

**Ein neuer Syntheseweg für wertvolle Fettsäuren  
in *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Mareike Hoffmann**  
aus  
Wolfenbüttel

Göttingen 2008

D7

Referent : Prof. Dr. Ivo Feußner

Korreferent : Prof. Dr. Oliver Einsle

Tag der mündlichen Prüfung: : 29.04.2009

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Membranen und ihre Bedeutung für die Funktion lebender Zellen .....	1
1.2	Lipide und Fettsäuren .....	2
1.3	Sehr langkettige, mehrfach-ungesättigte $\omega$ 6- und $\omega$ 3-Fettsäuren.....	6
1.3.1	$\omega$ 6- und $\omega$ 3-Fettsäuren als essentielle Fettsäuren.....	6
1.3.2	Funktionen von $\omega$ 6- und $\omega$ 3-VLCPUFAs im menschlichen Stoffwechsel .....	7
1.3.3	Quellen von VLCPUFAs für den menschlichen Verbrauch.....	8
1.3.4	Ansätze zur Erschließung neuer $\omega$ 3-VLCPUFA-Quellen .....	9
1.4	Biosynthese von Fettsäuren und Lipiden.....	9
1.5	Biosynthese von VLCPUFAs .....	13
1.6	Die Enzyme der VLCPUFA-Biosynthese .....	17
1.6.1	Elongasen.....	17
1.6.2	Desaturasen: Hintergrund, Topologie und Substratspezifität.....	17
1.6.3	Die Topologie membrangebundener Desaturasen.....	20
1.6.4	Die Substratdichotomie der Desaturasen.....	23
1.7	Status der VLCPUFA-Produktion in Pflanzen .....	24
1.8	Zielsetzung der Arbeit .....	27
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterial .....	28
2.2	Chemikalien.....	29
2.3	Fettsäure- und Lipidstandards.....	29
2.4	Enzyme .....	29
2.4.1	Restriktionsenzyme.....	29
2.4.2	Sonstige Enzyme und Kits.....	29
2.5	Vektoren .....	30
2.6	Organismen.....	31
2.6.1	Bakterienstämme .....	31
2.6.2	Hefe.....	31
2.6.3	Algenstämme .....	32
2.6.4	Pflanzen .....	32

2.7	Kulturmedien .....	32
2.7.1	Bakterienmedien .....	32
2.7.2	Hefemedien .....	33
2.7.3	Algenmedien .....	33
2.8	Medienzusätze .....	34
2.9	Wachstumsbedingungen der Pflanzen .....	35
2.10	Präparation von RNA und DNA aus biologischen Proben .....	35
2.10.1	Isolierung von RNA aus Algen .....	35
2.10.2	Isolierung von genomischer DNA aus Algen .....	36
2.10.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	36
2.10.4	Reinigung und Präzipitation von DNA/RNA .....	36
2.11	Elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA .....	37
2.11.1	Auftrennung von DNA in Agarosegelen .....	37
2.11.2	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA .....	37
2.12	Amplifikation von DNA-Fragmenten durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	38
2.12.1	Standard-PCR .....	38
2.12.2	cDNA-Synthese und Reverse Transkriptase-PCR .....	39
2.12.3	Kolonie-PCR .....	39
2.12.4	5'-und 3'-RACE-PCR .....	39
2.12.5	Fusions-PCR (Overlap-PCR) .....	40
2.12.6	DNA-Sequenzanalyse .....	40
2.13	Klonierungsmethoden .....	41
2.13.1	Restriktion von Plasmid-DNA und genomischer DNA .....	41
2.13.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	41
2.13.3	Behandlung von Plasmid-DNA mit Alkalischer Phosphatase .....	41
2.13.4	Ligation .....	41
2.14	Transformation von <i>E. coli</i> .....	42
2.14.1	Präparation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	42
2.14.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	42
2.15	Transformation von <i>A. tumefaciens</i> .....	43
2.15.1	Präparation chemisch-kompetenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen .....	43
2.15.2	Transformation kompetenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen .....	43
2.16	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	43
2.16.1	Transformation chemisch-kompetenter Hefezellen (PEG-Methode) .....	44

2.17	Transformation von Pflanzen .....	44
2.17.1	Transformation von <i>A. thaliana</i> durch <i>A. tumefaciens</i> .....	44
2.18	Computergestützte Datenbankvergleiche, Sequenz- und Hydropathieanalysen .....	45
2.19	Erzeugung der verwendeten cDNA-Klone .....	45
2.19.1	Isolierung und Klonierung von <i>MsI</i> und <i>MsII</i> aus <i>Mantoniella squamata</i> .....	45
2.19.2	Klonierung von <i>OtII</i> aus <i>O. tauri</i> .....	46
2.20	Strategien zur Klonierung rekombinanter Plasmide .....	47
2.20.1	Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression von <i>MsI</i> und <i>MsII</i> in Hefe ....	47
2.20.2	Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression von <i>MsΔ6</i> und <i>MsΔ5</i> zusammen mit PSE1 in Pflanzen .....	48
2.20.3	cDNA-Konstrukte für den Domänen austausch .....	49
2.20.4	Herstellung des rekombinanten Plasmides für die heterologe Expression von <i>AnI</i> in Pflanzen .....	50
2.21	Heterologe Expression verschiedener cDNA-Klone in <i>S. cerevisiae</i> .....	50
2.22	Lipidanalytik .....	51
2.22.1	Isolierung von Gesamtlipiden, Lipidklassen und Lipidunterklassen aus Hefe .....	51
2.22.2	Isolierung von Gesamtlipiden und Lipidunterklassen aus <i>M. squamata</i> und <i>Arabidopsis</i> -Samen .....	52
2.22.3	Isolierung und Analyse von Fettsäuren aus Gesamtextrakten und isolierten Lipiden ..	53
2.22.4	Isolierung von Fettsäuren aus <i>Arabidopsis</i> -Samen .....	53
2.22.5	Gaschromatographie .....	53
2.22.6	Extraktion und Analyse von Acyl-CoAs .....	54
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>56</b>
3.1	Optimierung der Biosynthese von VLCPUFAs durch Etablierung eines neuen Stoffwechselweges .....	56
3.1.1	Auswahl der Spenderalgen zur Isolierung Acyl-CoA-abhängiger Desaturasen .....	56
3.1.2	Vorarbeiten zur Identifizierung von cDNA-Klonen mutmaßlicher „Front End“-Desaturasen .....	59
3.1.3	Isolierung mutmaßlich Acyl-CoA-abhängiger Desaturasen aus <i>M. squamata</i> und <i>O. tauri</i> .....	59
3.1.4	Funktionale Charakterisierung der isolierten Klone durch heterologe Expression in Hefe .....	63

3.1.5	Katalytische Effizienz von Ms $\Delta$ 6 und Ms $\Delta$ 5 im Vergleich zu bekannten Lipid- und Acyl-CoA-abhängigen Desaturasen .....	67
3.1.6	Charakterisierung der Substrate von Ms $\Delta$ 6 und Ms $\Delta$ 5: Lipidabhängige oder CoA-abhängige Desaturierung .....	71
3.1.7	Detektion der Desaturaseprodukte von Ms $\Delta$ 6 und Ms $\Delta$ 5 als Coenzym A-Ester .....	74
3.1.8	Test des biosynthetischen Zusammenspiels der <i>M. squamata</i> -Desaturasen mit Elongasen.....	78
3.1.9	Akkumulation von EPA bei CoA-abhängiger- oder lipidabhängiger Biosynthese in Hefe .....	82
3.1.10	Etablierung eines samenspezifisch exprimierten Acyl-CoA-abhängigen VLCPUFA-Biosynthesewegs in <i>Arabidopsis</i> .....	85
3.1.11	Verteilung der VLCPUFA auf verschiedene Lipidklassen der <i>Arabidopsis</i> -Samen....	91
3.2	Sequenzdeterminanten der Bifunktionalität von Desaturasen und optimierte Produktion mehrfach ungesättigter Fettsäuren durch bifunktionale Enzyme.....	93
3.2.1	Optimierung der Biosynthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren durch Expression einer bifunktionalen Desaturase .....	93
3.2.2	Computergestützte Erstellung eines Topologiemodells für membrangebundene Desaturasen und Annotierung möglicher funktionaler Domänen .....	96
3.2.3	Test der Hybridenzyme auf Bifunktionalität bei heterologer Expression in Hefe .....	100
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>103</b>
4.1	Etablierung eines Acyl-CoA-abhängigen Syntheseweges für VLCPUFAs in Hefe und <i>Arabidopsis</i> .....	103
4.1.1	Neue Enzyme aus Algen.....	103
4.1.2	Ms $\Delta$ 6 als Schrittmacherezym für die Bildung von $\omega$ 3-VLCPUFAs.....	104
4.1.3	Die neu isolierten Enzyme vermitteln Acyl-CoA-abhängige Desaturierung .....	106
4.1.4	Acyl-CoA-abhängige Synthese von VLCPUFAs: Funktionalität in Hefe und transgenen Pflanzen .....	108
4.1.5	Erhöhte VLCPUFA-Einlagerung in Speicherlipide .....	113
4.2	Bifunktionale Enzyme zur Optimierung biotechnologischer Anwendungen.....	114
4.2.1	Expression einer bifunktionalen Desaturase in <i>Arabidopsis</i> erhöht $\omega$ 3-Substrate .....	115
4.2.2	Hinreichende Determinanten der Bifunktionalität von Desaturasen.....	116
4.3	Fragen, Lösungen und neue Fragen.....	117

<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>119</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>120</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>135</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>136</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>137</b>
<b>10.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>140</b>

## 1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der biotechnologischen Produktion sehr langkettiger, mehrfach ungesättigter Fettsäuren („very long chain polyunsaturated fatty acids“, VLCPUFAs) in Pflanzen und deren Akkumulation in Samenölen. Die Gründe warum diese Art von Fettsäuren für den Menschen essentiell sind daher in Pflanzen produziert werden müssen und welche Probleme und Lösungsansätze dafür erkannt wurden, werden in dieser Einleitung beschrieben.

### 1.1 Membranen und ihre Bedeutung für die Funktion lebender Zellen

Eukaryotische Zellen und ihre Organellen sind von Membranen umschlossen. Membranen definieren die Zelle sowie die zellulären Kompartimente als getrennte Reaktionsräume, ermöglichen aber als selektive Barrieren auch einen gerichteten Austausch von Energie und Stoffwechselintermediaten zwischen Zellen und ihren Kompartimenten. Biomembranen bestehen aus Doppelschichten amphipathischer Lipide, die sich im wäßrigen Milieu des Zellinneren bilden. Dabei orientieren sich die hydrophoben Anteile zum Inneren der Membran, während sich die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide nach außen richten und so die Oberfläche der Membran bilden (Berg et al., 2003). Die Funktionen verschiedener Membranen werden maßgeblich durch die Lipidzusammensetzung und einer Vielzahl eingelagerter Proteine bestimmt. Die Lipidzusammensetzung von Membranen unterscheidet sich je nach Gewebe und in manchen Fällen sogar zwischen einzelnen Zellen innerhalb eines Gewebes. Dabei sind verschiedene Faktoren von Bedeutung, die Stabilität und Fluidität und somit die Funktionalität der Membranen beeinflussen. Ein Beispiel für die Wichtigkeit der Membranzusammensetzung ist unser Gehirn, bzw. das zentrale Nervensystem. Entwicklung und Funktion eines so komplexen Organs wie des Gehirns sind auf bestimmte Fettsäuren in den Membranen der Nervenzellen angewiesen (SanGiovanni und Chew, 2005). Eine veränderte Fettsäurezusammensetzung der Membranlipide führt zu eingeschränkter Funktionalität, die sich in schwerwiegenden Krankheitsbildern oder Entwicklungsstörungen zeigen kann, wie weiter unten noch detaillierter beschrieben wird. Obwohl pflanzliche Gewebe generell weniger komplex sind als tierische und in Pflanzen insgesamt weniger Typen von differenzierten Zellen vorkommen als in Säugern, gilt die Abhängigkeit der Membranfunktion von Lipid- und Fettsäurezusammensetzung auch für pflanzliche membranabhängige Prozesse. So wird die Fettsäurezusammensetzung der Membranen in

Pflanzen temperaturabhängig verändert, um eine optimale Fluidität der Membranen zu gewährleisten, von der dann wiederum biochemische oder biophysikalische Prozesse in den Membranen abhängen (Williams et al., 1988; Falcone et al., 2004).

Um den in dieser Arbeit gewählten praktischen Ansatz im Detail darzulegen, werden in den folgenden Abschnitten zunächst grundlegende Zusammenhänge des pflanzlichen Lipidstoffwechsels beschrieben.

## 1.2 Lipide und Fettsäuren

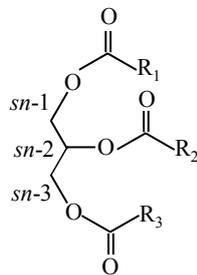
Lipide stellen neben Proteinen, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren eine wichtige Klasse organischer Moleküle dar und sind für jeden Organismus unentbehrlich. Lipide können als hydrophobe Gruppen Fettsäuren enthalten, beispielsweise in Wachsen oder Glycerolipiden. Andere Lipide wie z.B. Oxylipine oder Prostaglandine sind Fettsäurederivate. Sphingolipide enthalten neben Fettsäuren auch den langkettigen Aminoalkohol Sphingosin oder eines seiner Derivate. Andere Moleküle mit hydrophoben Eigenschaften leiten sich von Isoprenoiden ab, wie z.B. Sterole oder verschiedene Pigmente.

Die biologischen Funktionen von Lipiden sind vielfältig und Lipide dienen als Energiespeicher, Strukturkomponenten von Membranen, Schutzsubstanzen gegen Umwelteinflüsse (Post-Beittenmiller, 1996; Shepherd und Griffiths, 2006), als Signalüberträger (Wang, 2004) und als Modifikationen von Proteinen (Nadolski und Linder, 2007). Im folgenden wird speziell auf Glycerolipide eingegangen, die Aufgaben als Speichersubstanzen und in der Bildung von Membranen übernehmen.

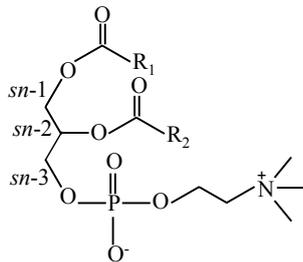
Glycerolipide bestehen aus einem Glycerin-Rückgrat, an das über Esterbindungen Fettsäuren gebunden sind. Eine Veresterung mit drei Fettsäuremolekülen an die Kohlenstoffatome C1 (*sn*-1), C2 (*sn*-2) und C3 (*sn*-3) liegt in den Triacylglycerinen (TAGs) vor, die in verschiedenen Organismen als Speichersubstanzen dienen. TAGs stellen sehr effiziente Speichersubstanzen dar, vor allem weil der Wassergehalt des Speicheröls sehr gering ist. Die Numerierung der Kohlenstoffatome des Glycerins erfolgt nach stereospezifischen Aspekten und wird daher mit *sn* für „*stereospecific numbered*“ gekennzeichnet. An der *sn*-3 Position des Glycerin-Rückgrats kann anstelle der dritten Fettsäure eine polare Kopfgruppe vorliegen (Abb. 1). Im Falle der Glycerophospholipide innerhalb der Phospholipide ist dies im einfachsten Fall Phosphorsäure, und das entsprechende Phospholipid ist Phosphatidsäure (PtdOH). An die Phosphatgruppe können dann über Esterbindungen andere Kopfgruppen wie die Aminoalkohole Cholin, Ethanolamin

oder Serin oder die Alkohole Glycerin oder Inosit geknüpft sein. Die entsprechenden Phospholipide werden Phosphatidylcholin (PtdCho), Phosphatidylethanolamin (PtdEtn), Phosphatidylserin (PtdSer), Phosphatidylglycerin (PtdGro) oder Phosphatidylinositol (PtdIns) genannt. Eine Besonderheit stellt 1,3-bis(*sn*-3'-Phosphatidyl)-*sn*-Glycerin dar, das aus zwei über ein Glycerin verknüpften Phosphatid-Einheiten besteht und nur in Prokaryoten oder Mitochondrien vorkommt und hier zur Vereinfachung mit dem Trivialnamen Cardiolipin bezeichnet wird (Frentzen und Griebau, 1994).

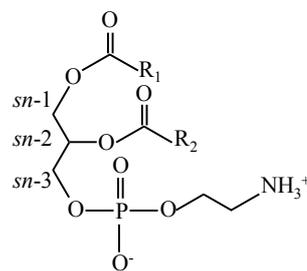
**A** Triacylycerin (TAG)



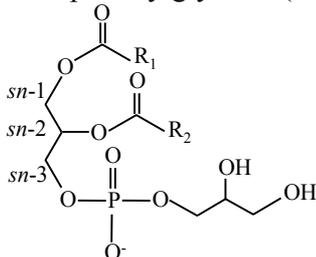
**B** Phosphatidylcholin (PtdCho)



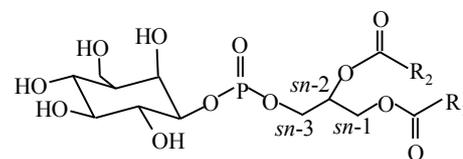
Phosphatidylethanolamin (PtdEtn)



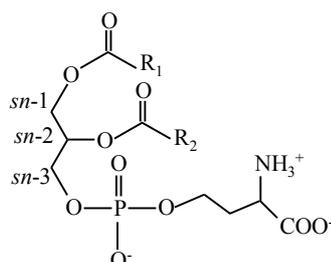
Phosphatidylglycerol (PtdGro)



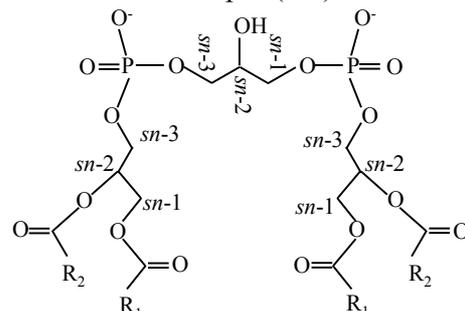
Phosphatidylinositol (PtdIns)

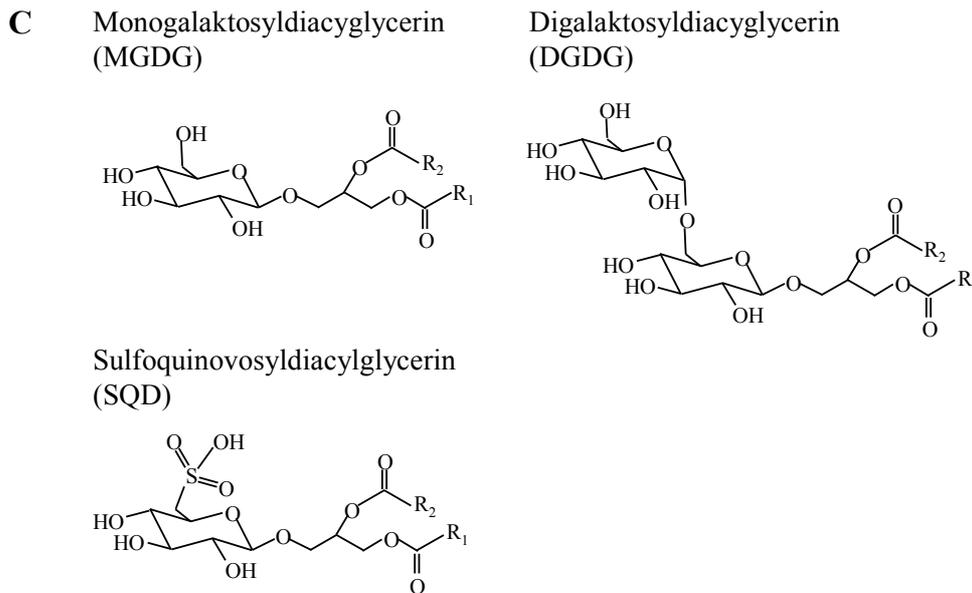


Phosphatidylserin (PtdSer)



Cardiolipin (CL)





**Abb. 1. Strukturen der häufigsten Glycerolipide.** (A) Triacylglycerin ist das Speicherlipid sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Organismen. (B) Phosphoglycerolipide dienen in den Zellen hauptsächlich als Membranbausteine, können aber auch Aufgaben in der Signalübertragung übernehmen. Cardiolipin ist ein Sonderfall innerhalb der Lipide und kommt nur in Prokaryoten oder in den Mitochondrien von Eukaryoten vor. (C) Die dargestellten Glykoglycerolipide kommen hauptsächlich in den Plastiden höherer Pflanzen oder in Cyanobakterien vor. R, Fettsäurerest.

Im Falle der Glykoglycerolipide (Glykolipide) besteht die polare Kopfgruppe der *sn*-3-Position aus Mono-, Di- oder Oligosacchariden. Die häufigsten Glykolipide höherer Pflanzen sind Monogalaktosyldiacylglycerin (MGDG), Digalaktosyldiacylglycerin (DGDG) und Sulfoquinovosyldiacylglycerin (SQD) (Abb. 1).

Trotz der relativ geringen Anzahl an verschiedenen Kopfgruppen existiert eine sehr große Anzahl an verschiedenen Glycerophospholipiden und -glykolipiden, bedingt durch die große Zahl verschiedener Fettsäurereste, die sich sowohl in Kettenlänge als auch in der Anzahl und Position der Doppelbindungen unterscheiden können.

Die hydrophoben Eigenschaften der Glycerolipide werden durch die assoziierten Fettsäuren bedingt. Die häufigsten natürlich vorkommenden Fettsäuren sind unverzweigte, gesättigte oder ungesättigte, aliphatische Monocarbonsäuren, die eine gerade Anzahl von Kohlenstoffatomen besitzen. Die Einteilung von Fettsäuren kann nach ihrer Kettenlänge sowie der Anwesenheit, Anzahl und Position von Doppelbindungen erfolgen. Fettsäuren mit 6 - 10 Kohlenstoffatomen werden oft als kurzkettig, mit 12 - 14 Kohlenstoffatomen als mittelkettig, mit 16 - 18 Kohlenstoffatomen als langkettig, und mit über 18 Kohlenstoffatomen als sehr langkettig bezeichnet. Fettsäuren ohne Doppelbindungen sind

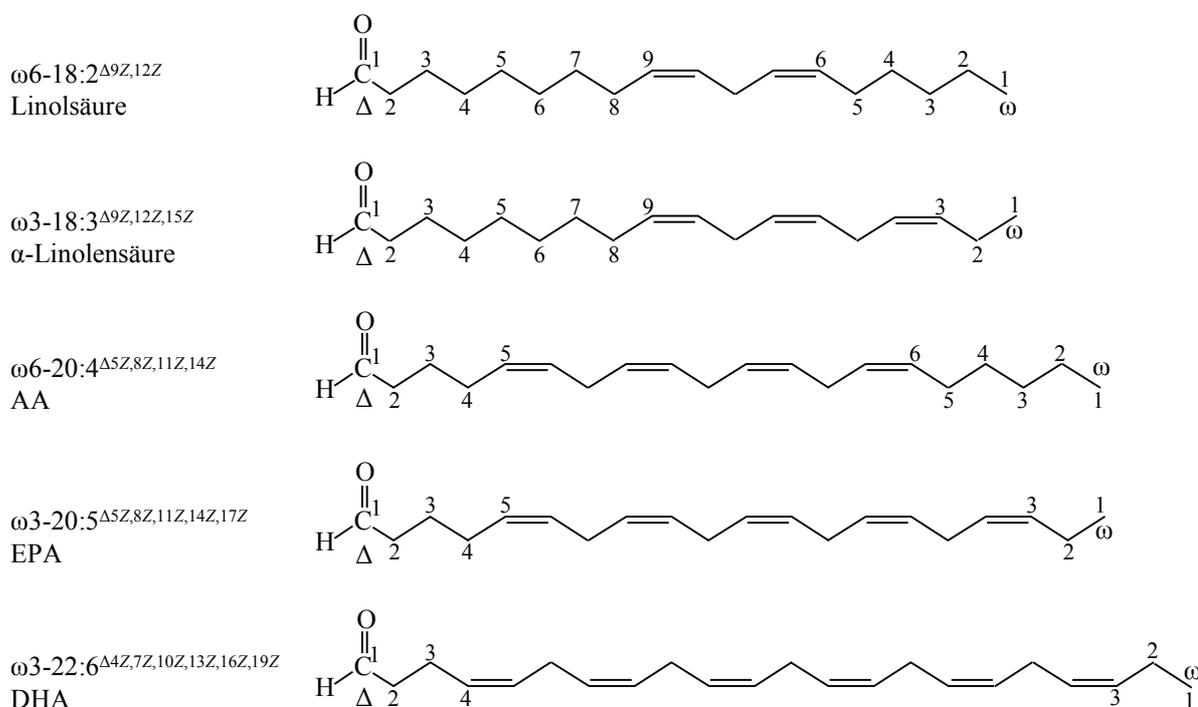
„gesättigt“ und durch die „Absättigung“ der C-Atome mit Wasserstoffatomen gegenüber Sauerstoff stabil. Ungesättigte Fettsäuren hingegen besitzen Doppelbindungen in der Kohlenwasserstoffkette, was zu einem reduzierten Grad ihrer Wasserstoffabsättigung führt. Die Doppelbindungen der meisten biologisch relevanten ungesättigten Fettsäuren liegen in *cis*-Konfiguration vor, was in der Fettsäurebezeichnung durch ein *Z* angegeben wird. Ungesättigte Fettsäuren sind damit eher der chemischen Oxidation durch Sauerstoff ausgesetzt als gesättigte. Durch die Doppelbindung(en) wird die intramolekulare Rotationsfähigkeit des Fettsäuremoleküls eingeschränkt, was zu einer verminderten Van der Waal Interaktion zwischen benachbarten Fettsäuremolekülen bzw. Lipidmolekülen führt. Wegen der erniedrigten Interaktionsfähigkeit ungesättigter Fettsäuren ändert sich ihr Schmelzpunkt. Ungesättigte Fettsäuren haben daher einen niedrigeren Schmelzpunkt als die entsprechenden gesättigten Fettsäuren (Berg et al., 2003).

Ungesättigte Fettsäuren werden zunächst nach der Anzahl der Doppelbindungen unterschieden. Fettsäuren mit einer Doppelbindung werden als mono-ungesättigte Fettsäuren bezeichnet; ein verbreitetes Beispiel ist Ölsäure, 18:1<sup>Δ9</sup>. Die Abkürzung 18:1<sup>Δ9</sup> gibt die Anzahl der Kohlenstoffatome der Fettsäurekette und die Anzahl und Position der Doppelbindung an. Die Position der Doppelbindung wird dabei durch eine hochgestellte Zahl und den griechischen Buchstaben Delta (Δ) bezeichnet. Die in diesem Fall angewandte Delta-Nomenklatur richtet sich nach dem Abstand der Doppelbindung vom Carboxylende. Eine andere Nomenklatur ist die Omega (ω)-Nomenklatur, die sich bei der Beschreibung der Position der ersten Doppelbindung in der Fettsäurekette auf das Methylende der Fettsäure bezieht.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids*, „PUFA“) und sehr langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*very long chain polyunsaturated fatty acids*, „VLCPUFA“) enthalten mindestens zwei und bis zu acht methylenunterbrochene Doppelbindungen (Mansour, 2005). Beispiele für PUFAs sind Linolsäure (18:2<sup>Δ9,12</sup>), γ- und α-Linolensäure (18:3<sup>Δ6,9,12</sup> und 18:3<sup>Δ9,12,15</sup>) und für VLCPUFAs Arachidonsäure (20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup>, AA), Eicosapentaensäure (20:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup>, EPA) und Docosahexaensäure, 22:6<sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup>, DHA) (Abb. 2).

### 1.3 Sehr langkettige, mehrfach-ungesättigte $\omega$ 6- und $\omega$ 3-Fettsäuren

Nach der Position ihrer jeweilig ersten Doppelbindung vom Methylende werden aus PUFAs und VLCPUFAs in  $\omega$ 6- und  $\omega$ 3-Fettsäuren eingeteilt (siehe Abb. 2). Ernährungsphysiologisch sind diese Fettsäuren sehr wichtig und übernehmen im menschlichen Körper eine Vielzahl an Aufgaben, wobei der Unterschied in der Lage der Doppelbindungen zwischen den  $\omega$ 6- und  $\omega$ 3-Fettsäuren zu unterschiedlichen und oft sogar gegensätzlichen Aufgaben führt. In dieser Arbeit wird zum besseren Verständnis entscheidender Passagen der Fettsäurebezeichnung ein „ $\omega$ 3“ oder „ $\omega$ 6“ vorangestellt.



**Abb. 2. Beispiele für PUFAs und VLCPUFAs.** Die Zahlen bezeichnen die Kohlenstoffatome vom Carboxyl- oder Methylende aus bis zur ersten Doppelbindung und markieren so das C-Atom für die  $\Delta$ - und die  $\omega$ -Nomenklatur.

#### 1.3.1 $\omega$ 6- und $\omega$ 3-Fettsäuren als essentielle Fettsäuren

Sowohl  $\omega$ 6- als auch  $\omega$ 3-VLCPUFAs sind für Säuretiere lebensnotwendig, wobei Linolensäure und  $\alpha$ -Linolensäure die jeweiligen Ausgangssubstrate für die Synthese der komplexeren  $\omega$ 6- und  $\omega$ 3-Fettsäuren darstellen. Da Säugetiere keine  $\Delta$ 12- oder  $\Delta$ 15-

Desaturasen besitzen, welche die Umwandlung von Ölsäure ( $18:1^{\Delta 9}$ ) zu Linolsäure ( $\omega 6-18:2^{\Delta 9,12}$ ) und weiter in  $\alpha$ -Linolensäure ( $\omega 3-18:3^{\Delta 9,12,15}$ ) katalysieren, sind Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure für Säugetiere essentielle Nahrungsbestandteile (Goyens et al., 2006). Die enzymatische Umwandlung der essentiellen  $\omega 6$ - und  $\omega 3$ -Intermediate zu den  $\omega 6$ - und  $\omega 3$ -C20/C22-VLCPUFA kann dann prinzipiell durch körpereigene Enzyme erfolgen. Die Effektivität dieses VLCPUFA-Synthesewegs durch die vorhandenen Enzymaktivitäten ist in Säugern allerdings eingeschränkt (Gerster, 1998; Pawlosky et al., 2001; Brenna, 2002). Ernährungswissenschaftler empfehlen ein Verhältnis der essentiellen Fettsäuren Linolsäure ( $\omega 6-18:2^{\Delta 9,12}$ ) zu  $\alpha$ -Linolensäure ( $\omega 3-18:3^{\Delta 9,12,15}$ ) in der Nahrung von 1:1. Die momentanen Ernährungsgewohnheiten in den westlichen Industrieländern verschieben das Verhältnis zwischen  $\omega 6$ - und  $\omega 3$ -Fettsäuren in ein Ungleichgewicht von ca. 15:1 (Simopoulos, 2006). Da  $\omega 6$ - und  $\omega 3$ -Substrate der VLCPUFA-Biosynthese um die Enzyme konkurrieren, führt das verschobene Verhältnis von 15:1 zu einer nur geringen Umsetzung von  $18:3^{\Delta 9,12,15}$  und zu einer Unterversorgung mit  $\omega 3$ -VLCPUFA. Um den täglichen Bedarf an  $\omega 3$ -VLCPUFA zu decken, wird daher eine direkte Aufnahme von  $\omega 3$ -VLCPUFA empfohlen (Goyens et al., 2006).

### 1.3.2 Funktionen von $\omega 6$ - und $\omega 3$ -VLCPUFAs im menschlichen Stoffwechsel

Die Bedeutung der  $\omega 6$ - und  $\omega 3$ -VLCPUFAs wird deutlich, wenn man die verschiedenen physiologischen Aufgaben betrachtet, die durch diese Fettsäuren im menschlichen Körper übernommen werden. Wie schon eingangs erwähnt, spielen AA und DHA eine unentbehrliche Rolle bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems während der fötalen Entwicklung, aber auch bei Erwachsenen sind VLCPUFAs wichtige strukturgebende Bestandteile der Membranen von Nervenzellen in Gehirn und Retina. VLCPUFAs stellen die Hauptfettsäuren in den Glycerophospholipiden der Gehirnrinde (graue Substanz oder auch Cortex) dar und machen bis zu 15-20 % der Trockenmasse des Gehirns aus (Glomset, 2006). Der hohe Anteil an DHA in neuronalen Membranen erhöht deren Fluidität, was eine gesteigerte Aktivität der Membranen bzw. darin enthaltener Enzyme zur Folge hat. Es wird angenommen, daß durch DHA vermittelte Membraneigenschaften zur schnellen Signalübertragung in den Nervenzellen (Litman et al., 2001) und zur G-Proteingekoppelten Signalübertragung in der Retina benötigt werden (Jump, 2002). Mangel an DHA in den Membranen des Gehirns und der Retina hat Veränderungen der strukturellen und physikalischen Membraneigenschaften zur Folge. Pathologische Auswirkungen dieses Mangels können Konzentrationsschwäche, Verlust des Erinnerungsvermögens (Salem et al.,

2001), Reduktion der Sehschärfe, aber auch psychologische Störungen, wie Depressionen (Kidd, 2004), Alzheimer-Krankheit (Hartmann et al., 2007) und Schizophrenie sein (Peet, 2006).

Zusätzlich zu ihrer strukturellen Funktion bilden  $\omega$ 6- und  $\omega$ 3-VLCPUFA Biosynthesestufen für hormonähnliche Substanzen. Entzündungsfördernd wirken die aus AA abgeleiteten Signalmoleküle, wie die entsprechenden Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene. Werden diese aus AA entstehende Eicosanoide im Übermaß gebildet, können sie zur Entwicklung kardiovaskulärer, allergischer und entzündlicher Veränderungen und Störungen beitragen. Antagonistisch dazu wirken die von EPA und DHA abgeleiteten Botenstoffe entzündungshemmend, wie z.B. Resolvine, Neuroprotektine und Docosatriene. Es gibt Hinweise, daß  $\omega$ 3-Fettsäuren die Risikofaktoren für Herz-Kreislaufkrankungen sowie aufgrund ihres Einflusses auf die AA- und Eicosanoid-Bildung entzündliche und immunologische Prozesse reduzieren oder hemmen können (Simopoulos, 2002). VLCPUFAs sind also für Funktion und Wohlbefinden des menschlichen Körpers von entscheidender Bedeutung.

### 1.3.3 Quellen von VLCPUFAs für den menschlichen Verbrauch

Da die Umwandlung von  $\omega$ 3-18:3 <sup>$\Delta$ 9,12,15</sup> zu EPA bzw. DHA nur ineffizient abläuft, müssen  $\omega$ 3-VLCPUFA direkt mit der Nahrung aufgenommen werden (Goyens et al., 2006). Die wichtigsten Quellen an  $\omega$ 3-VLCPUFA für die menschliche Ernährung stellen Meeresfische dar, insbesondere fetthaltige Arten wie Lachs, Makrele, Thunfisch oder Hering. Der steigende Bedarf an Fischölen für die menschliche Ernährung hat bereits zu einer Überfischung weiter Teile der Meere geführt. Eine weitere Ausbeutung dieser Ressourcen wird, auch im Hinblick auf die weiter ansteigende Weltbevölkerung, zur zeitnahen Ausrottung bestimmter Fischarten führen (Pauly et al., 1998; Jackson et al., 2001; Myers und Worm, 2003). Fischöle sind zudem oftmals durch Methylquecksilber und dioxinähnliche Verbindungen und Antibiotika belastet, deren Aufnahme negative gesundheitliche Konsequenzen hat (Hites et al., 2004). Fischfarmen bieten hier keine Alternative, da Zuchtfisch zwar tendenziell höhere Gesamtlipidgehalte aufweist als Wildfisch, aber einen niedrigeren Anteil an  $\omega$ 3-VLCPUFA als Wildfisch enthält (Blanchet et al., 2005). Fischöle stellen also eine begrenzte VLCPUFA-Quelle dar, die alleine den Bedarf einer wachsenden Weltbevölkerung nicht decken kann (Hites et al., 2004).

Wie alle Vertebraten haben Fische selbst nicht die Enzymsausstattung zur Synthese von VLCPUFAs und nehmen ebenfalls die Fettsäuren 18:2 <sup>$\Delta$ 9,12</sup> und 18:3 <sup>$\Delta$ 9,12,15</sup> oder

VLCPUFAs über ihre Nahrung auf. Die Nahrung VLCPUFA-akkumulierender Fische besteht normalerweise direkt oder indirekt aus Zooplankton und Phytoplankton und den darin enthaltenen Mikroalgen. Mikroalgen gelten als Primärproduzenten von VLCPUFAs in der marinen Nahrungskette. Die Fähigkeit zur Biosynthese von VLCPUFAs beinhaltet, daß diese Algen als Quellen für Gene dienen können, die für die VLCPUFA-Biosynthese verantwortlich sind.

#### **1.3.4 Ansätze zur Erschließung neuer $\omega$ 3-VLCPUFA-Quellen**

Die Produktion von  $\omega$ 3-VLCPUFAs durch die genetische Einführung der Biosynthesewege in einjährige Ölsaaten stellt eine mögliche alternative Quelle für die künftige  $\omega$ 3-VLCPUFA-Versorgung dar. Ölsaaten lagern TAGs als Speichersubstanzen in ihren Samen ein und stellen seit Jahrtausenden eine wichtige Nahrungsquelle für den Menschen dar. Die Produktion von  $\omega$ 3-VLCPUFAs in transgenen Kulturpflanzen ermöglicht die Erzeugung großer Mengen eines gewünschten Produktes durch Ausnutzung bestehender landwirtschaftlicher Infrastrukturen für Aussaat, Ernte und Prozessierung (Kinney et al., 2002). Um die  $\omega$ 3-VLCPUFA-Biosynthese biotechnologisch anwenden zu können, müssen die grundlegenden Reaktionen der beteiligten Stoffwechselwege herangezogen werden. In den folgenden Abschnitten werden daher zunächst mögliche Stoffwechselwege für die transgene Erzeugung von VLCPUFAs und ihre Einlagerung in Speicheröle dargelegt. Im weiteren werden bisher verfolgte Ansätze zur VLCPUFA-Akkumulation in Pflanzen beschrieben und dabei erkannte Probleme aufgezeigt.

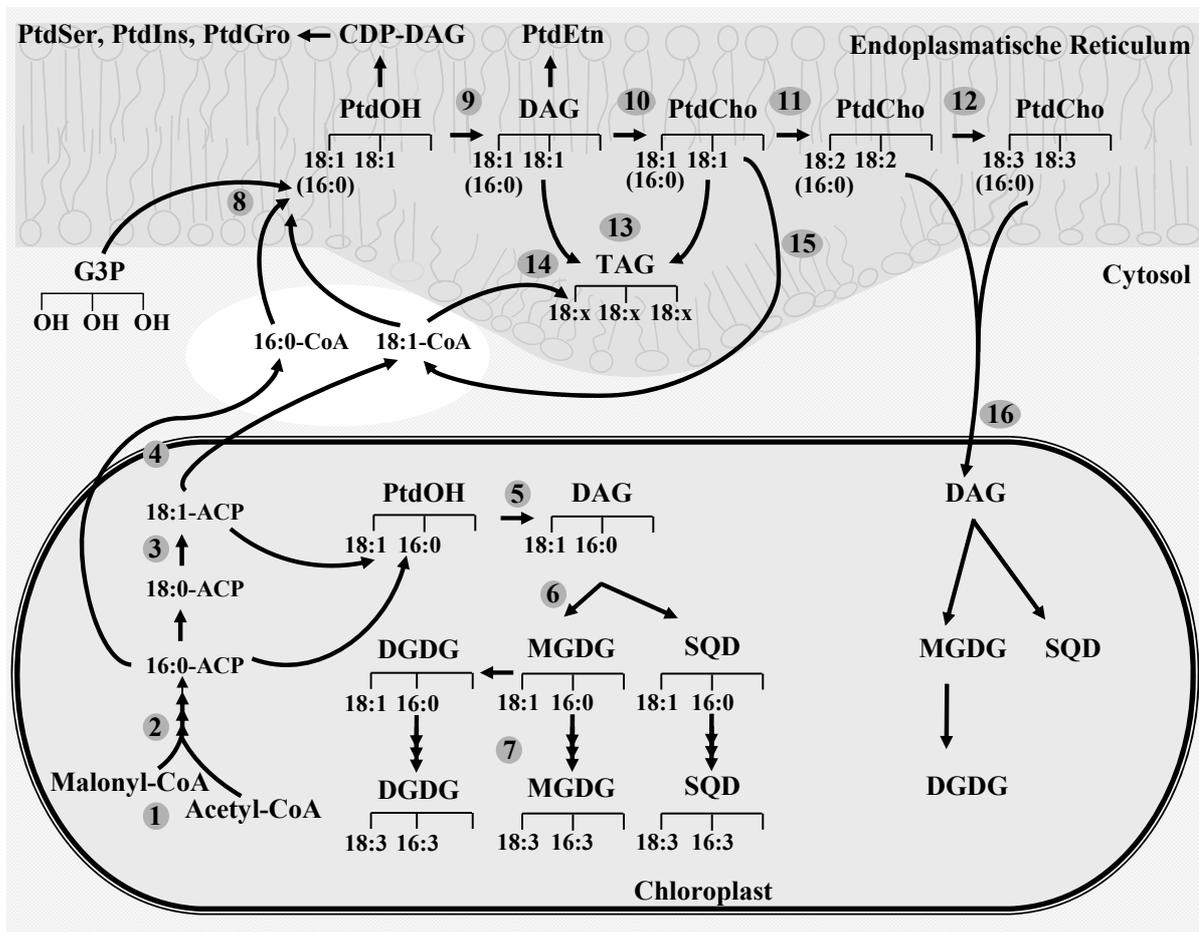
#### **1.4 Biosynthese von Fettsäuren und Lipiden**

Die *de novo* Synthese von Fettsäuren gehört bis auf wenige Ausnahmen zu einer der grundlegenden Charakteristika aller lebender Organismen und wird von einem als Fettsäure-Synthase (FAS)-Komplex bezeichneten Enzym katalysiert. In Tieren und Pilzen besteht dieses cytosolische Enzym aus ein bis zwei Proteinketten, auf denen alle katalytischen Zentren in Nachbarschaft lokalisiert sind. Sie werden als FAS I-Typ bezeichnet. In Bakterien und bei Pflanzen, in denen die Neusynthese von Fettsäuren in den Plastiden stattfindet (Ohlrogge et al., 1979), besteht der FAS-Komplex aus sechs bis sieben einzelnen Enzymen, die zusammen als FAS des Typs II bezeichnet werden. Beide FAS-Typen katalysieren die gleichen katalytischen Schritte (Somerville et al., 2000).

Aufgrund des Schwerpunkts dieser Arbeit, wird im folgenden die Neusynthese von Fettsäuren und die Lipidsynthese am Beispiel pflanzlicher Organismen beschrieben. Die Fettsäuresynthese beginnt mit der Umwandlung von Acetyl-CoenzymA (CoA) in Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase oder in Acetyl-Acyl-Carrier-Protein (ACP) durch die Acetyltransacylase. Aus diesen beiden Ausgangssubstraten wird durch eine Claisen-Kondensationsreaktion Acetoacetyl-ACP gebildet, aus dem in wiederholten Zyklen von Kondensations-, Reduktions- und Dehydratisierungsreaktionen, die durch die FAS katalysiert werden, die Hauptprodukte der Kettenverlängerung 16:0-ACP und 18:0-ACP entstehen (Millar et al., 2000). Durch die Aktivität der löslichen plastidären Stearoyl-ACP-Desaturase wird die erste Doppelbindung in die Fettsäureketten noch am ACP eingeführt. Die meisten beschriebenen Stearoyl-ACP-Desaturasen haben eine Regiospezifität für die  $\Delta 9$ -Position in der Fettsäurekette (Shanklin et al., 1991; Thompson et al., 1991). Die Produkte dieser Reaktion sind Palmitolensäure (16:1 $^{\Delta 9}$ -ACP) und Ölsäure (18:1 $^{\Delta 9}$ -ACP). Durch Thioesterasen werden die Endprodukte der plastidären „prokaryotischen“ Fettsäuresynthese (16:0, 16:1 $^{\Delta 9}$ , 18:0 und 18:1 $^{\Delta 9}$ ) vom ACP gelöst und können in die plastidäre Glycerolipidsynthese eingehen (Roughan et al., 1980; Sparace und Mudd, 1982; Heinz und Roughan, 1983). Alternativ können die Fettsäuren aus den Plastiden in das Cytoplasma exportiert werden, wo sie durch eine Acyl-CoA-Synthetase mit CoA reaktiviert werden (Shine et al., 1976; Koo et al., 2004) und dann für die „eukaryotische“ Fettsäuresynthese bzw. Glycerolipidsynthese im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zur Verfügung stehen (Roughan und Slack, 1982; Somerville und Browse, 1991). Die Hauptwege des pflanzlichen Fettsäurestoffwechsels sind in Abb. 3 dargestellt.

Die initialen Schritte der Lipidsynthese in den Plastiden werden durch die Acyl-ACP:*sn*-Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase (GPAT) und die Acyl-ACP:*sn*-1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase (LPAAT) katalysiert. Die Enzyme verknüpfen unter Abspaltung von ACP selektiv 18:1 $^{\Delta 9}$  mit der *sn*-1-Position und 16:0 mit der *sn*-2-Position von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (Frentzen, 1993), wobei PtdOH entsteht. Durch diese Selektivität der Acyltransferasen entsteht dabei die für plastidäre Lipide typische Verteilung der Fettsäuren in den Lipiden (Ohlrogge et al., 1991; Ohlrogge und Browse, 1995). Die weitere Umsetzung von PtdOH führt zu PtdGro oder durch die PtdOH-Phosphatase (PAP) zu 1,2-Diacylglycerin (DAG). Durch den Transfer von UDP-aktivierten Zuckern (Kelly und Dörmann, 2002) auf die *sn*-3-Position des DAG entstehen die Glykoglycerolipide MGDG, DGDG und SQD (siehe auch 1.2). Die lipidgebundenen Fettsäuren der plastidären

Membranlipide können durch plastidäre membrangebundene Desaturasen durch weitere Einführung von Doppelbindungen modifiziert werden (Somerville und Browse, 1991, 1996).



**Abb. 3. Übersichtsschema der Fettsäure- und Lipidsynthese in Pflanzen.** Die Pfeile kennzeichnen die Reaktionswege bzw. Transportwege der Fettsäuren. (1) Start der *de novo* Fettsäuresynthese durch die Reaktion der Acetyl-CoA-Carboxylase; (2) Reaktionen der FAS II; (3) Einführung der ersten Doppelbindung in die Fettsäurekette durch die  $\Delta^9$ -Stearoyl-ACP-Desaturase; (4) Export der neugebildeten Fettsäuren aus den Plastiden und gleichzeitige Aktivierung mit CoA durch Acyl-CoA-Synthetasen. (5) Der sogenannte prokaryotische Lipidbiosyntheseweg in den Plastiden nutzt die in der *de novo* Fettsäuresynthese gebildeten Acyl-ACPs als Substrate. (6) Zuckerkopfgruppen-Übertragung auf die *sn*-3-Position der Lipide in den Plastiden. (7) Einführung von Doppelbindungen in die Fettsäuren von MGDG, DGDG und SQD durch die plastidären mikrosomalen Desaturasen. (8) Nach dem Export der *de novo* produzierten Fettsäuren aus den Chloroplasten gehen diese in den eukaryotischen Lipidbiosyntheseweg am ER ein. (9) Bildung von DAG durch die Aktivität der PAP und die Synthese von PtdGro, PtdIns und PtdSer über den CDP-DAG-Weg. (10) Bildung von PtdEtn und PtdCho über den CTP-Kopfgruppen-Weg. (11) Modifizierung der Fettsäuren an PtdCho durch die lipidabhängige  $\Delta^{12}$ - und  $\Delta^{15}$ -Desaturase (12) führt zur Bildung von 18:3<sup>A9,12,15</sup>. (13) Die TAG-Synthese wird am ER durch die PDAT oder die DAGAT (14) katalysiert. (15) Der Acyl-CoA-Pool der Zelle wird nicht nur durch den Export von Fettsäuren aus den Plastiden gebildet, sondern auch durch die Abspaltung und Reaktivierung von Fettsäuren aus den Membranlipiden, katalysiert durch die LPCAT und Acyl-CoA-Synthetasen. (16) Verbindung des eukaryotischen und des prokaryotischen Lipidsynthesewegs durch Transport von Lyso-PtdCho oder PtdCho in die Plastiden und der Einbindung in den Glykolipidstoffwechsel, (nach Ohlrogge und Browse, 1995).

Im Gegensatz zu den plastidären Acyltransferasen, haben die am ER lokalisierten Acyltransferasen eine Präferenz für CoA-gebundene C18-Fettsäuren. Die daraus resultierende sogenannte „eukaryotische“ Fettsäureverteilung in den Lipiden weist an der *sn*-1-Position bevorzugt 18:1<sup>Δ9</sup> aber auch 16:0 und an der *sn*-2-Position fast ausschließlich 18:1<sup>Δ9</sup> auf. Am ER gebildetes DAG ist Ausgangssubstrat für die Bildung der Phospholipide PtdCho und PtdEtn, wobei die aktivierten Kopfgruppen, Cytidin-5'-diphosphat (CDP)-Cholin und CDP-Ethanolamin, auf die *sn*-3-Position des DAG übertragen werden. Die Synthese von PtdSer, PtdIns und PtdGro erfolgt über den sogenannten CDP-DAG-Weg (Ohlrogge und Browse, 1995). Dabei wird PtdOH zuerst durch Cytidin-5'-triphosphat (CTP) zu CDP-DAG aktiviert und der Phosphatidrest auf die Alkohole, Serin, Inosit oder Glycerin übertragen. Die Synthese des mitochondrialen Cardiolipins wird durch die Diphosphatidylglycerin-Synthetase katalysiert; dabei wird ein Phosphatidrest von CDP-DAG auf PtdGro übertragen (Schlame et al., 2000). Die prokaryotischen und eukaryotischen Lipidsynthesewege sind nach dem Export *de novo* synthetisierter Fettsäuren nicht mehr streng getrennt und durch Transport von Lysophosphatidylcholin (Lyso-PtdCho) oder PtdOH in die Plastiden kommt es zu einer Verbindung beider Wege (Roughan und Slack, 1982; Somerville und Browse, 1991; Marechal et al., 1997; Mongrand et al., 2000). Fettsäuren, die durch Desaturierungen in der ER-Membran modifiziert wurden, gelangen so in die Plastiden und werden dort wahrscheinlich durch die Aktivität einer plastidären LPAAT in die Synthese von MDGD, DGDG und SQD eingeschleust (Mongrand et al., 2000).

Die in den Phospholipiden bevorzugt an PtdCho oder in Glykolipiden an MGDG oder DGDG gebundenen 18:1<sup>Δ9</sup>-Fettsäuren sind im ER und in den Plastiden Substrate für mikrosomale Δ12- und in nächsten Schritt Δ15-Desaturasen, wobei die Enzyme eine Präferenz für an *sn*-1 oder *sn*-2 gebundene Fettsäuren haben (Domergue et al., 2003). Die resultierenden PUFAs sind Linolsäure (ω6-18:2<sup>Δ9,12</sup>) und α-Linolensäure (ω3-18:3<sup>Δ9,12,15</sup>). Die meisten höheren Pflanzen können keine weiteren Doppelbindungen in diese Fettsäureketten einfügen, und die dreifach-ungesättigte α-Linolensäure stellt somit das Endprodukt der PUFA-Synthese vieler höherer Pflanzen dar.

Durch Modifikationen oder Austausch von Lipidkopfgruppen (Browse und Somerville, 1991; Joyard et al., 1994), durch Lipasen (Shah, 2005; Upchurch, 2008) oder auch durch Acyltransferasen (Lands, 1960; Stymne und Stobart, 1984) werden Membranlipide ständigen Änderungen unterworfen, die dem Zustand der Zelle oder der jeweiligen Membran angepaßt werden. Durch die Aktivität der Acyl-CoA:Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase (LPCAT) werden z.B. spezifisch Fettsäuren

von der *sn*-2-Position von PtdCho auf CoA umgeestert und stehen im CoA-Pool dann weiteren Enzymen als Substrate zur Verfügung (Stymne und Stobart, 1984), was netzwerkartige Verbindungen zwischen den verschiedenen Lipiden schafft, über die Fettsäuren zwischen Lipidklassen ausgetauscht werden können, z.B. zwischen Membranlipiden und Speicherlipiden.

Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit ist in diesem Zusammenhang der Aufbau von Speicherlipiden, insbesondere von TAG. Die Synthese von TAG findet am ER über zwei verschiedene Wege statt (Voelker und Kinney, 2001). In beiden Fällen wird DAG durch die Aktivität einer PAP aus PtdOH bereitgestellt. Eine dritte Fettsäure kann dann entweder durch die Aktivität der Phospholipid:Diacylglycerin-Acyltransferase (PDAT) aus PtdCho auf DAG übertragen werden, wobei neben TAG lyso-PtdCho entsteht. Alternativ dazu kann die dritte Fettsäure auch aus dem Acyl-CoA-Pool stammen und über eine Acyl-CoA:Diacylglycerin-Acyltransferase (DAGAT)-Aktivität auf DAG übertragen werden (Dahlqvist et al., 2000). Das TAG akkumuliert zunächst zwischen den Einzelschichten der glatten ER-Membran, aus der sich schließlich Ölkörper abschnüren (Schwarzenbach, 1971; Stobart et al., 1986; Murphy und Vance, 1999). Die Samenöle von *Arabidopsis* und verschiedenen Kulturpflanzen wie Raps und Soja enthalten gewöhnlich hauptsächlich 18:2<sup>Δ9,12</sup> und 18:3<sup>Δ9,12,15</sup>. Zur Veredelung der Samenöle durch erhöhte Gehalte von VLCPUFAs müssen also spezielle Reaktionsfolgen in Pflanzen ablaufen, um die vorhandenen Vorstufen 18:2<sup>Δ9,12</sup> und 18:3<sup>Δ9,12,15</sup> in die gewünschten VLCPUFAs zu überführen.

## 1.5 Biosynthese von VLCPUFAs

Im Gegensatz zu *Arabidopsis thaliana* und den landwirtschaftlichen Nutzpflanzen sind eine Reihe von Organismen zur Biosynthese von VLCPUFAs befähigt. Die Liste bekannter VLCPUFA-Produzenten umfaßt verschiedene Prokaryoten, einige Pilze, verschiedene Algenarten, niedere Pflanzen wie Moose und Farne, aber auch einige Gymnospermen-Arten und Vertebraten. Die in verschiedenen Organismen aktiven Stoffwechselwege unterscheiden sich dabei allerdings z. T. grundlegend voneinander.

Im Fall prokaryotischer und einiger eukaryotischer Mikroorganismen, wie *Shewanella* und dem eukaryotischen Protist *Schizochytrium* (Nichols et al., 1997; Russell und Nichols, 1999; Kato und Nogi, 2001), werden VLCPUFAs anaerob über sogenannte Polyketidsynthasen (PKS) synthetisiert (Metz et al., 2001). PKS sind multifunktionale Enzyme, die entweder wie die FAS vom Typ I (siehe 1.4) aus einem Multidomänenprotein

bestehen, oder aber sie sind wie die FAS vom Typ II aus einem Multienzymkomplex mit distinkten Untereinheiten zusammengesetzt. In beiden Fällen katalysieren die PKS die verschiedenen enzymatischen Reaktionen von Kondensation-, Reduktion- und Dehydratisierung der entstehenden Polyketide analog zu den Reaktionen der FAS, und noch während der Kettenverlängerung am PKS-Enzymkomplex werden die Doppelbindungen eingeführt. (Hopwood und Sherman, 1990; Katz und Donadio, 1993; Metz et al., 2001).

Im Gegensatz zu den Prokaryoten synthetisieren die meisten VLCPUFA-akkumulierenden eukaryotischen Organismen AA, EPA und DHA durch eine Abfolge von alternierenden Desaturierungs- und Elongationsschritten. Die daran beteiligten Desaturasen und Elongasen sind integrale Membranproteine und im glatten ER lokalisiert.

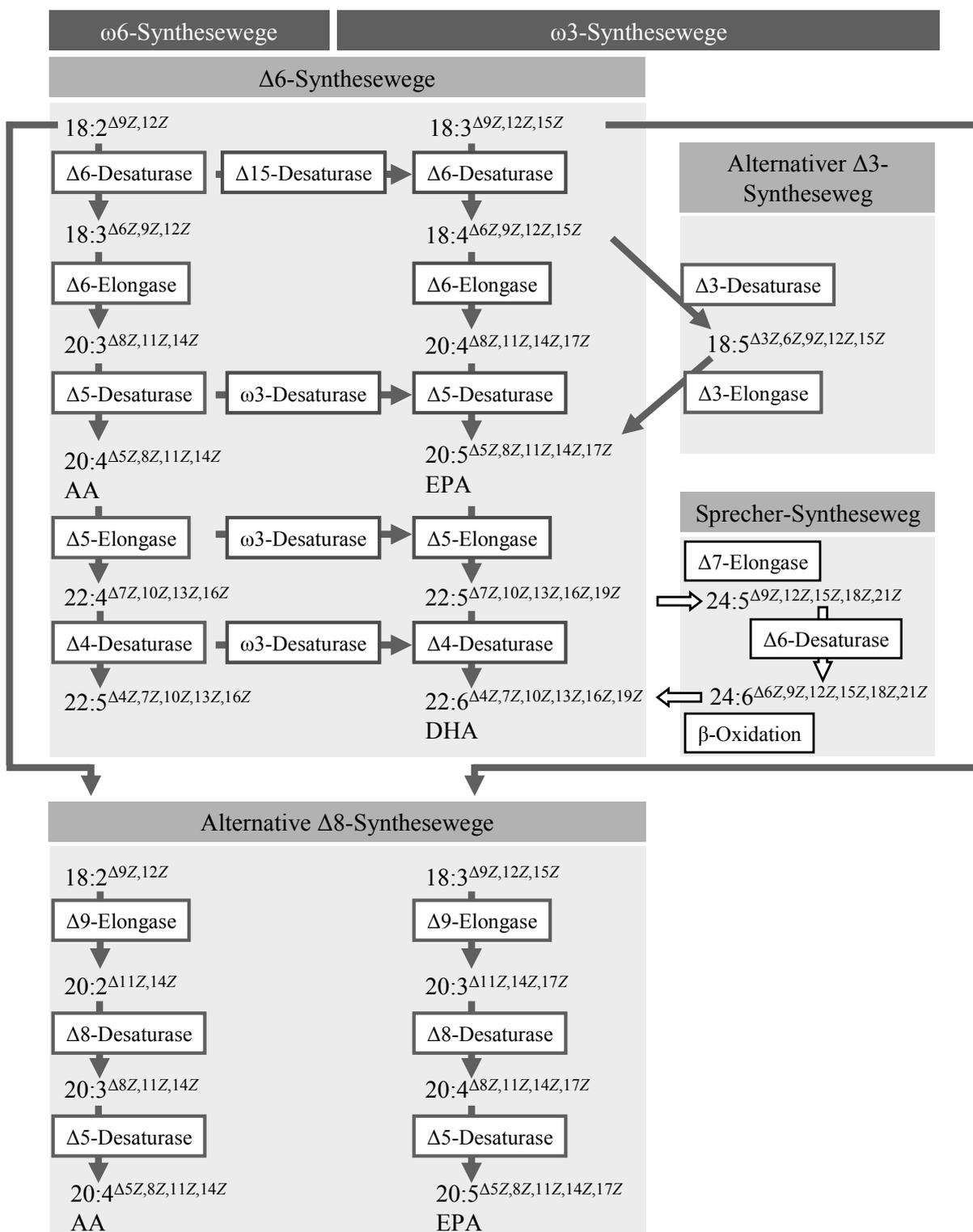
In Pilzen, Moosen und Mikroalgen kann zwischen zwei VLCPUFA-Synthesewegen unterschieden werden, dem  $\omega$ 6- und dem  $\omega$ 3-Biosyntheseweg. Die einzelnen Schritte der Konversion von  $18:2^{\Delta 9,12}$  und  $18:3^{\Delta 9,12,15}$  zu AA oder EPA und DHA sind in Abb. 4 dargestellt. Im „ $\Delta$ 6-Syntheseweg“ werden die Ausgangssubstrate durch die sukzessive Aktivität einer  $\Delta$ 6-Desaturase, einer  $\Delta$ 6-Elongase und einer  $\Delta$ 5-Desaturase zu AA bzw. EPA umgesetzt. Ausgehend von EPA wird durch eine weitere  $\Delta$ 5-Elongase und eine  $\Delta$ 4-Desaturase DHA erzeugt. Der bisher nur bei wenigen Mikroalgenarten beschriebene „alternative  $\Delta$ 8-Biosyntheseweg“ beruht auf den aufeinanderfolgenden Aktivitäten einer  $\Delta$ 9-Elongase, einer  $\Delta$ 8-Desaturase und einer  $\Delta$ 5-Desaturase zur Bildung von AA und EPA (Wallis und Browse, 1999; Qi et al., 2002; Sayanova und Napier, 2004). Aufgrund biochemischer Analysen wird ein weiterer alternativer VLCPUFA-Biosyntheseweg angenommen. Die Identifizierung der bisher vor allem in Algenstämmen der Dinophyceae und Haptophyceae detektierten Octadecapentaensäure ( $18:5^{\Delta 3,6,9,12,15}$ ) führte zu Spekulationen über die Existenz einer  $\Delta$ 3-Desaturase. Durch Markierungsstudien, konnte gezeigt werden, daß zumindest in der Alge *Prymnesium parvum*  $18:5^{\Delta 3,6,9,12,15}$  nicht durch Abbau ( $\beta$ -Oxidation) von EPA gebildet wird, sondern aus den Ausgangssubstraten der VLCPUFA-Biosynthese,  $18:2^{\Delta 9,12}$  und  $18:3^{\Delta 9,12,15}$  (Lang, 2007). Die Isolation und Charakterisierung der postulierten  $\Delta$ 3-Desaturase steht jedoch noch aus.

