Wildtyp, *Ag Δ SHM1* und zwei *Ag Δ SHM2*-Stämmen mit $^{13}\text{C}_1$ -Threonin wurde in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt, dargestellt als 5. bis 7. Experiment. Die detektierte Markierung im C_1 von Threonin wurde als 100 % festgesetzt (in Klammern angegeben).

Stamm	C_1 - ^{13}C -Markierung [%]								
	Serin			Glycin			Threonin		
	5. Exp.	6. Exp.	7. Exp.	5. Exp.	6. Exp.	7. Exp.	5. Exp.	6. Exp.	7. Exp.
Wildtyp	29,9 (31)	34,9 (35)	29,8 (31)	52,4 (54)	51,0 (52)	54,8 (57)	96,3 (100)	98,4 (100)	96,7 (100)
<i>AgΔSHM1</i>	31,3 (34)	38,6 (40)		57,6 (60)	55,2 (57)		96,3 (100)	96,7 (100)	
<i>AgΔSHM2-1</i>		5,3 (5)	4,2 (4)		65,5 (67)	56,1 (59)		97,7 (100)	94,8 (100)
<i>AgΔSHM2-2</i>			1,5 (2)			59,2 (62)			95,1 (100)

1.3.5 Regulation der *SHM*-Gene in *A. gossypii*

Die Deutung der *in vivo* Experimente bezüglich des quantitativen Beitrags der Isoenzyme stimmt nur, wenn der Pilz bei Disruption eines *SHM*-Gens nicht mit einer kompensierenden Regulation der Expression des übrigen Gens reagiert. Das gilt vor allem für *SHMT1*, was unterschätzt würde, wenn *SHM2* hochreguliert würde. Um dies zu überprüfen, wurde die Expression von *SHM1* und *SHM2* untersucht. Außerdem stellte sich die Frage, ob auch auf Transkriptionsebene ein Zusammenhang zwischen den *SHM*-Genen und *GLY1* besteht. Experimente auf Enzymlevel haben ergeben, dass in den *SHM*-Doppeldisruptanten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine Umwandlung von Serin zu Glycin erfolgt, die auf die Nebenaktivität der Threonin-Aldolase zurückgeführt wurde. Möglicherweise führt auch die Disruption von *GLY1* zu einer veränderten Expression von *SHM1* oder *SHM2*, damit der Glycin-Mangel aufgrund fehlender Threonin-Aldolase durch eine Steigerung der Glycin-Bildung durch *SHMT* ausgeglichen werden kann. Deshalb wurde die Expression von Wildtyp, zwei *SHM1*-Disruptanten, zwei *SHM2*-Disruptanten, zwei *SHM*-Doppeldisruptanten, dem *SHM1*-Überexprimierer *AgTEFpSHM1-8*, dem Threonin-Aldolase-Überexprimierer *AgpAG203GLY1* und der Threonin-Aldolase-Disruptante *Ag Δ GLY1* untersucht. Das Ergebnis der RT-PCR ist in der folgenden Abbildung (**Abb.18**) dargestellt.

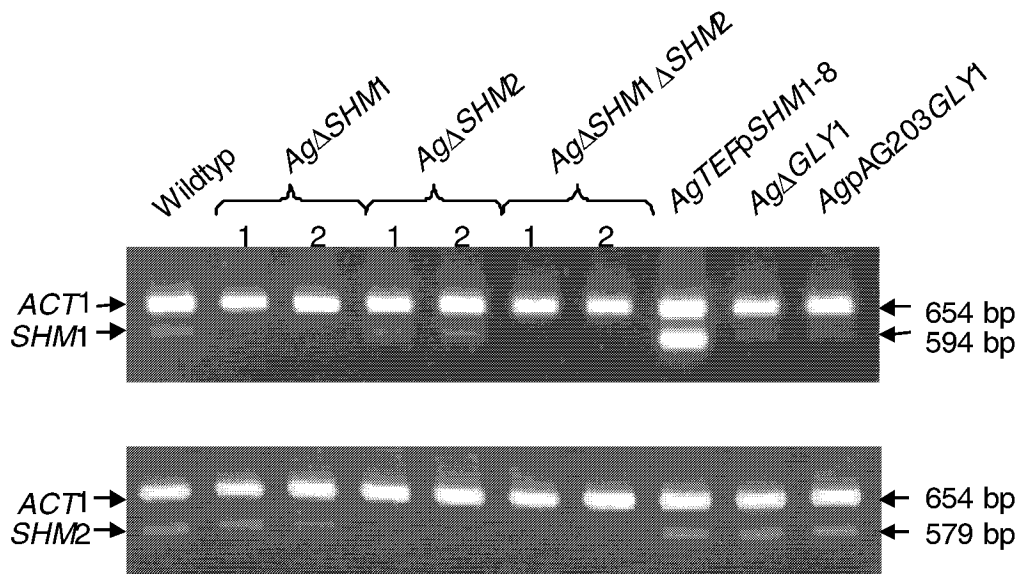


Abb.18 RT-PCR-Analyse zur relativen Bestimmung der *SHM1*- und *SHM2*-mRNA-Konzentrationen der Stämme *AgΔSHM1*, *AgΔSHM2*, *AgΔSHM1ΔSHM2*, *AgTEFpSHM1-8*, *AgΔGLY1* und *AgpAG203GLY1* im Vergleich zum *ACT1*-Transkript.

Bezüglich der Expression von *SHM1* waren bei den Negativ-Kontrollen mit disruptiertem *SHM1* (*AgΔSHM1-1*, *AgΔSHM1-2*, *AgΔSHM1ΔSHM2-1* und *AgΔSHM1ΔSHM2-2*) wie erwartet keine Signale zu sehen (**Abb.18**). Ebenso trat in den *SHM2*-disruptierten Stämmen (*AgΔSHM2-1*, *AgΔSHM2-2*, *AgΔSHM1ΔSHM2-1* und *AgΔHSM1ΔSHM2-2*) kein *SHM2*-Signal auf. Ferner konnte beobachtet werden, dass Wildtyp, *AgΔSHM2-1*, *AgΔSHM2-2*, *AgΔGLY1* und *AgpAG203GLY1* die gleiche Expressionsstärke zeigten. Das bedeutete, dass *SHM1* weder in *SHM2*-Disruptionsstämmen noch im Δ *GLY1*-Stamm hochreguliert wurde. *AgTEFpSHM1-8* zeigt ein deutlich stärkeres Signal. Die Überexpression des *SHM1*-Gens, durch Integration einer weiteren *SHM1*-Kopie unter Kontrolle des *TEF*-Promotors, führte zu einer Erhöhung der *SHM1*-Transkriptmenge. Dies war mit der gemessenen gesteigerten Enzymaktivität konsistent (Schlüpen *et al.*, 2003). Außerdem war zu beobachten, dass auch die Überexpression von *SHM1* die Expression von *SHM2* nicht beeinflusste. Bezüglich *SHM2* waren die relativen Transkript-Mengen in den Stämmen Wildtyp, *AgΔSHM1-1*, *AgΔSHM1-2*, *AgΔGLY1* und *AgpAG203GLY1* gleich groß. Auch hier führte die Disruption von *SHM1* nicht zu einer Hochregulierung der *SHM2*-Expression. Demnach findet keine Kompensation von *SHM1* und *SHM2* auf Transkriptionsebene statt. Die Ergebnisse der ^{13}C -Experimente mit den Mutanten lassen somit den Rückschluss auf den Wildtyp zu.

Weiterhin war interessant zu erfahren, ob *SHM1* und *SHM2* in Wachstums- und Produktionsphase des Pilzes unterschiedlich exprimiert werden. Während der Samenbildung von *Arabidopsis thaliana* wurde keine Expression des *akthr1*-Gens, das für eine Isoform der Aspartatkinase/Homoserin-Dehydrogenase kodiert, festgestellt (Zhu-Shimori, 1997).

Desweiteren spielt die Medien-Zusammensetzung eine wichtige Rolle in der Regulation einiger Enzyme. So trat in einem fakultativ methylotrophen Bakterium die eine SHMT bei Wachstum auf Methan oder Methanol auf, wohingegen das zweite Enzym bei Wachstum auf Succinat exprimiert wurde (O'Connor und Hanson, 1975). Auch in *S. cerevisiae* war die Expression zweier Gene (*GDH1* und *GDH3*) abhängig von der C-Quelle. Die Isoenzyme haben verschiedene allosterische Eigenschaften, und die relative Häufigkeit jeder Isoform reguliert die Glutamat-Biosynthese. Es ist daher nicht abwegig, dass bestimmte Medienkomponenten, deren Konzentration in Wachstums- und Produktionsphase unterschiedlich sind, der Auslöser für eine Expressionsänderung der einzelnen *SHM*-Gene sein könnten. Zur Untersuchung der *SHM*-Regulation wurden die Zellen des Wildtyps aus Wachstums- und Produktionsphase mit Hilfe der RT-PCR-Methode miteinander verglichen. Das Ergebnis ist in **Abb.19** dargestellt.

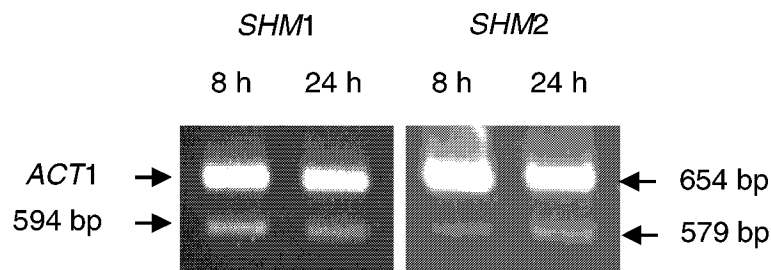


Abb.19 Analyse der *SHM*-Expression in Wachstums- und Produktionsphase. Die RNA-Isolierungen erfolgten nach 8 und 24 h während der Kultivierung auf HA-Medium.

Die *SHM1*-mRNA-Konzentration war in der Produktionsphase im Vergleich zur Wachstumsphase leicht reduziert. Aber auch das Actin-Transkript war erniedrigt. Es besteht also keine Regulation von *SHM1* auf Expressionslevel. Das *SHM2*-Signal war dagegen in der Riboflavin-Produktionsphase deutlich verstärkt. Demnach findet für *SHM2* eine Regulation auf Transkriptionsebene statt. Das Ergebnis korreliert mit der zeitabhängigen Aktivitätsbestimmung der SHMT (Monschau, 1998). Auf HA-Medium mit Glucose als C-Quelle wurde nach 10 h Kultivierung eine SHMT-Aktivität von 1 mU/mg Protein und nach 24 h von 3 mU/mg Protein gefunden. Mit Sojaöl als C-Quelle war die Aktivität nach 10 h ebenfalls 1 mU/mg Protein. In der Produktionsphase (24 h) wurden sogar 5 mU/mg Protein gemessen.

1.3.6 Bedeutung von AgSHMT1 und AgSHMT2 für das Wachstum

Desweiteren wurde die Bedeutung von SHMT1 und SHMT2 für das Wachstum untersucht. Dazu wurden die Stämme auf Mineralsalzmedium mit und ohne Supplementation von Glycin, Serin und Threonin geimpft. Wenn die SHMTs an den Stoffwechselwegen zu diesen Aminosäure-Pools beteiligt sind, sollten bei den Mutanten verzögertes Wachstum und

III. ERGEBNISSE

spezifische Komplementationseffekte zu beobachten sein. Neben Wildtyp, den beiden Einfachdisruptanten, *AgΔSHM1* und *AgΔSHM2*, und einer Doppeldisruptante wurde auch der beste *SHM1*-Überexprimierer *AgTEFpSHM1-8* untersucht. Ohne Aminosäure-Supplementation (Glycin < 45 µM, Serin < 55 µM, Threonin < 55 µM) zeigte *AgΔSHM2* im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte Wachstumsrate (**Tab.11**).

Tab.11 Effekt von Glycin, Serin und Threonin auf das radiäre Kolonien-Wachstum von Wildtyp, *AgΔSHM1*, *AgΔSHM2*, *AgΔSHM1ΔSHM2* und *AgTEFpSHM1*.

		Wachstumsraten [mm/Tag]				
		Wildtyp	<i>AgΔSHM1</i>	<i>AgΔSHM2</i>	<i>AgΔSHM1ΔSHM2</i>	<i>AgTEFpSHM1</i>
0 mM	Glycin	7,0	7,1	5,0	4,8	7,0
1 mM	Glycin	7,0	7,1	5,5	5,0	6,5
10 mM	Glycin	7,0	7,5	5,0	4,3	7,0
100 mM	Glycin	5,8	6,3	5,3	5,3	5,7
0 mM	Serin	7,3	7,3	4,8	4,2	6,8
1 mM	Serin	3,3	3,5	2,7	2,2	3,2
10 mM	Serin	2,8	1,8	2,2	1,3	2,2
100 mM	Serin	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0 mM	Threonin	7,3	7,5	4,8	4,5	6,3
1 mM	Threonin	5,0	4,8	5,5	5,2	4,7
10 mM	Threonin	5,3	5,5	5,3	5,0	5,3
100 mM	Threonin	3,3	2,2	2,7	3,3	3,3

Obwohl sowohl Glycin als auch Threonin einen positiven Effekt auf *AgΔSHM2* und *AgΔSHM1ΔSHM2* hatten, gelang es mit keiner Aminosäure diesen Phänotyp vollständig zu kompensieren. Dies kann durch einen diese Komplementation überlagernden wachstumshemmenden Effekt erklärt werden. Diese Wachstumshemmung wurde auch beim Wildtyp beobachtet und war bei Serin besonders deutlich. Wildtyp-Wachstum in *AgΔSHM2* und *AgΔSHM1ΔSHM2* konnte nur durch Fütterung von 1 mM Adenin wieder hergestellt werden (**Abb.20**). Die Notwendigkeit, Adenin zu supplementieren um Wildtyp-Wachstum zu erreichen zeigt den Zusammenhang zwischen Serin und dem C₁-Stoffwechsel. In allen Stämmen wurde das Wachstum mit steigenden Serin-Konzentrationen gehemmt und die Supplementierung von 100 mM Serin führte zu einem vollständigen Wachstumsverlust

(Tab.11). Die Fütterung von 100 mM Threonin führte ebenfalls zu einer Wachstumshemmung. Es wäre zu erwarten gewesen, dass sich mit steigender Threonin-Konzentration auch die Glycin-Konzentration innerhalb der Zelle erhöht und daher dieselben Effekte wie bei der Glycin-Fütterung auftreten. Jedoch muß berücksichtigt werden, dass bei hohen Threonin-Konzentrationen die Aspartatkinase wahrscheinlich allosterisch inhibiert wird. In *S. cerevisiae* wurden ebenfalls Wachstumshemmungen bei hohen Threonin-Konzentrationen beobachtet. Als Ursache für die Wachstumshemmung wurde Methionin-Mangel angenommen, da Methionin sich aus einem Zwischenprodukt der Threonin-Biosynthese ableitet (Arévalo-Rodríguez *et al.*, 1999).

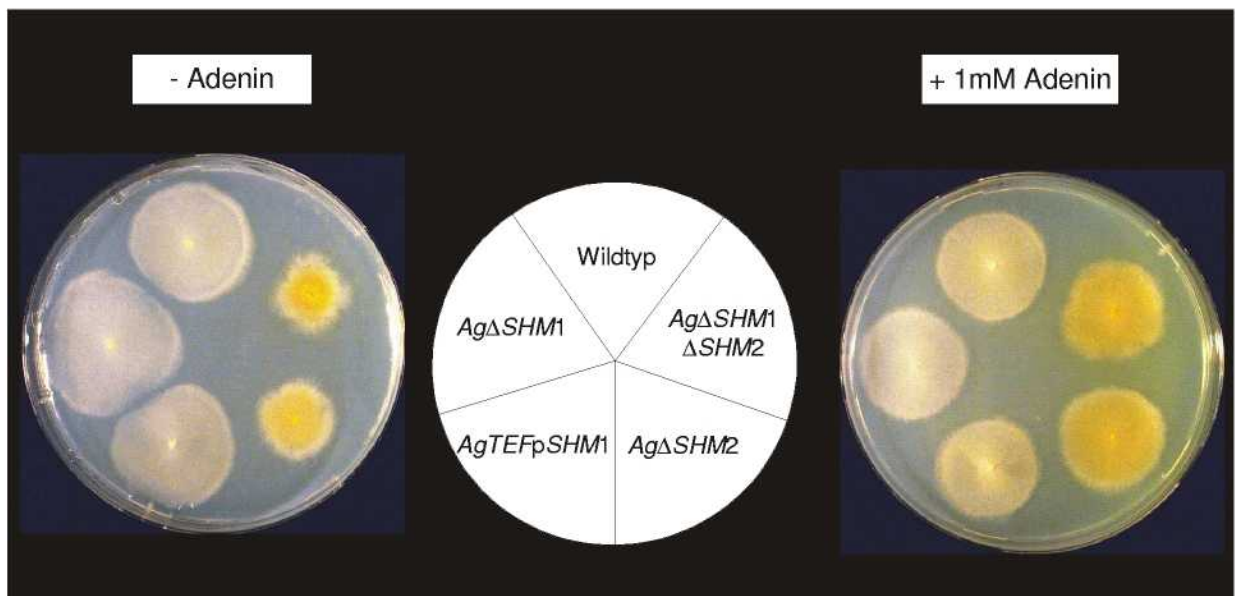


Abb.20 Wirkung der Adenin-Supplementierung auf das Wachstum von *SHM*-Mutanten. *A. gossypii* Wildtyp, eine *SHM1*- und eine *SHM2*-Disruptante, eine *SHM1 SHM2*-Doppeldisruptante sowie der *SHM1*-Überexprimierer *AgTEFpSHM1* wurden auf Mineralsalzmedium mit und ohne Zugabe von 1 mM Adenin kultiviert.

1.4 Einfluss der *SHM2*-Disruption auf die Glycin-Antimetabolit-Resistenz

Die Selektion von Aminosäure-Antimetabolit-resistenten Stämmen ist eine gängige Methode zur Herstellung von Aminosäure-Überproduzenten (Niederberger, 1989). α -Aminomethylphosphonsäure (AMPS) ist ein Glycin-Antimetabolit. Die Wirkung dieser Substanz beruht auf ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Glycin. Durch die Bindung von AMPS an das aktive Zentrum der Enzyme, die normalerweise Glycin als Substrat besitzen, kommt es zu einer Kompetition zwischen Glycin und AMPS um die Substrat-Bindungsstelle, wodurch der Stoffwechsel gestört wird. Die resultierende Wachstumshemmung, kann durch Zusatz von Glycin bzw. durch eine Mutation in der Regulation der Glycin-Synthese oder im Aufnahmesystem von Glycin wiederhergestellt werden. Die Isolierung eines AMPS-resistenten Stamms sollte zu einer verbesserten Bereitstellung der limitierenden Vorstufe Glycin und damit zu einem Riboflavin-Überproduzenten führen. Der von Monschau (1998) isolierte Stamm *AgAMPS-NM-01* war AMPS-resistent auf Mineralsalzmedium und die Riboflavin-Überproduktion war deutlich gesteigert. Auffällig war, dass die spezifische SHMT-Aktivität um 50 % reduziert war. Im Hinblick auf die erhöhte Riboflavin-Überproduktion und die herabgesetzte SHMT-Aktivität trifft dieser Phänotyp auch auf *Ag Δ SHM2* zu. Es stellte sich die Frage, ob *Ag Δ SHM2* auch AMPS-Resistenz zeigte. Dazu wurden die Stämme *AgAMPS-NM-01*, Wildtyp, *Ag Δ SHM1* und *Ag Δ SHM2* auf Mineralsalzmedium mit und ohne Zugabe von 70 mM AMPS kultiviert (**Abb.21**).

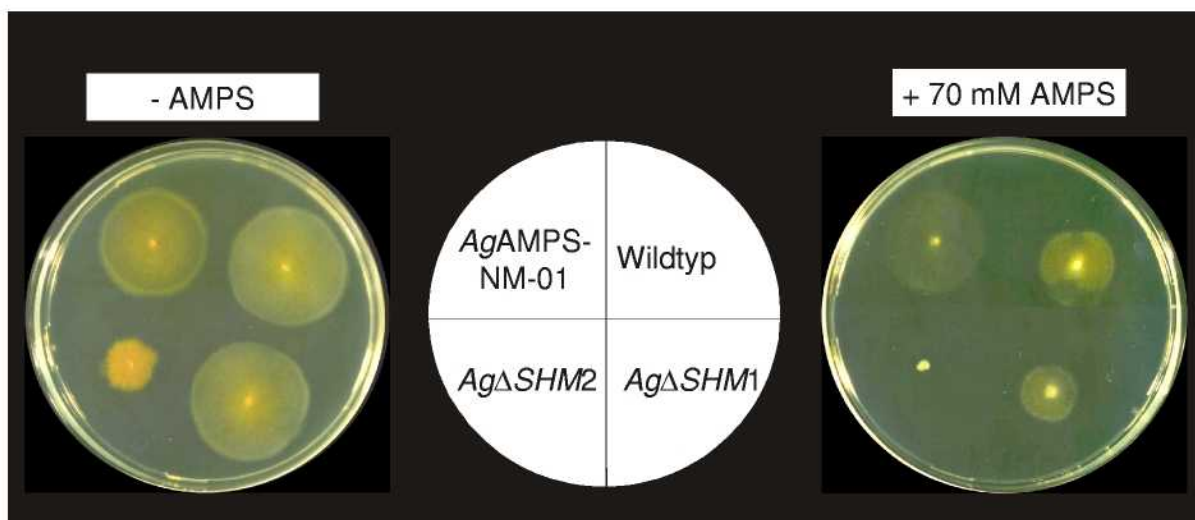


Abb.21 Überprüfung der AMPS-Resistenz. Die Stämme *AgAMPS-NM-01*, Wildtyp, *Ag Δ SHM1* und *Ag Δ SHM2* wurden auf Mineralsalzmedium-Platten mit und ohne Zugabe von 70 mM AMPS angeimpft.

Der Stamm *AgAMPS-NM-01* zeigte in Anwesenheit von 70 mM AMPS ein gleichmäßiges radiäres Wachstum, während in Wildtyp und *Ag Δ SHM1* zunächst eine Wachstumshemmung und nach einem Tag die Ausbildung von Sektoren aus spontan resistenten Mutanten auftrat.

Entgegen den Erwartungen war bei *AgΔSHM2* keine AMPS-Resistenz zu beobachten. Das führte zu der Vermutung, dass die Mutation, die beim Stamm *AgAMPS-NM-01* zur Antimetabolit-Resistenz führt, im *SHM2*-Gen lokalisiert ist. Ein $^{13}\text{C}_1$ -Markierungsexperiment wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob sich *AgAMPS-NM-01* wie *AgΔSHM2* in Bezug auf den Kohlenstofffluss verhält. Wildtyp, *AgΔSHM2* und *AgAMPS-NM-01* wurden mit $^{13}\text{C}_1$ -Threonin gefüttert.

Tab.12 Umsetzung von $^{13}\text{C}_1$ -Threonin zu Glycin und Serin durch Wildtyp, *AgΔSHM2* und *AgAMPS-NM-01*. Die ^{13}C -Markierungen im C_1 von Serin, Glycin und Threonin wurden aus dem Zellprotein nach Wachstum auf Mineralsalzmedium (0,05 g/l Hefeextrakt, 1 g/l Glucose) erhalten.

