Biochemische und molekulare Evidenz für die Beteiligung einer Δ4-Desaturase an der Biosynthese von Docosahexaensäure in Mikroorganismen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Astrid Meyer
Hamburg

Hamburg, März 2003

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
aa	amino acids
abs	absolut
A. dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ACP	Acyl-Carrier-Protein
amp	Ampicillin
ATP	Adenintriphosphat
bp	Basenpaare
BPE	Bromphenacylester
C	Cytosin
cDNA	komlementäre DNA
CDP	Cytidindiphosphat
cis	auf der gleichen Seite der Bezugsebene
CoA	Coenzym A
DAG	Diacylglycerin
DC	Dünnschichtchromatographie
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphat
DGD	Digalaktosyldiacylglycerin
DMOX	Dimethyloxyazolin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	expressed sequence tags
FAME	Fettsäuremethylester
FFA	Freie Fettsäuren
FID	Flammenionisationsdetektor
G	Guanin
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G3P	Glycerin-3-phosphat
GC	Gaschromatographie
HPLC	high performance liquid chromatography
konz	konzentriert
LCB	langkettige Sphingobase
LPA	Lysophosphatidsäure
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MGD	Monogalaktosyldiacylglycerin
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektroskopie
NADH	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid (reduziert)
NADPH	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduziert)
OD_x	Optische Dichte bei x Nanometern
PA	Phosphatidsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglykol
pfu	plaque-forming units
PtdCho / PC	Phosphatidylcholin
PtdEtn	Phosphatidylethanolamin

PtdGly	Phosphatidylglycerin
PtdIno	Phosphatidylinsositol
PtdSer	Phosphatidylserin
PTS	Peroxisomal targeting sequence
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	reversed-phase HPLC
RT	Raumtemperatur
sn	stereospezifische Numerierung
SQD	Sulfochinovosyldiacylglycerin
T	Thymin
TAG	Triacylglycerin
THF	Tetrahydrofuran
TMH	Transmembrane Helix/Helices
U	Uracil
v/v	volume per volume
VLCPUFA	very long chain polyunsaturated fatty acids
w/v	weight per volume

Aminosäuren:

A	Alanin	G	Glycin	P	Prolin
R	Arginin	H	Histidin	S	Serin
N	Asparagin	I	Isoleucin	T	Threonin
D	Asparaginsäure	L	Leucin	W	Tryptophan
C	Cystein	K	Lysin	Y	Tyrosin
Q	Glutamin	M	Methionin	V	Valin
E	Glutaminsäure	F	Phenylalanin		

Abkürzung von Genen und Genprodukten:

Gene: Großbuchstaben (Beispiel: DES)
Genprodukte: nur der erste Buchstabe groß (Beispiel: Des)

Abkürzungen von Fettsäuren:

Palmitinsäure	16:0		
Stearinsäure	18:0		
Ölsäure	18:1	$18:1^{\Delta 9}$	
Linolsäure	18:2	$18:2^{\Delta 9,12}$	
α-Linolensäure	α-18:3	$18:3^{\Delta 9,12,15}$	
γ-Linolensäure	γ-18:3	$18:3^{\Delta 6,9,12}$	
Stearidonsäure	18:4	$18:4^{\Delta 6,9,12,15}$	
Di-homo-γ-linolensäure	20:3	$20:3^{\Delta 8,11,14}$	
Di-homo-γ-stearidonsäure	20:4ω3	$20:4^{\Delta 8,11,14,17}$	
Arachidonsäure	20:4ω6	$20:4^{\Delta 5,8,11,14}$	ARA
Eicosapentaensäure	20:5ω3	$20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$	EPA
Docosatetraensäure	22:4ω6	$22:4^{\Delta 7,10,13,16}$	
Docosapentaensäure	22:5ω3	$22:5^{\Delta 7,10,13,16,19}$	
Docosahexaensäure	22:6	$22:6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$	DHA
Tetracosapentaensäure	24:5	$24:5^{\Delta 9,12,15,18,21}$	
Tetracosahexaensäure	24:6	$24:6^{\Delta 6,9,12,15,18,21}$	

1 EINLEITUNG 1

1.1 Struktur und Vorkommen von VLCPUFA 2
1.1.1 Bakterien 5
1.1.2 Eukaryotische Algen und Pilze 5
1.1.3 Moose und höhere Pflanzen 7

1.2 Biosynthese von VLCPUFA 7
1.2.1 Biosynthese von Fettsäuren und Lipiden 7
1.2.2 Biosynthese von VLCPUFA 10
1.2.2.1 Der ω3- und ω6-Weg mit Desaturasen und Elongasen 11
1.2.2.2 Der Sprecher-Weg 13
1.2.2.3 VLCPUFA-Polyketidsynthasen 14

1.3 Desaturasen 16
1.3.1 "Front End"-Desaturasen 21

1.4 Problemstellung und Zielsetzung dieser Arbeit 23

2 MATERIAL UND METHODEN 25

2.1 Geräte, Verbrauchsmaterial, Enzyme und Chemikalien 25
2.1.1 Geräte 25
2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Isotope 26
2.1.2.1 Synthese von [2-^{14}C]Docosapentaensäure und [2-^{14}C]Docosatetraensäure 26

2.2 Organismen 28
2.2.1 Bakterien 28
2.2.2 Hefen 28
2.2.3 Pilze und Algen 28

2.3 Vektoren 29

2.4 Anzucht der Organismen 29
2.4.1 Kultur von *Escherichia coli* 29
2.4.2 Kultur von *Saccharomyces cerevisiae* 30
2.4.3 Kultur von *Cricosphaera carterae* 31
2.4.4 Kultur von *Crypthecodinium cohnii* 33
2.4.5 Kultur von *Euglena gracilis* 34
2.4.6 Kultur von *Thraustochytrium* sp. und *Schizochytrium* sp. 35

2.5 Transformation von *Escherichia coli* 36
2.5.1 Herstellung kompetenter Zellen 36
2.5.2 Transformation 36

2.6 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* 37
2.6.1 Transformation mit der PEG-Methode 37
2.6.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen 37
2.6.3 Elektroporation 37

2.7 Isolierung von Plasmid-DNA 38
2.7.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* 38
2.7.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* 38
2.7.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* 38

2.8 Isolierung genomischer DNA aus *Euglena gracilis* 39

2.9 Isolierung von RNA 39
2.9.1 Isolierung von Gesamt-RNA 40

2.9.2 Isolierung von poly(A)-RNA ... 40

2.10 Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und Oligonukleotiden ... 40

2.11 Synthese von cDNA ... 41

2.12 Klonierungsmethoden ... 41
2.12.1 Restriktion von DNA ... 41
2.12.2 Behandlung mit Alkalischer Phosphatase ... 41
2.12.3 Ligation ... 41

2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ... 41

2.14 Overlap-PCR ... 43

2.15 Agarose-Gelelektrophorese ... 43
2.15.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA ... 43
2.15.2 Agarose-Gelelektrophorese von RNA ... 44
2.15.3 Elution von DNA aus Agarose-Gelen ... 44

2.16 Sequenzierung ... 44

2.17 Computer-gestützte Auswertung von Sequenzdaten ... 45

2.18 Southern Blot-Analyse ... 46
2.18.1 Restriktion der genomischen DNA ... 46
2.18.2 DNA-Transfer auf eine Nylonmebran ... 46
2.18.3 Herstellung der DNA-Sonden ... 47
2.18.4 Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschen ... 47
2.18.5 Detektion ... 47

2.19 Isolierung von cDNA-Klonen aus cDNA-Banken ... 48
2.19.1 Anzucht der bakteriellen Wirtszellen für die Infektion ... 48
2.19.2 Ermittlung des Phagentiters der cDNA-Bank ... 48
2.19.3 Plattieren der cDNA-Bank ... 49
2.19.4 Plaque-Transfer auf Nylon-Membranen ... 49
2.19.5 Sonden-Synthese, Plaque-Hybridisierung und Waschen ... 50
2.19.6 Detektion ... 50
2.19.7 *In vivo*-Excision ... 51

2.20 Klonierung rekombinanter Plasmide ... 52
2.20.1 Isolierung und Klonierung des Klons ccDES aus *Cricosphaera carterae* ... 53
2.20.2 Klonierung des cDNA-Klons egDES aus *Euglena gracilis* Stamm Z ... 54

2.21 Heterologe Expressionen in *Saccharomyces cerevisiae* ... 54
2.21.1 Heterologe Expression zur Identifizierung von Genfunktionen ... 54
2.21.2 Heterologe Expression für die Positionsanalyse ... 55

2.22 Lipidanalytik ... 55
2.22.1 Isolierung von Gesamtlipiden ... 55
2.22.2 Isolierung der Fettsäuren aus Monogalaktosyldiacylglycerin (MGD) ... 56
2.22.3 Positionsanalyse der Fettsäuren in Phospholipiden ... 56
2.22.4 Darstellung und GC-Analyse von Fettsäuremethylestern und DMOX-Derivaten ... 57
2.22.5 Sphingobasen-Analyse ... 58
2.22.6 *In vivo*-Markierungsversuche mit ^{14}C-Fettsäuren ... 58
2.22.7 α-Oxidation von ^{14}C-markierten Fettsäureprodukten ... 59

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION 61

3.1 Biochemischer Nachweis einer Δ4-Desaturase in *Thraustochytrium* sp. und *Euglena gracilis*..... 63
3.1.1 *In vivo*-Umsetzung von [2-^{14}C]Docosapentaensäure 63
3.1.2 *In vivo*-Umsetzung von [2-^{14}C]Docosatetraensäure, [1-^{14}C]Ölsäure und [1-^{14}C]Acetat 69

3.2 Identifizierung von Klonen mit Ähnlichkeiten zu "Front End"-Desaturasen 72
3.2.1 Strategien zur Isolierung von Genen für "Front End"-Desaturasen 72
3.2.2 Identifizierung eines putativen Δ4-Desaturase-Klons aus *E. gracilis* Stamm Z 73
3.2.3 Nachweis von egDES4-1 im Genom von *E. gracilis* 80
3.2.4 Identifizierung eines putativen Δ6-Desaturase-Klons aus *Cricosphaera carterae* 82

3.3 Funktionale Identifizierung eines "Front End"-Desaturase-ähnlichen Klons aus *E. gracilis*..... 84
3.3.1 Expression von egDES4-1 und egDES4 84

3.4 Expression von ccDES1 aus *Cricosphaera carterae*..... 86

3.5 Expression eines putativen Δ12-Desaturasegens aus *Thraustochytrium* sp. 87

3.6 Substratspezifität von egDes4 88
3.6.1 Spezifität gegenüber dem Acylrest 88
3.6.2 Spezifität gegenüber der *sn*-Position von Phospholipiden 92

3.7 Expressionen von egDES4 mit verkürzter oder ausgetauschter Cytochrom b5-Domäne 99

4 ZUSAMMENFASSUNG 101

5 LITERATURVERZEICHNIS 103

1 Einleitung

Essentielle Fettsäuren wie Linolsäure, γ- und α-Linolensäure sind wichtige Bestandteile der menschlichen Nahrung. Sie werden u. a. mit den Lipiden von Ölsaaten aufgenommen. Im Körper entstehen aus ihnen sehr langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*very long chain polyunsaturated fatty acids*, VLCPUFA) wie die ω6-Fettsäure Arachidonsäure und die ω3-Fettsäuren Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure. Insbesondere ω3-VLCPUFA spielen wichtige Rollen in der Physiologie des menschlichen Körpers, z. B. bei der Entwicklung des Gehirns bei Kindern sowie der Erhaltung normaler Gehirnfunktionen bei Erwachsenen, und bei der Prävention von kardiovaskulären Krankheiten. Eine α-Linolensäure-reiche Diät führt zur Anreicherung von Eicosapentaensäure in Geweben, eine Erhöhung des Gehaltes an Docosahexaensäure wird jedoch nur durch die Aufnahme dieser Fettsäure erreicht.