Die beschriebenen  $\omega$ 6- und  $\omega$ 3-VLCPUFA-Synthesewege laufen nicht grundsätzlich strikt voneinander getrennt ab. In manchen Organismen konnten diverse  $\omega$ 3-Desaturasen charakterisiert werden, die  $\omega$ 6-VLCPUFA in  $\omega$ 3-VLCPUFAs umsetzen können (Abb. 4; (Pereira et al., 2004a; Damude et al., 2006), aus Säugetieren sind solche Enzyme allerdings bislang nicht beschrieben worden.

Die Biosynthese von VLCPUFAs in Säugetieren zeigt aufgrund der anderen Enzymausstattung zusätzliche Besonderheiten. Säugetiere verfügen nicht über Desaturasen, die Doppelbindungen jenseits der  $\Delta 9$ -Position in Fettsäuren einfügen können (siehe 1.3.1), das heißt *de novo* können Säugetiere selbst nur Ölsäure ( $18:1^{\Delta 9}$ ) synthetisieren. Die Ausgangssubstrate der VLCPUFA-Synthese,  $18:2^{\Delta 9,12}$  und  $18:3^{\Delta 9,12,15}$ , sind daher wie schon eingangs erwähnt für Säugetiere essentiell. Allerdings verfügen Säugetiere über die nötigen Enzyme, die zwischen einer vorhandenen Doppelbindung und der Carboxylgruppe aufgenommener PUFAs weitere Doppelbindungen einführen können.

Die Synthese von AA und EPA erfolgt in Säugetieren durch die bereits oben beschriebene Abfolge von Elongations- und Desaturierungsschritten in der Membran des ER. Allerdings konnte in Säugern noch keine  $\Delta 4$ -Desaturase nachgewiesen werden. Eine alternative Biosyntheseroute für DHA wurde von Sprecher et al. (1995) vorgeschlagen und durch weitere Untersuchungen bestätigt (Leonard et al., 2002). Dabei wird EPA durch zwei aufeinanderfolgende Elongationsschritte zu Tetracosapentaensäure ( $24:5^{\Delta 9,12,15,18,21}$ ) verlängert, durch eine  $\Delta 6$ -Desaturase zu  $24:6^{\Delta 6,9,12,15,18,21}$  desaturiert und anschließend in die Peroxisomen transportiert. Hier entsteht durch einen  $\beta$ -Oxidationsschritt DHA, das wieder an die ER-Membran zurückbefördert wird. (Sprecher et al., 1995; Sprecher, 2000; Ferdinandusse et al., 2001).

Die Unterschiede in den Synthesewegen verschiedener Organismen erscheinen auf den ersten Blick gering, jedoch weisen die jeweils beteiligten Enzyme zusätzlich unterschiedliche Substrat- und Regiospezifitäten auf, die für Säuger, Pilze oder pflanzliche Organismen charakteristisch sind.



**Abb. 4. Schematische Darstellung verschiedener VLCPUFA-Biosynthesewege.** Die Synthese von ω6- (links) und ω3-VLCPUFAs (rechts) kann über verschiedene Stoffwechselwege ablaufen. Dargestellt sind die verschiedenen durch alternative Desaturierung und Elongation katalysierten Synthesewege zur Bildung von AA, EPA und DHA. Der weit verbreitete Δ6-Syntheseweg steht in manchen Organismen mit dem mutmaßlichen Δ3-Syntheseweg oder dem Sprecherweg in Verbindung. Die dargestellte Verknüpfung des ω6- mit dem ω3-Syntheseweg durch ω3-Desaturasen findet in Säugern nicht statt. Der alternative Δ8-Syntheseweg wurde in verschiedenen Algen und Protozoen beschrieben. Für Details siehe Text.

## 1.6 Die Enzyme der VLCPUFA-Biosynthese

Die VLCPUFA-Biosynthese, die sich an die PUFA-Synthese anschließt, verlangt die Aktivität von zwei Klassen von Enzymen: Desaturasen und Elongasen. Im folgenden Abschnitt sollen relevante Details an der VLCPUFA-Synthese beteiligter Enzyme hervorgehoben werden, die für den praktischen Ansatz dieser Arbeit von Bedeutung sind.

### 1.6.1 Elongasen

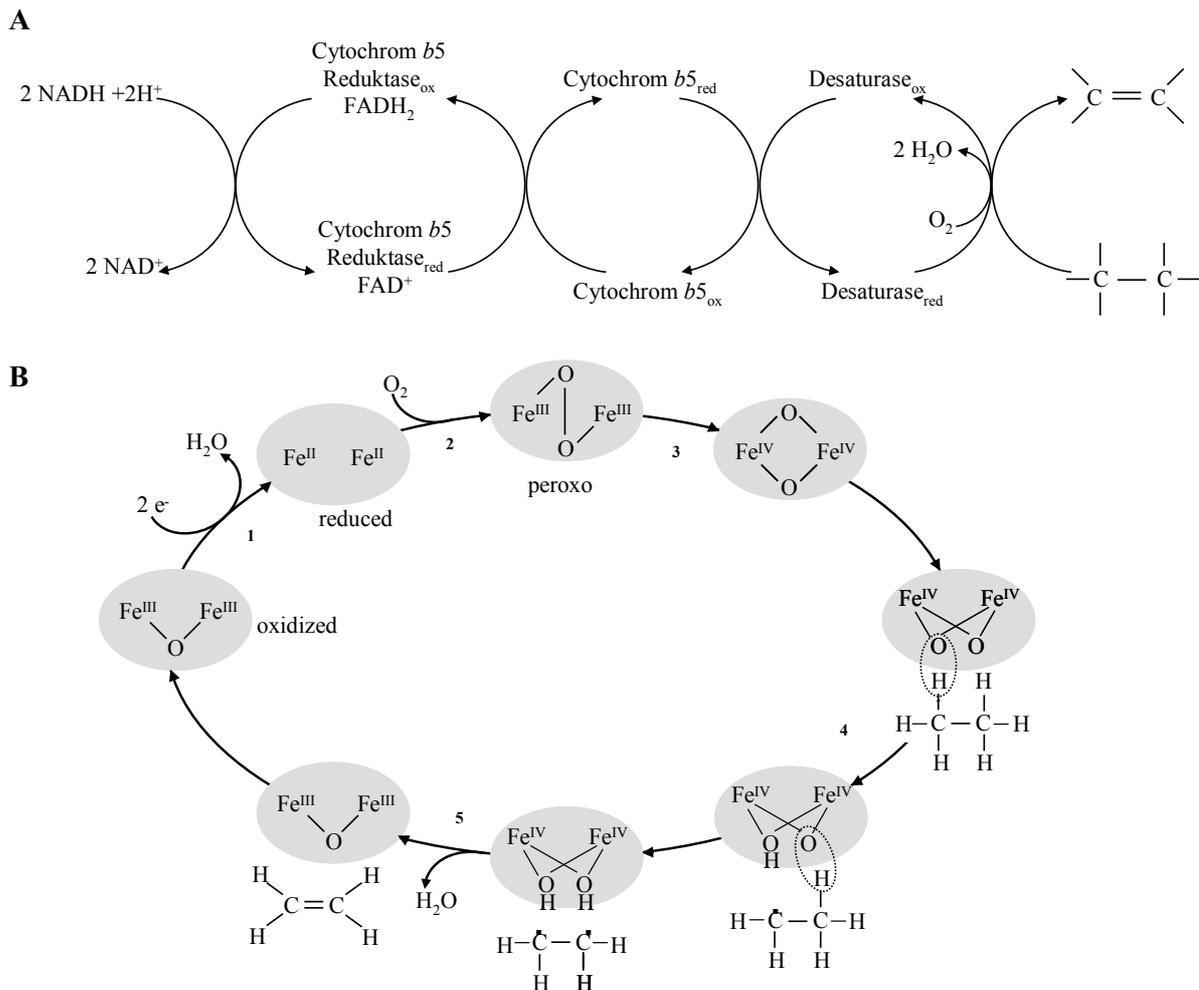
Die an der VLCPUFA-Synthese beteiligten Elongasen sind membrangebundene Enzyme des glatten ER und katalysieren die Verlängerung von Fettsäureketten ab 18 Kohlenstoffatomen durch Kondensation mit Malonyl-CoA um zwei Kohlenstoffatome. Die Elongation ist eine vierstufige Reaktion, die durch die vier Untereinheiten der Elongase katalysiert wird: Kondensation durch die  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase (KCS), Reduktion durch die Ketoacyl-CoA-Reduktase, Dehydrierung durch die Hydroxyacyl-CoA-Dehydratase, und eine erneute Reduktion durch die Enoyl-CoA-Reduktase. Die Untereinheit, die die initiale Kondensationsreaktion (KCS) katalysiert, bestimmt die Substratspezifität und die Aktivität des Elongasekomplexes. *In vitro* und *in vivo* Studien haben gezeigt, daß Elongasen Fettsäuren metabolisieren, die an CoA-gebunden vorliegen (Ghanevati und Jaworski, 2002; Domergue et al., 2003).

Eine Reihe von KCS-Untereinheiten unterschiedlicher Elongasekomplexe sind bereits identifiziert worden, die an der VLCPUFA-Biosynthese beteiligt sind und im folgenden als „Elongasen“ bezeichnet werden. Als Prefix dient hier die Bezeichnung jener Doppelbindung, die die Substratspezifität determiniert. So konnten beispielsweise aus dem Moos *Physcomitrella patens* die  $\Delta 6$ -Elongase, PSE1 (Zank et al., 2002), aus der Mikroalge *Ostreococcus tauri* die  $\Delta 6$ - und  $\Delta 5$ -Elongasen, OtELO1 und OtELO2 (Meyer et al., 2004), und aus der Mikroalge *Isochrysis galbana* die  $\Delta 9$ -Elongase IgASE1 (Qi et al., 2002) isoliert werden.

### 1.6.2 Desaturasen: Hintergrund, Topologie und Substratspezifität

Neben den Elongasen sind vor allem die Fettsäuredesaturasen für die VLCPUFA-Synthese entscheidend. Fettsäuredesaturasen konnten in nahezu allen aeroben Lebensformen, wie Bakterien, Hefen, Pilzen, Algen, Moosen, Pflanzen und Tieren identifiziert werden. Allen Desaturasen gemeinsam ist die sauerstoffabhängige Eliminierung von zwei Wasserstoffatomen von je einer Methylgruppe (*syn*-Eliminierung) innerhalb der Acyl-Kette,

die über ein Di-Eisen-Zentrum katalysiert wird. Grundsätzlich können zwei Desaturasetypen unterschieden werden: lösliche Acyl-ACP-Desaturasen und membrangebundene Desaturasen, wobei die Mehrheit der bekannten Desaturasen dem zweiten Typ angehören und integrale Membranproteine sind. Auf Aminosäureebene unterscheiden sich beide Desaturasetypen stark. Die Verwendung von Cofaktoren sowie die Stereochemie der Wasserstoffabstraktion weisen jedoch Ähnlichkeiten auf (Shanklin und Cahoon, 1998; Sperling et al., 2003). Eine weitere Unterscheidung zwischen Desaturasen kann nach der Art des jeweiligen Elektronendonors und nach der Quelle der für die Reaktion benötigten Reduktionsäquivalente vorgenommen werden. Die Elektronentransportsysteme unterscheiden sich dabei nicht zwischen membrangebundenen oder löslichen Desaturasen, sondern sind spezifisch für den Ort der Desaturierungsreaktion also entweder das plastidäre Stroma, die Plastidenmembran, oder die ER-Membran (Shanklin und Cahoon, 1998). In den Plastiden werden zunächst zwei Elektronen von NADPH auf das Flavoprotein NADPH-Ferredoxin-Oxidoreduktase übertragen, das anschließend die Elektronen einzeln auf zwei Ferredoxine überträgt. Jedes Ferredoxin überträgt schließlich ein Elektron auf das Eisenzentrum oxidierter Desaturasen, sowohl des löslichen als des membrangebundenen Typs (Schmidt und Heinz, 1990; Wada et al., 1993). Im ER werden Elektronen zunächst von NADH auf das Flavoprotein Cytochrom  $b_5$  Reduktase übertragen, das Cytochrom  $b_5$  reduziert. Der Cytochrom  $b_5$ -Cofaktor überträgt die Elektronen wiederum an das Di-Eisenzentrum der Desaturasen (Spatz und Strittmatter, 1971; Dailey und Strittmatter, 1979; Hackett und Strittmatter, 1984). Das mutmaßliche Reaktionsschema der Elektronenübertragung ist in Abb. 5 dargestellt. Anzumerken ist, daß chloroplastidäre oder cyanobakterielle membrangebundene Desaturasen bei heterologer Expression auch in die ER-Membran integriert werden und dort die vorhandene Elektronentransportkette nutzen können (Reddy und Thomas, 1996; Heilmann et al., 2004a). Vermutlich ist die Natur des Elektronendonors also eine Frage der jeweiligen Lokalisierung der Desaturase und nicht prinzipiell entscheidend für die Desaturasefunktion



**Abb. 5. Elektronentransportkette und vorgeschlagener Reaktionsmechanismus von Desaturasen am ER.** (A) ER Desaturasen benötigen als Cofaktoren der Reaktion NADH, Cytochrom  $b_5$ -Reduktase und Cytochrom  $b_5$ . Die Bildung einer Doppelbindung benötigt die Übertragung von zwei Elektronen, die der Desaturase durch die Cofaktoren bereitgestellt werden. Die Abstraktion der zwei Wasserstoffatome von der Fettsäurekette führt zur Bildung von  $2 \text{H}_2\text{O}$ . (B) Vorgeschlagener Mechanismus der Desaturierung. Im Grundzustand liegen die Eisenatome des Di-Eisenzentrum in der oxidierten  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form vor (1). Durch Übertragung von zwei Elektronen entsteht die reduzierte  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form. Diese bindet molekularen Sauerstoff und geht in ein Peroxo-Intermediat über (2). Die Trennung der Doppelbindung des  $\text{O}_2$ -Moleküls führt zu der sehr reaktiven  $\text{Fe}^{\text{IV}}$ -Form des Peroxo-Intermediats (3). Nach diesem Modell abstrahiert diese oxidierte Form des Di-Eisenzentrums der Desaturasen nacheinander die zwei Wasserstoffatome von der Fettsäurekette, unter Bildung eines gebundenen Hydroxyls und  $\text{H}_3\text{C}\cdot$  Radikals, was schließlich zur Wasserabspaltung und Bildung der Doppelbindung führt (4). Die Regenerierung des oxidierten Di-Eisenzentrums stellt die Ausgangssituation wieder her (5), (nach Shanklin und Cahoon, 1998).

Bei einigen Desaturasen ist ein Cytochrom  $b_5$  an den N- oder C-Terminus von Desaturasen fusioniert. N-terminale Fusionen konnten bei Desaturasen aus Algen und Moosen beobachtet werden, C-terminale Fusionen dagegen bei Pilzen und Hefen (Stukey et al., 1990; Itoh et al., 1998; Sakuradani et al., 1999; Sperling und Heinz, 2001). In einigen

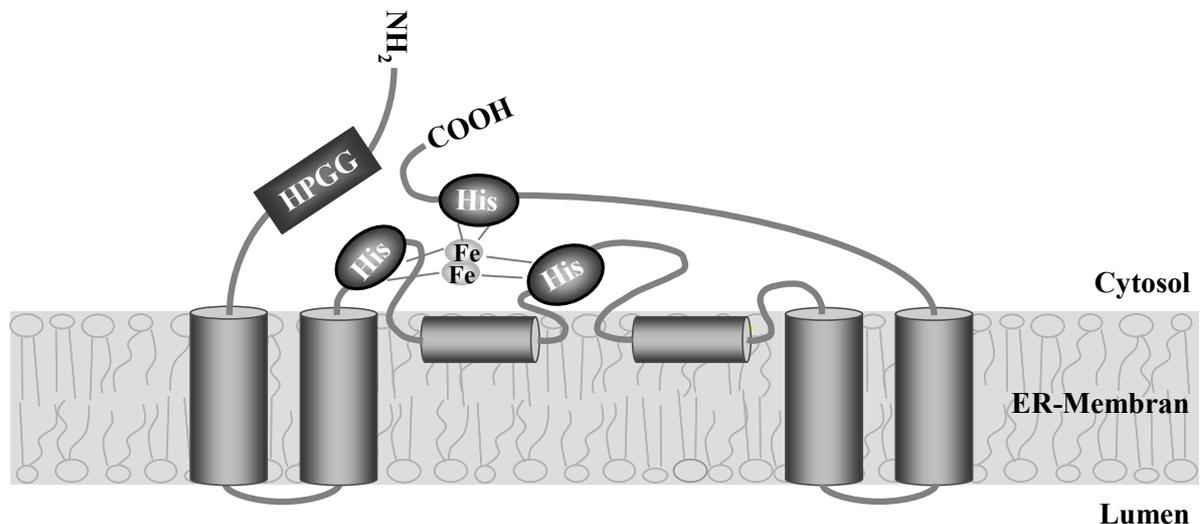
Fällen weist die Cytochrom  $b_5$ -Domäne eine N-terminale Verlängerung auf. Es wird dann auch von einem internen Cytochrom  $b_5$  gesprochen (Girke et al., 1998; Sperling et al., 2003). Allen Desaturasen mit fusioniertem Cytochrom  $b_5$  ist das typische Aminosäuremotiv „HPGG“ gemeinsam, das als Bindestelle für die Cytochrom  $b_5$ -Reduktase dient.

### 1.6.3 Die Topologie membrangebundener Desaturasen

Die bisher beschriebenen Desaturasetypen weisen verschiedene Substrat- und Regiospezifitäten auf (Shanklin und Cahoon, 1998; Buist, 2004), und es gibt eine Reihe von löslichen oder membrangebundenen Desaturasen, die Doppelbindungen an verschiedenen Positionen verschieden langer Fettsäuresubstrate einfügen. Trotz struktureller Gemeinsamkeiten des katalytischen Zentrums ist es bislang auch für die besser charakterisierten pflanzlichen Enzyme nicht möglich, die Substrat- und Regiospezifität aufgrund der Aminosäuresequenz vorherzusagen. Die membrangebundenen Desaturasen bilden zusammen mit membrangebundenen Hydroxylasen, Epoxygenasen (Shanklin und Cahoon, 1998) und Konjugasen (Cahoon et al., 1999; Cahoon et al., 2001; Hornung et al., 2002; Iwabuchi et al., 2003) eine multifunktionelle Enzymgruppe. Die Enzyme dieser Gruppe werden durch drei konservierte histidinreiche Motive charakterisiert, die zwei Eisenatome koordinieren (Fox et al., 2004) und so das katalytische Zentrum bilden (Shanklin und Cahoon, 1998; Sperling et al., 2003). Die Histidin-Boxen zeigen nur wenige Variationen; normalerweise bestehen sie aus insgesamt acht Histidinen und sind für die Funktion der Enzyme wesentlich (Shanklin et al., 1994). Manche Desaturasen zeigen in der dritten Histidin-Box einen Austausch des ersten Histidins gegen ein Glutamin (Napier et al., 1997; Sayanova et al., 1997).

Im Gegensatz zu löslichen Desaturasen, deren Struktur röntgenkristallographisch aufgeklärt wurde (Lindqvist et al., 1996), und für die Struktur-Funktionsanalysen durchgeführt wurden (Cahoon et al., 1997; Shanklin et al., 1997), gibt es entsprechende Daten für membrangebundene Desaturasen nicht. Das Fehlen struktureller Informationen für membrangebundene Desaturasen ist vor allem bedeutend, weil gerade diese Enzyme eine ungleich größere Variabilität verschiedener Spezifitäten aufweisen als lösliche Desaturasen. Strukturelle Aussagen über membrangebundene Desaturasen beruhen auf Mutagenesestudien und biochemischen Topologie- und Hydrophathieanalysen (Prasad et al., 1980; Stukey et al., 1990; Diaz et al., 2002a; Man et al., 2006). Die Ergebnisse führten zu einem Topologie-modell membrangebundener Desaturasen (Abb.6). Das Modell ordnet den Desaturasen vier transmembrane und zwei membranperiphere Domänen zu, wobei sich sowohl N- und C-

Termini als auch die Histidin-Boxen auf der cytosolischen Seite bzw. der dem plastidären Stroma der Membran zugewandten Seite anordnen (Abb. 6).

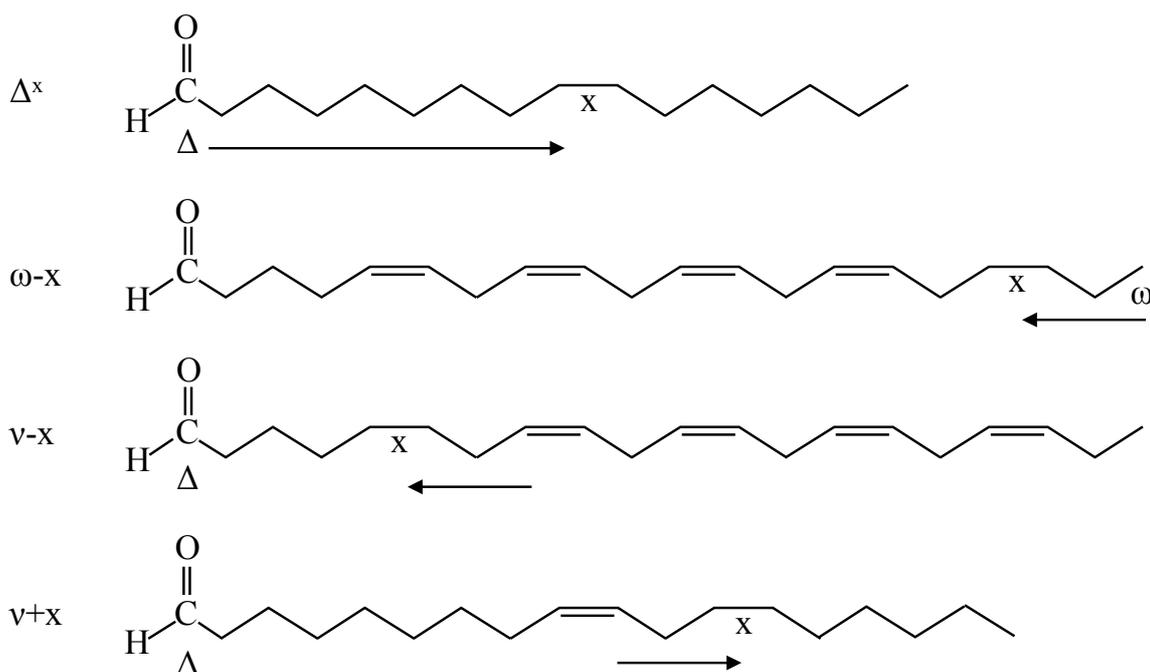


**Abb. 6. Topologie-Modell membrangebundener Desaturasen.** Als Beispiel wurde eine mit Cytochrom  $b_5$ -fusionierte Desaturase des ER dargestellt. Das typische HPGG-Motiv des Cytochroms  $b_5$  und die drei Histidin-Boxen, die die zwei Eisenatome koordinieren, orientieren sich in diesem Modell zum Cytosol. Transmembrandomänen und membranperiphere Bereiche sind durch Zylinder angedeutet.

Die Substratspezifitäten von Desaturasen scheinen sich nach der Fettsäurelänge und/oder der Anzahl der bereits vorhandenen Doppelbindungen zu richten. Je nach betrachtetem Enzym kann eine Doppelbindung entweder neu, oder zwischen der Carboxylgruppe und einer bereits vorhandenen Doppelbindung eingefügt werden. Alternativ wird sie zwischen einer vorhandenen Doppelbindung und der Methylgruppe, dem Ende der Fettsäurekette eingefügt. Des weiteren fügen manche Enzyme nur dann eine Doppelbindung ein, wenn bereits eine solche als Referenz vorhanden ist (Heinz, 1993). Auch die Länge der Fettsäure (Heinz, 1993) und die Kopfgruppe des Glycerolipids an die die Fettsäure gebunden ist, spielen eine Rolle. Modelle, um die verschiedenen möglichen Regiospezifitäten zu beschreiben, wurden von (Meesapyodsuk et al., 2000) vorgeschlagen und sind in Abb. 7 dargestellt.

Nicht alle Desaturasen zeigen nur eine distinkte Regiospezifität oder Substratspezifität. So wurden bereits eine Reihe von Desaturasen isoliert, die als bifunktionale Enzyme charakterisiert werden konnten. Beispiele dafür umfassen die Oleat 12-Hydroxylase/Desaturase aus *Lesquerella fendleri* (Broun et al., 1998), die  $\Delta 6$ -

Acetylenase/Desaturase aus dem Moos *Ceratodon purpureus* (Sperling et al., 2000), die  $\Delta 5/\Delta 6$ -Desaturase aus dem Fisch *Danio rerio* (Hastings et al., 2001), die  $\Delta 12/\omega 3$ -Desaturasen aus den Ascomyceten *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum* und *Magnaporthe grisea* (Damude et al., 2006) und die  $\Delta 12/\Delta 15$ -Desaturase aus *Acanthamoeba castellanii* (Sayanova et al., 2006a).



**Abb. 7. Modell verschiedener Regiospezifitäten von Desaturasen.** Desaturasen mit  $\Delta^x$  und  $\omega$ - $x$ -Regiospezifität orientieren sich nach dem Abstand zum Carboxyl- oder Methylende der Fettsäure, um die Position der einzuführenden Doppelbindung zu determinieren.  $\nu$ - $x$  und  $\nu$ + $x$  Desaturasen hingegen orientieren sich an schon vorhandenen Doppelbindungen und messen entweder den Abstand zum Carboxyl- oder zum Methylende der Fettsäurekette, wobei  $\nu$  die Position der bereits vorhandenen Doppelbindung angibt, (nach Meesapyodsuk et al., 2000).

Desaturasen, die N-terminale Cytochrom  $b_5$ -Fusionsproteine darstellen und eine Doppelbindung zwischen eine bereits vorhandene Doppelbindung und die Carboxylgruppe mit entweder einer  $\Delta 4$ -,  $\Delta 5$ -,  $\Delta 6$ - oder  $\Delta 8$ -Regiospezifität in die Fettsäure einfügen, werden als „Front-End“-Desaturasen bezeichnet (Napier et al., 1997). Alle bisher beschriebenen Desaturasen dieses Typs weisen die bereits erwähnte Histidin/Glutamat Substitution in der dritten Histidin-Box auf. Alle bisher klonierten Desaturasen, die in tierischen oder pflanzlichen Organismen bzw. in Mikroorganismen an der VLCPUFA-Biosynthese beteiligt

sind, konnten diesem Desaturasetyp zugeordnet werden. Nicht alle „Front-End“-Desaturasen sind allerdings in die VLCPUFA-Synthese eingebunden, und auch Sphingolipid-Desaturasen gehören zu den „Front-End“-Desaturasen. Datenbankvergleiche zeigen, daß die Sphingolipid-Desaturasen wahrscheinlich evolutionär von den  $\Delta 6$ -Desaturasen abstammen (Sperling et al., 1998; Libisch et al., 2000), so daß ähnliche Merkmale sich durch die verwandtschaftliche Beziehung erklären.

#### 1.6.4 Die Substratdichotomie der Desaturasen

Membrangebundene Desaturasen lassen sich hinsichtlich ihrer Spezifität gegenüber dem Acylträger, an den das Substrat gebunden vorliegt, in Acyl-Lipid und Acyl-CoA-spezifische Desaturasen einteilen. Diese Unterscheidung wird als Substratdichotomie der Desaturasen bezeichnet. Die Mehrzahl der charakterisierten ER-lokalisierten membrangebundenen Desaturasen aus pflanzlichen Organismen, einigen Pilzen und Bakterien bevorzugen Fettsäuren, die an der *sn*-2-Position von Phospholipiden gebunden sind. Hier werden insbesondere jene umgesetzt, die an PtdCho gebunden sind umgesetzt (Galle-Le Bastard et al., 2000; Domergue et al., 2003). Für die  $\Delta 6$ -Desaturase der Thylakoidmembranen aus Cyanobakterien (Wada und Murata, 1998) und die thylakoidassoziierte FAD5 (*Fatty Acid Desaturase 5*) aus *Arabidopsis* (Heilmann et al., 2004b) konnte gezeigt werden, daß diese Desaturasen eine Präferenz für in MGDG veresterte Fettsäuren aber keine Präferenz für eine bestimmte *sn*-Position haben. Für Desaturasen aus Tieren hingegen wird angenommen, daß sie Fettsäuren umsetzen, die an CoA gebunden sind, umsetzen (Okayasu et al., 1981; Tocher et al., 1998)

Bis vor kurzem konnte die CoA-abhängige Desaturierung von Fettsäuren nur in der Bäckerhefe und in tierischen Organismen nachgewiesen werden. Domergue et al. (2005) beschrieben jedoch eine  $\Delta 6$ -Desaturase aus der Mikroalge *O. tauri*, die ebenfalls bevorzugt CoA-gebundene Fettsäuren umsetzt. Bisher war eine Spezifität für aktivierte Fettsäuren bei pflanzlichen Desaturasen nur für die löslichen chloroplastidären Stearoyl-ACP-Desaturasen beschrieben worden, die Fettsäuren gebunden an ACP oder an CoA akzeptieren (Sperling et al., 2003). Da die Desaturasesequenz aus *O. tauri* nur geringe Ähnlichkeit zu bereits charakterisierten Desaturasen aufwies, ist die strukturelle Ursache für diese besondere biochemische Spezifität noch unbekannt.

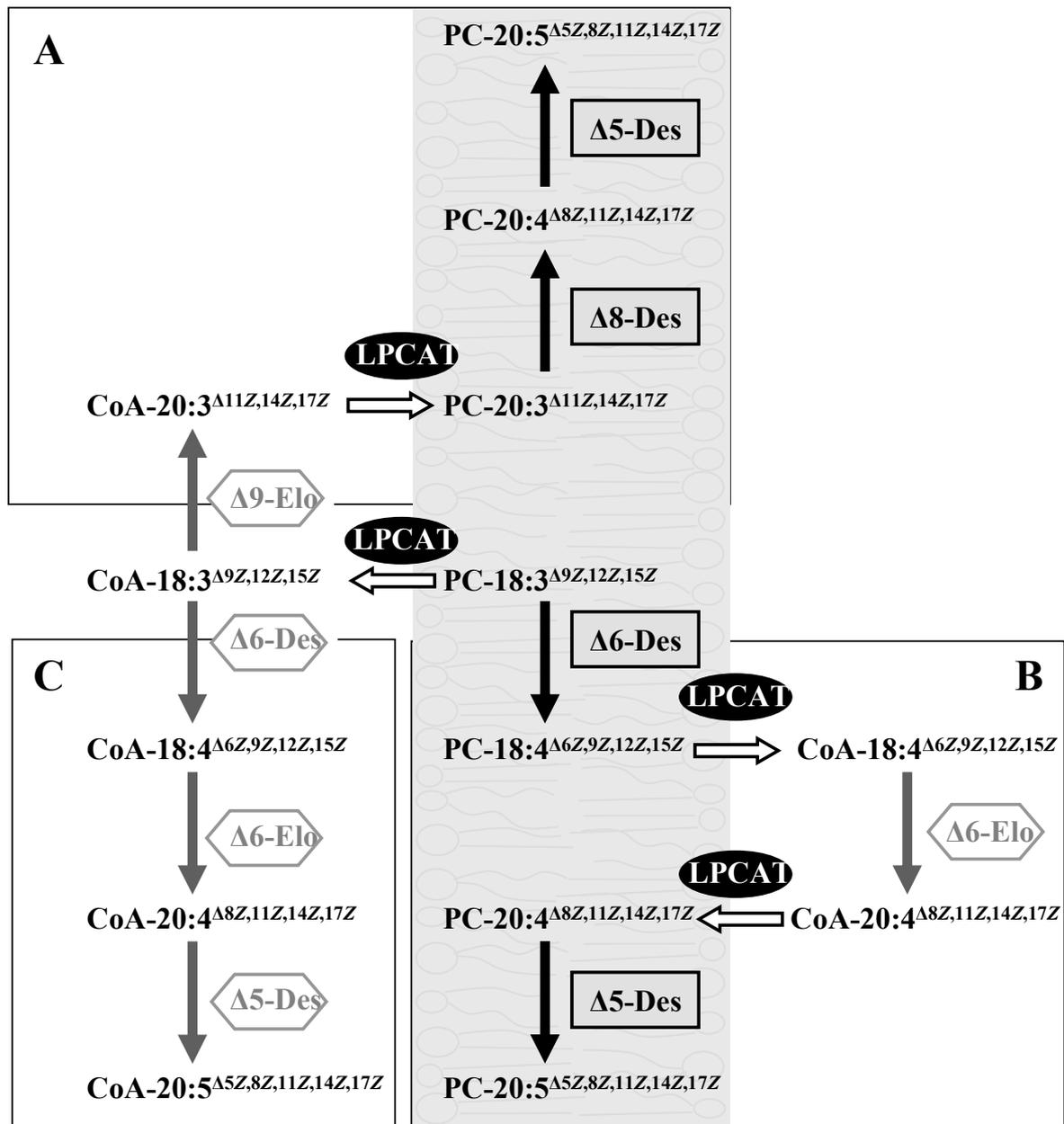
## 1.7 Status der VLCPUFA-Produktion in Pflanzen

Die bisher beschriebenen Charakterisierungen einzelner Enzyme wurden meist im Rahmen der biotechnologischen Herstellung von VLCPUFAs in transgenen Organismen durchgeführt. Wie in Abb. 4 dargestellt, benötigt die Synthese von AA und EPA die sukzessive Aktivität einer  $\Delta 6$ -Desaturase, einer  $\Delta 6$ -Elongase und einer  $\Delta 5$ -Desaturase. Die aus zahlreichen Organismen wie Pilzen, Moosen und Mikroalgen isolierten Desaturasen und Elongasen mit geeigneten Regiospezifitäten wurden einzeln und auch schon in Kombination im heterologen System Hefe auf ihre zu erwartende Aktivität in eukaryotischen Organismen überprüft. Tests in den Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana* (Qi et al., 2004; Sayanova et al., 2006b) oder in Ölsaaten wie Lein (*Linum usitatissimum*; Abbadi et al., 2004), Soja (*Glycine max*; Kinney, 2004) oder *Brassica juncea* (Wu et al., 2005) resultierten in der Akkumulation von AA und EPA, allerdings in sehr unterschiedlichen Mengen (Graham et al., 2007; Napier, 2007).

Relevant für diese Arbeit waren vor allem zwei transgene Ansätze zur Produktion von VLCPUFAs in Pflanzen: Im ersten Ansatz wurde der sogenannte alternative  $\Delta 8$ -Syntheseweg für die VLCPUFA-Biosynthese erfolgreich in *Arabidopsis* Blättern getestet (Qi et al., 2004; vgl. Abb. 8 A). Dieser Syntheseweg basiert auf der Reaktionskette einer  $\Delta 9$ -Elongase aus der Mikroalge *Isochrysis galbana* (Qi et al., 2002), einer  $\Delta 8$ -Desaturase aus der Mikroalge *Euglena gracilis* (Wallis und Browse, 1999) und einer  $\Delta 5$ -Desaturase aus dem Pilz *Mortierella alpina* (Michaelson et al., 1998a). Durch die Aktivität der  $\Delta 9$ -Elongase wurden  $18:2^{\Delta 9,12}$  und/oder  $18:3^{\Delta 9,12,15}$  im Acyl-CoA-Pool in  $20:2^{\Delta 11,14}$  und/oder  $20:3^{\Delta 11,14,17}$  umgewandelt, welche anschließend durch lipidabhängige  $\Delta 8$ - und  $\Delta 5$ -Desaturierung entweder zu AA bzw. EPA umgewandelt wurden (Abb. 8 A). Letztendlich akkumulierte EPA bis zu ~3 % des Gesamtfettsäuregehaltes in den Blättern der transgenen Pflanzen (Qi et al., 2004). Problematisch war jedoch, daß *Arabidopsis*-Blätter kein Öl speichern und hier die Fettsäuren direkt als Membranbausteine verarbeitet wurden, anstatt wie im Samen in Form von TAG gespeichert zu werden. In einem analogen Versuch von (Sayanova et al., 2006b) wurde ein weiteres Problem deutlich: Die Analyse des Acyl-CoA und des Lipid-Pools zeigte, daß die  $\Delta 9$ -Elongationsprodukte  $20:2^{\Delta 11,14}$  und  $20:3^{\Delta 11,14,17}$  zu großen Mengen im Acyl-CoA-Pool der transgenen Pflanzen akkumulierten und bis zu 40 % der im Acyl-CoA-Pool detektierbaren Fettsäuren ausmachten, aber nur zu 8 % der VLCPUFAs als lipidgebundene Fettsäuren in Erscheinung traten (Sayanova et al., 2006b). Es wurde daher vermutet, daß die endogene LPCAT aus *Arabidopsis* (siehe 1.4) die fremden Fettsäuren nicht als Substrat akzeptiert und nicht vom Ort der Elongation, dem Acyl-CoA-Pool, an den Ort der Desaturierung, den

PtdCho-Pool, transportiert (Sayanova et al., 2006b). Diese Elongationsprodukte standen also der weiteren Desaturierung nicht zur Verfügung, wodurch die Effizienz des Biosynthesewegs stark vermindert wurde.

Im zweiten Ansatz konnte der  $\Delta 6$ -Desaturierungsweg durch die Cotransformation der  $\Delta 6$ - und der  $\Delta 5$ -Desaturase aus der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* (Pt $\Delta 6$  und Pt $\Delta 5$ ; Domergue et al., 2002) zusammen mit der  $\Delta 6$ -Elongase aus *P. patens* (PSE1; Zank et al., 2002), in Leinsamen etabliert werden (Abb. 8 B). In den Samen dieser transgenen Pflanzen wurde zunächst die an der  $\Delta 6$ -Position desaturierte C18-VLCPUFA 18:4 <sup>$\Delta 6,9,12,15$</sup>  bis zu 30 % der Gesamtfettsäuren gebildet, es akkumulierte aber dennoch nur ungefähr 1 % EPA im Samenöl. Die vergleichende Analyse von Acyl-CoA- und Lipid-Pool der transgenen Pflanzen zeigte, daß sich die  $\Delta 6$ -desaturierten Produkte der Pt $\Delta 6$  entweder in den Membranlipiden und vor allem in PtdCho anreicherten, oder direkt in TAGs eingebaut wurden; im Acyl-CoA-Pool waren diese  $\Delta 6$ -desaturierten Fettsäuren kaum detektierbar, so daß sie für die weiteren enzymatischen Schritte der VLCPUFA-Synthese nicht mehr zur Verfügung standen. Durch diese Analysen wurde deutlich, daß die Produktion von VLCPUFAs nicht nur die Aktivität von Desaturasen und Elongasen erfordert, sondern auch die Aktivität von spezifischen LPCATs. Die Synthesewege der lipidabhängigen Desaturierung benötigt demnach den Hin- und Rücktransport von C18 Fettsäuren mit  $\Delta 6$ -Doppelbindung durch LPCATs, und diese Reaktionen wurden in beiden beschriebenen Ansätzen als limitierende Faktoren erkannt (Abb. 8 A und B). Die unterschiedlichen Präferenzen verschiedener Enzyme der Fettsäurebiosynthese für Lipid- oder CoA-gebundene Substrate führt wegen der für VLCPUFAs ungeeigneten Substratspezifitäten der endogenen LPCATs zu einem Engpaß der VLCPUFA-Biosynthese, die in bisherigen Studien die VLCPUFA-Akkumulation in transgenen Pflanzen limitiert hat (Abadi et al., 2004).



**Abb. 8. Verschiedene Strategien für die Produktion von VLCPUFAs in Pflanzen.** (A) Biosynthese von VLCPUFAs in *Arabidopsis*-Blättern durch den alternativen lipidabhängigen  $\Delta 8$ -Desaturierungsweg (Qi et al., 2004). (B) Lipidabhängiger  $\Delta 6$ -Desaturierungsweg in Leinsamen. Beide Synthesewege sind abhängig von der Reaktion einer LPCAT (Abbadi et al., 2004) (C) Alternativer Acyl-CoA-abhängiger VLCPUFA-Biosyntheseweg. Sowohl Elongation als auch Desaturierung finden im Acyl-CoA-Pool statt. Die grau hinterlegte Fläche stellt die ER-Membran dar. PC, Phosphatidylcholin; CoA, Coenzym A; Des, Desaturase; Elo, Elongase; LPCAT, Acyl-CoA:Lyso-phosphatidylcholin-Acyltransferase, (nach Abbadi et al., 2004).

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorgelegten Arbeit war die Optimierung des VLCPUFA-Biosynthesewegs durch die gentechnische Etablierung eines koordinierten, ausschließlich Acyl-CoA-abhängigen Stoffwechselweges, der sich aus geeigneten Enzymen von Mikroalgen zusammensetzen sollte. Durch die Verlagerung aller Reaktionen in den Acyl-CoA-Pool sollte die mehrfache limitierende Transesterifizierung von Fettsäureintermediaten zwischen Membranlipid- und Acyl-CoA-Pool bei der VLCPUFA-Synthese vermieden werden (siehe Abb. 8 C).

Im ersten Schritt sollten die ausgewählten Spenderalgen *O. tauri* und *Mantoniella squamata* auf ihre endogenen VLCPUFA-Biosynthesewege untersucht werden, um auszuschließen, daß die Synthese der VLCPUFAs, wie bei vielen anderen Mikroorganismen, über einen PKS-abhängigen Syntheseweg katalysiert wird. Die Identifizierung charakteristischer Elongations- oder Desaturierungsintermediate in den Lipiden und im Acyl-CoA-Pool der Algen wies auf den gewünschten VLCPUFA-Biosyntheseweg hin, so daß diese Algen als Genspender für neue „Front-End“-Desaturasen mit mutmaßlicher Präferenz für die Acyl-CoA-abhängige Desaturierung genutzt werden konnten.

Nach dieser Charakterisierung hinsichtlich der Fettsäurezusammensetzung sollten Gene, die für „Front-End“-Desaturasen kodieren, aus *O. tauri* und *M. squamata* isoliert und anschließend in Hefe funktional charakterisiert werden. Durch umfassende Lipidanalysen nach Expression der neu isolierten Desaturasen sollte getestet werden, ob diese Acyl-CoAs oder lipidgebundene Fettsäuren bevorzugen.

Die einzeln getesteten Desaturasen sollten dann in Kombination mit Elongasen heterolog in Hefe exprimiert werden, um das metabolische Zusammenspiel der Enzyme zu testen. Um einen vollständigen CoA-Pool-spezifischen VLCPUFA-Syntheseweg bis hin zu EPA in Hefe zu etablieren, stand bereits die  $\Delta 6$ -Elongase aus *P. patens* zur Verfügung (Zank et al., 2002). Die Expression in Hefe sollte die Effizienz des neu etablierten Acyl-CoA-abhängigen Stoffwechselweges überprüfen.

Durch Erzeugung und Charakterisierung transgener *Arabidopsis*-Pflanzen, in denen der neue Acyl-CoA-abhängig VLCPUFA-Biosyntheseweg biotechnologisch etabliert wurde, sollte schließlich *in planta* getestet werden, ob eine erfolgreiche Umgehung des LPCAT Engpasses in Pflanzen etabliert wurde, und wie diese die VLCPUFA-Produktion beeinflusst.

## 2. Material und Methoden

Für alle Methoden wurden sterilisierte Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet. Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt und, soweit nicht anders beschrieben, durch Autoklavieren sterilisiert.

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

ABI Prism 310 Genetic Analyser	PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Gefiltertes Meerwasser	Biologische Anstalt Helgoland, Deutschland
Kieselgel-Dünnschichtplatten Si-60, 20 x 20 cm	Merck, Darmstadt, Deutschland
Gel-Detektionssystem DIANA	Raytest, Straubenhardt, Deutschland
Gel-Detektionssystem AIDA	Raytest, Straubenhardt, Deutschland
Mini-PROTEAN <sup>®</sup> 3 Elektrophoreseapparatur	Biorad, Hercules, USA
Thermocycler: Mastercycler personal	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifugen: Biofuge pico	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gaschromatograph (GC)	Agilent, Waldborn, Deutschland
Autoinjektor	Agilent, Waldborn, Deutschland
GC-Massenspektrometrie (GC-MS)	Agilent, Waldborn, Deutschland
High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)	Agilent, Waldborn, Deutschland
Phenyl-Hexyl-Säule (5 µm, 150mm x 2 mm)	Phenomenex, Macclesfield, CheshireUK
Heizplatte	Camag, Muttenz, Schweiz

## 2.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht separat erwähnt, von den Firmen Sigma-Aldrich (München, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Organische Lösungsmittel, wie *n*-Hexan, Methanol, Ethanol, Isopropanol und Acetonitril wurden von Acros (Geel, Belgien) oder Baker (Griesheim, Deutschland) bezogen.

## 2.3 Fettsäure- und Lipidstandards

Fettsäuremethylester-Mix (F.A.M.E. Mix, C4-C24)	Sigma, München, Deutschland
Menhadenöl	Sigma, München, Deutschland
Triheptadecanoensäure	Sigma, München, Deutschland
Acyl-CoA-Standards	Larodan, Malmö, Schweden
Phospholipidstandards	Sigma, München, Deutschland
Fettsäuren (Substrate)	Cayman, Lörrach, Deutschland

## 2.4 Enzyme

### 2.4.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme *EcoRI*, *NotI*, *BglII*, *BamHI*, *NheI*, *XbaI*, *NcoI* und *SacII* wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) und die Restriktionsenzyme *AgeI*, *AsiSI* und *SbfI* von NewEngland Biolabs (Ipswich, UK) bezogen und nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

### 2.4.2 Sonstige Enzyme und Kits

DNase I	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>TaKaRa ExTaq</i> <sup>TM</sup>	Cambrex BioScience, Potsdam, Deutschland
Expand <sup>TM</sup> High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Phusion <sup>TM</sup> DNA-Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
Advantage 2 <sup>®</sup> Polymerase Mix	BD Bioscience Clontech, Heidelberg, Deutschland

Marathon™ cDNA Amplification Kit	BD Bioscience Clontech, Heidelberg, Deutschland
Macherey-Nagel NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Extract Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
pGEM®-T Ligations Kit	Promega, Heidelberg, Deutschland
ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

## 2.5 Vektoren

Klonierungsvektoren:

pGEM®-T Amp<sup>R</sup> (Promega, Heidelberg, Deutschland) zur Subklonierung von PCR-Produkten

pUC19-USP-OCS123

Amp<sup>R</sup>, Verwendet zur Subklonierung von cDNAs, die in den Pflanzentransformationsvektor kloniert werden sollten. Enthält drei verschiedene Polylinker zwischen jeweils einem USP-Promotor (Bäumlein et al., 1991) und einem OCS-Terminator (MacDonald et al., 1991). Diese Dreier-Expressionskassette kann entweder mit *SacII* oder *SbfI* aus dem pUC-Derivat geschnitten werden. (Modifiziert nach Abbadi et al., 2004; zur Verfügung gestellt durch Martin Fulda)

Hefeexpressionsvektoren:

pESC-LEU	Amp <sup>R</sup> , Stratagene, Amsterdam, Niederlande
pESC-TRP	Amp <sup>R</sup> , Stratagene, Amsterdam, Niederlande
pESC-URA	Amp <sup>R</sup> , Stratagene, Amsterdam, Niederlande
pESC-HIS	Amp <sup>R</sup> , Stratagene, Amsterdam, Niederlande
pYES2	Amp <sup>R</sup> , Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pYES2/CT	Amp <sup>R</sup> , Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

## Pflanzen-Expressionsvektoren:

pCAMBIA3300	Kan <sup>R</sup> in Bakterien, Glufosinat, „Basta <sup>Rcc</sup> “ ( <i>bar</i> -Gen) in Pflanzen unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors. Der Vektor enthält doppelte <i>SacII</i> - und <i>SbfI</i> -Klonierungsstellen. (Modifiziert nach Abbadi et al. (2004); zur Verfügung gestellt durch Martin Fulda).
pCAMBIA3300-USP-Gateway	Kan <sup>R</sup> in Bakterien, Glufosinat, „Basta <sup>Rcc</sup> “ ( <i>bar</i> -Gen) in Pflanzen unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors. Der Vektor enthält zwei Erkennungssequenzen über die durch homologe Rekombination die gewünschte cDNA, in Leserichtung des USP-Promotors, in den Vektor eingebracht wird. (Modifiziert und zur Verfügung gestellt durch Dr. Ellen Hornung)

## 2.6 Organismen

### 2.6.1 Bakterienstämme

Für Klonierungen: *Escherichia coli* XL1blue  
 Genotyp: *endA1, hsdR17, supE44, thi-1, rec A1, gyrA96, relA1, lac, [F', proAB, lacI<sup>f</sup>ZΔ15, Tn10(tet<sup>R</sup>)]*;  
 Stratagene, Amsterdam, Niederlande.

Zur Transformation von

*Arabidopsis thaliana*: *Agrobacterium tumefaciens* pEHA105  
 pTiBo542ΔT-DNA Rif<sup>R</sup> (Hood et al., 1993).

### 2.6.2 Hefe

*Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland); Genotyp *his3Δ1/his3Δ1, leu2/leu2, trp1-289/trp1-289, ura3-52/ura3-52*.

### 2.6.3 Algenstämme

*Mantoniella squamata* SAG 65.90 (Manton und Parke, 1960) wurde von der Sammlung von Algenkulturen in Göttingen (SAG) bezogen.

*Ostreococcus tauri*, Stamm OTTH0595-Genome wurde von der Roscoff Culture Collection (RCC), Roscoff, Frankreich bezogen.

### 2.6.4 Pflanzen

*Arabidopsis thaliana* Columbia (Col 0)

## 2.7 Kulturmedien

### 2.7.1 Bakterienmedien

Für die Herstellung von Festmedien wurden jeweils 1,5 % Micro-Agar (Duchefa, Haarlem, Niederlande) hinzugefügt.

#### **Medien für *E. coli*:**

LB-Medium (Luria und Bertani-Medium; (Raleigh et al., 1989)

LB-Medium enthielt 1 % (w/v) Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt und 1 % (w/v) NaCl. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt.

SOC-Medium (Hanahan, 1983)

SOC-Medium enthielt 0,2 % (w/v) Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,05 % (w/v) NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,4 % (w/v) Glukose. Die Glukose, MgSO<sub>4</sub> und MgCl<sub>2</sub> wurden als sterile Lösungen nach dem Autoklavieren zugegeben.

#### **Medien für *A. tumefaciens*:**

YEB-Medium

YEB-Medium enthielt 0,5 % (w/v) Fleischextrakt, 0,1 % (w/v) Hefeextrakt, 0,1 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Saccharose und 5 mM MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O.

### 2.7.2 Hefemedien

Für die Herstellung von Festmedien wurden jeweils 2 % (w/v) Micro-Agar (Duchefa, Haarlem, Niederlande) hinzugefügt.

#### YPAD-Medium (Vollmedium):

YPAD-Medium enthielt 2 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) Hefeextrakt und 2 % (w/v) Glukose.

#### SC-Medium (Selektionsmedium):

SC-Medium enthielt 0,17 % (w/v) Yeast nitrogen base w/o amino acids (Q-BIOgene, Heidelberg, Deutschland), 0,5 % (w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,2 % (w/v) Dropout-Puder und entweder 2 % (w/v) Glukose (Festmedium), 2 % (w/v) Raffinose (bei Vorkulturen) oder 2 % (w/v) Galaktose (Expressionskulturen). Der entsprechende Zucker (sterilfiltriert) und das Drop-out-Pulver wurden erst nach dem Autoklavieren zugegeben.

#### Drop-out-Pulver (-Leucin/-Tryptophan/-Uracil)

Adenin (Hemisulfat)	2 g
L-Arginin (HCl)	2 g
L-Histidin (HCl)	2 g
L-Isoleucin	2 g
L-Lysin (HCl)	2 g
L-Methionin	2 g
L-Phenylalanin	2 g
L-Serin	2 g
L-Threonin	2 g
L-Tyrosin	2 g
L-Valin	9 g

Die Substanzen wurden vermischt und in einem Mörser pulverisiert.

Je nach Selektionsbedingung wurden Leucin, Tryptophan und/oder Uracil separat in das Drop-out-Pulver gemischt (je 2 g zu dem oben aufgelisteten Gemisch).

### 2.7.3 Algenmedien

*M. squamata* und *O. tauri* wurden in Brackwassermedium angezogen. Das Medium enthielt 2 mM  $\text{KNO}_3$ , 0,1 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  und 0,17 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 30 ml Erdextrakt, 5 ml Spurenelementelösung, 450 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$ , 455 ml gefiltertes Meerwasser und  $5 \cdot 10^{-6}$  g/l Cyanocobalamin (Vitamin  $\text{B}_{12}$ ). Das Vitamin wurde dem Medium erst nach dem Autoklavieren zugesetzt.

Erdextrakt wurde aus Vorgartenerde durch Aufkochen mit Wasser hergestellt. Durch dreimaliges Autoklavieren der mit Wasser versetzten Erde in einem Abstand von 24 h wurden Bakterien und Pilzsporen abgetötet. Erdpartikel wurden durch Zentrifugation sedimentiert. Der flüssige Überstand, der Erdextrakt, wurde abgenommen, durch wiederholtes Filtrieren von den restlichen Festbestandteilen befreit und bei 4 °C gelagert.

Spurenelementelösung:

I	Stocklösung (g/100ml)	eingesetztes Volumen
ZnSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,1	1 ml
MnSO <sub>4</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	0,1	2 ml
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,2	5 ml
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0,02	5 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	0,02	5 ml
CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	0,0005	1 ml
ddH <sub>2</sub> O		881 ml
		total 1 l

II	Stocklösung (g/100ml)	eingesetztes Volumen
FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,7	
EDTA	0,8	
ddH <sub>2</sub> O		100 ml

Das FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O wurde zusammen mit dem EDTA zunächst als separate Lösung (II) angesetzt, um Präzipitate zu vermeiden. Nach dem Autoklavieren wurden Lösungen I und II vereinigt.

## 2.8 Medienzusätze

Zusatz	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
Carbenicillin	H <sub>2</sub> O	100 mg/ml	100 mg/l
Kanamycin	H <sub>2</sub> O	50 mg/ml	25 mg/l
Rifampicin	Dimethylsulfoxid (DMSO)	50 mg/ml	50 mg/l
IPTG	H <sub>2</sub> O	0,1 M	0,2 mM
X-Gal	Dimethylformamid (DMF)	2 % (w/v)	0,004 %

Die wäßrigen Stammlösungen wurden sterilfiltriert.

## 2.9 Wachstumsbedingungen der Pflanzen

Col-0 und transgene *A. thaliana*-Pflanzen wurden in Frühstorfer Erde<sup>®</sup> Typ: EP Nr. 340, Industrie Erdwerk Archut, Lauterbach-Wallenrod, Deutschland im Gewächshaus angezogen. Die Licht- / Dunkelphase betrug 16 h / 8 h. Die Lufttemperatur während der Lichtperiode betrug 20 - 22 °C und während der Dunkelperiode 16 - 18 °C.

## 2.10 Präparation von RNA und DNA aus biologischen Proben

### 2.10.1 Isolierung von RNA aus Algen

Total-RNA aus Algenmaterial wurde stets mit Trizol isoliert. Dazu wurden 2 - 200 mg Algenmaterial von drei bis vier Wochen alten *M. squamata*- oder *O. tauri*-Kulturen durch Zentrifugation (3320 g, 10 min) bei 4 °C geerntet. Die Algensedimente wurden in flüssigem N<sub>2</sub> unter Zugabe von 1 ml Trizol gemörsert. Das entstandene Pulver wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, aufgetaut und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 20 000 g bei 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde abgenommen, mit 200 µl Chloroform versetzt und 15 sec mit der Hand ausgeschüttelt. Die Proben wurden 2 - 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut für 15 min zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen, mit einem halben Probenvolumen Isopropanol und einem halben Probenvolumen High Salt Precipitation Buffer (0,8 M NaCitrat, 1,2 M NaCl) versetzt, durch Invertieren gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden für 10 min bei 20 000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde zweimal mit je 900 µl 75 %-igem Ethanol gewaschen und bei 1100 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die RNA im Niederschlag wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 10 - 20 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

Trizol:

3,8 ml Roti-Phenol (in TE-Puffer äquilibriertes Phenol, pH 8; Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
2 ml 4 M Guanidiniumthiocyanat  
1 ml 4 M Ammoniumthiocyanat  
334 µl 3 M NaAcetat pH 5,0  
500 µl Glycerin  
ddH<sub>2</sub>O auf 10 ml

### 2.10.2 Isolierung von genomischer DNA aus Algen

Ergiebige *M. squamata*- oder *O. tauri*-Kulturen wurden für 10 min zentrifugiert (3320 g, 10 min, bei 4 °C) und der Überstand dekantiert. Das Algensediment wurde in 250 µl CTAB/-Puffer (2% (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid, 100 mM Tris-HCl, pH 8, 20 mM EDTA, pH 8, 1,4 M NaCl) mit 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol resuspendiert. Die Proben wurden für 3 h bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt und ausgeschüttelt. Nach 3-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch zur Phasentrennung bei 1100 g zentrifugiert. Die wäßrige obere Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1/20 Probenvolumen auf 65 °C vorgewärmter CTAB/NaCl-Lösung (10 % CTAB-Puffer; 0,7 % (w/v) NaCl) versetzt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol und Mischen wurde die DNA gefällt. Die Proben wurden bei 20 000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die gefällte DNA mit 100 µl 75 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach Entfernung des Ethanols wurde die DNA bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 bis 100 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.10.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Plasmid-DNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid Kits von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Eluiert wurde die Plasmid-DNA mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O.