Stamm	C_1 - ^{13}C -Markierung [%]		
	Serin	Glycin	Threonin
Wildtyp	29,8 (31)	54,8 (57)	96,7 (100)
<i>AgΔSHM2</i>	1,5 (2)	59,2 (63)	94,3 (100)
<i>AgAMPS-NM-01</i>	9,6 (10)	57,0 (60)	95,1 (100)

Die *SHM2*-Disruption führte zu geringerer Serin- und gesteigerter Glycin-Markierung (**Tab.12**). So wurden in *AgΔSHM2* nur 2 % Markierung im Serin und 63 % im Glycin detektiert, im Vergleich zum Wildtyp mit 31 % im Serin und 57 % im Glycin. Die detektierten Markierungen in *AgAMPS-NM-01* von 10 % im Serin und 60 % Glycin zeigten, dass der Glycin-Serin-Fluss in diesem Stamm vergleichbar mit dem in *AgΔSHM2* ist. Dies stützte die Vermutung, dass die Mutation zur AMPS-Resistenz im *SHM2*-Gen liegt. Eine Disruption des *SHM2*-Gens im Stamm *AgAMPS-NM-01* sollte dann zu einem Verlust der AMPS-Resistenz führen. Die *SHM2*-Disruption in *AgAMPS-NM-01* und die anschließende Überprüfung der Transformanten wurde wie in III.1.3.1 beschrieben durchgeführt. Die *SHM2*-Disruption einer der Transformanten (*AgAMPS-NM-01ΔSHM2*) wurde mittels Southern-Blot-Analyse überprüft (**Abb.22A**). Das 800 bp große Signal zeigt, dass in *AgAMPS-NM-01* die Austauschmutagenese am *SHM2*-Lokus, wie erwartet, eingetreten ist.

Um zu überprüfen, ob die Disruption von *SHM2* zu einem Verlust der Funktionalität des Enzyms führt, wurde mit den Stämmen Wildtyp, *AgΔSHM2* und *AgAMPS-NM-01ΔSHM2* der radioaktive SHMT-Test durchgeführt. **Abb.22B** zeigt, dass die Aktivitäten von *AgAMPS-NM-01ΔSHM2* und *AgΔSHM2* gleich groß und im Vergleich zum Wildtyp reduziert waren.

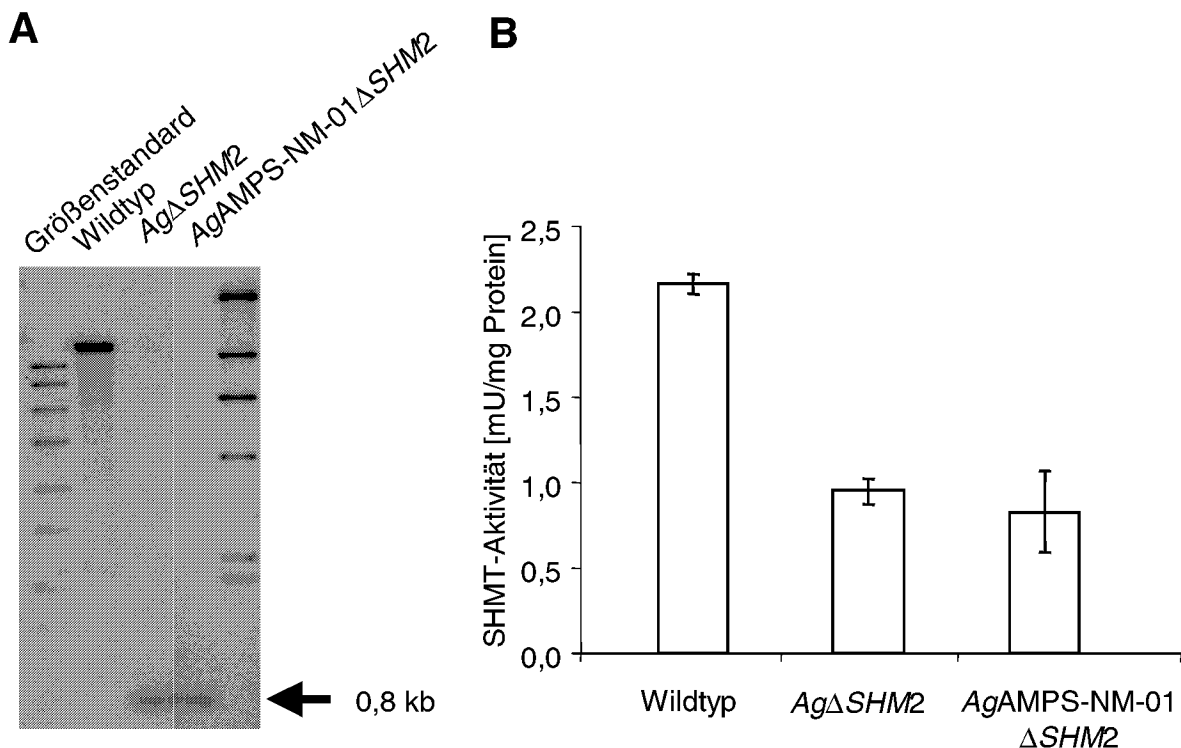


Abb.22 A Southern-Blot-Analyse zur Überprüfung der *SHM2*-Disruption in dem Stamm *AgAMPS-NM-01 ΔSHM2*. Die genomische DNA von Wildtyp, *AgΔSHM2* und der zu untersuchenden Transformante wurde mit *EcoRI* geschnitten und gegen das *EcoRI/EcoRV*-Fragment des Vektors pJR2417 hybridisiert.

B Bestimmung der spezifischen SHMT-Aktivität in Wildtyp, *AgΔSHM2* und *AgAMPS-NM-01ΔSHM2* nach 24 stündiger Kultivierung auf Vollmedium.

Zur Untersuchung, ob *AgAMPS-NM-01ΔSHM2* die AMPS-Resistenz verloren hatte, wurde ein Wachstumstest durchgeführt. Die Stämme Wildtyp, *AgΔSHM2*, *AgAMPS-NM-01* und *AgAMPS-NM-01ΔSHM2* wurden auf Mineralsalzmedium mit und ohne Zugabe von 70 mM AMPS geimpft.

Tab.13 Wachstum der Stämme Wildtyp, *AgΔSHM2*, *AgAMPS-NM-01* und *AgAMPS-NM-01ΔSHM2* auf Mineralsalzmedium mit 0,02 % Hefeextrakt und 0,5 % Glucose als C-Quelle in Anwesenheit und in Abwesenheit von 70 mM AMPS. Die Platten wurden punktförmig mit den Stämmen beimpft und fünf Tage bei 30 °C inkubiert.

Stamm	Wachstumsrate [mm/Tag]	
	- AMPS	+ 70 mM AMPS
Wildtyp	7,3	“5,0” (Mutanten)
<i>AgAMPS-NM-01</i>	6,0	6,7
<i>AgΔSHM2</i>	5,3	0,6
<i>AgAMPS-NM-01ΔSHM2</i>	3,3	0,2

Während *AgAMPS-NM-01* AMPS-resistent war, zeigte *AgAMPS-NM-01 Δ SHM2* keine Resistenz und verhielt sich somit wie *Ag Δ SHM2* (**Tab.13**). Beim Vergleich von *AgAMPS-NM-01 Δ SHM2* mit *Ag Δ SHM2* auf Medium ohne AMPS wurde jedoch deutlich, dass sich die beiden Stämme bezüglich ihres Wachstums unterschieden. So konnte für *Ag Δ SHM2* eine Wachstumsrate von 5,3 mm/Tag bestimmt werden, wohingegen *AgAMPS-NM-01 Δ SHM2* nur 3,3 mm/Tag wuchs. Dazu war das Myzel von *Ag Δ SHM2* deutlich gelber als das von *AgAMPS-NM-01 Δ SHM2*, was zeigt, dass die Riboflavin-Überproduktion in *Ag Δ SHM2* größer ist. Demnach konnte der Schluß gezogen werden, dass die Mutation, die beim Stamm *AgAMPS-NM-01* zur Antimetabolit-Resistenz führte, nicht im *SHM2*-Gen lokalisiert war, sondern in einem anderen Gen, dass sich auf SHMT2 auswirkt.

2. Isolierung eines Gens der Threonin-Biosynthese von *A. gossypii*

Die Fütterung von Glycin führt in *A. gossypii* zu einer Steigerung der Riboflavin-Überproduktion. Jedoch wird nur ein geringer Anteil des extrazellulär angebotenen Glycins verbraucht, was auf eine schlechte Aufnahme der Aminosäure schließen läßt (Monschau, 1998). Messungen der Aminosäure-Konzentrationen vor und nach der Kultivierung haben gezeigt, dass die Threonin-Aufnahme im Vergleich zur Glycin-Aufnahme erleichtert ist. Durch Untersuchungen zur Bedeutung der Threonin-Aldolase wurde herausgefunden, dass Threonin ebenfalls ein limitierender Faktor der Riboflavin-Überproduktion werden kann. So führte die Überexpression des *GLY1*-Gens, das für die Threonin-Aldolase kodiert, in einem *A. gossypii*-Stamm nur nach Zugabe von 50 mM Threonin zu einer 8fachen Steigerung der Riboflavin-Überproduktion (Monschau *et al.*, 1998). Die Ursache lag in einer verbesserten Glycin-Bereitstellung für die Riboflavin-Synthese. Die Threonin-Supplementierung könnte umgangen werden, indem ein Stamm konstruiert wird, der eine gesteigerte Threonin-Biosynthese aufweist. Von *S. cerevisiae* wurden Stämme isoliert, die Threonin überproduzierten und exkretierten (Farfán *et al.*, 1996; Farfán und Calderón, 2000). Ursache dafür war eine deregulierte Aspartatkinase, dem Schlüsselenzym der Threonin-Biosynthese. Um gezielte Veränderungen in der Threonin-Biosynthese vornehmen und deren Einfluss auf die Riboflavin-Produktion untersuchen zu können, sollte in diesem Teil der Arbeit die Aspartatkinase aus *A. gossypii* isoliert werden.

2.1 Komplementation einer Threonin-auxotrophen *S. cerevisiae*-Mutante

Um die Funktion der Aspartatkinase im Threonin- und Glycin-Stoffwechsel sowie die Bedeutung für die Riboflavin-Bildung zu untersuchen, mußte zunächst das für dieses Enzym kodierende *HOM3*-Gen aus *A. gossypii* isoliert werden. Aufgrund der engen Verwandtschaft zwischen *S. cerevisiae* und *A. gossypii*, die schon aus der funktionellen Komplementation von Hefemutanten mit *AgGLY1* (Monschau, 1998) bzw. *AgICL1* (Maeting, 1999) deutlich wurde, war anzunehmen, dass auch in bezug auf das *HOM3*-Gen eine funktionelle Komplementation möglich ist.

In der von EUROSCARF bezogenen Threonin-auxotrophen *S. cerevisiae*-Mutante Y00187 war das *HOM3*-Gen durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt worden. *S. cerevisiae* Y00187 wurde mit einer *A. gossypii*-Genbank transformiert. Die Genbank bestand aus 34 Fraktionen mit je 100 verschiedenen YEp352-Plasmiden, die neben den Markern Amp^R, *URA3* und *lacZ* die *Sau3A*-Fragmente chromosomaler *A. gossypii*-DNA trugen (Maeting *et al.*, 1999). Durch eine funktionelle Komplementation sollte in *S. cerevisiae* das intakte *HOM3*-Gen des *A. gossypii*-Plasmids exprimiert werden und die gebildete Aspartatkinase den Threonin-Mangel beseitigen. Im ersten Schritt wurden durch Selektion auf Uracil-Prototrophie die Zellen erhalten, die ein Genbank-Plasmid besaßen. Jede der 34

Transformationen führte zu ca. 3000 Kolonien pro Platte (**Tab.14**). Im zweiten Selektionsschritt wurden die Zellen auf SD-Medium ohne Threonin und ohne Uracil überstempelt und damit auf Threonin-Prototrophie selektioniert. Das Ergebnis der Transformation ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tab.14 Ergebnis der Transformation nach Selektion auf Uracil- und Threonin-Prototrophie. GB steht für den Transformationsansatz, der die jeweilige Genbank-Fraktion enthält.

1. Selektion (SD – ura, + thr)	GB-01,..., GB-34	~ 3000	Kolonien/Platte
2. Selektion (SD – ura, - thr)	GB-28	431	Kolonien
	GB-29	68	Kolonien
	GB-30	7	Kolonien
	GB-32	16	Kolonien
	GB-33	8	Kolonien

Auf diese Weise wurden insgesamt 530 Threonin-prototrophe Klone erhalten. Zur Überprüfung, ob die Threonin-Prototrophie der Transformanten plasmidkodiert war, wurden Plasmidkurierungs-Experimente durchgeführt. Je drei Transformanten wurden zufällig ausgewählt und nach zwei Vollmedium-Passagen wurden 15 Klone auf verschiedenen Medien kultiviert. Während auf Vollmedium (YPD) alle wuchsen, zeigten auf beiden Selektionsmedien (SD – ura + thr; SD – ura – thr) nur 1. bis 11. Wachstum. Vier Klone waren vom Plasmid kuriert und konnten deshalb ohne Uracil nicht mehr wachsen. Genau diese Klone waren auch wieder auxotroph für Threonin. Dieses Ergebnis spricht für eine Plasmid-kodierte Aspartatkinase. Die Plasmide aus den 15 *S. cerevisiae* Transformanten wurden isoliert und in *E. coli* amplifiziert, um dann einer Restriktionsanalyse unterzogen zu werden. 11 Transformanten enthielten den Vektor YEp352 mit einem 6,5 kb großen Integrations-Fragment. Mit der DNA aus den vier übrigen Transformanten konnten keine *E. coli*-Transformanten gewonnen werden. Die Restriktionsmuster des 6,5 kb-Inserts waren in allen Plasmiden identisch, so dass davon auszugehen war, dass auf allen Plasmiden das gleiche Gen vorlag. Mit einem der Plasmide (YEp352 GB-28-1-1) wurde daher exemplarisch eine Retransformation des Threonin-auxotrophen Ausgangsstammes *S. cerevisiae* Y00187 durchgeführt. Im ersten Selektionsschritt wurden die Zellen auf Medium ohne Uracil aber mit Threonin ausplattiert. Es konnten 2400 Transformanten erhalten werden. 80 dieser Kolonien wurden auf Medium ohne Uracil und ohne Threonin überimpft und konnten darauf wachsen. Das bedeutete, dass alle Transformanten das Plasmid YEp352 mit integriertem 6,5 kb-Fragment besaßen, welches zu Threonin-Prototrophie durch funktionelle Komplementation

fürte. Das 6,5 kb-Fragment des Plasmids YEp352 GB-28-1-1 wurde sequenziert (Arbeitsgruppe Revuelta, Salamanca). Die Sequenz-Analyse eines 3,64 kb großen Teilbereiches dieses Fragments ergab vier offene Leserahmen (**Abb.23**). ORF1 mit einer Länge von 821 bp und ORF2 mit einer Länge von 1659 bp zeigten die gleiche Orientierung. ORF3 (422 bp) und ORF4 (476 bp) waren entgegengesetzt orientiert, wobei ORF4 und ORF2 mit 417 bp überlappten.

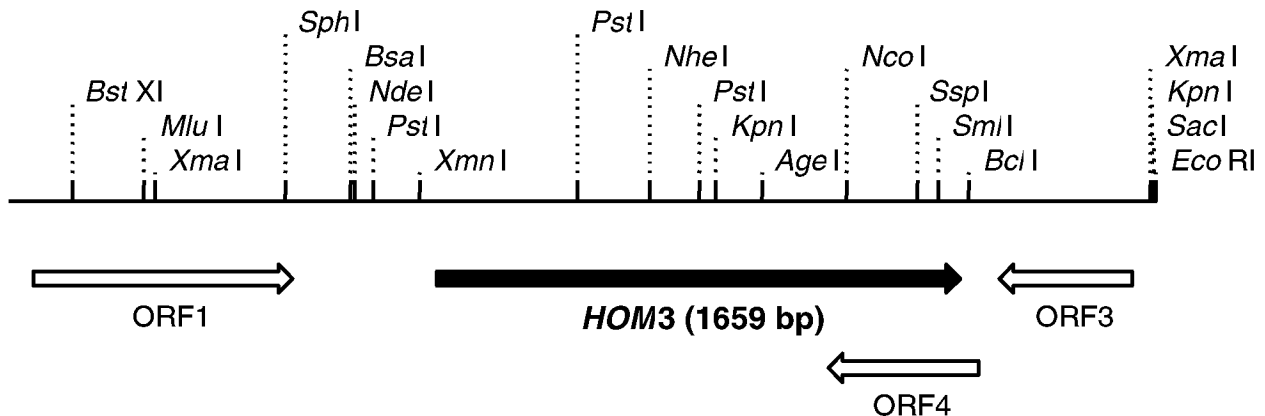


Abb.23 Bereich des sequenzierten Fragmentes, auf dem sich *AgHOM3* befindet.

Ein computergestützter Vergleich (CLUSTALW) der abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen dieser offenen Leserahmen mit Protein-Datenbanken ergab, dass die abgeleitete Sequenz des ORF2 70 % Aminosäure-Sequenz-Identität zu der Aspartatkinase aus *S. cerevisiae* besaß. Während die benachbarten ORFs des *S. cerevisiae* *HOM3*-Gens für Proteine bisher unbekannter Funktion kodieren, konnten für die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *A. gossypii* ORFs Funktionen zugeordnet werden. So zeigte das abgeleitete Protein des ORF1 41 % Sequenz-Identität zum *S. cerevisiae* Cytochrom b5-Protein, die Proteinsequenz des ORF3 stimmte in 56 % mit der NADH-Cytochrom b5 Reduktase aus *S. cerevisiae* überein und das abgeleitete Protein von ORF4 war zu 32 % mit einem Aureobasidin A Resistenzprotein identisch.

2.2 Sequenz des *AgHOM3*-Gens

Das *AgHOM3*-Gen (ORF2) kodiert für ein putatives Protein von 553 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 62000. Ein Vergleich der abgeleiteten *AgHOM3*-Aminosäure-Sequenz mit Aspartatkinasen von *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Neurospora crassa* wurde mit Hilfe des ClustalW Computerprogramms durchgeführt. Alle abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen sind in etwa gleich lang (**Abb.24**). Das *AgHOM3*-Protein zeigte mit 71 % die größten Identitäten zur *S. cerevisiae* Aspartatkinase, gefolgt von

dem entsprechenden Protein aus *S. pombe* (53 %). Eine 45 %ige Übereinstimmung der Aminosäuren trat zwischen dem AgHOM3-Protein und der Aspartatkinase aus *N. crassa* auf.

Ag_HOM3P	MNKQNRRLQLQLFPY	SRSIAQRDTMRSIADQK	TNWWVQKFGGTS	****	IGKFPTNIVNDIVKV	60
Sc_AK	-----MPMDFQPT	S-----	SHSNWVQKFGGTS		VGKFPVQIVDDIVKH	38
Sp_AK	-----MSIAKNIE	N-----	DPSKGWVQKFGGTS		VGKFPKIIVADVAK	39
Nc_AK	-----MAGPQLLQ	N-----	DSPNGWIVQKFGGTS		VGKFPDRIAEDIIRA	39
Ag_HOM3P	F	SHDYG--KNVAVVCSARS	SYTKSEGTTS	SRLLMACD-----	AAASYDET-----	FQDIVR 108
Sc_AK	Y	SKPDGPNNNVAVVCSARS	SYTKAEGTTS	SRLLKCCD-----	LASQESE-----	FQDIIE 87
Sp_AK	Y	LSTKR----VALVCSARS	TDTKAEGTTT	TRLIRATE-----	AALRPAVGS----	VHDLVR 86
Nc_AK	Y	VKDHR----LVVCSARS	TGKKVTGTT	SRLLEVFKNLKAIA	AYASDEHKQDAL	LKDAKR 95
Ag_HOM3P	V	IR---EDHVENASHHIKDAE	LRVRLVEQTND	ELDQVERYLQASQ	ILG-EVSNRTMDLVM	164
Sc_AK	V	IR---QDHIDNADRFILNPAL	QAKLVDDTNKE	LELVKKYLNASKVL	LG-EVSSRTVDLVM	143
Sp_AK	I	IE---TDHVQAARDFIQDVG	TQDELIDAFHAD	CVELEQYLNATRV	LS-EVSPRTDRLVI	142
Nc_AK	V	MDICSDDHTAAADKFIQDAE	LAAIVKEETVKE	CQLLIEYLEEAAK	REHLEVNSRAKDRVI	155
Ag_HOM3P	S	VGEKLSCLFLTALCEDCGVTA	EYVDFSSIVPTD	FRCAEGSLDNSFY	ALLVFAKERLAQ	224
Sc_AK	S	CGEKLSCLFLMTALCNDRC	GKAKYVDLSHIV	PSDF--SASALDNS	FYTFVLQALKEK	LAP 201
Sp_AK	G	MGERLSCRFMMAAVLKDQ	GIDSEFIDMSHI	IDEQR--EWRNLDA	SFYAYLAS----	QLAS 196
Nc_AK	S	FGEKLSCRFMACMLKDRG	VDAEYVDLADVL	HLDA--SIERLDAT	FYREAAE----	VIK 209
Ag_HOM3P	I	VQANKEGKRIVPVITGFFGL	LLPMGLLN-GVGRGY	TDLCALVAVALNA	DELQVWKEVDG	283
Sc_AK	F	VSAK---ERIVPVFTGFFGL	LVPTGLLN-GVGRGY	TDLCALIAVAVNA	DELQVWKEVDG	257
Sp_AK	K	VTAVG---NKVPVVTGFFG	MVPGLLS-QIGRGY	TDLCALIAVAVNA	DELQVWKEVDG	252
Nc_AK	K	ILAC---ENRVPVVTGFFG	NVPGLLDGDVGRGY	TDLCALIAVAVNA	DELQVWKEVDG	266
Ag_HOM3P	I	FTADPRKVPQARLLET	VTPEEAEELTYYG	SEVIHPFTTMEQV	IRAK--IPIRIKNV	QNPT 341
Sc_AK	I	FTADPRKVPPEARLL	DSVTPEEAEELTYYG	SEVIHPFTTMEQV	IRAK--IPIRIKNV	QNPL 315
Sp_AK	I	FTADPRKVPTARLL	PLITPEEAEELTYYG	SEVIHPFTTMSQV	HAIR--IPIRIKNV	GNPR 310
Nc_AK	I	FTADPSKVPTARLV	PSITPEEAEELTYYG	SEVIHHLTMDQV	IKATPPIPIRIKNV	KNPR 326
Ag_HOM3P	G	GTVIYADNIAKKGEST	PPHPPISVS	SSFFE-----	QRK-RGATAITTKND	IVVLNIH 394
Sc_AK	G	NGTIIYPDNVAKKGEST	PPHPPENLSS	SSFYE-----	KRK-RGATAITTKND	IFVINIH 368
Sp_AK	G	KGTVIFPDTISRHGS	ATPPHPPKIMP	DDISA-----	SLANKGATAVTIKD	TIMVINIQ 364
Nc_AK	G	EGTIVKPDPLLPDQ	ILQRHQQNGTC	NGTKTNGTGQK	SNKPKRPTAVTIK	KDISIINI 386
Ag_HOM3P	S	NKKTLSHGFLAQIFT	ILDNYKLVVDL	ISTSEVHVS	MALPVPDSDSQRSL	RNAVEELKKL 454
Sc_AK	S	NKKTLSHGFLAQIFT	ILDNYKLVVDL	ISTSEVHVS	MALPIPDA	SLKSIRQAEEKLRIL 428
Sp_AK	S	NKRKISAHGFLASIF	AILDKYKLAVDL	ITSEVHVS	MALYEE	SDDG--NMHEAFVELRRL 422
Nc_AK	S	NKRKISAHGFLASIF	AILDKYKLAVDL	ITSEVHVS	MALYEE	SDDG--NMHEAFVELRRL 445
Ag_HOM3P	G	TVDLIKMAIVSLVGK	QMKHFI	GLAGAMFTT	LSQNIEMI	SQANEINISCVI DEKN 514
Sc_AK	G	SVDTITKKSIVSLVGK	QMKHFI	GLAGAMFTT	LSQNIEMI	SQANEINISCVI NESD 488
Sp_AK	G	TLDILHGLAILSLVGK	HMRNTTGY	AGRMFCKLAE	QINIEMI	SQASEINISCVI DEKM 482
Nc_AK	G	DVSVLHGLAILSLVGK	AEKMMIGISG	KMFSTLGDHR	INIEMI	SQASEINISCVI DARD 505
Ag_HOM3P	S	VRALQSIHAKLLE	PLAPTSSG--	AVLNGRLEQLK	SLDL	552
Sc_AK	S	INALQCIHAKLL	SERTNTSNQFE	HAIDERLEQLK	RGLI-	527
Sp_AK	A	VKALNVIHKELLE	PLALHEVPSQ	ASMLVEKPW	LYSA---	519
Nc_AK	A	ERAMNILHTNL	FTFLE-----			522

Abb.24 Aminosäure-Sequenz-Vergleich des abgeleiteten *A. gossypii* HOM3-Proteins mit den Aspartatkinasen aus *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp) und *Neurospora crassa* (Nc). Die in allen Sequenzen identischen Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Konservierte Substitutionen sind dunkelgrau, semikonservierte Substitutionen hellgrau unterlegt. Das in allen eukaryotischen und prokaryotischen Aspartatkinasen identische Tetrapeptid ist mit Sternen (****) gekennzeichnet. Aminosäure-Reste, die an der Funktion der Aspartatkinase beteiligt sind, wurden eingerahmt.