Fettreicher Fisch und daraus gewonnenes Öl repräsentieren die bisher wichtigsten Bezugsquellen für VLCPUFA. Der Gehalt an VLCPUFA in fettem Seefisch spiegelt im Wesentlichen die Zusammensetzung der Mikroalgen und -pilze wieder, die mit dem Phyto- und Zooplankton aufgenommen wurden. Somit repräsentieren diese Mikroorganismen die primären VLCPUFA-Produzenten im Meer. Aufgrund der wachsenden Ausbeutung der Meere durch Überfischung wird nach nachhaltigeren Quellen geforscht. Transgene Ölsaaten wie Raps und Lein mit VLCPUFA in den Samenlipiden stellen eine potentielle Möglichkeit dar, das Fischöl zu ersetzen. Für diesen transgenen Ansatz wird seit einigen Jahren intensiv nach Organismen gesucht, die die entsprechenden Synthesegene besitzen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, zunächst Mikroorganismen zu identifizieren, die von Desaturasen zur Herstellung von VLCPUFA Gebrauch machen. Auf der Basis dieser Ergebnisse sollten anschließend Gene isoliert und funktional charakterisiert werden, die für an der Synthese von Docosahexaensäure beteiligte Desaturasen kodieren. Von besonderem Interesse war dabei das zu Beginn dieser Arbeit noch nicht isolierte Gen einer Δ4-Desaturase.

Die folgende Einführung soll zunächst einen Überblick über Struktur und Vorkommen von VLCPUFA in verschiedenen Organismengruppen geben. Danach folgt eine Übersicht über die verschiedenen Biosynthesewege, die in diesen Organismen realisiert sind. Schließlich wird auf den Desaturase-Reaktionsmechanismus eingegangen, und Vorkommen, Strukturen und Spezifitäten von Desaturasen werden erörtert.

1.1 Struktur und Vorkommen von VLCPUFA

VLCPUFA definieren sich als Carbonsäuren mit einer Kettenlänge von mehr als 18 Kohlenstoffatomen und mehr als zwei Doppelbindungen. Die wichtigsten und verbreitetsten VLCPUFA sind Arachidonsäure (ARA), Eiosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA). Ihre Strukturen werden in Abbildung 1.1 wiedergegeben.

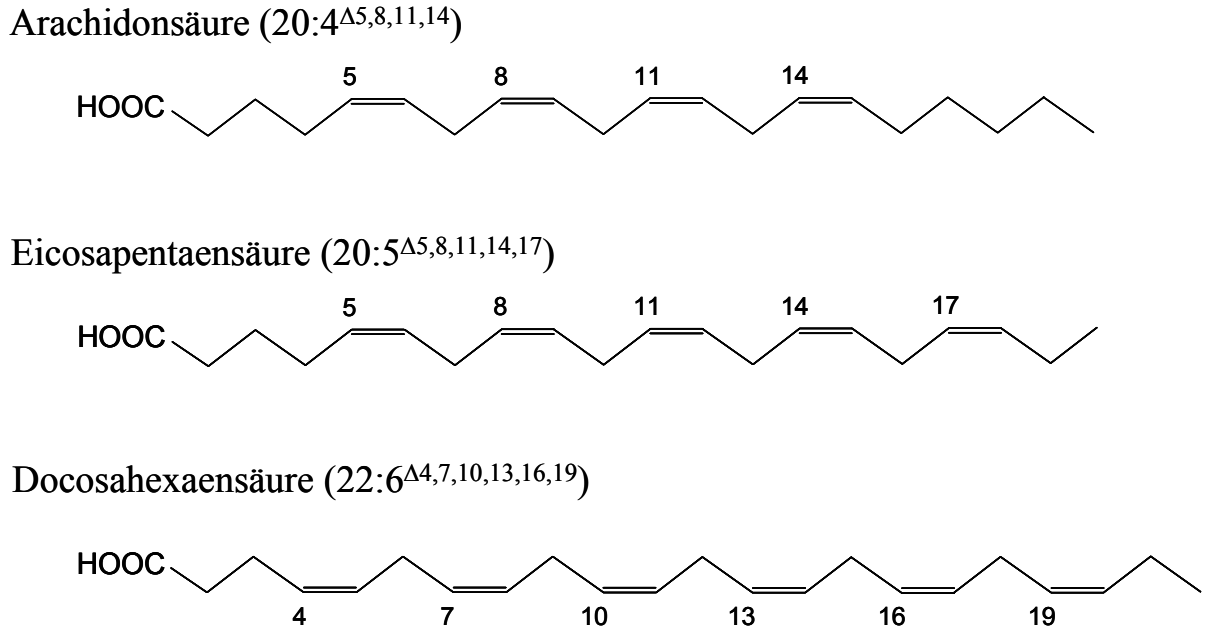


Abb. 1.1: Strukturen der wichtigsten sehr langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (VLCPUFA). Die Zahlen geben die Positionen der Doppelbindungen ausgehend vom Carboxylende an.

Zur Bezeichnung von VLCPUFA oder Fettsäuren im Allgemeinen werden oft Abkürzungen verwendet, wie sie in Abbildung 1.1 angegeben sind. Sie beinhalten die Anzahl der Kohlenstoffatome und Doppelbindungen sowie die Positionen der Doppelbindungen. Ein 'Δ' verweist dabei auf die Position des ersten Kohlenstoffatoms der Doppelbindung ausgehend vom Carboxylende, die Bezeichnung 'ω' bezieht sich dagegen auf das Methylende. Da die Doppelbindungen der meisten Polyenfettsäuren durch eine Methylengruppe voneinander getrennt sind, findet man oft eine verkürzte Bezeichnung, die lediglich die Position der dem Methylende am nächsten liegenden Doppelbindung benennt. So wird für Arachidonsäure auch die Abkürzung 20:4ω-6 und für Eicosapentaensäure die Abkürzung 20:5ω-3 verwendet, oder noch vereinfachter 20:4ω6 und 20:5ω3.

Nicht immer sind die Doppelbindungen von Fettsäuren methylenunterbrochen. Als Beispiele können Taxolsäure ($18:2^{\Delta5,9}$), Pinolensäure ($18:5^{\Delta5,9,12}$) und Coniferonsäure ($18:4^{\Delta5,9,12,15}$) in den Samen von Pinaceae genannt werden (Wolff *et al*., 2000). Die Doppelbindungen von Fettsäuren liegen meistens,

aber nicht ausschließlich in *cis* (*Z*)-Konfiguration vor, wie in den bisher genannten Beispielen. Seltener besitzen sie eine *trans* (*E*)-Konfiguration. So findet man z. B. eine Δ3-*trans*-Doppelbindung in einem Acylrest des Phosphatidylglycerins aus Chloroplasten. Eine *trans*-Doppelbindung wird durch den Buchstaben 't' gekennzeichnet. Neben den Doppelbindungen kommen auch Dreifachbindungen in Fettsäuren vor. Diese Acetylengruppen erhalten das Suffix 'a'.

VLCPUFA können als freie Fettsäuren in den Zellen vorliegen, oder sie sind über Esterbindungen an andere Moleküle gebunden. So sind sie z. B. mit den Hydroxygruppen des Glycerins verestert und bilden Glycerolipide, oder sie sind mit der Thiolgruppe von Coenzym A verestert.

VLCPUFA kommen im Tierreich, im Pflanzenreich und bei den Prokayoten vor. Im Pflanzenreich findet man sie insbesondere bei den einzelligen Algen, den Algenpilzen (Oomycota) und den Jochpilzen (Zygomyceten). So besitzen fast alle Abteilungen der eukaryotischen Algen Arten, die ARA und EPA oder auch die C_{22}-VLCPUFA DHA produzieren. Tabelle 1.1 veranschaulicht anhand ausgesuchter Beispiele die ubiquitäre Verbreitung dieser Fettsäuren unter den Prokaryoten, den eukaryotischen Algen und den einfachen Pilzen. ARA, EPA und DHA befinden sich sowohl in den Membranlipiden als auch in den Speicherlipiden dieser Organismen. Über ihre Funktion besteht jedoch bisher Unklarheit. Als Bestandteil von Speicherlipiden fungieren sie vermutlich als Reservematerial für den Energie- und Kohlenstoffstoffwechsel. Zudem dienen die in den Triacylglycerinen gespeicherten VLCPUFA in einigen Mikroalgen der Synthese von Chloroplastenlipiden (Cohen *et al*., 2000). Da diese Beobachtung in Verbindung mit Temperatursenkungen gemacht wurde, wird angenommen, dass es sich um eine Anpassung an Temperatur-induzierten Stress handelt.