### 2.10.4 Reinigung und Präzipitation von DNA/RNA

Die Extraktion von DNA/RNA-haltigen Lösungen mit Phenol-Chloroform (1:1, v/v) diente der Entfernung von Proteinen. Dazu wurde die DNA-Lösung mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 200 µl gebracht und mit einem Probenvolumen Phenol-Chloroform gemischt. Durch Zentrifugation bei 16 000 g für 5 min wurden die wässrige und die organische Phase voneinander getrennt. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Nukleinsäuren durch Zugabe und Mischung von weiteren 200 µl Chloroform von Phenolresten gesäubert. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation und Überführung der Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß. Zur Fällung der Nukleinsäuren wurde der Überstand mit 1/10 Probenvolumen 3 M Na-Acetat, pH 5,2, und 2,5 Probenvolumen 96 % (v/v) Ethanol versetzt und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung für 10 min bei 16 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen und das DNA- bzw. RNA-Niederschlag anschließend mit 250 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, im offenen Reaktionsgefäß bei 37 °C getrocknet und in sterilem ddH<sub>2</sub>O gelöst.

## **2.11 Elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA**

### **2.11.1 Auftrennung von DNA in Agarosegelen**

In Abhängigkeit von der weiteren Verwendung der DNA-Fragmente wurden 0,8 - 2 %-ige Agarosegele für die horizontale Agarosegelelektrophorese verwendet. Als Gel- und Laufpuffer diente 1x TEA-Puffer (40 mM Tris-Acetat, pH 8,3, 2 mM EDTA). Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Probenvolumen Probenpuffer (50 % Glycerin, 0,2 g/ml Saccharose, 250 mM EDTA, 0,4 % Orange G) versetzt. Als Größen- und Mengenstandard wurden 2,5 µg des GeneRuler™ 1 kb DNA Ladders (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 70 - 120 Volt durchgeführt. Anschließend wurden die Gele für 5 - 15 min in einem Ethidiumbromidbad (10 µg/ml EtBr in ddH<sub>2</sub>O) inkubiert. Die DNA-Banden konnten dann durch UV-Licht im Gel-Detektionssystem AIDA (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) sichtbar gemacht und dokumentiert werden (Programm DIANA).

### **2.11.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA**

Die Konzentrationen von DNA und RNA wurden anhand bekannter DNA-Mengen als Standard in mit Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen abgeschätzt. Als Größenstandard wurde jeweils 0,5 µg GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder eingesetzt. Anhand des Vergleichs der Helligkeit der Proben- und Markerbanden wurden Konzentrationen abgeschätzt. Im Fall von RNA gab das Mengenverhältnis von 28S rRNA zu 18S rRNA Auskunft über den Abbaugrad. Um den Abbau der RNA während des Laufes zu verhindern, wurden Kammer, Gelschlitten und Kamm vor dem Gießen des Gels für mindestens 30 min zur Inaktivierung von RNAsen in 1 % (w/v) SDS-Lösung inkubiert.

## 2.12 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 2.12.1 Standard-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der selektiven Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. In diesem Verfahren wird doppelsträngige DNA zunächst thermisch denaturiert, d.h. die beiden Stränge trennen sich voneinander, wenn die DNA auf mehr als 80 °C erhitzt wird. Mit Hilfe von hitzestabilen DNA-Polymerasen können Teile der Einzelstränge repliziert werden. Voraussetzung für die Amplifikation sind zwei spezifische oder auch degenerierte Oligonukleotide, die als Primer eingesetzt werden und an den Enden der Zielsequenz liegen müssen. Die Primer werden ebenso wie ein Gemisch aus den vier Desoxynukleotiden dem Reaktionsansatz im Überschuß zugesetzt. Sie lagern sich, wenn die Temperatur sinkt, an komplementäre Sequenzen der denaturierten Matrizen-DNA an und bilden so den Startpunkt zur Synthese des Gegenstrangs durch die DNA-Polymerase. Die Thermostabilität der DNA-Polymerase erlaubt eine Automatisierung des PCR-Prozesses, da das Enzym nicht nach jedem Denaturierungsschritt erneut zugesetzt werden muß. Auf diese Weise ist es möglich, den Reaktionsansatz Zyklen von Denaturierung, Primeranlagerung und Doppelstrangsynthese immer wieder durchlaufen zu lassen. Die Anzahl der Kopien einer Zielsequenz steigt dabei exponentiell an. Für analytische Zwecke wurde die Reaktion in 25 µl und für präparative Zwecke in 50 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Im Thermocycler durchlief der Reaktionsansatz vorprogrammierte Temperaturzyklen. Beispielhaft wird hier ein Standard-Programm wiedergegeben:

- |                        |  |
|------------------------|--|
| 1. 95 °C               | 30 s (Denaturierung)                                   |
| 2. 95 °C               | 30 s (Denaturierung)                                   |
| 3. T <sub>Ann</sub> °C | 30 s (Annealing, Anlagerung)                           |
| 4. 72 °C               | n s (Elongation) (ca. 1 min pro kb erwartetes Produkt) |
|                        | Der Zyklus von 2. - 4. wurde 18 - 35mal wiederholt.    |
| 5. 72 °C               | 3 - 10 min   |

T<sub>Ann</sub> ist die Anlagerungs-(Annealing)-Temperatur der verwendeten Primer (ca. 3 °C unter der Schmelztemperatur). Die Schmelztemperatur läßt sich folgendermaßen berechnen:

$$T_m [°C] = 69,3 + 0,41[\%GC] - 650/n \text{ (wobei } n = \text{Anzahl der Nukleotide)}$$

Durch Variationen der Anlagerungstemperatur, MgCl<sub>2</sub>-Konzentration und Zugabe von DMSO (erniedrigt die Anlagerungstemperatur, T<sub>Ann</sub>) im Reaktionsansatz und Programmierung des Thermocyclers ist eine Optimierung im Einzelfall möglich.

### 2.12.2 cDNA-Synthese und Reverse Transkriptase-PCR

Die Methode der Reverse Transkriptase-PCR (Mullis und Faloona, 1987) dient der Amplifikation von Sequenzabschnitten auf der Basis von mRNA. Bei dem hierfür notwendigen Enzym, der Reversen Transkriptase (RT), handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase ohne zusätzliche Exonukleaseaktivität. Sie synthetisiert auf der Basis einer RNA-Matrize einen komplementären *copy*DNA (cDNA)-Gegenstrang. Vor der RT-Reaktion wurde die RNA mit RNase-freier DNase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland; nach Angaben des Herstellers) behandelt. Für die Synthese von Einfach- und Doppelstrang-cDNA wurde die AMV Reverse Transkriptase und der Second-Strand Enzyme Cocktail, beides von BD Biosciences Clontech (Heidelberg, Deutschland) benutzt. Die Synthese der Einfach- und Doppelstrang-cDNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Qualitätskontrolle der RT-Reaktion wurde mit 0,5 µl der RT-Reaktionsansätze eine PCR mit Ubiquitin spezifischen Primern, Ubi-for und Ubi-rev, (siehe Anhang) durchgeführt. Ubiquitin ist ein hochkonserviertes Protein und wird von Polyubiquitinen kodiert, die sich in ihren Größen unterscheiden. Die Längen der Ubiquitin-PCR-Banden auf dem Kontrollgel sind ein Anzeichen für die Güte der RNA-Präparation und RT-PCR.

### 2.12.3 Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Kolonie-PCR wurden transformierte Einzelklone mit spezifischen Primern auf das Vorhandensein des gewünschten DNA-Fragments überprüft. Bakterienkolonien wurden mit sterilen Zahnstochern gepickt und in dem PCR-Reaktionsansatz gelöst. Zum Abtöten und Aufschließen der Bakterien wurden der eigentlichen Amplifikationsreaktion (siehe 2.12.1) 8 min bei 95 °C im PCR-Programm vorangestellt.

### 2.12.4 5'-und 3'-RACE-PCR

Zur Amplifikation unbekannter Sequenzabschnitte eines Gens wurde der Marathon<sup>TM</sup> cDNA Amplification Kit verwendet. Dieser Kit bietet die Möglichkeit, sowohl 5' als auch 3'-Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) mit der selben cDNA-Matrize durchzuführen. Die Durchführung erfolgte nach Anweisungen des Herstellers. Als DNA-Polymerase wurde der Advantage 2<sup>®</sup> Polymerase Mix verwendet.

### 2.12.5 Fusions-PCR (Overlap-PCR)

Zur Herstellung von Hybridkonstrukten aus DNA-Fragmenten verschiedener Gene, wurden die zu fusionierenden Fragmente zunächst unter Verwendung der Expand<sup>TM</sup> High Fidelity Polymerase durch PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden so konstruiert, daß die 3'-Enden komplementär zur amplifizierenden Sequenz waren und die 5'-Enden der Primer eine Überlappung mit der späteren Fusionssequenz aufwiesen. Die DNA-Fragmente wurden anschließend in entsprechender Kombination in der eigentlichen Fusions-PCR eingesetzt. Die hierbei verwendeten Primer waren komplementär zu den jeweils äußersten Enden des synthetisierten Hybridgens. Die komplementären Überhänge der einzelnen Fragmente, aus denen ein Hybridgen konstruiert wurde, dienten in diesen Fusions-PCRs als „interne“ Primer.

### 2.12.6 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung unbekannter DNA-Fragmente und die Kontrolle auf Korrektheit von Nukleotidsequenzen erfolgte nach der Methode von (Sanger et al., 1977) an einem Sequenzanalyse-Automaten (ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 Genetic Analyser, Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Für die Sequenzierungsreaktion wurde der ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.1 verwendet. Der Kit beruht auf der Verwendung von Didesoxynukleotiden, die aufgrund ihrer fehlenden 3'-OH-Gruppe zum Kettenabbruch bei der DNA-Polymerase-Reaktion führen („Cycle Sequencing“). Die Didesoxynukleotide sind hierbei mit einem basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoff konjugiert. Der Reaktionsansatz setzte sich aus 200 - 300 ng DNA-Matrize, 1,5 µl BDT *Ready Reaction Mix*, 1,5 µl *half term*-Puffer, 1 µl Sequenzierungsprimer (0,5 µM), und 5 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O zusammen. Das Temperaturprofil der Sequenzierungs-PCR: 1 min bei 96 °C gefolgt von 25 Zyklen mit 5 s bei 96 °C, 15 s bei 55 °C und 4 min bei 60 °C. Nach der Sequenzierungs-PCR wurden die Ansätze mit 2 µl 3 M Na-Acetat (pH 5), 2 µl 125 mM EDTA und 50 µl Ethanol (96 %, v/v) gefällt und die DNA durch Zentrifugation (20 000g, 20 min) sedimentiert. Nach dem Waschen des DNA-Niederschlags mit 70 µl 70 % (v/v)-igem Ethanol wurde die DNA bei 90 °C für 1 min getrocknet und in 15 µl deionisiertem Formamid aufgenommen. Die Lagerung bis zur Analyse erfolgte bei -20 °C.

## **2.13 Klonierungsmethoden**

### **2.13.1 Restriktion von Plasmid-DNA und genomischer DNA**

Restriktionsenzyme erkennen spezifisch palindromische Sequenzen in Doppelstrang-DNA und schneiden, je nach Enzym, spezifisch in der Symmetrieachse, wobei so genannte „blunt ends“ entstehen, oder versetzt, wobei überhängende 5'- oder 3'-Enden entstehen. Plasmid-DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen in den entsprechenden Puffersystemen des Herstellers gespalten. Zum Restriktionsverdau wurden die Ansätze für 1 - 4 h bei 37 °C inkubiert.

### **2.13.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Fragmente, die für Overlap-PCR (siehe 2.12.5) oder Ligationen (siehe 2.13.4) eingesetzt werden sollten, wurden aus Agarosegelen mit Hilfe des „NucleoSpin<sup>®</sup> Extract Kit“ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Die Elution der DNA erfolgte mit 10 - 30 µl ddH<sub>2</sub>O. Anschließend wurde die Konzentration der DNA in dem Eluat bestimmt (siehe 2.11.2).

### **2.13.3 Behandlung von Plasmid-DNA mit Alkalischer Phosphatase**

Die Behandlung von restringierten Plasmiden mit Alkalischer Phosphatase führt zu einer Dephosphorylierung der geschnittenen 5'-Phosphat-Enden der Plasmide. Dadurch ließ sich eine Religation der Vektoren und somit die Isolierung falsch-positiver Klone vermeiden. In dieser Arbeit wurde mit der Antarctic Alkalischen Phosphatase von New England Biolabs (Ipswich, UK) nach Angaben des Herstellers gearbeitet.

### **2.13.4 Ligation**

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphat und 3'-OH-Gruppen. Für die Konstruktion von rekombinanten Plasmiden wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl die zu ligierende DNA, d.h. Vektor (5 - 10 ng) und DNA-Fragment in einem Verhältnis von 1:10 mit 1 - 5 Weiss u/µl T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und 1 µl 10x Ligasepuffer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Handelte es sich bei dem DNA-Fragment um ein PCR-Produkt, wurde zur Ligation das „pGEM<sup>®</sup>-T“-Vektor System I (Promega, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

## 2.14 Transformation von *E. coli*

Als Transformation bezeichnet man die Übertragung von freier, löslicher DNA auf einen Empfängerorganismus. Bei der Transformation von Bakterien macht man sich die Kompetenz, d.h. die natürliche Aufnahmebereitschaft von Bakterien für Fremd-DNA, zunutze. In der Regel ist die natürliche Kompetenz nur gering, sie kann aber durch Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$  und anschließende Hitzeeinwirkung gesteigert werden.

### 2.14.1 Präparation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen wurde die Methode von (Inoue et al., 1990) modifiziert. Diese Methode erzeugt kompetente Zellen mit hoher Transformationseffizienz, die bei  $-80\text{ °C}$  lange Zeit gelagert werden können. Für die Herstellung von kompetenten Zellen wurde der *E. coli* Stamm XL1blue verwendet.

5 ml LB-Medium wurden mit XL1blue angeimpft und über Nacht bei  $37\text{ °C}$  geschüttelt. Mit dieser 5 ml Übernachtskultur wurden 200 ml LB Medium ( $\text{OD}_{600} = 0,25 - 0,3$ ) angeimpft und bei  $37\text{ °C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von  $0,6 - 0,7$  angezogen. Hatte die Bakterienkultur diese OD erreicht, wurden die Zellen auf 50 ml Reaktionsgefäße verteilt und durch Zentrifugation ( $3320\text{ g}$ ,  $10\text{ min}$ ,  $4\text{ °C}$ ) geerntet. Der Überstand wurde abgossen und die Zellen auf Eis gestellt. Zu den Zellen wurden jeweils 15 ml vorgekühlter Transformationspuffer ( $10\text{ mM PIPES}$ ,  $15\text{ mM CaCl}_2$ ,  $250\text{ mM KCl}$ ,  $\text{pH } 6,7$ ,  $55\text{ mM MnCl}_2$ , sterilfiltriert) gegeben und die Zellen vorsichtig resuspendiert. Die Suspensionen wurden für  $15\text{ min}$  auf Eis inkubiert und anschließend wurden die Zellen bei  $3220\text{ g}$  für  $10\text{ min}$ ,  $4\text{ °C}$  abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in  $4\text{ ml}$  Transformationspuffer und  $300\text{ }\mu\text{l}$  DMSO resuspendiert und weitere  $5 - 10\text{ min}$  auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde aliquotiert ( $300 - 500\text{ }\mu\text{l}$ ) und sofort in flüssigem  $\text{N}_2$  schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei  $-80\text{ °C}$ .

### 2.14.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Für jede Transformation von XL1blue-Zellen mit Plasmid-DNA wurde ein  $100\text{ }\mu\text{l}$  Aliquot kompetenter Zellen benötigt. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurden entweder  $10\text{ }\mu\text{l}$  eines Ligationsansatzes (siehe 2.13.4) oder  $0,5\text{ }\mu\text{l}$  aus Bakterien isolierte Plasmid-DNA (siehe 2.10.3) zu den Zellen gegeben. Nach kurzem Mischen wurden die Ansätze für  $20\text{ min}$  auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für  $30\text{ s}$  bei  $42\text{ °C}$  einem Hitzeschock ausgesetzt und für  $1\text{ min}$  auf Eis gestellt. Es wurde  $0,7\text{ ml}$  SOC-

Medium zugegeben und die Ansätze zur Expression der Antibiotikaresistenz für 1 h bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation, wurden die Transformationsansätze auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum plattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

## **2.15 Transformation von *A. tumefaciens***

### **2.15.1 Präparation chemisch-kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen**

Für die Herstellung der kompetenten *A. tumefaciens* Bakterien wurden zunächst 5 ml YEB-Medium angeimpft, bei 28 °C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag 2 ml davon in 50 ml YEB-Medium verdünnt. Die Zellen wurden bei 28 °C für weitere 5 h bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultiviert und danach bei 2 300 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in 10 ml 0,15 M NaCl resuspendiert und jeweils bei 2 300 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Bakteriensediment in 1 ml eiskaltem 75 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden in Aliquots zu jeweils 200 µl in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bis zum Gebrauch bei -80 °C.

### **2.15.2 Transformation kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen**

Für die Transformation von *A. tumefaciens* EHA105 (Hood et al., 1993) wurde jeweils ein Aliquot von 200 µl kompetenten Zellen benötigt. Die Zellen wurden in der Hand aufgetaut, mit 5 µl aus Bakterien isolierter Plasmid-DNA vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 2 min bei -80 °C eingefroren und bei 37 °C wieder aufgetaut. Es wurde nun 1 ml YEB-Medium zugegeben, gemischt und die Ansätze wurden für 4 h bei 28 ° unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Die Transformationsansätze wurden anschließend auf YEB-Medium, welches zur Selektion Kanamycin (Selektion des Vektors) und Rifampicin (Selektion der Agrobakterien) enthielt, ausplattiert und für zwei Tage bei 28 °C inkubiert.

## **2.16 Transformation von *S. cerevisiae***

Um lösliche Fremd-DNA in Hefezellen einschleusen zu können, müssen deren Membranen permeabel gemacht werden. Kompetente Hefen lassen sich im Labor mit Hilfe

der Lithiumacetat-Methode (Ito et al., 1983) herstellen und durch Hitzeeinwirkung bei 42 °C transformieren

### **2.16.1 Transformation chemisch-kompetenter Hefezellen (PEG-Methode)**

Für die Herstellung und anschließende Transformation chemisch kompetenter Hefezellen wurden 2 ml YPAD-Medium mit dem Hefestamm INVSc1 angeimpft und über Nacht bei 30 °C im Schüttler (200 rpm) inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 50 ml frisches YPAD-Medium mit der Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 angeimpft. Diese Kultur wurde bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,7 - 1,0 ebenfalls bei 30 °C auf einem Schüttler (200 rpm) kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1 500 g für 3 min geerntet und einmal mit 10 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 800 µl 0,1 M LiAc in TE-Puffer (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8, sterilfiltriert) resuspendiert. Je 200 µl Aliquots wurden mit 1 – 3 µg Plasmid-DNA und 800 µl Transformationsmix (660 µl 50 %-iges PEG 4000, 85 µl 1 M LiAc, 85 µl TE-Puffer, pH 8,0) gemischt. Die Transformationsansätze wurden für 30 min bei 30 °C inkubiert und anschließend einem Hitzeschock bei 42 °C für 25 min ausgesetzt. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation bei 4 500 g für 1 min sedimentiert und der Überstand verworfen. Der Zellschlag wurde in 100 µl 0,9 % NaCl resuspendiert und auf entsprechendem SD-Selektionsmedium ausplattiert.

## **2.17 Transformation von Pflanzen**

### **2.17.1 Transformation von *A. thaliana* durch *A. tumefaciens***

Pflanzentransformationen erfolgten durch *A. tumefaciens* (Stamm EHA105) vermittelten Gentransfer nach der „Flower-Dip“-Methode von (Clough und Bent, 1998). Dazu wurden die transformierten Agrobakterien in 400 ml YEB-Medium bei 28 °C unter Schütteln (200 rpm) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 angezogen, anschließend durch Zentrifugation bei 3 220 g und 4 °C für 20 min geerntet und in 200 ml einer 5 %-igen Saccharoselösung resuspendiert. Diese Suspension wurde für 20 - 30 min auf Eis inkubiert. Kurz vor der *Arabidopsis*-Transformation wurde in die Zellsuspension 100 µl 0,05 %-iges (v/v) Silwet L-77 (OSI Specialties, Danbury, CT, USA) gegeben. Die Blütenstände der zu transformierenden *Arabidopsis*-Pflanzen wurden für ca. 5 - 8 s unter leichtem Schwenken in die vorbereitete Agrobakterien-Suspension getaucht.

## 2.18 Computergestützte Datenbankvergleiche, Sequenz- und Hydropathieanalysen

Die durch RACE-PCR neu isolierten Sequenzen wurden durch Sequenzvergleiche mit im Internet öffentlich zugänglichen Sequenzdatenbanken ausgewertet. Die Sequenzvergleiche erfolgten über Gendatenbanken von NCBI (National Center of Biotechnology Information) mittels des BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Tool; Altschul et al., 1997). Der Paarweise Vergleich von Aminosäuresequenzen erfolgte mit Hilfe des EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms (Rice et al., 2000). Die Sequenzvergleiche mehrerer Aminosäuresequenzen erfolgten durch das Programm MultAlin (Corpet, 1988) (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>). Die Darstellung der Sequenzvergleiche (Alignments) erfolgte durch Boxshade 3.21 ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)).

Die Computergestützten Hydropathieanalysen der membrangebundenen Desaturasen wurden mit Hilfe des ProtScale-Programms (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>) durchgeführt. Vergleichende Topologie-Vorhersagen wurden durch die Programme TMHMM (Krogh et al., 2001; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) und PredictProtein (Rost et al., 2004; <http://www.predictprotein.org/>) durchgeführt.

Weitere genutzte Datenbanken oder online Programme:

iPSORT (Nakai und Horton, 1999)

Predotar V1.03 (Emanuelsson et al., 2000)

ChloroP 1.1 (Emanuelsson et al., 1999)

WoLFPSORT (Horton et al., 2007)

## 2.19 Erzeugung der verwendeten cDNA-Klone

### 2.19.1 Isolierung und Klonierung von *Msl* und *MslII* aus *Mantoniella squamata*

Durch Sequenzierungen einer cDNA-Bank ( $\lambda$ ZAPII cDNA-Bank, Stratagene) von *M. squamata* konnten Expressed Sequence Tag (EST)-Sequenzen identifiziert werden, die für mögliche „Front End“-Desaturasen kodieren. Die EST-Sequenzen wiesen eine durchschnittliche Länge von 500 bp auf (Dr. Amine Abbadi, persönliche Mitteilung). Diese EST-Sequenzinformationen dienten als Ausgangspunkt für die Isolierung der vollständigen Gensequenzen.

Um die vollständigen cDNA-Sequenzen zu isolieren, wurde die Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)-Technik angewendet. Dazu wurden mit Hilfe des Marathon cDNA amplification Kits 5 µl von *M. squamata* Total-RNA durch die Reverse Transkriptase-DNA-Polymerase in cDNA umgeschrieben und zu Adaptor-ligierter Doppelstrang-cDNA (ds-cDNA) ligiert. Diese Adaptor-ligierte ds-cDNA diente als Matrize für die 5'- und 3'-RACE-PCRs. Für die RACE-PCRs wurden von den bekannten EST-Sequenzen genspezifische Primer abgeleitet. Die Primersequenzen für die EST-Sequenz *MsI* (später *MsΔ6*), *MsI*-5'-RACE und *MsI*-3'-RACE, sowie für die EST-Sequenz *MsII* (später *MsΔ5*), *MsII*-5'-RACE und *MsII*-3'-RACE, sind im Anhang dargestellt. RACE-Amplifikationen wurden in 50 µl Reaktionsansätzen, mit 1 × Advantage2 DNA Polymerase Puffer, 1 µl Advantage 2 DNA Polymerase, 0,2 mM je dNTP, 0,5 µM 5'-Primer oder 3'-Primer, 0,5 µM Adaptor-Primer 1 (siehe Marathon cDNA amplification Kit) und 5 µl der Adaptor-ligierten ds-cDNA durchgeführt. Das folgende PCR-Programm wurde verwendet: 30 s bei 94 °C, darauf folgten 5 Zyklen von 5 s bei 94 °C, 4 min bei 72 °C, dann 5 Zyklen von 5 s bei 94 °C, 4 min bei 70 °C und anschließend 15 - 20 Zyklen von 5 s bei 94 °C und 4 min bei 68 °C. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch getrennt, aus dem Agarosegel isoliert, über Gelextraktion aufgereinigt und anschließend in den Klonierungsvektor pGEM-T ligiert. Die klonierten RACE-Produkte wurden sequenziert. Durch die neu erworbenen Sequenzinformationen, konnten die in Frage kommenden Translationsinitiations-Codons und die Stopcodons der beiden möglichen Desaturasesequenzen identifiziert werden. Diese Sequenzinformationen wurden benutzt um Primer abzuleiten, die die Vollängen-cDNA umfaßten, und um die vollständigen cDNA-Sequenzen zu amplifizieren. Die genspezifischen Primer *MsI*-for/*MsI*-rev und *MsII*-for/*MsII*-rev (Primersequenzen siehe Anhang) wurden von den jeweiligen 5'- und 3'-Enden der kodierenden Sequenzen abgeleitet und eingesetzt, um die vollständigen Gene zu amplifizieren. Die entstehenden Amplikons wurden in den pGEM-T-Vektor ligiert. Zur Amplifikation der Vollängen-cDNAs wurde die Phusion<sup>TM</sup> DNA-Polymerase und das folgende PCR-Programm verwendet: 1 min bei 98 °C darauf folgten 25 Zyklen von 20 s bei 98 °C, 30 s bei 70 °C und 45 s bei 72 °C, anschließend erfolgte ein terminaler Extensionsschritt von 3 min bei 72 °C.

### 2.19.2 Klonierung von *OtII* aus *O. tauri*

Der offene Leserahmen der möglichen Desaturasesequenz *OtII* (*OtΔ5*) wurde mit der Phusion<sup>TM</sup> DNA-Polymerase durch PCR von genomischer DNA als Matrize amplifiziert. Die verwendeten Primer, *OtII*-for und *OtII*-rev, sind im Anhang dargestellt. Zur Amplifikation

von *OtII* wurde das folgende PCR-Programm verwendet: 1 min bei 98 °C darauf folgten 10 Zyklen von 20 s bei 98 °C, 1 min bei 72 °C - 0,1 °C pro Zyklus und 1 min bei 72 °C, anschließend folgten weitere 20 Zyklen von 20 s bei 98 °C, 1 min bei 70 °C - 0,3 °C pro Zyklus und 1 min bei 72 °C. Das PCR-Produkt wurde in einem Agarosegel aufgetrennt, aus dem Agarosegel isoliert (siehe 2.13.2), über Gelextraktion aufgereinigt und anschließend in den Klonierungsvektor pGEM-T ligiert.

## 2.20 Strategien zur Klonierung rekombinanter Plasmide

### 2.20.1 Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression von *MsI* und *MsII* in Hefe

Für die heterologe Charakterisierung der isolierten cDNA-Klone *MsI*, *MsII* (siehe 2.18.1) und *OtII* (siehe 2.18.2) in Hefe, wurden die mutmaßlichen offenen Leserahmen von *MsI*, *MsI* und *OtII* in Hefeexpressionsvektoren kloniert. Durch PCR-Amplifikation der mutmaßlichen offenen Leserahmen wurden mit Hilfe der verwendeten Primer eine Translationsinitiationssequenz mit der Basenfolge ACATA (Donahue und Cigan, 1990) vor die Startcodons eingeführt und zum anderen Restriktionsschnittstellen an die jeweiligen 5'- und 3'-Enden der cDNA angefügt. Die Translationsinitiationssequenz sollte eine optimale Translation in Hefe ermöglichen. Die Sequenzen der verwendeten Primer, *MsI*-for-*NotI* und *MsI*-rev-*BglIII*, *MsII*-for-*BamHI* und *MsII*-rev-*NheI* als auch *OtII*-for-*NotI* und *OtII*-rev-*BglIII*, sind im Anhang dargestellt. In PCR-Reaktionen zur Amplifizierung vollständiger cDNA-Klone wurde die Phusion<sup>TM</sup> DNA-Polymerase verwendet. Das verwendete PCR-Programm war: 1 min bei 98 °C darauf folgten 25 Zyklen von 20 s bei 98 °C, 30 s bei 70 °C und 45 s bei 72 °C, anschließend erfolgte ein terminaler Extensionsschritt von 3 min bei 72 °C. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und in den pGEM-T-Vektor zwischenkloniert. Nach Vermehrung der pGEM-T-Konstrukte in *E. coli* XL1blue und anschließender Plasmidisolierung wurden die offenen Leserahmen von *MsI*, *MsII* und *OtII* mit Hilfe der eingefügten Restriktionsschnittstellen aus den pGEM-T-Vektor herausgeschnitten, aufgereinigt und in pESC-LEU bzw. pESC-TRP ligiert. Es entstanden die rekombinanten Plasmide *MsI*-pESC-LEU, *MsII*-pESC-TRP und *OtII*-pESC-TRP.

Für vergleichende Charakterisierungen wurden die cDNAs der  $\Delta 6$ -Desaturasen *Ot16* und *Pt16* sowie der  $\Delta 5$ -Desaturase *Pt15*, in entsprechender Weise wie *MsI* und *MsII* bzw. *OtII*, in die Hefeexpressionsvektoren kloniert. Die Sequenzen der verwendeten Primer, *Ot16*-

for-NotI und *OtΔ6*-rev-BglII, *PtΔ6*-for-NotI und *PtΔ6*-rev-BglII als auch *PtΔ5*-for-NotI und *PtΔ5*-rev-BglII sind im Anhang dargestellt.

Für die Coexpression der  $\Delta 6$ -Desaturasen mit einer  $\Delta 6$ -Elongasen, wurden die Konstrukte *MsΔ6-PSE1*-pESC-LEU, *OtΔ6-PSE1*-pESC-LEU und *PtΔ6-PSE1*-pESC-LEU erstellt. Die kodierende Sequenz der  $\Delta 6$ -Elongase *PSE1* aus *Physcomitrella patens* (Zank et al., 2002) wurde mit Hilfe der PCR-Technik und der folgenden Primerkombination modifiziert: *PSE1*-for-*Bam*HI und *PSE1*-rev-*Nhe*I. Die entsprechenden Primersequenzen sind im Anhang dargestellt. Der modifizierte offene Leserahmen von *PSE1* wurde in die jeweils zweite vorhandene Klonierungsstelle des pESC-LEU-Vektors ligiert. Die cDNA-Sequenzen von *PSE1*, *PtΔ6* und *PtΔ5*, die hier als Ausgangsklone dienten, wurden mir freundlicherweise von Silke Schlenczek zur Verfügung gestellt. Für die Coexpression der  $\Delta 5$ -Desaturasen mit einer  $\Delta 5$ -Elongase wurde das Konstrukt *OtELO2*-pESC-URA erstellt. Die verwendete Sequenz der  $\Delta 5$ -Elongase *OtELO2* aus *O. tauri* (Meyer et al., 2004) wurde mit Hilfe der PCR-Technik und der folgenden Primerkombination modifiziert: *OtELO2*-for-*Bam*HI und *OtELO2*-rev-*Nhe*I. Die entsprechenden Primersequenzen sind im Anhang dargestellt. Der modifizierte offene Leserahmen von *OtELO2* wurde in die entsprechende Klonierungsstelle des pESC-URA-Vektors ligiert.

Durch Transformation in *E. coli* XL1blue wurden die rekombinanten Plasmide positiv selektiert und vervielfältigt, um dann zur Transformation in Hefe (siehe 2.16.1) eingesetzt zu werden. (Konstrukte siehe Anhang)

### **2.20.2 Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression von *MsΔ6* und *MsΔ5* zusammen mit *PSE1* in Pflanzen**

Als Ausgangspunkt zur Herstellung rekombinanter Plasmide für die *Arabidopsis*-Transformation diente zunächst ein pUC19-basierter Vektor. Durch verschiedene Modifikationen enthielt dieses pUC19-Derivat eine Dreifachexpressionskassette, bestehend aus drei USP-Promotoren (unbekanntes Samen Protein; Bäumlein et al., 1991) drei OCS-Terminationssequenzen (MacDonald et al., 1991) und drei verschiedenen Mehrfachklonierungsstellen zwischen je einem Promotor und einer korrespondierenden Terminatorsequenz. Dieser so angepaßte Vektor wurde pUC19-USP123OCS benannt. Die offenen Leserahmen der verschiedenen Desaturasen und Elongasen wurden mit Hilfe der PCR und entsprechenden Primern mit Restriktionsschnittstellen an die jeweiligen 5'- und 3'-Enden der cDNA angefügt. Durch PCR-Amplifikation der offenen Leserahmen der verschiedenen Desaturasen und Elongasen wurden mit Hilfe der verwendeten Primer

Restriktionsschnittstellen an die jeweiligen 5'- und 3'-Enden der cDNAs angefügt und nach Restriktionsverdau in die entsprechenden Mehrfachklonierungsstellen des pUC19-USP123OCS-Vektors ligiert. Die verwendeten Primersequenzen sind im Anhang dargestellt. Die daraus resultierenden Expressionskassetten, die jeweils drei kodierende cDNAs unter der Kontrolle des USP-Promotors und gekoppelt an jeweils eine Terminatorsequenz (OCS) enthielten, wurden aus dem pUC19-USP123OCS-Vektor mit Hilfe der Restriktionsenzyme *SbfI* oder *SacI* herausgeschnitten und in den binären Pflanzentransformationsvektor pCAMBIA3300 (siehe 2.5) ligiert. Die dadurch entstandenen Konstrukte waren Ms $\Delta$ 6-PSE1-Ms $\Delta$ 5-pCAMBIA3300, Ot $\Delta$ 6-PSE1-Ot $\Delta$ 5-pCAMBIA3300 und Pt $\Delta$ 6-PSE1-Pt $\Delta$ 5-pCAMBIA3300 und wurden zur Transformation in chemisch kompetente *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen (siehe 2.15.1) eingesetzt.

### 2.20.3 cDNA-Konstrukte für den Domänen austausch

Durch vergleichende Topologieanalysen bzw. Hydrophathieanalysen (2.18) der Desaturasen An1 und An2 konnten die jeweiligen Aminosäuresequenzen in neun Domänen (A-I) eingeteilt werden, die dann systematisch gegeneinander ausgetauscht wurden. Die Domänen austauschkonstrukte zwischen An1 und An2 wurden durch Fusions-PCRs (Horton et al., 1989) hergestellt. Zuerst wurden die einzelnen Domänen A<sub>1</sub>-I<sub>1</sub> der An1-Desaturasesequenz durch PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer enthielten überlappende Enden, die komplementär zu den entsprechenden flankierenden Sequenzregionen der An2-Desaturasesequenz waren und sind im Anhang dargestellt. Als Matrize diente ein An1-pGEM-T Klon (bereitgestellt von Dr. Ellen Hornung). Die entsprechenden Domänen der An2-Desaturase wurden auf gleiche Weise hergestellt. Als Matrize diente ein An2-pGEM-T Klon (bereitgestellt von Ellen Hornung). Die PCR-Amplifikationen wurden mit der Expand High Fidelity Polymerase (Roche Diagnostics) und folgendem PCR-Programm durchgeführt: 2 min bei 94 °C, darauf folgten 10 Zyklen von 15 s bei 94 °C, 30 s bei 68 °C, 70 s bei 72 °C, gefolgt von 20 Zyklen von 15 s bei 94 °C, 30 s bei 70 °C, und 70 s bei 72 °C; anschließend erfolgte ein terminaler Extensionsschritt von 5 min bei 72 °C. Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet. In darauf folgenden PCR-Reaktionen wurden die amplifizierten Sequenzfragmente fusioniert. Die Primer, die dazu verwendet wurden, waren An2for, An2rev, An1for und An1rev (Primersequenzen siehe Anhang), und es wurde das gleiche PCR-Protokoll benutzt wie im ersten Schritt der Herstellung der Sequenzfragmente. Die entstandenen Hybridgene wurden in den Subklonierungsvektor pGEM-T ligiert und nach

Vermehrung in *E. coli* XL1blue als restringierte *EcoRI/XhoI*-Fragmente in den Hefektor pYES2/CT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kloniert.

#### **2.20.4 Herstellung des rekombinanten Plasmides für die heterologe Expression von *An1* in Pflanzen**

Das rekombinante Plasmid für die *Arabidopsis*-Transformation wurde mit Hilfe des Gateway-Systems von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) konstruiert. Die Gateway-Technologie basiert auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda und erlaubt einen gerichteten Austausch von cDNA-Klonen zwischen verschiedenen Vektoren. Die *An1*-cDNA Sequenz wurde zunächst als *EcoRI/NotI*-Fragment in den Gateway Entry Vektor pUC18-Entry (modifiziert durch Dr. Ellen Hornung) subkloniert. Der Vektor pUC18-Entry besitzt neben einer multiplen Klonierungsstelle zwei Rekombinationsstellen, die für die Übertragung der cDNA-Klone zwischen Donorvektor und Zielvektor erforderlich sind. Über homologe Rekombination mittels der sogenannten Clonase<sup>®</sup> bestehend aus einer Integrase und einer Excisionase wurde die *An1*-cDNA vom Donorvektor in den binären Pflanzentransformationsvektor pCAMBIA3300-Gateway-Vektor (modifiziert durch Dr. Ellen Hornung) übertragen. Der Reaktionsansatz bestand aus ~100 ng des Donorvektors (pUC18-Entry-*An1*), ~200 ng Zielvektor (pCAMBIA3300-Gateway-Vektor), 1 µl des Clonase-Enzym-Mix und ad 8 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0) und wurde für die Reaktion für 1 h bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl Proteinase K und 10-minütige Inkubation bei 37 °C gestoppt. Durch Transformation in *E. coli* XL1blue wurde das *An1*-pCAMBIA3300-Konstrukt positiv selektiert und vervielfältigt und zur Transformation in chemisch kompetente *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen (siehe 2.15.1) eingesetzt.

#### **2.21 Heterologe Expression verschiedener cDNA-Klone in *S. cerevisiae***

Die funktionale Charakterisierung der Desaturasen erfolgte durch heretologe Expression in Hefe. Der verwendete Hefestamm INVSc1 ist auxotroph für Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil. Diese Auxotrophien wurden zur Selektion auf transgene Zellen, die das gewünschte Transgen gekoppelt an Auxotrophiemarker enthielten (Hefeexpressionvektoren siehe 2.5), ausgenutzt. Die Klonierung der rekombinanten Plasmide für die heterologe Expression ist unter 2.20.1 und 2.20.3 beschrieben. Die verwendeten pESC- und pYES-Vektoren enthalten stromabwärts der klonierten cDNAs jeweils einen Galaktose-induzierbaren Promotor, *GAL1* oder *GAL10*. Zur Expression von Transgenen

wurden Vorkulturen mit den entsprechenden transformierten Hefeklonen angeimpft und in 2 ml Selektionsmedium (siehe 2.7.2 SC-Medien) für 24 h bei 30 °C angezogen. Die Expressionskulturen (siehe 2.7.2 SC-Medien) wurden dann mit der Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 angeimpft und bei Raumtemperatur (~22 °C) und 150 rpm für weitere 72 h auf einem Schüttler kultiviert. Durch das Überführen der Hefezellen in das Expressionsmedium mit Galaktose wurde die Expression des Transgens induziert. Durch Applikation verschiedener Fettsäuren in das Expressionsmedium wurden den exprimierten Desaturasen ihre Fettsäuresubstrate zugeführt. Die freien Fettsäuren werden von den Hefezellen über die Membran aufgenommen. Allerdings ist die Aufnahme bei sehr langkettigen ungesättigten Fettsäuren durch die erhöhte Polarität erschwert. Um die verringerte Aufnahmeeffizienz zu umgehen, wurde den Expressionskulturen als Detergenz Igepal CA 630 ('NP 40'; Fluka, München, Deutschland) in einer finalen Konzentration von 1 % zugesetzt. Diese permeabilisiert die Zellmembran der Hefezellen und erleichterte die Fettsäureaufnahme in die Zelle. Die Ernte der Hefezellen erfolgte durch Zentrifugation (5 min, 1500 g, bei 4°C) in Glasreaktionsgefäßen. Der Zelleniederschlag wurde zweimal mit sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in Lipid- (siehe 2.22.1), Fettsäure- (siehe 2.22.3) oder Acyl-CoA-Extraktionen (siehe 2.22.6) aufgearbeitet.

## **2.22 Lipidanalytik**

### **2.22.1 Isolierung von Gesamtlipiden, Lipidklassen und Lipidunterklassen aus Hefe**

Für die Lipidanalysen wurden 50 ml Hefeexpressionskulturen geerntet. Die geernteten Zelleniederschläge wurden in 5 ml Chloroform/Methanol (1:2 v/v) homogenisiert und für mindestens 4 h bei 4 °C geschüttelt. Durch Zentrifugation bei 1500 g, für 5 min bei 4 °C wurden die Zellüberreste sedimentiert. Überstände wurden in neue Glasreaktionsgefäße überführt. Das Zellsediment wurde in einem zweiten Extraktionsschritt mit 5 ml Chloroform/Methanol (2:1 v/v) für mindestens weitere 24 h geschüttelt und anschließend wie oben beschrieben von den Zellresten befreit. Die organischen Phasen wurden vereinigt und unter strömendem N<sub>2</sub> getrocknet. Die getrockneten Gesamtlipide wurden in 1 ml Chloroform gelöst. Die Trennung der Lipidklassen, Neutrallipide und Phospholipide, erfolgte über Kieselsäure-Säulen (Bond Elut SI, 100 mg/ml; Varian) unter Verwendung entsprechender organischer Lösungsmittel. Dazu wurden die Kieselsäure -Säulen mit 1 ml Chloroform äquilibriert und anschließend Gesamtlipidextrakte auf die Säulen geladen. Die Elution der

Neutrallipide erfolgte mit Chloroform. Phospholipide eluierten anschließend mit Methanol/Essigsäure (9:1, v/v).

Die Isolation der Phospholipidunterklassen, PtdCho, PtdEtn, PtdIns/PtdSer und CL, wurden durch Auftrennung der Phospholipidextrakte mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie (DC) erreicht. Die Dünnschichtchromatographie wurde in 20 x 20 x 10 cm vertikalen Glaskammern mit 100 ml Laufmittel durchgeführt. Für die DC wurden Kieselgelplatten (Feinheitsgrad 60 von Merck) verwendet. Als Laufmittel diente Chloroform/Methanol/Essigsäure (65:25:8, v/v/v). Authentische Phospholipidstandards dienten der Identifizierung der Phospholipide. Der Teil der Kieselgelplatte, auf den die Lipidstandards aufgetragen wurden, wurde mit einem Glasschneider abgetrennt und angefärbt durch Inkubation in einer CuSO<sub>4</sub>-Lösung (10 g CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O; 0,8 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in 100 ml H<sub>2</sub>O) und anschließendem Erhitzen der DC auf 180 °C (Camag TLC plate heater III) angefärbt. Nach dem Abkühlen wurden die Probenlipide von dem ungefärbten Teil der DC-Platte abgekratzt und das Pulver in ein Glasreaktionsgefäß überführt. Die Lipide wurden aus dem Kieselsäurepulver mit 1 ml des Laufmittels herausgelöst und in ein neues Glasreaktionsgefäß überführt. Nach dem Eindampfen des Laufmittels unter N<sub>2</sub> konnten die Phospholipidunterklassen zur Derivatisierung der Fettsäuren eingesetzt werden.

### **2.22.2 Isolierung von Gesamtlipiden und Lipidunterklassen aus *M. squamata* und *Arabidopsis*-Samen**

0,5 mg Algenmaterial oder 10 mg *Arabidopsis*-Samen wurden für die Lipidanalyse abgewogen und in 4 ml Chloroform/Methanol/Essigsäure (2:1:0,1 v/v/v) in einem Glasreaktionsgefäß homogenisiert. Zur Extraktion der Lipide wurde das Homogenisat bei 4 °C für 24 h inkubiert. Zelltrümmer wurden 2 min bei 3000 g sedimentiert und der Lipidüberstand in ein neues Glasreaktionsgefäß überführt. Um die restlichen Lipide aus den Zelltrümmern zu extrahieren, wurden diese in 2 ml *n*-Hexan resuspendiert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der *n*-Hexan-Extrakt wurde nach erneuter Zentrifugation von den Zelltrümmern getrennt, mit dem ersten Lipidextrakt vereinigt und unter strömenden N<sub>2</sub> getrocknet. Die getrockneten Lipide wurden dann in 200 µl Chloroform resuspendiert. Die Trennung der Lipidklassen (TAG; PtdCho; PtdEtn; PtdIns/PtdSer) erfolgte durch DC. Die DC und die Isolation der Lipide aus dem Kieselgel wurde unter gleichen Bedingungen wie unter 2.22.1 beschrieben durchgeführt.

### 2.22.3 Isolierung und Analyse von Fettsäuren aus Gesamtextrakten und isolierten Lipiden

Die Derivatisierung von Gesamtfettsäuren (freie und veresterte Fettsäuren) in Algen oder Hefekulturen zu Fettsäuremethylestern erfolgte durch saure Methanolyse (Miquel und Browse, 1992). Die Zellsedimente wurden in 0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in Methanol mit 2 % (v/v) Dimethoxypropan resuspendiert und für 1 h bei 80 °C inkubiert. Die entstandenen Fettsäuremethylester wurden mit 2 ml *n*-Hexan extrahiert und unter strömendem  $\text{N}_2$  getrocknet. Für die gaschromatographische Analyse (siehe 2.22.5) wurden die Fettsäuremethylester in einem entsprechenden Volumen (5 – 50  $\mu\text{l}$ ) Acetonitril aufgenommen.

Fettsäuremethylester über DC aufgereinigter Lipide (siehe 2.22.1 und 2.22.2) wurden durch Transesterifizierung der an Lipiden veresterten Fettsäuren mit 333  $\mu\text{l}$  Toluol/Methanol (1:2 v/v) und 167  $\mu\text{l}$  0,5 M  $\text{NaOCH}_3$  bei Raumtemperatur hergestellt (Hornung et al., 2002). Die Fettsäuremethylester wurden mit 500  $\mu\text{l}$  NaCl, 50  $\mu\text{l}$  37 %-iger HCl und 2 ml *n*-Hexan extrahiert. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels unter strömendem  $\text{N}_2$  wurden die Fettsäuremethylester in 5  $\mu\text{l}$  Acetonitril resuspendiert und gaschromatographisch analysiert (siehe 2.22.5).

### 2.22.4 Isolierung von Fettsäuren aus *Arabidopsis*-Samen

Fettsäuremethylester aus *Arabidopsis*-Einzelsamen wurden durch Transesterifizierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) (Butte et al., 1982) hergestellt. Dazu wurden Einzelsamen in einer GC-Ampulle in 5  $\mu\text{l}$  TMSH zerrieben. Die Transesterifizierung erfolgte durch Inkubation bei Raumtemperatur, gleichzeitig verdampfte das TMSH und die Fettsäuremethylester wurden für die gaschromatographische Analyse (siehe 2.22.5) in 5  $\mu\text{l}$  Acetonitril aufgenommen.

### 2.22.5 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie (GC)-Analyse wurde mit einem Agilent GC 6890 System, das an einen Flammenionisationsdetektor (FID) gekoppelt ist, durchgeführt. Die benutzte Kapillarsäule war eine Agilent 122-2332 DB-23 Säule mit den Maßen 30 m x 0,32 mm und einer Schichtdicke von 0,5  $\mu\text{m}$ . Als Trägergas diente Helium mit einer Flußrate von 1  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Die Proben wurden bei einer Temperatur von 220 °C injiziert und der Auftrennungsgradient der Fettsäuremethylester war 150 °C für 1 min, auf 150 °C – 200 °C mit

einer Rate von  $15\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , auf  $200\text{ }^{\circ}\text{C} - 250\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit einer Rate von  $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , und bei  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 10 min. Für die Auswertung der Analysedaten wurde Hewlett-Packard ChemStation Rev. A09.03 Software benutzt und die entsprechenden Fettsäuremethylester mit Hilfe von entsprechenden Fettsäurestandards oder über GC-MS identifiziert.

Die Identifizierung von Fettsäuren erfolgte über GC-Massenspektroskopie (GC-MS) der jeweiligen Fettsäuremethylester mit einem GC 6890 System, das an einen Massendetektor (5973 Mass Selective detector System, Agilent, Waldorf) gekoppelt war. Zur Ionisierung der Fettsäuremethylester wurde eine Elektronenenergie von 70 eV benutzt; die Temperatur der Ionenquelle betrug  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$  und die GC-MS-Übergangstemperatur  $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die Bestimmung der Fettsäuren erfolgte dann über die jeweiligen Massenionen.

### 2.22.6 Extraktion und Analyse von Acyl-CoAs

Die sehr sensitive Methode der Acyl-CoA-Messung wurde von (Larson und Graham, 2001) entwickelt. Für die Analyse von Acyl-CoA Thioestern aus Hefe wurden 20 ml Hefeexpressionskulturen (2.21) bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 1,5 – 2,0 angezogen und unter Zugabe von 6 M Perchlorsäure durch Zentrifugation bei 1500 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 5 min geerntet. Nach zweimaligem Waschen der Zellsedimente wurden die Zellen mit 5  $\mu\text{l}$  internem Standard (17:0-CoA, 50  $\mu\text{M}$ ), 800  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O und 3 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v) versetzt und durch Zugabe von Glasperlen (1,3 - 1,5 mm Durchmesser) und 20-minütiges Schütteln bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  mechanisch aufgebrochen. Nach Zugabe von je 1 ml Chloroform und ddH<sub>2</sub>O und anschließendem Mischen für 60 s wurden die Proben zur Phasentrennung für 10 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 3320 g zentrifugiert. Ober- und Unterphase wurden verworfen und die verbleibende Interphase unter strömenden N<sub>2</sub> bei  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (mit den Glasperlen) getrocknet. Die getrocknete Interphase wurde in Acyl-CoA-Extraktionspuffer bestehend aus 1,2 ml Chloroform/Methanol (1:2, v/v), 2 ml Isopropanol, 2 ml 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2, 50  $\mu\text{l}$  Essigsäure, 80  $\mu\text{l}$  Fettsäure freien BSA (50 mg/ml) und 5  $\mu\text{l}$  gesättigten (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durch 10 minütiges Schütteln gelöst und anschließend bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 3320 g für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter N<sub>2</sub>-Strom getrocknet.

Die Derivatisierung der Adeninreste des Coenzym A zu *Ethno*-Derivaten erfolgte durch Inkubation der eingedampften Acyl-CoAs mit einem Chloroacetaldehyd-haltigen Derivatisierungspuffer, bestehend aus einer 50 %-igen wäßrigen Chloroacetaldehyd-Lösung (~7,9 M; Sigma, München, Deutschland) und 0,5 % (w/v) SDS. Der Puffer wurde mit 0,15 M Citratpuffer auf einen pH von 4,0 eingestellt. Für die Derivatisierung der Acyl-CoA-Proben

wurden 100 - 300 µl des Derivatisierungspuffers zu den Proben gegeben und diese für 20 min bei 85 °C inkubiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur Messung entweder bei 4 °C oder bei längerer Aufbewahrung bei -80 °C.

Die *Acyl-Etheno*-Derivate wurden durch *reversed-phased* HPLC aufgetrennt. Als Hauptsäule wurde eine LUNA 150 x 2.0 mm, mit 5 µm Phenyl-Hexyl Silicium Partikeln beschichtet war. Als Vorsäule wurde eine 4 x 2 mm Phenyl-Propyl-Säule (Phenomenex) verwendet. Injiziert wurden 10 – 20 µl der *Acyl-Etheno*-Proben. Der Elutionsgradient setzte sich aus verschiedenen Laufmitteln (A, B, C und D) zusammen, die in unterschiedlicher Zusammensetzung und Flußrate die Auftrennung und Elution der *Acyl-Etheno*-Derivate bewirkten (Larson und Graham, 2001). Die Details des Gradienten sind unten dargestellt.

---

Laufmittel A:	H <sub>2</sub> O/Essigsäure (100:1 v/v)
Laufmittel B:	Acetonitril/H <sub>2</sub> O/Essigsäure (90:9:1 v/v/v)
Laufmittel C:	H <sub>2</sub> O/Triethylamin (100:0,25 v/v)
Laufmittel D:	Acetonitril/H <sub>2</sub> O (90:10 v/v)

---

Gradient:

---

Zeit (min)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	Flußrate (ml/min)
0	90	10	0	0	0,4
5	20	80	0	0	0,4
5,1	20	0	80	0	0,4
7	0	0	97	3	0,2
10	0	0	95	5	0,2
10,1	0	0	95	5	0,2
50	0	0	55	45	0,2
51,1	0	0	0	100	0,4
52	0	0	0	100	0,4
62	0	0	0	100	0,4
62,1	90	10	0	0	0,4
65	90	10	0	0	0,4

---

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Optimierung der Biosynthese von VLCPUFAs durch Etablierung eines neuen Stoffwechselweges

Mikroalgen gehören zu den Primärproduzenten von VLCPUFAs in der ozeanischen Nahrungskette und sind daher mögliche Spenderorganismen für Gene, die für VLCPUFA-Biosyntheseenzyme kodieren. Da manche Vertreter der Mikroalgen weniger für die Isolierung der gewünschten Gene geeignet sind als andere, mußten zunächst Algen mit Eigenschaften identifiziert werden, die eine Genisolierung erfolgversprechend erscheinen ließen.

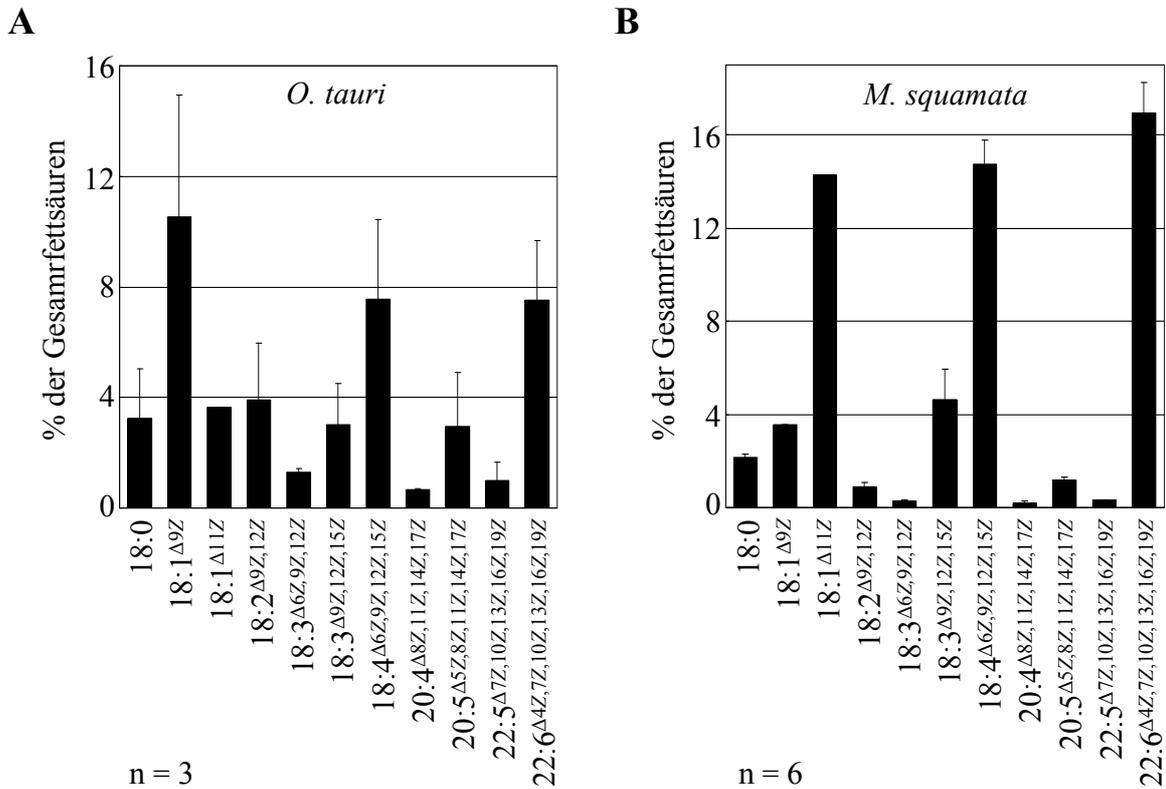
##### 3.1.1 Auswahl der Spenderalgen zur Isolierung Acyl-CoA-abhängiger Desaturasen

Um potentielle Spenderalgen zu identifizieren, die VLCPUFAs akkumulieren, wurden verschiedene Algen auf ihre Fettsäurezusammensetzung untersucht. Im Laufe der Arbeiten zur Fettsäureanalyse der Algen wurde eine Acyl-CoA-abhängige  $\Delta 6$ -Desaturase aus der Mikrolage *O. tauri* beschrieben (Domergue et al., 2005). Da die Identifizierung einer an der VLCPUFA-Biosynthese beteiligten Acyl-CoA-Desaturase, für das Vorhandensein auch weiterer Desaturasen in *O. tauri* sprach, wurden für diese Arbeit *O. tauri* und die nahe verwandte Mikroalge *M. squamata* als Spenderorganismen ausgewählt. Beide Mikroalgen werden phylogenetisch den Prasinophyceae zugeordnet, einer heterogenen Gruppe grüner Flagellaten mit vorwiegend mariner Verbreitung.

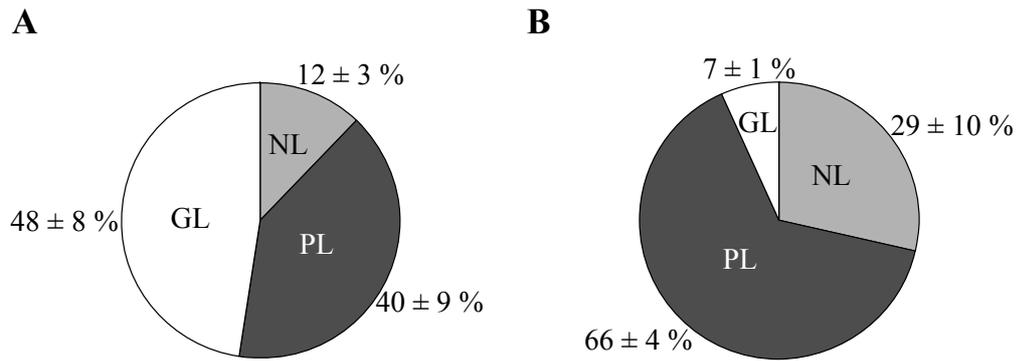
Die Analyse der Fettsäurezusammensetzung von *O. tauri* und *M. squamata* machte deutlich, daß die VLCPUFA-Anteile der Gesamtfettsäuren in *O. tauri* mit 12 % und in *M. squamata* mit über 20 %, substantiell sind (Abb. 9 A und B). Bemerkenswert ist, daß in *O. tauri* und *M. squamata* fast ausschließlich  $\omega 3$ -VLCPUFA akkumulieren während  $\omega 6$ -VLCPUFA nur einen geringen Anteil ausmachen. Das Verhältnis von  $\omega 3$ - zu  $\omega 6$ -Fettsäuren ist bei *M. squamata* 31 und bei *O. tauri* 14.