Das Alignment zeigt, dass sich am N-, am C-Terminus und im mittleren Teil der Aminosäure-Sequenzen stark konservierte Bereiche befinden. So wurde am N-Terminus das Tetrapeptid KFFG identifiziert, das den Kern einer hoch konservierten Region bildet und in allen eukaryotischen und prokaryotischen Aspartatkinasen zu finden ist (Arévalo-Rodríguez *et al.*, 1999). Obwohl die Funktion dieser Sequenz unbekannt ist, konnte herausgefunden werden, dass sie essentiell für die Funktionalität des Enzyms und nicht an der allosterischen Regulation beteiligt ist. Mutationen führten zu einer veränderten Affinität zu ATP und Aspartat, so dass die Region vermutlich an deren Bindung involviert ist. Aufgrund der Sequenz-Homologie zwischen dem *AgHOM3*-Protein und den Aspartatkinasen der Pilze besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei *AgHOM3* um das Gen, das für eine Aspartatkinase in *A. gossypii* kodiert, handelt.

2.3 Funktion des *AgHOM3*-Proteins

Die Funktion des *HOM3*-Genproduktes in *A. gossypii* sollte durch Bestimmung der zugehörigen Enzymaktivität aufgeklärt werden. Die Aspartatkinase gilt als das Schlüsselenzym der Threonin-Biosynthese. In *S. cerevisiae* ist eine Feedback-Hemmung der Aspartatkinase durch Threonin (Stadtman *et al.*, 1961; De Robichon-Szulmajster und Corrivaux, 1963; Ramos *et al.*, 1991) und Homoserin (Delgado *et al.*, 1982) beschrieben.

2.3.1 Nachweis des Aspartatkinase-Aktivität

Zur Bestimmung der Aspartatkinase-Aktivität in *A. gossypii* wurde ein von Black and Wright (1955) entwickelter Enzymtest modifiziert. Die spezifischen Aktivitäten der Aspartatkinase wurden im Wildtyp-Rohextrakt bestimmt. Außerdem wurde der Effekt von Threonin, Methionin und Homoserin auf die Aktivität untersucht.

Tab.15 Einfluss von Aminosäuren auf die spezifische Aspartatkinase-Aktivität im Rohextrakt des Wildtyp nach 20 h Kultivierung.

	spezifische Aktivität [mU/mg Protein]
Kontrolle	4,6
Threonin (10 mM)	0,6
Methionin (13 mM)	4,8
Homoserin (17 mM)	4,7

Es konnte Aspartatkinase-Aktivität im Wildtyp detektiert werden (**Tab.15**). Weiterhin führte die Zugabe von 10 mM Threonin zu einer 87 %igen Hemmung der Aktivität. Methionin und Homoserin übten keinen Effekt auf die Aktivität der Aspartatkinase aus.

2.3.2 Disruption des *HOM3*-Gens in *A. gossypii*

Ob das isolierte *HOM3*-Gen tatsächlich für eine Aspartatkinase kodiert, sollte durch Disruption des Gens und anschließende Bestimmung der Enzymaktivität herausgefunden werden. Für die Konstruktion des Vektors pUC18 Δ *HOM3*::G418^R, der für die Genaustausch-Mutagenese verwendet wurde, wurde zunächst das 3,43 kb *Bst*XI/*Eco*RI-Fragment aus dem Subklon YEp352 GB-28-1-1 in den Vektor pUC18 umkloniert (**Abb.25**).

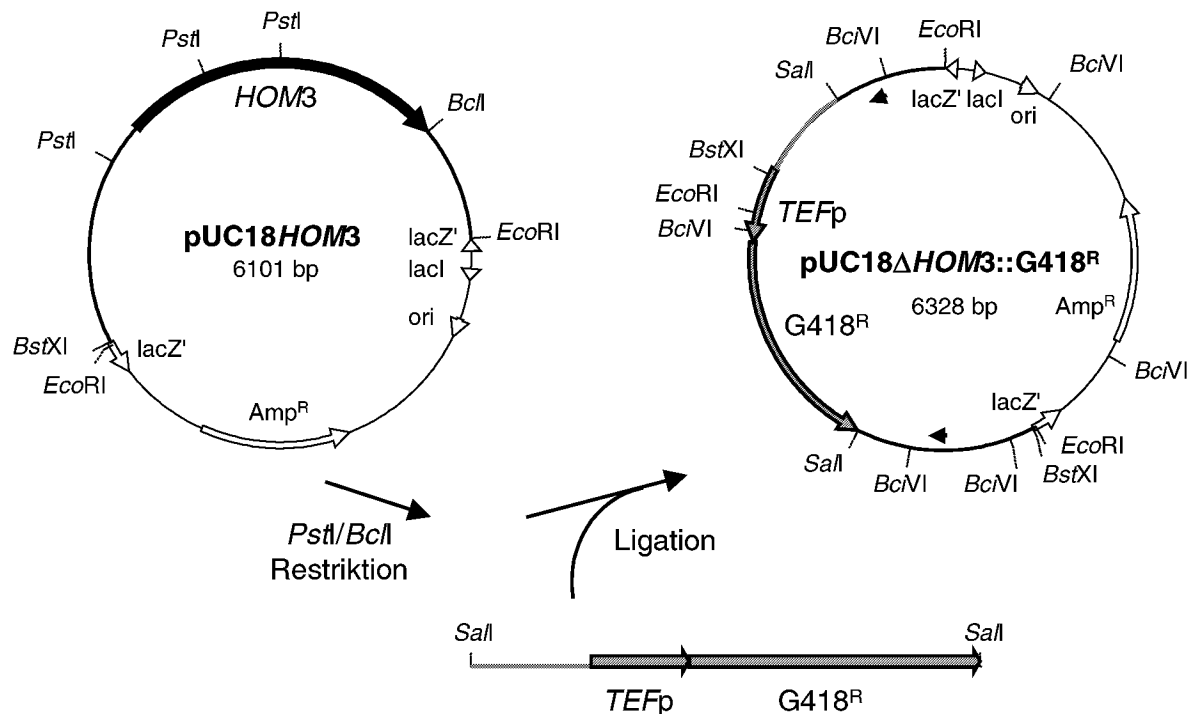


Abb.25 Schematische Darstellung der Konstruktion des Vektors pUC18 Δ *HOM3*::G418^R für den Genaustausch des intakten *HOM3*-Gens gegen ein durch partielle Deletion und Insertion des G418^R-Gens inaktiviertes *HOM3*-Gen. Die Pfeilspitzen markieren die Hybridisierungsstellen der Primer Δ *HOM3*-for und Δ *HOM3*-rev.

Das so erhaltene Plasmid pUC18*HOM3* wurde mit *Pst*I/*Bcl*I geschnitten, wodurch 1,89 kb deletiert wurden, die das komplette *HOM3*-Gen und weitere 229 bp upstream des ORFs umfassten. Auf diese Weise wurde ein 4,2 kb-Fragment erhalten, das dann mit dem 2,1 kb *Sal*I-Fragment des Plasmids pAG100, bestehend aus der Geneticin (G418)-Resistenzkassette unter Kontrolle des *TEF*-Promotors, ligiert wurde. Der resultierende Vektor pUC18 Δ *HOM3*::G418^R ist nicht replizierbar in *A. gossypii* und trägt das G418-Resistenzgen flankiert auf der 5'-Seite von der downstream-Region und auf der 3'-Seite von dem upstream-Bereich des *HOM3*-Gens. Das Fragment, bestehend aus Geneticin-Resistenzkassette und flankierenden homologen *HOM3*-Bereichen, mit einer Größe von 2,71 kb wurde mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden die Primer Δ *HOM3*-for und Δ *HOM3*-rev verwendet. Das amplifizierte Fragment wurde im Gel aufgereinigt und zur Transformation

von *A. gossypii* eingesetzt (**Abb.26A**). Nach Selektion auf Geneticin konnte eine Transformante erhalten werden. Da homologe Integration in *A. gossypii* häufig ist (Steiner *et al.*, 1995), war zu erwarten, dass in der Transformante durch ein Doppel-Crossover-Ereignis ein Austausch des intakten *HOM3*-Gens gegen die Kassette aus inaktivem *HOM3* und Resistenzmarker stattgefunden hatte. Der Nachweis der *HOM3*-Disruption erfolgte durch Southern-Blot-Analyse. Mittels PCR wurde eine Sonde mit einer Größe von 940 bp konstruiert. Die dazu benötigten Primer Sonde Δ *HOM3*for und Sonde Δ *HOM3*rev wurden aus Sequenzen des Plasmids pUC18 Δ *HOM3*::G418^R abgeleitet. Die Restriktion der genomischen DNA von Wildtyp sowie Transformante erfolgte mit *Bc*VI. Durch DNA:DNA-Hybridisierung mit der Sonde sollte im Falle des Wildtyps ein Signal mit einer Größe von 2,47 kb entstehen. Dagegen würde ein korrekter Genaustausch zu einem 1,57 kb-Fragment führen. **Abb.26B** zeigt das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse. Die detektierten Signale entsprachen mit den Größen 2,5 kb bzw. 1,6 kb genau den Erwartungen. Da nur ein einziges Signal bei *Ag* Δ *HOM3* detektiert wurde, hatte nur ein Austausch am *HOM3*-Lokus stattgefunden und zusätzliche ektopische Integrationen konnten ausgeschlossen werden.

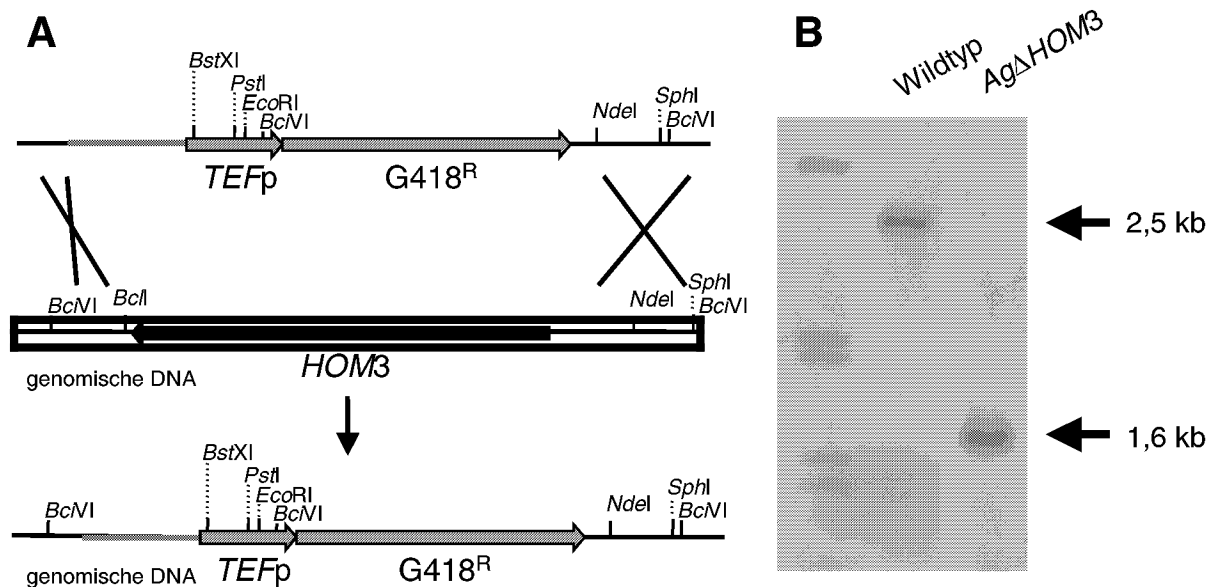


Abb.26 A Schematische Darstellung der Inaktivierung des *AgHOM3*-Gens durch Genaustausch-Mutagenese.

B Southern-Blot-Analyse zur Überprüfung des *HOM3*-Lokus. Genomische DNA von Wildtyp und *Ag* Δ *HOM3* wurde mit *Bc*VI geschnitten. Zum Nachweis wurde eine Sonde verwendet, die über 289 bp mit der DNA des Wildtyps bzw. über 940 bp mit der DNA der Disruptante hybridisierte.

Als nächstes wurde auf enzymatischer Ebene überprüft, ob die Disruption des *HOM3*-Genlokus Auswirkungen auf die Aspartatkinase-Aktivität hatte. Dafür wurde die spezifische Aktivität in dem Stamm *Ag* Δ *HOM3* im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

Tab.16 Spezifische Aspartatkinase-Aktivität in Wildtyp und *AgΔHOM3*.

Stamm	spezifische Aktivität [mU/mg Protein]
Wildtyp	4,57
<i>AgΔHOM3</i>	< 0,08

In *AgΔHOM3* konnte keine Aktivität der Aspartatkinase mehr nachgewiesen werden (**Tab.16**). Die Zerstörung des *HOM3*-Genortes führte somit zum Verlust der Aspartatkinase-Aktivität. Dadurch wurde gezeigt, dass *HOM3* für eine Aspartatkinase kodiert.

2.4 Bedeutung der Aspartatkinase für das Wachstum

In *S. cerevisiae* sind Stämme mit disruptiertem *HOM3*-Gen Threonin-auxotroph. Der Phänotyp von *AgΔHOM3* sollte im folgenden untersucht werden. Dazu wurden Wildtyp und *AgΔHOM3* auf Platten mit Mineralsalzmedium (ohne Hefeextrakt), die unterschiedliche Konzentrationen an Threonin, Methionin bzw. Homoserin enthielten, punktförmig geimpft. Die Wachstumsrate der Stämme wurde durch tägliche Bestimmung des radiären Koloniewachstums berechnet (**Tab.17**). Im Gegensatz zum Wildtyp war *AgΔHOM3* nicht in der Lage, auf Mineralsalzmedium ohne Aminosäure-Supplementierung zu wachsen. Auch die Zufütterung von 1 mM, 10 mM oder 100 mM Threonin stellte das Wachstum nicht wieder her. Steigende Threonin-Konzentration führte im Wildtyp zu einer Reduzierung der Wachstumsrate, vermutlich verursacht durch die Feedback-Hemmung der Aspartatkinase. In *S. cerevisiae* wurden ebenfalls Wachstumshemmungen bei hohen Threonin-Konzentrationen beobachtet. Als Ursache wurde Methionin-Mangel angenommen, da Methionin sich aus einem Zwischenprodukt der Threonin-Biosynthese ableitet (Arevalo-Rodriguez *et al.*, 1999). Der Grund für die Wachstumshemmung von *AgΔHOM3* könnte daher eine Methionin- und gleichzeitige Threonin-Auxotrophie sein. In einem weiteren Experiment wurden Mineralsalzmedium-Platten mit 1 mM Threonin und 1 mM Methionin bzw. mit 10 mM Threonin und 10 mM Methionin hergestellt. Um den Effekt der Methionin-Fütterung zu überprüfen, wurden auch Platten mit 1 mM und 10 mM Methionin eingesetzt. Methionin, als einzige Aminosäure zugefüttert, führte zu vollständiger Wachstumshemmung von *AgΔHOM3*. Die gleichzeitige Supplementierung von Threonin und Methionin stellte bei der Mutante wieder Wildtyp-Wachstum her.

Tab.17 Vergleich der Wachstumsraten von Wildtyp und *AgΔHOM3* auf Mineralsalzmedium ohne und mit Supplementierung mit Threonin, Methionin und Homoserin.

Supplementierung	Wachstumsraten [mm/Tag]	
	Wildtyp	<i>AgΔHOM3</i>
0 mM	4,6	0,0
1 mM Threonin	3,2	0,0
10 mM Threonin	1,6	0,0
100 mM Threonin	1,0	0,0
1 mM Methionin	5,3	0,0
10 mM Methionin	4,0	0,0
1 mM Threonin + 1 mM Methionin	4,3	4,3
10 mM Threonin + 10 mM Methionin	2,7	2,3
1 mM Homoserin	3,8	3,8
10 mM Homoserin	0,5	0,8

Da die Supplementierung mit 1 mM und 10 mM Homoserin den gleichen Effekt hatte wie die gleichzeitige Zufütterung von Threonin und Methionin, beruht die Wachstumshemmung in *AgΔHOM3* auf einer Homoserin-Auxotrophie, verursacht durch eine fehlende Aspartatkinase. Dass Threonin, Methionin und Homoserin in hohen Konzentrationen auch bei *AgΔHOM3* zu einer Reduzierung der Wachstumsrate führt, deutet auf eine weitere Regulationsstelle im Threonin-Stoffwechsel hin. In *S. cerevisiae* ist in dem Zusammenhang eine Threonin-Hemmung der Homoserinkinase beschrieben (Ramos *et al.*, 1991, Farfán und Calderón, 2000).

2.5 Bedeutung der Aspartatkinase für die Riboflavin-Überproduktion

Untersuchungen zur Bedeutung der Threonin-Aldolase hatten gezeigt, dass Threonin an die Stelle des Glycins als limitierende Vorstufe der Riboflavin-Überproduktion rücken kann (Monschau *et al.*, 1998). Um Aufschluß über die Bedeutung der an der Threonin-Bereitstellung beteiligten Aspartatkinase für die Riboflavin-Überproduktion zu erhalten, wurde *AgΔHOM3* parallel zum Wildtyp auf Mineralsalzmedium mit 1 g/l Hefeextrakt und 20 g/l Glucose 60 Stunden kultiviert. Darüber hinaus wurde der Einfluß von Aspartat-, Glycin- und Threonin- Supplementierung auf die Riboflavin-Produktion der zwei Stämme untersucht. Das Ergebnis ist in **Abb.27** dargestellt. Auffällig war, dass *AgΔHOM3* im Vergleich zum Wildtyp in

dem Produktionsmedium um 50 % schlechter wuchs. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *AgΔHOM3* Homoserin-auxotroph ist. Daher war davon auszugehen, dass der zugesetzte Hefeextrakt in dem Mineralsalzmedium nicht ausreichte, um den Wachstumsphänotyp zu unterdrücken. Supplementierung von 1 mM Threonin führte zu einer weiteren Wachstumshemmung um 15 %, was durch die Hemmung eines anderen Threonin-sensitiven Enzyms, wie zum Beispiel der Homoserinkinase, erklärt werden kann. Die Zugabe von Threonin hatte keinen Einfluß auf das Wachstum des Wildtyps. Wahrscheinlich wird ein Teil des Threonins durch die Aspartatkinase gebunden, so dass weniger zur Hemmung der Homoserinkinase bleibt.

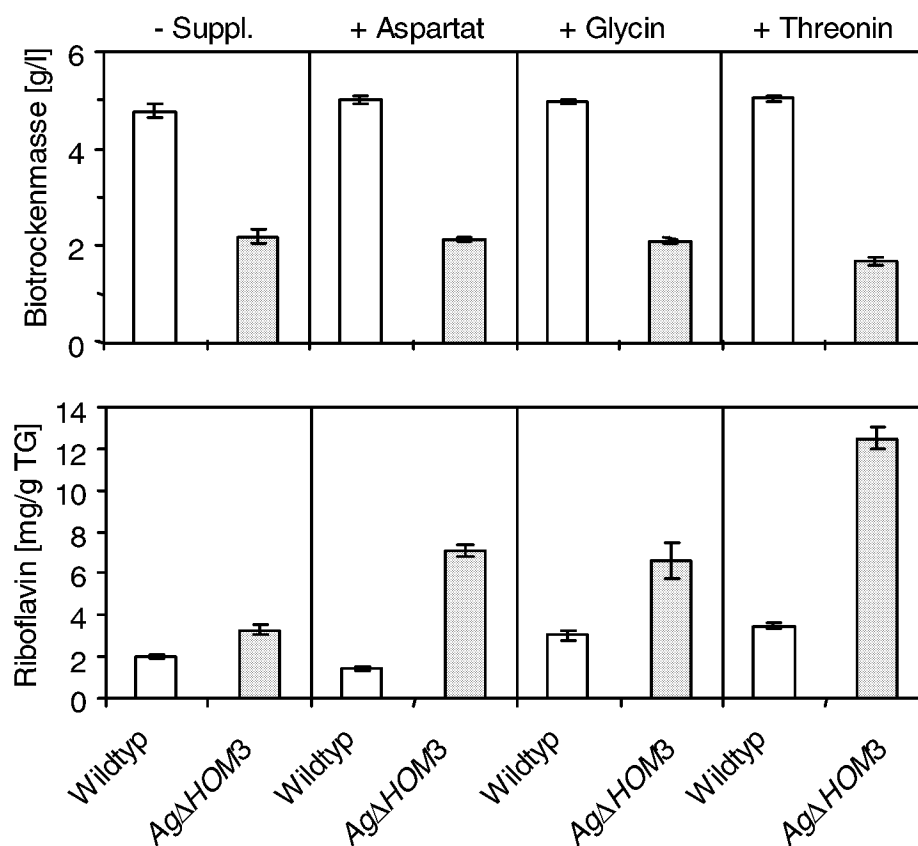


Abb.27 Wachstum und Riboflavin-Bildung der Stämme Wildtyp und *AgΔHOM3* bei Kultivierung auf Mineralsalzmedium mit und ohne Supplementierung von 1 mM Aspartat, 1 mM Glycin oder 1 mM Threonin. Die Daten sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

Überraschenderweise führte die Disruption des *HOM3*-Gens zu einer Steigerung der Riboflavin-Überproduktion. Auf Mineralsalzmedium ohne Supplementierung konnte eine Erhöhung um 40 % festgestellt werden. Die Zugabe von 1 mM Aspartat verdoppelte in *AgΔHOM3* sogar die Produktion von 3,5 mg/g TG auf 7,0 mg/g TG, während der Wildtyp eine reduzierte Riboflavin-Bildung aufwies. Glycin-Supplementierung führte in beiden Stämmen zu einer verbesserten Riboflavin-Überproduktion. Das ist ein Argument dafür, dass

AgΔHOM3 nicht aufgrund des geänderten Aminosäure-Stoffwechsels mehr Riboflavin produziert. Die Glycin-Limitierung besteht nach wie vor. Der Wildtyp bildete 50 % mehr Riboflavin, und die Riboflavin-Überproduktion von *AgΔHOM3* war vergleichbar mit den Ergebnissen bei Aspartat-Zufütterung. Durch Threonin-Supplementierung konnte in *AgΔHOM3* noch eine weitere Steigerung der Riboflavin-Bildung erzielt werden. Während der Wildtyp 3,5 mg/g TG produzierte, wurden in *AgΔHOM3* 12,5 mg Riboflavin/g TG gemessen. Die Disruption des *HOM3*-Gens führte somit zu einer 3,6fachen Steigerung der Riboflavin-Überproduktion. Bei Komplementation des Wachstumsdefekts durch Supplementierung mit Homoserin bzw. Threonin und Methionin war die Riboflavin-Überproduktion von *AgΔHOM3* deutlich reduziert und mit 1,4 – 3,5 mg Riboflavin/g TG sogar geringer als im Wildtyp (4,1 – 5 mg Riboflavin/g TG) (**Abb.28**).