	ARA	EPA	DHA	Referenz
PROKARYOTA				
Shewanella	0,3	16	-	Russell & Nichols, 1999
Colwellia	-	0,7	7	Russell & Nichols, 1999
PILZE				
OOMYCOTA				
Thraustochytrium	1	1	43	Bajpai *et al*., 1991
Pythium	10	25	-	O'Brien *et al*., 1993
ZYGOMYCOTA				
Mortierella	12	2	-	Kendrick & Ratledge, 1992b
EUKARYOTISCHE ALGEN				
GLAUCOPHYTA				
Cyanophora	-	24	-	Schenk *et al*., 1985
EUGLENOPHYTA				
Euglena	2	4	2	Korn, 1964
CRYPTOPHYTA				
Cryptomonas	3	17	10	Vazhappily & Chen, 1998
Chroomonas	4	8	-	Vazhappily & Chen, 1998
DINOPHYTA				
Amphidinium	-	20	22	Cohen *et al*., 1995
Crypthecodinium	-	-	44	de Swaaf *et al*., 1999
HAPTOPHYTA				
Cricosphaera	-	0,4	2	Singh & Ward, 1997
Pavlova	2	24	11	Kato *et al*., 1995
HETEROKONTOPHYTA				
Olisthodiscus (Xanthophyceae)	2	22	3	Cohen *et al*., 1995
Skeletonema (Bacillariophyceae)	0,1	35	6	Berge *et al*., 1995
Fucus (Phaeophyceae)	0,1	5	-	Fleurence *et al.*, 1994
Nannochloropsis (Eustigmatophyceae)	4	35	-	Schneider *et al*., 1995
RHODOPHYTA				
Porphyridium	15	44	-	Cohen *et al*., 1995
Chondrus	-	19	0,3	Fleurence *et al.*, 1994
Phycodrys	44	2	-	Bigogno *et al*., 2002
CHLOROPHYTA				
Caulerpa (Ulvophyceae)	4	9	1	Terrados & Lopez-Jimenez, 1996
Parietochloris (Trebuxiophyceae)	43	1	-	Bigogno *et al*., 2002

Tab. 1.1: Anteile der wichtigsten VLCPUFA an den Gesamtfettsäuren ausgewählter Organismen. Angegeben sind die Abteilungen und Gattungen. Bei den Heterokontophyta und Chlorophyta wurden die Klassen in Klammern ergänzt. Angaben des Fettsäureanteils an den Gesamtfettsäuren in Prozent. Werte größer als 1 wurden gerundet.

1.1.1 Bakterien

Zumeist findet man in prokaryoten Organismen C_{16} und C_{18} gesättigte oder einfach ungesättigte Fettsäuren. Die Einführung der Doppelbindung erfolgt anaerob bei der Fettsäurebiosynthese (Russell & Nichols, 1999), oder sie wird im Anschluss an die Synthese durch aerobe Desaturierung eingeführt (Fulco, 1974; Aguilar *et al*., 1998). Dabei können aerobe und anaerobe Wege zur Synthese ungesättigter Fettsäuren innerhalb einer Art operieren (Wada *et al*., 1991). Cyanobakterien besitzen langkettige Fettsäuren mit bis zu vier Doppelbindungen. Diese werden durch Desaturasen an den Positionen Δ9, ω6/Δ12, ω3/Δ15 und Δ6 eingeführt (Reddy *et al*., 1993; Wada *et al*., 1993; Sakamoto *et al*., 1994a; Sakamoto *et al*., 1994b). Mit der Analyse der Fettsäurezusammensetzung mariner, psychrophiler Bakterien wurde schließlich eine Gruppe von Prokaryoten beschrieben, die VLCPUFA synthetisieren (Russel & Nichols, 1999). Dazu gehören Arten der Gattungen *Flexibacter* (Johns & Perry, 1977), *Shewanella* (Russell & Nichols, 1999), *Colwella* (Russell & Nichols, 1999) und *Vibrio* (Yano *et al*., 1994). Die VLCPUFA sind vor allem Bestandteile der Membranlipide (Russell & Nichols, 1999). In *Shewanella* wird die Fettsäure EPA insbesondere in der *sn*-2-Position der Phospholipide Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylglycerin angereichert (Yazawa, 1996). Über die Funktion der VLCPUFA in der Prokaryotenmembran besteht Unklarheit. Obwohl der Anteil an VLCPUFA in den Membranlipiden von *Shewanella* und *Vibrio* mit der Wachstumstemperatur variiert (Hamamoto *et al*., 1994; Nichols *et al*., 1997) und sie somit an der Regulierung der Membranfluidität beteiligt sind, besitzen nicht alle marinen, psychrophilen Bakterien diese Fettsäuren. Sie könnten jedoch eine Rolle bei der Erhaltung der Membranfunktion spielen (Russell & Nichols, 1999).

1.1.2 Eukaryotische Algen und Pilze

Die Auswahl der in Tabelle 1.1 vertretenen Algenarten macht deutlich, dass sich die Fähigkeit zur Synthese von VLCPUFA in fast allen Abteilungen entwickelt hat. Dabei beschränkt sich die Synthese der VLCPUFA nicht nur auf die C_{20}-Fettsäuren ARA und EPA. So befinden sich mit Ausnahme der Glaucophyta, bei denen bisher nur sehr wenige Arten beschrieben wurden, in allen aufgelisteten Abteilungen auch DHA-Produzenten. Der Anteil der einzelnen VLCPUFA variiert mit der untersuchten Art. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die einzelnen Gruppen gegeben.

Zu den Dinoflagellaten gehören sehr DHA- und EPA-reiche Arten, die bereits für eine kommerzielle Produktion dieser Fettsäuren in Betracht gezogen werden. So reichert *C. cohnii* z. B. unter bestimmten Wachstumsbedingungen über 50 % DHA an den Gesamtfettsäuren an. Diese befinden sich im Wesentlichen in den Phospholipiden der Alge (Henderson *et al*., 1988). Da der VLCPUFA-Gehalt und das Fettsäureprofil zumeist deutlich variieren können, wird der Einfluß äußerer Faktoren wie die Art der Kohlenstoffquelle sowie die Mediumzusammensetzung, der pH-Wert, der physiologische Zustand

des Inokulums, die Temperatur, die Belüftung und die Lichtverhältnisse intensiv studiert (Singh & Ward, 1997; Cohen *et al*., 1995; de Swaaf *et al*., 1999).

Die Haptophyta werden nach den Dinoflagellaten als weitere potentielle DHA-Produzenten unter den Algen betrachtet. Sie besitzen jedoch wesentlich weniger DHA in ihren Lipiden, zumeist unter 10 %. *Cricosphaera* und *Isochrysis* repäsentieren die beiden bekanntesten Gattungen (Cohen *et al.*, 1995).

Unter den Heterokontophyta befinden sich potentielle EPA-Produzenten. Dies betrifft insbesondere die Kieselalgen (Bacillariophyceae) (Dunstan *et al*., 1994) und die Gattung *Nannochloropsis.* Letztere wird bereits in Photobioreaktoren zur Produktion von EPA kultiviert (Zittelli *et al*., 1999).

Die Rhodophyta kommen als potentielle Produzenten für ARA in Frage. Ihr bekanntester Vertreter ist in dieser Hinsicht *Porphyridium cruentum.* ARA ist in dieser Alge im Wesentlichen ein Bestandteil der plastidären Lipide (Nichols & Appleby, 1969). *P. cruentum* reichert in der stationären Phase bis zu 34 % ARA an (Cohen *et al*., 1995). Interessanterweise sinkt der ARA-Gehalt in der exponentiellen Phase, während der Gehalt an EPA stark ansteigt. Die Fettsäurezusammensetzung wird im Wesentlichen durch die Zelldichte beeinflußt (Cohen *et al*., 1995).

Die Alge *Chroomonas* aus der Gruppe der Cryptophyta besitzt ungefähr gleich viel EPA und DHA, die hauptsächlich in den Phospholipiden lokalisiert sind (Henderson & Mackinlay, 1992).

In *Cyanophora paradoxa* findet man EPA sowohl in ihren eigenen Lipiden als auch in denen ihrer cyanobakteriellen Cyanelle (Schenk *et al*., 1985). Es ist nicht geklärt, ob das symbiotische Cyanobakterium über eine eigene EPA-Synthese verfügt oder diese Fettsäure aus dem sie umgebenden Zellteil importiert.

In *Euglena* repräsentiert DHA nur eine der vielen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Korn, 1964). Man findet sie in Phosphatidylcholin und in dem mitochondrialen Lipid Diphosphatidylglycerin (Cardiolipin) (Nichols & Appleby, 1969). ARA und EPA sind dagegen neben den beiden genannten Lipiden in fast allen Phospholipiden und im Triacylglycerin vorhanden. Keine der drei VLCPUFA befindet sich in den plastidären Lipiden.

VLCPUFA-synthetisierende Arten gibt es in der Gruppe der Chlorophyta bei den Trebouxiophyceae, den Ulvophyceae und den Prasinophyceae. So findet man bei den Trebouxiophyceae die ARA- und EPA-synthetisierende Art *Parietochloris incisa*. Diese Alge ist sehr reich an Speicherlipiden und akkumuliert außergewöhnlich große Mengen von ARA, die bis zu 80 % der Fettsäuren der Triacylglycerine repräsentieren kann (Bigogno *et al*., 2002). ARA besetzt in 20 % der Triacylglycerine alle drei *sn*-Positionen des Lipids.

VLCPUFA-anreichernde Pilze findet man besonders unter den Zygomyceten und den Oomyceten. Die bekanntesten Vertreter sind die oleagenen Pilze *Mortierella* und die Thraustochytriaceen

Thraustochytrium und *Schizochytrium*. *Mortierella* ist hauptsächlich für die Produktion von Di-homo-γ-linolensäure, ARA und EPA interessant (Leman, 1997). *Thraustochytrium* und *Schizochytrium* werden dagegen für die Gewinnung von DHA verwendet. *Schizochytrium* reichert bis zu 43 % DHA an (Yokochi *et al*., 1998). Aus *Thraustochytrium aureum* werden unter optimierten Bedingungen ca. 270 mg/l DHA gewonnen (Bajpai *et al*., 1991). Die VLCPUFA reichern sich in den Pilzen in den Triacylglycerinen von Lipidkörpern an (Ashford *et al*., 2000; Kamisaka *et al*., 1999).

1.1.3 Moose und höhere Pflanzen

Viele Moosarten zeichnen sich durch signifikante Menge von acetylenierten Fettsäuren sowie von ARA und EPA aus (Kohn *et al*., 1987; Anderson *et al*., 1975). Der Anteil der Fettsäuren an den Gesamtfettsäuren variiert mit der Art. Bei den acetylenierten Fettsäuren handelt es sich um C_{18}- und C_{20}-Fettsäuren mit einer Dreifachbindung an der Δ5-, Δ6- oder Δ8-Position. Während sich die acetylenierten Fettsäuren auf die Neutrallipide der Moose beschränken, reichern sich ARA und EPA auch in den Glykolipiden und besonders in den Phospholipiden an (Kohn *et al.,* 1987). In einigen Arten wie *Pleurozium schreberi* konnte zudem $22{:}4^{\Delta 10,13,16,19}$ detektiert werden (Dembitsky & Rezanka, 1995).

Wolff *et al.* (1999) fanden ARA und EPA in der primitiven Gymnosperme *Agathis robusta*. Damit wurde die erste höhere Pflanze beschrieben, bei der VLCPUFA ein Bestandteil der Lipide in den Samen sind.

1.2 Biosynthese von VLCPUFA

Im Folgenden wird zunächst auf die Biosynthese von langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) eingegangen, da sie in vielen Organismen die Grundlage für die Synthese von VLCPUFA darstellt. Dies geschieht am Beispiel der gut untersuchten Lipidsynthese in höheren Pflanzen.

1.2.1 Biosynthese von Fettsäuren und Lipiden

Abbildung 1.2 gibt einen Überblick über die Biosynthese von Fettsäuren und Lipiden in den Pflanzen (Ohlrogge & Browse, 1995).