In einer detaillierteren Analyse wurden die Lipidzusammensetzung und die Verteilung der  $\omega 3$ -VLCPUFAs auf verschiedene Lipidklassen in *M. squamata* analysiert. Die  $\omega 3$ -VLCPUFAs häuften sich vorwiegend in Phospholipiden und Neutrallipiden von *M. squamata* an (Abb. 10 A und B). Desweiteren konnten Intermediate und Endprodukte der VLCPUFA-Biosynthese im Acyl-CoA-Pool von *M. squamata* detektiert werden (Abb. 11), so daß ausgeschlossen werden konnte, daß *M. squamata* VLCPUFAs über den anaeroben PKS-Weg synthetisiert. Aufgrund der publizierten (Domergue et al., 2005) und neugewonnenen

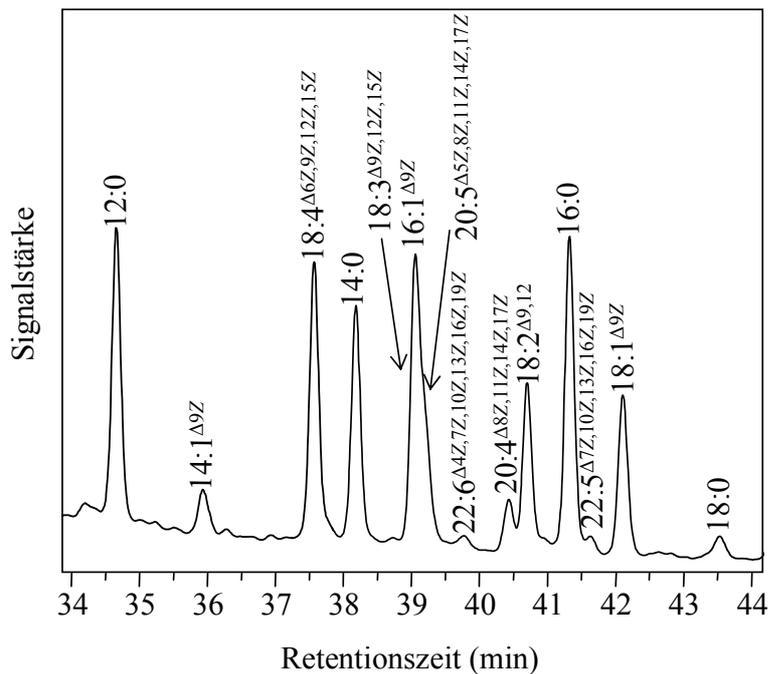
Ergebnisse wurden *O. tauri* und *M. squamata* als erfolgsversprechende Kandidaten zur Isolierung von Acyl-CoA-abhängigen Desaturasen verwendet.



**Abb. 9.** Analyse der Fettsäurezusammensetzung von *O. tauri* und *M. squamata*. Die prozentualen Anteile des Gesamtfettsäuregehalts sind für Fettsäuren mit Kettenlängen ab 18 Kohlenstoffatomen dargestellt. **(A)** Fettsäurezusammensetzung von drei Wochen alten *O. tauri*-Kulturen, **(B)** Fettsäurezusammensetzung von drei Wochen alten *M. squamata*-Kulturen. Die Fettsäurezusammensetzung wurde durch GC-Analyse der Fettsäuremethylester bestimmt. Die Daten stellen Mittelwerte von drei bzw. sechs Einzelmessungen dar. Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Messungen an und sind zum Teil im Maßstab der Abbildung nicht darstellbar.



**Abb. 10. Akkumulation von  $\omega$ 3-VLCPUFA in Phospholipiden und Neutrallipiden von *M. squamata*.** Die Verteilung von  $\omega$ 3-VLCPUFA auf verschiedene Lipidklassen in *M. squamata* weist auf eine bevorzugte Inkorporation in Phospholipide und Neutrallipide hin. **(A)** Anteile der Lipidklassen an den Gesamtlipiden; **(B)** Anteile der  $\omega$ 3-VLCPUFA, die assoziiert mit den verschiedenen Lipidklassen vorliegen. Die Daten sind Mittelwerte von drei Einzelmessungen  $\pm$  Standardabweichung. GL, Glykolipide; NL, Neutrallipide; PL, Phospholipide.



**Abb. 11. Detektion der Intermediate der VLCPUFA-Biosynthese im Acyl-CoA-Pool von *M. squamata*-Kulturen.** Die Identifizierung von Intermediaten und Endprodukten der VLCPUFA-Biosynthese im Acyl-CoA-Pool von *M. squamata* weist auf einen CoA-abhängigen Syntheseweg hin. Die Acyl-CoA-Extraktion erfolgte mit ca. sechs bis acht Wochen alten Algenkulturen. Die Identifizierung der Acyl-CoAs erfolgte durch Retentionsvergleiche mit authentischen Standards und durch anschließende GC-MS-Analyse. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis. Die Messung wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

### 3.1.2 Vorarbeiten zur Identifizierung von cDNA-Klonen mutmaßlicher „Front End“-Desaturasen

Die Mikroalgen *O. tauri* und *M. squamata* wurden als Genspenderorganismen für Acyl-CoA-abhängige Desaturasen ausgewählt. Das Genom von *O. tauri* wurde im August 2006 vervollständigt (Derelle et al., 2006), und die Sequenzinformation war seitdem öffentlich verfügbar. Für die Alge *M. squamata* gibt es hingegen noch immer keine genomische Information. Zur Identifizierung von Desaturasegenen aus *M. squamata* wurde im Vorfeld dieser Arbeit eine Expressed Sequence Tag (EST)-Datenbank erstellt. Beim Durchmustern dieser EST-Daten konnten zwei cDNA-Teilsequenzen mit Ähnlichkeit zu „Front End“-Desaturasen (Napier et al., 1997) identifiziert werden, *MsI* und *MsII*. Diese Teilsequenzen wurden mir von Dr. Amine Abbadi (Norddeutsche Pflanzenzucht, Hans-Georg Lembke KG Hohenlieth, Holtsee) zur Verfügung gestellt und dienten als Ausgangspunkt für die Isolierung der vollständigen Gensequenzen.

### 3.1.3 Isolierung mutmaßlich Acyl-CoA-abhängiger Desaturasen aus *M. squamata* und *O. tauri*

Basierend auf diesen ESTs wurde die fehlende Sequenzinformation der *MsI* und *MsII* cDNAs mit Hilfe der 5'- und 3'-Rapid Amplifikation of cDNA Ends (RACE)-Technik mittels korrekturlesender Polymerasen erhalten (siehe 2.19.1). Die ermittelte 5'- und 3'-Sequenzinformation beider cDNA-Klone wurde durch mehrfache Amplifikation und Sequenzierung der vollständigen Klone bestätigt. Daß der Beginn der neu isolierten cDNA-Klone tatsächlich dem Transkriptionsstart entsprach, wurde durch 5'-RACE über die mutmaßlichen Startcodons hinaus in den 5'-untranslatierten Bereich der jeweiligen Gene bestätigt. Die dabei erhaltenen Sequenzen ergaben keine alternativen Startcodons. Vergleiche mit den jeweiligen amplifizierten genomischen DNA-Sequenzen zeigten, daß jene der cDNA und der genomischen DNA-Sequenz identisch waren und somit in beiden Genen keine Introns vorliegen. Die so identifizierten offenen Leserahmen von *MsI* und *MsII* hatten eine Länge von 1350 bp (*MsI*) bzw. von 1449 bp (*MsII*).

Der offene Leserahmen von *MsI* mit 1350 bp kodiert für ein Polypeptid von 449 Aminosäuren. Sequenzvergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigten, daß *MsI* mit 66,5 % Identität eine hohe Übereinstimmung mit der Acyl-CoA-abhängigen  $\Delta^6$ -Desaturase der verwandten Mikroalge *O. tauri* aufweist (NCBI-Genbank Identifikationsnummer: AY746357; (Domergue et al., 2005). Ebenfalls hohe Identitäten zeigten mit 64 % eine bisher nicht charakterisierte Teilsequenz der nahe verwandten

Mikroalge *Ostreococcus lucimarinus* CCE9901 (Prasinophyceae; Genbank Identifikationsnummer: XM\_001421036) und mit 42 % die  $\Delta 5$ -Desaturase der Mikroalge *Pavlova salina* (Prymnesiophyceae; Genbank Identifikationsnummer: DQ995517; Zhou et al., 2007). Der offene Leserahmen des zweiten Klons, *MsII*, kodierte mit 1449 bp für ein Polypeptid von 482 Aminosäuren. Sequenzvergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz zeigten, daß *MsII* mit 66 % Identität eine hohe Übereinstimmung mit einer nicht charakterisierten mutmaßlichen  $\Delta 5$ -Desaturase von *O. tauri* aufweist (Genbank Identifikationsnummer: CR954212). Ebenfalls hohe Identitäten zeigte mit 64 % eine bislang nicht charakterisierte Teilsequenz von *O. lucimarinus* CCE9901 (Genbank Identifikationsnummer: XM\_001420818) und mit 51 % bzw. 32 % die  $\Delta 5$ -Desaturasen von *Physcomitrella patens* (Genbank Identifikationsnummer: DS54492; Kaewsuwan et al., 2006) und *Marchantia polymorpha* (Genbank Identifikationsnummer: AY583465; Kajikawa et al., 2004). Aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu *MsII* wurde die mutmaßliche  $\Delta 5$ -Desaturase aus *O. tauri* ebenfalls kloniert und der Klon vorerst *OtII* genannt. Da die Genomsequenzdaten von *O. tauri* zu der maßgeblichen Zeit schon veröffentlicht waren, konnte die *OtII* cDNA über direkte PCR-Amplifikation kloniert werden (siehe 2.19.2). Der offene Leserahmen von *OtII* kodierte mit 1476 bp für ein Polypeptid von 491 Aminosäuren.

Die Vergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *MsI*, *MsII* und *OtII* mit ähnlichen Sequenzen aus öffentlichen Datenbanken sind in Abb. 12 A und B dargestellt. Erkennbar sind die für „Front-End“-Desaturasen typischen konservierten Bereiche, wie die drei Histidin-Boxen (schwarze Balken; Shanklin et al., 1994) des katalytischen Zentrums und eine N-terminale Cytochrom  $b_5$ -Fusionsdomäne mit dem dafür kennzeichnenden HPGG-Sequenzmotiv (in Abb. 12 mit Sternchen gekennzeichnet; Sperling et al., 1995; Mitchell und Martin, 1997; Napier et al., 1997; Napier et al., 1999). Die acht bzw. sieben Histidine des katalytischen Zentrums koordinieren zwei Eisenatome als Redox-Einheit des katalytischen Zentrums der Desaturasen und sind somit wesentlich für ihre enzymatische Aktivität (Shanklin und Cahoon, 1998). Ebenfalls typisch für „Front-End“-Desaturasen ist die Substitution des ersten Histidins der dritten Histidin-Box gegen Glutamin (in Abb. 12 mit einem Pfeil gekennzeichnet). Sayanova et al. (2001) konnten zeigen, daß dieses Glutamin, wie auch die sieben restlichen Histidine, eine Rolle in der katalytischen Aktivität der Desaturasen spielt und eine Deletion oder der Austausch gegen ein Histidin zum Verlust der Enzymaktivität führt.

**A**

```

MsI      1  -----MCPPEKESTRKNAGGPLTRGKLSADLAKLEPHKLAQTFDTRWVRVGDVEYDVT
OtΔ6    1  MCVETENNDGIPTVEIAFDGERERAEANV KLSAEKMEPAALAKTFARRYVVIEGVEYDVT
Ol-putΔ6 1  -----ERRYVTTIEGVEYDVT
PsΔ5    1  -----MPPRDSYSYAAPPSSAQLHEVDTPQEHDKKELVIGDRAYDVT

MsI      53  NE--KHPGGSVIFYMLSN TGADATEAFNEFHMRSPKAWKMLKALPNRPAETP-RSQDPPDG
OtΔ6    61  DF--KHPGGTIVIFYALSN TGADATEAFKEFHFRSRKARKALALPSRPAKTA-KVDDAE-
Ol-putΔ6 16  DF--KHPGGSVIYYMLSN TGADATEAFKEFHFRSRKARKALALPHKPVDAATREPIEDE
PsΔ5    42  NEVKRHPGGKTIAYQV---GTDATDAYKQFHWRSKADKMLKSLPSRVHKCYSPRRAD-

MsI      110  PMIEDFAKWRAQLEKEGFFKPSIAHVAYRI AELAAMFALGCYIMSLGYPVVASIVFGAFF
OtΔ6    117  -MLQDFAKWRKELERDGFKFPSPAHVAYRFAELAAMYALGTYLMYARYVVSIVLVYACFF
Ol-putΔ6 74  AMLKDFAQWRKELEREGFFKFPSPAHVAYRFAELAAMFALGTALMHARWHVASVIVYSCFF
PsΔ5    98  -LIADEQEFKQLEAECMFEPSLPHVAYRLAEVLIAMHVAGAALIVHGVTFAGIAMLVVQV

MsI      170  GARCWVQHEGGHNSLTGNIWLDKRIQAATCGFGLSISGDMWNQMHNKHHATPQKVRHDM
OtΔ6    176  GARCWVQHEGGHSSLTGNIWWDKRIQAFTAGFGLAGSGDMWNSMHNKHHATPQKVRHDM
Ol-putΔ6 134  GARCWVQHEGGHNSLTGNIWWDKRIQAFAGFGLASSGDMWNNMHNKHHATPQKVRHDM
PsΔ5    157  G-RCGWLMHEGGHYSLTGNIAFDRAIQVACYGLCCGMSGAWWRNQH NKHHATPQKLVQHDV

MsI      230  DLDTTPAVAFFKTAVEDNRPRGFSRAWSRAQAWTFVVPVTSGLLVQMFVLYVLHPRQVARK
OtΔ6    236  DLDTTPAVAFFNTAVEDNRPRGFSKYWLR LQAWTFIPVTSGLVL-LFWMEFLHPSKALKG
Ol-putΔ6 194  DLDTTPVAVFFNSAVEENRPRGFSKLLWLR LQAWTFVVPVTSGMVL-LFWMFVLHPRNALRR
PsΔ5    216  DLDTLPLVAFHERIAAKVSPAM-KAWLSMQAKLEAPVTT-LLVALGWQLYLHPRHMLRT

MsI      290  KNYEEASWMLLSHVLR TATIKYAGGYSWPVAVLWESFGNWIAYMYLFAHFSTSHTHLEVV
OtΔ6    295  GRYEELVWMLAAHVIR TWTIKAVTGFTAMQSYGLFLATSWVSGCYLFAHFSTSHTHLDVV
Ol-putΔ6 253  KSEEEAAWMFSAHVIR TAVIKAVTGYSWIASYGLFAATMWASGCYLFAHFSTSHTHLDVV
PsΔ5    274  KHYDELAMLGIRYGLVGYLAANYGAGYVLA CYLLVQ---LGAMYIFCNEAVSHTHLPVV

MsI      350  PSDKHLISWVNYAVDHTVDIDPSKGYVNWLMGYLNCQVIHHLFPDMPQFRQPEVSRRFVAF
OtΔ6    355  PADEHLSWVRYAVDHTIDIDPSQGWVNWLMGYLNCQVIHHLFPSPMPQFRQPEVSRRFVAF
Ol-putΔ6 313  PSDKHLISWVRYAVDHTIDINPNSVNWLMGYLNCQVIHHLFPDMPQFRQPEVSRRFVAF
PsΔ5    331  EPNEHATWVEYAA NHTNCSPS-WWCDWMSYLN YQTEHHLYPSPMPQFRHFKIAPRVKQL

MsI      410  AKKWNLNKYKVLTYYGAWKATFTNLDTVGQHYYKHGKAHAH--
OtΔ6    415  AKKWNLNKYKVMTYAGAWKATLGNLNDVGHYYVHGQHS GKTA
Ol-putΔ6 373  AKKWNLNKYKVLTYYGAWKATFGNLNDVG-----
PsΔ5    390  FEKHGLHYDVRGYFEAMADTFANLNDVAHAPBKMKM-----
    
```

**B**

```

MsII     1  -----MPPRETTTPSVDHPVMDRITSLTGGAGAGVPRKYTTADVEKHS TPDDCWLIVHG
OtII     1  MTTVAEIVDDDARRAGKGATTRRRRATTRVARD DAREATYTA AEVARHARADDCWVIVRG
Ol-putΔ5 1  MGT TARDAGAVTTRARRRGTGATSEASRVVHAVDADARTYTA AEVATHARADDCWVIVRG
PpΔ5    1  ----MAPHSADTAGLVPSDELRLR LRSNSKCP EQEQLTKKYTLEDVSRHNTPADCWLVIWG
MpΔ5    1  ----MPPHAPDSTGLGP-EVFR LPPDAIPAQDRRSTQKKYSLS DVSKEHNTPNDCWLVIWG

MsII     55  KVIYDVTSFVPRHPGGNMIWVKAGGDCTQLFDSYHP IKTQAVLDKYYIGEVORVSGD---E
OtII     61  GVIYDVTRFVPRHPGGNMIYVKAGGECTALFDSYHPEERARATLEKYRIGALRRDAGERE-D
Ol-putΔ5 61  GVIYDVTA FVPRHPGGNMIYVKAGGECTALFDSYHPEKARGVLEKYRIGDLTREEGSAA-D
PpΔ5    57  KVIYDVTSWIFENHPGGSIIHVKAGQDSTQLFDSYHPLYVVRKMLAKYCI GELVPSAGDDKFK
MpΔ5    56  KVIYDVTSWVKVHPGGSIIIFVKAGQDSTQLFDSYHPLYVVRKLLAQFCIGELQTSAGDEKFK
    
```

MsII	112	KKIIEY-NDDMKCKEYMDCKVAVEKYFKDITKQDPRVHVEMYVKTFFVILAGVAVCHYCSF
OtII	120	EDVVEYLKDDLREGEFYADCKAGAAKYFKDNKLDPRVHWEMYAKTLVILTGIVVGHYGSF
Ol-putΔ5	120	GDIVEYAKDDLKDGAFADCKAGAAKYFKENKLDPRVHWEMYAKTAAIIVGIVVGHYYSF
PpΔ5	117	KATLEYADAENED--FYLVVKQRVESYFKSNKINPQIHPHMIILKSLFITLGGYFASYLAF
MpΔ5	116	SSTLEYAGEEHEV--FYHTLTKQRVETVYFRKQKINPRYHPQMLVKSAVIIGTLLLCYYFGF
■		
MsII	171	FLTS-SFLVSAVFAALHGMWKAIEVGVSIQHDANHGAYGKSRGFLHAMQTLTLDVVGASSFM
OtII	180	FAPSASFAAAALAVLHGTCKAEVGVSIQHDANHGAYGNNRTWLHAMQTLTLDVVGASSFM
Ol-putΔ5	180	FAPGVSFGAALAFALHGTCKAEVGVSIQHDANHGAYGNSRTWLHAMQTLTLDVVGASSFM
PpΔ5	175	FWSS-SVLVSLFFALWVGFFAAEVGVSIQHDGNHGSYTKWRGFGYIMGASLDLVGASSFM
MpΔ5	174	FWSQ-NVLLSMFLASIMGFCTAEVGM SIMHDGNHGSYTCSTLLGYVMGATLDLVGASSFM
■		
MsII	230	WRQOHVVGHHAYTNVEGVDPDIRCAPEKDIRRVNEHQPHESYHPLQHVYLFFAYGLLSFK
OtII	240	WKQOHVAGHHAYTNVEGIDPDIRCS-EKDVRRVNEHQPHPEYHRVQHVYLAIFYGLLSFK
Ol-putΔ5	240	WKQOHVAGHHAYTNVEGIDPDIRCS-EKDIRRVNEHQPHPEYHVQHVYLAIFYGLLSFK
PpΔ5	234	WRQOHVVGHHSEFTNVDNYDPDIRVK-DPDRRVVATTQPRQWYHAYQHTYLAIVLYGTLALK
MpΔ5	233	WRQOHVAGHHSEFTNIDHYDPDIRVK-DPDLRRVTSQOPRRWFHEVQHTYLVLYGVLALK
■		
MsII	290	SCFADDFNAAVSGRIGWVKVAKFTRGEAVSEWGSKVLWAFYLYLPATYSPHSGLRIVAL
OtII	299	SCFVDDFNAAFSGRIGWVKVMKFTTRGEAVAFWGSKLAWAFYLYLPKYSHRSIGQLLAL
Ol-putΔ5	299	SCFVDDFNAAFSGRIGWVKVMKFTTRGEAVAFWGTLLWAAYYLLPLKMSHRPLGELLAL
PpΔ5	293	SIFLDDFLAYFICSTIGFVKVAKMTPLEFNIFFOGKLLYAFYMFVLPVSVYGVHSGGTFLAL
MpΔ5	292	SVLIDDFSAAFFSAGLGPVKIAQMTPLEMGVFWGKVVYALYMFLLMMYGOYNIILTFIGL
■		
MsII	350	VTITEVITGWLLAFMFQVAHVVDVRFKLS---EKGKINLKGWGESQLYSADFAHGSKF
OtII	359	WTVTEFVTGWLLAFMFQVAHVVDVHFFRLN---EKNQINLKGWGEAQLMSTADFAHGSKF
Ol-putΔ5	359	WAVTEFVTGWLLAFMFQVAHVVDVHFFRLD---AKNRVNLKGWGEAQLMSTADFAHGSKF
PpΔ5	353	YVASQLITGWMLAFLFQVAHVVDVAFPTPE--GCKVK--GGWAAMQVATTTDFSPRSWF
MpΔ5	352	YILSOLVAGWTLALFFQVAHVVDVAFVPAETDGGKAKIPSGWAEMQVATTTDFSSRSWF
↓		
MsII	407	WMHFSGGLNYQVAHHLFPGVCHCHYPAPIIMKVAKEYGLEAYVYPTFWSALS AHFTHL
OtII	416	WTHFSGGLNYQVVHHLFPGVCHVHPALAPIIKAAADKHGLHYQIYPTFWSALRAHFHSL
Ol-putΔ5	416	WTHFSGGLNYQVVHHLFPGVCHVHPALAPIIKAAAEKHGLHYQIYPTFWSALRAHFHSL
PpΔ5	409	WGHVSGGLNNOIEHHLFPGVCHVHPALQPIVEKTCKEFDVPPYVAYPTFWALRAHFAHL
MpΔ5	412	WTHISGGLNHQIEHHLFPGVCHVHPSTIQPIVKATCDEFNVPYTSYPTFWAALRAHFQHL
■		
MsII	467	KNVGQKTYVPSIQTVG
OtII	476	ARVGHEAYVPSLRTVG
Ol-putΔ5	476	ANVGRAAYVPSIQTVG
PpΔ5	469	KKVG---LTE-FRLDG
MpΔ5	472	KNVG---LQDGLRLDG

**Abb. 12. Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von MsI, MsII und OtII mit nahe verwandten Proteinsequenzen.** Der Sequenzvergleich und die Darstellung erfolgte mit dem Programm MultAlin (Corpet, 1988) und Boxshade 3.21. Die konservierten Aminosäurereste der Cytochrom  $b_5$ -Fusionsdomäne sind durch Sterne markiert. Die drei Histidin-Motive sind durch schwarze Balken gekennzeichnet wobei die H zu Q Substitution in der dritten Histidin-Box durch einen Pfeil gekennzeichnet ist. (A), MsI im Vergleich zu OtΔ6, der Teilsequenz einer mutmaßlichen Desaturase von *O. lucimarinus* (Ol-putΔ6) und der Δ5-Desaturase von *P. salina* (PsΔ5). (B), MsII im Vergleich zu einer mutmaßlichen Δ5-Desaturase von *O. lucimarinus* CCE9901 (Ol-putΔ5), einer mutmaßlichen Δ5-Desaturase von *O. tauri* (OtII), der Δ5-Desaturase von *P. patens* (PpΔ5), und zu der Δ5-Desaturase von *M. polymorpha* (MpΔ5).

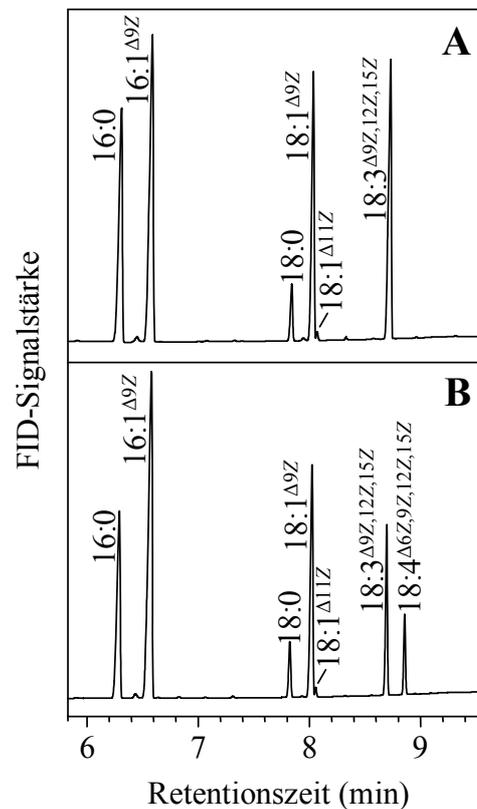
### 3.1.4 Funktionale Charakterisierung der isolierten Klone durch heterologe Expression in Hefe

Die funktionale Charakterisierung der möglichen Desaturasen erfolgte *in vivo* durch heterologe Expression in Hefe (siehe 2.21). Hefe stellt als eukaryotischer Organismus durch das Vorhandensein von Endomembranen und den benötigten Cofaktoren der Desaturasereaktion ein geeignetes Expressionssystem dar, in dem Desaturasen auf ihre Substratspezifität getestet werden können. Zudem ist die Expression in Hefe eine etablierte Plattform zur Charakterisierung solcher Enzyme (beispielhafte Referenzen dafür sind Michaelson et al., 1998a; Domergue et al., 2002; Whitney et al., 2003). Trotz der Möglichkeit, daß die heterologe Expression in Hefe nicht die *in vivo* Situation eines Enzyms in seinem natürlichen Kontext widerspiegelt (Heilmann et al., 2004a), kann die Charakterisierung in Hefe doch das biochemische Potential eines Enzymes zeigen.

Der verwendete Hefestamm INVSc1, ist eine Bäckerhefe, die verschiedene Auxotrophien aufweist, die als Selektionsmarker für die Transformation benutzt werden können. Anders als die meisten Algen oder höheren Pflanzen enthält Hefe endogen nur wenige verschiedene Fettsäuren, nämlich 16:0, 16:1<sup>Δ9</sup>, 18:0 und 18:1<sup>Δ9</sup>, und in sehr geringen Mengen 18:1<sup>Δ11</sup>, die als Substrate für heterolog exprimierte mutmaßliche Desaturasen dienen können. Allerdings können Hefezellen Fettsäuren aus dem Kulturmedium aufnehmen, und daher wurden den exprimierten mutmaßlichen Desaturasen definierte Fettsäuresubstrate durch Applikation zugeführt.

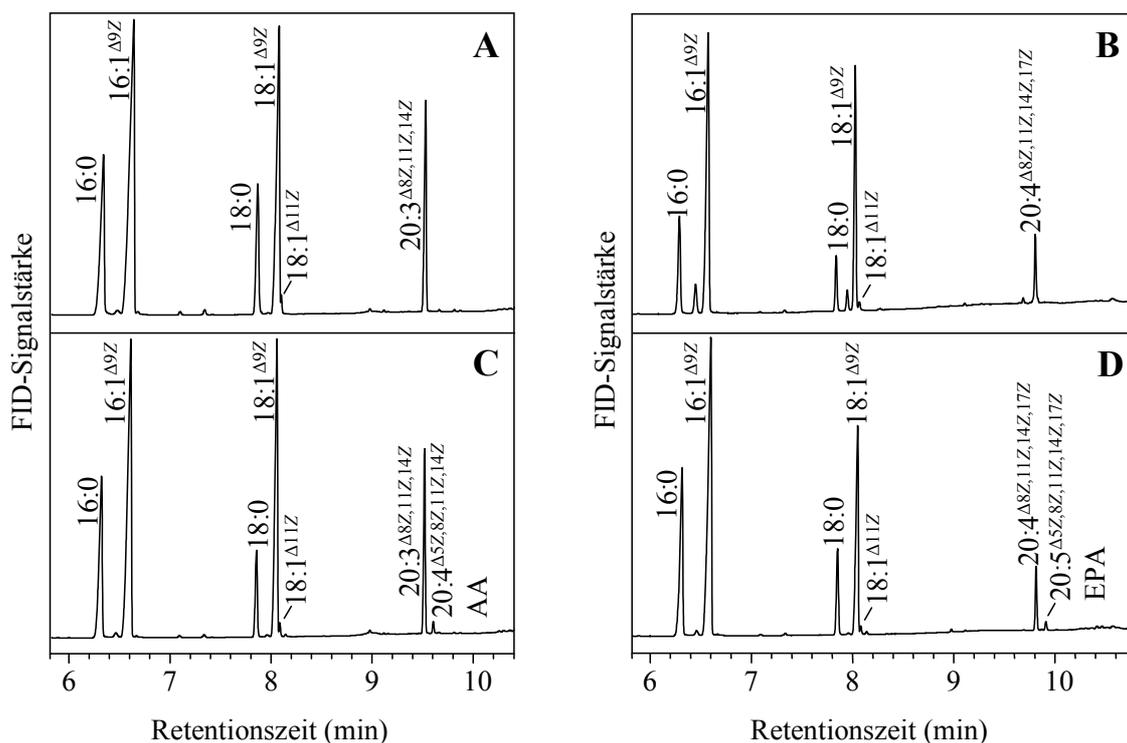
Für die heterologe Expression der mutmaßlichen Desaturasen *MsI*, *MsII* und *OtII* wurden die cDNA-Klone in die Hefeexpressionsvektoren pESC-LEU oder pESC-TRP kloniert. Als Kontrolle wurde bei jeder Expression der entsprechende Leervektor unter den gleichen Bedingungen mitgeführt (Kontrollkulturen). Die Expression der Transgene wurde in allen Fällen durch den GAL-Promotor kontrolliert, der durch die Zugabe von Galaktose induziert werden kann. Die Klone *MsI*, *MsII*, *OtII* und die entsprechenden Leervektoren wurden zunächst einzeln in Hefe in der Gegenwart potenzieller Fettsäuresubstrate exprimiert und die Hefekulturen anschließend auf ihre Fettsäurezusammensetzung untersucht (siehe 2.22.3). In den Kontrollkulturen konnten nur die hefeeigenen und die jeweils exogen applizierte Fettsäure detektiert werden (Abb. 13 A). Nach der Expression von *MsI* konnte nur nach der Zugabe des ω3-18:3<sup>Δ9,12,15</sup>-Substrats eine zusätzliche Fettsäure identifiziert werden, die nach Vergleich mit den Retentionszeiten authentischer Fettsäurestandards als ω3-18:4<sup>Δ6,9,12,15</sup> (Stearidonsäure) erkannt wurde (Abb. 13 B). Dieses Reaktionsprodukt wies auf eine Δ6-Desaturierung durch das *MsI*-Enzym hin, das deshalb von nun an als *MsΔ6*

bezeichnet wurde. Andere Substrate als  $18:3^{\Delta 9,12,15}$  wurden von Ms $\Delta 6$  nicht oder nur in sehr geringen Mengen desaturiert (siehe S. 66 Tab. 1); Ms $\Delta 6$  zeigte somit eine enge Substratspezifität für  $\omega 3-18:3^{\Delta 9,12,15}$ .



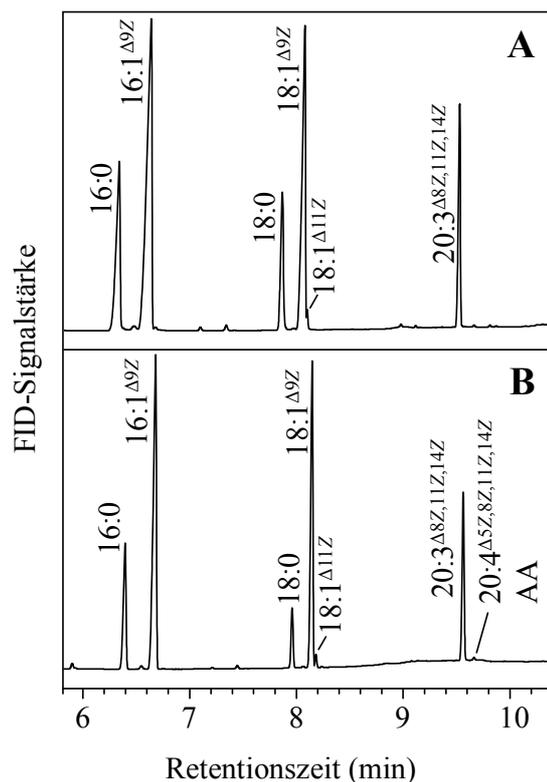
**Abb. 13. MsI kodiert für eine  $\Delta 6$ -Desaturase.** Dargestellt sind GC-Profile von Hefekulturen, die (A) mit dem Leervektor pESC-LEU oder (B) mit dem MsI-pESC-LEU-Konstrukt transformiert wurden. Die Expressionskulturen wurden für 72 h bei 22 °C mit 150  $\mu$ M  $18:3^{\Delta 9,12,15}$  kultiviert. Die Identifikation der Fettsäuren erfolgte anhand von authentischen Standards. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von sechs unabhängigen Messungen.

Bei Expression von MsII, wurden neue Fettsäureprodukte bei Fütterung von  $\omega 6-20:3^{\Delta 8,11,14}$ , Di-homo- $\gamma$ -Linolensäure, (Abb. 14 C) und  $\omega 3-20:4^{\Delta 8,11,14,17}$ , Di-homo- $\gamma$ -Stearidonsäure, (Abb. 14 D) detektiert. Die entsprechenden Desaturaseprodukte konnten als  $\omega 6-20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ , AA (Abb. 14 C) und  $\omega 3-20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$ , EPA (Abb. 14 D), identifiziert werden. Außerdem akzeptierte MsII in geringem Maße  $\omega 3-20:3^{\Delta 11,14,17}$  (Eicosatriensäure) als Substrat und desaturierte diese Fettsäure zu Juniperonsäure ( $20:4^{\Delta 5,11,14,17}$ ; Tab. 1). Die Regiospezifität der Substratumsetzung durch MsII charakterisierte das Genprodukt als  $\Delta 5$ -Desaturase, die von nun an als Ms $\Delta 5$  bezeichnet wurde.



**Abb. 14. *MsII* kodiert für eine  $\Delta 5$ -Desaturase.** Dargestellt sind GC-Profile von Hefekulturen. (A) und (B) zeigen die Fettsäurezusammensetzungen von Hefekulturen, die mit dem Leervektor pESC-TRP transformiert wurden. (C) und (D) zeigen die Fettsäurezusammensetzungen von Hefekulturen, die mit *MsII*-pESC-TRP transformiert wurden. Die Expressionskulturen wurden im Fall von (A) und (C) für 72 h bei 22 °C mit 200  $\mu\text{M}$  20:3 $^{\Delta 8,11,14}$ , im Fall von (B) und (D) für 72 h bei 22 °C mit 200  $\mu\text{M}$  20:4 $^{\Delta 8,11,14,17}$  kultiviert. Die Identifikation der Fettsäuren erfolgte anhand von authentischen Standards. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von sechs unabhängigen Messungen.

Wegen der hohen Übereinstimmung der abgeleiteten Aminosäuresequenzen (siehe 3.1.3) von *Ms $\Delta 5$*  und *OtII*, wurde vermutet, daß *OtII* ebenfalls für eine  $\Delta 5$ -Desaturase kodiert. Expressionsstudien in Analogie zu den bisher beschriebenen Experimenten zeigten, daß *OtII* ebenfalls die  $\Delta 5$ -Desaturierungssubstrate  $\omega 6$ -20:3 $^{\Delta 8,11,14}$  und  $\omega 3$ -20:4 $^{\Delta 8,11,14,17}$  zu den jeweiligen  $\Delta 5$ -desaturierten Fettsäuren umsetzt, wenn auch mit nur sehr geringer Aktivität (Abb. 15). Infolgedessen wurde *OtII* von nun an *Ot $\Delta 5$*  genannt. Wegen der geringen Aktivität nahe dem Detektionslimit wurden die in den folgenden Paragraphen beschriebenen Experimente nur mit *Ms $\Delta 6$*  und *Ms $\Delta 5$* , nicht aber mit *Ot $\Delta 5$*  durchgeführt.



**Abb. 15. *OtlI* kodiert für eine  $\Delta 5$ -Desaturase.** Dargestellt sind GC-Profile von Hefekulturen, die (A) mit dem Leervektor pESC-TRP oder (B) mit dem *OtlI*-pESC-TRP-Konstrukt transformiert wurden. Beispielhaft ist hier das Fettsäureprofil nach Applikation von 200  $\mu\text{M}$  20:3 $^{\Delta 8,11,14}$  dargestellt. Die Identifikation der Fettsäuren erfolgte anhand von authentischen Standards. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Messungen.

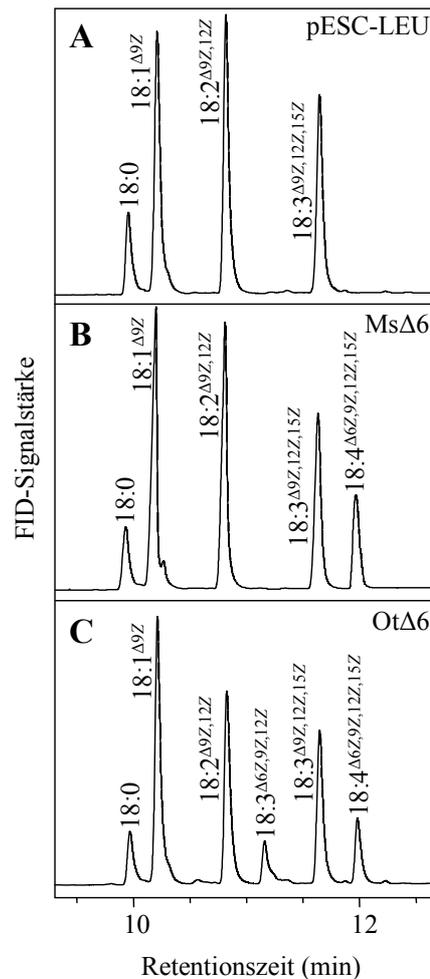
**Tab. 1. Analyse der Substratspezifität von Ms $\Delta 6$  und Ms $\Delta 5$  durch heterologe Expression in Hefe.** Expressionskulturen für Ms $\Delta 6$  oder Ms $\Delta 5$  wurden für 72 h bei 22 °C mit verschiedenen Fettsäuresubstraten inkubiert. Nach Aufarbeitung der Kulturen wurden die Fettsäuremethylester gaschromatographisch analysiert. Die Desaturierungseffizienz (Desaturierung %) wurde aus den prozentualen Anteilen der Gesamtfettsäuren als (Produkt · 100)/(Edukt + Produkt) berechnet. Die Werte sind als Mittelwerte von drei bzw. sechs unabhängigen Experimenten mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben. n.d., nicht detektierbar.

Ms $\Delta 6$		Ms $\Delta 5$	
Substrat	Desaturierung (%)	Substrat	Desaturierung (%)
16:1 $^{\Delta 9}$	n.d.	16:1 $^{\Delta 9}$	n.d.
18:1 $^{\Delta 9}$	n.d.	18:1 $^{\Delta 9}$	n.d.
18:2 $^{\Delta 9,12}$	0,3 $\pm$ 0,01	18:2 $^{\Delta 9,12}$	n.d.
18:3 $^{\Delta 9,12,15}$	34,2 $\pm$ 4,90	18:3 $^{\Delta 9,12,15}$	n.d.
20:3 $^{\Delta 8,11,14}$	0,3 $\pm$ 0,01	20:2 $^{\Delta 11,13}$	1,0 $\pm$ 0,04
20:3 $^{\Delta 11,14,17}$	n.d.	20:3 $^{\Delta 8,11,14}$	9,5 $\pm$ 2,20
20:4 $^{\Delta 8,11,14,17}$	n.d.	20:3 $^{\Delta 11,14,17}$	1,0 $\pm$ 0,40
		20:4 $^{\Delta 8,11,14,17}$	8,2 $\pm$ 0,50

### 3.1.5 Katalytische Effizienz von MsΔ6 und MsΔ5 im Vergleich zu bekannten Lipid- und Acyl-CoA-abhängigen Desaturasen

Nachdem MsΔ6 und MsΔ5 als Δ6- bzw. Δ5-Desaturasen identifiziert waren, wurden weitere Experimente durchgeführt, um die Substratspezifität und die Desaturierungseffizienz beider Enzyme näher zu untersuchen. Die Eigenschaften der neuen Enzyme wurden dazu mit denen bekannter Desaturasen verglichen. Zum Vergleich wurden die Acyl-CoA-abhängige Δ6-Desaturase aus *O. tauri* (OtΔ6; Domergue et al., 2005) und die bekannten lipid-abhängigen Desaturasen PtΔ6 und PtΔ5 aus *P. tricornutum* (Domergue et al., 2002) herangezogen.

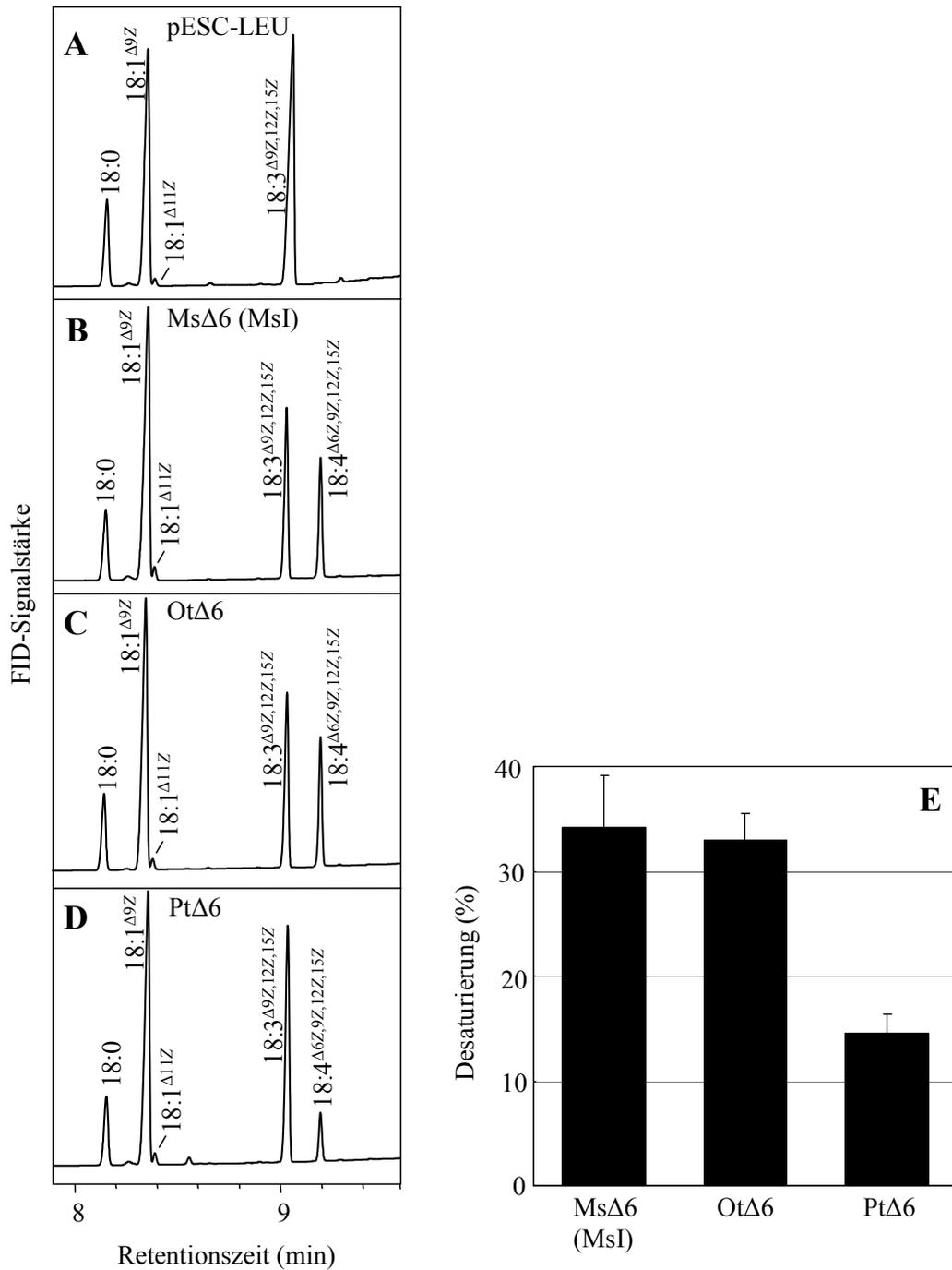
Die Δ6-Desaturase aus *M. squamata* hatte zunächst eine enge Substratspezifität gezeigt (vgl. 3.1.4). Die Mehrzahl beschriebener Δ6-Desaturasen führt die Δ6-Doppelbindung in Abhängigkeit von einer vorhandenen Δ9-Doppelbindung ein und akzeptiert daher sowohl 18:2<sup>Δ9,12</sup> als auch 18:3<sup>Δ9,12,15</sup> als Substrate. Für die *O. tauri* Δ6-Desaturase war bereits gezeigt worden, daß das Enzym beide Fettsäure-Substrate akzeptiert und mit etwa gleicher Effizienz desaturiert (Domergue et al., 2005). Unterschiede in den Substratspezifitäten von MsΔ6 und OtΔ6 werden in Abb. 16 deutlich. In diesem Experiment wurden die Klone MsΔ6 und OtΔ6 und als Kontrolle der entsprechende Leervektor pESC-LEU einzeln in Hefe exprimiert. Die zu testenden Substrate, 18:2<sup>Δ9,12</sup> und 18:3<sup>Δ9,12,15</sup> wurden den Kulturen in äquimolaren Mengen (200 μM) zugegeben. Abb. 16 A zeigt das Hefeprofil nach Expression mit dem Leervektor pESC-LEU. Die Analyse der Fettsäurezusammensetzung der MsΔ6- und OtΔ6-Kulturen zeigte, daß MsΔ6 nur das 18:3<sup>Δ9,12,15</sup>-Substrat nicht aber das gleichzeitig angebotene 18:2<sup>Δ9,12</sup>-Substrat umsetzte (Abb. 16 B), OtΔ6 hingegen setzte beide Substrate um (Abb. 16 C). MsΔ6 wies also eine engere Substratspezifität für das gewünschte ω3-Substrat 18:3<sup>Δ9,12,15</sup> auf als OtΔ6.



**Abb. 16. Enge Substratspezifität von MsΔ6 bei kompetitivem Substratangebot.** Die Hefekulturen wurden für 72 h bei 22 °C mit äquimolaren Mengen (200 μM) von 18:2<sup>Δ9,12</sup> und 18:3<sup>Δ9,12,15</sup> inkubiert. **(A)** Expressionskulturen transformiert mit dem Leervektor pESC-LEU. **(B)** Fettsäureprofil von Hefe bei Expression von MsΔ6; **(C)** Fettsäureprofil von Hefe bei Expression von OtΔ6. Die Identifikation der Fettsäuren erfolgte anhand von authentischen Standards. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Messungen.

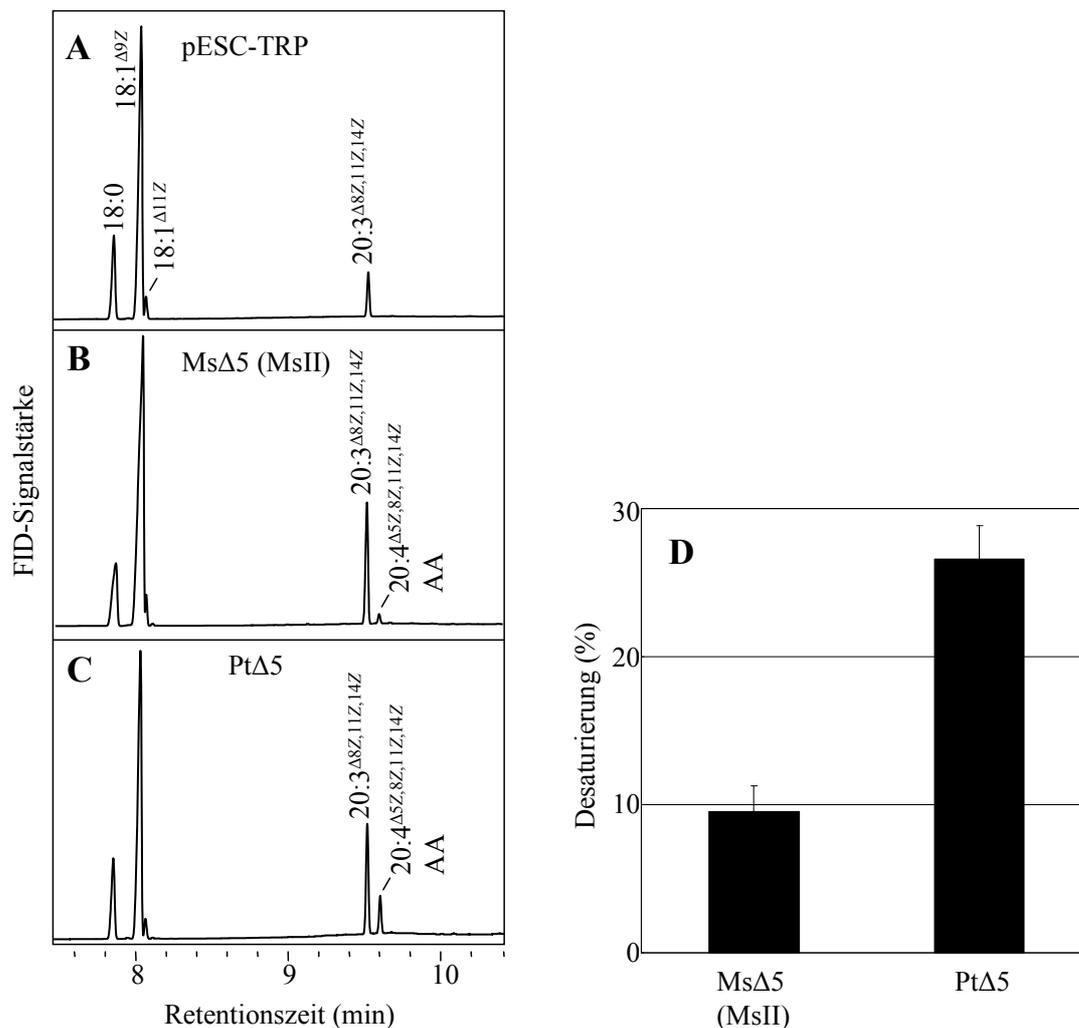
In Abb. 17 ist die Aktivität von MsΔ6 (Abb. 17 B) im Vergleich zu denen der Acyl-CoA-spezifischen Desaturase OtΔ6 (Abb. 17 C) und der lipidabhängigen Desaturase PtΔ6 (Abb. 17 D) dargestellt. Der Umsatz des angebotenen Substrats 18:3<sup>Δ9,12,15</sup> erfolgte mit unterschiedlicher katalytischer Effizienz (Abb. 17 E), wobei jeweils gleichen Proteinmengen der verwendeten Enzyme angenommen werden. Die katalytische Effizienz ist der prozentuale Anteil des Substrats, der durch die Enzymaktivität in das Produkt umgewandelt wurde. Etwa 34 % des in den Zellen zur Verfügung stehenden 18:3<sup>Δ9,12,15</sup>-Substrats wurde durch MsΔ6 umgesetzt. Damit ist die Desaturierungseffizienz von MsΔ6 mit jener der Δ6-Desaturase aus *O. tauri* vergleichbar (Abb. 17 E und vgl. Abb. 17 B und C). Im Gegensatz dazu zeigte PtΔ6

eine wesentlich geringere Desaturierungseffizienz, und nur etwa 15 % der  $18:3^{\Delta 9,12,15}$  wurden zu  $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$  desaturiert (Abb. 17 E).

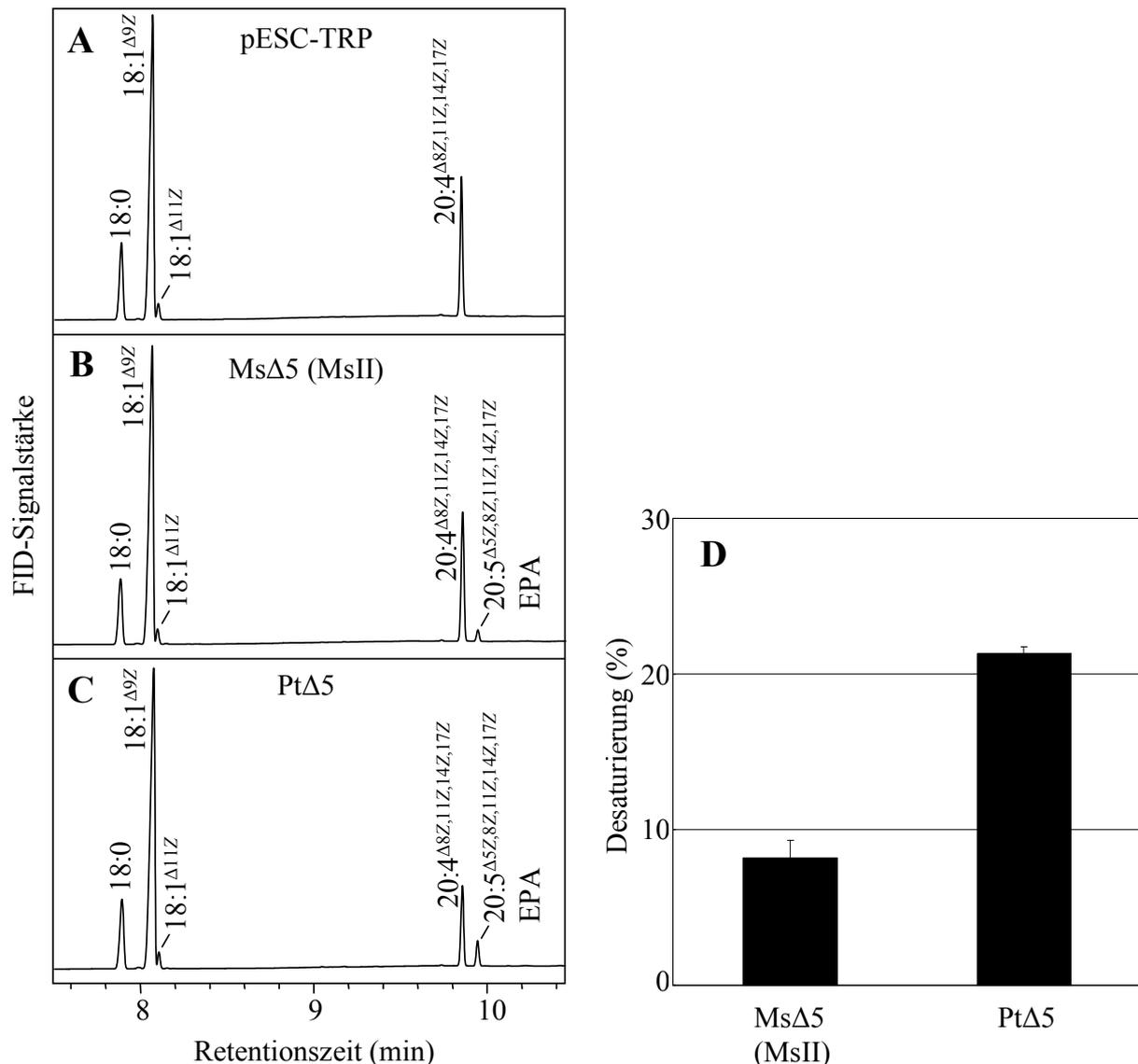


**Abb. 17. Vergleich der katalytischen Aktivität und Desaturierungseffizienz von MsΔ6 mit bekannten Δ6-Desaturasen.** Verschiedene Δ6-Desaturasen wurden für 72 h bei 22 °C in Anwesenheit von 200 μM  $18:3^{\Delta 9,12,15}$  exprimiert. (A) Leervektorkontrolle; (B) MsΔ6; (C) OtΔ6; (D) PtΔ6. Gezeigt sind repräsentative Fettsäureprofile von jeweils sechs unabhängigen Experimenten. (E) Die Desaturierungseffizienz der Δ6-Desaturasen wurde als  $(\text{Produkt} \cdot 100) / (\text{Edukt} + \text{Produkt})$  aus den prozentualen Anteilen der Gesamtfettsäuren berechnet. Die Werte in (E) geben die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Experimenten an.

Die Effizienz, mit der MsΔ5 die Substrate  $20:3^{\Delta 8,11,14}$  und  $20:4^{\Delta 8,11,14,17}$  in die entsprechenden Δ5-Desaturaseprodukte AA bzw. EPA umwandelte, wurde mit jener der PtΔ5 verglichen (Abb. 18 und Abb 19). Nur etwa 8–10 % der inkorporierten Substrate wurden von MsΔ5 zu den entsprechenden Δ5-Produkten desaturiert (Abb. 18 D und Abb. 19 D), was ein vergleichsweise geringer Wert ist im Vergleich zur Effizienz von PtΔ5 mit etwa 21 bis 26 % (Abb. 18 C und D und Abb. 19 C und D).



**Abb. 18. Katalytische Aktivität und Desaturierungseffizienz von MsΔ5 mit dem ω6-Fettsäuresubstrat  $20:3^{\Delta 8,11,14}$  im Vergleich zu PtΔ5.** (A-C) Beide Δ5-Desaturasen wurden für 72 h bei 22 °C in Anwesenheit von 200 μM  $20:3^{\Delta 8,11,14}$  exprimiert. (A) Leervektorkontrolle; (B) MsΔ5; (C) PtΔ5. Gezeigt sind repräsentative Fettsäureprofile von jeweils sechs unabhängigen Experimenten. (D) Die Desaturierungseffizienz der Δ5-Desaturasen wurde als  $(\text{Produkt} \cdot 100) / (\text{Edukt} + \text{Produkt})$  aus den prozentualen Anteilen der Gesamtfettsäuren berechnet. Die Werte geben die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Experimenten an.