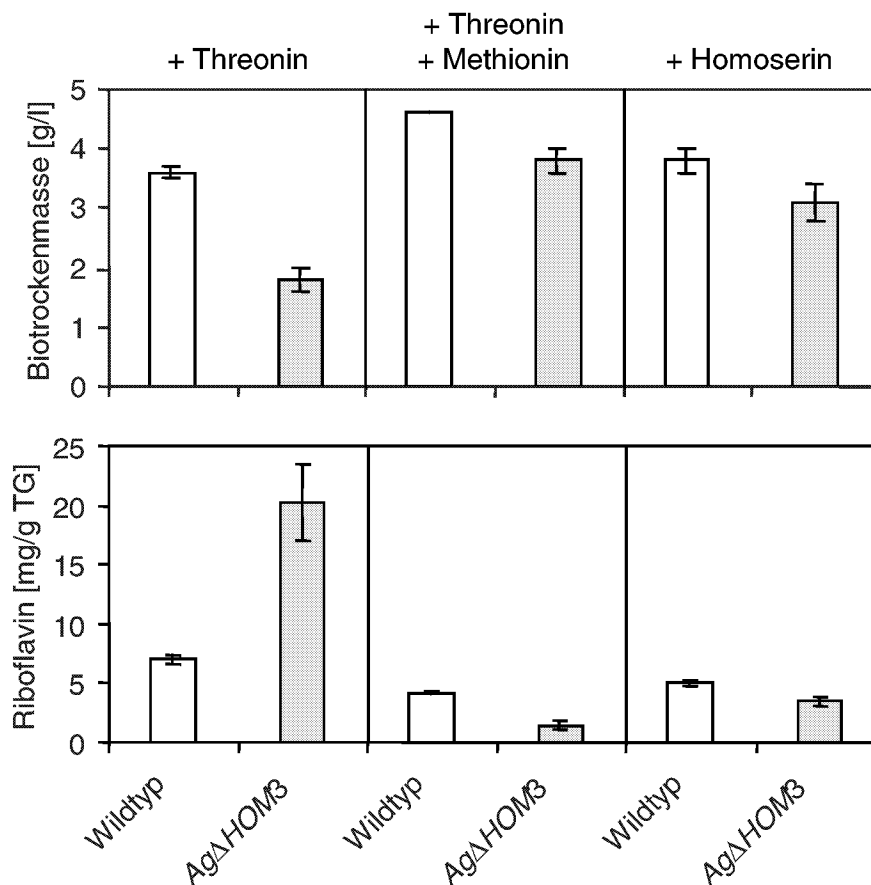


Abb.28 Kultivierung von Wildtyp und *AgΔHOM3* auf Mineralsalzmedium mit Supplementierung von 1 mM Threonin, 1 mM Threonin und 1 mM Methionin oder 1 mM Homoserin. Nach 60 h werden Wachstum und Riboflavin-Bildung bestimmt.

Dadurch wird klar, dass die gesteigerte Riboflavin-Produktion von *AgΔHOM3* kein metabolischer, sondern ein regulatorischer Effekt sein muß. Denkbar wäre, dass der durch die Disruption von *HOM3* erzeugte Aminosäure-Mangel sich einerseits in gehemmtem Wachstum äußert, andererseits zu einer verstärkten Induktion der *RIB*-Gene führt.

IV. DISKUSSION

1. Bedeutung der SHMT-Isoenzyme im Glycin-Stoffwechsel von *A. gossypii*

Es ist bekannt, dass Supplementierung des Mediums mit Glycin, einer Vorstufe der *de novo* Purin-Biosynthese, zu gesteigerter Riboflavin-Produktion in *A. gossypii* führt (Hanson, 1967). Dieses Phänomen, das als Glycin-Effekt bezeichnet wird, wurde von Monschau *et al.* (1998) bestätigt. Unklar ist, warum Glycin im Überschuss, d. h. millimolar, gefüttert werden muss, damit die Riboflavin-Produktion im mikromolaren Bereich steigt.

Eine Erklärung für den Bedarf einer hohen Glycin-Supplementierung liegt in der Kompartimentierung der Zelle, wodurch das Glycin in der Pilzzelle inhomogen verteilt ist. Nach Messenguy *et al.* (1980) befinden sich in *S. cerevisiae* 75 % des intrazellulären Glycins in der Vakuole. In *A. gossypii* wurden immerhin 48 % des Glycins in der Vakuole lokalisiert (Förster *et al.*, 1998), um dort wahrscheinlich als Stickstoffspeicher zu dienen (Klionsky *et al.*, 1990). Eine Erhöhung der extrazellulären Glycin-Konzentration wirkt sich damit nur abgeschwächt auf das Zellkompartiment aus, in dem der Glycin-Einbau in die Purinsynthese stattfindet. Der Einbau von Glycin in die *de novo* Purinsynthese erfolgt durch Katalyse der Glycinamidribonukleotid-Synthetase (GARS). Die Lokalisation dieses Enzyms ist weder in *A. gossypii* noch in anderen Pilzen bisher untersucht worden. Die Aminosäuresequenz des entsprechenden Gens aus *S. cerevisiae* (*PUR2*) zeigt kein bekanntes Targeting-Signal, was für eine cytosolische Lokalisation spricht. In Pflanzen befinden sich GARS-Isoenzyme sowohl in den Mitochondrien als auch in den Plastiden (Atkins *et al.*, 1997). Für eine Verbesserung der Glycin-Bereitstellung zur Purinsynthese könnte also eine Erhöhung der Glycin-Konzentration in den Mitochondrien der Pilzzelle entscheidend sein. Dafür spricht, dass eine zusätzliche Kopie des *SHM1*-Gens, dass für die mSHMT kodiert, die Riboflavin-Bildung erhöht. Werden mehrere Kopien des *SHM1*-Gens ins Genom integriert, ist der Einfluss der Überexpression auf die Riboflavin-Produktion allerdings widersprüchlich (Schlüpen, 2000). Vermutlich führt eine starke Überexpression mitochondrieller Proteine zu einem verzögerten Import in die Mitochondrien. Die meisten mitochondriellen Proteine werden von Zellkern-Genen kodiert und als cytosolische Vorstufen synthetisiert, die nach vollständiger Translation in das Organell importiert werden (Attardi und Schatz, 1988; Hartl *et al.*, 1989). Möglicherweise löste die Überexpression eine Beeinträchtigung des Protein-Translokationsapparats aus, so dass die SHMT1-Vorläufer-Proteine nicht in die Mitochondrien importiert werden konnten, was in einer Akkumulation von SHMT1-Vorläuferproteinen im Cytosol resultierte.

Alternativ könnte auch ein erhöhter mitochondrieller Glycin-Pool zu einer Induktion des Glycine Cleavage Systems führen, das ebenfalls in den Mitochondrien lokalisiert ist. So wird in *E. coli* das GCV durch exogenes Glycin induziert, wobei GcvA der Aktivator ist (Ghrist und

Stauffer, 1995). Ein ständiger Abbau des Glycin-Pools durch das GCV wäre für *A. gossypii* kontraproduktiv. In den Mitochondrien der Pflanzen stellt die Serin-Produktion aus Glycin über die SHMT und dem vom GCV gebildeten C1 die Hauptquelle der Serin-Versorgung der Zelle dar. Damit sollte nicht ein erhöhter Glycin-, sondern Serin-Pool in den Mitochondrien aufrecht erhalten werden (Ho und Saito, 2001).

Gegen die Vorstellung, dass die Glycin-Konzentration in den Mitochondrien erhöht werden muss, steht die Disruption des *SHM2*-Gens, das für die cytosolische SHMT kodiert. Die Verminderung der Serin-Bildung aus Glycin im Cytosol führt zu einer erhöhten Riboflavin-Bildung und gesteigerter Glycin-Ausscheidung. Das spricht dafür, dass die GARS in *A. gossypii* im Cytosol lokalisiert ist.

Eine weitere Erklärung, warum so hohe Glycin-Supplementierungen zur Riboflavin-Überproduktion notwendig sind, wäre, dass es durch die hohe extrazelluläre Glycin-Konzentration zu einer Hemmung des Glycin-Exports aus der Zelle kommen kann, wobei gleichzeitig nur eine sehr geringe Glycin-Aufnahme in die Zelle stattfindet. Dafür spricht die Zunahme der extrazellulären Glycin-Konzentration um 550 μM bei Kultivierung des Wildtyps auf HA-Medium bzw. um 40 μM auf Mineralsalzmedium. Ist der intrazelluläre Glycin-Pool erhöht, wie im Stamm *Ag Δ SHM2*, so wird noch mehr Glycin aus der Zelle heraustransportiert. So wurde bei diesem Stamm eine extrazelluläre Zunahme von 940 μM Glycin auf HA-Medium und 140 μM auf Mineralsalzmedium detektiert. Das Ergebnis legt nahe, dass *A. gossypii* Glycin bevorzugt aus der Zelle exportiert, anstatt es aus dem Medium aufzunehmen. Der Grund für diesen schlechten Glycin-Import könnte ein fehlendes Aufnahmesystem in *A. gossypii* sein. In *S. cerevisiae* ist kein spezifisches Glycin-Aufnahmesystem bekannt, aber Glycin kann durch die General Amino Acid Permease (Gap) importiert werden. Dieses Transportsystem gehört zur Aminosäure-Transporter-Familie 1 (Wipf *et al.*, 2002) und vermittelt mit niedriger Affinität und Spezifität den Transport einer Vielzahl von L- und D-Aminosäuren (Grenson, 1992). Glycinmengen von 0,05 – 5 μmol pro 50 mg Trockengewicht werden in *S. cerevisiae* mit stöchiometrischen Mengen an Protonen in die Zelle aufgenommen. Zur Kompensation findet ein Efflux von Kalium-Ionen statt (Eddy und Hopkins, 1989). Gap unterliegt vermutlich der Nitrogen Catabolit Repression (Grenson, 1992), da die Anwesenheit von Ammonium-Ionen die Aktivität reprimiert, wohingegen die Zugabe von Prolin oder Glutamat als Stickstoffquelle die Aktivität der Permease erhöht (Eddy und Hopkins, 1989).

Effizienter als eine Glycin-Fütterung ist die Steigerung der intrazellulären Glycin-Synthese durch Überexpression des für die Threonin-Aldolase kodierenden *GLY1*-Gens und zusätzlicher Threonin-Supplementierung (Monschau *et al.*, 1998). Als alternatives glycinogenes Enzym wurde die SHMT in Betracht gezogen.

In eukaryotischen Zellen sind SHMT-Isoenzyme beschrieben, die zumeist als cytosolische (cSHMT) und mitochondrielle (mSHMT) Isoform auftreten und von separaten Genen kodiert werden (Appling, 1991; Garrow *et al.* 1993). Ein drittes Isoenzym wurde in den Chloroplasten von Pflanzen beschrieben, z.B. in *Spinacia oleyacea* (Besson *et al.*, 1995) und in *Euglena gracilis* (Sakamoto *et al.*, 1996). Außerdem wurde eine cSHMT der Kaninchenleber in drei Subformen gefunden, die sich in mindestens einer posttranslationalen Modifikation eines Asparagin-Restes unterscheiden (Artigues *et al.*, 1990). Auf DNA-Level wurde im menschlichen Genom ein Pseudogen (SHMT-ps1) identifiziert, das 90 % Identität zu der Sequenz zeigte, die für eine cSHMT kodiert. Aber aufgrund vieler Mutationen wurde die Translation der mRNA eines funktionellen Gens verhindert (Byrne *et al.*, 1996; Devor *et al.*, 1998). Im *Arabidopsis*-Genom kommen sogar mindestens fünf *SHM*-Gene vor. Während *SHM1*- und *SHM2*-Proteine in der mitochondriellen Matrix lokalisiert sind, sollen die anderen drei *SHM*-Gene für cSHMTs kodieren. Diese Komplexität wurde durch differentielle Expressionen im Tag/Nacht Zyklus erklärt, da SHMT metabolisch mit der Photorespiration und der differentiellen Expression in photosynthetisch aktivem oder nicht-photosynthetisch aktivem Gewebe verbunden ist (McClung *et al.*, 2000). So sind die Produkte Serin (mSHMT-Reaktion) und CO₂ (GCV-Reaktion) für die Photorespiration essentiell. Unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen wird die C₁-THF vermittelte Biosynthese nicht benötigt, was bedeutet, dass dann andere SHMT-Isoformen aktiv sind.

In *S. cerevisiae* und *C. albicans*, beide nah verwandt mit *A. gossypii*, wurden zwei *SHM*-Gene identifiziert. Diese kodieren für SHMT1, das in den Mitochondrien lokalisiert ist und für eine cSHMT (Kastanos *et al.*, 1997; McNeil *et al.*, 1994). Aber nicht nur in Eukaryoten existieren mindestens zwei SHMTs. O'Connor *et al.* (1975) reinigten zwei SHMTs von einem fakultativ methylophilen Bakterium. Ein Enzym trat bevorzugt auf, wenn der Organismus auf Methan oder Methanol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wuchs, wohingegen das zweite Enzym überwiegend gebildet wurde, wenn Succinat verwendet wurde. Möglicherweise liegt die Expression der *SHM*-Gene in *A. gossypii* an der Veränderung der Medienzusammensetzung. So konnte gezeigt werden, dass die *SHM2*-Transkriptmenge in der Riboflavin-Produktionsphase erhöht war, während die *SHM1*-mRNA-Konzentration unverändert blieb. Eine unterschiedliche Regulation könnte ein anderer Grund für das Auftreten von Isoenzymen sein. In diesem Zusammenhang wurden zwei *S. cerevisiae*-Gene beschrieben (*GDH1* und *GDH3*), deren Produkte NADP-GDH Isoenzyme sind (DeLuna *et al.*, 2001). Diese Enzyme haben unterschiedliche allosterische Eigenschaften. So wurde mit 10 mM α -Ketoglutarat eine 5 %ige Hemmung der Aktivität des Gdh1-Enzyms beobachtet, während eine 25 mM Substratkonzentration für die gleiche Inhibition des Gdh3-Enzyms benötigt wurde. Auch in bezug auf die K_M-Werte für NADPH, Ammonium, NADP⁺ und Glutamat unterschieden sich die Isoenzyme voneinander. Außerdem wurde festgestellt, dass

die Expression von *GDH3* durch Ethanol induziert und durch Glucose reprimiert wurde. Die *GDH1*-Expression hingegen war auf beiden Kohlenstoff-Quellen hoch. Beim Wachstum auf einer nichtfermentativen oder limitierenden Kohlenstoff-Quelle wird die Verteilung von α -Ketoglutarat durch das Gdh3-Enzym einerseits in Richtung Glutamat-Biosynthese und andererseits in Richtung Energie-Stoffwechsel gesteuert. Während des fermentativen Wachstums würde die Glutamat-Biosynthese durch das Gdh1-Isoenzym erfolgen, das α -Ketoglutarat schneller umsetzt.

In *A. gossypii* wurden zwei Gene, *SHM1* und *SHM2*, isoliert (Revuelta, 1999, 2000), die für Serin-Hydroxymethyltransferasen kodieren. Die aus den *SHM*-Genen von *A. gossypii* abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen wurden mit SHMTs von *S. cerevisiae* und *C. albicans* verglichen. Das Alignment identifizierte AgSHMT1 und AgSHMT2 als Serin-Hydroxymethyltransferasen aufgrund der hohen Aminosäure-Identitäten, die einen hohen Grad der Konservierung unter diesen Pilzspezies repräsentieren. Isolierung und Sequenzierung verschiedener SHMT-Proteine führte zur Identifizierung von Aminosäuren, die in allen eukaryotischen und prokaryotischen SHMTs konserviert sind und auch in den Pilz-SHMTs gefunden wurden. Dies bestätigt die nahe Verwandtschaft bezüglich der Struktur und der katalytischen Mechanismen. So wurde in den Sequenzen ein Tetrapeptid (TTHK) identifiziert, das in allen pro- und eukaryotischen SHMTs auftritt. Diese Sequenz enthält einen Lysin-Rest, der an der PLP-Bindung beteiligt ist (Schirch *et al.*, 1993). Ein Homologie-Vergleich mit Säugern, Pflanzen und Bakterien ergab, dass die Aminosäuren aller SHMTs 42 - 68 % Identität aufwiesen. Zwischen Mensch und Kaninchen waren die cSHMTs zu 92 % und die mSHMTs sogar zu 94 % identisch. Dies bestätigt die Beobachtung, dass die SHMTs von Eukaryoten viel ähnlicher zueinander sind, als die der Prokaryoten (Rao *et al.*, 2000). Der Grad der Konservierung der SHMTs ist höher als der anderer PLP-abhängigen Enzyme und der meisten bekannten Proteine. Dadurch kann SHMT als evolutionärer Marker verwendet werden. Die cSHMTs von Säugern waren identischer zu ihren mitochondriellen Isoformen als zu den cSHMTs der Pilze. So zeigte beispielsweise die menschliche cSHMT 62 % Identität zur menschlichen mSHMT, aber nur 54 bzw. 55 % Identität zu den cSHMTs der Pilze. Das mitochondrielle Enzym der Erbse ist gleich weit entfernt von der mitochondriellen und der cytosolischen Form der SHMTs der Säuger. In allen Fällen sind zu 55 % identische Aminosäuren gefunden worden. Diese Ergebnisse bedeuten, dass eine Genverdopplung stattgefunden haben muss, nachdem sich Tiere, Pflanzen und Pilze getrennt hatten (Rao *et al.*, 2000).

Aufgrund der hohen Homologien zwischen den mitochondriellen SHMT1 von *S. cerevisiae*, *C. albicans* und AgSHMT1 sowie zwischen den cytosolischen SHMT2 von *S. cerevisiae*, *C. albicans* und AgSHMT2, ist die wahrscheinliche Lokalisation von AgSHMT1 in den Mitochondrien und von AgSHMT2 im Cytosol. Unterstützt wurde diese Annahme durch die

Identifizierung einer Pre-Sequenz am Amino-Terminus von AgSHMT1, die 61 % Identität zur MTS (mitochondrial targeting sequence) besaß. Diese Target-Information der mitochondriellen Vorläufer-Proteine wird durch eine spezifische Peptidase nach dem Import in die mitochondrielle Matrix abgespalten (Omura, 1998; Neupert, 1997; Ryan und Pfanner, 1998). Die wesentlichen Charakteristika der MTS sind das gehäufte Auftreten basischer Aminosäuren mit Hydroxyl-Seitenketten, die Abwesenheit saurer Aminosäuren und die Fähigkeit, amphipathische Helices zu bilden (Voos *et al.*, 1999; von Heijne, 1986). In *S. cerevisiae* war es möglich, durch Fusion des *FMN1*-Gens, das für eine Flavokinase kodiert, mit dem HA-Epitop die Lokalisation dieses Enzyms in den Mitochondrien herauszufinden (Santos *et al.*, 2000). Ebenso gelang es in *Schizosaccharomyces pombe* durch Detektion des mit HA fusionierten Pom1-Proteins, eine Proteinkinase, das polarisierte Wachstum und die Cytokinese der Zellen zu veranschaulichen (Bähler und Pringle, 1998). Zur Bestimmung der Lokalisation der SHMTs in *A. gossypii* wurde *SHM1* und *SHM2* mit dem HA-Epitop fusioniert. Durch Permeabilisierung der Zellen mit Digitonin sowie Organell-Dichtegradienten-Zentrifugation und anschließender Immunodetektion konnte gezeigt werden, dass sich SHMT1 in den Mitochondrien befindet, während SHMT2 im Cytosol lokalisiert ist.

Mit Ausnahme der *E. coli* SHMT, welche aus einem Dimer aus zwei 46 kDa Untereinheiten besteht, sind alle bisher untersuchten SHMTs Homotetramere mit ca. 53 kDa pro Untereinheit. Jede Untereinheit enthält ein PLP-Molekül, das als Schiff'sche Base an den Lysin-Rest des aktiven Zentrums gebunden ist (Ogawa *et al.*, 2000).

Die SHMT katalysiert die reversible Umwandlung von Serin zu Glycin, wobei Tetrahydrofolat (THF) als C1-Akzeptor dient. Der erste Schritt der Katalyse ist eine Transaminierung, bei der ein nukleophiler Angriff der Aminogruppe von Serin oder Glycin auf die Schiff'sche Base zwischen PLP und dem Lysin-Rest des aktiven Zentrums (internes Aldimin) erfolgt. Dies führt zur Bildung eines geminalen Diamins, das ein entscheidendes Intermediat aller PLP-abhängigen Enzyme ist (Schirch *et al.*, 1991) und im Fall der SHMT nachgewiesen werden konnte (Schirch, 1982). Das geminale Diamin wird nach Umlagerung des Lysins zum externen Aldimin, indem sich aus der Aminosäure und PLP eine Schiff'sche Base bildet. Von Dunathan (1966) wird vorgeschlagen, dass dann der Aminosäure-Teil, der sich orthogonal zu dem planaren PLP-Ring befindet, abgespalten wird. In der Richtung der Serin-Spaltung ist die Hydroxymethylgruppe des Serins in dieser Orientierung, während für die Serin-Synthese das Proton des Glycins orthogonal zum PLP-Ring liegt. Das externe Aldimin wird zu einem quinoiden Intermediat umgewandelt. Dieser Schritt wird durch THF verstärkt, das auch die Abspaltung der Aldehydgruppe vom aktiven Zentrum erleichtert (Szebenyi *et al.*, 2000). Ein Modell zur Reaktionskinetik wurde von Schirch *et al.* (1991) vorgeschlagen, um die Reaktionsspezifität der SHMT zu erklären. Nach diesem Modell existiert das Enzym in einem

Gleichgewicht aus offener und geschlossener Form. Substrate betreten und verlassen das aktive Zentrum in der offenen Form, aber die Katalyse erfolgt nur in der geschlossenen Form, um Nebenreaktionen zu vermeiden und um die Reaktionsspezifität zu erhöhen. Substrate, die andere Reaktionen eingehen, wie Transaminierung und Racemisierung, binden nur an die offene Form. Dieses Modell wurde durch Röntgen-Diffraktions-Studien bereits für die Aspartat-Aminotransferase postuliert.

Das Ziel dieser Arbeit war, die Bedeutung der beiden SHMT-Isoenzyme im Glycin-Stoffwechsel von *A. gossypii* zu erkennen. Zu diesem Zweck wurde das *SHM2*-Gen disruptiert und der resultierende Stamm wurde im Vergleich zu *AgΔSHM1* durch Wachstum und NMR-Studien charakterisiert.