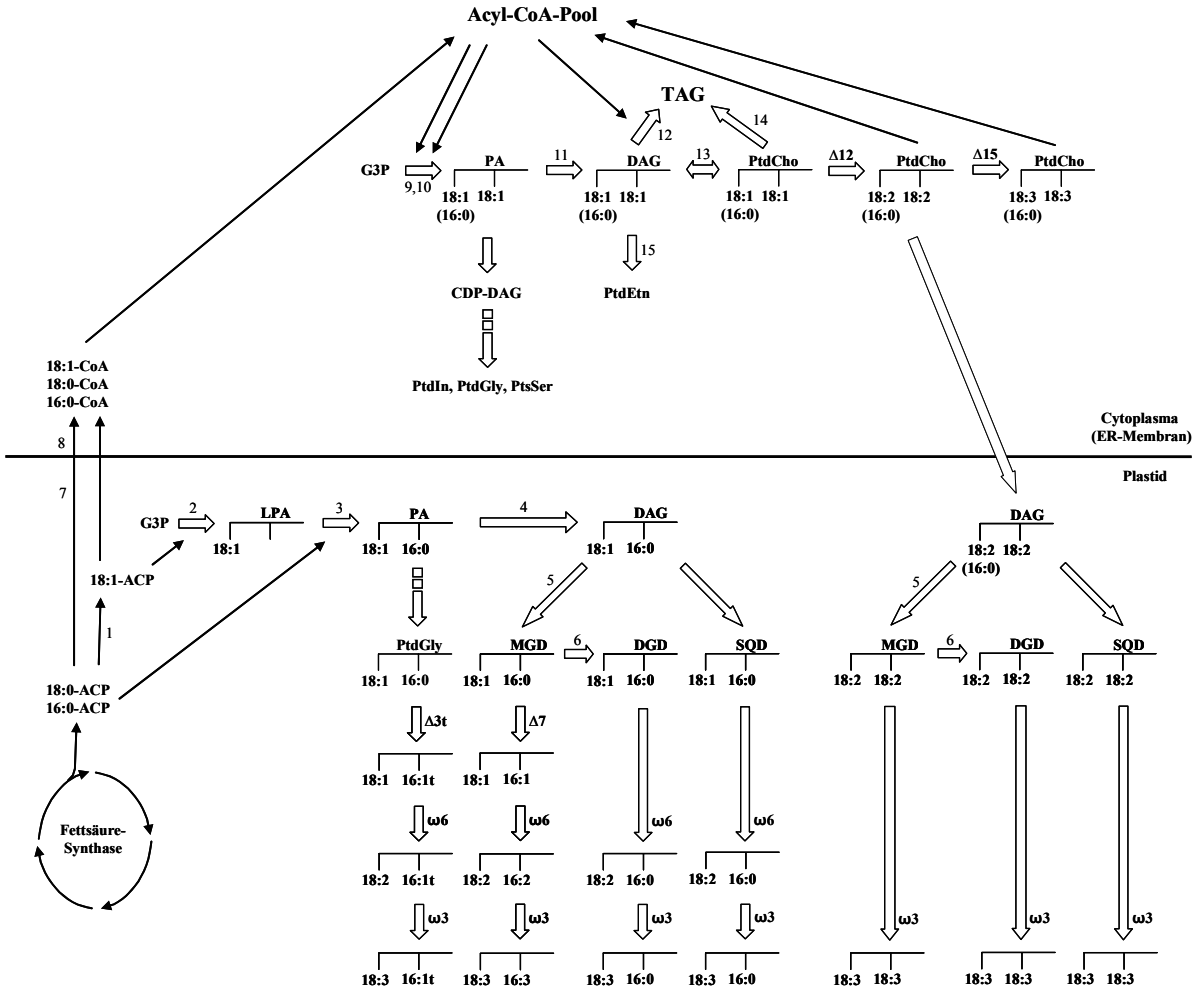


Abb. 1.2: Fettsäure- und Lipidbiosynthese in höheren Pflanzen (modifiziert nach Ohlrogge & Browse, 1995). Die Synthese von Glycerolipiden in Pflanzen erfordert ein Zusammenspiel von Plastiden, Cytoplasma und endoplasmatischem Retikulum (ER). Die Fettsäurebiosynthese erfolgt im Stroma der Plastiden duch die Fettsäure-Synthase. Die Acyl-ACPs werden für die plastidäre Glycerolipidsynthese verwendet, oder hydrolysiert, exportiert, mit Coenzym A aktiviert und für die Synthese der Glycerolipide in der ER-Membran verwendet. Der Diacylglycerinanteil des Phosphatidylcholins kann in die Plastide zurückgeführt werden.

Abkürzungen: Glycerin-3-phosphat (G3P), Lysophosphatidsäure (LPA), Phosphatidsäure (PA), Diacylglycerin (DAG), Monogalaktosyldiacylglycerin (MGD), Digalaktosyldiacylglycerin (DGD), Sulfochinovosyldiacylglycerin (SQD), Phosphatidylcholin (PtdCho), Phosphatidylglycerin (PtdGly), Phosphatidylinositol (PtdIn), Phosphatidylserin (PtdSer), Phosphatidylethanolamin (PtdEtn).

Enzyme: Stearoyl-ACP-Desaturase (1), Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase (2), Lysophosphatidsäure-Acyltransferase (3), Phosphatidsäure-Phosphatase (4), UDP-Galaktose:DAG-Galaktosyltransferase (5), UDP-Galaktose:MGD-Galaktosyltransferase (6), Acyl-ACP-Thioesterase (7), Acyl-CoA-Synthase (8), G3P-Acyltransferase (9), LPA-Acyltransferase (10), PA-Phosphatase (11), DAG-Acyltransferase (12), CDP-Cholin:DAG-Phosphocholintransferase (13), Phospholipid:DAG-Acyltransferase (14), CDP-Ethanolamin:DAG-Phosphoethanolamintransferase (15), Δ3-*trans*-Desaturase (Δ3t), Δ7-Desaturase (Δ7), ω6-Desaturase (ω6), ω3-Desaturase (ω3), Δ12-Desaturase (Δ12), Δ15-Desaturase (Δ15).

Die Biosynthese von Fettsäuren erfolgt im Plastidenstroma höherer Pflanzen durch die Komponenten der Fettsäure-Synthase, wobei Acetyl-CoA das Ausgangssubstrat darstellt. Die beiden Hauptprodukte der Synthese sind 16:0-ACP und 18:0-ACP. Durch eine lösliche Stearoyl-ACP-Desaturase wird zumeist eine Δ9-Doppelbindung in 18:0-ACP eingefügt. Die drei resultierenden Fettsäuren 16:0-ACP, 18:0-ACP und 18:1-ACP können direkt durch die plastidären Enzyme Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase und *sn*-1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase (Lysophosphatidsäure-Acyltransferase) zur Synthese von Phosphatidsäure (PA) verwendet werden, oder sie werden durch Acyl-ACP-Thioesterasen hydrolisiert und in das Cytoplasma exportiert (Millar *et al*., 2000; Dörmann *et al*., 1994). Aufgrund der Selektivität der plastidären Acyltransferasen befindet sich primär in der *sn*-1-Position plastidär synthetisierter Lipide 18:1 und in der *sn*-2-Position fast ausschließlich 16:0. Diese Fettsäureverteilung wird aufgrund ihrer Übereinstimmung mit der der Cyanobakterien als 'prokaryotisch' bezeichnet. Die PA wird zur Synthese von Phosphatidylglycerin (PtdGly) verwendet oder durch die PA-Phosphatase zu Diacylglycerin (DAG) dephosphoryliert. Anschließend erfolgt die Übertragung einer Kopfgruppe auf die *sn*-3-Position, so dass Monogalaktosyldiacylglycerin (MGD) und Sulfochinovosyldiacylglycerin (SQD) resultieren. Durch die Übertragung eines weiteren Galaktosemoleküls auf die Kopfgruppe des MGD entsteht Digalaktosyldiacylglycerin (DGD). Bei dem Galaktose-Donator handelt es sich wahrscheinlich um UDP-Galaktose (Kelly & Dörmann, 2002). Die membrangebundenen Desaturasen der Plastiden fügen in successiven Schritten Doppelbindungen in die Acylreste ein. So desaturiert eine 3-*trans*-Desaturase spezifisch 16:0 an der *sn*-2-Position des PtdGly, während 16:0 an der *sn*-2-Position des MGD eine Δ7-*cis*-Doppelbindung erhält. $16:1^{\Delta 7}$ und $18:1^{\Delta 9}$ sind zudem Substrate für eine ω6- und eine anschließende ω3-Desaturierung.

Die aus den Plastiden exportierten Fettsäuren werden zunächst durch eine Acyl-CoA-Synthase aktiviert und dem extraplastidären Acyl-CoA-Pool zugeführt. Dieser stellt die aktivierten Fettsäuren für die Synthese von Glycerolipiden in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) zur Verfügung. Die Synthese von DAG erfolgt im ER wie für die Plastiden beschrieben, jedoch führt die Selektivität der Lysophosphatidsäure-Acyltransferase zu einer als 'eukaryotisch' bezeichneten Fettsäureverteilung mit 18:1 in der *sn*-2-Position. Über den CDP-DAG-Weg entstehen aus PA die Phospholipide Phosphatidylinositol (PtdIn), PtdGly und Phosphatidylserin (PtdSer), während Phosphatidylethanolamin (PtdEtn) aus DAG synthetisiert wird. Aus DAG entsteht zudem durch die reversible Reaktion der CDP-Cholin:DAG-Phosphocholintransferase Phosphatidylcholin (PtdCho). PtdCho und möglicherweise auch andere Phospholipide sind Substrate der mikrosomalen Desaturasen. Diese fügen Doppelbindungen in die Δ12- und Δ15-Positionen der mit der *sn*-1- und *sn*-2-Position veresterten 18:1-Acylreste ein. Durch das Wirken von Phospholipasen und der *sn*-2-spezifischen Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase kommt es zu einem Austausch der Fettsäuren des PtdCho mit dem Acyl-CoA-Pool (Millar *et al.*, 2000; Stymne & Stobart, 1984). Der DAG-Anteil des PtdCho wird zudem für die Synthese der plastidären Glycerolipide verwendet. Der Import in die Plastiden efolgt möglicherweise in Form von DAG und Lyso-PtdCho (Ohlrogge & Browse, 1995; Montgrand *et al*.,

2000). In den Plastiden entstehen so MGD, DGD und SQD mit einer eukaryotischen Fettsäureverteilung. Der Anteil an Plastidenlipiden, die auf dem eukaryotischen Weg entstehen, variiert mit der Pflanzenart und ist bei niederen Pflanzen reduziert. In *Arabidopsis* und Spinat tragen der prokaryotische und der eukaryotische Weg zu ungefähr gleichen Teilen zur Synthese der Plastidenlipide bei. Da diese Pflanzen dadurch einen hohen Anteil von MGD mit prokaryotischer Fettsäurezusammensetzung haben, werden sie auch als 16:3-Pflanzen bezeichnet.