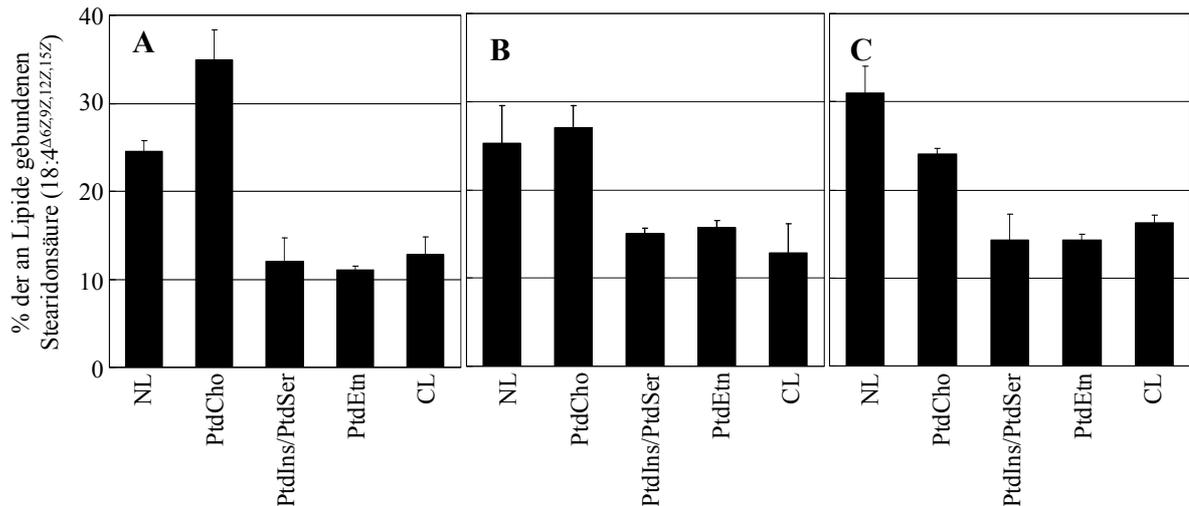
**Abb. 19. Katalytische Aktivität und Desaturierungseffizienz von MsΔ5 mit dem  $\omega$ 3-Fettsäuresubstrat 20:4<sup>Δ8,11,14,17</sup> im Vergleich zu PtΔ5.** Beide Δ5-Desaturasen wurden für 72 h bei 22 °C in Anwesenheit von 200  $\mu$ M 20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup> exprimiert. (A) Leervektorkontrolle; (B) MsΔ5; (C) PtΔ5. Gezeigt sind repräsentative Fettsäureprofile von jeweils sechs unabhängigen Experimenten. (D) Die Desaturierungseffizienz der Δ5-Desaturasen wurde als  $(\text{Produkt} \cdot 100)/(\text{Edukt} + \text{Produkt})$  aus den prozentualen Anteilen der Gesamtfettsäuren berechnet. Die Werte geben die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Experimenten an.

### 3.1.6 Charakterisierung der Substrate von MsΔ6 und MsΔ5: Lipidabhängige oder CoA-abhängige Desaturierung

Durch die nahe Verwandtschaft von *M. squamata* und *O. tauri*, aus der kürzlich die erste CoA-abhängige Desaturase identifiziert worden war (Domergue et al., 2005), lag die

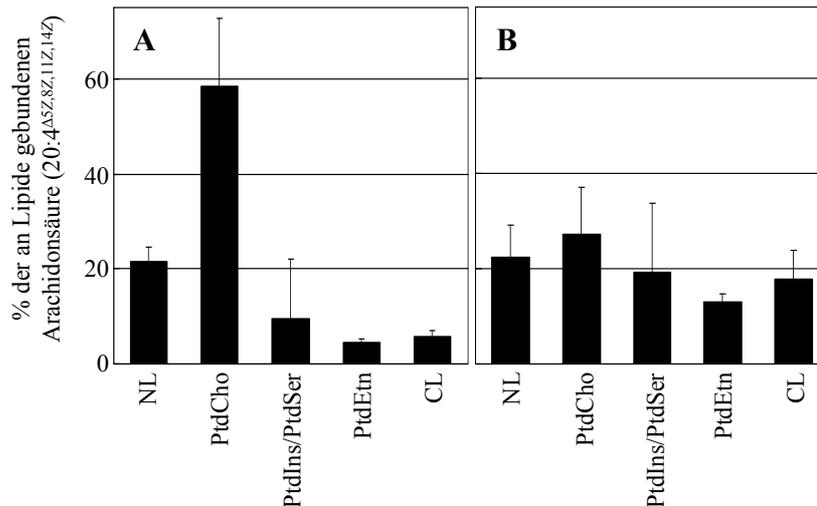
Möglichkeit nahe, daß auch die aus *M. squamata* klonierten  $\Delta 6$ - und  $\Delta 5$ -Desaturasen Acylreste bevorzugt CoA-abhängig desaturierten. Die Verteilung der Desaturierungsprodukte von Ms $\Delta 6$  und Ms $\Delta 5$  auf verschiedene Phospholipidklassen nach Expression in Hefe sollte einen Hinweis auf den bevorzugten Acylträger der Desaturasen geben. Als Vergleich dienen die CoA-abhängige Desaturase Ot $\Delta 6$  und die lipidabhängigen Desaturasen Pt $\Delta 6$  und Pt $\Delta 5$ . Eine gleichmäßige Verteilung der Desaturierungsprodukte auf verschiedene Phospholipide der Hefe würde auf eine Acyl-CoA-abhängige Desaturierung hinweisen, eine Akkumulation in einem bestimmten Phospholipid dagegen für eine lipidabhängige Aktivität sprechen.

Ms $\Delta 6$  oder Ms $\Delta 5$  wurden in Hefe in Anwesenheit von entweder 18:3 <sup>$\Delta 9,12,15$</sup>  oder 20:3 <sup>$\Delta 8,11,14$</sup>  exprimiert und die Verteilung der Desaturaseprodukte in den Neutrallipiden und den bedeutendsten Phospholipid-Klassen in Hefe analysiert (siehe 2.22.1 und 2.22.3). Parallel dazu wurden Kontrollexperimente mit der Acyl-CoA-abhängigen Desaturase Ot $\Delta 6$  und den lipidabhängigen Desaturasen Pt $\Delta 6$  und Pt $\Delta 5$  durchgeführt. Für alle getesteten  $\Delta 6$ -Desaturasen konnte gezeigt werden, daß das Desaturierungsprodukt 18:4 <sup>$\Delta 6,9,12,15$</sup>  überwiegend in den Neutrallipiden und in PtdCho akkumulierte und nur einen geringeren Anteil der Fettsäuren in den Phospholipiden PtdEtn, der PtdIns/PtdSer-Fraktion und CL ausmachte (Abb. 20). Erwartungsgemäß resultierte die Expression der lipid-abhängigen Desaturase Pt $\Delta 6$  in der Akkumulation von 35 % des Desaturaseproduktes 18:4 <sup>$\Delta 6,9,12,15$</sup>  bevorzugt in PtdCho (Abb. 20 A). Nach Expression der Acyl-CoA-abhängigen Desaturase Ot $\Delta 6$  konnte das Produkt 18:4 <sup>$\Delta 6,9,12,15$</sup>  zu annähernd gleichen Anteilen von 25 % und 27 % in der Neutrallipidfraktion und in PtdCho detektiert werden (Abb. 20 B). Die Expression von Ms $\Delta 6$  resultierte in einer Akkumulation von 31 % des gebildeten 18:4 <sup>$\Delta 6,9,12,15$</sup>  in den Neutrallipiden, während in PtdCho nur 24 % zu finden waren (Abb. 20 C), was als Hinweis auf eine evtl. nicht lipidabhängige Desaturierung zu deuten ist. Die Verteilung des Desaturaseproduktes 18:4 <sup>$\Delta 6,9,12,15$</sup>  auf die übrigen Phospholipide, PtdEtn, PtdIns/PtdSer und CL, war in allen  $\Delta 6$ -Desaturase Expressionskulturen annähernd gleich (vgl. Abb. 20 A, B, C).



**Abb. 20. Verteilung der  $\Delta 6$ -Desaturierungsprodukte auf verschiedene Phospholipide und die Neutrallipidfraktion.** Hefekulturen, die Pt $\Delta 6$  (A), Ot $\Delta 6$  (B) oder Ms $\Delta 6$  (C) exprimierten, wurden für 72 h bei 22 °C mit 200  $\mu\text{M}$  18:3 $\Delta 9,12,15$  kultiviert und anschließend der Lipidanalyse unterzogen. Die Daten zeigen die Mittelwerte mit Standardabweichung aus sechs Einzelmessungen. PtdCho, Phosphatidylcholin; PtdIns/PtdSer, Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin; PtdEtn, Phosphatidylethanolamin; CL, Cardiolipin; NL, Neutrallipide.

Produkte der  $\Delta 5$ -Desaturasen, Ms $\Delta 5$  und Pt $\Delta 5$ , konnten nach der Expression in Hefe in der Neutrallipidfraktion und allen analysierten Phospholipiden detektiert werden (Abb. 21). Der Vergleich der Produktverteilung der Desaturasen zeigte, daß das Desaturaseprodukt sich nach Expression der lipidabhängigen Desaturase Pt $\Delta 5$  zu 59 % in PtdCho anreicherte (Abb. 21 A), während 20:4 $\Delta 5,8,11,14$  nur zu geringen Anteilen in den Neutrallipiden und den übrigen Phospholipiden zu finden war. Nach der Expression von Ms $\Delta 5$  akkumulierte ihr Produkt 20:4 $\Delta 5,8,11,14$  (AA) zu etwa gleichen Mengen in den Neutrallipiden (22 %) und den analysierten Phospholipiden PtdCho (27 %), PtdEtn (13 %), PtdIns/PtdSer (19 %) und CL (18 %) (Abb. 21 B).



**Abb. 21. Verteilung der  $\Delta$ 5-Desaturierungsprodukte auf verschiedene Phospholipide und die Neutrallipidfraktion.** Hefekulturen, die Pt $\Delta$ 5 (A) oder Ms $\Delta$ 5 (B) exprimierten, wurden für 72 h bei 22 °C mit dem Substrat 200  $\mu$ M 20:3 $\Delta$ <sup>8,11,14</sup> kultiviert und anschließend der Lipidanalyse unterzogen. Die Daten zeigen die Mittelwerte mit Standardabweichung aus sechs Einzelmessungen. PtdCho, Phosphatidylcholin; PtdIns/PtdSer, Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin; PtdEtn, Phosphatidylethanolamin; CL, Cardiolipin; NL, Neutrallipide.

### 3.1.7 Detektion der Desaturaseprodukte von Ms $\Delta$ 6 und Ms $\Delta$ 5 als Coenzym A-Ester

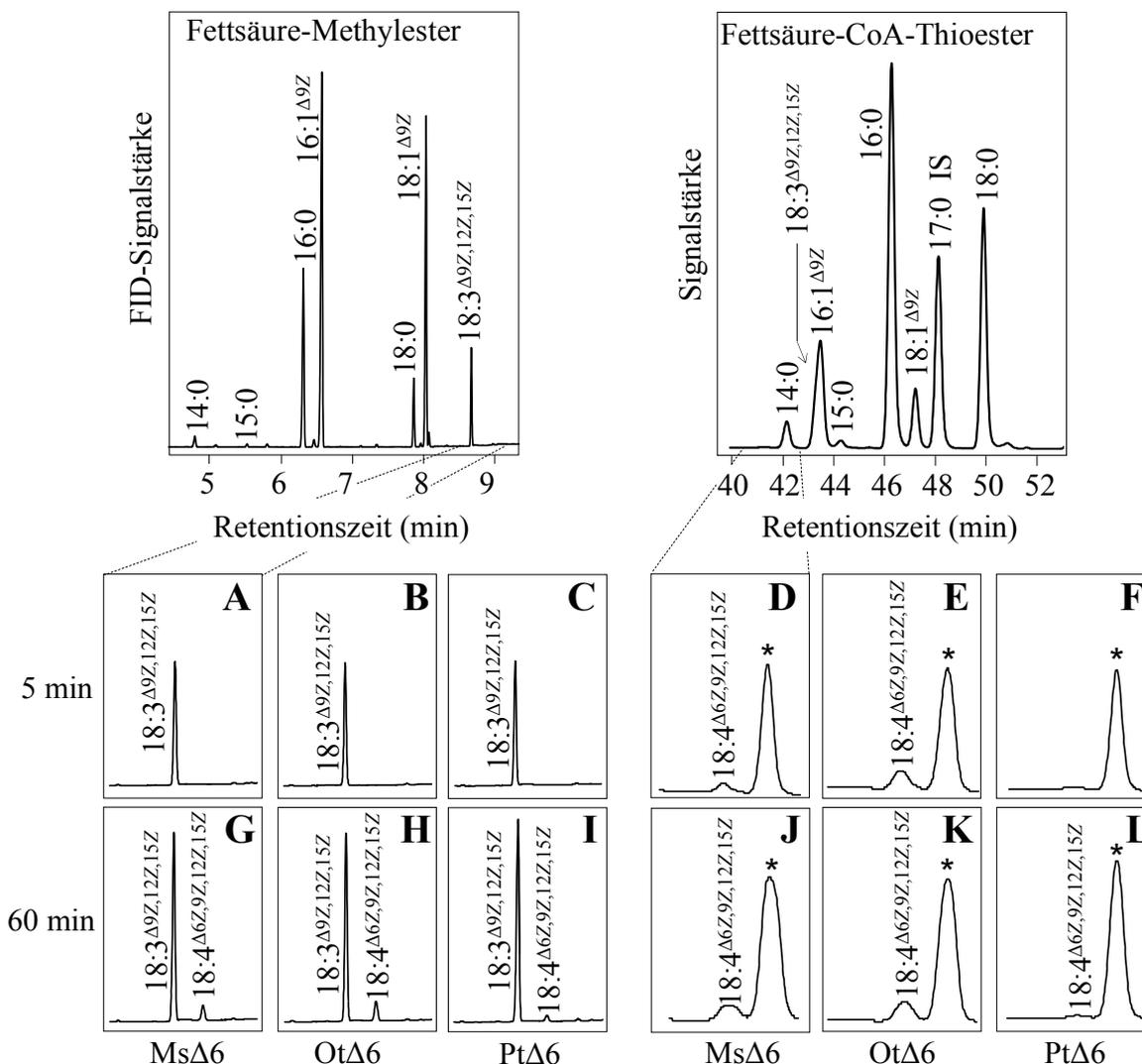
Die bisherigen Daten wiesen darauf hin, daß Ms $\Delta$ 6 und Ms $\Delta$ 5 Fettsäuren nicht bevorzugt an PtdCho gebunden desaturierten, sondern vielmehr ein Verteilungsmuster zeigten, das dem der Ot $\Delta$ 6 Desaturase ähnelte, die Acyl-CoA-Thioester den Lipidsubstraten vorzieht. Fettsäuren, die an CoA gebunden desaturiert werden, sollten im Acyl-CoA-Pool detektierbar sein, bevor sie in Lipide inkorporiert werden. Im Gegensatz dazu sollten Desaturaseprodukte lipidabhängiger Desaturasen zuerst in den Lipiden nachzuweisen sein, ehe sie durch Acyltransferase-Aktivitäten in den Acyl-CoA-Pool gelangen. Um die Acyl-CoA-Abhängigkeit von Ms $\Delta$ 6 und Ms $\Delta$ 5 zu testen, wurden Acyl-CoA- und lipidgebundene Fettsäuren in den entsprechenden Hefeexpressionskulturen zu bestimmten Zeitpunkten nach Zugabe des Fettsäuresubstrats analysiert. Parallel dazu wurden Kulturen getestet, die die Acyl-CoA-abhängige  $\Delta$ 6-Desaturase Ot $\Delta$ 6 oder die lipidabhängigen Desaturasen Pt $\Delta$ 6 oder Pt $\Delta$ 5 exprimierten. Die angewandte Methode wurde zuerst von Domergue et al. (2005) beschrieben. Die hier gewählten Zeitpunkte der Ernte waren für die  $\Delta$ 6-Desaturasen 5 min und 60 min, und für die  $\Delta$ 5-Desaturasen 60 min, 4 h, 8 h und 24 h nach Zugabe der Fettsäure. Transgene Hefen wurden in Hefeexpressionsmedium in Abwesenheit der jeweiligen Fettsäuresubstrate bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,5 - 2,0 kultiviert. Dadurch wurden die jeweiligen

cDNAs bereits exprimiert wenn der Versuch durch Zugabe der entsprechenden Fettsäuren gestartet wurde. Bei Expression der  $\Delta 6$ -Desaturasen wurde den Kulturen  $18:3^{\Delta 9,12,15}$ , bei  $\Delta 5$ -Desaturasen  $20:3^{\Delta 8,11,14}$  zugesetzt. Kulturen, die nicht mit exogenem Substrat versehen wurden, dienten als Kontrolle. Diese Kulturen zeigten Fettsäure- und Acyl-CoA-Muster, die nur die endogenen Hefefettsäuren repräsentierten.

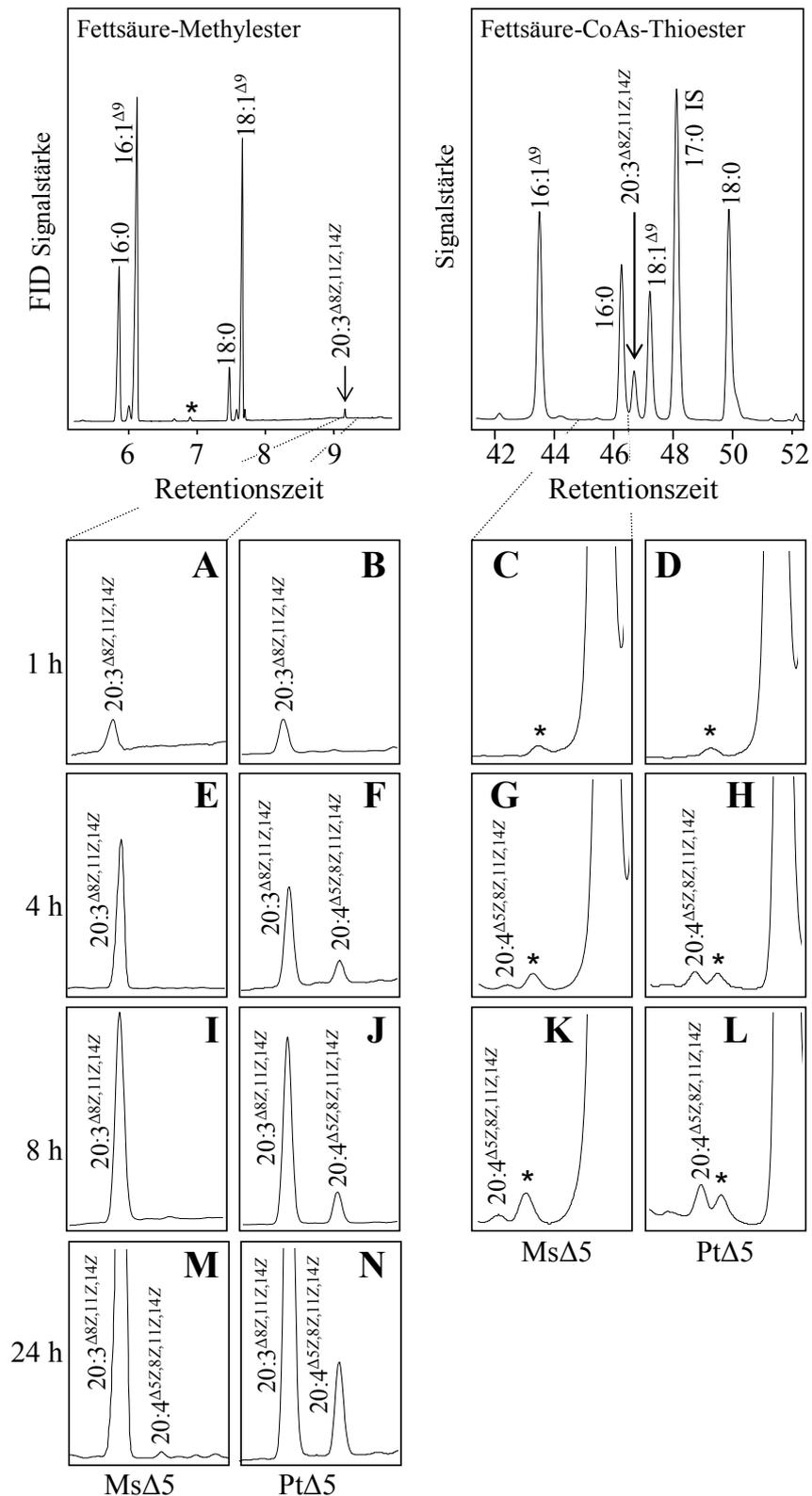
Schon fünf Minuten nach Zugabe von  $18:3^{\Delta 9,12,15}$ -Substrates zu Kulturen, die Ms $\Delta 6$ , Ot $\Delta 6$  oder Pt $\Delta 6$  exprimierten, konnte das Substrat in den Fettsäure- und Acyl-CoA-Profilen detektiert werden (Abb. 22 A - C), was auf eine erfolgreiche Aufnahme und Aktivierung des Substrats in Hefe hinweist. Gleichzeitig konnte das Desaturierungsprodukt  $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$  in den Ms $\Delta 6$ - und Ot $\Delta 6$ -exprimierenden Kulturen im Acyl-CoA-Pool identifiziert werden, nicht aber in den Kulturen, die Pt $\Delta 6$  exprimierten (vgl. Abb. 22 D - F). In keiner Kultur war das  $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$ -Produkt in den parallel gemessenen lipidgebundenen Fettsäuren detektierbar. Erst 60 Minuten nach Zugabe von  $18:3^{\Delta 9,12,15}$  konnten Spuren des  $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$ -Produktes in lipidgebundenen Fettsäuren der Ms $\Delta 6$ , Ot $\Delta 6$  und der Pt $\Delta 6$  Kulturen nachgewiesen werden (Abb. 22 G, H, I). Parallel dazu konnten nun auch geringe Mengen des  $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$ -Produkts im Acyl-CoA-Pool der Pt $\Delta 6$ -Kulturen gemessen werden (Abb. 22 J).

Die Veränderungen im Gesamtfettsäure- und Acyl-CoA-Pool bei Hefekulturen, die die  $\Delta 5$ -Desaturasen Ms $\Delta 5$  oder Pt $\Delta 5$  exprimierten, wurden wie bei den  $\Delta 6$ -Desaturasen analysiert. Verändert wurden hier die Zeitpunkte, bei denen die Kulturen nach Zugabe des Substrats geerntet wurden, da beide  $\Delta 5$ -Desaturasen wesentlich ineffizienter Edukte zu Produkten desaturierten. Die Expressionskulturen wurden daher direkt vor der Zugabe der Fettsäure  $20:3^{\Delta 8,11,14}$  und 1, 4, 8 und 24 h nach Zugabe des Substrats analysiert. Eine Stunde nach Zugabe von  $20:3^{\Delta 8,11,14}$  konnte in allen Kulturen nur die aufgenommene Fettsäure als aktivierter CoA-Thioester oder in die Lipide inkorporiert detektiert werden (Abb. 23 A, B). Nach 4 h war  $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ , das Produkt der Pt $\Delta 5$ -Desaturase, gleichzeitig im Lipid- als auch im Acyl-CoA-Pool nachweisbar (Abb. 23 F und H). In den Ms $\Delta 5$  Kulturen hingegen war  $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$  nach 4 h nur im Acyl-CoA-Pool detektierbar, nicht aber in den Lipiden (Abb. 23 E und G). Erst nach 24 h Inkubation mit dem Substrat  $20:3^{\Delta 8,11,14}$  konnte die Aktivität der Ms $\Delta 5$ -Desaturase, in Form von  $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$  auch im Lipid-Pool nachgewiesen werden (Abb. 23 M). Das frühere Erscheinen der  $\Delta 6$ - und  $\Delta 5$ -Desaturaseprodukte  $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$  bzw.  $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$  im Acyl-CoA-Pool gegenüber dem im Lipid-Pool spricht für eine Acyl-CoA-abhängige Desaturierung durch Ms $\Delta 6$  und Ms $\Delta 5$ . Gestärkt wird diese Schlußfolgerung durch den Vergleich mit der bereits durch Domergue et al. (2005) charakterisierten und sich

hier ähnlich verhaltenden Acyl-CoA-Desaturase Ot $\Delta$ 6 und den gegensätzlichen Fettsäure- und Acyl-CoA-Mustern der lipidabhängigen Desaturasen Pt $\Delta$ 6 und Pt $\Delta$ 5.



**Abb. 22. Nachweis des Ms $\Delta$ 6-Desaturierungsproduktes im Acyl-CoA-Pool vor der Inkorporation in Lipide.** Hefekulturen, die entweder Ms $\Delta$ 6, Ot $\Delta$ 6 oder Pt $\Delta$ 6 exprimierten, wurden nach Erreichen einer OD von 1,5 – 2,0 mit 18:3 $^{\Delta 9,12,15}$  ergänzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Acyl-CoA-Pool und Lipid-Pool auf die Aufnahme des Substrats in die Hefezellen und auf die neu gebildete  $\Delta$ 6-desaturierte Fettsäure analysiert. Oben links, typisches Profil transesterifizierter Fettsäuren von Hefe. Oben rechts, typisches Acyl-CoA-Profil von Hefe. Zur besseren Visualisierung werden im unteren Bereich Ausschnitte der entsprechenden Profile gezeigt. (A-C) Ausschnitte der Fettsäure-GC-Profile, 5 Minuten nach Zugabe von 200  $\mu$ M 18:3 $^{\Delta 9,12,15}$ . (D-E) Ausschnitt aus den Acyl-CoA-Profilen. Bereits nach 5 min konnte das Desaturierungsprodukt von Ms $\Delta$ 6 und Ot $\Delta$ 6 im Acyl-CoA-Pool gemessen werden. (G-I) Detektion des Desaturierungsproduktes in der lipidgebundenen Fettsäurefraktion aller Expressionsansätze 60 min nach Zugabe des Substrats. (J-L) Korrespondierende Acyl-CoAs der Expressionskulturen. Die dargestellten Lipid- und Acyl-CoA-Profile sind repräsentativ für die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten. (\*) markiert die hefeeigene Fettsäure 14:0.



**Abb. 23. Nachweis des Ms $\Delta^5$ -Desaturierungsproduktes im Acyl-CoA-Pool vor der Inkorporation in Lipide.** Hefekulturen, die entweder Ms $\Delta^5$  oder Pt $\Delta^5$  exprimierten, wurden nach Erreichen einer OD von 1,5 – 2,0 mit 20:3 $\Delta^8,11,14$  ergänzt und zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Aufnahme des Substrats in die Hefezellen und auf die neu gebildete  $\Delta^6$ -desaturierte Fettsäure im Acyl-CoA und Lipid-Pool analysiert. Oben links, typisches Profil transesterifizierter Fettsäuren von Hefe; oben rechts, typisches Acyl-CoA-Profil von Hefe. Zur besseren Visualisierung werden im unteren Bereich Ausschnitte der entsprechenden Profile gezeigt. **(A und B)** Ausschnitte der Fettsäure-

GC-Profilen, 1 h nach Zugabe von 200  $\mu\text{M}$  20:3 <sup>$\Delta$ 8,11,14</sup>. Die Fettsäure wurde in die Zellen aufgenommen und in die Lipide inkorporiert. **(C und D)** Ausschnitte aus den korrespondierenden Acyl-CoA-Profilen. **(E und F)** Detektion des Desaturierungsprodukts in der lipidgebundenen Fettsäurefraktion nach Expression von Pt $\Delta$ 5, nicht aber nach Expression von Ms $\Delta$ 5 4 h nach Zugabe des Substrats. **(G und H)** Korrespondierende Acyl-CoAs der Expressionskulturen. In beiden Expressionsansätzen (Ms $\Delta$ 5 und Pt $\Delta$ 5) konnte das Desaturierungsprodukt der  $\Delta$ 5-Desaturasen detektiert werden. **(I und J)** Fettsäureprofil-Ausschnitte 8 h nach Zugabe des Fettsäure-substrats sowie **(K und L)** die korrespondierenden Acyl-CoA-Daten. **(M)** Fettsäureprofil-Ausschnitte 24 h nach Zugabe des Fettsäuresubstrats. Erst jetzt konnte in den Ms $\Delta$ 5-Expressionskulturen das Desaturierungsprodukt auch in den lipidgebundenen Fettsäuren gemessen werden. Die dargestellten Lipid- und Acyl-CoA-Profile sind repräsentativ für die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten. (\*) markiert die hefeeigene Fettsäure 17:1 <sup>$\Delta$ 9</sup>.

### 3.1.8 Test des biosynthetischen Zusammenspiels der *M. squamata*-Desaturasen mit Elongasen

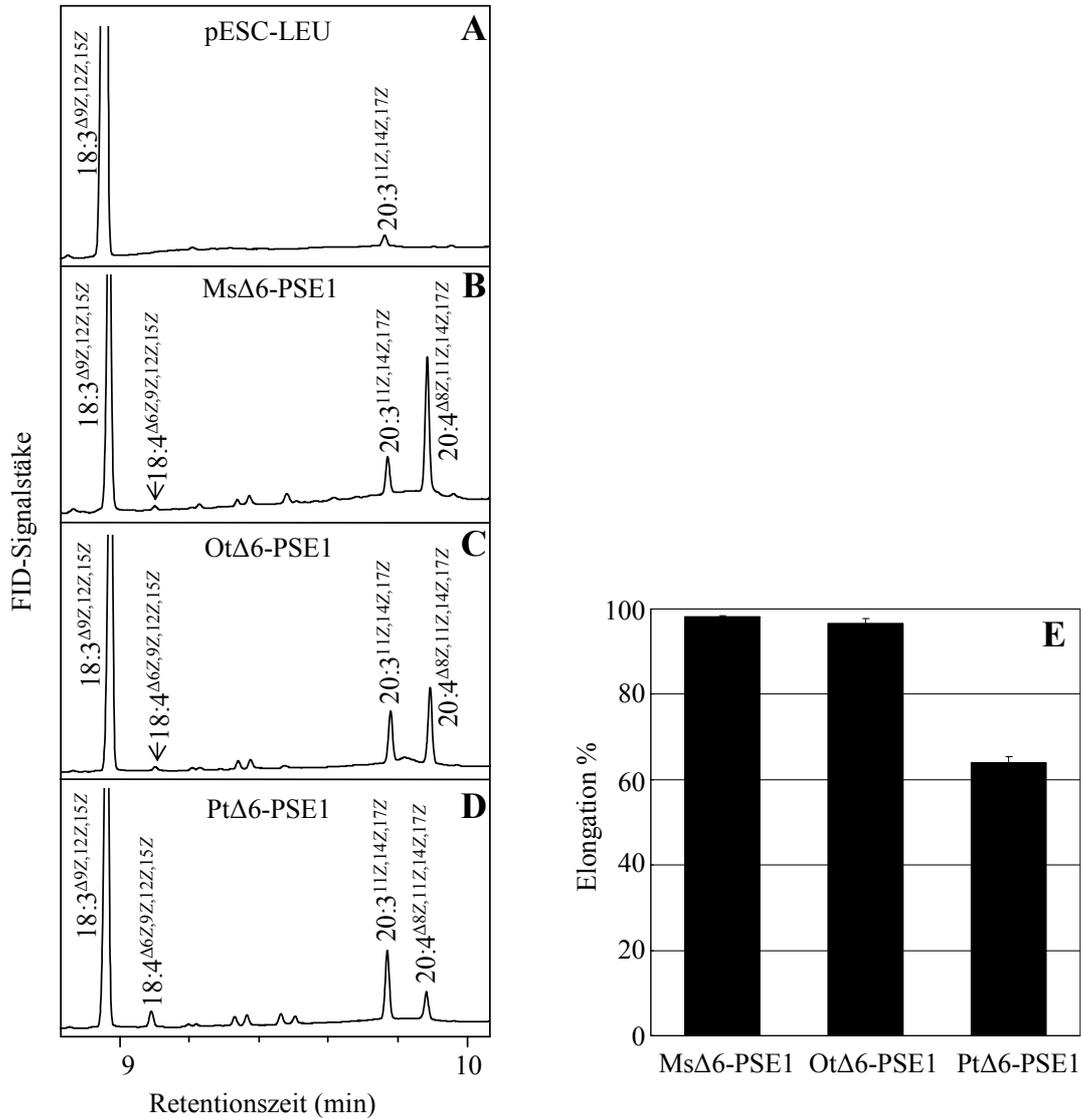
Als Ergänzung der Acyl-CoA-Pool-Messungen wurde ein zusätzlicher *in vivo* Nachweis der Acyl-CoA-abhängigen Desaturierung durch Ms $\Delta$ 6 und Ms $\Delta$ 5 gesucht. Beide Desaturasen wurden dazu individuell mit einer Elongase coexprimiert, die für die entsprechenden Desaturaseprodukte spezifisch ist. Das grundlegende Prinzip des Tests ist, daß die Fettsäureelongation Acyl-CoA-abhängig ist (Ghanevati und Jaworski, 2002; Domergue et al., 2003), und daß folglich Fettsäuren, die durch Acyl-CoA-abhängige Desaturierung entstehen und gleichzeitig Substrate für die Elongase darstellen, effizienter elongiert werden als solche, die an PtdCho desaturiert werden und der Elongase erst nach Umesterung vom Lipid auf CoA zu Verfügung stehen. Die Effizienz der kombinierten Desaturase/Elongase-Aktivität wurde mit der der bekannten Desaturasen Ot $\Delta$ 6, Pt $\Delta$ 6 oder Pt $\Delta$ 5 verglichen.

Die  $\Delta$ 6-Desaturasen wurden jeweils zusammen mit der  $\Delta$ 6-Elongase PSE1 aus dem Moos *Physcomitrella patens* (Zank et al., 2002) in Gegenwart des  $\Delta$ 6-Desaturasesubstrats 18:3 <sup>$\Delta$ 9,12,15</sup> in Hefe exprimiert. Als Kontrolle wurde parallel der Leervektor pESC-LEU exprimiert (Abb. 24 A). In Abb. 24 B und C sind Ausschnitte aus den Fettsäure-Profilen von Hefekulturen nach Coexpression von Ms $\Delta$ 6 bzw. Ot $\Delta$ 6 mit PSE1 dargestellt. Neben dem gefütterten Fettsäuresubstrat und den endogenen Hefefettsäuren, war das Desaturaseprodukt 18:4 <sup>$\Delta$ 6,9,12,15</sup> in beiden Ansätzen nur in Spuren detektierbar. Stattdessen wurde 18:4 <sup>$\Delta$ 6,9,12,15</sup> nahezu vollständig in das Elongationsprodukt der PSE1, 20:4 <sup>$\Delta$ 8,11,14,17</sup>, umgewandelt. Die Elongationseffizienzen der beiden Enzyme lagen bei 96 % und 97 % (Abb. 24 E). Eine weitere gebildete Fettsäure konnte als 20:3 <sup>$\Delta$ 11,14,17</sup> identifiziert werden, die durch die direkte Elongation des aufgenommenen und CoA-aktivierten Fettsäuresubstrates 18:3 <sup>$\Delta$ 9,12,15</sup> durch

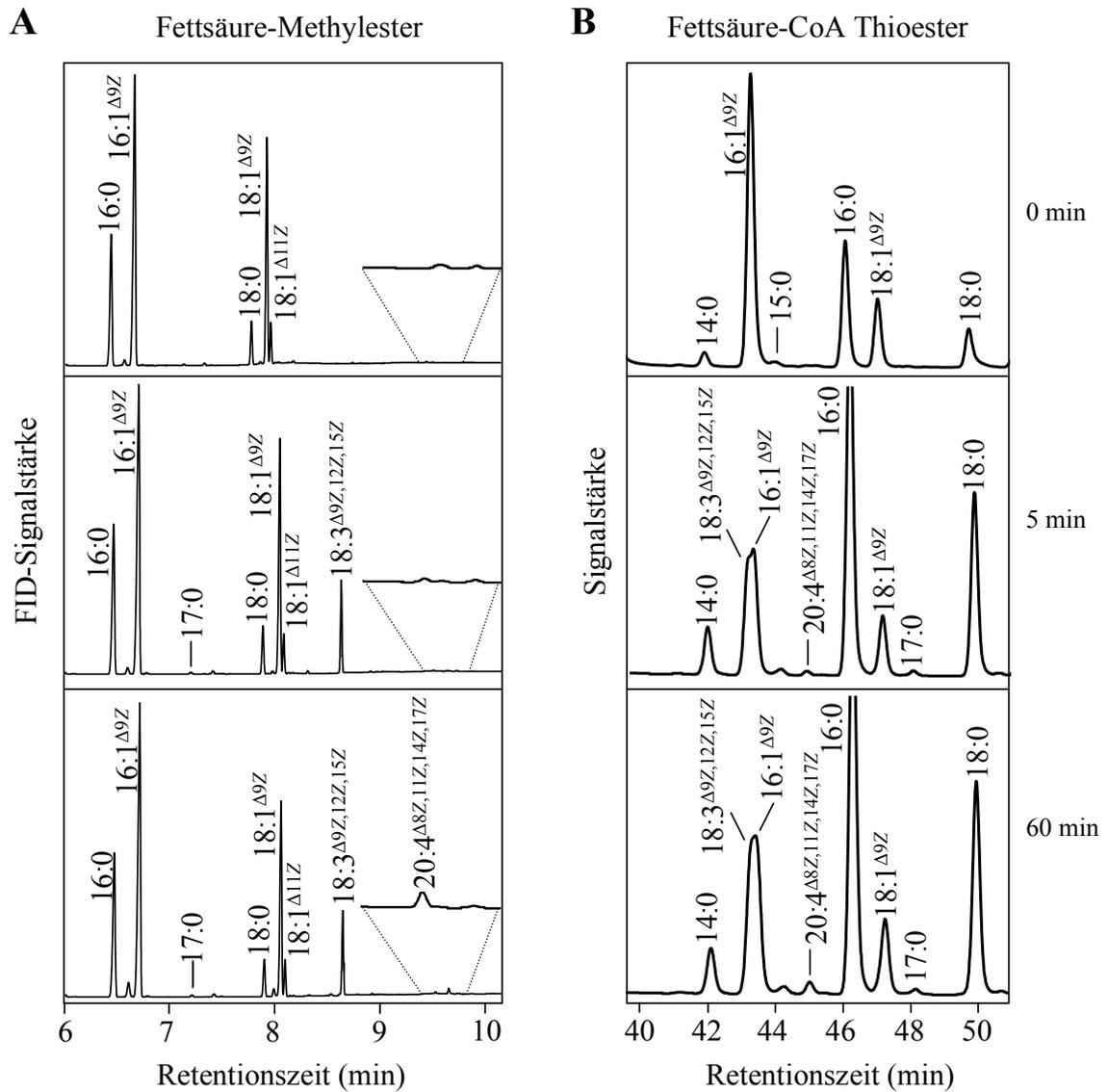
PSE1 oder durch eine der hefeeigenen Elongasen entstand. Die Beobachtung, daß PSE1 keine strikte Substratspezifität aufweist, wurde schon zu früherer Gelegenheit beschrieben (Zank et al., 2002; Domergue et al., 2002). Im Gegensatz zur Situation nach Expression von Ms $\Delta$ 6, resultierte die Coexpression von Pt $\Delta$ 6 mit PSE1 in einer Akkumulation des Desaturaseproduktes 18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$  und in einer ineffizienteren Elongation zu 20:4 $^{\Delta 8,11,14,17}$ ; nur etwa 60 % des Substrates wurden umgesetzt (Abb. 24 D und E). Dabei ist bemerkenswert, daß die angebotene Fettsäure 18:3 $^{\Delta 9,12,15}$  effizienter zu 20:3 $^{\Delta 11,14,17}$  elongiert wurde, als das  $\Delta$ 6-desaturierte Produkte der lipidabhängigen Pt $\Delta$ 6 Desaturase, die das eigentliche Substrat der  $\Delta$ 6-Elongase darstellt. Die CoA-aktivierte aufgenommene Fettsäure 18:3 $^{\Delta 9,12,15}$  war demnach ein besseres Substrat für PSE1 als das lipidgebundene 18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$ , trotz der Präferenz von PSE1 für  $\Delta$ 6-desaturierte Fettsäuren. Die geringere Akkumulation von 20:3 $^{\Delta 11,14,17}$  bei Expression von Ms $\Delta$ 6 oder Ot $\Delta$ 6 erklärt sich durch die hohe Effizienz mit der diese Enzyme 18:3 $^{\Delta 9,12,15}$  zu 18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$  umsetzen, so daß das gebildete 18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$  mit 18:3 $^{\Delta 9,12,15}$  um Bindung an PSE1 konkurriert (Abb. 24 B, C, D).

Das effiziente Zusammenspiel der Ms $\Delta$ 6-Desaturase mit der  $\Delta$ 6-Elongase, PSE1, ließ sich durch Acyl-CoA-Pool Messungen bestätigen. Ein vergleichbares Experiment wie unter 3.1.7 beschrieben zeigte, daß bei Coexpression von Ms $\Delta$ 6 zusammen mit PSE1 die Reaktionsfolge vollständig im Acyl-CoA-Pool abläuft. Das  $\Delta$ 6-Desaturase-Intermediat, 18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$ , das das Substrat der PSE1 darstellt, war weder im Acyl-CoA-Pool, noch im Lipid-Pool nachzuweisen (Abb. 25 A, B). Statt dessen war das Endprodukt der Reaktionsfolge, 20:4 $^{\Delta 8,11,14,17}$ , 5 min nach Zugabe des 18:3 $^{\Delta 9,12,15}$ -Substrates direkt im CoA-Pool zu detektieren (Abb. 25 B) noch bevor es im Lipid-Pool nachweisbar war (Abb. 25).

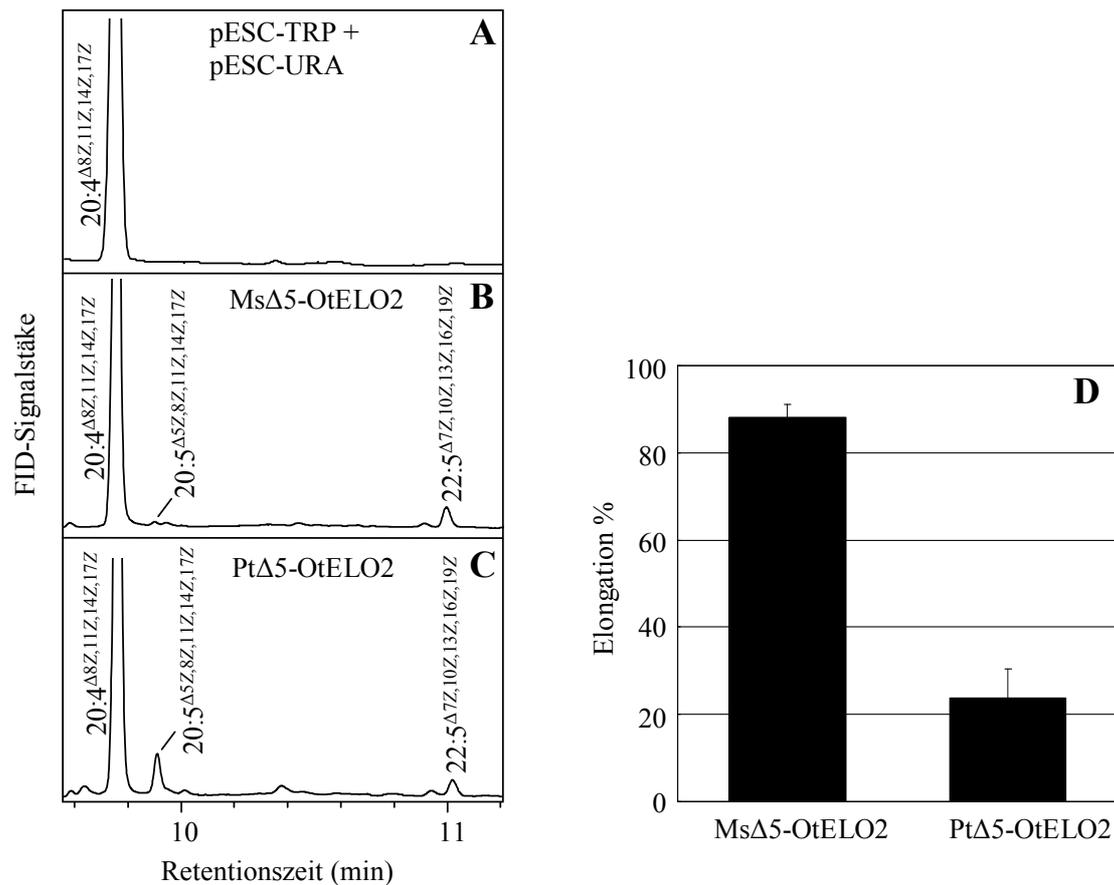
Die  $\Delta$ 5-Desaturasen Ms $\Delta$ 5 und Pt $\Delta$ 5 wurden in Hefe mit der  $\Delta$ 5-Elongase OtELO2 aus *O. tauri* (Meyer et al., 2004) coexprimiert. Den Kulturen wurde das  $\omega$ 3-Substrat 20:4 $^{\Delta 8,11,14,17}$  angeboten, da die jeweils coexprimierte  $\Delta$ 5-Elongase eine Präferenz für  $\omega$ 3-Fettsäuren hat (Meyer et al., 2004) und das entstehende  $\Delta$ 5-Desaturaseprodukt vorzieht. In Abb. 26 sind Ausschnitte der Fettsäureprofile nach der Expression der  $\Delta$ 5-Desaturasen zusammen mit OtELO2 dargestellt. Während von Ms $\Delta$ 5 gebildetes 20:5 $^{\Delta 5,8,11,14,17}$  (EPA) durch OtELO2 zu 88 %, d.h. nahezu vollständig zu 22:5 $^{\Delta 7,10,13,16,19}$  elongiert wurde (Abb. 26 B und D), akkumulierte das Desaturaseprodukt 20:5 $^{\Delta 5,8,11,14,17}$  (EPA) in Kulturen, in denen Pt $\Delta$ 5 zusammen mit OtELO2 exprimiert wurde (Abb. 26 C). Die Elongationseffizienz zu 22:5 $^{\Delta 7,10,13,16,19}$  war in diesen Kulturen mit etwa 24 % Konversion sehr gering (Abb. 26 D). Faßt man die bisherigen Daten der Expressionsstudien zusammen, zeigten Ms $\Delta$ 6 und Ms $\Delta$ 5 Charakteristika, die eher für CoA-abhängige als für lipidabhängige Desaturierung sprechen.



**Abb. 24. Effiziente Elongation des MsΔ6 Produkts 18:4<sup>Δ6,9,12,15</sup> durch PSE1.** Verschiedene Δ6-Desaturasen wurden mit der Δ6-Elongase PSE1 aus *P. patens* in Anwesenheit von 200 μM 18:3<sup>Δ9,12,15</sup> coexprimiert. Nach 72 h bei 22 °C wurden die Kulturen auf ihre Fettsäureprofile hin analysiert. (A) Leervektor; (B) MsΔ6-PSE1; (C) OtΔ6-PSE1; (D) PtΔ6-PSE1. Die gezeigten Profile sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (E) Die Elongationseffizienz wurde als (Produkt · 100)/Edukt + Produkt der Δ6-Elongase des durch die Δ6-Desaturierung bereitgestellten Substrates berechnet. Die Daten in (E) repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten.



**Abb. 25. Zeitverlauf der Fettsäureakkumulation in Gesamtfettsäuren und Acyl-CoA-Pool bei Coexpression von MsΔ6 und PSE1.** Hefekulturen, die MsΔ6 zusammen mit der Δ6-Elongase PSE1 exprimierten, wurden bei einer  $OD_{600} = 1,5 - 2,0$  mit  $200 \mu\text{M } 18:3^{\Delta 9,12,15}$  versetzt. Direkt vor der Fettsäurezugabe und 5 bzw. 60 min nach der Fettsäurezugabe wurden Proben der Expressionskulturen geerntet und ihre Fettsäurezusammensetzung im Lipid- und CoA-Pool analysiert. **(A)** Lipid-Pool; gemessen wurden die Fettsäuremethylester lipidgebundener Fettsäuren (GC). **(B)** Acyl-CoA-Pool. Die dargestellten Lipid- und Acyl-CoA-Profile sind repräsentativ für die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.



**Abb. 26. Effiziente Elongation des Ms $\Delta$ 5 Produkts 20:5 $\Delta$ 5,8,11,14,17 durch OtELO2.** Verschiedene  $\Delta$ 5-Desaturasen wurden mit der  $\Delta$ 5-Elongase OtELO2 aus *O. tauri* in Anwesenheit von 200  $\mu$ M 20:4 $\Delta$ 8,11,14,17 coexprimiert. Nach 72 h bei 22 °C wurden die Kulturen auf ihre Fettsäuren analysiert. (A) Leervektor; (B) Ms $\Delta$ 5-OtELO2; (C) Pt $\Delta$ 5-OtELO2. Die gezeigten Profile sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (D) Die Elongationseffizienz wurde als (Produkt · 100)/Edukt + Produkt der  $\Delta$ 5-Elongase des durch die  $\Delta$ 5-Desaturierung bereitgestellten Substrates, berechnet. Die Daten in (D) repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten.

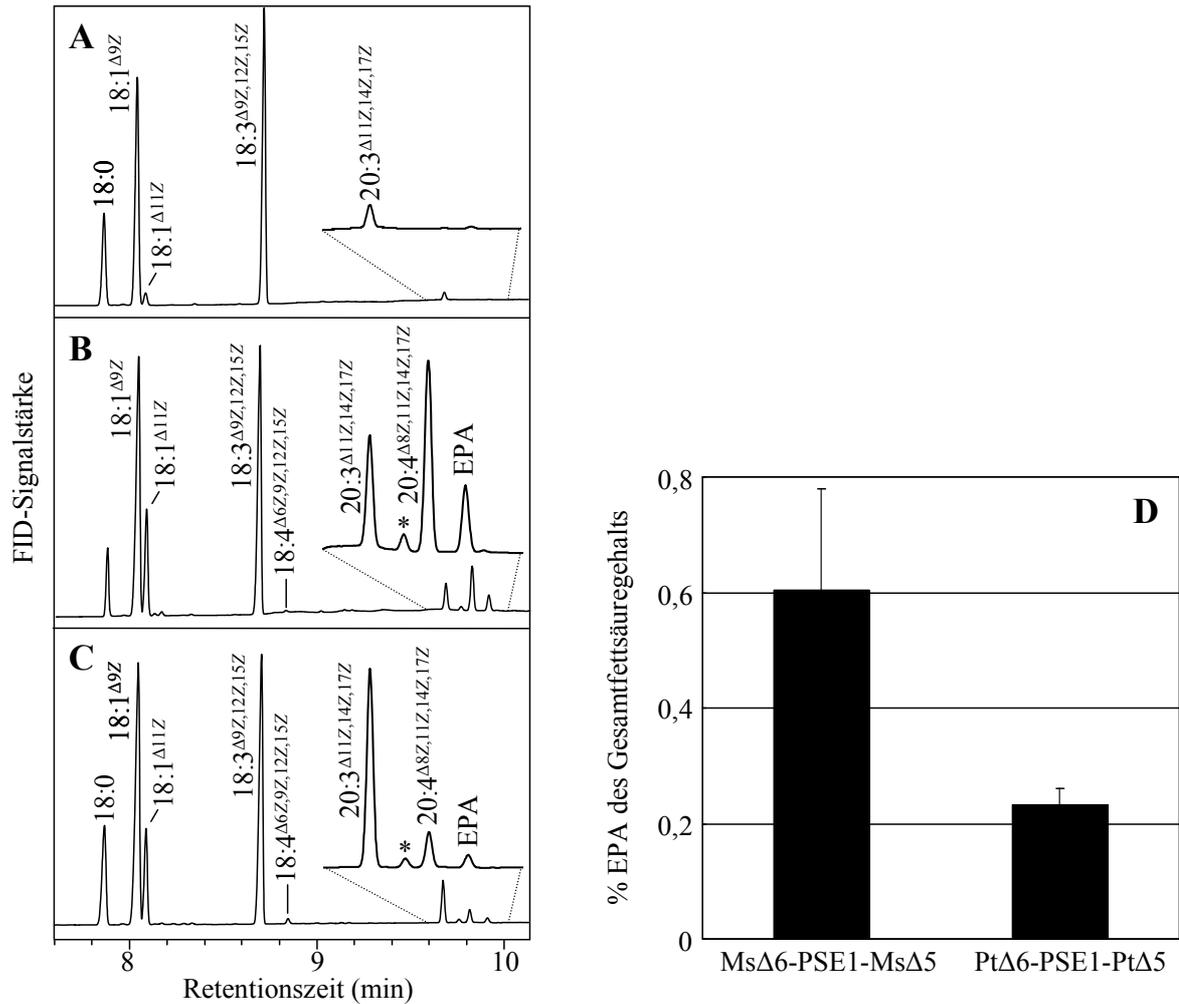
### 3.1.9 Akkumulation von EPA bei CoA-abhängiger- oder lipidabhängiger Biosynthese in Hefe

Die Charakterisierung der neu identifizierten Desaturasen Ms $\Delta$ 6 und Ms $\Delta$ 5 ergab eindeutige Hinweise auf ihre CoA-abhängige Desaturierung. Um zu testen, ob das Zusammenspiel der Acyl-CoA-spezifischen Desaturasen zu einer effizienteren Synthese von 20:5 $\Delta$ 5,8,11,14,17 (EPA) führt als das der lipidabhängigen Desaturasen, wurden Ms $\Delta$ 6 und Ms $\Delta$ 5 und analog dazu Pt $\Delta$ 6 und Pt $\Delta$ 5 zusammen mit der  $\Delta$ 6-Elongase PSE1 in Hefe exprimiert. Die Expressionskulturen wurden mit 18:3 $\Delta$ 9,12,15 versetzt und anschließend auf ihre Fettsäurezusammensetzung untersucht.

In beiden Expressionskulturen konnten EPA-Biosyntheseintermediate wie 18:4<sup>Δ6,9,12,15</sup> oder 20:4<sup>Δ8,11,14,17</sup>, sowie EPA selbst, identifiziert werden (Tab. 2 und Abb. 27). Außerdem konnten Nebenprodukte der Enzymreaktionen wie 20:3<sup>Δ11,14,17</sup> und 20:4<sup>Δ5,11,14,17</sup> identifiziert werden. Die EPA-Biosynthese konnte also durch heterologe Expression jedes der beiden Biosynthesewege in Hefe etabliert werden. Hinsichtlich der erreichten Akkumulation von EPA zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede bei Expression des Acyl-CoA-abhängigen und des lipidabhängigen Weges (Tab. 2 und Abb. 27 B und C). EPA akkumulierte in den Hefekulturen durch das Zusammenwirken der Acyl-CoA-abhängigen Desaturasen MsΔ6 und MsΔ5 mit der Acyl-CoA-abhängigen Δ6-Elongase zu ungefähr 0,6 % der Gesamtfettsäuren und damit zwei bis drei mal höher als bei Expression lipidabhängiger Desaturasen mit nur 0,23 % EPA (siehe Abb. 27 D). Dieses Ergebnis wurde erzielt, obwohl die MsΔ5 Desaturase weniger effizient war als die PtΔ5-Desaturase (vgl. auch Abb. 18 und 19) und nur 23 % der elongierten Fettsäureintermediate durch MsΔ5 zu EPA desaturiert wurden. Der vergleichsweise höhere EPA-Gehalt ist also auf die hohe MsΔ6-Aktivität und die mit 97 % Umsatz sehr effiziente Elongation des Δ6-desaturierten Substrates zurückzuführen.

Der Umsatz der gefütterten 18:3<sup>Δ9,12,15</sup> zum Endprodukt EPA war bei Verwendung der Acyl-CoA-abhängigen Desaturasen deutlich effizienter als mit den hier zum Vergleich herangezogenen lipidabhängigen Desaturasen. Es ist von entscheidender Wichtigkeit anzumerken, daß die Akkumulation der Δ6-desaturierten Produkte im lipidspezifischen Biosyntheseweg als limitierender Faktor der EPA Biosynthese in Lein identifiziert worden war (Abbadi et al., 2004). In der komplett Acyl-CoA-abhängigen Reaktionsfolge kam es zu keiner oder nur geringer Häufung der Biosyntheseintermediate, während im lipidabhängigen Biosyntheseweg bereits das Δ6-Desaturaseprodukt akkumulierte und nur in begrenztem Umfang der darauf folgenden Elongase-Reaktion zur Verfügung stand.

Durch die in Hefe zur EPA-Produktion exprimierten Enzyme entstanden auch die Nebenprodukte 20:3<sup>Δ11,14,17</sup> und 20:4<sup>Δ5,11,14,17</sup>. Wie schon unter 3.1.8 beschrieben, wird 20:3<sup>Δ11,14,17</sup> durch die unspezifische Δ6-Elongase PSE1 und bis zu einem gewissen Grad auch durch die Aktivität der in Hefe vorkommenden Elongasen gebildet (siehe Abb. 27 A). Die Fettsäure 20:4<sup>Δ5,11,14,17</sup> entsteht durch die Aktivität der Δ5-Desaturasen, die das durch die Δ6-Elongase gebildete Nebenprodukt 20:3<sup>Δ11,14,17</sup> umsetzen (siehe Abb. 27 und auch Tab. 1).



**Abb. 27. Etablierung eines ausschließlich Acyl-CoA-abhängigen EPA-Biosyntheseweges in Hefe.** Die EPA Akkumulation in Hefe bei Coexpression Acyl-CoA-abhängiger Desaturasen mit PSE1 und die bei Coexpression lipidabhängiger Desaturasen mit PSE1 wurde verglichen. Die Expressionskulturen wurden für 72 h bei 22 °C mit 200 μM 18:3<sup>Δ9,12,15</sup>, dem Ausgangssubstrat der EPA-Synthese, kultiviert und anschließend auf ihre Fettsäurezusammensetzung untersucht. (A) Leervektorkontrolle; (B) Coexpression der CoA-abhängigen MsΔ6, MsΔ5 und PSE1; (C) Coexpression der lipidabhängigen PtΔ6, PtΔ5 mit PSE1. Das Nebenprodukt der Enzyme, 20:4<sup>Δ5,11,14,17</sup>, ist mit einem Stern gekennzeichnet. Die gezeigten Profile repräsentieren Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten. (D) Die ermittelten prozentualen EPA-Anteile an den Gesamtfettsäuregehalten der Hefeexpressionskulturen. Die Daten in (D) sind Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

**Tab. 2. Fettsäurezusammensetzung von Hefe nach Coexpression von MsΔ6, PSE1 und MsΔ5 oder von PtΔ6, PSE1 und PtΔ5.** Zur Kontrolle wurden Hefekulturen analysiert, die mit der Leervektorkombination transformiert worden waren. Die Expressionskulturen wurden für 72 h bei 22 °C mit 18:3<sup>Δ9,12,15</sup> als Ausgangssubstrat der EPA-Synthese kultiviert und anschließend auf ihre Fettsäurezusammensetzung untersucht. Die mit einem Stern gekennzeichneten Fettsäuren sind hefe-eigene Fettsäuren, die mit zwei Sternen gekennzeichnete das den Hefekulturen applizierte Substrat.