Die Disruption von *SHM2* in *A. gossypii* führte zu einem 85 %igen Verlust der detektierbaren SHMT-Aktivität, wohingegen die Enzymaktivität bei *AgΔSHM1* nicht vom Wildtyp-Level unterschieden werden konnte. Ein Stamm mit überexprimiertem *SHM1*-Gen unter der Kontrolle des *TEF*-Promoters erreichte aber eine 6fache Steigerung der spezifischen SHMT-Aktivität, was zum einen die Funktionalität von SHMT1 zeigt und zum anderen die relativ schwache Expression durch den ursprünglichen *SHM1*-Promotor (Schlüpen *et al.*, 2003). *S. cerevisiae* *SHM2*-disruptierte Stämme zeigten nur 2 - 15 % SHMT-Aktivität im Vergleich zum Parentalstamm, während der *SHM1*-disruptierte Stamm zum Elterstamm vergleichbare Aktivität aufwies. Demnach stellt das cytosolische Enzym die vorwiegende SHMT-Isoform in der Hefezelle dar (McNeil *et al.*, 1994). Auch in Pflanzen sind die SHMT-Aktivitäten unterschiedlich aufgeteilt. Während sich in den Mitochondrien 50 % der totalen SHMT-Aktivität befindet, tragen die SHMTs aus Cytosol und Chloroplasten nur zu jeweils 20 – 25 % zu der Gesamtaktivität bei (Besson *et al.*, 1995). In Säugerzellen ist das verstärkte Auftreten einer der beiden SHMT-Isoformen vom Gewebe abhängig. So tritt in Lammleber die SHMT häufiger im Cytosol (85 – 95 %) als in den Mitochondrien (8 -15 %) auf (Xue *et al.*, 1999; Ogawa *et al.*, 2000). Das ist ebenfalls der Fall für die SHMT der Schweineleber, bei der die cytosolische Form etwa 95 % der totalen Aktivität besitzt. Dagegen fanden Chasin *et al.* (1974) in CHO (chinese hamster ovary)-Zellen, dass die spezifische SHMT-Aktivität in den Mitochondrien ca. 20mal höher als im Cytosol ist. In der Erbse gibt es ein Gewebespezifisches Vorkommen der SHMT-Isoformen. So akkumuliert die mSHMT in den Blättern und nicht in den Wurzeln der Erbse. Dennoch weisen beide Gewebe vergleichbare SHMT-Aktivität auf (Turner *et al.*, 1992). Das deutet darauf hin, dass die eine SHMT-Isoform in der Lage ist, die Funktion der anderen zu übernehmen.

Im Gegensatz dazu stehen Experimente mit *S. cerevisiae*. Präparationen der mitochondriellen und cytosolischen Fraktionen zeigten, dass bei $\Delta SHM1$ -Extrakten SHMT-Aktivität in der Mitochondrien-Fraktion fehlte, während in $\Delta SHM2$ -Extrakten keine SHMT-

Aktivität in der cytosolischen Fraktion gemessen werden konnte (McNeil *et al.*, 1994). Aber Enzyme eines alternativen Glycin-Wegs könnten einen kompensierenden Effekt haben. In diesem Zusammenhang wurde eine *Neurospora crassa*-Mutante isoliert, der die cSHMT fehlte und die dadurch nur 1 % SHMT-Gesamtaktivität im Vergleich zum Wildtyp besaß. Die Mutante zeigte erhöhte Isocitrat-Lyase- und Glyoxylat-Aminotransferase-Aktivität, womit über einen alternativen Glycin-Syntheseweg von Isocitrat über Glyoxylat zu Glycin der intrazelluläre Glycin-Pool ausgeglichen werden konnte (Cossins *et al.*, 1980). Snell *et al.* (1988) beobachteten, dass die SHMT-Aktivität in menschlichen Zellen erniedrigt oder gesteigert wurde, wenn Gene von konkurrierenden Serin-umsetzenden Enzymen, wie Serin-Dehydratase oder Serin-Aminotransferase, deletiert waren. Es wird also deutlich, dass Zellen in der Lage sind, die Aktivität eines fehlenden Enzyms zu kompensieren, indem die Aktivität eines alternativen Enzyms oder Stoffwechselwegs gesteigert wird. Weiterhin kann sich die Versorgung der Zelle mit den Substraten der SHMT-Reaktion auf die Expression der *SHM*-Gene auswirken. So wird in *N. crassa* die SHMT-Aktivität durch Veränderungen der Transkriptmenge der *for*-Gene, die für SHMTs kodieren, reguliert. Dabei verringert Serin-Supplementierung den *for*-mRNA-Level, während die Zugabe von Formiat den *for*-mRNA-Level erhöht (Cossins *et al.*, 1980). Interessant war, ob *A. gossypii* bei Disruption oder Überexpression eines *SHM*-Gens mit einer kompensierenden Expression des zweiten Gens reagiert. Oder ob die Expression der *SHM*-Gene in Δ *GLY1*-Mutanten, denen die Threonin-Aldolase fehlt, zum Ausgleich des intrazellulären Glycin-Pools gesteigert ist. Die Ergebnisse zeigten, dass weder die Disruption der *SHM*-Gene noch die Disruption oder Überexpression des *GLY1*-Gens sich auf den mRNA-Level von *SHM1* bzw. *SHM2* auswirkte.

Neben der Aldol-Spaltungs-Reaktion kann SHMT mit einigen Aminosäuren Transaminierungen und Decarboxylierungen katalysieren. Eine Vielzahl an 3-Hydroxyaminosäuren werden zu Glycin und dem korrespondierenden Aldehyd gespalten (Barra *et al.*, 1983; Matthews *et al.*, 1998). Kaninchenleber SHMT katalysiert so die Aldolspaltung von L-Isomeren von *threo*- und *erythro*-3-Phenylserin zu Benzaldehyd und Glycin. Einige Nebenreaktionen sind langsam und haben Wechselzahlen im Rahmen von Minuten (Ogawa *et al.*, 2000). So spaltet SHMT zwar 3-Hydroxy-6-trimethyllysin in 4-Butyrobetainaldehyd und Glycin, aber die Reaktion ist so langsam, dass es zweifelhaft ist, ob dieses Enzym an der Carnithin-Biosynthese beteiligt ist. In diesem Sinne sind die Aktivitäten der Kaninchen SHMT, *allo*-Threonin und Threonin in Glycin und Acetaldehyd zu spalten, mit 30 % bzw. 6 % der Serin-Spaltung für cSHMT und 10 % bzw. 0,6 % für mSHMT, sehr niedrig. Niedrige Threonin-Aldolase- und *allo*-Threonin-Aldolase-Aktivitäten sind auch für die SHMT der Lammleber beschrieben. Dagegen ist mit der SHMT der Rattenleber keine Threonin-Aldolase-Aktivität detektierbar. Es konnte nur gezeigt werden, dass mehr als 97 % des Kondensationsprodukts von Glycin und Acetaldehyd bei Katalyse der cSHMT *allo*-

Threonin war (Schirch und Gross, 1968). Daher ist die Aktivität, Threonin zu Glycin und Acetaldehyd zu spalten, keine generelle Eigenschaft der SHMT (Ogawa *et al.*, 2000). In *A. gossypii* konnte trotz Disruption von *SHM1* und *SHM2* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* noch eine Umsetzung von Glycin zu Serin festgestellt werden. Die Bestimmung der spezifischen SHMT-Aktivität im Rohextrakt des Threonin-Aldolase-Überexprimierers ergab eine deutlich höhere SHMT-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Demnach besitzt die Threonin-Aldolase SHMT-Aktivität. Auch in *E. coli* kann die Threonin-Aldolase zum Teil die SHMT-Aktivität ersetzen (Liu *et al.*, 1998). Nach Schirch *et al.* (1991) kontrolliert ein Konformationswechsel, der bei der Substratbindung erfolgt, die Reaktionsspezifität.

In Säugerzellen katalysiert die SHMT noch eine zweite Reaktion: die irreversible Konversion von 5,10-Methenyl-THF zu 5-Formyl-THF (Stover und Schirch, 1993; Fu *et al.*, 2003). Einmal synthetisiert, bleibt 5-Formyl-THF am Enzym gebunden und agiert als ein effektiver langsam-bindender Inhibitor der SHMT-katalysierten Reaktionen *in vitro* und *in vivo* (Stover und Schirch, 1991; Girgis *et al.*, 1997)

In wie weit jedes SHMT-Isoenzym von *A. gossypii* am Glycin-Metabolismus beteiligt ist, konnte aus der NMR-Analyse abgeleitet werden. Supplementierung mit $^{13}\text{C}_1$ -markiertem Serin resultierte in *AgΔSHM1* nur in einer 6 %igen Abnahme des detektierten $^{13}\text{C}_1$ -Glycins, wohingegen in *AgΔSHM2* eine Reduzierung von 37 % beobachtet werden konnte. Dies weist darauf hin, dass beide Isoenzyme Serin zu Glycin umwandeln, wenn Serin gefüttert wird. Außerdem wird deutlich, dass SHMT2 mehr an der Glycin-Synthese beteiligt ist als SHMT1. Das ist konsistent mit den *in vitro* Enzym-Aktivitätsmessungen. $^{13}\text{C}_1$ -Threonin-Fütterung zeigte, dass die Serin-Synthese von Glycin nicht verändert ist, wenn *SHM1* disruptiert ist. In Bezug auf *AgΔSHM2* und *AgΔSHM1ΔSHM2* führte die Threonin-Supplementierung nicht nur zu einer stark reduzierten Markierung im detektierten $^{13}\text{C}_1$ -Serin, sondern auch zu einer Steigerung von $^{13}\text{C}_1$ -Glycin. Das bedeutet einerseits, dass die *in vivo* Flussrichtung der SHMT-Reaktion durch die gefütterten Aminosäuren bestimmt wird und andererseits, dass SHMT2 aufgrund der höheren Aktivität und der cytosolischen Lokalisation im Vergleich zu SHMT1 eine bedeutendere Rolle spielt. In *S. cerevisiae* kontrolliert der Nahrungszustand der Zelle die Richtungen der Flüsse über die beiden Isoenzyme. Wie auch in *Neurospora crassa* katalysiert die cSHMT die Reaktion von Serin zu Glycin, während die Rückreaktion in den Mitochondrien durch die mSHMT stattfindet (Cossins und Pang, 1980). Damit wird bei *S. cerevisiae* im Gegensatz zu *A. gossypii* unter Glycin-Überschuss der mSHMT eine serinogene Funktion zugeschrieben und nicht der cSHMT (Kastanos *et al.*, 1997). In CHO (chinese hamster ovary)-Zellen sind die metabolischen Rollen von mSHMT und cSHMT ebenfalls klar getrennt (Pfendner und Pizer, 1980). Wie in *A. gossypii* erfolgt in den Mitochondrien die Umsetzung von Serin zu Glycin und im Cytosol die Rückreaktion. Dabei ist die mSHMT-Reaktion der einzige Weg zur Glycin-Bildung in diesen Zellen, da eine

Inaktivierung der mSHMT zu Glycin-Auxotrophie führt (Chasin *et al.*, 1974). Im Gegensatz zu der Disruption von *SHM1* führte die *SHM2*-Disruption in *A. gossypii* zu einer reduzierten Wachstumsrate in Mineralsalzmedium. Die Zugabe von Glycin konnte das Wachstum der *SHM2*-Mutanten verbessern. Demnach ist SHMT2 die Hauptquelle der Glycinbildung in diesem Organismus. In *S. cerevisiae* resultiert die Inaktivierung von entweder einem oder beiden *SHM*-Genen nicht in einer Aminosäure-Auxotrophie (McNeil *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu ist *Corynebacterium glutamicum* mit fehlender SHMT Glycin-auxotroph (Simic *et al.*, 2002), und *Neurospora*-Stämme mit fehlender cSHMT benötigen Formiat zum Wachstum (McClung, 1992). Supplementierung mit 1 mM Adenin stellt das Wildtyp-Wachstum in *AgΔSHM2* wieder her, da in der Wachstumsphase über die SHMT2-Reaktion C1-Einheiten gebildet werden. Dies ist konsistent mit der Beobachtung von Piper *et al.* (2000), die vermuten, dass die Wachstumslimitierung durch Adenin in *S. cerevisiae shm2*-Mutanten zu einer Abnahme des cytosolischen 5,10-CH₂-THF-Pools führt. Das resultiert in einer Verschiebung des C1-Metabolismus in die Mitochondrien. Da in den Mitochondrien aber nur 25 % der C1-Einheiten für die Purin-Synthese generiert werden, führt dies zu Adenin-Mangel (Piper, 2000).

In den *SHM2*-disruptierten Stämmen wurde eine höhere ¹³C₁-Glycin-Markierung detektiert. Dies korreliert mit der Steigerung der Riboflavin-Überproduktion in diesem Stamm. Eine Erklärung dafür wäre, dass die Inaktivierung von SHMT2 zu einer Verringerung des Kohlenstoffflusses von Glycin zu Serin führte und daher mehr Glycin für die Riboflavin-Synthese verfügbar war. Zusätzlich wird C1 gespart, das ebenfalls für die Synthese der Riboflavin-Vorstufe GTP benötigt wird. Ob die Versorgung mit C1 die Riboflavin-Biosynthese limitiert, kann jetzt noch nicht entschieden werden, solange der C1-Metabolismus mit Glycin verknüpft ist. Ein Argument gegen eine C1-Limitierung ist, dass Serin-Supplementierung die Riboflavin-Produktion nicht steigert. Ein weiterer Hinweis ist, dass *ΔSHM2*-Stämme mehr Riboflavin produzieren, obwohl ihr Wachstum durch C1 limitiert ist, wie durch Supplementierung mit Adenin gezeigt werden konnte.

Die Redirektion des Kohlenstoffflusses durch die Inaktivierung eines Gens ist eine bewährte Strategie des Metabolic Engineering. So wurde in *C. glutamicum* durch Inaktivierung der Threonin-Dehydratase der Threonin-Abbau gestoppt, was zu einer gesteigerten Threonin-Bildung führte (Simic *et al.*, 2002). Ein weiteres Beispiel für die Überproduktion eines Sekundärmetaboliten durch Disruption wird von Casqueiro *et al.* (1999) beschrieben. Hier verbesserte die Disruption des *lys2*-Gens, das für die Aminoacidipat-Reduktase kodiert, die Penicillin-Produktion in *Penicillium chrysogenum*. Wenn der Lysin-Weg an einem Punkt nach α-Aminoacidipinsäure unterbrochen wird, kann die synthetisierte α-Aminoacidipinsäure in dem disruptierten Stamm für die Penicillin-Produktion verwendet werden.

Eine weitere interessante Frage war, wie das Wachstum von *SHM*-disruptierten Stämmen im Vergleich zum *A. gossypii*-Wildtypstamm bei Supplementierung mit Glycin, Serin oder Threonin beeinflusst wird. In eukaryotischen Zellen ist die Untersuchung von Wachstumshemmungen, die aus der Fütterung von Aminosäuren resultieren, kompliziert, da die Aminosäurepools zwischen Cytosol und Organellen, wie Mitochondrien, Nukleus und Vakuolen, ungleich verteilt sind (Winston und Bhattacharjee, 1982). So sind 75 % des intrazellulären Glycins in der Vakuole von *S. cerevisiae* lokalisiert (Messenguy *et al.*, 1980). Förster *et al.* (1998) detektierten 48 % des intrazellulären Glycins in der Vakuole von *A. gossypii*. Kastanos *et al.* postulierten, dass in *S. cerevisiae* die Rollen der SHMT-Isoenzyme so variieren, wie sich der Nahrungsbedarf der Zelle verändert. Überträgt man das Modell auf *A. gossypii*, so führt die Supplementierung mit Glycin zu einer serinogenen Katalyse durch SHMT2. Supplementierung von >10 mM Glycin hemmt das Wachstum von Wildtyp, *AgΔSHM1* und *AgTEFpSHM1*. Ein erhöhter Serin-Pool könnte eine mögliche Erklärung dafür sein. Für L-Serin ist seit langem eine Wachstumshemmung von *E. coli*-Zellen bekannt, die auf Minimalmedium mit Lactat, Glucose oder einem anderen Kohlenhydrat als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert wurden (Hama *et al.*, 1990). Hama *et al.* (1994) schlossen daraus, dass das Target der Serin-Inhibition in *E. coli* die Homoserin-Dehydrogenase I ist. Durch die bedeutendere Funktion der SHMT2 in *A. gossypii* kommt es zu einer Serin-Akkumulation in der Zelle. SHMT1 spielt eine eher untergeordnete Rolle im Serin-Glycin-Stoffwechsel und ist nicht in der Lage, den stark erhöhten Serin-Pool abzubauen. Weder die Disruption noch die Überexpression von *SHM1* wirken sich daher auf das Wachstum im Vergleich zum Wildtyp aus. Diese *in vivo* Situation kann nur dann auf diese Weise vorliegen, wenn die intrazellulären Bedingungen über den gesamten Zeitraum auf die serinogene Richtung der SHMT2 ausgerichtet sind, d. h., dass trotz Serin-Akkumulation die Serin-Konzentration in der Zelle immer noch niedriger als die intrazelluläre Glycin-Konzentration ist. In *AgΔSHM2* und *AgΔSHM1ΔSHM2* steigt die Wachstumsrate, wenn ≥10 mM Glycin gefüttert wird. In diesem Fall ist die Akkumulation von Serin vermieden worden, da SHMT2 inaktiviert vorlag. Das supplementierte Glycin könnte direkt in die Purin-Synthese eingebaut werden, wodurch das Wachstum gesteigert würde. Alternativ könnte Glycin über das mitochondriell lokalisierte GCV zu C1-Einheiten abgebaut werden, die dann wiederum in die Purin-Synthese einfließen.

Supplementierung von ≥ 1 mM Serin resultierte in einer signifikanten Abnahme der Wachstumsrate in allen Stämmen von *A. gossypii*, und die Zugabe von 100 mM führte zur vollständigen Wachstumshemmung. Dies bestätigt die vorherige Annahme, dass Akkumulation von Serin innerhalb der Zelle zu einem inhibitorischen Effekt führt. Obwohl die Serin-Supplementierung die glycinogene Richtung der Katalyse durch SHMT1 und SHMT2 bewirkte, war bereits 1 mM Serin wachstumshemmend. Ein inhibitorischer Serin-Effekt

wurde auch beim Wachstum menschlicher Zellen beobachtet. Exogenes Serin fließt bevorzugt in die Protein-Biosynthese ein. Ist Serin in ausreichender Konzentration vorhanden, wurde eine Repression der Enzyme, die am phosphorylierten Serin-Weg beteiligt sind festgestellt (Pizer, 1964). Eine Serin-Endprodukt-Hemmung der Phosphoglycerat-Dehydrogenase wurde auch in den Bakterien *Streptococcus faecium* und *Salmonella typhimurium* beschrieben (Stauffer und Brenchley, 1974, Greene und Radovich, 1975; Dev *et al.*, 1984). Möglicherweise unterliegen auch in *A. gossypii* die Enzyme des phosphorylierten Serin-Wegs einer Endprodukt-Hemmung durch Serin.

Die Aufnahme von Threonin durch *A. gossypii* ist erleichtert im Vergleich zur Glycin-Aufnahme (Monschau *et al.*, 1998). Threonin wird durch die Threonin-Aldolase zu Glycin umgewandelt. Supplementierung mit Threonin erhöht daher den intrazellulären Glycin-Pool mehr als Glycin-Fütterung (Monschau *et al.*, 1998). Deshalb ist ein ähnlicher Effekt zu beobachten, wenn 1 mM Threonin oder 100 mM Glycin zugegeben wird. Die Zugabe von > 10 mM Threonin reduzierte die Wachstumsrate in allen Stämmen, sogar in *AgΔSHM2* und *AgΔSHM1ΔSHM2*. Eine Feedback-Inhibition der Aspartatkinase, dem entscheidend regulierten Enzym der Threonin-Biosynthese, könnte eine Erklärung dafür sein. Die Threonin-Konzentration für eine halbmaximale Hemmung der *S. cerevisiae* Aspartatkinase beträgt 3 mM (Ramos *et al.*, 1991). Möglicherweise war die intrazelluläre Threonin-Konzentration so hoch, dass Hemmeffekte auftraten. Schirch *et al.* (1977) haben in einer detaillierten Analyse der Regulation und des katalytischen Mechanismus der SHMT von Kaninchenleber und *E. coli* gezeigt, dass Glycin im Bereich von 4 – 37 mM die Umwandlung von Serin zu Glycin und 5,10-Methylen-THF hemmt. In Säugerzellen bindet SHMT Glycin in Verbindung mit 5-CH₃-THF oder 5-HCO-THF, was zur Ausbildung eines dead-end-Komplexes führt, der die Aktivität des Enzyms inhibiert (Stover *et al.*, 1997).

Zusammengefasst wird festgestellt, dass die Bedeutungen der SHMT-Isoenzyme im Serin-Glycin-Stoffwechsel von *A. gossypii* unterschiedlich sind. Während die cytosolische SHMT eine deutlich größere Rolle spielt, übernimmt die mitochondrielle SHMT eine eher untergeordnete Funktion. Unter normalen Bedingungen katalysiert cSHMT die Umwandlung von Glycin und Methylen-THF zu Serin, wohingegen mSHMT die Rückreaktion katalysiert.

Eine mögliche Idee, warum eine Aufteilung der Enzymfunktionen auf unterschiedliche Kompartimente zustande gekommen ist, wäre eine Regulation der lokalen Serin- und Glycin-Konzentrationen des Cytosols und der Mitochondrien oder der multiplen Pools von Serin und Glycin innerhalb der Zelle. Um die Aminosäurepools in den Kompartimenten der Zelle konstant zu halten, wäre eine Rollenaufteilung der SHMTs erforderlich. Es könnte auch sein, dass durch die Aufteilung der Reaktionsrichtung die Verteilung von C1-Einheiten in der Zelle erst ermöglicht wird. So könnte eine wesentliche Rolle der cSHMT sein, C1-Einheiten zu Serin zu generieren, um diese als Serin-Transportform in die Mitochondrien zu überführen.

2. Zusammenhang zwischen SHMT2 und der Resistenz gegen den Glycin-Antimetaboliten AMPS

In *A. gossypii* kann eine Steigerung der Riboflavin-Produktion erreicht werden, wenn die Serin-Bildung aus Glycin unterbrochen wird und dadurch mehr Glycin für die Riboflavin-Synthese verfügbar ist. Dies wird durch Inaktivierung der cSHMT ermöglicht.

Eine alternative Methode zur Gewinnung eines Glycin-überproduzierenden Stamms und damit eines verbesserten Riboflavin-Überproduzenten war das Screening auf Resistenz gegen den Glycin-Antimetaboliten AMPS. Monschau (1998) isolierte die AMPS-resistente *A. gossypii*-Mutante *AgAMPS-NM-01*, deren Riboflavin-Produktion deutlich gesteigert ist. Der Stamm *AgAMPS-NM-01* produziert ohne Glycin-Supplementierung die gleiche Menge Riboflavin wie der Wildtyp in Gegenwart von 80 mM Glycin. Im Hinblick auf den Glycin-Stoffwechsel in diesem Stamm wurden die Aktivitäten der an der Glycin-Biosynthese beteiligten Enzyme bestimmt. Während Threonin-Aldolase- und AGAT-Aktivität vergleichbar zum Wildtyp waren, wurde eine 50 % reduzierte SHMT-Aktivität gemessen. Interessanterweise zeigt der Stamm *AgΔSHM2* auch eine deutlich erhöhte Riboflavin-Produktion bei einer um 85 % reduzierten SHMT-Aktivität. ¹³C₁-Markierungsexperimente ergaben zudem, dass wie in *AgΔSHM2* auch in *AgAMPS-NM-01* weniger ¹³C₁-Serin und mehr ¹³C₁-Glycin detektiert werden konnte. Experimente, die auf Medium mit 70 mM AMPS-Supplementierung durchgeführt wurden, zeigten überraschenderweise, dass sich *AgΔSHM2* bezüglich des Wachstums nicht wie *AgAMPS-NM-01* verhielt. *AgΔSHM2* zeigte keine AMPS-Resistenz und war auch nicht in der Lage, Spontan-Mutanten zu bilden wie der Wildtyp oder *AgΔSHM1*. Daher bestand die Vermutung, dass die Mutation zur AMPS-Resistenz im *SHM2*-Gen lokalisiert ist. Die Disruption des *SHM2*-Gens in *AgAMPS-NM-01* führte zu einer Aufhebung der AMPS-Resistenz. Dieses Ergebnis zeigt, dass *SHM2* eindeutig mit der AMPS-Resistenz in Zusammenhang steht. Bei einer Kultivierung auf Mineralsalzmedium ohne AMPS zeigten *AgΔSHM2* und *AgAMPS-NM-01ΔSHM2* unterschiedliche Phänotypen. Beim Stamm *AgΔSHM2* konnte sowohl ein verbessertes Wachstum als auch eine stärkere Riboflavin-Produktion nachgewiesen werden. Daher liegt der Schluss nahe, dass die Mutation zur AMPS-Resistenz nicht im *SHM2*-Gen liegt, sondern ein anderes Gen betroffen ist, dass sich auf die SHMT2 auswirkt.