Die Biosynthese von Triacylglycerin (TAG) findet in der ER-Membran auf zwei Wegen statt (Voelker & Kinney, 2001). Zum einen verestert die DAG-Acyltransferase Fettsäuren des Acyl-CoA-Pools mit der *sn*-3-Position von DAG. Über einen zweiten Weg wird durch die Phospholipid:DAG-Acyltransferase der Acylrest in der *sn*-2-Position des PtdCho auf DAG übertragen, so dass TAG entsteht (Dahlqvist *et al*., 2000).

1.2.2 Biosynthese von VLCPUFA

Bisher wurden drei Hauptwege für die Synthese von VLCPUFA beschrieben. Dabei handelt es sich um die miteinander verknüpften ω3- und ω6-Wege aus alternierend agierenden Desaturasen und Elongasen, um den Sprecher-Weg als alternative Route zu den vorherigen Wegen, und um Fettsäure-Polyketidsynthase-Systeme, die unabhängig von Desaturasen und Elongasen fungieren.

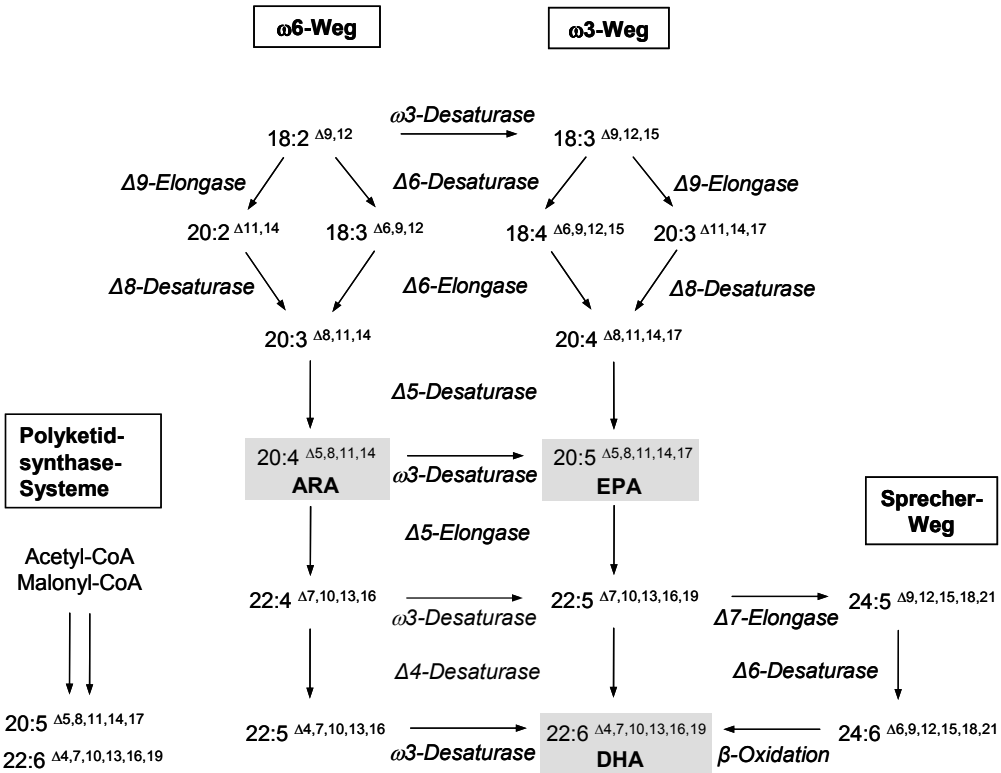


Abb. 1.3: Biosynthesewege für VLCPUFA. Dargestellt sind der ω3- und ω6-Weg, der Sprecher-Weg und die Biosynthese durch Polyketidsynthase-Systeme. Zur Vereinfachung wurde darauf verzichtet, alle ω3-Desaturierungsschritte einzuzeichnen.

1.2.2.1 Der ω3- und ω6-Weg mit Desaturasen und Elongasen

Die Synthese von ARA, EPA und DHA erfolgt bei dem ω3- und ω6-Weg ausgehend von Linolsäure ($18:2^{\Delta 9.12}$) und α-Linolensäure ($18:3^{\Delta 9.12,15}$) durch die abwechselnde Aktivität von Desaturasen und Elongasen. Bei den Desaturasen und Elongasen handelt es sich um membrangebundene Enzyme des ER. Die Bezeichnung der beiden Wege ergibt sich aus der Position der Doppelbindung, die dem Methylende am nächsten ist.

In den ersten Schritten der VLCPUFA-Biosynthese werden die beiden genannten C_{18}-Fettsäuren in Di-homo-γ-linolensäure ($20:3^{\Delta 8,11,14}$) und Di-homo-γ-stearidonsäure ($20:4^{\Delta 8,11,14,17}$) umgewandelt. Dies kann auf zwei unterschiedlichen Wegen geschehen. Der vermutlich am weitesten verbreitete Weg ist die Einführung einer Doppelbindung an der Δ6-Position der Fettsäuren durch eine sauerstoffabhängige Desaturase. Die entstehenden Produkte γ-Linolensäure ($18:3^{\Delta 6,9,12}$) und Stearidonsäure ($18:4^{\Delta 6,9,12,15}$) sind Substrate für eine Elongase, die zwei Kohlenstoffatome an das Carboxylende der Fettsäure anfügt, so dass Di-homo-γ-linolensäure und Di-homo-γ-stearidonsäure resultieren. Die Elongationsreaktion erfordert das Wirken von vier Enzymen, von denen das Erste für die Spezifität und Aktivität der Elongase entscheidend ist (Millar & Kunst, 1997) (Abbildung 1.4). Die kodierenden Sequenzen für eine in die Synthese von VLCPUFA involvierte β-Ketoacyl-CoA-Synthase, dem Kondensierungsenzym der Elongase, wurden aus *Physcomitrella patens* (Zank *et al*., 2002), *Mortierella alpina* (Parker-Barnes *et al*., 2000), *Caenorhabditis elegans* (Beaudoin *et al.*, 2000) und Mensch (Leonard *et al.*, 2000a) isoliert und funktional exprimiert. Ebenso wurde bereits eine Anzahl von cDNAs, die für Δ6-Desaturasen kodieren, aus verschiedenen Organismen isoliert und exprimiert (Kapitel 1.3.1). Für die Algen *Euglena gracilis* und *Isochrysis galbana* wurde eine alternative Route zur Synthese von Di-homo-γ-linolensäure und Di-homo-γ-stearidonsäure beschrieben, die auf dem Wirken einer Δ9-spezifischen Elongase und einer Δ8-Desaturase beruht (Abbildung 1.3) (Wallis & Browse, 1999; Qi *et al*., 2002). Durch eine Desaturierung der beiden Fettsäuren an der Δ5-Position entstehen schließlich ARA und EPA.

Für die Synthese von DHA aus der ω3-Fettsäure EPA ist ein zusätzlicher Elongationsschritt mit anschließender Einführung einer Δ4-Doppelbindung erforderlich. Die Identifizierung und Klonierung von Genen für das Kondensierungsenzym dieser Elongase und der Δ4-Desaturase standen zu Beginn dieser Arbeit noch aus. Zudem lagen durch Voss *et al.* (1991) biochemische Beweise für einen alternativen Weg der DHA-Synthese bei Tieren vor, die die Existenz einer Δ4-Desaturase in Frage stellten (siehe Kapitel 1.2.2.2).

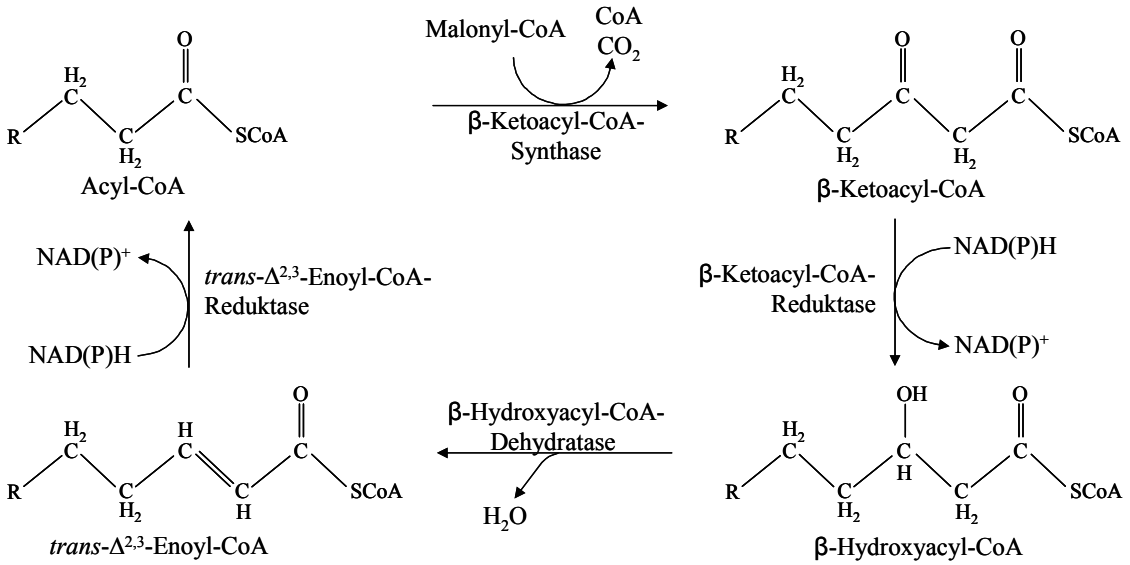


Abb. 1.4: Fettsäure-Elongation. Dargestellt sind die vier Reaktionen der Elongase. Die Aktivitäten liegen auf separaten Proteinen. Die initiierende Reaktion, die Kondensierung eines Acylrestes (möglicherweise wie hier dargestellt Acyl-CoA) mit Malonyl-CoA zum β-Ketoacyl-CoA, wird durch die β-Ketoacyl-CoA-Synthase katalysiert. Der Elongationszyklus kann mehrfach durchlaufen werden.