Fettsäure	Leervektor	MsΔ6-PSE1-MsΔ5	PtΔ6-PSE1-PtΔ5
16:0*	14,5 ± 0,3	16,7 ± 0,5	17,4 ± 1,6
16:1 <sup>Δ9*</sup>	27,3 ± 0,3	28,9 ± 0,2	28,2 ± 0,6
18:0*	5,9 ± 0,4	4,2 ± 0,2	4,6 ± 0,2
18:1 <sup>Δ9*</sup>	16,3 ± 0,6	16,7 ± 0,3	16,7 ± 0,4
18:3 <sup>Δ9,12,15**</sup>	27,6 ± 1,2	22,6 ± 1,5	23,3 ± 2,7
18:4 <sup>Δ6,9,12,15</sup>	n.d.	0,1 ± 0,01	0,6 ± 0,3
20:3 <sup>Δ11,14,17</sup>	0,1 ± 0,02	1,0 ± 0,3	2,4 ± 0,2
20:4 <sup>Δ5,11,14,17</sup>	n.d.	0,1 ± 0,04	0,2 ± 0,04
20:4 <sup>Δ8,11,14,17</sup>	n.d.	2,3 ± 0,2	0,4 ± 0,1
20:5 <sup>Δ5,8,11,14,17</sup>	n.d.	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,03

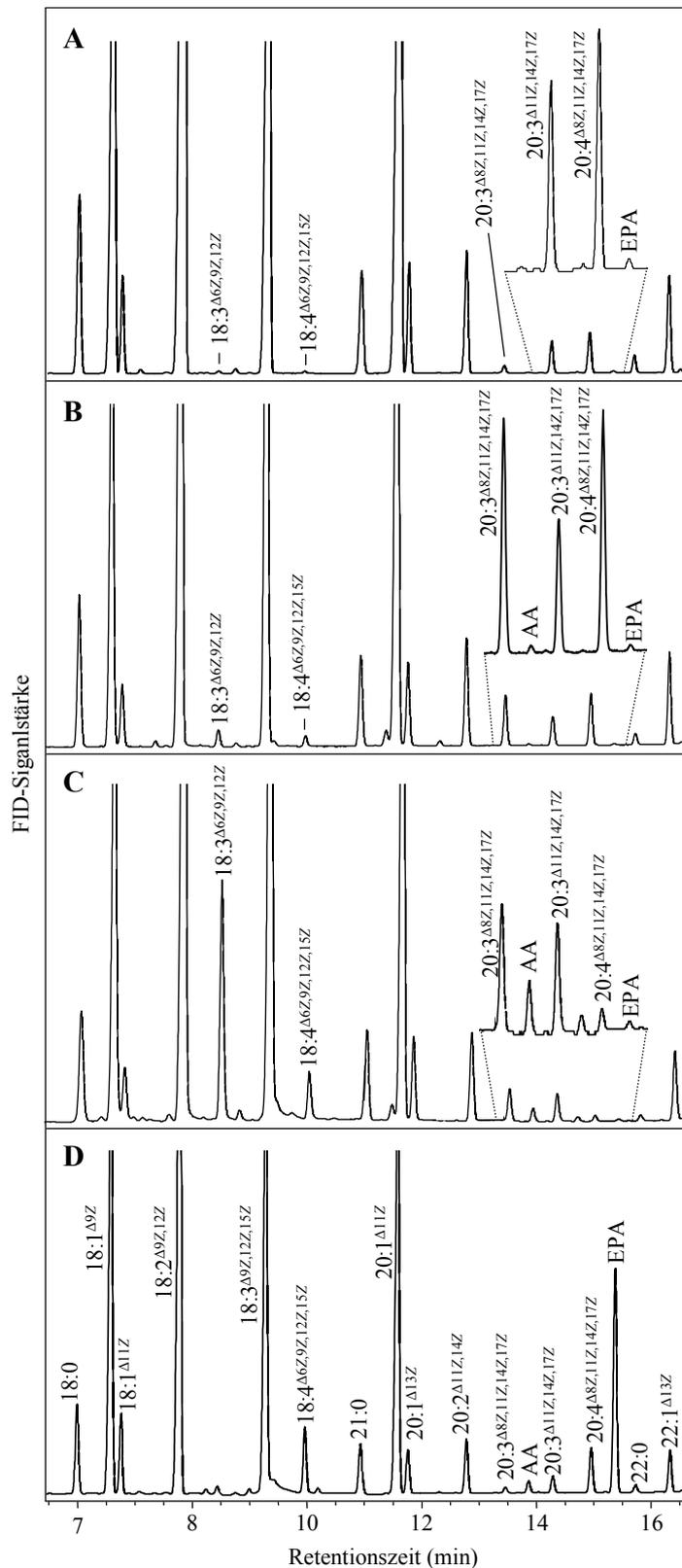
### 3.1.10 Etablierung eines samenspezifisch exprimierten Acyl-CoA-abhängigen VLCPUFA-Biosynthesewegs in *Arabidopsis*

Die Etablierung eines Acyl-CoA-abhängigen EPA Biosynthesewegs in Hefe hat gezeigt, daß es möglich ist, durch ausschließlich Acyl-CoA-spezifische Enzymaktivitäten den Engpaß des Substrat-/Produkttransports zwischen CoA und Lipiden zu umgehen und die bei der lipidabhängigen Desaturierung zusätzlich benötigten enzymatischen Aktivitäten der LPCAT zu vermeiden. Da Hefe kein ölakumulierender Organismus ist und das Ausgangssubstrat der Reaktionsfolge nicht endogener Natur ist, sondern in hohen Mengen dem Expressionssystem Hefe zugesetzt wird, dienten die bisher beschriebenen Experimente der Überprüfung des Gesamtkonzepts für den neuen VLCPUFA-Biosyntheseweg. Durch die Etablierung des Biosynthesewegs mit Acyl-CoA-abhängigen Enzymreaktionen in *Arabidopsis* sollte getestet werden, ob der beschriebene Engpaß der VLCPUFA-Biosynthese (Abbadi et al., 2004) auch in einem pflanzlichen Organismus umgangen werden kann. Dazu wurden Vektoren für die transgene Expression der neuen Desaturasen erstellt und über Agrobakterien-vermittelten Gentransfer in *Arabidopsis*-Pflanzen transformiert.

Die so erzeugten transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen exprimierten samenspezifisch (USP-Promoter; Bäumllein et al., 1991) entweder die neue Enzymkombination MsΔ6, MsΔ5 und PSE1 oder andererseits die lipidabhängigen Desaturasen PtΔ6 und PtΔ5 zusammen mit PSE1, in Anlehnung an die bereits veröffentlichten Versuche in Lein und Tabak (Abbadi et

al., 2004). Zum Vergleich wurden auch die ebenfalls mutmaßlich Acyl-CoA-abhängige Enzymkombination Ot $\Delta$ 6 und Ot $\Delta$ 5 in Kombination mit PSE1 getestet.

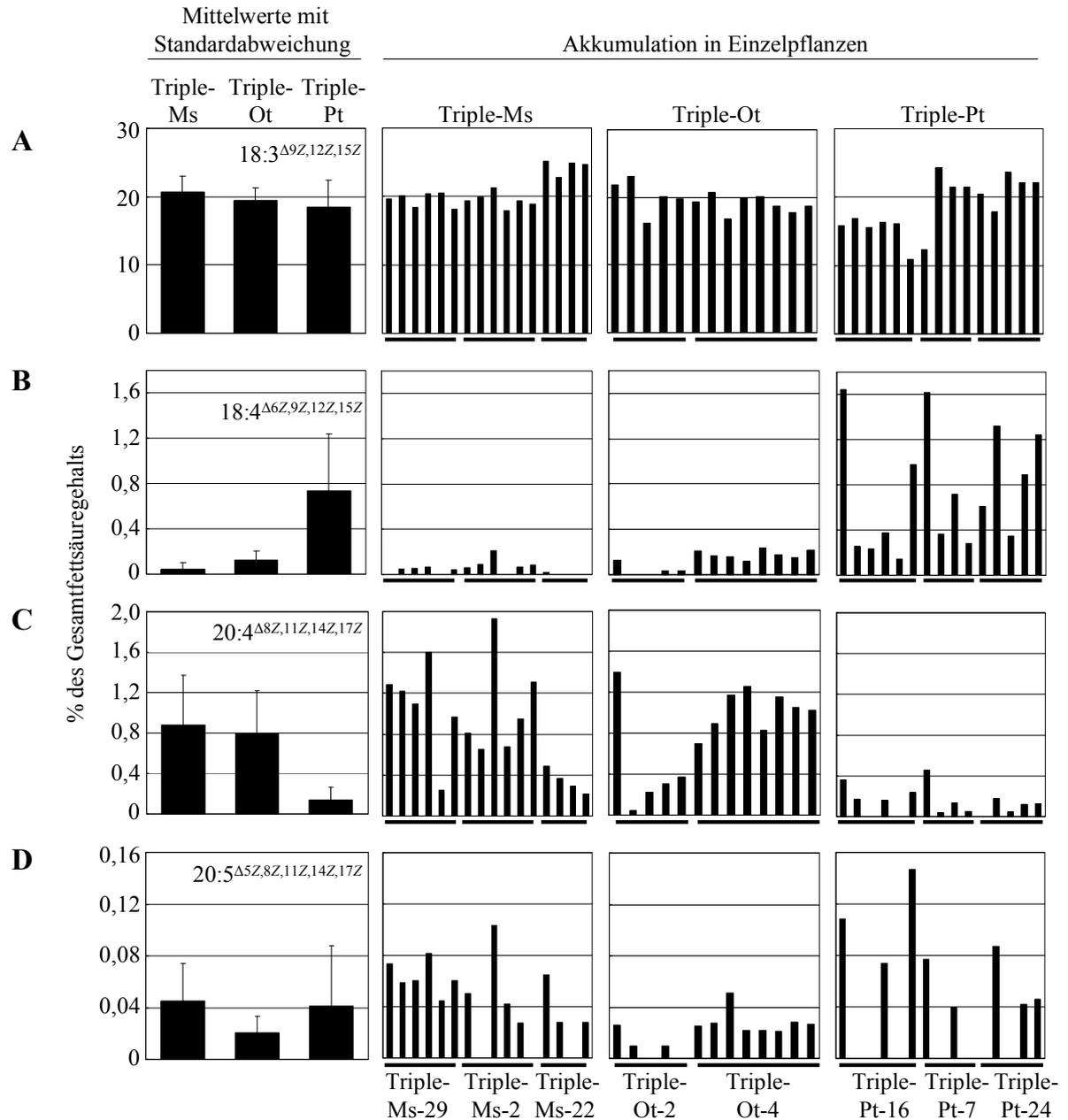
Die aus den Transformationsereignissen resultierenden Pflanzen wurden entsprechend der Herkunft der Desaturasen in den Dreifachkonstrukten entweder Triple-Ms, Triple-Ot oder Triple-Pt genannt. T2-Samen BASTA-resistenter T1-Pflanzen wurden geerntet und auf ihre Fettsäurezusammensetzung hin untersucht. Die Fettsäureprofile von Einzelsamen der Triple-Ms-, -Ot- und -Pt-Pflanzen zeigten neue, nicht *Arabidopsis*-eigene, Fettsäuresignale, die als  $\omega$ 3-18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$ ,  $\omega$ 3-20:4 $^{\Delta 8,11,14,17}$  und EPA identifiziert werden konnten (Abb. 28). Zusätzlich waren in den Triple-Ot- und Triple-Pt-Pflanzen auch  $\omega$ 6-VLCPUFAs identifizierbar, und zwar  $\omega$ 6-18:3 $^{\Delta 6,9,12}$ ,  $\omega$ 6-20:3 $^{\Delta 8,11,14}$  und  $\omega$ 6-20:4 $^{\Delta 5,8,11,14}$ . In den transgenen Triple-Ms-Pflanzen konnte demnach der  $\omega$ 3-Biosyntheseweg und in den Triple-Ot- und Triple-Pt-Pflanzen sowohl der  $\omega$ 3- als auch der  $\omega$ 6-Biosyntheseweg etabliert werden. In einzelnen Triple-Ms-Pflanzen konnte auch das  $\omega$ 6-Desaturierungsprodukt 18:3 $^{\Delta 6,9,12}$  und das daraus resultierende Elongationsprodukt  $\omega$ 6-20:3 $^{\Delta 8,11,14}$  detektiert werden (siehe Abb. 28 A). Diese Beobachtung war insofern interessant, als daß Ms $\Delta$ 6 in Hefe bei kompetitivem Angebot der möglichen  $\Delta$ 6-Desaturasesubstrate, nur das  $\omega$ 3-Substrat 18:3 $^{\Delta 9,12,15}$  umsetzte, nicht aber das  $\omega$ 6-Substrat 18:3 $^{\Delta 9,12}$  (vgl. Abb. 16). Trotz dieser Beobachtung wurde das  $\omega$ 3-Substrat 18:3 $^{\Delta 9,12,15}$  von Ms $\Delta$ 6 auch in Pflanzen deutlich bevorzugt (Abb. 28 A).



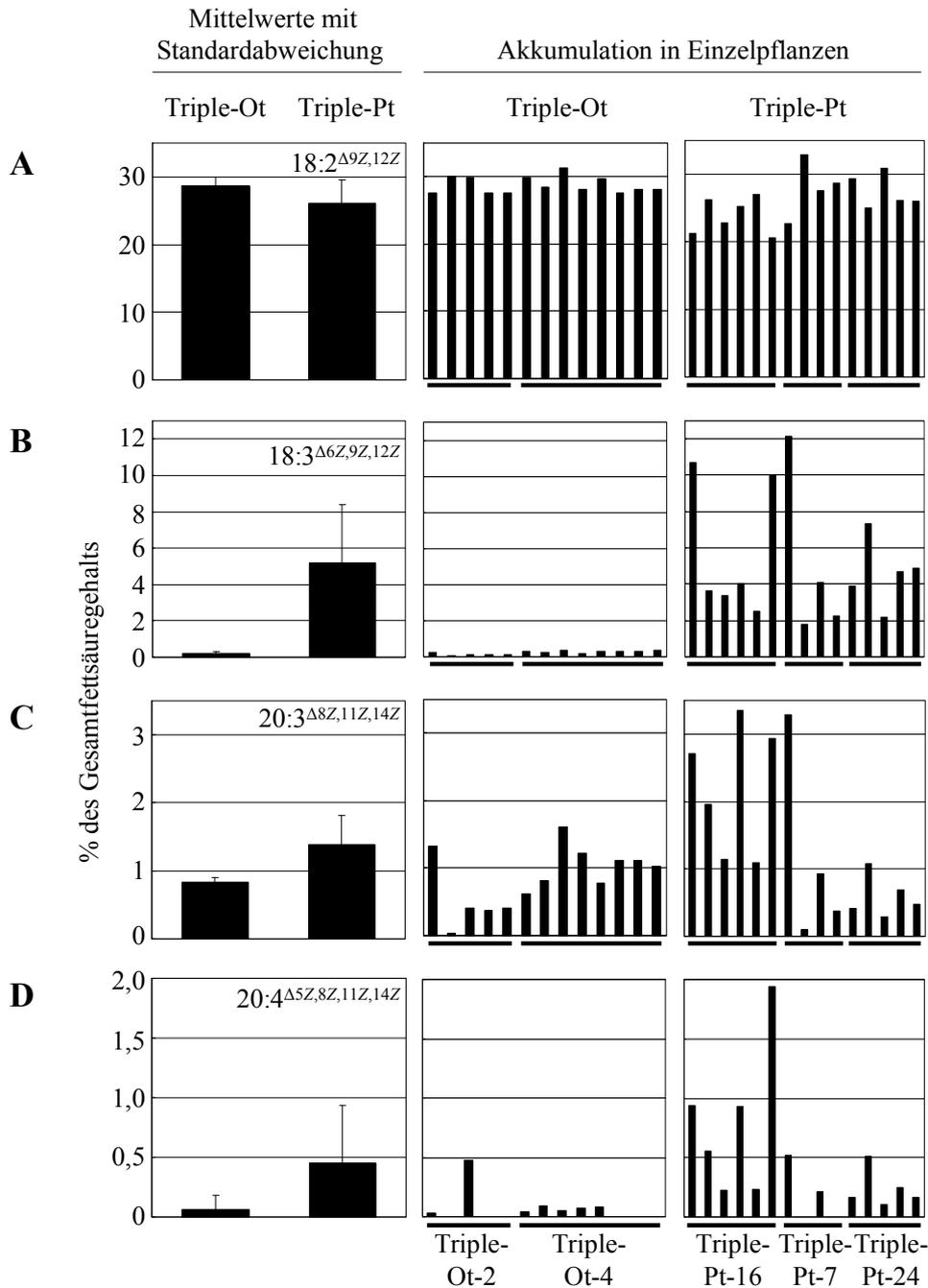
**Abb. 28. Fettsäureprofile von Einzelsamenanalysen der Triple-Ms-, Triple-Ot- und Triple-Pt-Pflanzen.** Dargestellt sind repräsentative GC-Pprofile von Einzelsamen der transgenen Triple-Ms- (A), Triple-Ot- (B) und Triple-Pt- (C) *Arabidopsis*-Pflanzen aus drei bis acht unabhängigen Messungen. Die Fettsäuren wurden durch Vergleich mit einem Gemisch authentischer Standards identifiziert (D).

Der prozentuale Anteil der endogenen Fettsäuren  $18:2^{\Delta 9,12}$  und  $18:3^{\Delta 9,12,15}$  sowie der neu gebildeten  $\omega 3$ - und  $\omega 6$ -VLCPUFA am Gesamtfettsäuregehalt der transgenen *Arabidopsis*-Samen ist in den Abb. 29 und 30 dargestellt. Die endogenen Fettsäuren  $18:2^{\Delta 9,12}$  und  $18:3^{\Delta 9,12,15}$  dienten als Ausgangssubstrate der neu eingebrachten VLCPUFA-Biosynthese. Die prozentualen Anteile der beiden Fettsäuren waren in allen drei transgenen Ansätzen gleich hoch (Abb. 29 A und 30 A). Die am stärksten akkumulierenden neu gebildeten Fettsäuren in den Triple-Ms- und Triple-Ot-Pflanzen waren die Elongationsprodukte der  $\Delta 6$ -Elongase,  $\omega 3$ -20:4 $^{\Delta 8,11,14,17}$  bzw. in den Triple-Ot-Pflanzen  $\omega 3$ -20:4 $^{\Delta 8,11,14,17}$  und  $\omega 6$ -20:3 $^{\Delta 8,11,14}$  (Abb. 29 C und Abb. 30 C). In den Triple-Pt-Pflanzen waren hingegen die  $\Delta 6$ -desaturierten Fettsäuren  $\omega 3$ -18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$  und  $\omega 6$ -18:3 $^{\Delta 6,9,12}$  am stärksten vertreten (Abb. 29 B und Abb. 30 B). Durch nahezu vollständige Elongation von  $\omega 3$ -18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$  bzw.  $\omega 6$ -18:3 $^{\Delta 6,9,12}$  zu den entsprechenden C20-VLCPUFAs in den Triple-Ms- und Triple-Ot-Pflanzen konnten im Gegensatz zu den Triple-Pt-Pflanzen keine oder nur geringe Mengen der  $\Delta 6$ -Desaturaseprodukte detektiert werden (Abb. 29 B und Abb. 30 B). Diese Ergebnisse demonstrieren, daß das ineffiziente Umestern der Fettsäuren zwischen dem Ort der Desaturierung (PtdCho) und dem Ort der Elongation (CoA) in der lipidabhängigen VLCPUFA-Synthese durch das Einbringen eines ausschließlich Acyl-CoA-abhängigen VLCPUFA-Biosyntheseweges (Triple-Ms und Triple-Ot) auch in der pflanzlichen Fettsäuresynthese umgangen werden konnte.

Die niedrige Akkumulation an EPA in den Triple-Ms- und Triple-Ot-Pflanzen verwies auf geringe  $\Delta 5$ -Desaturase Aktivitäten von Ms $\Delta 5$  und Ot $\Delta 5$ , durch die die Akkumulation von EPA in den *Arabidopsis*-Samen nach der zuvor limitierenden LPCAT-Aktivität eingeschränkt wird. Dieses Ergebnis entspricht den Daten, der Hefeexpressionsstudien, in denen sich die Ms $\Delta 5$  und Ot $\Delta 5$ -Desaturasen ebenfalls als nur wenig aktiv präsentierten.



**Abb. 29.  $\omega$ 3-Fettsäuregehalt transgener *Arabidopsis*-Pflanzen.** Einzelsamenanalyse von jeweils zwei bzw. drei unabhängigen Triple-Ms-, Triple-Ot- und Triple-Pt-Linien. **(A)** Mittelwerte und Einzelwerte der Samenanalysen von  $\omega$ 3-18:3 $^{\Delta 9,12,15}$ , **(B)** dem  $\Delta$ 6-Desaturierungsprodukt  $\omega$ 3-18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$ , **(C)** dem Elongationsprodukt der  $\Delta$ 6-Elongase,  $\omega$ 3-20:4 $^{\Delta 8,11,14,17}$  und **(D)** dem Endprodukt des  $\omega$ 3-VLCPUFA-Biosynthesewegs EPA,  $\omega$ 3-20:5 $^{\Delta 5,8,11,14,17}$ .

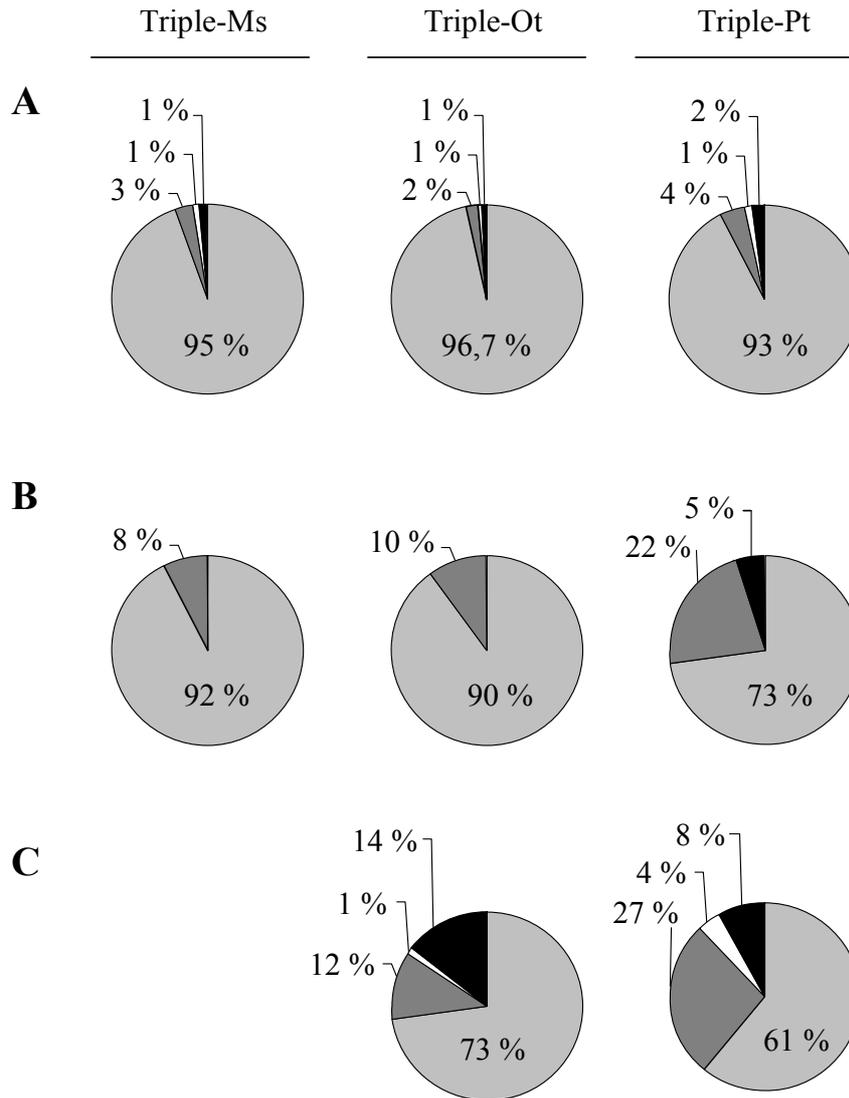


**Abb. 30.**  $\omega$ 6-Fettsäuregehalt transgener *Arabidopsis*-Pflanzen. Einzelsamenanalyse von zwei oder drei unabhängigen Triple-Ot- und Triple-Pt-Linien. (A) Mittelwerte und Einzelwerte der Samenanalysen von  $\omega$ 6-18:2<sup>Δ9,12</sup>, (B) dem  $\Delta$ 6-Desaturierungsprodukt  $\omega$ 6-18:3<sup>Δ6,9,12</sup>, (C) dem Elongationsprodukt der  $\Delta$ 6-Elongase,  $\omega$ 6-20:3<sup>Δ8,11,14</sup> und (D) dem Endprodukt des  $\omega$ 6-VLCPUFA-Biosynthesewegs AA,  $\omega$ 6-20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup>.

### 3.1.11 Verteilung der VLCPUFA auf verschiedene Lipidklassen der *Arabidopsis*-Samen

Die veränderten Fettsäure-Profile in den Samen der Triple-Ms- und Triple-Ot-Pflanzen zeigten, daß die Akkumulation der  $\Delta 6$ -desaturierten Biosyntheseintermediate durch das Verwenden von Acyl-CoA-abhängigen Desaturasen erfolgreich vermieden werden konnte. Neben der Optimierung der VLCPUFA-Biosynthese in transgenen Pflanzen ist die Akkumulation dieser neugebildeten Fettsäuren in den TAGs ein weiteres Ziel. Um zu testen, ob VLCPUFA in den transgenen Pflanzen mit TAG assoziierten oder in den Phospholipiden akkumulierten, wurden die Samen auf die Verteilung der VLCPUFA in verschiedenen Lipidklassen untersucht. Die Verteilung der VLCPUFA in TAGs und Phospholipiden wurde als prozentualer Anteil der Gesamtlipide berechnet. Die Analyse der Zusammensetzung der Lipidklassen in den transgenen Samen zeigte, daß TAG in den drei transgenen Linien zu annähernd vergleichbaren Anteilen akkumulierte (Abb. 31 A). Interessanterweise zeigten sich aber Unterschiede in der Verteilung der neu gebildeten VLCPUFA auf TAG und die analysierten Phospholipide in Samen, die entweder das Triple-Ms-, Triple-Ot- oder zum Vergleich das Triple-Pt-Konstrukt exprimierten. Die Daten deuten an, daß die  $\omega 3$ - und  $\omega 6$ -Endprodukte, EPA und AA, nach ausschließlich Acyl-CoA-abhängiger VLCPUFA-Biosynthese in den Triple-Ms- und Triple-Ot-Pflanzen signifikant effizienter in die TAGs inkorporiert wurden als nach Expression des Triple-Pt-Konstrukts, welches die lipid-abhängigen Desaturasen Pt $\Delta 6$  und Pt $\Delta 5$  kodiert. Abb. 31 B zeigt die prozentuale Verteilung von EPA auf die Lipidanteile in den Samen. In den Samen der Triple-Ms- bzw. Triple-Ot-Pflanzen wurden 92 % bzw. 90 % des gebildeten EPA in die TAGs inkorporiert (Abb. 31 B) während es in den Triple-Pt-Samen nur 73 % waren. Das  $\omega 6$ -Produkt AA, das aufgrund der Substratspezifitäten der in die Pflanzen eingeführten  $\Delta 6$ -Desaturasen nur in den Triple-Ot- bzw. in den Triple-Pt-Pflanzen gebildet wurde, akkumulierte in den Samen der Triple-Ot-Pflanzen zu 73 % in den TAG, während es in den Triple-Pt-Pflanzen nur 61 % waren (Abb. 31 C). Das restliche gebildete EPA und AA verblieb in den Phospholipiden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß das  $\omega 3$ -Produkt EPA zu signifikant höheren Anteilen in die TAGs inkorporiert wurde, als das  $\omega 6$ -Produkt AA (vergleiche in Abb. 31 B und C).



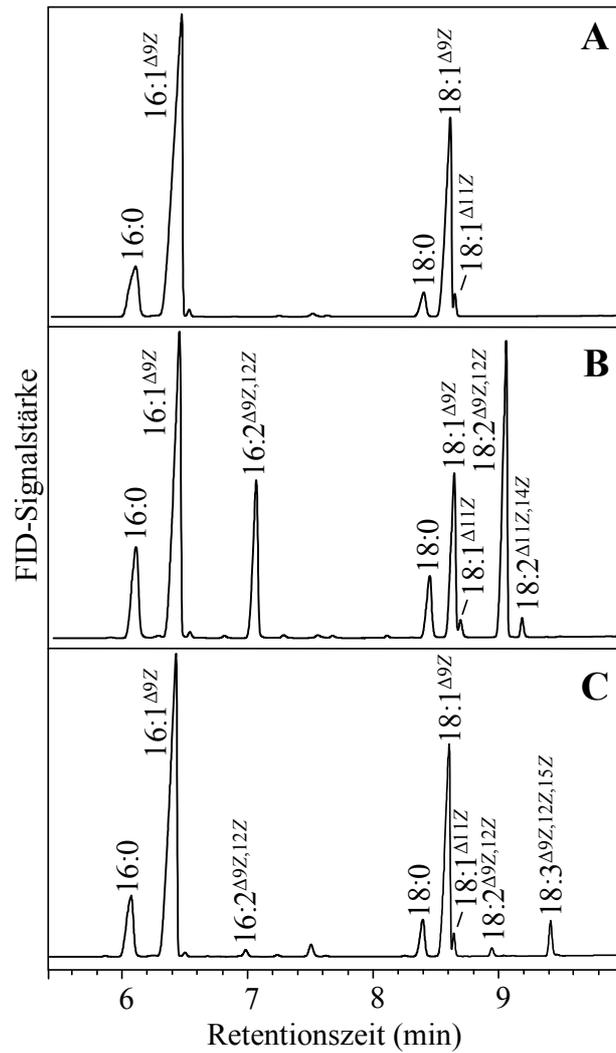
**Abb. 31. Akkumulation der CoA-abhängig synthetisierten VLCPUFAs in Glycerolipiden transgener *Arabidopsis*-Samen.** Die Verteilung der transgen synthetisierten VLCPUFAs auf verschiedene Lipidklassen in *Arabidopsis*-Samen weist auf eine bevorzugte Inkorporation in TAGs hin. **(A)** Anteile der analysierten Lipidklassen an den Gesamtlipiden; **(B)** Anteile von EPA, das assoziiert mit den verschiedenen Lipidklassen vorliegt; **(C)** Anteile von AA, das assoziiert mit den verschiedenen Lipidklassen vorliegt. Die Daten beruhen auf jeweils drei Einzelmessungen. Die Werte zeigen Mittelwerte aus drei Analysen. Der Fehler lag unter 5 %. Hellgrau, Neutrallipide; Dunkelgrau, PtdCho; Weiß, PtdIns zusammen mit PtdSer; Schwarz, PtdEtn.

### **3.2 Sequenzdeterminanten der Bifunktionalität von Desaturasen und optimierte Produktion mehrfach ungesättigter Fettsäuren durch bifunktionale Enzyme**

Fettsäuredesaturasen katalysieren die Einführung von Doppelbindungen. Die Substratspezifität und Regioselektivität, nach der die Enzyme kategorisiert werden, kann bisher nur durch heterologe Expressionsstudien bestimmt werden. Mit Ausnahme der löslichen chloroplastidären Stearoyl-ACP-Desaturasen repräsentiert die Mehrzahl der Desaturasen integrale Membranproteine. Das derzeitige Verständnis von Enzymstruktur und enzymatischer Aktivität beruht auf Mutantanalysen (Shanklin et al., 1994; Shanklin et al., 1997), biochemischen Topologieanalysen (Prasad et al., 1980; Stukey et al., 1990; Diaz et al., 2002a; Man et al., 2006) und vergleichenden Studien verwandter Enzyme (Broun et al., 1998; Dyer et al., 2002). Da es keine Kristallstruktur von membrangebundenen Desaturasen gibt, konnten bisher keine Analysen zur Beziehung von Enzymstruktur und Funktionsweise beitragen.

#### **3.2.1 Optimierung der Biosynthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren durch Expression einer bifunktionalen Desaturase**

Durch vergleichende Genomanalysen konnten von Dr. Phillip Ternes zwei neue Desaturasesequenzen im Genom von *Aspergillus nidulans* identifiziert werden. Nach heterologer Charakterisierung in Hefe konnte Dr. Ellen Hornung eine der kodierenden Sequenzen als eine strikt monofunktionale Oleoyl- $\Delta$ 12-Desaturase (An2) und eine als prozessive bifunktionale Oleoyl- $\Delta$ 12/Linoleoyl- $\omega$ 3-Desaturase (An1) beschreiben (Abb. 32). Die weitere Charakterisierung in Hefe zeigte, daß An1 ein breites Substratspektrum besitzt (Tab. 3) und ihre Substrate zunächst in die jeweiligen  $\Delta$ 12-Desaturierungsprodukte, dann aber prozessiv weiter in die jeweiligen  $\omega$ 3-Desaturierungsprodukte umsetzt (Tab. 3). Die Desaturase-Klone, An1 und An2, wurden mir von Dr. Ellen Hornung zur Verfügung gestellt und dienten als Ausgangspunkt für die weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Analysen.



**Abb. 32. Identifikation einer mono- und einer bifunktionalen Desaturase aus *A. nidulans*.** Dargestellt sind GC-Fettsäureprofile von Hefekulturen, die (A) mit dem Leervektor pESC-HIS transformiert wurden, (B) mit der monofunktionalen Oleoyl- $\Delta$ 12-Desaturase (An2) oder (C) mit der prozessiven bifunktionalen Oleoyl- $\Delta$ 12/Linoleoyl- $\omega$ 3-Desaturase (An1). Die Daten sind freundlicherweise von Dr. Ellen Hornung zur Verfügung gestellt worden.

**Tab. 3. Analyse der Substratspezifität der bifunktionalen Desaturase An1 durch heterologe Expression in Hefe.** Expressionskulturen von An1-pESC-TRP wurden mit verschiedenen Fettsäuresubstraten kultiviert. Nach Aufarbeitung der Kulturen wurden die Fettsäuremethylester gaschromatographisch analysiert. Dargestellt sind die prozentualen Anteile des Gesamtfettsäuregehaltes. Die Werte sind als Mittelwerte von drei bis sieben unabhängigen Experimenten (n = Anzahl der durchgeführten Analysen) mit Standardabweichung angegeben.

detektierte Fettsäuren	applizierte Fettsäuren				
	-	18:2 <sup>Δ9,12</sup>	18:3 <sup>Δ6,9,12</sup>	20:3 <sup>Δ8,11,14</sup>	20:4 <sup>Δ5,8,11,14</sup>
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
16:0	11,5 ± 0,5	14,6 ± 2,2	13,7 ± 0,8	11,9 ± 0,3	12,2 ± 0,2
16:1 <sup>Δ9</sup>	52,7 ± 3,0	44,1 ± 3,8	40,0 ± 1,5	53,1 ± 0,6	42,3 ± 6,7
16:2 <sup>Δ9,12</sup>	0,8 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,1
18:0	5,0 ± 0,5	4,8 ± 0,2	4,6 ± 0,5	4,2 ± 0,1	4,5 ± 0,9
18:1 <sup>Δ9</sup>	26,9 ± 1,1	42,2 ± 1,0	20,4 ± 1,5	27,0 ± 0,4	18,8 ± 3,9
18:2 <sup>Δ9,12</sup>	0,7 ± 0,1	6,3 ± 2,6	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,1
18:3 <sup>Δ6,9,12</sup>			10,9 ± 5,6		
18:3 <sup>Δ9,12,15</sup>	3,2 ± 0,3	6,0 ± 1,0	2,0 ± 0,6	2,0 ± 0,0	2,5 ± 0,3
18:4 <sup>Δ6,9,12,15</sup>			7,4 ± 1,3		
20:3 <sup>Δ8,11,14</sup>				0,6 ± 0,1	
20:4 <sup>Δ5,8,11,14</sup>					16,4 ± 8,5
20:4 <sup>Δ8,11,14,17</sup>				0,2 ± 0,1	
20:5 <sup>Δ5,8,11,14,17</sup>					3,2 ± 0,5
	n = 3	n = 7	n = 5	n = 4	n = 3

Um zu testen, ob die bifunktionale Desaturase An1 einen optimierenden Effekt auf den  $\omega$ 3-Fettsäuregehalt des Samenöls von *Arabidopsis* hat, wurde die für das Enzym kodierende cDNA in einen Pflanzenexpressionsvektor kloniert und über Agrobakterienvermittelten Gentransfer in *Arabidopsis*-Pflanzen transformiert. Die Expression in *Arabidopsis* wurde durch den Samenspezifischen USP-Promotor (Bäumlein et al., 1991) kontrolliert. Die T3-Samen dreier unabhängiger Linien wurden auf ihre Fettsäurezusammensetzung hin untersucht und mit dem Fettsäuremuster von Kontrollpflanzen verglichen, die mit einem leeren Vektor transformiert waren. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 als mol% der Gesamtfettsäuren und als Quotient von 18:3<sup>Δ9,12,15</sup>/18:2<sup>Δ9,12</sup> dargestellt. In transgenen Pflanzen, die An1 exprimierten, war der 18:3<sup>Δ9,12,15</sup>-Gehalt gegenüber dem der Kontrollpflanzen erhöht, was sich in der Änderung des 18:3<sup>Δ9,12,15</sup>/18:2<sup>Δ9,12</sup>-Quotienten von 0,82 in den Kontrollpflanzen auf 1,33 in den An1-Expressoren widerspiegelte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß An1 in *Arabidopsis*-Samen zunächst die  $\omega$ 6-Fettsäure 18:2<sup>Δ9,12</sup> erzeugte und dann weiter in das  $\omega$ 3-Produkt 18:3<sup>Δ9,12,15</sup> umwandelte und somit in der Optimierung der  $\omega$ 3-VLCPUFA-Synthese in Pflanzen einsetzbar ist. Da ein bifunktionales Enzym wie An1 zwei Reaktionen katalysiert, für die sonst zwei eigenständige Enzyme nötig

sind, bietet Bifunktionalität prinzipiell die Möglichkeit, die Zahl benötigter Desaturase-Transgene, z.B. für die Produktion von VLCPUFAs, zu reduzieren. Die Sequenzdeterminanten für Bifunktionalität sind also von grundlegendem Interesse für weiterführende Studien zum Design multifunktionaler Enzyme für biotechnologische Anwendungen.

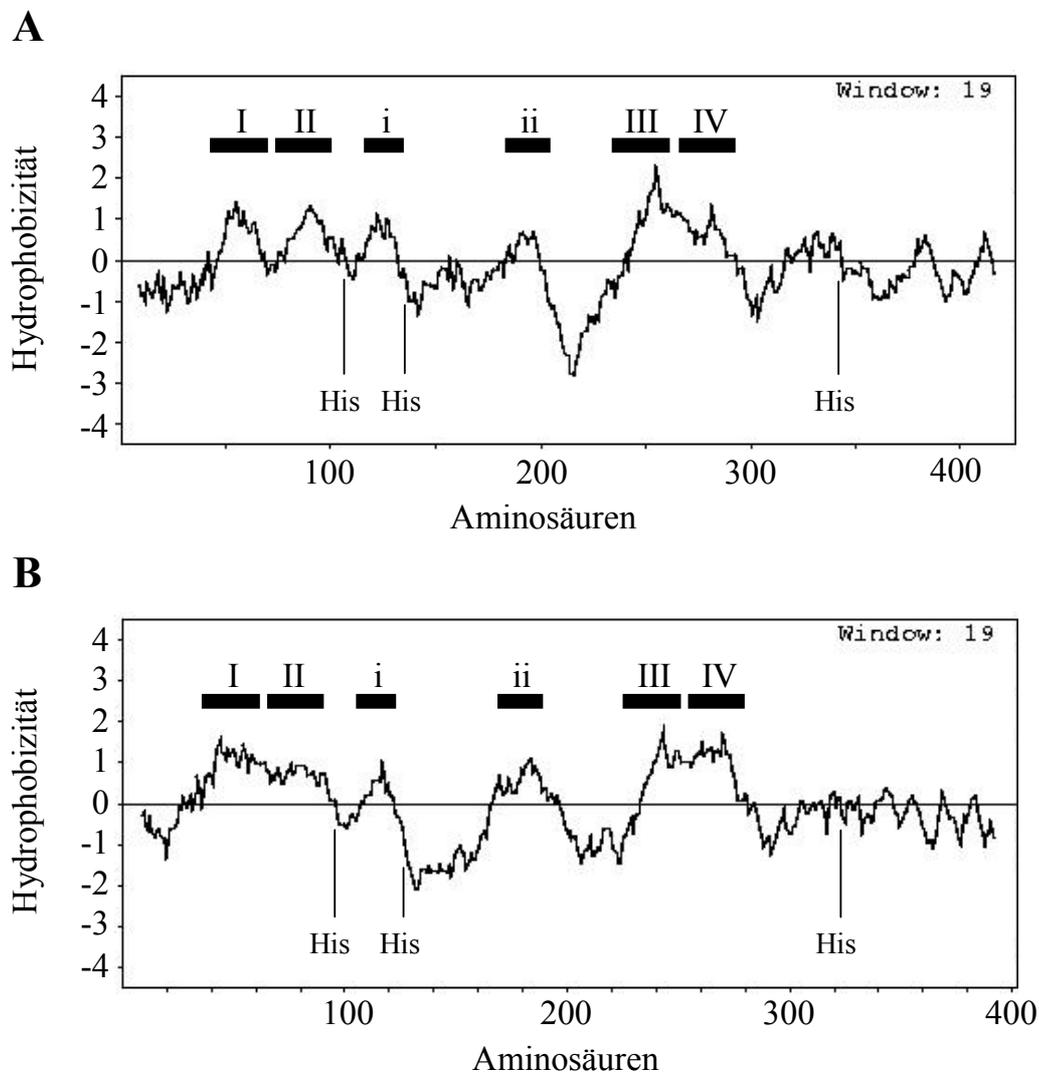
**Tab. 4. Veränderte Fettsäurezusammensetzung durch heterologe Expression von An1 in *Arabidopsis*-Samen.** Einzelsamenanalysen von je fünf Pflanzen drei unabhängiger An1-*Arabidopsis*-Linien (T3-Generation) wurden durchgeführt. Die Daten geben die Mittelwerte des prozentualen Anteils der jeweiligen Fettsäure an dem Gesamtfettsäuregehalt in transgenen *Arabidopsis*-Samen an. Gemessen wurden 10 bis 20 Einzelsamen pro Pflanze. Zur Kontrolle wurden die Fettsäuremuster der transgenen Pflanzen mit denen BASTA-resistenter Kontrollpflanzen verglichen.

Fettsäure	16:0	18:0	18:1 <sup>Δ9</sup>	18:2 <sup>Δ9,12</sup>	18:3 <sup>Δ9,12,15</sup>	20:1 <sup>Δ11</sup>	Verhältnis (18:3/18:2)
Kontrolle	6,6 ± 0,4	3,1 ± 0,5	12,5 ± 0,2	27,4 ± 0,8	21,5 ± 1,5	15,2 ± 1,0	0,82 ± 0,01
Linie 1							
1-1	7,5 ± 0,6	3,6 ± 0,3	12,5 ± 0,4	22,2 ± 1,1	26,0 ± 0,8	16,5 ± 0,8	1,16 ± 0,08
1-2	7,3 ± 0,7	3,5 ± 0,6	10,2 ± 0,8	22,8 ± 0,8	27,7 ± 2,2	15,9 ± 1,4	1,31 ± 0,05
1-3	7,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	10,9 ± 0,3	23,2 ± 0,7	24,5 ± 1,1	15,9 ± 1,0	1,10 ± 0,08
1-4	7,1 ± 0,8	2,8 ± 0,2	10,0 ± 0,7	23,0 ± 1,1	27,8 ± 1,3	14,2 ± 1,4	1,25 ± 0,01
1-5	6,8 ± 0,3	3,2 ± 0,6	12,2 ± 2,6	22,1 ± 2,6	26,3 ± 2,0	14,1 ± 0,9	1,17 ± 0,07
Linie 2							
2-1	6,9 ± 0,2	2,9 ± 0,2	10,6 ± 0,8	28,4 ± 0,7	21,6 ± 0,4	15,3 ± 0,2	0,76 ± 0,07
2-2	6,9 ± 0,3	2,9 ± 0,2	10,6 ± 0,4	25,7 ± 0,8	22,4 ± 0,8	15,1 ± 0,8	0,92 ± 0,07
2-3	7,7 ± 0,8	3,6 ± 0,6	10,8 ± 1,6	25,4 ± 1,2	25,7 ± 0,7	13,9 ± 0,4	1,01 ± 0,03
2-4	7,0 ± 0,4	2,9 ± 0,2	10,6 ± 0,5	25,9 ± 0,8	24,8 ± 1,1	14,9 ± 1,3	0,95 ± 0,02
2-5	7,1 ± 0,3	3,3 ± 0,2	12,7 ± 0,9	24,8 ± 0,4	23,0 ± 0,9	17,8 ± 0,8	0,97 ± 0,05
Linie 3							
3-1	8,2 ± 0,2	4,7 ± 0,6	12,3 ± 1,0	23,2 ± 1,5	27,1 ± 1,6	14,5 ± 0,8	1,33 ± 0,9
3-2	6,6 ± 0,4	2,8 ± 0,2	11,7 ± 0,9	24,7 ± 0,5	25,9 ± 1,2	15,9 ± 1,1	1,05 ± 0,05
3-3	6,2 ± 0,2	3,0 ± 0,2	13,4 ± 0,7	23,8 ± 0,1	21,8 ± 0,9	16,2 ± 1,4	0,92 ± 0,04
3-4	7,6 ± 0,5	4,6 ± 1,0	12,2 ± 0,9	22,6 ± 1,4	26,7 ± 1,8	14,2 ± 0,6	1,2 ± 0,04
3-5	7,1 ± 0,3	3,2 ± 0,3	12,7 ± 0,9	24,8 ± 0,4	23,0 ± 0,9	14,2 ± 2,0	0,93 ± 0,05

### 3.2.2 Computergestützte Erstellung eines Topologiemodells für membrangebundene Desaturasen und Annotierung möglicher funktionaler Domänen

Die Isolierung und Charakterisierung der Desaturasen An1 und An2 mit hoher Sequenzähnlichkeit aber unterschiedlicher biosynthetischer Kapazität (Abb. 32) bot die Möglichkeit, die Sequenzdeterminanten zu identifizieren, die für die ungleiche Substratspezifität und vor allem für die Bifunktionalität verantwortlich sind. Durch den Austausch von Domänen der monofunktionalen Δ12-Desaturase (An2) gegen die

entsprechenden Domänen der bifunktionalen  $\Delta^{12}/\omega^3$ -Desaturase (An1) sollte der Sequenzabschnitt identifiziert werden, der Bifunktionalität in der zunächst nur monofunktionalen Desaturase etablieren kann.



**Abb. 33. Hydropathieprofile von den Aminosäuresequenzen der bifunktionalen und der monofunktionalen Desaturase aus *A. nidulans*.** Die Hydrophobizität der Proteinbereiche ist anhand der Kyte-Doolittle-Skala dargestellt. Proteindomänen, die in der Kyte-Doolittle-Skala einen Wert von über Null zugewiesen bekommen, haben einen hydrophoben Charakter und stellen mutmaßliche transmembrane Sequenzbereiche dar. Die mutmaßlichen Sequenzdomänen der transmembranen Helices sind durch schwarze Balken in den Profilen gekennzeichnet und mit römischen Zahlen von jeweils I - IV numeriert. Die Proteindomänen, die als mutmaßliche periphere Membrandomänen interpretiert worden sind, wurden durch i und ii gekennzeichnet. His, Position konservierter Histidin-Motive; **(A)** An2; **(B)** An1.

Anhand computergestützter Analysen der Hydrophathie und Sekundärstruktur wurden die Positionen transmembraner Helices und cytosolischer Sequenzbereiche beider Desaturasen bestimmt und miteinander verglichen (Abb. 33). In beiden Sequenzen wurden vier transmembrane Helices und zwei möglicherweise membranperiphere Sequenzdomänen identifiziert, was mit dem akzeptierten Topologiemodell (Prasad et al., 1980; Stukey et al., 1990; Diaz et al., 2002a; Man et al., 2006) für membrangebundene Desaturasen übereinstimmt (Abb. 33). Nach den hier durchgeführten computergestützten Analysen orientieren sich N- und C-Termini sowie die Sequenzabschnitte mit den drei konservierten Histidin-Motiven (Shanklin et al., 1994; Shanklin und Cahoon, 1998) von An1 und An2 zum Cytosol (Abb. 33). Die erste Histidin-Box befindet sich dabei jeweils zwischen der zweiten transmembranen Helix und der ersten membranperipheren Sequenzregion (i in Abb. 33), die zweite Histidin-Box zwischen den beiden membranperipheren Sequenzregionen (i und ii in Abb. 33) und die dritte Histidin-Box hinter der vierten transmembranen Helix im cytosolischen C-Terminus der Desaturasen An1 oder An2. Die Nähe der Histidin-Boxen zu transmembranen oder membranassoziierten Regionen innerhalb des Enzyms bringt das aktive Zentrum der Desaturase (gebildet durch die Histidin-Boxen) in unmittelbare Nachbarschaft potentieller Substratlipide innerhalb der Membran.

Basierend auf den Hydrophathie- und Topologie-Analysen wurden die Sequenzen von An1 und An2 in jeweils neun aufeinanderfolgende Domänen A – I eingeteilt (siehe Abb. 34). Die Domäne A ist äquivalent zum cytosolischen N-Terminus; Domäne B umfaßt die beiden ersten transmembranen Helices; Domäne C beinhaltet den folgenden cytosolischen Sequenzbereich, einschließlich der ersten Histidin-Box; Domäne D umfaßt den ersten membranperipheren Sequenzbereich; Domäne E die zweite cytosolische Schleife mit der zweiten Histidin-Box, und Domäne F umfaßt die zweite membranperiphere Proteindomäne. Das zweite Paar der transmembranen Helices, das durch einen kurzen ER-luminalen Sequenzbereich verbunden wird, ist in Domäne H zusammengefaßt. Der cytosolische C-Terminus mit der dritten Histidin-Box bildet Domäne I (siehe Abb. 34).

Die Domänen A<sub>2</sub>-I<sub>2</sub> der monofunktionalen  $\Delta 12$  Desaturase An2 wurden systematisch einzeln gegen die jeweils entsprechenden Domänen A<sub>1</sub>-I<sub>1</sub> der bifunktionalen  $\Delta 12/\omega 3$ -Desaturase An1 ausgetauscht. Die Hybridgene wurden nach der elterlichen monofunktionalen Desaturase An2 benannt, gefolgt von einem Buchstaben der die entsprechende eingefügte Domäne der bifunktionalen Desaturase An1 spezifiziert. Abb. 35 veranschaulicht die Struktur der chimären Gene, die durch den Austausch der korrespondierenden cDNA-Sequenz der  $\Delta 12$ -Desaturase-Domänen gegen die Domänen der bifunktionalen Desaturase entstanden.



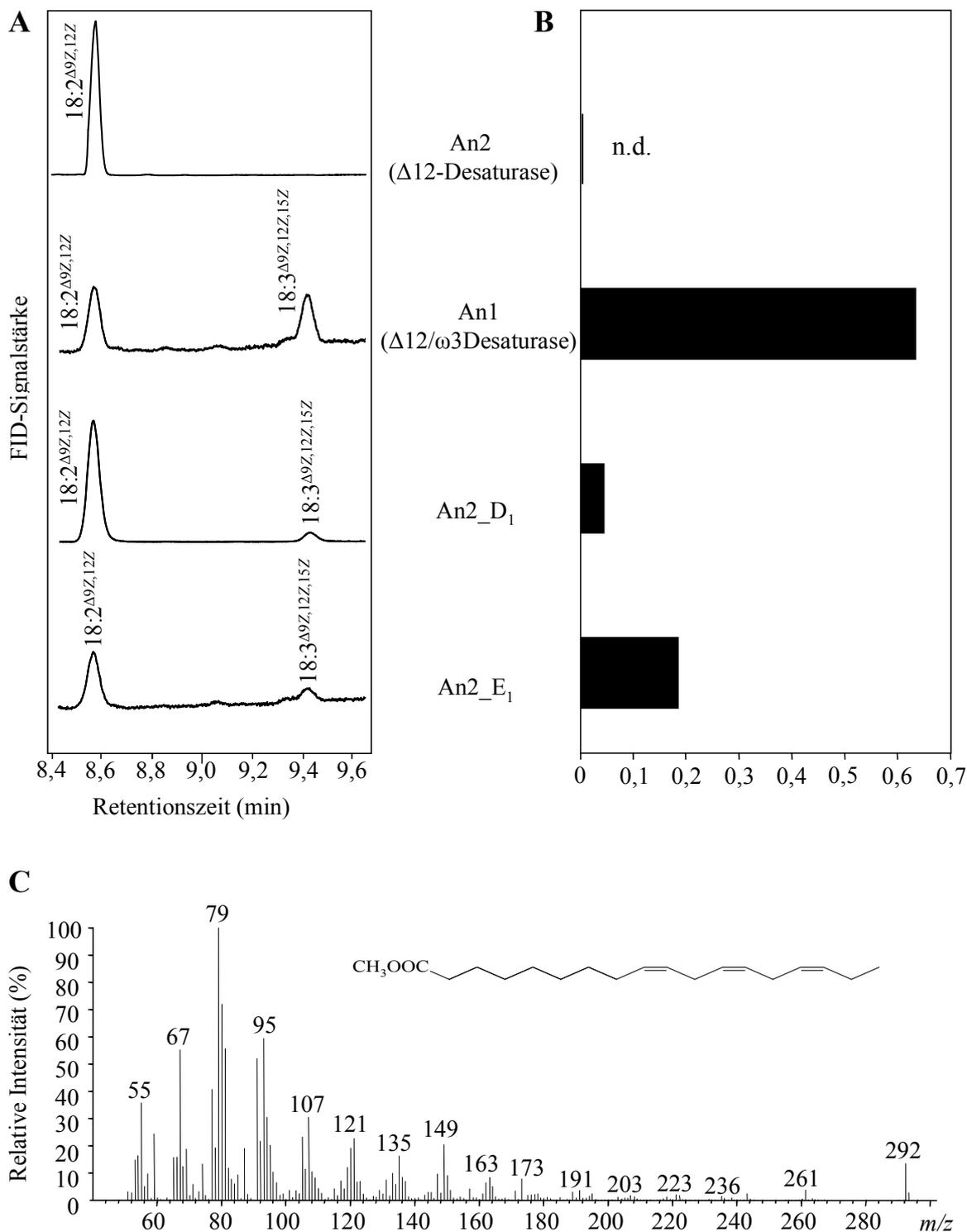
### 3.2.3 Test der Hybridenzyme auf Bifunktionalität bei heterologer Expression in Hefe

Zur funktionalen Charakterisierung der Hybridenzyme wurden diese einzeln heterolog in Hefe exprimiert. Getestet wurde, i) ob die chimären Enzyme trotz Domänenaustausches als Fettsäuresaturasen aktiv waren und ii) inwieweit die Substratspezifität bzw. Regiospezifität der Enzyme sich gegenüber der elterlichen monofunktionalen  $\Delta 12$ -Desaturase verändert hatte. Zur Kontrolle wurden die unveränderten An1- und An2-Desaturasen und auch der Leervektor exprimiert. Die Analyse auf neue Fettsäureprodukte in den Hefeexpressionskulturen ergab, daß alle Hybridenzyme als Fettsäuresaturasen katalytisch aktiv waren (Tab. 5). Die meisten Hybridenzyme zeigten aber keine Bifunktionalität und akkumulierten somit nur  $18:2^{\Delta 9,12}$  (Tab. 5).

Nur auf zwei der neun Hybridenzyme, An2\_D<sub>1</sub> und An2\_E<sub>1</sub>, war Bifunktionalität übertragen worden, und diese Hybridenzyme zeigten veränderte Substrat und Regiospezifität: Mit Expression von An2\_D<sub>1</sub> oder An2\_E<sub>1</sub>, konnte sowohl das Produkt der  $\Delta 12$ -Regiospezifität,  $18:2^{\Delta 9,12}$  als auch das prozessiv daraus gebildete  $\omega 3$ -Produkt,  $18:3^{\Delta 9,12,15}$  nachgewiesen (siehe Tab. 5 und Abb. 36 A) und über GC-MS Analyse bestätigt werden (Abb. 36 C).

**Tab. 5. Übersicht der Fettsäurezusammensetzung von Hefe nach Expression der Hybridgene.** Die Desaturaseprodukte sind als Prozent der zellulären Gesamtfettsäuren dargestellt. Die heterologe exprimierten Genkonstrukte in Hefe wurden abgekürzt mit: An2 = *A. nidulans* monofunktionale  $\Delta 12$ -Desaturase; An1 = *A. nidulans* bifunktionale  $\Delta 12/\omega 3$ -Desaturase; An2\_A<sub>1</sub>-I<sub>1</sub> = Hybridgene, benannt nach An2, der elterlichen Desaturase, gefolgt von einem Buchstaben, der die Domäne benennt, die gegen die entsprechende Domäne des bifunktionalen Enzyms (An1) ausgetauscht wurde. Die Daten repräsentieren den Mittelwert von 2 bis 5 unabhängigen Experimenten; die entsprechenden Standardabweichungen sind dargestellt. n.d., nicht detektierbar

Desaturase	$18:2^{\Delta 9,12}$	$18:3^{\Delta 9,12,15}$	Verhältnis (18:3/18:2)
Leervektor	n.d.	n.d.	n.d.
An2	$9,294 \pm 1,156$	n.d.	n.d.
An1	$0,174 \pm 0,023$	$0,100 \pm 0,004$	$0,544 \pm 0,026$
An2_A <sub>1</sub>	$0,022 \pm 0,006$	n.d.	n.d.
An2_B <sub>1</sub>	$0,017 \pm 0,008$	n.d.	n.d.
An2_C <sub>1</sub>	$0,091 \pm 0,003$	n.d.	n.d.
An2_D <sub>1</sub>	$5,772 \pm 1,06$	$0,256 \pm 0,033$	$0,045 \pm 0,018$
An2_E <sub>1</sub>	$0,127 \pm 0,02$	$0,028 \pm 0,003$	$0,244 \pm 0,042$
An2_F <sub>1</sub>	$0,055 \pm 0,001$	n.d.	n.d.
An2_G <sub>2</sub>	$0,028 \pm 0,01$	n.d.	n.d.
An2_H <sub>1</sub>	$0,137 \pm 0,05$	n.d.	n.d.
An2_I <sub>1</sub>	$0,020 \pm 0,002$	n.d.	n.d.



**Abb. 36. Übertragung der An1-Domänen D und E erzeugt Bifunktionalität in An2.** Die Hybridenzyme, An2\_D<sub>1</sub> und An2\_E<sub>1</sub>, und die Kontrollenzyme An1 und An2 wurden in Hefe für 72 h bei 22 °C exprimiert. Nach Aufarbeitung der Kulturen wurden die Fettsäuremethylester gaschromatographisch analysiert. **(A)** Gezeigt sind Ausschnitte der jeweiligen GC-Profile. **(B)** Das Verhältniss der durch Desaturierung gebildeten 18:3<sup>Δ9,12,15</sup> Fettsäure und der 18:2<sup>Δ9,12</sup>-Fettsäure (18:3<sup>Δ9,12,15</sup>/18:2<sup>Δ9,12</sup>). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. **(C)** Verifizierung der neu gebildeten 18:3<sup>Δ9,12,15</sup>-Fettsäuren durch GC-MS. Das Massenspektrum repräsentiert das Vorhandensein der 18:3-Fettsäure (292 *m/z*). n.d., nicht detektierbar.

Die Domänen D und E der bifunktionalen Desaturase An1 konnten somit als hinreichende Determinanten identifiziert werden, die die Bifunktionalität des An1 Enzyms auf die monofunktionale An2-Desaturase übertragen. Die Domäne D stellt einen hydrophoben Sequenzabschnitt von 18 Aminosäuren dar und ist dem Topologiemodell zufolge nahe des aktiven Zentrums gelegen (Abb. 34). Die Domäne E umfaßt 49 Aminosäuren und liegt in dem cytosolischen Sequenzbereich der Desaturase, der auch die zweite Histidin-Box enthält, ist also ebenfalls in der Nähe des katalytischen Zentrums lokalisiert oder sogar direkt an seiner Bildung beteiligt (Abb. 34). Da die Sequenzdomänen, die maßgeblich zu der Bifunktionalität beitragen, direkt nebeneinander lagen, wurde getestet, ob ein simultaner Austausch beider Domänen (D und E) in der  $\Delta 12$ -Desaturase gegen die Domänen der bifunktionalen Desaturase den Effekt der Einzelaustausche verstärken würde. Die Charakterisierung der Doppelaustausch-Chimäre in Hefe zeigte aber, daß dieses Hybridenzym katalytisch inaktiv war.