Möglicherweise unterliegt *SHM2* einem übergeordneten Regulationsmechanismus, der durch die AMPS-Resistenz verändert ist. Diese Änderung der *SHM2*-Regulation wirkt sich dann, auf die Aktivität des SHMT-Proteins aus.

3. Aspartatkinase als Schlüsselenzym der Threonin-Biosynthese und die Funktion für die Riboflavin-Produktion in *A. gossypii*

Die Überexpression des *GLY1*-Gens, das für die Threonin-Aldolase kodiert, führte in einem *A. gossypii*-Stamm erst nach Zugabe von 50 mM Threonin zu einer 8fachen Steigerung der Riboflavin-Überproduktion (Monschau *et al.*, 1998). Eine alleinige Überexpression des *GLY1*-Gens verbesserte die Glycin-Bereitstellung nicht, da der intrazelluläre Threonin-Pool zu niedrig war. Im Wildtyp war es nicht möglich die Riboflavin-Produktion des *GLY1*-Überexprimierers durch Glycin-Supplementierung zu erreichen. Somit ist bei *GLY1*-Überexpression nicht mehr Glycin, sondern Threonin limitierend.

Die Steigerung der Riboflavin-Bildung kam durch eine bessere Aufnahme des extrazellulären Threonins und der dann folgenden intrazellulären Umsetzung zu Glycin zustande. Durch Messung der Aminosäure-Konzentrationen vor und nach Kultivierung wurde gezeigt, dass die Threonin-Aufnahme im Vergleich zur Glycin-Aufnahme erleichtert ist (Monschau, 1998). Dies deutet auf getrennte Transportsysteme für die beiden Aminosäuren hin. Über Aminosäure-Transporter ist in *A. gossypii* bisher nichts bekannt. In *S. cerevisiae* wird Glycin über die General Amino Acid Permease 1 (Gap1) transportiert (van der Rest *et al.*, 1995). Der Threonin-Transport ist in *S. cerevisiae* bislang nicht untersucht worden. In *E. coli* gibt es unterschiedliche Transportsysteme für Glycin und Threonin. Glycin gelangt über einen Carrier, der auch D-Alanin und D-Serin transportiert, in die Zelle (Robbins und Oxender, 1973; Ghrist und Stauffer, 1995). Für die Threonin-Aufnahme gibt es zwei Systeme. Das eine transportiert neben Threonin auch Alanin, Cystein, Homoserin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Tyrosin und Valin, das andere Transportsystem ist spezifisch für Threonin und Serin (Templeton und Savageau, 1974). In *C. glutamicum* werden Threonin und Serin durch den ThrE-Carrier transportiert (Simic *et al.*, 2001).

Als Alternative für eine verbesserte Riboflavin-Überproduktion wäre neben einer Threonin-Supplementierung eine Steigerung der Threonin-Biosynthese zu nennen.

In *S. cerevisiae* wurde jedes Gen des Threonin-Wegs einzeln und in Kombination überexprimiert. Nur die Amplifikation des *HOM3*-Gens, das für die Aspartatkinase kodiert, führte in den verschiedenen Mutanten zu einer Steigerung der Threonin-Akkumulation (Farfan *et al.*, 1996; Farfan und Calderon, 2000). Dies bedeutet, dass die Reaktion, die durch die Aspartatkinase katalysiert wird, den Schlüsselschritt in der Regulation der Threonin-Biosynthese darstellt. In *A. gossypii* zeigten Fütterungsexperimente mit Threonin-Vorstufen, dass neben Threonin auch Homoserin in der Lage ist, die Riboflavin-Produktion zu steigern. Aspartat dagegen zeigt keinen Effekt, obwohl nachgewiesen werden konnte, dass extrazellulär angebotenes Aspartat aufgenommen wird (Monschau, 1998). Demnach liegt der für die Riboflavin-Produktion limitierende Schritt in der Umwandlung von Aspartat zu

Homoserin. Es ist naheliegend, dass dies auch für die durch die Aspartatkinase katalysierte Reaktion in *A. gossypii* gilt.

Das *HOM3*-Gen konnte durch heterologe Komplementation des Threonin-auxotrophen *S. cerevisiae*-Stammes Y00178 aus *A. gossypii* isoliert werden. Der Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz des *AgHOM3*-Gens mit Aspartatkinasen einiger Pilze ergab, dass die Aspartatkinase aus *A. gossypii* mit 71 % die größten Identitäten zum entsprechenden *S. cerevisiae*-Protein aufweist. Mit den Aspartatkinasen aus *Schizosaccharomyces pombe* und *Neurospora crassa* wurden 53 % und 45 % identische Aminosäuren identifiziert. Dabei waren am N- und C-Terminus und im zentralen Teil der Aminosäure-Sequenzen stark konservierte Bereiche lokalisiert. Dies deutet darauf hin, dass die Aspartatkinasen bezüglich ihrer Struktur und katalytischen Mechanismen eng miteinander verwandt sind. In diesem Zusammenhang wurde am N-Terminus das Tetrapeptid KFFG identifiziert, das den Kern einer hoch konservierten Region bildet, welcher in allen eukaryotischen und prokaryotischen Aspartatkinasen zu finden ist (Arévalo-Rodríguez *et al.*, 1999). Zwar ist die Funktion dieser Sequenz unbekannt, es konnte aber gezeigt werden, dass sie essentiell für die Funktionalität des Enzyms und nicht an der allosterischen Regulation beteiligt ist. Mutationen führten zu einer veränderten Affinität zu ATP und Aspartat, so dass die Region vermutlich bei deren Bindung involviert ist (Arévalo-Rodríguez *et al.*, 1999). Durch Punktmutationen im *HOM3*-Gen von *S. cerevisiae* konnten Aminosäure-Reste identifiziert werden, die an verschiedenen Funktionen beteiligt sind. So führte die Mutation G25D zu einer Reduktion der Affinität zu den Substraten Aspartat und ATP. Es wird postuliert, dass die Sequenz D262-P263-R264 im aktiven Zentrum liegt, und der Alanin-Rest an Position 406 für die Konformation der Aspartatkinase eine wichtige Rolle spielt. Die einzelnen Mutationen E282D, G452D und S472Y führten zur Feedback-Resistenz gegenüber Threonin.

Die Feedback-Hemmung der *S. cerevisiae*-Aspartatkinase durch Threonin wurde bereits beschrieben (Stadtman *et al.*, 1961, Ramos *et al.* 1991). Delgado *et al.* (1982) beobachteten weiterhin eine Feedback-Hemmung durch Homoserin. Auf transkriptioneller Ebene wurde eine Repression des Aspartatkinase-Gens durch Threonin oder Homoserin nachgewiesen (de Robichon-Szulmajster und Corrivaux, 1963, 1964; de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1962, 1966). Diese Regulationen auf Protein- und Gen-Ebene zeigen, dass die Aspartatkinase in Hefe eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle der Threonin-Synthese spielt. In *A. gossypii* wurde die Aspartatkinase im Rohextrakt durch Zugabe von 10 mM Threonin zu 87 % inhibiert. Eine Hemmung durch Homoserin konnte nicht detektiert werden. Wurde *HOM3* in *A. gossypii* ausgeschaltet, war die Mutante (*AgΔHOM3*) nicht mehr in der Lage, auf Mineralsalzmedium zu wachsen. Fütterungsexperimente zeigten, dass die Zugabe von Threonin zum Medium den Wachstumsdefekt nicht aufheben konnte. Erst durch zusätzliche

Supplementierung mit Methionin konnte Wildtyp-Wachstum wieder hergestellt werden. Alternativ zeigte die Zugabe von Homoserin diesen Effekt.

Ein erhöhter Homoserin- und Methionin-Bedarf wurde ebenfalls in *S. cerevisiae* beobachtet. So resultierte die durch 20 mM Threonin-Fütterung entstandene Repression der Aspartatkinase-Synthese in Methionin-Mangel, wodurch das Wachstum des Wildtyps verlangsamt war. Die Zugabe von 5 mM Methionin konnte das Wachstum wieder herstellen. In *S. cerevisiae* wurde aber auch beobachtet, dass höhere Methionin-Konzentrationen das Wachstum hemmen (Stadtman *et al.*, 1961). Supplementierung von Threonin, Methionin oder Homoserin in Konzentrationen ≥ 10 mM führen in *A. gossypii* zu einer reduzierten Wachstumsrate sowohl im Wildtyp als auch in *AgΔHOM3*. Dies zeigt, dass der Aspartatweg einer strikten Regulation unterliegt. Veränderungen der entsprechenden intrazellulären Aminosäure-Pools kontrollieren die Synthese jeder einzelnen Aminosäure (Viola, 2001). So findet in *S. cerevisiae* am Verzweigungspunkt des Threonin- und Methionin-Synthese-Wegs eine Regulation der Homoserinkinase durch Threonin und Methionin statt (Ramos *et al.*, 1991). Besonders der Methionin-spezifische Teil des Aspartat-Wegs ist mehrfach reguliert, da die Homoserin-o-transacetylase durch Methionin und S-Adenosylmethionin sowohl stark inhibiert als auch ihre Bildung reprimiert wird. So konnten *S. cerevisiae*-Mutanten isoliert werden, die resistent gegen das Threonin-Analogon Hydroxynorvalin waren. Diese Stämme produzierten Homoserin und Threonin. Eine Akkumulation von Methionin konnte nicht gezeigt werden (Ramos *et al.*, 1992).

Da die Disruption von *HOM3* zu einem Wachstumsdefekt führte und demnach die Funktion der Aspartatkinase von keinem anderen Enzym übernommen werden konnte, ist davon auszugehen, dass in *A. gossypii* nur eine monofunktionelle Aspartatkinase existiert. Eine einzige monofunktionelle Aspartatkinase wurde in *S. cerevisiae* (Stadtman *et al.*, 1961; Ramos *et al.* 1991) *Candida sp.* (Michalik und Raczynska-Bojanowska, 1976) und *C. glutamicum* (Pfefferle *et al.*, 2003) beschrieben. Die Aspartatkinase aus *C. glutamicum* wird durch die zwei Endprodukte L-Lysin und L-Threonin gehemmt (Pfefferle *et al.*, 2003). Viele Bakterien besitzen mehrere Isoformen der Aspartatkinase, von denen einige bifunktionell sind (Cohen, 1969). In *E. coli* gibt es z. B. drei Aspartatkinasen. Während Threonin die bifunktionelle Aspartatkinase/Homoserin-Dehydrogenase I sowohl inhibiert als auch reprimiert, wird das Gen der ebenfalls bifunktionellen Aspartatkinase/Homoserin-Dehydrogenase II durch Methionin reprimiert. Die dritte Isoform ist ein monofunktionelles Enzym, das durch Lysin inhibiert wird (Cohen und Dauntry-Varsat, 1980). Die zwei Aspartatkinasen von *Bacillus* werden durch den Diaminopimelat-Level reguliert bzw. durch Threonin oder Lysin inhibiert (Rosner und Paulus, 1971). In Pflanzen gibt es mindestens zwei Aspartatkinase-Isoenzyme, von denen eine Lysin-sensitiv und die andere Threonin-sensitiv ist (Azevedo *et al.*, 1997). Molekularbiologische Untersuchungen an Karotte und

Mais zeigten, dass es sich bei dem Threonin-sensitiven Isoenzym um eine bifunktionelle Aspartatkinase/Homoserin-Dehydrogenase handelt (Wilson *et al.*, 1991; Azevedo *et al.*, 1992b). Untersuchungen zu dieser bifunktionellen Aspartatkinase/Homoserin-Dehydrogenase I ergaben, dass sich die N-terminale Kinase und die C-terminale Dehydrogenase unabhängig voneinander in eine enzymatisch aktive Form falten, auch wenn ihre gemeinschaftliche Struktur dadurch zerstört wird (Dauntry-Varsat und Garel, 1981).

In *Arabidopsis thaliana* wurde jetzt ein zweites Gen (*akth2*) für eine Threonin-sensitive bifunktionelle Aspartatkinase/Homoserin-Dehydrogenase isoliert (Rognes *et al.*, 2003). Mit Reporterkonstrukten wurden die Expressionen von *akth1* und *akth2* untersucht. Beide Gene werden im Meristem und in Blättern simultan exprimiert. In Wurzeln wird *akth1* geringer exprimiert als *akth2*, wohingegen *akth2* z. B. während der Samenbildung gar nicht exprimiert wird (Zhu-Shimoni *et al.*, 1997; Rognes *et al.*, 2003).

Die Aspartatkinase unterliegt offenbar einer Vielzahl von Regulationsmöglichkeiten. Neben der Kontrolle auf Enzymebene durch Endprodukt-Hemmung oder der Funktion als bifunktionelles Enzym ist auf genetischer Ebene eine Regulation durch Repression oder durch Gewebe-spezifische bzw. Entwicklungsstadium-abhängige Expression möglich. Aufhebungen der einzelnen Regulationen resultieren meistens in Mutanten, die Threonin produzieren.

In *S. cerevisiae*-Mutanten führte eine Feedback-resistente Aspartatkinase zu deutlicher Homoserin- und Threonin-Überproduktion. Es wurden Stämme isoliert, die 40mal mehr Threonin bilden als der Wildtyp (Farfan und Calderon, 2000). Methionin wurde, aufgrund der starken Regulation dieses Biosynthese-Zweigs, nicht vermehrt produziert (Arevalo-Rodriguez *et al.*, 1999).

Weiterhin zeigten Mutanten, die resistent gegen das toxische Threonin-Analogon Hydroxynorvalin (α -Amino- β -hydroxyvalerinsäure) sind, eine 15 - 30fache Threonin-Akkumulation in der Zelle. Zusätzlich exkretieren diese Mutanten dreimal mehr Threonin als der Parentalstamm (Delgado *et al.*, 1982; Ramos und Calderon, 1992). Die Threonin-Überproduktion kam durch die Feedback-Resistenz der Aspartatkinase zustande.

Auffällig ist, dass die Aufhebung der Feedback-Hemmung in allen Mutanten, die über unterschiedliche Arten gewonnen wurden, zu einer Reduzierung der *in vitro* Aspartatkinase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp führen (Martin-Rendon *et al.*, 1993; Seibold *et al.*, 1981; Ramos und Calderon, 1992). Eine mögliche Erklärung wäre eine Repression des *HOM3*-Gens durch Threonin. Weiterhin wäre vorstellbar, dass die Aspartatkinasen in den Feedback-resistenten Mutanten derart in ihrer Konformation verändert sind, dass die Bindung des Substrats nicht optimal ist. Auch eine verschlechterte Isomerisierung der Aspartatkinase zur Endkonformation muss in Betracht gezogen werden, wodurch die Substrat-Bindung gestört wird. Dies resultiert in einer reduzierten Affinität der Aspartatkinase

bezüglich ihrer natürlichen Substrate Aspartat und ATP. Möglicherweise sind die mutierten Enzyme aber auch instabiler als die Wildtyp-Formen, so dass es bei der Aufreinigung zu einem Verlust der Aktivität kommt.

Im Hinblick auf die Riboflavin-Produktion von *AgΔHOM3* konnte in Folge einer Wachstumslimitierung eine Steigerung der Riboflavin-Produktion beobachtet werden. Die Wiederherstellung des Wachstums senkte die Überproduktion sogar unter den Wildtyp-Level. Da dieses Phänomen metabolisch nicht erklärt werden kann, deutet dies auf einen regulatorischen Effekt hin. Die Regulation der an der Riboflavin-Biosynthese beteiligten *RIB*-Gene wurde in *A. gossypii* untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die relativen mRNA-Konzentrationen der Gene *RIB3*, *RIB4* und *RIB5*, die für Enzyme im quantitativ wichtigeren Zweig des Riboflavin-Biosynthesewegs kodieren, in der Produktionsphase im Vergleich zur Wachstumsphase verstärkt transkribiert werden (Schlösser *et al.*, 2001). Das *RIB3*-Genprodukt, die Dihydroxybutanonphosphat-Synthase, ist das Schlüsselenzym der Synthese. Durch *RIB3*-Promotor-*lacZ*-Fusionsanalysen wurde eine Korrelation des Anstiegs der β -Galaktosidase-Aktivität und der *RIB3* mRNA-Konzentration mit dem Beginn der Riboflavin-Produktionsphase nachgewiesen. Dies zeigt, dass *RIB3* transkriptionell reguliert ist. Obwohl mit den *RIB4*- und *RIB5*-Promotoren keine Reporter-Analysen durchgeführt wurden, liegt die Vermutung nahe, dass auch diese Gene transkriptionell reguliert werden (Schlösser *et al.*, 2001). Zur Untersuchung, welche Faktoren die Gene anschalten, konnte beobachtet werden, dass in Fermenter-Kultivierungen die Riboflavin-Überproduktion erst startete, wenn die Wachstumsrate beim Übergang in die stationäre Phase abnahm (Stahmann *et al.*, 2001). Daher könnte die negative Änderung der Wachstumsrate der Auslöser für die Überproduktion von Riboflavin sein. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass eine Herabsetzung der Durchflussrate im Chemostat-Experiment von $D = 0,16/h$ auf $D = 0,05/h$ die Riboflavin-Bildung induzierte (Wiesenburg, 1999). Vermutlich lösen sich sukzessiv verschlechternde Umweltbedingungen, die durch eine abnehmende Verfügbarkeit von Nährstoffen gekennzeichnet sind, die Riboflavin-Überproduktion aus.

Die Situation in *AgΔHOM3* könnte somit erklärt werden, da auch dort die Wachstumslimitierung in einer deutlich gesteigerten Riboflavin-Produktion resultierte. Es stellt sich daher die Frage, ob es durch die Disruption von *HOM3* zu einer verstärkten Expression der *RIB*-Gene kommt. Eine Bestimmung der *RIB3*-Expression in *AgΔHOM3* könnte mit Hilfe eines *RIB3*_{Promotor}/*lacZ*-Reporterkonstrukts erfolgen, um so den Zusammenhang zwischen Disruption und Überproduktion zu klären.

Wurde das Kultivierungsmedium mit Glycin supplementiert, war sowohl im Wildtyp als auch in *AgΔHOM3* die Riboflavin-Bildung erhöht. Demnach besteht die Glycin-Limitierung nach wie vor, und liefert ein weiteres Argument dafür, dass *AgΔHOM3* nicht aufgrund des geänderten Aminosäure-Stoffwechsels mehr Riboflavin als der Wildtyp produziert. Durch

Fütterung von Aspartat war die Produktion in *AgΔHOM3* vergleichbar mit der, die durch Glycin-Zugabe erreicht wurde. Dagegen war die Riboflavin-Überproduktion im Wildtyp reduziert, was zeigt, dass Aspartat im Wildtyp nicht die Riboflavin-Synthese limitiert.

Geht man davon aus, dass diese gesteigerte Produktion durch Aspartat in der $\Delta HOM3$ -Mutante auf der intrazellulären Umsetzung von Aspartat zu Glycin beruht, muss gefolgert werden, dass *A. gossypii* über einen weiteren Biosyntheseweg zur Umsetzung von Aspartat zu Glycin verfügt. Hierbei könnte es sich um den phosphorylierten Serin-Weg handeln. ^{13}C -Markierungsexperimente in *S. cerevisiae* zeigten, dass Aspartat zu Oxalacetat transaminiert werden kann, das dann zu Phosphoenolpyruvat (PEP) durch Katalyse der PEP-Carboxykinase umgewandelt wird. PEP reagiert zu 3-Phosphoglycerat, das über Phosphoserin zu Serin umgesetzt wird. Die SHMT katalysiert dann die Bildung von Glycin (Woldman und Appling, 2002). Wenn dieser Weg in *A. gossypii* existiert, ist es verwunderlich, dass der Wildtyp ihn offenbar zur Glycin-Synthese nicht nutzt, da trotz Aspartat-Fütterung die Riboflavin-Produktion verringert war. Demnach spielen unter diesen Bedingungen weitere Regulationsunterschiede zwischen dem Wildtyp und der $\Delta HOM3$ -Mutante eine Rolle.

Da gezeigt werden konnte, dass das isolierte *HOM3*-Gen für eine Threonin-sensitive Aspartatkinase in *A. gossypii* kodiert, wäre das nächste Ziel eine Verbesserung der Threonin-Biosynthese. Dazu wäre zunächst zu untersuchen, welchen Effekt die Überexpression von *HOM3* auf die Threonin- und Riboflavin-Bildung hat. In *S. cerevisiae* war die Threonin-Synthese bei *HOM3*-Überexpression gesteigert (Farfán und Calderón, 2000). Eine deutlich höhere Threonin-Akkumulation und -Exkretion wurde in Stämmen mit Feedback-resistenter Aspartatkinase gefunden (Ramos und Calderon, 1992). Durch Sequenzierung des *HOM3*-Gens in den Mutanten wurden Punktmutationen identifiziert, die auf Aminosäure-Ebene zu einem Austausch und damit zur Feedback-Resistenz führten (Arévalo-Rodríguez *et al.*, 1999). In *A. gossypii* könnte die Einführung einer Feedback-resistenten Aspartatkinase durch ortsgerichtete Mutagenese ein weiterer Ansatzpunkt zur Steigerung der Threonin-Bildung sein. Eine erhöhte Threonin-Konzentration in der Zelle wirkte sich nur dann auf die Riboflavin-Synthese aus, wenn das *GLY1*-Gen, das für die Threonin-Aldolase kodiert, überexprimiert wurde (Monschau *et al.*, 1998). Zur Herstellung eines Riboflavin-Überproduzenten ist daher wahrscheinlich nicht nur die Überexpression eines mutierten *HOM3*-Gens erforderlich, zusätzlich müsste auch das *GLY1*-Gen überexprimiert werden. Wenn die Riboflavin-Produktion in solch einem Stamm gesteigert werden könnte, wäre mit Hilfe von ^{13}C -Experimenten zu zeigen, ob die Threonin- sowie Glycin-Bereitstellung verbessert wurde.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Der filamentöse Pilz *Ashbya gossypii* erhielt biotechnische Bedeutung durch seine Fähigkeit zur Überproduktion von Riboflavin (Vitamin B₂). Glycin ist eine Vorstufe der *de novo* Purin-Synthese und fließt darüber in die Riboflavin-Biosynthese ein. Supplementierung des Mediums mit Glycin führt zu einer Steigerung der Riboflavin-Bildung. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der zwei an der Glycin-Biosynthese beteiligten Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT)-Isoenzyme, um eine verbesserte Glycin-Bereitstellung für die Riboflavin-Produktion zu erreichen.

Zur intrazellulären Lokalisierung der beiden SHMTs wurden HA-SHM-Fusionskonstrukte verwendet. Durch Immunodetektion wurde SHMT1 in den Mitochondrien und SHMT2 im Cytosol lokalisiert.