Der ω3- und der ω6-Weg verwenden Desaturasen und Elongasen, die sowohl ω3- als auch ω6-Fettsäuren als Substrate akzeptieren. So desaturieren z. B. die Δ6-Desaturasen aus dem Moos *Physcomitrella patens* und der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* Linolsäure (18:2$^{\Delta 9,12}$) und α-Linolensäure (18:3$^{\Delta 9,12,15}$) (Girke *et al*., 1998; Domergue *et al*., 2002). Zudem sind beide Wege durch das Wirken von Desaturasen, die eine ω3-Doppelbindung in die Fettsäuren des ω6-Weges einführen, miteinander verbunden. Die ω3-Desaturase FAT-1 aus *Caenorhabditis elegans* desaturiert die C_{18}-Fettsäuren Linol- und γ-Linolensäure, zeigt aber auch Aktivität gegenüber Di-homo-γ-linolensäure und ARA (Spychalla *et al*., 1997; Meesapyodsuk *et al*., 2000). Die Expressionen des Gens in Rattenzellen führte zudem zu einer Erhöhung des Anteils von ω3-desaturierten Fettsäuren (Kang *et al*., 2001). Dies zeigte sich auch in einer Reduktion von 22:4$^{\Delta 7,10,13,16}$ und einem Anstieg von 22:5$^{\Delta 7,10,13,16,19}$, jedoch kann dieses Ergebnis auf einen Rückgang von ARA durch Desaturierung zu EPA zurückzuführen sein, der sich auch in den Elongationsprodukten wiederspiegelt. Auch die FAD3-Desaturase aus *Brassica napus*, die in der Pflanze nicht mit mehrfach ungesättigten C_{20}-Fettsäuren konfrontiert wird, setzt bei Expressionen in Hefe ARA halb so gut um wie ihr natürliches Substrat Linolsäure (Reed *et al*., 2000). Obwohl bisher keine Gene für mikrosomale Desaturasen mit ω3-Spezifität aus Pilzen oder eukaryotischen Algen kloniert wurden, gibt es biochemische Hinweise, dass sie in dem oomycoten Pilz *Saprolegnia parasitica* sowie in den Algen *Phaeodactylum tricornutum* und *Nannochloropsis* sp. auf der C_{20}-Stufe an der Synthese von EPA beteiligt sind (Gellerman & Schlenk, 1979; Arao & Yamada, 1994; Schneider *et al*., 1995). Die ω3-Desaturase des Pilzes zeigt zudem eine Spezifität für C_{20}-Fettsäuren und akzeptiert keine C_{18}-Acylreste.

Trotz der Verwendung von Desaturasen und Elongasen mit Spezifität für ω3- und ω6-desaturierte Acylreste scheinen die beiden Wege gewöhnlich getrennt zu operieren (Kendrick & Ratledge, 1992b). Dies zeigt sich in der positionellen Verteilung von ω3- und ω6-Fettsäuren in den Phospholipiden von lipidreichen Pilzen, bei denen ω3-Fettsäuren bevorzugt in der *sn*-1-Position und ω6-Fettsäuren in der *sn*-2-Position auftreten. Ein Grund hierfür kann die Positionsspezifität der Desaturasen darstellen. So ließ sich für die Δ6-Desaturasen aus *Borago officinalis* und *Mucor circinelloides* eine Spezifität für die *sn*-2-Position demonstrieren (Galle-Le Bastard *et al*., 2000; Kendrick & Ratledge, 1992a). Eine zusätzliche Bevorzugung der *sn*-1-Position durch die ω3-Desaturase kann zu einer positionellen Verteilung mit ARA in der *sn*-2- und EPA in der *sn*-1-Position der Phospholipide führen. Die ω3-Desaturase aus *S. parasitica* verbindet beide Wege wieder, da sie *sn*-2-gebundene ARA in EPA überführt.

1.2.2.2 Der Sprecher-Weg

DHA repräsentiert ca. 7 % der Fettsäuren in den Phospholipiden von Rattenleber, während Docosapentaensäure ($22:5^{\Delta4,7,10,13,16}$) ca. 18 % der Fettsäuren in den Phospholipiden der Hoden dieser Tiere einnimmt (Yin *et al*., 1999). Die Arbeiten von Voss *et al.* (1991) und Yin *et al.* (1999) demonstrierten, dass die Synthese dieser Fettsäuren in den Leberzellen von Ratten über eine von den letzten Schritten des ω3-Weges abweichende Route erfolgt, die als Sprecher-Weg bezeichnet wird. An dem Sprecher-Weg sind neben den Desaturasen und Elongasen des ER auch die peroxisomalen Enzyme der β-Oxidation beteiligt. Voss *et al.* (1991) inkubierten Mikrosomen mit radioaktiv markierter ω3-Docosapentaensäure ($22:5^{\Delta7,10,13,16,19}$) und beobachteten eine Elongation der Fettsäure zu Tetracosapentaensäure ($24:5^{\Delta9,12,15,18,21}$) mit anschließender Desaturierung zu Tetracosahexaensäure ($24:6^{\Delta6,9,12,15,18,21}$). Eine direkte Desaturierung an der Δ4-Position, wie sie für den ω3-Weg beschrieben ist, wurde nicht beobachtet. Wurden jedoch intakte Hepatozyten mit der markierten Docosapentaensäure inkubiert, wurde diese zu DHA umgewandelt, wobei auch geringe Mengen der beiden genannten C_{24}-Fettsäuren in den Phospholipiden detektiert wurden. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die Synthese von DHA aus ω3-Docosapentaensäure über folgende Schritte efolgt: (1) Elongation zu Tetracosapentaensäure ($24:5^{\Delta9,12,15,18,21}$) und (2) Desaturierung zu Tetracosahexaensäure ($24:6^{\Delta6,9,12,15,18,21}$) in der ER-Membran, danach (3) Transport zu den Peroxisomen und (4) partielle β-Oxidation zu DHA. Vergleichbare Studien demonstrierten, dass ω6-Docosapentaensäure ($22:5^{\Delta4,7,10,13,16}$) auf einem analogen Weg aus Docosatetraensäure ($22:4^{\Delta7,10,13,16}$) synthetisiert wird (Sprecher *et al*., 1995). Sowohl die Peroxisomen als auch die Mitochondrien dienen in tierischen Zellen der β-Oxidation von Fettsäuren. Ferdinandusse *et al.* (2001) konnten jedoch mit menschlichen Hautfibroblastzellen aus Patienten mit defekten Peroxisomen oder Mutationen in den Genen der mitochondrialen β-Oxidation langkettiger Fettsäuren zeigen, dass nur die Peroxisomen in die Synthese von DHA involviert sind. Es wird angenommen, dass die entstehenden C_{22}-PUFA zur Veresterung mit den Membranlipiden zum ER zurückkehren, da eine Acyl-

CoA:Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase nicht in den Peroxisomen nachgewiesen werden konnte (Baykousheva *et al*., 1995). Es ist jedoch unklar, weshalb die C_{24}-Fettsäuren keine weiteren Runden der β-Oxidation unterlaufen. Luthria *et al.* (1996) vermuten, dass eine geringe Aktivität der peroxisomalen 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase für den partiellen Abbau der C_{24}-VLCPUFA verantwortlich ist. Da dieses Enzym in der β-Oxidation von Δ4-desaturierten Fettsäuren involviert ist, kann eine reduzierte Aktivität dazu führen, dass nur ein geringer Teil der in den Peroxisomen entstehenden ω6-Docosapentaensäure und DHA weiter degradiert wird, während der größte Anteil diese Fettsäuren in das ER zurückgeführt wird. Die geringe Aktivität der Reduktase wird jedoch von Infante und Huszagh (1998) als ein artifizielles Ergebnis gewertet, das durch einen Mangel an dem Reduktionsäquivalent NADPH entstanden ist. Sie postulierten dagegen einen alternativen Syntheseweg für ω6-Docosapentaensäure und DHA in der äußeren Mitochondrienmembran, an dem ω6- und ω3-spezifische Δ4-Desaturasen beteiligt sind.

1.2.2.3 VLCPUFA-Polyketidsynthasen

Die Isolierung mariner Bakterien mit der Fähigkeit, VLCPUFA wie EPA und DHA herzustellen (1.1.1), warf die Frage nach dem Synthesemechanismus in diesen Organismen auf. Nichols *et al.* (1992) und Metz *et al.* (2001) hatten demonstriert, dass die Synthese der VLCPUFA in marinen Bakterien nicht sauerstoffabhängig erfolgt, und daher eine Beteiligung von Desaturasen angezweifelt werden konnte. Zudem wurden die exogen zugegebenen Fettsäuren Palmitinsäure, Ölsäure, Linolsäure und Di-homo-γ-linolensäure (20:3ω6) in die Phospholipide des EPA-produzierenden Bakteriums *Shewanella* sp. inkorporiert, jedoch nicht umgesetzt (Watanabe *et al*., 1996). Radiomarkiertes Acetat wurde hingegen nur in gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren sowie EPA eingelagert, während keine weiteren ungesättigten Fettsäuren markiert wurden. Yazawa (1996) gelang die Isolierung eines ca. 40 kb großen Genclusters aus dem Bakterium, das bei heterologer Expression in *E. coli* und *Synechococcus* sp. zur Synthese von EPA in den Wirtsorganismen führte (Yazawa, 1996; Takeyama *et al*., 1997). Das Cluster kodierte für neun offene Leserahmen (ORF), jedoch konnte die Zahl der für die EPA-Synthese in *E. coli* essentiellen ORF durch Deletionsstudien auf fünf reduziert werden (Yu *et al*., 2000). Obwohl einige der ORF für Domänen mit Ähnlichkeiten zu Proteinen und Enzymen der Fettsäure-Synthese wie Acyl-Carrier-Protein (ACP), Ketoacyl-ACP-Synthase, Malonyl-CoA:ACP-Acyltransferase und Ketoacyl-ACP-Reduktase aufwiesen, konnte bei keinem der ORF eine Ähnlichkeit zu Desaturasesequenzen festgestellt werden. Tanaka *et al*. (1999) isolierten schließlich aus dem DHA-produzierenden Bakterium *Vibrio marinus* ein Gencluster mit großen Übereinstimmungen in der Organisation zu dem EPA-Cluster von *Shewanella* sp. Sie vermuteten aufgrund der Ähnlichkeit der abgeleiteten enzymatischen Domänen des Clusters zu entsprechenden Funktionen von bekannten Polyketidsynthasen aus verschiedenen Organismen, dass die ORF für multifunktionale Proteine kodieren. Eine Expression des Genclusters aus *V. marinus* führte in *E. coli* nicht zur Synthese von DHA. Dennoch konnten mehrere ORF des *Vibrio*-Clusters die deletierten Homologe des EPA-

Clusters aus *Shewanella* sp. bei Expressionsversuchen in *E. coli* komplementieren. Zudem führte die Komplementation durch einen bestimmten der *Vibrio*-ORF zur Synthese von DHA in *E. coli* (Facciotti *et al*., 2000).