## 4. Diskussion

### 4.1 Etablierung eines Acyl-CoA-abhängigen Syntheseweges für VLCPUFAs in Hefe und *Arabidopsis*

Transgene Pflanzen geraten als „grüne Fabriken“ zur kostengünstigen und zukunftsfähigen Produktion von gesundheitsfördernden VLCPUFAs zunehmend in das Blickfeld biotechnologischer Anwendungen. Vorteile der Produktion wertvoller Inhaltsstoffe in Pflanzen sind die leichte Kultivierbarkeit und die bestehende Infrastruktur für Ernte und Prozessierung (Voelker und Kinney, 2001; Thelen und Ohlrogge, 2002).

#### 4.1.1 Neue Enzyme aus Algen

Die Produktion wertvoller Öle in den Samen transgener Kulturpflanzen gehört zu den klassischen Beispielen der „grünen Biotechnologie“, und eine Vielzahl von Studien hat sich bereits mit der Optimierung der Synthese von VLCPUFAs in Samenölen befaßt. Bisherige transgene Ansätze zur Produktion von VLCPUFAs in Samenölen haben gezeigt, daß die Substratdichotomie eingeführter biosynthetischer Desaturasen einen bedeutenden limitierenden Faktor der VLCPUFA-Synthese darstellt. Die Notwendigkeit des Transportes der Fettsäuren zwischen dem Ort der Desaturierung im Lipid-Pool und dem Ort der Elongation, dem Acyl-CoA-Pool, führt bei bisher gewählten transgenen Ansätzen dazu, daß Intermediate der Synthese an ihrem Acylträger verblieben und weiterführenden Enzymen nicht als Substrate zur Verfügung standen (Abadi et al., 2004; Sayanova et al., 2006b). Der so begrenzte Umsatz des Stoffwechselweges, der durch die Desaturasen und Elongasen definiert war, führte bisher zu einer geringen Bildung an VLCPUFAs. Durch die Identifizierung geeigneter Enzyme aus Algen und die Etablierung eines ausschließlich Acyl-CoA-abhängigen VLCPUFA-Biosynthesewegs sollte im Rahmen dieser Arbeit der beschriebene Engpaß umgangen werden.

Gene für die benötigten neuen Acyl-CoA-abhängigen Desaturasen sollten aus Mikroalgen, den Primärproduzenten von VLCPUFAs, isoliert werden. Als Genspender sind Algen nicht neu. Viele der bekannten Desaturasegene wurden aus Algen isoliert (z.B. (Wallis und Browse, 1999; Domergue et al., 2002; Meyer et al., 2003; Pereira et al., 2004b). Als erfolgversprechende Kandidaten zur Isolierung von Acyl-CoA-abhängigen Desaturasen stellten sich die Mikrolagen *O. tauri* und *M. squamata* heraus. Die Fettsäurezusammensetzung (vgl. Abb. 9), die Detektierbarkeit von VLCPUFA-Biosynthese-

intermediaten im Acyl-CoA-Pool (vgl. Abb. 11) und die Tatsache, daß aus *O. tauri* bereits eine Acyl-CoA-abhängige  $\Delta 6$ -Desaturase isoliert werden konnte (Domergue et al., 2005), führten zur Auswahl der beiden verwendeten Algenstämme. Die Wahl von *M. squamata* war zusätzlich durch die Beobachtung bedingt, daß fast ausschließlich  $\omega 3$ -VLCPUFAs in dieser Alge detektiert werden konnten (vgl. Abb. 9). Da speziell  $\omega 3$ -VLCPUFAs in der menschlichen Physiologie und in verschiedenen Stoffwechselprozessen eine wesentliche Rolle spielen, sind diese Fettsäuren für unsere Ernährung von besonderer Bedeutung. Eine unzureichende Zufuhr von  $\omega 3$ -VLCPUFAs, wie sie ernährungsbedingt in westlichen Industrieländern üblich ist, kann diverse Fehlentwicklungen beim Fötus aber auch Störungen physiologischer Funktionen beim Erwachsenen zur Folge haben. Organismen, die wie *M. squamata* Enzyme enthalten, die spezifisch im  $\omega 3$ -VLCPUFA-Biosyntheseweg aktiv sind, sind also von besonderem Interesse, da die entsprechenden Gene gezielt für die Produktion von  $\omega 3$ -VLCPUFAs in transgenen Pflanzen eingesetzt werden können.

Durch das Vorhandensein von EST-Sequenzen, die freundlicherweise von Dr. Amine Abbadi zur Verfügung gestellt wurden, konnten aus der Mikroalge *M. squamata* zwei mutmaßliche Desaturasesequenzen, MsI und MsII, isoliert werden. Da das Genom von *O. tauri* sequenziert und veröffentlicht ist (Derelle et al., 2006), konnte außerdem eine weitere mutmaßliche Desaturasesequenz, OtII, isoliert werden. Die von den isolierten cDNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen enthielten die typischen Merkmale von „Front-End“-Desaturasen, die in anderen Organismen an der Synthese von VLCPUFAs beteiligt sind. Die heterologe Expression der cDNA-Klone in Hefe ergab, daß MsI, MsII und OtII zugesetzte Fettsäuren desaturierten, also aktive Enzyme darstellten (Abb.13 - 15). Die Analyse der gebildeten Desaturierungsprodukte zeigte, daß es sich bei MsI um eine  $\Delta 6$ -Desaturase (Ms $\Delta 6$ ) und bei MsII und OtII jeweils um  $\Delta 5$ -Desaturasen handelte (Ms $\Delta 5$  und Ot $\Delta 5$ ). Mit diesen neuen Enzymen war es nun möglich, die Biosynthese von EPA in Hefe zu etablieren. Ms $\Delta 6$  zeigte im Vergleich zu der lipidabhängigen Pt $\Delta 6$  eine hohe Desaturierungseffizienz, die mit der der Ot $\Delta 6$  Desaturase vergleichbar war. Ot $\Delta 6$  zeigte bei den hier durchgeführten Experimenten allerdings nicht die hohe Desaturierungseffizienz, die für dieses Enzym beschrieben ist (Domergue et al., 2005).

#### 4.1.2 Ms $\Delta 6$ als Schrittmacherenzym für die Bildung von $\omega 3$ -VLCPUFAs

Bisher charakterisierte  $\Delta 6$ -Desaturasen katalysieren die Umsetzung sowohl von  $\omega 6$ -18:2 $^{\Delta 9,12}$  als auch von  $\omega 3$ -18:3 $^{\Delta 9,12,15}$  in die  $\Delta 6$ -desaturierten Produkte  $\omega 6$ -18:3 $^{\Delta 6,9,12}$  und  $\omega 3$ -18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$  und vermitteln so die einleitenden Schritte der  $\Delta 6$ -Stoffwechselwege zur

VLCPUFA-Synthese (Abb. 4). Ms $\Delta$ 6 stellt durch seine deutliche Substratpräferenz für  $\omega$ 3-18:3 $^{\Delta 9,12,15}$  (Abb. 16) im Vergleich zu bekannten Desaturasen eine Besonderheit dar (D'Andrea et al., 2002; Guillou et al., 2004). Seine hohe Spezifität grenzt Ms $\Delta$ 6 deutlich von der nahe verwandten Ot $\Delta$ 6-Desaturase ab, die keine ausgeprägte Substratpräferenz zeigte und verschiedene Fettsäuren mit bestehender  $\Delta$ 9-Doppelbindung umsetzte (vgl. Abb. 16; Domergue et al., 2005). Ein Vergleich der Verhältnisse der durch verschiedene  $\Delta$ 6-Desaturasen umgesetzten  $\omega$ 3- und  $\omega$ 6-Substrate zeigt die Unterschiede der Enzyme besonders deutlich: Während mit Ot $\Delta$ 6 das Verhältnis von  $\omega$ 3- zu  $\omega$ 6-desaturierten Fettsäuren nur 1,3 betrug (Domergue et al., 2005), zeigte die bereits als  $\omega$ 3-spezifisch charakterisierte  $\Delta$ 6-Desaturase aus *Primula luteola* ein Verhältnis von 5,8 (Sayanova et al., 2003; Sayanova et al., 2006c). Das für Ms $\Delta$ 6 bestimmte Verhältnis von  $\omega$ 3- zu  $\omega$ 6-desaturierten Fettsäuren war mit einem Wert von 114 deutlich höher als das der anderen Enzyme, was gut mit der bestimmten Fettsäurezusammensetzung in der Herkunftsalge *M. squamata* übereinstimmt, die ausschließlich  $\omega$ 3-VLCPUFAs akkumuliert (Abb. 9). Die meisten Ölsaaten enthalten  $\omega$ 6-18:2 $^{\Delta 9,12}$ - und  $\omega$ 3-18:3 $^{\Delta 9,12,15}$  als Substrate für die VLCPUFA-Synthese. Desaturasen ohne strikte Substratpräferenz bilden daher verschiedene Zwischenprodukte, die um die transgen etablierten Enzyme der VLCPUFA-Biosynthese konkurrieren. Für die Synthese von VLCPUFAs in transgenen Pflanzen zeigt sich Ms $\Delta$ 6 wegen seiner Spezifität also als besonders vielversprechender Kandidat, da das Enzym schon beim einleitenden Schritt die Synthese in Richtung der  $\omega$ 3-Produkte lenken kann, so daß die Akkumulation unerwünschter  $\omega$ 6-Nebenprodukte vermieden wird.

Wegen des Besitzes eines N-terminalen HPGG-Motivs und der Modifikation des ersten Histidinrestes der dritten Histidin-Box zu Glutamin waren die aus Algen identifizierten Desaturasen den „Front-End“-Desaturasen zugerechnet worden (Abb. 12), und die beobachtete  $\Delta$ 6-Desaturierung bestätigte diese Zuordnung (Abb. 13). Die Spezifität von „Front-End“-Desaturasen ist durch die Position einer im Substrat bestehenden Doppelbindung vorgegeben, wobei eine neue Doppelbindung zwischen der bestehenden Doppelbindung und der Carboxylgruppe eingefügt wird (Napier et al., 1997). Verschiedene Gruppen haben die Hypothese aufgestellt, daß eine weitere  $\omega$ 3-Doppelbindung keinen Effekt auf die Substratspezifität von „Front-End“-Desaturasen ausübt (Napier et al., 1997; Domergue et al., 2002). Für verschiedene „Front-End“-Desaturasen wurde gezeigt, daß das  $\omega$ -Ende der Fettsäurekette keinen Einfluß auf die Substratwahl hat, wie z.B. für die menschliche  $\Delta$ 6-Desaturase, die sowohl  $\omega$ 6-18:2 $^{\Delta 9,12}$  und  $\omega$ 3-18:3 $^{\Delta 9,12,15}$  und auch  $\omega$ 6-24:4 $^{\Delta 9,12,15,18}$  und  $\omega$ 3-24:5 $^{\Delta 9,12,15,18,21}$  desaturiert (de Antueno et al., 2001). Im Gegensatz zu bisher charakterisierten

Desaturasasen war Ms $\Delta$ 6 fähig, zwischen  $\omega$ 3- und  $\omega$ 6-Substraten zu diskriminieren, was bedeutet, daß die Kontrolle der Regiospezifität von „Front-End“-Desaturasasen doch facettenreicher ist als bisher angenommen.

Neben Ms $\Delta$ 6 wurden zwei neue  $\Delta$ 5-Desaturasasen isoliert. Die Substratspezifität von Ms $\Delta$ 5 und Ot $\Delta$ 5 war nach Expression in Hefe mit der bekannter  $\Delta$ 5-Desaturasasen vergleichbar (Michaelson et al., 1998b; Domergue et al., 2002; Hornung et al., 2005), und es wurden C20- $\omega$ 6- und  $\omega$ 3-Fettsäuren in ähnlichem Maße umgesetzt (Abb. 14). Die Effizienz des Umsatzes war allerdings sowohl für  $\omega$ 6-20:3 $\Delta$ <sup>8,11,14</sup> als auch für  $\omega$ 3-20:4 $\Delta$ <sup>8,11,14,17</sup> gering, der Umsatz durch Ot $\Delta$ 5 sogar nahe dem Detektionslimit (Abb. 15). Auch durch Modifizierung der Expressionsbedingungen oder durch Anpassung der Codons der ersten 10 - 20 Aminosäuren der Enzyme an den Codongebrauch von Hefe konnte die Desaturierungseffizienz nicht gesteigert werden. Bei der Bewertung der Ergebnisse der heterologen Expression in Hefe muß als mögliche Erklärung in Betracht gezogen werden, daß in den Algen bislang unbekannte akzessorische Proteine oder Cofaktoren eine effizientere Funktion von Ms $\Delta$ 5 und Ot $\Delta$ 5 ermöglichen könnten. Um die Möglichkeit zu erkunden, daß eine unterschiedliche oder fehlgeleitete subzelluläre Lokalisierung von  $\Delta$ 6- oder  $\Delta$ 5-Desaturasasen einen effizienten Austausch verhinderte, wurden computergestützte Vorhersagen der subzellulären Verteilung durchgeführt. Keiner der getesteten Algorithmen (Predotar, iPSORT, ChloroP) ergab dabei eine eindeutige Zuordnung. Es ist wichtig anzumerken, daß die Ergebnisse nicht auf eine chloroplastidäre Lokalisierung hinwiesen. Wegen der evolutionären Distanz von *M. squamata* und *O. tauri* zu anderen, besser untersuchten eukaryotischen Organismen besteht allerdings die Möglichkeit, daß die Ergebnisse der Computervorhersagen unsicher sind.

#### 4.1.3 Die neu isolierten Enzyme vermitteln Acyl-CoA-abhängige Desaturierung

Eine grundlegende Voraussetzung für den hier verfolgten Ansatz zur Optimierung der VLCPUFA-Produktion in transgenen Pflanzen war die Isolierung Acyl-CoA-abhängiger Desaturasasen. Um die Abhängigkeit der neu identifizierten Desaturasasen bewerten zu können, wurden Vergleichstudien mit der bekannten von Acyl-CoA abhängigen Ot $\Delta$ 6-Desaturase als Positivkontrolle und den lipidabhängigen Desaturasasen Pt $\Delta$ 6 und Pt $\Delta$ 5 aus *P. tricornutum* als Negativkontrollen durchgeführt. Im Rahmen früherer Untersuchungen zur Präferenz verschiedener Desaturasasen hinsichtlich ihrer Acylträger konnte gezeigt werden, daß die lipidabhängige Desaturierung an PtdCho stattfindet und daß das Produkt der Desaturierung an diesem Lipid bevorzugt akkumuliert (Domergue et al., 2003). Erfolgt die Desaturierung hingegen an Acyl-CoA-Estern, war eine gleichmäßigere Verteilung der desaturierten

Fettsäuren auf verschiedene Lipide zu beobachten, da Acyltransferasen das Desaturaseprodukt sowohl auf PtdCho als auch auf andere Lipide verteilen, wie für die menschliche CoA-abhängige  $\Delta 6$ -Desaturase FADS2 gezeigt werden konnte (Domergue et al., 2003). Die Verteilung der neu gebildeten desaturierten Fettsäuren auf verschiedene Lipidklassen kann also Hinweise auf den bevorzugten Acylträger geben. Für die Analyse der neu isolierten Desaturasen wurden diese einzeln oder in Kombination mit entsprechenden Elongasen in Hefe exprimiert und die Verteilung der Desaturaseprodukte auf die verschiedenen Lipidklassen getestet. Obwohl Hefe die Substrate der VLCPUFA-Synthese endogen nicht produziert, werden zugeführte Fettsäuren von diesen Zellen aufgenommen. Die Produkte von Ms $\Delta 6$  und Ms $\Delta 5$  ( $\omega 3$ -18:4 <sup>$\Delta 6,9,12,15$</sup>  bzw.  $\omega 6$ -20:4 <sup>$\Delta 5,8,11,14$</sup> ) akkumulierten schließlich wie erwartet nicht zu hohen Anteilen an PtdCho, wie die der entsprechenden lipidabhängigen Vergleichsenzyme, sondern wurden entweder bevorzugt in TAGs detektiert oder gleichmäßig auf alle untersuchten Lipidklassen verteilt (Abb. 20 und 21). Die zum Vergleich analysierte Verteilung der Produkte der Acyl-CoA-abhängigen Ot $\Delta 6$  (Domergue et al., 2005) weisen darauf hin, daß die Desaturasen von *M. squamata* Acyl-CoA-Ester als Substrate bevorzugen.

In einem parallelen Ansatz wurde die Präferenz der neu isolierten Desaturasen für CoA-Thioester durch direkte Detektion der Produkte im Acyl-CoA-Pool getestet. Bei der Bewertung dieser Experimente ist zu beachten, daß aufgenommene Fettsäuren in Hefezellen schnell durch Acyl-CoA-Synthetasen zu CoA-Thioestern aktiviert (Wagner und Paltauf, 1994) und erst dann in Lipide inkorporiert werden. Die Analyse der Desaturierung gefütterter Substrate in Abhängigkeit von der Zeit (Domergue et al., 2003) erlaubt also Aussagen über die bevorzugten Acylträger der verschiedenen heterolog exprimierten Enzyme. Die Produkte von Ms $\Delta 6$ , Ms $\Delta 5$  und Ot $\Delta 6$  waren deutlich früher in isolierten Acyl-CoA-Estern nachzuweisen als in den Lipiden (Abb. 22), was auf eine Präferenz für CoA-gebundene Substrate hinweist. Im Gegensatz dazu waren die Desaturierungsprodukte der lipidabhängigen Desaturasen zuerst in der Lipidfraktion detektierbar und erschienen erst später im Acyl-CoA-Pool. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen mit beschriebenen Eigenschaften von Pt $\Delta 6$  und Pt $\Delta 5$  überein (Domergue et al., 2002; Domergue et al., 2003). Die Coexpression von Ms $\Delta 6$  oder Ms $\Delta 5$  mit den entsprechenden  $\Delta 6$ - bzw.  $\Delta 5$ -Elongasen PSE1 bzw. OtELO2 führte in allen Fällen zu einer effizienten Elongation der jeweiligen Produkte. Intermediate, die ebenfalls Produkte der Desaturierung darstellen, konnten bei der Analyse von Gesamtfettsäuren nur in geringen Mengen detektiert werden (Abb. 24 und 26). Gleichzeitig akkumulierten die jeweiligen Elongationsprodukte, was für eine effiziente Weitergabe der

Desaturierungsprodukte direkt im Acyl-CoA-Pool spricht. Die direkte Messung von Acyl-CoA- und Lipid-Pool bei Coexpression von Ms $\Delta$ 6 und PSE1 zeigte, daß das direkt nach der Substrataufnahme im CoA-Pool gebildete Desaturaseprodukt  $\omega$ 3-18:4 <sup>$\Delta$ 6,9,12,15</sup> nicht akkumulierte, sondern sofort zu  $\omega$ 3-20:4 <sup>$\Delta$ 8,11,14,17</sup> umgesetzt wurde (Abb. 25 A). In Lipiden erschien das Produkt der Reaktionsfolge erst zu späteren Zeitpunkten (Abb. 25 B). Der direkte Nachweis Acyl-CoA-gebundener Fettsäuren konnte wegen der Coelution verschiedener Fettsäuren in dieser Weise nur für Ms $\Delta$ 6/PSE1 durchgeführt werden, da die Produkte der entsprechenden  $\Delta$ 5-Reaktionsfolge nicht als separate Signale eluieren. Die als Kontrollen getesteten Coexpressionen der lipidabhängigen Desaturasen Pt $\Delta$ 6 oder Pt $\Delta$ 5 mit PSE1 bzw. mit OtELO2 ergaben im Einklang mit früheren Beobachtungen (Domergue et al., 2002; Abbadi et al., 2004) daß die Elongation der jeweiligen Produkte nur mit geringerer Effizienz stattfand (Abb. 24 und 26). Eine mögliche Erklärung für die geringere Elongationseffizienz nach lipidabhängiger Desaturierung ist, daß eine hefeeigene Acyltransferase zunächst den Transport der Fettsäuren vom Lipid- in den Acyl-CoA-Pool katalysieren muß, um die Desaturaseprodukte für die Elongation bereitzustellen. Da in verschiedenen Studien beschrieben wurde, daß Acyltransferasen den Transport von Fettsäuren aus dem Acyl-CoA-Pool in die Lipide effizient vermitteln, der umgekehrte Transport aber weniger effizient ist (Stymne und Stobart, 1984; Wagner und Paltauf, 1994; Domergue et al., 2003), verbleiben die desaturierten Fettsäuren an den Lipiden und stehen der Elongase nur in geringer Menge zur Verfügung. Zusammengefasst weisen die Daten darauf hin, daß Ms $\Delta$ 6 und Ms $\Delta$ 5 ihre jeweiligen Fettsäuresubstrate zumindest in Hefe abhängig von Acyl-CoA desaturierten. Daher stellen Ms $\Delta$ 6 und Ms $\Delta$ 5 nicht nur wegen ihrer geeigneten Regiospezifitäten, sondern auch wegen der bevorzugten Acylträger-Spezifität ideale Enzyme für eine Acyl-CoA-abhängige Produktion von  $\omega$ 3-VLCPUFAs dar.

#### **4.1.4 Acyl-CoA-abhängige Synthese von VLCPUFAs: Funktionalität in Hefe und transgenen Pflanzen**

Ein ausschließlich von Acyl-CoA abhängiger VLCPUFA-Biosyntheseweg sollte den limitierenden Austausch von Fettsäuren zwischen PtdCho und Acyl-CoA-Pool auf ein Minimum reduzieren. Um das Zusammenspiel und die Effizienz der VLCPUFA-Synthese durch die neu identifizierten Desaturasen zu testen, wurden Ms $\Delta$ 6 und Ms $\Delta$ 5 zusammen mit der  $\Delta$ 6-Elongase PSE1 in Hefe exprimiert und die Akkumulation von EPA getestet (Abb. 27). Als Kontrolle diente die Coexpression der lipidabhängigen Pt $\Delta$ 6 und Pt $\Delta$ 5 mit PSE1. Die vergleichende Analyse der in Hefe erzielten EPA-Gehalte zeigte, daß durch die Acyl-CoA-

abhängige Reaktionsfolge etwa dreimal mehr EPA in den Hefezellen akkumulierte als durch den lipidabhängigen Syntheseweg (Abb. 27 D). Dieses Ergebnis wurde trotz der schwachen Effizienz von Ms $\Delta$ 5 (vgl. Abb. 18) erzielt und war mit hoher Wahrscheinlichkeit im effektiveren Zusammenspiel von Ms $\Delta$ 6 und PSE1 im Acyl-CoA-Pool begründet. Die Analyse der Zwischenprodukte des Stoffwechselweges zeigte, daß das zunächst gebildete  $\omega$ 3-18:4 <sup>$\Delta$ 6,9,12,15</sup> durch PSE1 nahezu vollständig elongiert wurde, was die erfolgreiche Umgehung des beschriebenen LPCAT-Engpasses (Abbadi et al., 2004) der VLCPUFA-Synthese darstellt. Die resultierende Akkumulation von  $\omega$ 3-20:4 <sup>$\Delta$ 8,11,14,17</sup> bot Ms $\Delta$ 5 ausreichend Substrat, um trotz geringer Desaturierungseffizienz letztlich mehr EPA zu produzieren als beim lipidabhängigen Kontrollversuch beobachtet werden konnte. Der LPCAT-Engpaß der VLCPUFA-Synthese trat bei lipidabhängiger Desaturierung anschaulich durch die Akkumulation des  $\omega$ 3-18:4 <sup>$\Delta$ 6,9,12,15</sup> Zwischenproduktes in Erscheinung, und die Elongation zu  $\omega$ 3-20:4 <sup>$\Delta$ 8,11,14,17</sup> durch PSE1 erfolgte mit nur geringer Effizienz. Beim Vergleich der von Acyl-CoA abhängigen und der lipidabhängigen EPA-Synthese muß beachtet werden, daß das Ausgangssubstrat den Hefekulturen exogen zugesetzt wurde, nach der Aufnahme zuerst durch hefeeigene Acyl-CoA-Synthetasen CoA-aktiviert wurde (Wagner und Paltauf, 1994; Faergeman et al., 2001; Domergue et al., 2003), und so dem Acyl-CoA-abhängigen Weg direkt zur Verfügung stand, während das Substrat für den lipidabhängigen Weg zunächst in PtdCho inkorporiert werden mußte. Der Acyl-CoA-abhängige Weg war somit möglicherweise durch den Stoffwechsel des Hefeexpressionssystems bevorteilt, so daß eine abschließende Bewertung des Acyl-CoA-abhängigen Weges zur VLCPUFA-Synthese erst nach Analyse der entsprechenden transgenen Pflanzen vorgenommen werden kann. Außer EPA konnten in beiden Ansätzen Nebenprodukte der VLCPUFA-Biosyntheseenzyme detektiert werden, wie sie auch schon von anderen beschrieben wurden (Beaudoin et al., 2000; Domergue et al., 2002). Für die Entstehung dieser unspezifischen Produkte waren vor allem die  $\Delta$ 6-Elongase und die beiden  $\Delta$ 5-Desaturasen verantwortlich, die alle in Frage kommenden Substrate in Hefe umsetzten. Die Nebenprodukte zeigen die oben erwähnte Konkurrenz der Enzyme um die Substrate, die den Umsatz der gewünschten VLCPUFA-Intermediate zu EPA hemmt. Es ist anzumerken, daß die in Hefe beobachteten Nebenprodukte in den Spenderalgen *M. squamata* (diese Arbeit) und *P. tricornutum* (Domergue et al., 2002) selbst nicht detektierbar waren (vgl. auch Abb. 9), was darauf hinweist, daß in den Algen mögliche akzessorische Proteine einen gerichteten Substrat-Produkt-Transport zwischen den einzelnen Enzymen gewährleisten, durch den Nebenreaktionen ausbleiben. Welcher Art solche akzessorischen Proteine sind, bleibt an dieser Stelle spekulativ. In diesem Zusammenhang erscheint die

Hypothese relevant, daß die Synthese von PtdCho oder TAG jeweils in spezifischen Subdomänen des ER stattfindet (Hills et al., 1993; Shockey et al., 2006), die auf bisher unbekannte Weise etabliert werden. Die postulierte Subkompartimentierung der Synthesewege für bestimmte Lipide in ER-Domänen kompliziert die Verwendung heterolog exprimierter Enzyme wie Acyltransferasen, Desaturasen oder Elongasen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit im heterologen System nicht im korrekten physiologischen Kontext aktiv sind, da mögliche akzessorische Proteine fehlen, die im homologen System die entsprechenden Subdomänen mitgestalten (Graham et al., 2007).

Die Konzeptstudie für die Etablierung eines Acyl-CoA-abhängigen EPA-Syntheseweges in Hefe zeigte die prinzipielle Möglichkeit auf, die komplette Reaktionsfolge in Acyl-CoA-abhängiger Weise durchzuführen. Da Hefe kein öllakkumulierender Organismus ist und, wie schon oben erwähnt, die Substrate der VLCPUFA-Synthese exogen zugegeben werden müssen, können die bisherigen Beobachtungen nicht unmittelbar auf die Situation in Pflanzen oder Samen übertragen werden. Aus verschiedenen Gründen, die mit dem gegenüber Hefe unterschiedlichen Stoffwechsel der Pflanzen zusammenhängen, stellt sich die Etablierung der VLCPUFA-Biosynthese in Pflanzen erheblich komplexer dar als in Hefe. Obwohl die Produktion von VLCPUFAs in Pflanzen bereits prinzipiell erfolgreich stattfindet, wurden verschiedene Faktoren identifiziert, die speziell die Bildung von  $\omega$ 3-VLCPUFAs in Ölsaaten erschweren. In den letzten Jahren sind alternative Biosynthesewege für VLCPUFAs mit verschiedenen Kombinationen von Desaturasen, Elongasen und Acyltransferasen in verschiedenen Modellpflanzen und Ölsaaten getestet worden (Abadi et al., 2004; Kinney, 2004; Qi et al., 2004; Wu et al., 2005; Sayanova et al., 2006b). Dabei wurde u.a. erkannt, daß die Akkumulation der gewünschten VLCPUFAs in den einzelnen Pflanzen nicht optimal war, weil die verwendeten Desaturasen nicht für  $\omega$ 3-Fettsäuren spezifisch waren und daher neben  $\omega$ 3-Produkten vor allem auch  $\omega$ 6-Produkte gebildet wurden. Da im Gegensatz zu Hefe in den meisten Pflanzen sowohl  $\omega$ 6- als auch  $\omega$ 3-Substrate in großen Mengen vorliegen, läßt sich dieses Problem vorzugsweise durch die Verwendung eines  $\omega$ 3-spezifischen Enzyms lösen, was aber bislang nicht beschrieben war. Ein weiteres Problem entsteht durch die Substratdichotomie der eingebrachten Enzyme. Da die Verbindung von lipidspezifischer Desaturierung und Acyl-CoA-abhängiger Elongation durch LPCATs erfolgt, fällt diesen Enzymen eine Schlüsselrolle bei der VLCPUFA-Synthese zu. Die für den Austausch von Fettsäuren zwischen Lipiden und Acyl-CoA-Pool verantwortlichen LPCATs scheinen in Pflanzen Substratspezifitäten zu besitzen, die Fettsäuren mit Doppelbindungen vor der  $\Delta$ 9-Position ausschließen. Neu gebildete VLCPUFAs verblieben so entweder in den Lipiden

(Abbadi et al., 2004) oder im CoA-Pool (Qi et al., 2004; Sayanova et al., 2006b). Die Diskriminierung  $\Delta 6$ -desaturierter Fettsäuren durch die LPCAT in Lein und *Arabidopsis*, zwei Pflanzenarten mit ähnlicher endogener Fettsäurezusammensetzung, läßt vermuten, daß die Spezifität von LPCATs auf Haushaltssubstrate festgelegt ist und fremde Fettsäuren nicht als Substrat erkannt werden. Ein alternativer Ansatz der Optimierung der VLCPUFA-Biosynthese in Pflanzen hat die Identifizierung von LPCATs mit den in der VLCPUFA-Synthese gewünschten Substratspezifitäten zum Ziel, die gezielt die Intermediate der VLCPUFA-Synthese zwischen Lipid-Pool und Acyl-CoA-Pool transportieren, um sie den beiden Synthesenzymen zugänglich zu machen (Kinney et al., 2002; Abbadi et al., 2004; Beaudoin und Napier, 2004; Domergue et al., 2005). Ähnlich zum in dieser Arbeit verfolgten Ansatz wird versucht, Kandidatengene für LPCATs in Mikroalgen oder anderen VLCPUFA-produzierenden Organismen zu identifizieren und diese Enzyme auf geeignete biochemische Eigenschaften zu testen. Auch nach erfolgreicher Bildung von VLCPUFAs bleiben Fragen zur VLCPUFA-Akkumulation und Synthese offen. Nur im Samenöl können VLCPUFAs in signifikanter Menge akkumulieren, weil sie hier vor einer weiteren Modifikation geschützt sind (Kinney, 2006) Der gerichtete Transport neu gebildeter VLCPUFAs in die Speicherlipide der Samen ist daher ein weiterer als problematisch erkannter Aspekt. Da die phospholipidabhängige TAG-Synthese durch die PDAT nicht spezifisch für ein bestimmtes Phospholipid ist wurden lipidabhängig vorwiegend an PtdCho gebildete VLCPUFAs selten vollständig aus dem Phospholipid-Pool in Speicherlipide inkorporiert (Stahl et al., 2004). Der hier beschriebene transgene Ansatz der ausschließlich Acyl-CoA-abhängigen VLCPUFA-Synthese sollte zumindest einige der eben angesprochenen Probleme der VLCPUFA-Akkumulation in Pflanzen lösen oder zu vielleicht neuen Lösungsansätzen führen.

Um die Effektivität der EPA-Synthese mittels der neu identifizierten Enzyme im Zusammenhang mit der Ölakumulation in Samen zu testen, wurden Ms $\Delta 6$  und Ms $\Delta 5$  zusammen mit PSE1 samenspezifisch in *A. thaliana* exprimiert. Als Kontrollen wurden wie schon bei den Hefeexperimenten die lipidabhängigen Desaturasen Pt $\Delta 6$  und Pt $\Delta 5$  zusammen mit PSE1 unter gleichen Bedingungen samenspezifisch exprimiert und die EPA-Akkumulation in den transgenen Pflanzen getestet. Ebenfalls getestet wurde das Zusammenspiel von Ot $\Delta 6$  und Ot $\Delta 5$  mit PSE1. Aufgrund der bereits diskutierten schwachen Aktivität von Ot $\Delta 5$  in den anfänglichen Hefecharakterisierungen, waren die oben beschriebenen Experimente mit diesem Enzym nicht durchgeführt worden. Die Coexpression der *O. tauri*-Enzyme in Samen wurde dagegen untersucht, um zu testen, ob Ot $\Delta 5$  in Pflanzen ein anderes Profil zeigte als in Hefe.

Das Ergebnis der Expression des Triple-Ms-Konstrukts in *Arabidopsis*-Samen zeigte, daß ein  $\omega$ 3-spezifischer EPA-Biosyntheseweg in den Samen der Pflanzen etabliert werden konnte (Abb. 28). Durch die Spezifität von Ms $\Delta$ 6 für das  $\omega$ 3-Substrat 18:3 <sup>$\Delta$ 9,12,15</sup> konnte die Synthese in Richtung der  $\omega$ 3-VLCPUFA gelenkt werden (Abb. 28 A). Die Ergebnisse der Pflanzenanalysen stimmen also gut mit den zuvor in Hefe gemachten Beobachtungen überein (vgl. Abb. 27 und 28). Die in Triple-Ms-Pflanzen detektierte geringe Menge an  $\omega$ 6-18:3 <sup>$\Delta$ 6,9,12</sup> oder dem C20-Elongationsprodukt  $\omega$ 6-20:3 <sup>$\Delta$ 8,11,14</sup> weist darauf hin, daß die erwähnte Substrat-Enzym-Konkurrenz bei Bildung von  $\omega$ 6-Nebenprodukten durch Verwendung hochspezifischen Ms $\Delta$ 6 vermieden werden konnte. Mit Ms $\Delta$ 6 war also eine gezielte Produktion von fast ausschließlich  $\omega$ 3-VLCPUFAs auch in *Arabidopsis* möglich, wo sowohl  $\omega$ 3- als auch  $\omega$ 6-Ausgangssubstrate vorlagen. Die Kontrollexperimente mit Triple-Ot- und Triple-Pt-Pflanzen unterstreichen die Ergebnisse der Triple-Ms-Pflanzen. In beiden Fällen akkumulierten neben  $\omega$ 3- auch  $\omega$ 6-VLCPUFAs in den Samenölen (Abb. 28 B und C), und in den Triple-Pt-Pflanzen machten  $\omega$ 6-Produkte sogar den Hauptanteil der gebildeten VLCPUFAs aus (vgl. Abb. 29 und 30). Bei Verwendung von  $\Delta$ 6-Desaturasen mit breiter Substratspezifität konnte in den Kontrollpflanzen also keine gerichtete Biosynthese von  $\omega$ 3-VLCPUFAs etabliert werden. Auf der Ebene der detektierbaren Metabolite wurde in Triple-Pt-Pflanzen eine substantielle Akkumulation der  $\Delta$ 6-Produkte von Pt $\Delta$ 6 beobachtet (Abb. 29 B und 30 B), was die bereits in Leinpflanzen gemachten Beobachtungen von Abbadi et al. (2004) bestätigt und zeigt, daß auch in *Arabidopsis* LPCATs einen Engpaß der lipidabhängigen VLCPUFA-Biosynthese darstellen. Im Gegensatz zu den Kontrollen zeigte sich in den Triple-Ms-Pflanzen eine nahezu vollständige Elongation von 18:4 <sup>$\Delta$ 6,9,12,15</sup> zu 20:4 <sup>$\Delta$ 8,11,14,17</sup> durch PSE1 (Abb. 29 B und 30 B), was darauf hinweist, daß der limitierende LPCAT-Engpaß durch effektives Zusammenspiel von Ms $\Delta$ 6 und PSE1 im Acyl-CoA-Pool erfolgreich umgangen werden konnte. Das Überwinden des LPCAT-Engpasses (siehe Abb. 29 B und 30 B) stellt die erfolgreiche Lösung der eingangs formulierten Zielsetzung dieser Arbeit dar.

Trotz dieses Erfolges zeigte sich ähnlich wie in Hefe nur eine geringe Akkumulation von 0,04 % EPA im Samenöl. Ein maßgeblicher Grund für die niedrige Akkumulation ist die schwache Aktivität von Ms $\Delta$ 5 bzw. Ot $\Delta$ 5. Der Umsatz des durch die  $\Delta$ 6-Elongase produzierten Substrates war so gering, daß nach Umgehung des LPCAT-Engpasses nun das folgende Elongationsprodukt 20:4 <sup>$\Delta$ 8,11,14,17</sup> akkumulierte (Abb. 29 C). Es ist anzumerken, daß Ms $\Delta$ 6 und Ot $\Delta$ 6 in *Arabidopsis*-Samen außerdem eine geringere Umsatzrate zeigten als aufgrund der Hefeexperimente zu erwarten war, was ebenfalls zur nur geringen VLCPUFA-

Produktion beitrug. Eine mögliche Erklärung für die in Pflanzen geringere Effizienz von MsΔ6 und OtΔ6 ist das Vorliegen des Ausgangssubstrates 18:3<sup>Δ9,12,15</sup> in Membranlipiden der Samen im Gegensatz zu Acyl-CoA-Estern nach Zufütterung der Hefeexpressionskulturen. Eine weitere mögliche Erklärung ist ein Fehlen VLCPUFA-spezifischer Acyl-CoA-Synthetasen, das die Aktivierung freier VLCPUFAs zu CoA-Estern verhindern würde. Diese Erklärung erscheint allerdings unwahrscheinlich, da die VLCPUFA-Synthese von endogenem 18:3<sup>Δ9,12,15</sup> ausgeht, für das *Arabidopsis* endogen kompatible Acyl-CoA-Synthetasen besitzt (Shockey et al., 2003). Ist 18:3<sup>Δ9,12,15</sup> erst aktiviert, bleibt es für alle weiteren Schritte der EPA-Synthese an CoA gebunden, da im Acyl-CoA-abhängigen Biosyntheseweg die Umesterung und Reaktivierung der Intermediate gerade umgangen wird. Auch nach dem Einbau der gebildeten VLCPUFAs in TAGs findet dann kein Umbau der Lipide mehr statt (Kinney, 2006).

Neben den Details des pflanzlichen Lipidstoffwechsels können sich auch genetische Faktoren ungünstig auf die VLCPUFA-Synthese in transgenen Pflanzen auswirken. Solche Probleme können durch die genomische Insertionsposition des Expressionskonstruktes oder die Aktivität der verwendeten Promotoren bedingt sein. Durch die zufällige Insertion der transgenen Kasette in das pflanzliche Genom können Einflüsse promotorregulierender Faktoren umliegender Genombereiche entstehen, die im Voraus nicht einschätzbar sind (Kinney, 2004). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß die Expressionseinheiten von Promotor, cDNA und Terminatorsequenz am besten funktionieren, wenn sie in bestimmten Abständen zueinander unterbrochen von untranskribierten Sequenzabschnitten vorliegen (Kinney et al., 2002). Erst systematische Expressionsstudien oder die Analyse der transgen erzeugten Produkte einer größeren Zahl unabhängiger Transformanten kann zeigen, wie effektiv die eingeführten Transgene im Optimalfall exprimiert werden. Da im zeitlich begrenzten Rahmen dieser Arbeit naturgemäß nur eine eingeschränkte Zahl transgener Linien analysiert werden konnte, hängt die beobachtete niedrige EPA-Akkumulation möglicherweise mit nicht optimaler genomischer Insertion und den damit verbundenen Positionseffekten oder anderen genetischen Faktoren zusammen. Letztlich können nach bisherigem Verständnis nur über große Zahlen analysierter Pflanzen transgene Linien identifiziert werden, die eine gesteigerte Produktivität aufweisen.

#### 4.1.5 Erhöhte VLCPUFA-Einlagerung in Speicherlipide

Neben gesteigerter Effizienz der VLCPUFA-Synthese durch die Acyl-CoA-abhängige Reaktionsfolge sollten auch weitere als Problem erkannte Faktoren der

VLCPUFA-Produktion in Pflanzen untersucht werden. Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit bezieht sich daher auf die Einlagerung gebildeter VLCPUFAs in TAGs des Samenöls. Die Verteilung der transgen produzierten  $\omega$ 6- und  $\omega$ 3-VLCPUFAs, besonders der Endprodukte AA und EPA, auf verschiedene Lipidklassen (Abb. 31) zeigte, daß VLCPUFAs, die über den Acyl-CoA-abhängigen Syntheseweg gebildet wurden, effizienter in TAGs inkorporiert wurden als lipidabhängig gebildete VLCPUFAs (Abb. 31 B und C). Außerdem konnte gezeigt werden, daß  $\omega$ 3-VLCPUFAs gegenüber  $\omega$ 6-VLCPUFAs bevorzugt in TAGs inkorporiert wurden (vgl. Abb. 31 B und C). Beide Beobachtungen lassen neue Annahmen über die bevorzugten TAG-Biosynthesewege in *Arabidopsis*-Samen zu. Ein bevorzugter Einbau CoA-gebundener VLCPUFAs in TAG weist darauf hin, daß die DAGAT-Aktivität eine bedeutendere Rolle spielt als die PDAT-Aktivität, daß also TAGs bevorzugt durch Einführung Acyl-CoA gebundener Fettsäuren an DAG entsteht. Dabei ist es möglich, daß die samenspezifische DAGAT in *Arabidopsis* eine unerwartete Präferenz für  $\omega$ 3-Fettsäuren aufweist und so die bevorzugte Inkorporation von  $\omega$ 3-Produkten in TAGs bedingt. Um einen besseren Fluß der VLCPUFA in die TAGs zu bekommen wäre es denkbar, Gene für spezifische DAGATs oder PDATs in VLCPUFA-produzierenden Organismen zu identifizieren, um diese gezielt zur Verbesserung der transgenen Produktion von VLCPUFAs einsetzen zu können (Abadi et al., 2004; Graham et al., 2007). Allerdings zeigen die Daten der hier präsentierten Arbeit, daß die in *Arabidopsis* endogen vorkommenden DAGAT- und die PDAT-Aktivitäten keine limitierenden Enzyme bei der TAG-Synthese sind, sondern nur die LPCAT-Reaktion. Die effiziente Einlagerung in TAGs stellt insgesamt einen Vorteil dar, durch den sich die Acyl-CoA-abhängige VLCPUFA-Biosynthese von anderen möglichen Synthesewegen, z.B. über Expression von spezifischen LPCATs, abhebt.

#### 4.2 Bifunktionale Enzyme zur Optimierung biotechnologischer Anwendungen

Wie schon erwähnt kann die Beeinflussung der Fettsäurezusammensetzung von Samenölen durch Desaturasen von gesundheitlicher und ökonomischer Bedeutung sein. Die gezielte Manipulation der Ölgehalte oder Fettsäurezusammensetzung von Samenölen durch transgene Expression von Desaturasen ist daher das Ziel verschiedener alternativer Forschungsansätze. Das im folgenden Abschnitt beschriebene Projekt geht auf die Identifizierung zweier Desaturasen aus dem Gießkannenschimmel *A. nidulans* zurück, der strikt monofunktionalen  $\Delta$ 12- Desaturase An2 und der bifunktionalen  $\Delta$ 12/ $\omega$ 3-Desaturase An1. Da die Enzyme 40 % Sequenzidentität besitzen, bestand die Möglichkeit,

Sequenzbereiche zu identifizieren, die für die veränderte Substratspezifität der bifunktionalen Desaturase verantwortlich sein könnten. Heterologe Expression erst in Hefe und dann in *Arabidopsis*-Samen zeigte die breite Substratspezifität von An1 gegenüber  $\omega$ 6-Fettsäuren und die Bifunktionalität der Desaturase, wie sie auch schon für Desaturasen verwandter Ascomyceten-Spezies beschrieben wurde (Damude et al., 2006). Die biologische Relevanz der in Ascomyceten gehäuft vorkommenden Bifunktionalität von Desaturasen ist nicht klar. Man nimmt an, daß die bifunktionalen Enzyme auf eine frühe Duplikation eines Genes für eine monofunktionale  $\Delta$ 12-Desaturase zurückgehen, und daß sich durch den Verlust des selektiven Drucks eines der beiden Gene im Laufe der Evolution so veränderte, daß ein bifunktionales Enzym mit breiterer Regiospezifität entstand (Damude et al., 2006). Erweiterte Spezifitäten werden als erster evolutiver Schritt in der Entwicklung neuer Enzymaktivitäten angesehen (Shanklin, 2000; Sperling et al., 2003).

#### 4.2.1 Expression einer bifunktionalen Desaturase in *Arabidopsis* erhöht $\omega$ 3-Substrate

Bifunktionale Enzyme sind für die transgene Produktion von  $\omega$ 3-VLCPUFAs in Pflanzen von Interesse, da Pflanzenöle der Nutzpflanzen, wie Raps oder Soja, oftmals hohe Gehalte der  $\omega$ 6-Fettsäure  $18:2^{\Delta 9,12}$  aufweisen. Um eine effizient gesteigerte  $\omega$ 3-VLCPUFA Synthese in Pflanzen wie *Arabidopsis* oder Lein etablieren zu können, ist es wünschenswert, die VLCPUFA-Synthese nicht nur durch die oben diskutierten spezifischen  $\Delta$ 6-Desaturasen in Richtung der  $\omega$ 3-Fettsäuren zu bewegen, sondern auch die Menge des Ausgangssubstrates  $\omega$ 3- $18:3^{\Delta 9,12,15}$  zu erhöhen. Durch Expression von An1 in *Arabidopsis*-Samen konnte der Gehalt an  $\omega$ 3- $18:3^{\Delta 9,12,15}$  gegenüber dem der Kontrollpflanzen erhöht werden (Tab. 4), was sich in einem von 0,8 auf 1,3 gesteigerten Verhältnis gebildeter  $\omega$ 3- $18:3^{\Delta 9,12,15}$  zu  $18:2^{\Delta 9,12}$  Fettsäuren zeigte. Die absoluten Werte mit Expression von An1 waren geringer als die zuvor bei Expression einer bifunktionalen Desaturase aus *Fusarium moniliforme* in Sojaembryonen beobachteten (Damude et al., 2006). Die von Damude et al. (2006) berichteten Verhältnisse von  $18:3/18:2$  in Kontrollen und transgenen Sojapflanzen betragen 0,4 und 18. Ein direkter Vergleich der hier präsentierten *Arabidopsis*-Daten mit denen aus Sojaembryonen ist allerdings wegen der unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzungen der Pflanzen nur begrenzt möglich. Das Verhältnis von  $18:1^{\Delta 9}$  zu  $18:2^{\Delta 9,12}$  war in den transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen unverändert (Tab. 4) und der Beitrag von An1 zur Bildung von  $18:2^{\Delta 9,12}$  ist wegen der endogenen  $\Delta$ 12-Desaturaseaktivität unklar. Da jedoch mit Expression von An1 eine deutliche Steigerung der  $18:3^{\Delta 9,12,15}$ -Gehalte zu verzeichnen war (Tab. 4), kann angenommen

werden, daß An1 auch zur Bildung von 18:2<sup>Δ9,12</sup> beitrug. Grundsätzlich zeigte die Expression in *Arabidopsis*, daß An1 als Werkzeug in der Produktion von ω3-VLCPUFA einsetzbar ist.

#### 4.2.2 Hinreichende Determinanten der Bifunktionalität von Desaturasen

Trotz großen Interesses an der Produktion pflanzlicher Öle, ist das Wissen über die Determinanten der relevanten Substrat- und Regiospezifitäten von Desaturasen eher gering. Die Lösung der Kristallstruktur einer plastidären Stearoyl-ACP-Desaturase (Lindqvist et al., 1996) brachte zwar einige Informationen über Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion löslicher Desaturasen, die Mehrzahl der Desaturasen sind aber membrangebundene Enzyme, deren Funktionsprinzipien wegen fehlender struktureller Daten bislang nicht verstanden sind. Die wenigen verfügbaren Strukturinformationen über membrangebundene Desaturasen wurden über Mutanten- und Topologieanalysen ermittelt (Prasad et al., 1980; Stukeley et al., 1990; Diaz et al., 2002a; Man et al., 2006). Die Determinanten der unterschiedlichen Regiospezifitäten von Fettsäuresaturasen wurden anhand des systematischen Vergleiches der monofunktionalen An2 mit der bifunktionalen An1 untersucht. Eine wichtige Vorbereitung für das Domänen austauschexperiment war die Einteilung der An1 und An2 in neun charakteristische Domänen anhand eines Topologiemodells membrangebundener Desaturasen (Abb. 34). Durch systematischen Austausch der kodierenden DNA-Bereiche einzelner Domänen von An2 gegen die korrespondierenden Bereiche von An1 wurde eine Reihe von Hybridgenen geschaffen, die für Proteine kodierten, in denen einzelne Proteindomänen ausgetauscht waren (Abb. 35). Systematische Tests, welche der Chimärenproteine Bifunktionalität von An1 übernommen hatten (Tab. 5 und Abb. 36), zeigten, daß hinreichende Determinanten der Bifunktionalität in einer kurzen membranperipheren Domäne von 18 Aminosäuren (Domäne D) und einer direkt darauf folgenden Domäne von 54 Aminosäuren (Domäne E) lagen, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum postulierten katalytischen Zentrum befinden (Abb. 34). Trotz der Nähe zum katalytischen Zentrum der Desaturase sind die Domänen D und E wahrscheinlich nicht selbst an der Bildung des Zentrums beteiligt. Wegen ihrer membranperipheren Topologie liegt es nahe anzunehmen, daß Domäne D mit Substraten interagiert und diese dem katalytischen Zentrum zur Modifikation zuführt. In ähnlicher Weise könnte auch Domäne E die Positionierung von Fettsäuren für den Angriff des katalytischen Zentrums steuern. Der Domänen austausch eines kombinierten D/E-Abschnittes von An2 gegen den entsprechenden Abschnitt von An1 ergab ein katalytisches inaktives Protein. Eine mögliche Erklärung ist, daß

das Proteinrückgrat von An2 die Aufnahme des größeren kombinierten Abschnittes nicht ohne Konformationsänderungen erlaubte, die zur Inaktivierung des Enzyms führten.

Die Bestimmung der Sequenzabschnitte, die Bifunktionalität in Fettsäuresaturasen vermitteln können, eröffnet neue Wege der genetischen Manipulation von Enzymen der VLCPUFA-Synthese. Vergleiche der Aminosäuresequenzen der Domäne D der monofunktionalen mit der bifunktionalen Desaturase zeigten an, daß von 18 ausgetauschten Aminosäuren nur vier unterschiedlich waren. Diese vier Aminosäuren stellen also sehr präzise Determinanten der Bifunktionalität dar und sind Kandidaten für die Substratinteraktion membrangebundener Desaturasen. Vergleiche der Sequenzen für Domäne E ergaben kein so klares Bild, da 34 der 54 ausgetauschten Aminosäuren unterschiedlich sind. Hier sind weitere Experimente nötig, um die Zahl der relevanten Positionen weiter einzugrenzen. Es bleibt abzuwarten, ob Austausch oder Modifikation anderer biotechnologisch interessanter Desaturasen entsprechende Änderungen in der Regiospezifität bewirken, und ob sich die entstehenden Chimärenenzyme für biotechnologische Anwendungen eignen.

### **4.3 Fragen, Lösungen und neue Fragen**

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Faktoren untersucht, die zur Optimierung der VLCPUFA-Synthese in Kulturpflanzen berücksichtigt werden müssen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß die systematische Untersuchung des pflanzlichen Fettsäure- und Lipidstoffwechsels zu einem zunehmenden Wissen führen kann, das die schrittweise Eliminierung der bekannten Hindernisse und Engpässe bei der Produktion wertvoller Inhaltsstoffe in Pflanzen erlaubt. Die Komplexität des pflanzlichen Stoffwechsels präsentiert dabei immer neue Hindernisse, z.B. in Form einer nur schwach aktiven  $\Delta 5$ -Desaturase, deren Umgehung Ziel künftiger Experimente sein wird.

Neben den biologisch-wissenschaftlichen Aspekten zur Lösung praktischer Probleme der Erzeugung nützlicher Produkte in transgenen Pflanzen stellt sich die mindestens ebenso relevante Frage der gesellschaftlichen Akzeptanz genetisch veränderter Nutzpflanzen und biotechnologisch erzeugter Produkte. Wegen der leider immer noch unzureichenden Öffentlichkeitsarbeit sowohl biotechnologisch aktiver Firmen als auch von Medien und Umweltorganisationen, die aus unterschiedlichen Motiven alle für den Verbraucher nur schwer bewertbare Inhalte vermitteln, wird die grüne Biotechnologie -viel mehr als die Pflanzenzüchtung- von verschiedenen Seiten als Risikofaktor angesehen. Es bleibt zu hoffen, daß ein verantwortungsvoller Umgang mit der verfügbaren Technologie und die Verbreitung

verständlicher Information in Schulen und öffentlichen Medien in zunehmender Weise praktiziert werden, um in Zukunft Akzeptanz und einen wirklich nutzbringenden Umgang mit den Möglichkeiten der modernen Biotechnologie zu gewährleisten.

## 5. Zusammenfassung

Die Erzeugung ernährungsrelevanter VLCPUFAs in transgenen Ölsaaten stellt eine bedeutende Herausforderung für die pflanzliche Biotechnologie dar. Die VLCPUFA-Akkumulation in Pflanzen wurde in bisherigen Ansätzen durch die Umesterung von VLCPUFA-Vorstufen zwischen an CoA gebundenen und lipidgebundenen Formen beschränkt. Dieser ineffiziente Transportprozess hatte in früheren Arbeiten zur Akkumulation von  $\Delta 6$ -desaturierten Fettsäuren geführt, die für weitere Syntheseschritte dann nicht mehr zur Verfügung standen. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Engpass der VLCPUFA-Biosynthese zu umgehen und einen ausschließlich von CoA abhängigen VLCPUFA-Biosyntheseweg zu testen.

Neue Gene für CoA-spezifische  $\Delta 6$ - und  $\Delta 5$ -Desaturasen wurden aus den Mikroalgen *Mantoniella squamata* und *Ostreococcus tauri* isoliert und die rekombinanten Enzyme durch heterologe Expression in Hefe charakterisiert. Eine neue  $\Delta 6$ -Desaturase aus *M. squamata* zeigte ausgeprägte Spezifität für die Umsetzung von  $\omega 3$ -Substraten, was beim einleitenden Schritt der Reaktionsfolge die VLCPUFA-Synthese in Richtung von  $\omega 3$ - anstatt weniger erwünschter  $\omega 6$ -Produkte lenken kann. Die weiteren neuen  $\Delta 5$ -Desaturasen aus *M. squamata* und *O. tauri* zeigten nur geringe Aktivität. Die neuen Acyl-CoA-abhängigen  $\Delta 6$ - und  $\Delta 5$ -Desaturasen wurden in Kombination mit der bekannten Elongase PSE1 aus *Physcomitrella patens* eingesetzt, um einen ausschließlich im CoA-Pool agierenden Biosyntheseweg für EPA in *Arabidopsis*-Samen zu etablieren. Die systematische Analyse der transgenen Samen auf den Gehalt an EPA und relevanten Zwischenprodukten zeigte, daß der limitierende Umesterungsschritt durch die von CoA abhängige Biosynthese erfolgreich umgangen werden konnte. Eine wichtige Beobachtung war, daß von Acyl-CoA abhängig synthetisierte VLCPUFAs effizienter in Speicherlipide eingebaut wurden als solche, die in Kontrollpflanzen über einen alternativen, lipidabhängigen Biosyntheseweg produziert wurden.