Die Disruption von *SHM2* resultierte in einer signifikanten Steigerung der Riboflavin-Überproduktion. Die spezifische SHMT-Aktivität fiel um 85 % von 3 mU/mg Protein auf 0,5 mU/mg Protein. Wurde zusätzlich *SHM1* inaktiviert, konnten noch 3 % SHMT-Aktivität gemessen werden, die durch eine Nebenaktivität der Threonin-Aldolase zustande kam. Die erhöhte Riboflavin-Bildung der *SHM2*-Disruptanten konnte damit erklärt werden, dass der Fluss von Glycin zu Serin verringert wurde, was in einer verbesserten Verfügbarkeit der Riboflavin-Vorstufe Glycin resultierte. Wurde ¹³C₁-Threonin gefüttert, fand sich mehr als 50 % der Markierung im C₁ von Glycin, was durch die Threonin-Aldolase-Aktivität erklärt werden kann. Mehr als 30 % Markierung konnte im C₁ von Serin bestimmt werden. Serin wurde aus Glycin durch die SHMT-Reaktion gebildet. Die Disruption von *SHM1* hatte keinen detektierbaren Effekt auf die Markierung im Serin. Dagegen führte die Disruption von *SHM2* zu einer erniedrigten Serin- (2 – 5 %) und einer erhöhten Glycin- (59 – 67 %) Markierung, was den veränderten Kohlenstofffluss zeigt. Die *SHM2*-Disruption führte zu einer reduzierten Wachstumsrate in Mineralsalzmedium. Supplementierung mit 1 mM Adenin stellte das Wildtyp-Wachstum wieder her, was zeigt, dass in *AgΔSHM2* das Wachstum C1-limitiert ist.

Da bei Überexpression des Gens für die Threonin-Aldolase nicht mehr Glycin, sondern Threonin limitierend für die Riboflavin-Synthese war, sollte die Threonin-Biosynthese in *A. gossypii* verbessert werden. Durch heterologe Komplementation einer Threonin-auxotrophen Mutante von *Saccharomyces cerevisiae* wurde das *AgHOM3*-Gen, das für eine monofunktionelle Aspartatkinase kodiert, isoliert. Im Rohextrakt von *A. gossypii* wurde eine spezifische Aspartatkinase-Aktivität von 5 mU/mg Protein gemessen. Die Zugabe von 10 mM Threonin inhibierte die Aktivität zu 85 %. Die Disruption des *AgHOM3*-Gens führte zu Homoserin-Auxotrophie.

Die Riboflavin-Produktion von *AgΔHOM3* war signifikant erhöht, wenn das Wachstum limitiert wurde. Wurde durch Supplementierung des Mediums mit Homoserin Wildtyp-ähnliches Wachstum wieder hergestellt, war die Produktion von Riboflavin niedriger als beim Wildtyp. Das lässt eine verstärkte Induktion der *RIB*-Gene als Ursache für die erhöhte Riboflavin-Produktion von *AgΔHOM3* vermuten.

VI. LITERATUR

Aebi, H.E. (1974). Catalase. In: Methods of enzymatic analysis, pp. 673-686, Bergmeyer, H.U. (Ed.) Academic Press, New York

Althöfer, H., Seulberger, H., Zelder, O. und Revuelta, J.L. (1999). Genetisches Verfahren zur Herstellung von Riboflavin. Patent DE19823834A1.

Appling, D.R. (1991). Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes. *FASEB J.* **5**: 2645-2651

Arévalo-Rodríguez, M., Calderon, I. und Holmberg, S. (1999). Mutations that cause threonine sensitivity identify catalytic and regulatory regions of the aspartate kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**: 1331-1345

Artigues, A., Birkett, A. und Schirch, V. (1990). Evidence for the in vivo deamination and isomerization of an asparaginy residue in cytosolic serine hydroxymethyltransferase. *J. Biol. Chem.* **265**(9): 4853-4858

Ashby, S.F. und Nowell, N. (1926). The fungi of stigmatomycosis. *Annals of Botany* **40**: 69-83

Atkins, C.A., Smith, P.M.C. und Storer, P.J. (1997). Reexamination of the intracellular localization of de novo purine synthesis in cowpea nodules. *Plant Physiol.* **113**:127-135

Attardi, G. und Schatz, G. (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **4**: 289-333

Azevedo, R.A., Arruda, P., Turner, W.L. und Lea, P.J. (1997). The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. *Phytochemistry* **46**: 395-419

Azevedo, R.A., Smith, R.J. und Lea, P.J. (1992b). Aspects of aspartate kinase regulation in maize: co-purification of aspartate kinase and homoserine dehydrogenase sensitive to threonine. *Phytochemistry* **31**: 3731-3734

Bacher, A. (1991). Biosyntheseis of flavins. In: Chemistry and biochemistry of flavoenzymes, Vol. I, pp. 215-259, Müller, F. (Ed.), CRC Press, Boston

Bähler, J. und Pringle, J.R. (1998). Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes and development* **12**: 1356-1370

Barra, D., Martini, F., Angelaccio, S., Bossa, F., Gavilanes, F., Peterson, D., Bullis, B. und Schirch, L. (1983). Sequence homology between prokaryotic and eukaryotic forms of serine hydroxymethyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116**(3):1007-1012

Batra, L.R. (1973). Nematosporeaceae (Hemiascomycetidae): Taxonomy, pathogenicity, distribution and vector relations. *USDA Technol. Bull.* **1469**: 1-71

Besson, V., Neuburger, M., Rébeillé, F. und Douce, R. (1995). Evidence for three serine hydroxymethyltransferases in green leaf cells. Purification and characterization of the mitochondrial and chloroplastic isoforms. *Plant Physiol. Biochem.* **33**: 665-673

- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979).** A rapid extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513
- Black, S. und Wright, N.G. (1955).** β -Aspartokinase and β -aspartyl phosphate. *J. Biol. Chem.* **213**: 27-38
- Blakley, R.L. (1969).** In: The biochemistry of folic acid and related pteridines, Vol. 13 of Frontiers of Biology, Chap. 8, pp. 267-293, Neuberger, A. und Tatum, E.L. (Eds.), American Elsevier, New York
- Böddecker, T. (1998).** Persönliche Mitteilung.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 258-264
- Burrows, R.B. und Brown, G.M. (1978).** Presence in *Escherichia coli* of deaminase and a reductase involved in biosynthesis of riboflavin. *J. Bacteriol.* **136**: 657-667
- Byrne, P.C., Shipley, J.M., Sanders, P.G. und Snell, K. (1996).** Characterisation of a human serine hydroxymethyltransferase pseudogene and its localisation to 1p32.3-33. *Hum. Genet.* **97**: 340-344
- Capelluto, D.G.S., Hellman, U., Cazzulo, J.J. und Cannata, J.J.B. (1999).** Purification and partial characterization of serine hydroxymethyltransferase from *Crithidia fasciculata*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **98**: 187-201
- Casqueiro, J., Gutiérrez, S., Banuelos, O., Hijarrubia, M.J. und Martín, J.F. (1999).** Gene targeting in *Penicillium chrysogenum*: disruption of the *lys2* gene leads to penicillin overproduction. *J. Bacteriol.* **181**(4): 1181-1188
- Chasin, L.A., Feldman, A., Konstam, M. und Urlaub, G. (1974).** Reversion of a chinese hamster cell auxotrophic mutant. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**: 718-722
- Chaves, A.C.S.D., Fernandez, M., Lerayer, A.L.S., Mierau, I., Kleerebezem, M. und Hugenholtz, J. (2002).** Metabolic engineering of acetaldehyd production by *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(11): 5656-5662
- Cohen, G.N. (1969).** The aspartokinases and homoserine dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Curr. Topics Cell. Regulat.* **1**: 183-231
- Cohen, G.N. (1983).** The common pathway to lysine, methionine, and threonine. In : Amino Acids: biosynthesis and genetic regulation. pp.147-171 Hermann, K.M., Somerville, R.L. (Eds), Addison-Wesley, Reading, MA
- Cohen, G.N. und Dautry-Varsat, A. (1980).** The aspartokinases-homoserine dehydrogenases of *Escherichia coli*. In: Multifunctional proteins; Bisswanger, H. und Schmincke-Ott, E. (Eds); pp. 49-121 John Wiley, New York
- Contestabile, R., Paiardini, A., Pascarella, S., diSalvo, M.L., D'Aguanno, S. und Bossa, F. (2001).** L-Threonine aldolase, serine hydroxymethyltransferase und fungal alanine racemase. *Eur. J. Biochem.* **268**: 6508-6525
- Cooper, T.G. (1981).** Biochemische Arbeitsmethoden, de Gruyter, Berlin
- Cooperman, J.M. und Lopez, R. (1984).** Riboflavin. In: Machlin L.J. (Ed), Handbook of vitamins. pp. 300-327 Dekker, New York

Cossins, E.A. und Chan, L. (1997). Folates and one-carbon metabolism in plants and fungi. *Phytochemistry* **45**: 437-452

Cossins, E.A. und Pang, S.H.Y. (1980). Loss of cytosolic serine hydroxymethyltransferase in a formate mutant of *Neurospora crassa*. *Experientia* **36**: 289-290

Dainty, R.H. und Peel, J.L. (1970). Biosynthesis of amino acids in *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. J.* **117**: 573-584

Dammer, K.-H. und Ravelo, H.G. (1990). Verseuchung von *Leptoglossus gonagra* (Fabr.) mit *Nematospora coryli* Peglion und *Ashbya gossypii* (Ashby et Nowell) Guillermond in einer Zitrusanlage der Republik Kuba. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz, Berlin* **26**: 71-78

Dauntry-Varsat, A. und Garel, J.R. (1981). Independent folding regions in aspartokinase-homoserine dehydrogenase. *Biochemistry* **20**: 1396-1401

de Robichon-Szulmajster H. und Corrivaux, D. (1963). Metabolic regulations of methionine and threonine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Repression and retroinhibition of aspartokinase. *Biochim. Biophys. Acta* **72**: 248-256

de Robichon-Szulmajster H. und Corrivaux, D. (1964). Metabolic regulations of methionine and threonine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. III. Kinetic studies on repression and derepression of the first three enzymes of the pathway. *Biochim. Biophys. Acta* **92**: 1-9

de Robichon-Szulmajster, H., Surdin, Y. und Mortimer, R.K. (1966). Genetic and biochemical studies of genes controlling the synthesis of threonine and methionine in *Saccharomyces*. *Genetics* **53**: 609-619

Delgado, M.A., Guerrero, J.A. und Conde, J. (1982). Genetic and biochemical study of threonine-overproducing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **2(7)**: 731-736

DeLuna, A., Avendana, A., Riego, L. und González, A. (2001). NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae* – purification, kinetic properties and physiological roles. *J. Biol. Chem.* **276(47)**: 43775-43783

Demain, A.L. (1972). Riboflavin oversynthesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **26**: 369-388

Demain, A.L. (2000). Microbial biotechnology. *TIBTECH* **18**: 26-31

Dev, I.K. und Harvey, R.J. (1984). Regulation of synthesis of serine hydroxymethyltransferase in chemostat cultures of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **259**: 8394-8401

Devor, E.J., Dill-Devor, R.M., Magee, H.J. und Waziri, R. (1998). Serine hydroxymethyltransferase pseudogene, SHMT-ps1: a unique genetic marker of the order primates. *J. Exp. Zool.* **282**: 150-156

Diaz-diaz, M., Ward, O.P., Honek, J. und Lajoie, G. (1995). Enzymes from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 11097 participating in biotransformation of acetaldehyd and glycine to threonine isomers. *Can. J. Microbiol.* **41**: 438-443

Dohmen, J.R., Strasser, A.W.M., Höner, C.B. und Hollenberg, C.P. (1991). An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**: 691-692

- Douce, R., Bourguignon, J., Neuburger, M. und Rébeillé, F. (2001).** The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in Plant Science* **6**: 167-176
- Dunathan, H.C. (1966).** Conformation and reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55(4)**:712-706
- Easterby, J.S. und Quadri, S.S. (1982).** Hexokinase Type II from rat skeletal muscle. *Methods Enzymol.* **90**: 11-15
- Eddy, A.A. und Hopkins, P. (1989).** Transport of amino acids and selected anions in yeast. *Methods in Enzymology* **174**: 623-628
- Eggerdorfer, M. und Adam, G. (1996).** Vitamins. Chapter 1. In: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. VCH, Weinheim, A27: 527-530
- Farfán, M.J. und Calderón, I.L. (2000).** Enrichment of threonine content in *Saccharomyces cerevisiae* by pathway engineering. *Enz. Microbial Technol.* **26**: 763-770
- Farfán, M.J., Martín-Rendón E. und Calderón, I.L. (1996).** Effect of gene amplification on threonine production by yeast. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 667-674
- Fincham, J.R.S. (1989).** Transformation in fungi. *Microbiol. Rev.* **53**:148-170
- Förster, C., Marienfeld, S., Wilhelm, R. und Krämer, R. (1998).** Organelle purification and selective permeabilisation of the plasma membrane: two different approaches to study vacuoles of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *FEMS Microbiol. Letters* **167**: 209-214
- Förster, C., Santos, M.A., Ruffert, S. Krämer, R. und Revuelta, J.L. (1999).** Physiological consequence of disruption of the VMA1 gene in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *J. Biol. Chem.* **274**: 9442-9448
- Fu, T.-F., Scarsdale, J.N., Kazanina, G., Schirch, V. und Wright, H.T. (2003).** Location of the pteroylpolyglutamate-binding site on rabbit cytosolic serine hydroxymethyltransferase. *J. Biol. Chem.* **278(4)**: 2645-2653
- Galas, E. und Florianowicz, T. (1975).** L-Glutamate-glyoxylate aminotransferase. *Acta Microbiologica Polonica Ser. B* **7(27)**: 243-252
- Garrow, T., Brenner, A., Whitehead, M., Chen, X.N., Duncan, R., Korenberg, J. und Shane, B. (1993).** Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferases and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* **368**: 11910-11916
- Geller, A. M. und Kotb, M. Y. (1989).** A binding assay for serine hydroxymethyltransferase. *Anal. Biochem.* **180**: 120-125.
- Ghrist, A.C. und Stauffer, G.V. (1995).** The *Escherichia coli* glycine transport system and its role in the regulation of the glycine cleavage system. *Microbiology* **141**: 133-140
- Girgis, S., Nasrallah, I.M., Suh, J.R., Oppenheim, E., Zanetti, K.A., Mastro, M.G. und Stover, P.J. (1998).** Molecular cloning, characterization and alternative splicing of the human cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase gene. *Gene* **210**: 315-324
- Goodwin, T.W. (1959).** Production and biosynthesis of riboflavin in microorganisms. In: Progress in industrial microbiology, Vol. I, pp. 139-177, Hockenhull, D.J.D. (Ed.), Heywood und Company Ltd., London

- Greene, R.C. und Radovich, C. (1975).** Role of methionine in the regulation of serine hydroxymethyltransferase in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **124**: 269-278
- Grenson, M. (1992).** Amino acid transporters in yeast: structure, function and regulation. *New Compr. Biochem.* **21**: 219-245
- Gross, D.S., Collins, K.W., Hernandez, E.M. und Garrad, W.T. (1988).** Vakuum blotting: a simple method for transferring DNA from sequencing gels to nylon membranes. *Gene* **74**: 347-356
- Guillermond, P. (1928).** Recherche sur quelques ascomycetes inferieur isoles de la stigmatomycose des graines de cotonnier. Essai sur la phylogenie des ascomycetes. *Rev. Gen. Bot.* **40**: 328-342
- Hama, H., Kayahara, T., Ogawa, W., Tsuda, M. und Tsuchija, T. (1994).** Enhancement of serine-sensitivity by a gene encoding rhodanese-like protein in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **115**: 1135-1140
- Hama, H., Sumita, Y., Kakutani, Y., Tsuda, M. und Tsuchija, T. (1990).** Target of serine inhibition in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **168** (3): 1211-1216
- Hanahan, D. (1985).** Techniques for transformation of *E. coli*. In: DNA cloning – A practical approach, Vol.I, pp. 222-250, Pepler, H.J. (Ed.), Reinhold, New York
- Hanson, A.N. (1967).** Microbial production of pigments and vitamins. In: Microbial technology, pp. 222-250, Pepler, H.J. (Ed.), Reinhold, New York
- Hartl, F.-U., Pfanner, N., Nicholson, D.W. und Neupert, W. (1989).** Mitochondrial protein. *Biochim. Biophys. Acta* **988**: 1-45
- Hayasaka, K., Nanao, K., Takada, G., Okamura-Ikeda, K. und Motokawa, Y. (1993).** Isolation and sequence determination of cDNA encoding human T-protein of the glycine cleavage system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**: 766-771
- Heefner, D.L., Weaver, C.A. Yarus, M.J., Burdzinski, L.A., Gyure, D.C. und Foster, E.W. (1988).** Riboflavin producing strains of microorganisms, method for selecting, and method for fermentation. Patent WO 88/09822
- Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J. und Tzagoloff, A. (1986).** Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**: 163-167
- Hillocks, R.J. (1992).** Fungal diseases of the boll. In: Cotton Diseases, pp. 239-263, Hillocks, R.J. (Ed.), Redwood Press Ltd, Melksham, UK
- Hiraga, K. und Kikuchi, G. (1982).** The mitochondrial glycine cleavage sytem: inactivation of glycine decarboxylase as a side reaction of the glycine decarboxylation in the presence of aminomethyl carrier protein. *J. Biochem.* **92**(5): 1489-1498
- Ho, C.-L. und Saito, K. (2001).** Molecular biology of the plastidic phosphorylated serine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids* **20**: 243-259
- Höfgen, R., Kreft, O., Willmitzer, L. und Hesse, H. (2001).** Manipulation of thiol contents in plants. *Amino Acids* **20**: 291-299
- Hollander, I. und Brown, G.M. (1979).** Biosynthesis of riboflavin – Reductase and deaminase of *Ashbya gossypii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**: 759-763

- Jones, B.M. und Gilligan, J.P. (1983).** O-Phtaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase-high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J. Chromatography* **266**: 471-482
- Jungermann, K.A., Schmidt, W., Kirchniawy, F.H., Rupprecht, E.H. und Thauer, R.K. (1970).** Glycine formation via threonine and serine aldolase – its interrelation with the pyruvate formate lyase pathway of one-carbon unit synthesis in *Clostridium kluyveri*. *Eur. J. Biochem.* **16**: 424-429
- Kaplan, L. and Demain, A.L. (1970).** Nutritional studies on riboflavin overproduction by *Ashbya gossypii*. In: Recent trends in yeast research, Vol. 1, pp. 137-159, Ahearn, D.G. (Ed.), Atlanta: Georgia State Univ.
- Kastanos, E.K., Woldman, Y.Y. und Appling, D. (1997).** Role of mitochondrial and cytoplasmatic serine hydroxymethyltransferase isoenzymes in de novo purine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **36**: 14956-14964
- Kataoka, M., Wada, M., Nishi, K., Yamada, H. und Shimizu, S. (1997).** Purification and characterization of L-allo-threonine aldolase of *Aeromonas jandaei* DK-39. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**: 245-248
- Kielkopf, C.L. und Burley, S.K. (2002).** X-ray structures of threonine aldolase complexes : structural basis of substrate recognition. *Biochemistry* **41**: 11711-11720
- Kikuchi, G. (1973).** The glycine cleavage system: composition, reaction mechanism and physiological significance. *Molecular und Cellular Biochemistry* **1(2)**: 266-292
- Klionsky, D.J., Herman, P.K. und Emr, S.D. (1990).** The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* **54**: 266-292
- Koizumi, S., Yonetani, Y., Maruyama, A. und Teshiba, S. (2000).** Production of riboflavin by metabolically engineered *Corynebacterium ammoniagenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 674-679
- Kumagai, H., Nagatae, T., Yoshida, H. und Yamada, H. (1972).** Threonine aldolase from *Candida humicola*: purification, crystallization and properties. *Biochim. Biophys. Acta* **258**: 779-790
- Kurth, J.H., Bowcock, A.M., Erlich, H.A. und Cavallisforza, L.L. (1992).** HLA-DQa allelic frequencies detected with PCR in a variety of human populations. *Gene Geogr.* **6(3)**: 175-183
- Kurtzmann, C.P. (1995).** Relationships among the genera *Ashbya*, *Eremothecium*, *Holleya* and *Nematospora* determined from rDNA sequence divergence. *J. Indust. Microbiol.* **14**: 523-530
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lago, B.D. und Kaplan, L. (1981).** Vitamin fermentations: B₂ and B₁₂. *Adv. Biotechnol.* **3**: 241-246
- Liébecq, C. (Ed.) (1978).** Biochemical nomenclature and related documents, International Union for Biochemistry, The Biochemical Society, London

- Lipman, F. und Tuttle, L.C. (1945).** A specific micromethod for the determination of acyl phosphates. *J. Biol. Chem.* **159**: 21-28
- Liu, J.-Q., Dairi, T., Itoh, N., Kataoka, M., Shimizu, S. und Yamada, H. (1998).** Gene cloning, biochemical characterization and physiological role of a thermostable low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **225**: 220-226
- Liu, J.-Q., Dairi, T., Itoh, N., Kataoka, M., Shimizu, S. und Yamada, H. (1997).** L-allo-Threonine Aldolase from *Aeromonas jandaei* DK-39: gene cloning, nucleotide sequencing, and identification of the pyridoxal 5'-phosphate-binding lysine residue by site-directed mutagenesis. *J. Bacteriol.* **179(11)**: 3555-3560
- Liu, J.-Q., Ito, S., Dairi, T., Itoh, N., Kataoka, M., Shimizu, S. und Yamada, H. (1998).** Gene cloning, nucleotide sequencing, and purification and characterization of the low-specific L-threonine aldolase from *Pseudomonas sp.* strain NCIMB 10558. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 549-554
- Liu, J.-Q., Nagata, S., Dairi, T., Misono, H., Shimizu, S. und Yamada, H. (1997).** The *GLY1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a low-specific L-threonine aldolase that catalyzes cleavage of L-allo-threonine and L-threonine to glycine. *Eur. J. Biochem.* **245**: 289-293
- Maeting, I. , Schmidt, G., Sahm, H., Revuelta, J.L., Stierhof, Y.-D., und Stahmann, K.-P. (1999).** Isocitrate lyase of *Ashbya gossypii* – transcriptional regulation and peroxisomal localization. *FEBS Lett.* **444**: 15-21
- Martin-Rendon, E., Farfán, M.J., Ramos, C. und Calderon, I.L. (1993).** Isolation of a mutant allele that deregulates the threonine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **24**: 465-471
- Masuda, T., Sakamoto, M., Nishizaki, I., Hayashi, H., Yamamoto, M. und Wada, H. (1987).** Affinity purification and characterization of serine hydroxymethyltransferases from rat liver. *J. Biochem. (Tokyo)* **101(3)**: 643-652
- Matthews, R.G., Drummond, J.T. und Webb, H.K. (1998).** Cobalamin-dependent methionine synthase and serine hydroxymethyltransferase: targets for chemotherapeutic intervention? *Advan. Enzyme Regul.* **38**: 377-392
- McClung, C.R., Davis, C.R., Page, K.M. und Denome, S.A. (1992).** Characterization of the formate (for) locus, which encodes serine hydroxymethyltransferase of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 1412-1421
- McClung, C.R., Hsu, M., Painter, J.E., Gagne, J.M., Karlsberg, S.D. und Salomé, P.A. (2000).** Integrated temporal regulation of the photorespiratory pathway. Circadian regulation of two *Arabidopsis* genes encoding serine hydroxymethyltransferase. *Plant Physiol.* **123**: 381-391
- McNeil, J.B., Flynn, J., Tsao, N., Monschau, N., Stahmann, K.-P., Haynes, R.H., McIntosh, E.M. und Pearlman, R.E. (2000).** Glycine metabolism in *Candida albicans*: characterization of the serine hydroxymethyltransferase (*SHM1*, *SHM2*) and threonine aldolase (*GLY1*) genes. *Yeast* **16**, 167-175
- McNeil, J.B., McIntosh, E.M., Taylor, B.V., Zhang, F.-R., Tang, S. und Bognar, A.L. (1994).** Cloning and molecular characterization of three Genes, including two genes encoding serine hydroxymethyltransferases, whose inactivation is required to render yeast auxotrophic for glycine. *J. Biol. Chem.* **269**: 9155-9165