Polyketidsynthasen (PKS) sind große Multienzym-Systeme, die komplexe Naturprodukte wie Antibiotika und Aflatoxine aus einfachen Kohlenstoff-Bausteinen wie Acetyl-CoA, Propionyl-CoA, Malonyl-CoA und Methylmalonyl-CoA synthetisieren (Khosla *et al.*, 1999). Eine zentrale Rolle spielen hierbei die successiven Kondensierungsreaktionen der Kettenverlängerung, die in genetischer und mechanischer Hinsicht der Elongation bei der Fettsäurebiosynthese ähneln. Im Gegensatz zur Fettsäuresynthese folgt jedoch der Kondensierungsreaktion bei PKS nicht immer ein abgeschlossener Zyklus aus Keto-Reduktion, Dehydratation und Enoyl-Reduktion. Durch die teilweise nur partiell durchgeführte Prozessierung der Kohlenstoffkette und der Verwendung verschiedener Starter- und Verlängerungsbausteine entstehen komplexe Muster funktioneller Gruppen. Oft resultieren Kohlenstoffketten mit Keto- und Hydroxygruppen sowie Kohlenstoffdoppelbindungen in *trans*-Konfiguration.

Es werden drei Typen von PKS unterschieden. Typ I-Synthasen bestehen ähnlich den Fettsäure-Synthasen von Vertebraten aus großen Multidomänen-Proteinen, die alle erforderlichen aktiven Zentren tragen. In Typ II-Synthasen sind die aktiven Zentren auf kleine, gewöhnlich monofunktionelle Polypeptide aufgeteilt. Diese Organisation ähnelt den Fettsäure-Synthasen aus Bakterien und Plastiden. Die PKS des letzten Typs sind in Modulen organisiert, die jeweils eine Grundausstattung an Funktionen tragen: β-Ketoacyl-ACP-Synthase, Acyltransferase und ACP. Als zusätzliche Domänen können Kombinationen aus Ketoacyl-Reduktase, Dehydratase, Enoyl-Reduktase und Thioesterase vorhanden sein. Während die wachsende Kohlenstoffkette das PKS durchläuft, erfolgt durch die einzelnen Module jeweils ein Zyklus der Kettenverlängerung und der Modifizierung der funktionellen Gruppen.

Die putativen, für die Synthese der VLCPUFA in Bakterien verantwortlichen PKS weisen in ihrem strukturellen Aufbau Ähnlichkeiten zu den modulären PKS auf. Die katalysierte Reaktionssequenz, die auch zur Einführung von Doppelbindungen in *cis*-Konfiguration führt, ist weitgehend ungeklärt. Zwei Domänen des EPA-Clusters aus *Shewanella* sp. zeigen Homologie zu dem fabA-Gen aus *E. coli* (Metz *et al*., 2001; Facciotti *et al*., 2000). Das fabA-Gen kodiert für ein bifunktionales Enzym, das sowohl die Dehydratisierung eines Hydroxyacylrestes als auch die anschließende Isomerisierung und Verschiebung der durch die Dehydratisierung entstandenen *trans*-Doppelbindung zur *cis*-Doppelbindung katalysiert. Möglicherweise tragen die fabA-homologen Domänen des *Shewanella*-PKS auch zu der Einführung der Doppelbingungen in EPA bei.

1.3 Desaturasen

Desaturasen führen durch das Entfernen von zwei Wasserstoffatomen eine Doppelbindung in Acylreste ein. Die Reaktion ist sauerstoffabhängig und finden wahrschenlich am 2-Eisen-Zentrum der Desaturasen statt. Zudem werden Reduktionsäquivalente benötigt, die durch reduziertes Ferredoxin oder Cytochrom b5 bereitgesellt werden. Abbildung 1.5 zeigt den Reaktionsmechanismus der Desaturierung, wie er z. B. aus Analogie zum 2-Eisen-Zentrum der bakteriellen Methan-Monooxygenase vorgeschlagen wird (Shanklin & Cahoon, 1998; Diekmann *et al*., 2002). Die Elektronen dienen der "Säuberung" des unreaktiven μ-oxo-2-Eisen-Komplexes (Sperling & Heinz, 2001). Durch Bindung von molekularem Sauerstoff kommt es zur Aktivierung des Komplexes. Die Abstrahierung der Wasserstoffatome erfolgt in einer syn-Eliminierung. Anhand von kinetischen Isotopeneffekten konnte für verschiedene *cis*-Desaturierungsreaktionen gezeigt werden, dass die Eliminierung der Wasserstoffatome sequentiell stattfindet, wobei das Carboxyl-nähere Kohlenstoffatom den ersten Angriffspunkt darstellt (Fauconnot & Buist, 2001; Meesapyodsuk *et al.*, 2000). Die Reduktion des Ferredoxins erfolgt durch das lösliche Flavoprotein Ferredoxin:NADP-Oxidoreduktase. Das membrangebundene Cytochrom b5 erhält die Elektronen von der NADH:Cytochrom-b5-Oxidoreduktase und zu einem unbedeutenderen Teil von der NADPH:Cytochrom-P450-Oxidoreduktase. Die Acylreste sind mit einem Acyl-Carrier-Protein (ACP) oder mit Coenzym A (CoA) verestert, oder sie sind Bestandteil von Lipiden (Los & Murata, 1998). Man unterscheidet aufgrund von Aminosäuresequenzenvergleichen die nicht miteinander verwandten Gruppen der löslichen und membrangebundenen Desaturasen, obwohl es Ähnlichkeiten in der Verwendung der Cofaktoren sowie der Stereochemie der Wasserstoffabstraktion gibt (Shanklin & Cahoon, 1998; Sperling *et al*., 2003b). Die löslichen Desaturasen führen die erste Doppelbindung in gesättigte Fettsäuren ein, die an ACP gebunden sind. Am häufigsten kommt die Δ9-18:0-ACP-Desaturase (Shanklin & Somerville, 1991; Thompson *et al*., 1991) vor, jedoch stellen auch 14:0-ACP und 16:0-ACP Substrate für Desaturasen dar (Cahoon *et al*., 1992; Cahoon *et al*., 1994; Schultz *et al*., 1996). Die Acyl-ACP-Desaturasen verwenden Ferredoxin als Elektronendonator und wurden bisher nur für die Plastiden von Pflanzen beschrieben. Die membrangebundenen Desaturasen lassen sich aufgrund ihrer Substrate in zwei Gruppen unterteilen: Die Acyl-CoA-Desaturasen der Tiere, Pilze, Algen und Hefen, sowie die Acyl-Lipid-Desaturasen der Pflanzen, Pilze und Bakterien.

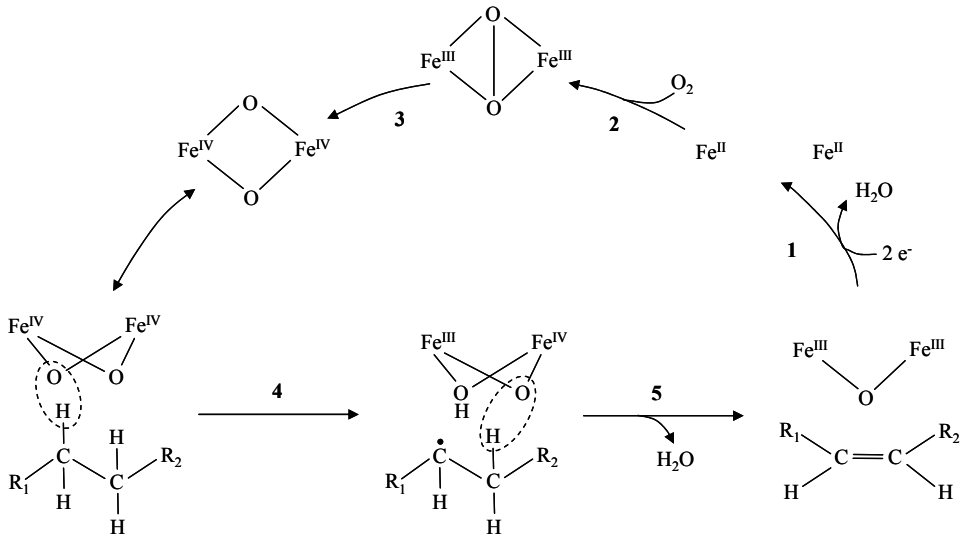


Abb. 1.5: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der Desaturierung. Im Ruhezustand liegt das 2-Eisen-Zentrum oxidiert vor (Fe^{III}-Fe^{III}) und bildet eine µ-oxo-Brücke. (1) Die Übertragung von zwei Elektronen durch Ferredoxin oder Cytochrom b5 führt zur Reduktion zur Fe^{II}-Fe^{II}-Form. (2) Durch Bindung von molekularem Sauerstoff entsteht ein peroxo-Intermediat. (3) Aus der Spaltung der O-O-Bindung resultiert schließlich die aktivierte Form des 2-Eisen-Zentrums (Fe^{IV}-Fe^{IV}). (4) Diese abstrahiert ein Wasserstoffatom von der Methylengruppe des Acylrestes, so dass ein Radikal entsteht. (5) Das Entfernen des zweiten Wasserstoffs führt zur Bildung der Doppelbindung und Regenerierung des oxidierten 2-Eisen-Zentrums.

Bei den membrangebundenen Desaturasen aus Plastiden und Cyanobakterien dient wie bei den löslichen Desaturasen reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator, während die extraplastidären Enzyme Cytochrom b5 verwenden. Das Cytochrom b5 kann in freier Form vorliegen oder an die Desaturase fusioniert sein. Diese Fusion findet man am C-Terminus oder am N-Terminus der Desaturase-Domäne. Einige Desaturasen und Acetylenasen der Moose weisen eine N-terminale Verlängerung der Cytochrom b5-Domäne auf (Girke *et al*., 1998; Sperling *et al*., 2000), so dass auch von einem internen Cytochrom b5 gesprochen wird. C-terminale Fusionen wurden bisher für Acyl-CoA-Desaturasen aus Pilzen, Hefen und Algen beschrieben (Stukey *et al*., 1990; Sakuradani *et al.*, 1999b; Itoh *et al*., 1998).

Die membrangebundenen Desaturasen teilen strukturelle Gemeinsamkeiten mit Enzymen, die eine ähnliche biochemische Reaktion durchführen. Dies trifft z. B. insbesondere für die mit den Δ12-Desaturasen verwandten Hydroxylasen (van de Loo *et al*., 1995), Epoxidasen (Lee *et al*., 1998) und Konjugasen (Fritsche *et al*., 1999; Cahoon *et al*., 2001; Iwabuchi *et al*., 2003) zu. Tatsächlich führt ein Austausch von nur vier Aminosäuren in der Δ12-Desaturase aus *Arabidopsis thaliana* gegen die entsprechenden Reste der Ölsäure-Hydroxylase aus *Ricinus communis* zu einem deutlichen Anstieg der basalen Hydroxylase-Aktivität des Enzyms (Broadwater *et al*., 2002). Es wird angenommen, dass drei sogenannte Histidin-Boxen, konservierte Regionen in den Aminosäuresequenzen von Desaturasen, der Ligandenbindung dienen. Obwohl es geringe Variationen in der Struktur der Histidin-Boxen bei verschiedenen membrangebundenen Desaturasen gibt, lassen sie sich mit den

Motiven $H(X)_{3-4}H$, $H(X)_{2-3}HH$ und $H/Q(X)_2HH$ beschreiben. Ein $H(X)_4H$-Motiv in der ersten Histidin-Box beschränkt sich bisher auf Acyl-CoA-Desaturasen (Wongwathanarat *et al.*, 1999; Zhang *et al*., 1999), während ein $H(X)_3HH$-Motiv in der zweiten Histidin-Box von Acyl-Lipid-Desaturasen mit verschiedener Regiospezifität vorkommt (Tabelle 1.2). Die acht Histidine der Boxen sind für die Funktion der Desaturasen essentiell (Shanklin *et al*., 1994).