Eine weitere Möglichkeit, die VLCPUFA-Biosynthese in Pflanzen zu optimieren, stellt der Einsatz bifunktionaler Enzyme dar. Anhand des Vergleiches einer bifunktionalen  $\Delta 12/\omega 3$ -Desaturase mit einer verwandten, strikt monofunktionalen  $\Delta 12$ -Desaturase wurden die Sequenzdeterminanten untersucht, die für Bifunktionalität von Desaturasen verantwortlich sind. Durch systematischen Domänen austausch zwischen den beiden Enzymen wurde ein kurzer Sequenzabschnitt identifiziert, der hinreichende Determinanten für Bifunktionalität enthält und als membranperipherer Bereich nahe dem katalytischen Zentrum der Desaturase liegt.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abbadi A, Domergue F, Bauer J, Napier JA, Welti R, Zähringer U, Cirpus P, Heinz E** (2004) Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds: Constraints on their accumulation. *Plant Cell* 16: 2734-2748
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402
- Bäumlein H, Boerjan W, Nagy I, Bassuner R, Van Montagu M, Inze D, Wobus U** (1991) A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Mol Gen Genet* 225: 459-467.
- Beaudoin F, Michaelson LV, Hey SJ, Lewis MJ, Shewry PR, Sayanova O, Napier JA** (2000) Heterologous reconstitution in yeast of the polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway. *Proc Nat Acad Sci USA* 97: 6421-6426
- Beaudoin F, Napier JA** (2004) Biosynthesis and compartmentalisation of triacylglycerol in higher plants. *Top Curr Gen* 6: 267-287
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L** (2003) Lipide und Zellmembranen. *In* Freeman NY and Company, Biochemie, 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Deutschland, pp 349-403
- Blanchet C, Lucas M, Julien P, Morin R, Gingras S, Dewailly E** (2005) Fatty acid composition of wild and farmed atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids* 40: 529-531
- Brenna JT** (2002) Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5: 127-132
- Broun P, Shanklin J, Whittle E, Somerville C** (1998) Catalytic plasticity of fatty acid modification enzymes underlying chemical diversity of plant lipids. *Science* 282: 1315-1317
- Browse J, Somerville C** (1991) Glycerolipid synthesis - Biochemistry and regulation. *Annu Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol* 42: 467-506
- Buist PH** (2004) Catalytic diversity of fatty acid desaturases. *Tetrahedron: Asymmetry* 15: 2779-2785
- Butte W, Eilers J, Kirsch M** (1982) Triakylsulfonium- and triakylselenoniuimhydroxides for the pyrolytic alkylation of acidic compounds. *Anal Lett* 15: 841-850

- Cahoon EB, Carlson TJ, Ripp KG, Schweiger BJ, Cook GA, Hall SE, Kinney AJ** (1999) Biosynthetic origin of conjugated double bonds: Production of fatty acid components of high-value drying oils in transgenic soybean embryos. *Proc Nat Acad Sci USA* 96: 12935-12940
- Cahoon EB, Lindqvist Y, Schneider G, Shanklin J** (1997) Redesign of soluble fatty acid desaturases from plants for altered substrate specificity and double bond position. *Proc Nat Acad Sci USA* 94: 4872-4877
- Cahoon EB, Ripp KG, Hall SE, Kinney AJ** (2001) Formation of conjugated  $\Delta^8$ ,  $\Delta^{10}$  double bonds by  $\Delta^{12}$ -oleic acid desaturase related enzymes. Biosynthetic origin of calendic acid. *J Biol Chem* 276: 2083-2087
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-743
- Corpet F** (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16: 10881-10890
- Dahlqvist A, Stahl U, Lenman M, Banas A, Lee M, Sandager L, Ronne H, Stymne S** (2000) Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: An enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6487-6492
- Dailey HA, Strittmatter P** (1979) Modification and identification of cytochrome b5 carboxyl groups involved in protein-protein interaction with cytochrome b5-reductase. *J Biol Chem* 254: 5388-5396
- Damude HG, Zhang H, Farrall L, Ripp KG, Tomb J-F, Hollerbach D, Yadav NS** (2006) Identification of bifunctional  $\Delta^{12}/\omega^3$  fatty acid desaturases for improving the ratio of  $\omega^3$  to  $\omega^6$ -fatty acids in microbes and plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9446-9451
- D'Andrea S, Guillou H, Jan S, Catheline D, Thibault JN, Bouriel M, Rioux V, Legrand P** (2002) The same rat  $\Delta^6$ -desaturase not only acts on 18- but also on 24-carbon fatty acids in very-long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *Biochem J* 364: 49-55
- de Antueno RJ, Knickle LC, Smith H, Elliot ML, Allen SJ, Nwaka S, Winther MD** (2001) Activity of human  $\Delta^5$  and  $\Delta^6$  desaturases on multiple n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *FEBS Letters* 509: 77-80
- Derelle E, Ferraz C, Rombauts S, Rouze P, Worden AZ, Robbens S, Partensky F, Degroeve S, Echeynie S, Cooke R, Saeys Y, Wuyts J, Jabbari K, Bowler C, Panaud O, Piegu B, Ball SG, Ral J-P, Bouget F-Y, Piganeau G, De Baets B,**

- Picard A, Delseny M, Demaille J, Van de Peer Y, Moreau H** (2006) Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 11647-11652
- Diaz AR, Mansilla MC, Vila AJ, de Mendoza D** (2002a) Membrane topology of the acyl-lipid desaturase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 277: 48099-48106
- Domergue F, Abbadi A, Ott C, Zank TK, Zahringer U, Heinz E** (2003) Acyl carriers used as substrates by the desaturases and elongases involved in very long-chain polyunsaturated fatty acids biosynthesis reconstituted in yeast. *J Biol Chem* 278: 35115-35126
- Domergue F, Abbadi A, Zähringer U, Moreau H, Heinz E** (2005) *In vivo*-characterisation of the first acyl-CoA  $\Delta^6$ -desaturase from the plant kingdom. *Biochem J* 389: 483-490
- Domergue F, Lerchl J, Zahringer U, Heinz E** (2002) Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricornutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis. *Eur J Biochem* 269: 4105-4113
- Donahue TF, Cigan AM** (1990) Sequence and structural requirements for efficient translation in yeast. *Methods Enzymol* 185: 366-372
- Dyer JM, Chapital DC, Kuan JC, Mullen RT, Turner C, McKeon TA, Pepperman AB** (2002) Molecular analysis of a bifunctional fatty acid conjugase/desaturase from tung. Implications for the evolution of plant fatty acid diversity. *Plant Physiol* 130: 2027-2038
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G** (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300: 1005-1016
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G** (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* 8: 978-984
- Faergeman NJ, Black PN, Zhao XD, Knudsen J, DiRusso CC** (2001) The Acyl-CoA synthetases encoded within FAA1 and FAA4 in *Saccharomyces cerevisiae* function as components of the fatty acid transport system linking import, activation, and intracellular Utilization. *J Biol Chem* 276: 37051-37059
- Falcone DL, Ogas JP, Somerville CR** (2004) Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biol* 4: 17

- Ferdinandusse S, Denis S, Mooijer PA, Zhang Z, Reddy JK, Spector AA, Wanders RJ** (2001) Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid. *J Lipid Res* 42: 1987-1995
- Fox BG, Lyle KS, Rogge CE** (2004) Reactions of the diiron enzyme stearoyl-acyl carrier protein desaturase. *Acc Chem Res* 37: 421-429
- Frentzen M** (1993) Acyltransferases and triacylglycerols. In Moore TS, Jr, ed, *Lipid Metabolism in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 195-230
- Frentzen M, Griebau R** (1994) Biosynthesis of cardiolipin in plant mitochondria. *Plant Physiol* 106: 1527-1532
- Galle-Le Bastard AM, Demandre C, Oursel A, Joseph M, Mazliak P, Kader JC** (2000) Phosphatidylcholine molecular species involved in  $\gamma$ -linolenic acid biosynthesis in microsomes from borage seeds. *Physiol Plant* 108: 118-124
- Gerster H** (1998) Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *Int J Vitam Nutr Res* 68: 159-173
- Ghanevati M, Jaworski JG** (2002) Engineering and mechanistic studies of the *Arabidopsis* FAE1 beta-ketoacyl-CoA synthase, FAE1 KCS. *Eur J Biochem* 269: 3531-3539
- Girke T, Schmidt H, Zähringer U, Reski R, Heinz E** (1998) Identification of a novel  $\Delta 6$ -acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. *Plant J* 15: 39-48
- Glomset JA** (2006) Role of docosahexaenoic acid in neuronal plasma membranes. *Sci STKE* 2006: pe6
- Goyens PL, Spilker ME, Zock PL, Katan MB, Mensink RP** (2006) Conversion of alpha-linolenic acid in humans is influenced by the absolute amounts of alpha-linolenic acid and linoleic acid in the diet and not by their ratio. *Am J Clin Nutr* 84: 44-53
- Graham IA, Larson T, Napier JA** (2007) Rational metabolic engineering of transgenic plants for biosynthesis of omega-3 polyunsaturates. *Curr Opin in Biotechnol* 18: 142-147
- Guillou H, D'Andrea S, Rioux V, Jan S, Legrand P** (2004) The surprising diversity of  $\Delta 6$ -desaturase substrates. *Biochem Soc Trans* 32: 86-87
- Hackett CS, Strittmatter P** (1984) Covalent cross-linking of the active sites of vesicle-bound cytochrome b5 and NADH-cytochrome b5-reductase. *J Biol Chem* 259: 3275-3282

- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580
- Hartmann T, Kuchenbecker J, Grimm MO** (2007) Alzheimer's disease: the lipid connection. *J Neurochem* 103(Suppl 1): 159-170
- Hastings N, Agaba M, Tocher DR, Leaver MJ, Dick JR, Sargent JR, Teale AJ** (2001) A vertebrate fatty acid desaturase with Delta 5 and Delta 6 activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14304-14309
- Heilmann I, Mekhedov S, King B, Browse J, Shanklin J** (2004b) Identification of the *Arabidopsis* palmitoyl-monogalactosyldiacylglycerol delta7-desaturase gene FAD5, and effects of plastidial retargeting of *Arabidopsis* desaturases on the fad5 mutant phenotype. *Plant Physiol* 136: 4237-4245
- Heilmann I, Pidkowich MS, Girke T, Shanklin J** (2004a) Switching desaturase enzyme specificity by alternate subcellular targeting. *Proc Nat Acad Sci USA* 101: 10266-10271
- Heinz E** (1993) Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *In* Moore TS, Jr, ed, *Lipid Metabolism in Plants*. CRC Press, London, pp 33-89
- Heinz E, Roughan PG** (1983) Similarities and differences in lipid metabolism of chloroplasts isolated from 18:3 and 16:3 plants. *Plant Physiol* 72: 273-279
- Hills MJ, Watson MD, Murphy DJ** (1993) Targeting of oleosins to the oil bodies of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Planta* 189: 24-29
- Hites RA, Foran JA, Schwager SJ, Knuth BA, Hamilton MC, Carpenter DO** (2004) Global assessment of polybrominated diphenyl ethers in farmed and wild salmon. *Environ Sci Technol* 38: 4945-4949
- Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A** (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res* 2: 208-218
- Hopwood DA, Sherman DH** (1990) Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Genet* 24: 37-66
- Hornung E, Korfei M, Pernstich C, Struss A, Kindl H, Fulda M, Feussner I** (2005) Specific formation of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by a front-end  $\Delta^5$ -desaturase from *Phytophthora megasperma*. *Biochim Biophys Acta* 1686: 181-189
- Hornung E, Pernstich C, Feussner I** (2002) Formation of conjugated  $\Delta^{11}\Delta^{13}$ -double bonds by  $\Delta^{12}$ -linoleic acid (1,4)-acyl-lipid-desaturase in pomegranate seeds. *Eur J Biochem* 269: 4852-4859

- Horton P, Park KJ, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, Nakai K** (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* 35: 585-587
- Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR** (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77: 61-68
- Inoue H, Nojima H, Okayama H** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A** (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153: 163-168
- Itoh R, Toda K, Takahashi H, Takano H, Kuroiwa T** (1998) Delta-9 fatty acid desaturase gene containing a carboxyl-terminal cytochrome b5 domain from the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Curr Genet* 33: 165-170
- Iwabuchi M, Kohno-Murase J, Imamura J** (2003) Delta-12-oleate desaturase-related enzymes associated with formation of conjugated trans-delta 11, cis-delta 13 double bonds. *J Biol Chem* 278: 4603-4610
- Jackson JB, Kirby MX, Berger WH, Bjorndal KA, Botsford LW, Bourque BJ, Bradbury RH, Cooke R, Erlandson J, Estes JA, Hughes TP, Kidwell S, Lange CB, Lenihan HS, Pandolfi JM, Peterson CH, Steneck RS, Tegner MJ, Warner RR** (2001) Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science* 293: 629-637
- Joyard J, Marechal E, Malherbe A, Block MA, Douce R** (1994) Importance of diacylglycerol in glycerolipid biosynthesis by spinach chloroplast envelope membranes. *Prog Lipid Res* 33: 105-118
- Jump DB** (2002) The biochemistry of *n*-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 277: 8755-8758
- Kaewsuwan S, Cahoon EB, Perroud P-F, Wiwat C, Panvisavas N, Quatrano RS, Cove DJ, Bunyapraphatsara N** (2006) Identification and functional Characterization of the moss *Physcomitrella patens*  $\Delta^5$ -desaturase gene involved in arachidonic and eicosapentaenoic acid biosynthesis. *J Biol Chem* 281: 21988-21997
- Kajikawa M, Yamato KT, Kohzu Y, Nojiri M, Sakuradani E, Shimizu S, Sakai Y, Fukuzawa H, Ohyama K** (2004) Isolation and characterization of  $\Delta^6$ -desaturase, an ELO-like enzyme and  $\Delta^5$ -desaturase from the liverwort *Marchantia Polymorpha* and production of arachidonic and eicosapentaenoic acids in the methylotrophic yeast *Pichia Pastoris*. *Plant Mol Biol* 54: 335-352

- Kato C, Nogi Y** (2001) Correlation between phylogenetic structure and function: examples from deep-sea *Shewanella*. *FEMS Microbiol Ecol* 35: 223-230
- Katz L, Donadio S** (1993) Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Annu Rev Microbiol* 47: 875-912
- Kelly AA, Dörmann P** (2002) *DGD2*, an *Arabidopsis* gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions. *J Biol Chem* 277: 1166-1173
- Kidd PM** (2004) Bipolar disorder and cell membrane dysfunction. Progress toward integrative management. *Altern Med Rev* 9: 107-135
- Kinney AJ** (2004) Production of very long chain polyunsaturated fatty acids in oilseeds. *In* Patent *WO 2004/071467 A2*,
- Kinney AJ** (2006) Metabolic engineering in plants for human health and nutrition. *Curr Opin Biotechnol* 17: 130-138
- Kinney AJ, Cahoon EB, Hitz WD** (2002) Manipulating desaturase activities in transgenic crop plants. *Biochem Soc Trans* 30: 1099-1103
- Koo AJ, Ohlogge JB, Pollard M** (2004) On the export of Fatty acids from the chloroplast. *J Biol Chem* 279: 16101-16110
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL** (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305: 567-580
- Lands WE** (1960) Metabolism of glycerolipids. 2. The enzymatic acylation of lysolecithin. *J Biol Chem* 235: 2233-2237
- Lang I** (2007) New fatty acids, oxilipins and volatiles in microlagae. Dissertation. Georg-August-University, Göttingen
- Larson TR, Graham IA** (2001) Technical Advance: a novel technique for the sensitive quantification of acyl CoA esters from plant tissues. *Plant J* 25: 115-125.
- Leonard AE, Kelder B, Bobik EG, Chuang LT, Lewis CJ, Kopchick JJ, Mukerji P, Huang YS** (2002) Identification and expression of mammalian long-chain PUFA elongation enzymes. *Lipids* 37: 733-740
- Libisch B, Michaelson LV, Lewis MJ, Shewry PR, Napier JA** (2000) Chimeras of  $\Delta^6$ -fatty acid and  $\Delta^8$ -sphingolipid desaturases. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 779-785
- Lindqvist Y, Huang WJ, Schneider G, Shanklin J** (1996) Crystal structure of  $\Delta(9)$  stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. *EMBO J* 15: 4081-4092

- Litman BJ, Niu SL, Polozova A, Mitchell DC** (2001) The role of docosahexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways: visual transduction. *J Mol Neurosci* 16: 237-242
- MacDonald MH, Mogen BD, Hunt AG** (1991) Characterization of the polyadenylation signal from the T-DNA-encoded octopine synthase gene. *Nucleic Acids Res* 19: 5575-5581
- Man WC, Miyazaki M, Chu K, Ntambi JM** (2006) Membrane topology of mouse stearoyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem* 281: 1251-1260
- Mansour MP** (2005) Reversed-phase high-performance liquid chromatography purification of methyl esters of C16-C28 polyunsaturated fatty acids in microalgae, including octacosaoctanoic acid [28:8(n-3)]. *J Chromatogr A* 1097: 54-58
- Manton I, Parke M** (1960) Further observations on small green flagellates with special reference to possible relatives of *Chromulina pusilla*. *Butcher. J Mar Biol Assoc UK* 39: 275-278
- Marechal E, Block MA, Dorne AJ, Douce R, Joyard J** (1997) Lipid synthesis and metabolism in the plastid envelope. *Physiol Plant* 100: 65-77
- Meesapyodsuk D, Reed DW, Savile CK, Buist PH, Ambrose SJ, Covello PS** (2000) Characterization of the regiochemistry and cryptoregiochemistry of a caenorhabditis elegans fatty acid desaturase (*FAT-1*) expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 39: 11948-11954
- Metz JG, Roessler P, Facciotti D, Levering C, Dittrich F, Lassner M, Valentine R, Lardizabal K, Domergue F, Yamada A, Yazawa K, Knauf V, Browse J** (2001) Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science* 293: 290-293
- Meyer A, Cirpus P, Ott C, Schlecker R, Zahringer U, Heinz E** (2003) Biosynthesis of docosahexaenoic acid in *Euglena gracilis*: biochemical and molecular evidence for the involvement of a  $\Delta^4$ -fatty acyl group desaturase. *Biochemistry* 42: 9779-9788
- Meyer A, Kirsch H, Domergue F, Abbadi A, Sperling P, Bauer J, Cirpus P, Zank TK, Moreau H, Roscoe TJ, Zahringer U, Heinz E** (2004) Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. *J Lipid Res* 45: 1899-1909
- Michaelson LV, Lazarus CM, Griffiths G, Napier JA, Stobart AK** (1998a) Isolation of a  $\Delta^5$ -fatty acid desaturase gene from *Mortierella alpina*. *J Biol Chem* 273: 19055-19059

- Michaelson LV, Napier JA, Lewis M, Griffiths G, Lazarus CM, Stobart AK (1998b)**  
Functional identification of a fatty acid  $\Delta 5$  desaturase gene from *Caenorhabditis elegans*. FEBS Lett 439: 215-218
- Millar AA, Smith MA, Kunst I (2000)** All fatty acids are not equal: discrimination in plant membrane lipids. Trends Plant Sci 5: 95-101
- Miquel M, Browse J (1992)** *Arabidopsis* mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis. J Biol Chem 267: 1502-1509
- Mitchell AG, Martin CE (1997)** Fah1p, a *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *b5* fusion protein, and its *Arabidopsis thaliana* homolog that lacks the cytochrome *b5* domain both function in the  $\alpha$ -hydroxylation of sphingolipid-associated very long chain fatty acids. J Biol Chem 272: 28281-28288
- Mongrand S, Cassagne C, Bessoule JJ (2000)** Import of Lyso-Phosphatidylcholine into Chloroplasts Likely at the Origin of Eukaryotic Plastidial Lipids. Plant Physiol 122: 845-852
- Mullis KB, Faloona FA (1987)** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155: 335-350
- Murphy DJ, Vance J (1999)** Mechanisms of lipid body formation. Trends Biochem Sci 24: 109-115
- Myers RA, Worm B (2003)** Rapid worldwide depletion of predatory fish communities. Nature 423: 280-283
- Nadolski MJ, Linder ME (2007)** Protein lipidation. FEBS J 274: 5202-5210
- Nakai K, Horton P (1999)** PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. Trends Biochem Sci 24: 34-36
- Napier JA (2007)** The Production of Unusual Fatty Acids in Transgenic Plants. Annu Rev Plant Biol 58: 295-319
- Napier JA, Sayanova O, Sperling P, Heinz E (1999)** A growing family of cytochrome *b5*-domain fusion proteins. Trends Plant Sci 4: 2-4
- Napier JA, Sayanova O, Stobart AK, Shewry PR (1997)** A new class of cytochrome *b5* fusion proteins. Biochem J 328(Pt 2): 717-718
- Nichols DS, Nichols PD, Russell NJ, Davies NW, McMeekin TA (1997)** Polyunsaturated fatty acids in the psychrophilic bacterium *Shewanella gelidimarina* ACAM 456T: molecular species analysis of major phospholipids and biosynthesis of eicosapentaenoic acid. Biochim Biophys Acta 1347: 164-176
- Ohlrogge JB, Browse J (1995)** Lipid Biosynthesis. Plant Cell 7: 957-970

- Ohlrogge JB, Browse J, Somerville CR** (1991) The Genetics of Plant Lipids. *Biochim Biophys Acta* 1082: 1-26
- Ohlrogge JB, Kuhn DN, Stumpf PK** (1979) Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1194-1198
- Okayasu T, Nagao M, Ishibashi T, Imai Y** (1981) Purification and partial characterization of linoleoyl-CoA desaturase from rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 206: 21-28
- Pauly D, Christensen VV, Dalsgaard J, Froese R, Torres F, Jr.** (1998) Fishing down marine food webs. *Science* 279: 860-863
- Pawlosky RJ, Hibbeln JR, Novotny JA, Salem N, Jr.** (2001) Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. *J Lipid Res* 42: 1257-1265
- Peet M** (2006) The metabolic syndrome, omega-3 fatty acids and inflammatory processes in relation to schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75: 323-327
- Pereira S, Leonard A, Huang Y, Chuang L, Mukerji P** (2004b) Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the omega 3-fatty acid, Eicosapentaenoic acid (EPA), to Docosahexaenoic acid (DHA). *Biochem J* 384: 357-366
- Pereira SL, Huang YS, Bobik EG, Kinney AJ, Stecca KL, Packer JC, Mukerji P** (2004a) A novel omega3-fatty acid desaturase involved in the biosynthesis of eicosapentaenoic acid. *Biochem J* 378: 665-671
- Post-Beittenmiller D** (1996) Biochemistry and Molecular Biology of Wax Production in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 405-430
- Prasad MR, Sreekrishna K, Joshi VC** (1980) Topology of the delta 9 terminal desaturase in chicken liver microsomes and artificial micelles. Inhibition of the enzyme activity by the antibody and susceptibility of the enzyme to proteolysis. *J Biol Chem* 255: 2583-2589
- Qi B, Beaudoin F, Fraser T, Stobart AK, Napier JA, Lazarus CM** (2002) Identification of a cDNA encoding a novel C18- $\Delta^9$  polyunsaturated fatty acid-specific elongating activity from the docosahexaenoic acid (DHA)-producing microalga, *Isochrysis galbana*. *FEBS Lett* 510: 159-165
- Qi B, Fraser T, Mugford S, Dobson G, Sayanova O, Butler J, Napier JA, Stobart AK, Lazarus CM** (2004) Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. *Nat Biotechnol* 22: 739-745

- Raleigh FA, Lech K, Brent R** (1989) Current protocols in molecular biology. *In* Ausubel FM, ed, Current protocols in molecular biology. Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, USA, pp 1.4.1-1.4.14.
- Reddy AS, Thomas TL** (1996) Expression of a cyanobacterial delta 6-desaturase gene results in gamma- linolenic acid production in transgenic plants. *Nat Biotechnol* 14: 639-642
- Rice P, Longden I, Bleasby A** (2000) EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 16: 276-277
- Rost B, Yachdav G, Liu J** (2004) The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res* 32: 321-326
- Roughan PG, Holland R, Slack CR** (1980) The role of chloroplasts and microsomal fractions in polar-lipid synthesis from [1-14C]acetate by cell-free preparations from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Biochem J* 188: 17-24
- Roughan PG, Slack CR** (1982) Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol* 33: 97-132
- Russell NJ, Nichols DS** (1999) Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria -a dogma rewritten. *Microbiology* 145(Pt 4): 767-779
- Sakuradani E, Kobayashi M, Shimizu S** (1999)  $\Delta$ 6-fatty acid desaturase from an arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus - Gene cloning and its heterologous expression in a fungus, *Aspergillus*. *Gene* 238: 445-453
- Salem N, Jr., Litman B, Kim HY, Gawrisch K** (2001) Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* 36: 945-959
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- SanGiovanni JP, Chew EY** (2005) The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog Retin Eye Res* 24: 87-138
- Sayanova O, Beaudoin F, Libisch B, Castel A, Shewry PR, Napier JA** (2001) Mutagenesis and heterologous expression in yeast of a plant  $\Delta^6$ - fatty acid desaturase. *J Exp Bot* 52: 1581-1585.
- Sayanova O, Haslam R, Guschina I, Lloyd D, Christie WW, Harwood JL, Napier JA** (2006a) A bifunctional  $\Delta$ 12, $\Delta$ 15-desaturase from *Acanthamoeba castellanii* directs the synthesis of highly unusual n-1 series unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 281: 36533-36541
- Sayanova O, Haslam R, Qi B, Lazarus CM, Napier JA** (2006b) The alternative pathway C20 Delta8-desaturase from the non-photosynthetic organism *Acanthamoeba castellanii* is an atypical cytochrome b5-fusion desaturase. *FEBS Lett* 580: 1946-1952

- Sayanova O, Haslam R, Venegas-Caleron M, Napier JA** (2006c) Identification of *Primula* "front-end" desaturases with distinct *n*-6 or *n*-3 substrate preferences. *Planta* 224: 1269-1277
- Sayanova O, Smith MA, Lapinskas P, Stobart AK, Dobson G, Christie WW, Shewry PR, Napier JA** (1997) Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of  $\Delta$ 6-desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4211-4216
- Sayanova OV, Beaudoin F, Michaelson LV, Shewry PR, Napier JA** (2003) Identification of *Primula* fatty acid  $\Delta$ 6-desaturases with *n*-3 substrate preferences. *FEBS Lett* 542: 100-104
- Sayanova OV, Napier JA** (2004) Eicosapentaenoic acid: biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants. *Phytochemistry* 65: 147-158
- Schlame M, Rua D, Greenberg ML** (2000) The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res* 39: 257-288
- Schmidt H, Heinz E** (1990) Desaturation of oleoyl groups in envelope membranes from spinach chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9477-9480
- Schwarzenbach AM** (1971) Observations on spherosomal membranes. *Cytobiologie* 4: 415-417
- Shah J** (2005) Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* 43: 229-260
- Shanklin J** (2000) Exploring the possibilities presented by protein engineering. *Curr Opin Plant Biol* 3: 243-248
- Shanklin J, Cahoon EB** (1998) Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 611-641
- Shanklin J, Cahoon EB, Whittle EJ, Lindqvist Y, Schneider G, Schmidt H** (1997) Structure-function studies on desaturases and related hydrocarbon hydroxylases. In JP Williams, et al., eds, *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 6-10
- Shanklin J, Mullins C, Somerville C** (1991) Sequence of a complementary DNA from *Cucumis sativus* L. encoding the stearoyl-acyl-carrier protein desaturase. *Plant Physiol* 97: 467-468
- Shanklin J, Whittle E, Fox BG** (1994) Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* 33: 12787-12794

- Shepherd T, Griffiths DW** (2006) The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytol* 171: 469-499
- Shine WE, Mancha M, Stumpf PK** (1976) Fat metabolism in higher plants. Differential incorporation of acyl-coenzymes A and acyl-acyl carrier proteins into plant microsomal lipids. *Arch Biochem Biophys* 173: 472-479
- Shockey JM, Fulda MS, Browse J** (2003) Arabidopsis contains a large superfamily of acyl-activating enzymes. Phylogenetic and biochemical analysis reveals a new class of acyl-coenzyme a synthetases. *Plant Physiol* 132: 1065-1076
- Shockey JM, Gidda SK, Chapital DC, Kuan J-C, Dhanoa PK, Bland JM, Rothstein SJ, Mullen RT, Dyer JM** (2006) Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* 18: 2294-2313
- Simopoulos AP** (2002) Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* 21: 495-505
- Simopoulos AP** (2006) Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother* 60: 502-507
- Somerville C, Browse J** (1991) Plant lipids - metabolism, mutants, and membranes. *Science* 252: 80-87
- Somerville C, Browse J** (1996) Dissecting desaturation: plants prove advantageous. *Trends Cell Biol* 6: 148-153
- Somerville C, Browse J, Jaworski JG, Ohlrogge J** (2000) Lipids. *In* Buchanan BB et al., eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, pp 456-527
- Sparace SA, Mudd JB** (1982) Phosphatidylglycerol synthesis in spinach chloroplasts: Characterization of the newly synthesized molecule. *Plant Physiol* 70: 1260-1264
- Spatz L, Strittmatter P** (1971) A form of cytochrome b<sub>5</sub> that contains an additional hydrophobic sequence of 40 amino acid residues. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 1042-1046
- Sperling P, Heinz E** (2001) Desaturases fused to their electron donor. *Eur J Lipid Sci Technol* 103: 158-180
- Sperling P, Lee M, Girke T, Zähringer U, Stymne S, Heinz E** (2000) A bifunctional  $\Delta^6$ -fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss *Ceratodon purpureus*. A new member of the cytochrome b<sub>5</sub> superfamily. *Eur J Biochem* 267: 3801-3811.

- Sperling P, Schmidt H, Heinz E** (1995) A cytochrome-b<sub>5</sub>-containing fusion protein similar to plant acyl lipid desaturases. *Eur J Biochem* 232: 798-805
- Sperling P, Ternes P, Zank TK, Heinz E** (2003) The evolution of desaturases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68: 73-95
- Sperling P, Zähringer U, Heinz E** (1998) A sphingolipid desaturase from higher plants - Identification of a new cytochrome b<sub>5</sub> fusion protein. *J Biol Chem* 273: 28590-28596
- Sprecher H** (2000) Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1486: 219-231
- Sprecher H, Luthria DL, Mohammed BS, Baykousheva SP** (1995) Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 36: 2471-2477
- Stahl U, Carlsson AS, Lenman M, Dahlqvist A, Huang B, Banas W, Banas A, Stymne S** (2004) Cloning and functional characterization of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135: 1324-1335
- Stobart AK, Stymne S, Höglund S** (1986) Safflower microsomes catalyze oil accumulation in vitro: a model system. *Planta* 169: 33-37
- Stukey JE, McDonough VM, Martin CE** (1990) The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the  $\Delta^9$  fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene. *J Biol Chem* 265: 20144-20149
- Stymne S, Stobart AK** (1984) Evidence for the reversibility of the acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cotyledons and rat liver. *Biochem J* 223: 305-314
- Thelen JJ, Ohlrogge JB** (2002) Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. *Metab Eng* 4: 12-21
- Thompson GA, Scherer DE, Foxall-Van Aken S, Kenny JW, Young HL, Shintani DK, Kridl JC, Knauf VC** (1991) Primary structures of the precursor and mature forms of stearoyl-acyl carrier protein desaturase from safflower embryos and requirement of ferredoxin for enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2578-2582
- Tocher DR, Leaver MJ, Hodgson PA** (1998) Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases. *Prog Lipid Res* 37: 73-117
- Upchurch RG** (2008) Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol Lett Epub* ahead of print

- Voelker T, Kinney AJ** (2001) Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 335-361
- Wada H, Avelange-Macherel MH, Murata N** (1993) The *desA* gene of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 is the structural gene for delta 12 desaturase. *J Bacteriol* 175: 6056-6058
- Wada H, Murata N** (1998) Membrane lipids in cyanobacteria. In Siegenthaler N, ed, *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 65-81
- Wagner S, Paltauf F** (1994) Generation of glycerophospholipid molecular species in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Fatty acid pattern of phospholipid classes and selective acyl turnover at sn-1 and sn-2 positions. *Yeast* 10: 1429-1437
- Wallis JG, Browse J** (1999) The  $\Delta^8$ -desaturase of *Euglena gracilis*: An alternate pathway for synthesis of 20-carbon polyunsaturated fatty acids. *Arch Biochem Biophys* 365: 307-316
- Wang X** (2004) Lipid signaling. *Curr Opin Plant Biol* 7: 329-336
- Whitney HM, Michaelson LV, Sayanova O, Pickett JA, Napier JA** (2003) Functional characterisation of two cytochrome *b<sub>5</sub>*-fusion desaturases from *Anemone leveillei*: the unexpected identification of a fatty acid  $\Delta^6$ -desaturase. *Planta* 217: 983-992
- Williams JP, Khan MU, Mitchell K, Johnson G** (1988) The effect of temperature on the level and biosynthesis of unsaturated fatty acids in diacylglycerols of *Brassica napus* leaves. *Plant Physiol* 87: 904-910
- Wu G, Truksa M, Datla N, Vrinten P, Bauer J, Zank T, Cirpus P, Heinz E, Qiu X** (2005) Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants. *Nat Biotechnol* 23: 1013-1017
- Zank TK, Zahringer U, Beckmann C, Pohnert G, Boland W, Holtorf H, Reski R, Lerchl J, Heinz E** (2002) Cloning and functional characterisation of an enzyme involved in the elongation of  $\Delta^6$ -polyunsaturated fatty acids from the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J* 31: 255-268
- Zhou XR, Robert SS, Petrie JR, Frampton DM, Mansour MP, Blackburn SI, Nichols PD, Green AG, Singh SP** (2007) Isolation and characterization of genes from the marine microalga *Pavlova salina* encoding three front-end desaturases involved in docosahexaenoic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 68: 785-796

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.	Strukturen der häufigsten Glycerolipide.	4
Abb. 2.	Beispiele für PUFAs und VLCPUFAs.	6
Abb. 3.	Übersichtsschema der Fettsäure- und Lipidsynthese in Pflanzen.	12
Abb. 4.	Schematische Darstellung verschiedener VLCPUFA-Biosynthesewege.	15
Abb. 5.	Elektronentransportkette und vorgeschlagener Reaktionsmechanismus von Desaturasen am ER.	18
Abb. 6.	Topologie-Modell membrangebundener Desaturasen.	21
Abb. 7.	Modell verschiedener Regiospezifitäten von Desaturasen.	22
Abb. 8.	Verschiedene Strategien für die Produktion von VLCPUFAs in Pflanzen.	26
Abb. 9.	Analyse der Fettsäurezusammensetzung von <i>O. tauri</i> und <i>M. squamata</i> .	57
Abb. 10.	Akkumulation von $\omega$ 3-VLCPUFA in Phospholipiden und Neutrallipiden von <i>M. squamata</i> .	58
Abb. 11.	Detektion der Intermediate der VLCPUFA-Biosynthese im Acyl-CoA-Pool von <i>M. squamata</i> -Kulturen.	58
Abb. 12.	Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von MsI, MsII und OtII mit nahe verwandten Proteinsequenzen.	62
Abb. 13.	<i>MsI</i> kodiert für eine $\Delta$ 6-Desaturase.	64
Abb. 14.	<i>MsII</i> kodiert für eine $\Delta$ 5-Desaturase.	65
Abb. 15.	<i>OtII</i> kodiert für eine $\Delta$ 5-Desaturase.	66
Abb. 16.	Enge Substratspezifität von Ms $\Delta$ 6 bei kompetitivem Substratangebot.	68
Abb. 17.	Vergleich der katalytischen Aktivität und Desaturierungseffizienz von Ms $\Delta$ 6 mit bekannten $\Delta$ 6-Desaturasen.	69
Abb. 18.	Katalytische Aktivität und Desaturierungseffizienz von Ms $\Delta$ 5 mit dem $\omega$ 6-Fettsäuresubstrat 20:3 $^{\Delta$ 8,11,14} im Vergleich zu Pt $\Delta$ 5.	70
Abb. 19.	Katalytische Aktivität und Desaturierungseffizienz von Ms $\Delta$ 5 mit dem $\omega$ 3-Fettsäuresubstrat 20:4 $^{\Delta$ 8,11,14,17} im Vergleich zu Pt $\Delta$ 5.	71
Abb. 20.	Verteilung der $\Delta$ 6-Desaturierungsprodukte auf verschiedene Phospholipide und die Neutrallipidfraktion.	73
Abb. 21.	Verteilung der $\Delta$ 5-Desaturierungsprodukte auf verschiedene Phospholipide und die Neutrallipidfraktion.	74
Abb. 22.	Nachweis des Ms $\Delta$ 6-Desaturierungsproduktes im Acyl-CoA-Pool vor der Inkorporation in Lipide.	76
Abb. 23.	Nachweis des Ms $\Delta$ 5-Desaturierungsproduktes im Acyl-CoA-Pool vor der Inkorporation in Lipide.	77
Abb. 24.	Effiziente Elongation des Ms $\Delta$ 6 Produkts 18:4 $^{\Delta$ 6,9,12,15} durch PSE1.	80

Abb. 25.	Zeitverlauf der Fettsäureakkumulation in Gesamtfettsäuren und Acyl-CoA-Pool bei Coexpression von MsΔ6 und PSE1.	81
Abb. 26.	Effiziente Elongation des MsΔ5 Produkts 20:5 <sup>Δ5,8,11,14,17</sup> durch OtELO2.	82
Abb. 27.	Etablierung eines ausschließlich Acyl-CoA-abhängigen EPA-Biosyntheseweges in Hefe.	84
Abb. 28.	Fettsäureprofile von Einzelsamenanalysen der Triple-Ms-, Triple-Ot- und Triple-Pt-Pflanzen.	87
Abb. 29.	ω3-Fettsäuregehalt transgener <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.	89
Abb. 30.	ω6-Fettsäuregehalt transgener <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.	90
Abb. 31.	Akkumulation der CoA-abhängig synthetisierten VLCPUFAs in Glycerolipiden transgener <i>Arabidopsis</i> -Samen.	92
Abb. 32.	Identifikation einer mono- und einer bifunktionalen Desaturase aus <i>A. nidulans</i> .	94
Abb. 33.	Hydrophathie-Profile von den Aminosäuresequenzen der bifunktionalen und der monofunktionalen Desaturase aus <i>A. nidulans</i> .	97
Abb. 34.	Einteilung der Aminosäuresequenzen von An1 und An2 in auszutauschende Domänen.	99
Abb. 35.	Schema der konstruierten chimären cDNAs von An2 und An1.	99
Abb. 36.	Übertragung der An1-Domänen D und E erzeugt Bifunktionalität in An2.	101

## 8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.	Analyse der Substratspezifität von MsI (MsΔ6) und MsII (MsΔ5) durch heterologe Expression in Hefe.	66
Tab. 2.	Fettsäurezusammensetzung von Hefe nach Coexpression von MsΔ6, PSE1 und MsΔ5 oder von PtΔ6, PSE1 und PtΔ5.	85
Tab. 3.	Analyse der Substratspezifität der bifunktionalen Desaturase An1 durch heterologe Expression in Hefe.	95
Tab. 4.	Veränderte Fettsäurezusammensetzung durch heterologe Expression von An1 in <i>Arabidopsis</i> -Samen.	96
Tab. 5.	Übersicht der Fettsäurezusammensetzung von Hefe nach Expression der Hybridgene.	100

## 9. Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure (Arachidonic acid)
Abb.	Abbildung
ACP	Acyl-Carrier-Protein
ad	bis zu
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad (Celsius)
cDNA	Copy-DNA
CoA	Coenzym A
CTP	Cytidin 5'-Triphosphat
DAG	Diacylglycerin
DAGAT	Acyl-CoA:Diacylglycerin-Acyltransferase
dd	doppelt destilliert
DGDG	Digalaktosyldiacylglycerin
DHA	Docosahexaensäure (Docosahexaenoic acid)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPA	Eicosapentaensäure (Eicosapentaenoic acid)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	Expressed sequence tags
et al.	<i>et alii</i>
FAME	Fettsäuremethylester
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm; Erdbeschleunigung
G3P	Glycerin-3-Phosphat
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie

---

h	Stunde
HPLC	High performance liquid chromatography
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobase(n)
l	Liter
MGDG	Monoglakatosyldiacylglycerin
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
Ms $\Delta$ 5 (MsII)	<i>Mantoniella squamata</i> delta5-Desaturase
Ms $\Delta$ 6 (MsI)	<i>Mantoniella squamata</i> delta6-Desaturase
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikromol
$\mu$ M	Mikromolar
nm	Nanometer
nmol	nanomol
nM	nanomolar
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei x Nanometern
Ot $\Delta$ 5 (OtII)	<i>Ostreococcus tauri</i> delta5-Desaturase
Ot $\Delta$ 6	<i>Ostreococcus tauri</i> delta6-Desaturase
OtELO2	<i>Ostreococcus tauri</i> delta5-Elongase
PtdOH	Phosphatidylsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDAT	Phospholipid:Diacylglycerin-Acyltransferase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PSE1	<i>Physcomitrella patens</i> delta6-Elongase
Pt $\Delta$ 5	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> delta5-Desaturase
Pt $\Delta$ 6	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> delta6-Desaturase
PtdCho/PC	Phosphatidylcholin
PtdEtn	Phosphatidylethanolamin
PtdGly	Phosphatidylglycerin
PtdIno/PI	Phosphatidylinositol
PtdSer/PS	Phosphatidylserin

PUFA	Polyunsaturated fatty acids
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNA	Ribonukleinsäure
rp-HPLC	Reversed-phase HPLC
RT	Reverse Transkriptase
TAG	Triacylglycerin
T <sub>Ann</sub>	Anlagerungs-Temperatur
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Enzym-Einheit (Unit)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
vgl.	vergleiche
VLCPUFA	Very long chain polyunsaturated fatty acids
Vol	Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

## 10. Anhang

### Anhang 1. Oligonukleotidprimer zur Isolierung vollständiger cDNA-Sequenzen aus *M. squamata* durch RACE-PCR.

Primer	Sequenz
<i>MsI</i> -5'-RACE-1	5'-TTGAAGAACGCCACCGCGGGTGTG-3'
<i>MsI</i> -3'-RACE-1	5'-AACCTCGGGCGACATGTGGAACCAGAT-3'
<i>MsI</i> -5'-RACE-2	5'-GTCGAAGATGACGCTGCCGCCCGGATG-3'
<i>MsI</i> -3'-RACE-2	5'-CCCTCCAAGGGTTACGTCAACTGG-3'
<i>MsII</i> -5'-RACE-1	5'-CTCACCCGATGGTTTGAAGGCTGG-3'
<i>MsII</i> -3'-RACE-1	5'-GGCTCAACTACCAGGTAGCTCACC-3'
<i>MsII</i> -5'-RACE-2	5'-TGGAGTGCAGGAACCCCTGCTCTTAC-3'
<i>MsII</i> -3'-RACE-2	5'-CACTCTCCGGCGGGCTCAACTACC-3'
<i>MsII</i> -3'-RACE-3	5'-CAGTCCCCACCGGCTTTGACCCAGATC-3'

### Anhang 2. Oligonukleotidprimer zur Amplifikation der Vollängen cDNAs der Desaturase und Elongasen aus *M. squamata*, *O. tauri*, *P. tricornutum* und *P. patens* für die Klonierung in pGEM-T oder die Hefeexpressionsvektoren.

Primer	Sequenz
<i>MsI</i> -for	5'-ATGTGTCCTCCCAAGGAATCCACG-3'
<i>MsI</i> -rev	5'-CTAGTGAGCGTGCGCCTTCCCGTG-3'
<i>MsII</i> -for	5'-ATGCATGCCCCGCGGAGACCACCAC-3'
<i>MsII</i> -rev	5'-ATGCTCACCCGATGGTTTGAAGGCTGG-3'
<i>OtII</i> -for	5'-ATGCATGGGGACGACCGCGCGACGCG-3'
<i>OtII</i> -rev	5'-ATGCTCATCCGACGGTTTGGAGGGACGG-3'
<i>MsI</i> -for-NotI ( <i>MsA6</i> -for-NotI)	5'-ATGCGCGCCGCACATAATGTGTCCTCCCAAGGAAT-3'
<i>MsI</i> -rev-BglII ( <i>MsA6</i> -rev-BglII)	5'-ATGCAGATCTCTAGTGAGCGTGCGCCTTC-3'
<i>MsII</i> -for-BamHI ( <i>MsA5</i> -for-BamHI)	5'-ATGCGGATCCACATAATGCCCCGCGGAGACCA-3'

<i>MsII</i> -rev- <i>NheI</i> ( <i>MsΔ5</i> -rev- <i>NheI</i> )	5'-ATGCGCTAGCTCACCCGATGGTTTGAAGG-3'
<i>OtII</i> -for- <i>NotI</i> ( <i>OtΔ5</i> -for- <i>NotI</i> )	5'-ATGCGCGGCCGCACATAATGGGGACGACCGCGCGCGAC-3'
<i>OtII</i> -rev- <i>BglII</i> ( <i>OtΔ5</i> -rev- <i>BglII</i> )	5'-ATGCAGATCTTCATCCGACGGTTTGGAGGGACGG-3'
<i>OtΔ6</i> -for- <i>NotI</i>	5'-ATGCGCGGCCGCACATAATGTGCGTGGAGACGGAAAAT-3'
<i>OtΔ6</i> -rev- <i>BglII</i>	5'-ATGCAGATCTTTACGCCGTCTTCCGGAGTGT-3'
<i>PtΔ6</i> -for- <i>NotI</i>	5'-ATGCGCGGCCGCACATAATGGGCAAAGGAGGGGACGC-3'
<i>PtΔ6</i> -rev- <i>BglII</i>	5'-ATGCAGATCTTTACATGGCGGGTCCATGCG-3'
<i>PtΔ5</i> -for- <i>NotI</i>	5'-ATGCGCGGCCGCACATAATGGCTCCGGATGCGGATAAG-3'
<i>PtΔ5</i> -rev- <i>BglII</i>	5'-ATGCAGATCTTTACGCCCGTCCGGTCAAGGG-3'
<i>PSE1</i> -for- <i>BamHI</i>	5'-ATGCGGATCCTATGGAGGTCGTGGAGAGAT-3'
<i>PSE1</i> -rev- <i>NheI</i>	5'-ATGCGCTAGCTCACTCAGTTTTAGCTCCCTT-3'
<i>OtELO2</i> -for- <i>BamHI</i>	5'-ATGCGGATCCATGAGCGCCTCCGGTGGCGCTGCTGCC-3'
<i>OtELO2</i> -rev- <i>NheI</i>	5'-ATGCGCTAGCTTAGTCAATTTTTCGAGATCG-3'

---

**Anhang 3. Oligonukleotidprimer zur Amplifikation der Vollängen cDNAs der Desaturase und Elongasen aus *M. squamata*, *O. tauri*, *P. tricornutum* und *P. patens* für die Klonierung in den Pflanzenexpressionsvektor.**

---

Primer	Sequenz
<i>MsΔ6</i> -for- <i>NotI</i>	5'-ATGCGCGGCCGCACATAATGTGTCCTCCCAAGGAAT-3'
<i>MsΔ6</i> -rev- <i>XbaI</i>	5'-GCATTCTAGATTACATGGCGGGTCCATCGCGTA-3'
<i>MsΔ5</i> -for- <i>NcoI</i>	5'-ATGCCCATGGACATAATGCCCCGCGGAGACCACC-3'
<i>MsΔ5</i> -rev- <i>AgeI</i>	5'-ATGCACCGGTTACCCGATGGTTTGAAGGCTGGGCAC-3'
<i>OtΔ5</i> -for- <i>NcoI</i>	5'-ATGCCCATGGACATAATGTGGACGCCCGCGCGCA-3'
<i>OtΔ5</i> -rev- <i>AgeI</i>	5'-ATGCACCGGTTTCATCCGACGGTTTGGAGGG-3'
<i>OtΔ6</i> -for- <i>NotI</i>	5'-ATGCGCGGCCGCACATAATGTGCGTGGAGACGGAAAAT-3'
<i>OtΔ6</i> -rev- <i>XbaI</i>	5'-ATGCTCTAGATTACGCCGTCTTCCGGAGTGT-3'
<i>PtΔ6</i> -for- <i>NotI</i>	5'-ATGCGCGGCCGCACATAATGGGCAAAGGAGGGGACGC-3'

<i>PtΔ6</i> -rev- <i>Xba</i> I	5'-GCATTCTAGATTACATGGCGGGTCCATCGCGTA-3'
<i>PtΔ5</i> -for- <i>Nco</i> I	5'-ATGCCCATGGACATAATGGCTCCGGATGCGGATAAGC-3'
<i>PtΔ5</i> -rev- <i>Asi</i> SI	5'-ATGCGCGATCGCTTACGCCCCGTCCGGTCAAGGGATTTTC-3'
<i>PSE1</i> -for- <i>Bam</i> HI	5'-AGTCGGATCCTATGGAGGTCGTGGAGAGAT-3'
<i>PSE1</i> -rev- <i>Nhe</i> I	5'-GACTGCTAGCTCACTCAGTTTTAGCTCCCTT-3'

---

**Anhang 4. Oligonukleotidprimer für die Konstruktion von Hybridgenen zwischen der monofunktionalen  $\Delta 12$ -Desaturase (An2) und der bifunktionalen  $\Delta 12/\omega 3$ -Desaturase (An1) aus *Aspergillus nidulans*.**

---

**Bifunktionale  $\Delta 12/\omega 3$ -Desaturase, An1**

---

Primer	Sequenz
An1 for	5'-GGGAATTCGCTATGGCTGCAACTGCAACAACC-3'
An2A <sub>1</sub> rev	5'-GCGAGATCACGGAAGACGTAGGCAGAGGAAA-3'
An1B <sub>1</sub> for	5'-TCAGGAGTCTGTCCTATGTCGTCCGCGATCTCC-3'
An1B <sub>1</sub> rev	5'-TGAGCAAGAACCCAAATGATTCCGGTGCC-3'
An1C <sub>1</sub> for	5'-GGTCTGTTCCGGTACCGGTATCTGGATCCTC-3'
An1C <sub>1</sub> rev	5'-GATCCAGCCAACAGTGTTCGTTCCACGTTTG-3'
An1D <sub>1</sub> for	5'-ACTTCCAAGGTGCTCAACGATGTCGTCGGA-3'
An1D <sub>1</sub> rev	5'-CTTGCCGTGAGAGATCTTCCAGCTGAAA-3'
An1E <sub>1</sub> for	5'-GTCCCCTATTTCTCGTGGAAGATCACGCA-3'
An1E <sub>1</sub> rev	5'-CAGGATGGAGTGGGTGGCGACGGGCGTGTCTC-3'
An1F <sub>1</sub> for	5'-GAGACCCCTTGGCCACTTACAACCTTATTAGCCTA-3'
An1F <sub>1</sub> rev	5'-TGTCGTGACCGGTAACGTTACAGAGATAACATCTG-3'
An1G <sub>1</sub> for	5'-CCCTTGTACCTGCTCACCTTTTACGTTAGCGCC-3'
An1G <sub>1</sub> rev	5'-GGCGGTGATGGCGAGGCCCGAAATCGCAATCAG-3'
An1H <sub>1</sub> for	5'-TCATCATTCTGAGTGATATCGACCTGGGGTTGCTG-3'
An1H <sub>1</sub> rev	5'-GCTGGTAGTGGGGGGAGAGTGGGGTGTGTGTGG-3'
An1I <sub>1</sub> for	5'-GCCATCACCTACCTCCAGCACACACCCCT-3'
An1rev	5'-GTCACTCGAGTTCCGCTTTGGCACCCCTTCTT-3'

---

**Monofunktionale  $\Delta 12$ -Desaturase, An2**

Primer	Sequenz
An2for	5'-GGGAATTCGCTATGGCCTCGGATGCGGGCAAG-3'
An2A <sub>2</sub> rev	5'-GGAGATCGCGGACGACATAGGACAGACTCCTGA-3'
An2B <sub>2</sub> for	5'-TTTCCTCTGCCTACGTCTTCCGTGATCTCGC-3'
An2B <sub>2</sub> rev	5'-GAGGATCCAGATAACCGGTACCGAACAGCCA-3'
An2C <sub>2</sub> for	5'-GGCACCGGAATCATTGGGTTCTTGCTCA-3'
An2C <sub>2</sub> rev	5'-TCCGACCACATCGTTGAGCACCTTGGAAGT-3'
An2D <sub>2</sub> for	5'-CAAACGTGGAACGACACTGTTGGCTGGATC-3'
An2D <sub>2</sub> rev	5'-TGCGTGATCTTCCACGAGAAATAGGGGAC-3'
An2E <sub>2</sub> for	5'-TTTCAGCTGGAAGATCTCTCACGGCAAG-3'
An2E <sub>2</sub> rev	5'-GCTAATAAGGTTGTAAGTGGCCAAGGGGTCTC-3'
An2F <sub>2</sub> for	5'-GAGGACACGCCCCTCGCCACCCACTCCATCCTG-3'
An2F <sub>2</sub> rev	5'-GGCGCTAACGTAAAAGGTGAGCAGGTACAAGGG-3'
An2G <sub>2</sub> for	5'-CAGATGTATCTCTGTAACGTTACCGGTCACGACA-3'
An2G <sub>2</sub> rev	5'-CAGCAACCCCAGGTCGATATCACTCAGATTCATGA-3'
An2H <sub>2</sub> for	5'-CTGATTGCGATTCGGGCCTCGCCATCACCGCC-3'
An2H <sub>2</sub> rev	5'-AGGGGTGTGTGTGCTGGAGGTAGGTGATGGC-3'
An2I <sub>2</sub> for	5'-CCACACACACCCCACTCTCCCCCACTACCAGC-3'
An2rev	5'-GTCACTCGAGGTTAGGCTTGGTCAGCTT-3'

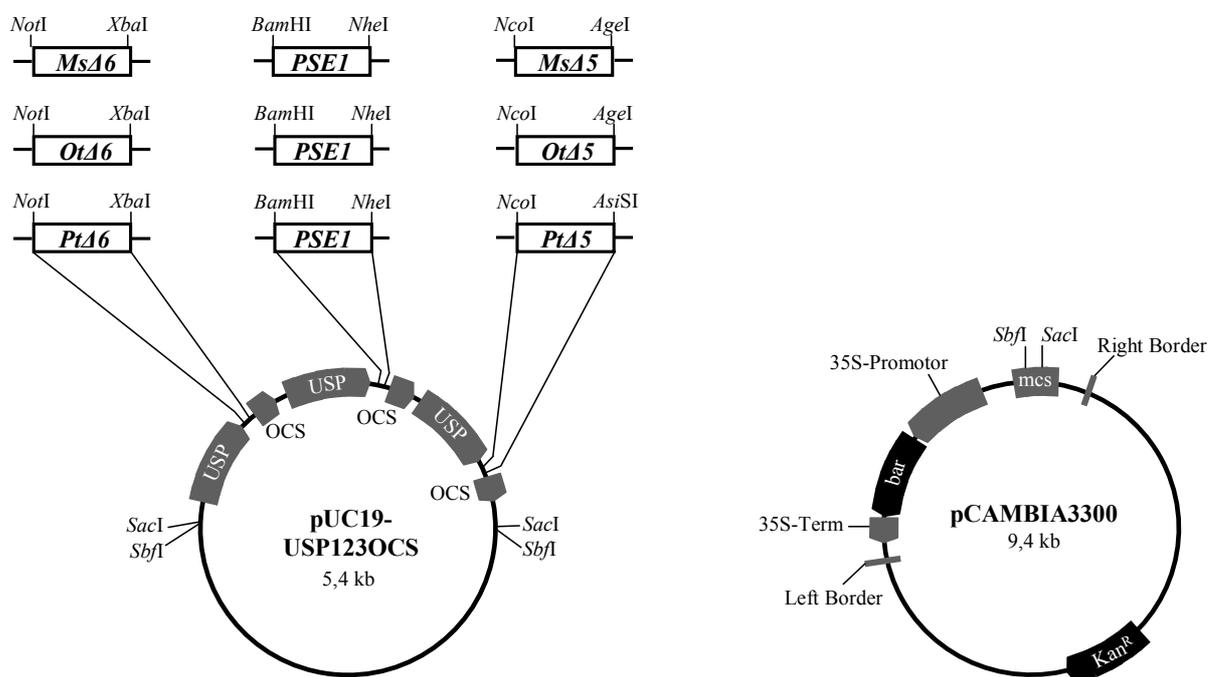
**Anhang 5. Oligonukleotidprimer für Sequenzierungen**

Primer	Sequenz
T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGG-3'
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATAC-3'
GAL1-for	5'-ATTTTCGGTTTGTATTACTTC-3'
GAL1-rev	5'-GTTCTTAATACTAACATAACT-3'
GAL10-for	5'-GGTGGTAATGCCATGTAATATG-3'
GAL10-rev	5'-GGCAAGGTAGACAAGCCGACAAC-3'

## Anhang 6. Schematische Darstellung des Aufbaus der Triple-Konstrukte für die Expression in Pflanzen.

Wie dargestellt wurde jeweils entweder Ms $\Delta$ 6 und Ms $\Delta$ 5 zusammen mit PSE1 oder Ot $\Delta$ 6 mit Ot $\Delta$ 5 und PSE1 oder Pt $\Delta$ 6 mit Pt $\Delta$ 5 und PSE1 kloniert.

USP, unbekanntes Samen Protein; Bäumlein et al., 1991; OCS, Terminationssequenzen des Octopin-Synthetase Gens (MacDonald et al., 1991); mcs, multiple Klonierungsstelle; 35S-Prom, Promotorsequenz des Cauliflower-Mosaik-Virus (CaMV). bar, Resistenzgen gegen Glufosinat (BASTA<sup>®</sup>); 35S-Term, Terminationssequenz des CaMV; Right-Border und Left-Border, Sequenzen des Ti-Plasmids der Agrobakterien zur Vermittlung der Rekombination in das pflanzliche Genom.



## Danksagung

Ich bedanke mich für finanzielle Unterstützung durch ein Stipendium des Fonds der chemischen Industrie, durch die Union zur Förderung von Öl- und Proteinpflanzen e. V., die Norddeutsche Pflanzenzucht, Hans-Georg Lembke KG Hohenlieth, Holtsee und das Bundesministerium für Bildung und Forschung 0313637c, Projekt "OLeRa".

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ivo Feußner für das Überlassen des Themas, die Betreuung und Unterstützung, die zahlreichen Diskussionen und die Möglichkeiten bedanken, an Tagungen teilzunehmen.

Herrn Prof. Dr. Oliver Einsle danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Für die herausragende Koordination des „OLeRa“-Projektes möchte ich mich bei Herrn Dr. Amine Abbadi bedanken, sowie für die ständige Hilfsbereitschaft, die mich zum selbständigen Arbeiten motivierte.

Für die nette Zusammenarbeit danke ich allen Beteiligten des Forschungsverbunds „OLeRa“, besonders aber Dr. Martin Fulda und Martin Wagner für die freundliche Bereitstellung der Pflanzenvektoren, die fruchtbaren Diskussionen und die Unterstützung.

Silke Schlenczek gilt mein Dank für das Überlassen von cDNA-Klonen von *Phaeodactylum tricornutum* und *Physcomitrella patens*.

Dr. Ellen Hornung danke ich für das Überlassen der cDNA-Klone aus *Aspergillus nidulans* und den Gateway-Vektor, die schöne und erfolgreiche Zusammenarbeit, die stete Unterstützung bei Problemen jeglicher Art, sowie das Korrekturlesen des Material und Methodenteils, und natürlich für die Einladungen zu zahlreichen köstlichen Essen.

Dr. Cornelia Göbel und Sabine Freitag danke ich für das Retten von undichten HPLC-Säulen, abstürzenden GC-Programmen und die Hilfe bei technisch scheinbar unlösbaren Aufgaben mit den Geräten, aber vor allem für die gute Laune und euren Humor!

Dr. Ingo Heilmann möchte ich für die vielen interessanten Diskussionen am Küchentisch über Lipide und verwandte und unverwandte Themen danken.

Bei Susanne Mesters möchte ich mich für die Einweisung in die Welt der Pflanzenpflege, die Einblicke in eine gelungene Schafszucht, die vielen lustigen Gespräche und die Versorgung mit Würstchen bedanken.

Theres Riemekasten danke ich für den jederzeit möglichen Ausgleich fehlenden Labormaterials im Laboralltag.

Gerd und Christoph Mader danke ich für die Hilfe bei Problemen mit den Computern, ob Hardware oder Software.

Ein besonderes Dankeschön geht an Imke Lang für die Freundschaft und die heitere und schöne gemeinsame Zeit im Labor!

Bei Kristl Sauer, Sabine König, Alina Mosblech, Till Ischebeck, Christian Löffke, Irene Stenzel, Alexandra Andreou, Theres Riemekasten, Martin Wagner, Florian Brodhun, Katharina Hoppe und allen anderen möchte ich mich für die tolle Stimmung und Freundschaft bedanken wozu auch lustige Mittagspausen, Pizza- und Grillabende gehörten!

Mein ganz besonderer Dank geht an Ingo. Ohne deine Unterstützung, Liebe und Geduld wäre alles ein wenig schwerer gewesen. Danke.

Ich danke meinen Eltern und meinem Bruder Martin, für die immerwährende Unterstützung und das Vertrauen das ihr mir entgegenbringt.

## Lebenslauf

Name: Mareike Hoffmann  
Geboren: 30. Juli 1979  
In: Wolfenbüttel, Deutschland  
Nationalität: Deutsch

### Schulbildung

1986 - 1990 Grundschule Am Geitelplatz, Wolfenbüttel  
1990 - 1992 Orientierungsstufe Ravensberger Straße, Wolfenbüttel  
1992 - 1999 Theodor-Heuss-Gymnasium, Wolfenbüttel

### Studium

1999 - 2004 Biologiestudium an der Georg-August-Universität Göttingen  
11/2003 Diplomprüfungen mit der Fächerkombination Biochemie, Botanik und Mikrobiologie  
12/2003 - 10/2004 Diplomarbeit „Ein Dicarboxylat-Transporter aus *Alnus glutinosa*-Knöllchen in transgenen Kartoffelpflanzen“, an der Georg-August-Universität Göttingen in der Abteilung Biochemie der Pflanze, unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Katharina Pawlowski

### Promotion

04/2005 - 04/2007 Stipendium des Fonds der Chemischen Industrie  
04/2005 - 03/2008 Promotion „Ein neuer Syntheseweg für wertvolle Fettsäuren in *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana*“ an der Georg-August-Universität Göttingen in der Abteilung Biochemie der Pflanze unter Anleitung von Prof. Dr. Ivo Feußner

### Anstellung

11/2004 - 03/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Frau Prof. Dr. Katharina Pawlowski und Prof. Dr. Ivo Feußner, an der Georg-August-Universität Göttingen in der Abteilung Biochemie der Pflanze