- Melcher, K. und Entian, K.-D. (1992).** Genetic analysis of serine biosynthesis and glucose repression in yeast. *Curr. Genet.* **21**: 295-300
- Messenguy, F., Colin, D. und ten Have, J. (1980).** Regulation of compartmentation of amino pools in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on metabolic control. *Eur. J. Biochem.* **108**: 439-447
- Messner, R., Prillinger, H., Ibl, M. und Himmler, G. (1995).** Sequence of ribosomal genes and internal transcribed spacers move three plant parasitic fungi, *Eremothecium ashbyi*, *Ashbya gossypii* and *Nematospora coryli*, towards *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **41**: 31-42
- Michalik, J. und Raczynska-Bojanowska, K. (1976).** Aspartate kinase in *Candida tropicalis*. *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.* **24**: 309-312
- Mironov, V.N., Chikindas, M.L., Kraev, A.S., Stepanov, A.I. und Skryabin, K.G. (1990).** Operon organization of genes of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Dok. Akad. Nauk SSSR* **312**: 237-240
- Monschau, N. (1998).** Untersuchungen zur Biosynthese von Glycin als Vorstufe von Riboflavin in *Ashbya gossypii*. Dissertation der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Monschau, N., Sahm, H., Stahmann, K.-P. (1998).** Threonine aldolase overexpression plus threonine supplementation enhanced riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Appl. Env. Microbiol.* **64**(11): 4283-4290
- Monschau, N., Stahmann, K.-P., Sahm, H., McNeil, J.B. und Bognar, A.L. (1997).** Identification of *Saccharomyces cerevisiae* GLY1 as a threonine aldolase: a key enzyme in glycine biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters* **150**: 55-60
- Mouillon, J.-M., Aubert, S., Bourguignon, J., Gout, E., Douce, R. und Rébeillé, F. (1999).** Glycine and serine catabolism in non-photosynthetic higher plant cells: their role in C1 metabolism. *Plant J.* **20**(2): 197-205
- Nakada, H.I. (1964).** Glutamic-glycine transaminase from rat liver. *J. Biol. Chem.* **239**: 468-471
- Nakamura, K.D., Trewyn, R.W. und Parks, L.W. (1973).** Purification and characterization of serine transhydroxymethylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta* **327**: 328-335
- Neupert, W. (1997).** Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 863-917
- Niederberger, P. (1989).** Microorganisms in our food: yesterday, today and tomorrow. *Soz. Präventivmed* **34**(2):53-7
- Noguchi, T. und Takada, Y. (1978).** Purification and properties of peroxisomal pyruvate (glyoxylate) aminotransferase from rat liver. *Biochem. J.* **175**(2):765-8
- O'Connor, M.L. und Hanson, R.S. (1975).** Serine transhydroxymethylase isoenzymes from a facultative methylotroph. *J. Bacteriol.* **124**(2): 985-996
- Ogawa, H., Gomi, T. und Fujioka, M. (2000).** Serine hydroxymethyltransferase and threonine aldolase: are they identical? *Int. J. Biochem. Cell Biol* **32**: 289-301

- Ogur, M., Liu, T.N., Cheung, I., Paulavicius, I., Walesm, W., Mehnert, D. und Blaise, D. (1977).** "Active" one-carbon generation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **129**: 926-933
- Oliver, D.J., Neuberger, M., Bourgignon, J. und Douce, R. (1990b).** Glycine metybolism in plant mitochondria. *Physiol. Plant.* **80**: 487-491
- Omura, T. (1998).** Mitochondria-targeting sequence, a multi-role sorting sequence recognized at all steps of protein import into mitochondria. *J. Biochem.* **123**: 1010-1016
- Özbas, T. und Kutsal, T. (1986).** Comparative study of riboflavin production from two microorganisms: *Eremothecium ashbyi* and *Ashbya gossypii*. *Enzyme Microb. Technol.* **8**: 593-596
- Pagani, R., Leoncini, R., Terzuoli, L., Chen, J., Pizzichini, M., Marinello, E. (1991).** DL-allo-threonine aldolase in rat liver. *Biochem. Soc. Trans.* **19**: 346-347
- Pascarella, S., Schirch, V. und Bossa, F. (1993).** Similarity between serine hydroxymethyl-transferase and other pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *FEBS Letters* **331(1-2)**: 145-149
- Pasternack, L.B., Laude, D.A. und Appling, D.R. (1992).** ¹³C NMR detection of folate-mediated serine and glycine synthesis in vivo in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **31**: 8713-8719
- Paszkowski, A. und Niedzielska, A. (1989).** Glutamate:glyoxylate aminotransferase from the seedlings of rye (*Secale cereale* L.). *Acta Biochimica Polonica* **36**: 17-29
- Perkins, J.B., Sloma, A., Hermann, T., Theriault, K., Zachgo, E., Erdenberger, T. und Hannet, N. (1999).** Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 8-18
- Pfefferle, W., Möckel, B., Bathe, B. und Marx, A. (2003).** Biotechnological manufacture of lysine. *Adv. Biochem. Engineering/Biotechnology* **79**: 59-112
- Pfendner, W. und Pizer, L.I. (1980).** The metabolism of serine and glycine in mutant lines of chinese hamster ovary cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **200(2)**: 503-512
- Piper, M.D., Hong, S.-P., Ball, G.E. und Dawes, I.W. (2000).** Regulation of the balance of one-carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275(40)**: 30987-30995
- Pizer, L.I. (1964).** Enzymology and regulation of serine biosynthesis in cultured human cells. *J. Biol. Chem.* **239**: 4219-4226
- Plaut, G.W.E. (1954).** Biosynthesis of riboflavin – incorporation of ¹⁴C-labelled compounds into rings B and C. *J. Biol. Chem.* **208**: 513-520
- Pridham, T.G. und Raper, K.B. (1950).** *Ashbya gossypii* – its significance in nature and in the laboratory. *Mycologia* **42**: 603-623
- Prillinger, H., Schweigkofler, W., Breitenbach, M., Briza, M., Staudacher, F., Lopandic, K., Molnar, O., Weigang, F., Ibi, M. und Ellinger, A. (1997).** Phytopathogenic filamentous (*Ashbya gossypii*, *Eremothecium*) and dimorphic fungi (*Holleya*, *Nematosporea*) with needle-shaped ascospores as new members within the Saccharomycetaceae. *Yeast* **13**: 945-960

- Rafalski, J.A. und Falco, S.C. (1988).** Structure of the yeast *HOM3* gene which encodes aspartokinase. *J. Biol. Chem.* **263**: 2146-2151
- Ramos, C. und Calderon, I.L. (1992).** Overproduction of threonine by *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to hydroxynorvaline. *Appl. Environ. Microbiol.* **58(5)**: 1677-1682
- Ramos, C., Delgado, M.A., und Calderon, I.L. (1991).** Inhibition by different amino acids of the aspartate kinase and the homoserine kinase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS* **278(1)**: 123-126
- Rao, N.A., Talwar, R. und Savithri, H.S. (2000).** Molecular organization, catalytic mechanism and function of serine hydroxymethyltransferase – a potential target for cancer chemotherapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**: 405-416
- Rébeillé, F. und Douse, R. (1999a).** Folate synthesis and compartmentation in higher plants. In: Regulation of primary metabolic pathway in plants (Kruger, N.J., Hill, S.A. und Ratcliff, R.G., Eds.) Dordrecht: Kluwer Academic, pp. 53-99
- Revuelta, J.L. (1998, 2000, 2001).** Persönliche Mitteilung
- Robbins, J.C. und Oxender, D.I. (1973).** Transport systems for alanine, serine, and glycine in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **116**: 12-18
- Rognes, S.E., Dewaele, E., Aas, S.F., Jacobs, M. und Frankard, V. (2003).** Transcriptional and biochemical regulation of a novel *Arabidopsis thaliana* bifunctional aspartate kinase-homoserine-dehydrogenase gene isolated by functional complementation of a yeast *hom6* mutant. *Plant Mol. Biol.* **51**: 281-294
- Rosner, A. und Paulus, H. (1971).** Regulation of aspartokinase in *Bacillus subtilis*. The separation and properties of two isofunctional enzymes. *J. Biol. Chem.* **246**: 2965-2971
- Rowell, E.V., Snell, K., Carnie, J.A., Al-Tai, A.H. (1969).** Liver-L-alanine-glyoxylate and L-serine-pyruvate aminotransferase activities: an apparent association with gluconeogenesis. *Biochem. J.* **115(5)**: 1071-1073
- Ryan, M.T. und Pfanner, N. (1998).** The preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane. *Biol. Chem.* **379(3)**: 289-294
- Sakamoto, M., Masuda, T., Yanagimoto, Y., Nakano, Y., Kitaoka, S. und Tanigawa, Y. (1996).** Purification and characterization of serine hydroxymethyltransferase from mitochondria of *Euglena gracilis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60(12)**: 1941-1944
- Sakata, Y., Owada, Y., Sato, K., Kojima, K., Hisanaga, K., Shinka, T., Suzuki, Y., Aoki, Y., Satoh, J., Kondo, H., Matsubara, Y. und Kure, S. (2001).** Structure and expression of the glycine cleavage system in rat central nervous system. *Mol. Brain Res.* **94**: 119-130
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Santos, M.A., Jimenez, A. und Revuelta, J.L. (2000).** Molecular characterization of *FMN1*, the structural gene for the monofunctional flavokinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**: 28618-28624
- Schirch, D., Delle Fratte, S., Iurescias, S., Angelaccio, S., Contestabile, R., Bossa, F. und Schirch, V. (1993).** Function of the active-site lysine in *Escherichia coli* serine hydroxymethyltransferase. *J. Biol. Chem.* **268(31)**: 23132-23138

Schirch, V. (1982). Serine hydroxymethyltransferase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **53**: 83-112

Schirch, V. (1984). Folates in glycine and serine metabolism. In: *Folates and Pterins*, Vol.1 (Blakley, R.L. und Benkovic, S.J., Eds.). New York: Wiley Interscience, pp. 399-431

Schirch, V. und Gross, T. (1968). Serine transhydroxymethylase: identification as the threonine and allothreonine aldolase. *J. Biol. Chem.* **243**: 5651-5655

Schirch, V., Shostak, K., Zamora, M. und Gautam-Basak, M. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**: 759-764

Schirch, V., Tatum, C.M. Jr. und Benkovic, S.J. (1977). Serine transhydroxymethylase: evidence for a sequential random mechanism. *Biochemistry* **16**(3): 401-409

Schlösser, T. (2002). Molekularbiologische Untersuchungen zur Regulation der an der Riboflavinbiosynthese beteiligten Gene bei *Ashbya gossypii*. Dissertation der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Schlösser, T., Schmidt, G. und Stahmann, K.-P. (2001). Transcriptional regulation of 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *Microbiology* **147**: 3377-3386

Schlüpen, C. (2000). Biosynthese von Glycin in *Ashbya gossypii* – Lokalisation von Enzymen in der Zelle und Bestimmung ihrer Bedeutung für den Stofffluss. Diplomarbeit der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Schlüpen, C., Santos, M.A., Weber, U., deGraaf, A., Revuelta, J.L. und Stahmann, K.-P. (2003). Disruption of the *SHM2* gene, encoding one of two serine hydroxymethyltransferase isoenzymes, reduces the flux from glycine to serine in *Ashbya gossypii*. *Biochem. J.* **369**: 263-273

Schmidt, G., Stahmann, K.-P., Kaesler, B. und Sahm, H. (1996). Correlation of isocitrate lyase activity and riboflavin formation in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *Microbiology* **142**: 419-426

Seibold, M., Nill, K. und Poralla, K. (1981). Homoserine and threonine pools of borrelidin resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutants with altered aspartokinase. *Arch. Microbiol.* **129**: 368-370

Shavlovskii, G.M., Fedorovich, D.V., Logvinenko, E.M. und Koltun, L.V. (1985). Isolation and characterization of flavinogenic strains of *Pichia guilliermondii* carrying the regulatory mutation *rib80* (*ribR*). *Microbiology* **54**(2): 731-737

Sherman, F., Fink, G.R. und Hicks, J.B. (1986). Laboratory course manual for methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory

Simic, P., Sahm, H. und Eggeling, L. (2001). L-Threonine export: use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **183** : 5317-5324

Simic, P., Willuhn, J., Sahm, H. und Eggeling, L. (2002). Identification of *glyA* (encoding serine hydroxymethyltransferase) and its use together with the exporter ThrE to increase L-threonine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(7): 3321-3327

- Sinclair, D.A. und Dawes, I.W. (1995).** Genetics of the synthesis of serine from glycine and the utilization of glycine as sole nitrogen source by *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **140**: 1213-1222
- Smith, I.K. (1985).** Aminotransferases utilizing glyoxylate. In: Transaminases, pp. 390-395, Christen, P. und Metzler, D.E. (Eds.), John Wiley und Sons, New York
- Smith, L. (1955).** Cytochromes a, a₁, a₂ and a₃. *Methods Enzymol.* **II**: 732-740
- Snell K., Baumann, U., Byrne, P., Chave, K.J., Renwick, S.B., Sanders, P. und Whitehouse, S.K. (2000).** The genetic organization and protein crystallographic structure of human serine hydroxymethyltransferase. *Advan. Enzyme Regul.* **40**: 353-403
- Snell, K., Natsumeda, Y., Eble, J.N., Glover, J.L. und Weber, G. (1988).** Enzymic imbalance in serine metabolism in human colon carcinoma and rat sarcoma. *Br. J. Cancer* **57**: 87-90
- Southern, E.M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517
- Stadtman, E.R., Cohen, G.N., LeBras, G. und de Robichon-Szulmajster, H. (1961).** Feed-back inhibition and repression of aspartokinase activity in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **236**(7): 2033-2038
- Stahmann, K.-P., Arst, H.N. Jr, Althöfer, H., Revuelta, J.L., Monschau, N., Schlüpen, C., Gätgens, C., Wiesenburg, A. und Schlösser, T. (2001).** Riboflavin, overproduced during sporulation of *Ashbya gossypii*, protects its hyaline spores against ultraviolet light. *Environ. Microbiol.* **3**: 545-550
- Stahmann, K.-P., Kupp, C., Feldmann, S.D. und Sahm, H. (1994).** Formation and degradation of lipid bodies found in the riboflavin-producing fungus *Ashbya gossypii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 121-127
- Stahmann, K.-P., Revuelta, J.L. und Seulberger, H. (2000).** Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 509-516
- Stauffer, G.V. und Brenchley, J.E. (1974).** Evidence for the involvement of serine transhydroxymethylase in serine and glycine interconversions in *Salmonella typhimurium*. *Genetics* **77**: 185-198
- Stauffer, L.T., Ghrist, A. und Stauffer, G.V. (1993).** The *Escherichia coli* *gcvT* gene encoding the T-protein of the glycine cleavage enzyme system. *DNA Sequence* **3**: 339-346
- Steiner, S. (1991).** Expressionsstudien im filamentösen Pilz *Ashbya gossypii* unter Verwendung von Signalsequenzen des *TEF*-Gens. Dissertation der Universität Gießen.
- Steiner, S. und Philippsen, P. (1994).** Sequence and promotor analysis of the highly expressed *TEF* gene of the filamentous fungi *Ashbya gossypii*. *Mol. Gen. Genet.* **242**: 263-271
- Steiner, S., Wendland, J., Wright, M.C. und Philippsen, P. (1995).** Homologous recombination as the main mechanism for DNA integration and cause of rearrangements in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*. *Genetics* **140**: 973-987

Sternson, L.A., Stobaugh, J.F. und Repta, A.J. (1984). Rational design and evaluation of improved o-phthalaldehyde-like fluorogenic reagents. *Anal. Biochem.* **144**: 233-246

Stover, P. und Schirch, V. (1991). Serine hydroxymethyltransferase catalyzes the hydrolysis of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-formyltetrahydrofolate. *J. Biol. Chem.* **266**: 1543-1550

Stover, P. und Schirch, V. (1993). The metabolic role of leucovorin. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 102-106

Stover, P.J., Chen, L.H., Suh, J.R., Stover, D.M., Keyomarsi, K. und Shane, B. (1997). Molecular cloning, characterization, and regulation of the human mitochondrial serine hydroxymethyltransferase gene. *J. Biol. Chem.* **272**(3): 1842-1848

Sukanya, N., Vijaya, M., Savithri, H.S., Radhakrishnan, A.N. und Rao, N.A. (1991). Serine hydroxymethyltransferase from mung bean (*Vigna radiata*) is not a pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme. *Plant Physiol.* **95**: 351-357

Szebenyi, D.M.E., Liu, X., Kriksunov, I.A., Stover, P.J. und Thiel, D.J. (2000). Structure of a murine cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase quinoid ternary complex: evidence for asymmetric obligate dimers. *Biochemistry* **39**: 13313-13323

Takada, Y. und Noguchi, T. (1985). Characteristics of alanine:glyoxylate aminotransferase from *Saccharomyces cerevisiae*, a regulatory enzyme in the glyoxylate pathway of glycine and serine biosynthesis from tricarboxylic acid cycle intermediates. *Biochem. J.* **231**: 157-163

Taylor, R.T. und Hanna, M.L. (1982). Folate-dependent enzymes in cultured chinese hamster ovary cells: impaired mitochondrial serine hydroxymethyltransferase activity in two additional glycine – auxotroph complementation classes. *Arch. Biochem. Biophys.* **217**: 609-623

Templeton, B.A. und Savageau, M.A. (1974). Transport of biosynthetic intermediates: homoserine and threonine uptake in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **117**:1002-1009

Thornton, B. (2001). Uptake of glycine by non-mycorrhizal *Lolium perenne*. *J. Exp. Botany* **52**: 1315-1322

Truffa-Bachi, P., van Rapenbusch, R., Janin, J., Gros, C. und Cohen, G.N. (1968). The threonine-sensitive homoserine dehydrogenase and aspartokinase activities of *Escherichia coli* K12. Isolation, molecular weight, amino acid analysis and behaviour of the sulfhydryl groups of the protein catalyzing the two activities. *Eur. J. Biochem.* **5**: 73-80

Turner, S.R., Ireland, R., Morgan, C. und Rawsthorne, S. (1992). Identification and localization of multiple forms of serine hydroxymethyltransferase in pea (*Pisum sativum*) and characterization of a cDNA encoding a mitochondrial isoform. *J. Biol. Chem.* **267**(19): 13528-13534

Ulane, R. und Ogur, M. (1972). Genetic and physiological control of serine and glycine biosynthesis in *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.* **109**: 34-43

van der Rest, M.E., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B. und Konings, W.N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. *Microbiol. Rev.* **59**: 304-322

- Vandamme, E.J. (1992).** Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **53**: 313-327
- Vieira, J. und Messing, J. (1982).** The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-268
- Viola, R.E. (2001).** The central enzymes of the aspartate family of amino acid biosynthesis. *Acc. Chem. Res.* **34**: 339-349
- von Heijne, G. (1986).** Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J.* **5**(6): 1335-1342
- Voos, W., Martin, H., Krimmer, T. und Pfanner, N. (1999).** Mechanisms of protein translocation into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1422**: 235-254
- Walpole, C.S.J. und Wigglesworth, R. (1987).** Oxido-reductases – flavoenzymes. In: M.I. Page and Williams, A. (Eds.), *Enzyme mechanisms*, Belfast University Press, pp. 506-533
- Walton, N.J. und Butt, V.S. (1981).** Glutamate and serine as competing donors for amination of glyoxylate in leaf peroxisomes. *Planta* **153**: 232-237
- Wells, X.E. und Lees, E.M. (1991).** Ureidoglycolate amidohydrolase from developing French bean fruits (*Phaseolus vulgaris* [L.]). *Arch. Biochem. Biophys.* **287**(1): 151-159
- Wendisch, V. F., deGraaf, A. A. und Sahm, H. (1997).** Accurate determination of ¹³C enrichments in nonprotonated carbon atoms of isotopically enriched amino acids by ¹H nuclear magnetic resonance. *Anal. Biochem.* **245**, 196-202
- Wickerham, L.J., Flickinger, M.H. und Johnston, R.M. (1946).** The production of riboflavin by *Ashbya gossypii*. *Arch. Biochem.* **9**: 95-98
- Wiesenburg, A. (1999).** Kontinuierliche Kultivierung von *Ashbya gossypii* im Laborfermenter. Untersuchungen zu Wachstum, Regulation der Riboflavin-Produktion und Nebenproduktbildung. Diplomarbeit der Fachhochschule Jena.
- Wilson, B.J., Gray, A.C. und Matthews, B.F. (1991).** Bifunctional protein in carrot contains both aspartokinase and homoserine dehydrogenase activities. *Plant Physiol.* **97**: 1323-1328
- Winston, M.K. und Bhattacharjee, J.K. (1982).** Growth inhibition by α -amino adipate and reversal of the effect by specific amino acid supplements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **152**: 874-879
- Wipf, D., Ludewig, U., Tegeder, M., Rentsch, D., Koch, W. und Frommer, W.B. (2002).** Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *TRENDS in Biochem. Sciences* **27**: 139-147
- Woldman, Y. und Appling, D.R. (2002).** A general method for determining the contribution of split pathways in metabolite production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering* **4**: 170-181
- Wright, M. und Philippsen, P. (1991).** Replicative transformation of the filamentous fungus *Ashbya gossypii* with plasmids containing *Saccharomyces cerevisiae* ARS elements. *Gene* **109**: 99-105

Xue, H.-H., Sakaguchi, T., Fujie, M., Ogawa, H. und Ichiyama, A. (1999). Flux of the L-serine metabolism in rabbit, human, and dog livers – substantial contributions of both mitochondrial and peroxisomal serine:pyruvate/alanine:glyoxylate aminotransferase. *J. Biol. Chem.* **274(23)**: 16028-16033

Yamada, H., Gumagai, H., Nagate, T. und Yoshida, H. (1970). Crystalline threonine aldolase from *Candida humicola*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **39**: 53-58

Yoshida, T., Kikuchi, G. (1970). Major pathways of glycine and serine catabolism in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **139(2)**:380-392

Zhu-Shimoni, J.X., Lev-Yadun, S., Matthews, B. und Galili, G. (1997). Expression of an aspartate kinase homoserine dehydrogenase gene is subject to a specific spatial and temporal regulation in vegetative tissues, flowers, and developing seeds. *Plant Physiol.* **113**: 695-706

Zubay, G. (1973). In vitro synthesis of protein in microbial systems. *Annu. Rev. Genet.* **7**:267-287

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, seine großzügige Unterstützung sowie sein fortwährendes Interesse an meiner Arbeit.

Herrn PD. Dr. R. Kölling-Paternoga danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.-Peter Stahmann für sein Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit. Seine ständige Diskussionsbereitschaft sowie seine konstruktive Kritik haben mir das Arbeiten sehr erleichtert und zudem für ein gutes Arbeitsklima gesorgt.

Den Pilzköpfen Thomas Dickhaus, Cornelia Gätgens, Ines Maeting, Sonja Meyer zu Berstenhorst, Susanne Nieland, Thomas Schlösser und Ulrike Weber danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die netten Runden nach Feierabend.

Bei den Kooperationspartnern der BASF AG sowie Universität Salamanca, Dr. H. Althöfer, Dr. C. Bollschweiler und Dr. M. Karos sowie Prof. Dr. J. L. Revuelta, bedanke ich mich für die wertvollen Hinweise und anregende Diskussion in *Ashbya*-Projekt.

Dabei möchte ich mich noch einmal besonders bei Prof. Dr. J. L. Revuelta für den sechs-wöchigen Aufenthalt in seinem Labor im schönen Salamanca bedanken.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die freundliche Aufnahme und das gute Arbeitsklima.

Frau K. Bräker danke ich für ihre professionelle fotografische Arbeit.

Ein besonderes Dankeschön gilt meiner Familie und meinem Freund Oliver, die mich mit viel Verständnis und Geduld während dieser Zeit aufgemuntert und so wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4093
Oktober 2003
ISSN 0944-2952