Tab. 1.2: Beispiele für die Variationen in der Struktur der Histidin-Boxen verschiedener Acyl-Lipid-Desaturasen.

Position	**1. His-Box**	**2. His-Box**	**3. His-Box**	**Organismus**	**Referenz**
ω3	HXXXH	HXXHH	HXXHH	*Brassica*	Yadav *et al*., 1993
ω6	HXXXH	HXXHH	HXXHH	*Brassica*	Hitz *et al*., 1994
Δ8	HXXXH	HXXHH	QXXHH	*Euglena*	Wallis & Browse, 1999
Δ6	HXXXH HXXXH	HXXHH HXXXHH	QXXHH HXXXHH	*Borago* *Synechocystis*	Sayanova *et al*., 1997 Reddy *et al.*, 1993
Δ5	HXXXH HXXXH	HXXHH HXXXHH	QXXHH QXXHH	*Thraustochytrium* *Mortierella*	Qiu *et al*., 2001 Knutzon *et al*., 1998
Δ4	HXXXH	HXXXHH	QXXHH	*Thraustochytrium*	Qiu *et al*., 2001
Motive	**$H(X)_3H$**	**$H(X)_{2-3}HH$**	**$H/Q(X)_{2-3}HH$**		

Eine Computeranalyse der Hydropathie einer Reihe von membrangebundenen Desaturasen ordnet den Enzymen 4-6 transmembrane Helices zu (Shanklin *et al*., 1994; Diaz *et al*., 2002). Diese entsprechen mit fast 30 % einem großen Anteil an der Aminosäuresequenz (Sperling *et al*., 2003b). Abbildung 1.6 zeigt ein Topologie-Modell, wie es bisher allgemein für Desaturasen des ER mit N-terminaler Cytochrom b5-Fusion akzeptiert wird. Bei einer Annahme von vier transmembranen Helices (TMH) befinden sich die drei Histidin-Boxen auf der cytoplasmatischen Seite der ER-Membran. Da viele Hydropathie-Profile den Enzymen noch ein bis zwei weitere membranspannende Regionen zuordnen, werden in dem Modell zusätzlich zwei membranassoziierte Helices angedeutet. Es wird angenommen, dass es sich nicht um transmembrane Helices handelt, da dann die Histidin-Boxen des aktiven Zentrums an verschiedenen Seiten der Membran positioniert wären. Im Gegensatz zu den nur durch Hydropathie-Profile abgeleiteten Membrantopologien gibt es exprerimentelle Daten für die Δ5-Desaturase aus *Bacillus subtilis* (Diaz *et al*., 2002). Fusionen mit dem Reportergen der Alkalischen Phosphatase und eine Biotinylierung von Lysin-Resten weisen diesem Enzym sechs membranspannende Regionen zu (Abbildung 1.6).

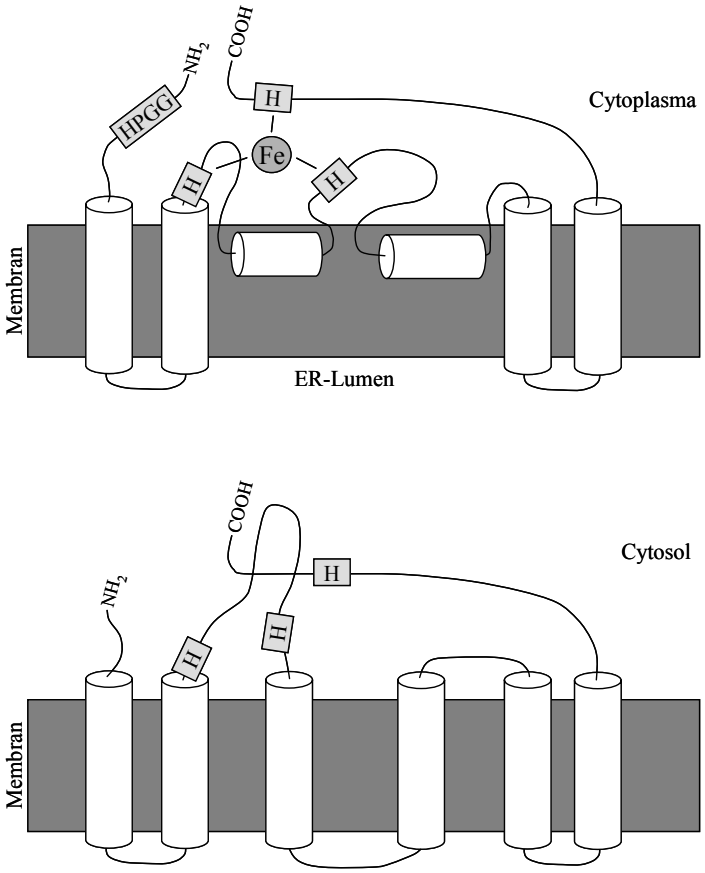


Abb. 1.6: Modelle zur Membrantopologie von Desaturasen am Beispiel der Cytochrom b5-fusionierten Desaturasen des ER (oben) und der Δ5-Desaturase von *Bacillus subtilis* (unten). Die drei Histidin-Boxen und das konservierte HPGG-Motiv des Cytochroms b5 sind angedeutet.

Wie aus Tabelle 1.2 ersichtlich wird, zeigen die membrangebundenen Desaturasen eine große Vielfalt in der Regiospezifität. Die Bezeichnung der Desaturasen nach der Position der Doppelbindung sagt jedoch nichts über den Mechanismus der Regiospezifität aus. Meesapyodsuk *et al*. (2000) schlugen Modelle vor, die die Regiospezifitäten der Desaturasen in Bezug zu den Enden des Acylrestes sowie der Anwesenheit anderer Doppelbindungen setzen (Abbildung 1.7). Die Δ15/ω3-Desaturase aus *C. elegans* besitzt nach diesem Modell eine (ω-3)-Regiospezifität, da sie die Doppelbindung sowohl in C_{16}- als auch C_{20}-Substrate einfügt und neben ω6-Substraten auch ω5- und ω9-Doppelbindungen sowie eine ω6-OH-Gruppe toleriert (Meesapyodsuk *et al*., 2000). Die Δ5-Desaturase aus dem gleichen Organismus akzeptiert sowohl Δ8- als auch Δ11-desaturierte Substrate und repräsentiert damit eine Δ5-Regiospezifität (Watts & Browse, 1999). Aber nicht immer fügen Desaturasen eine Doppelbindung in Relation zu den Enden des Acylrestes ein. Bei der Oleoyl-PC-Desaturase aus *Arachis hypogaea* handelt es sich weder um eine Δ12- noch um eine ω6-Desaturase, da sie neben $18{:}1^{\Delta 9}$ auch $16{:}1^{\Delta 9}$ zu $16{:}2^{\Delta 9,12}$ und $19{:}1^{\Delta 10}$ zu $19{:}2^{\Delta 10,13}$ desaturiert (Schwartzbeck *et al*., 2001). Somit inseriert das Enzym die Doppelbindung in (ν+3)-Abhängigkeit. Aus *Danio rerio* wurde eine Sequenz für eine Desaturase kloniert, die sowohl eine Δ6-Doppelbindung in Linolsäure ($18{:}2^{\Delta 9,12}$) und α-

Linolensäure ($18:3^{\Delta 9,12,15}$), als auch eine Δ5-Doppelbindung in Di-homo-γ-linolensäure ($20:3^{\Delta 8,11,14}$) und Di-homo-γ-stearidonsäure ($20:3^{\Delta 8,11,14,17}$) einfügt (Hastings *et al*., 2001). Eine solche Regiospezifität läßt sich mit (ν-3) beschreiben.

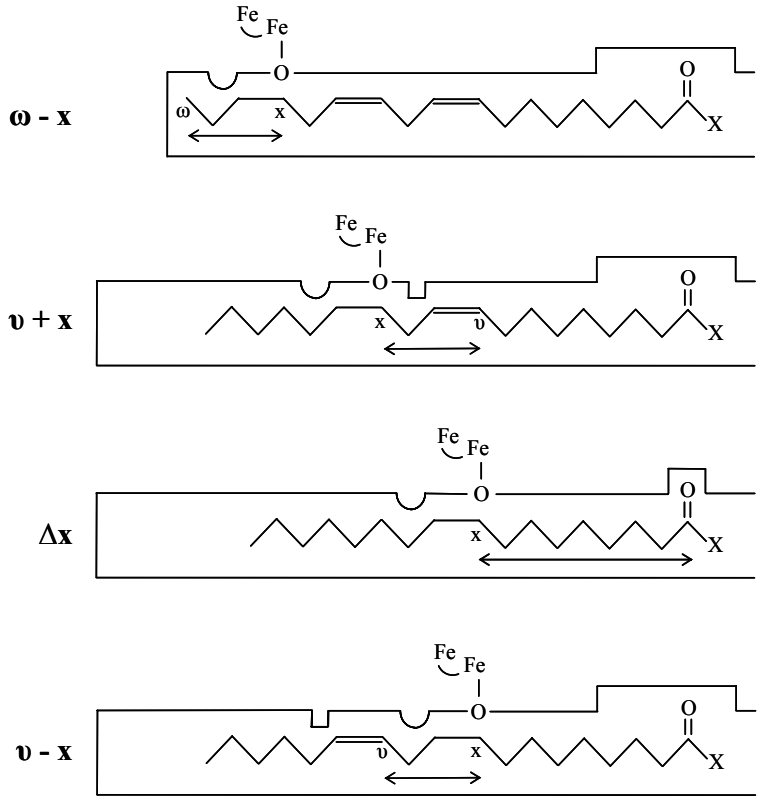


Abb. 1.7: Modelle, die Desaturasen mit unterschiedlicher Regiossspezifität repräsentieren (modifiziert nach Meesapyodsuk *et al*., 2000). Desaturasen mit (ω-x)- oder Δx-Regiospezifität zählen die Kohlenstoffatome ausgehend vom Methyl- bzw. vom Carboxylende des Acylrestes, während (ν+x)- und (ν-x)-Desaturasen den Abstand von einer vorhandenen Doppelbindung in Richtung des Methyl- bzw. Carboxylendes messen.

Acyl-Lipid-Desaturasen weisen z. T. auch eine Substratspezifität gegenüber der Kopfgruppe des Lipids und der *sn*-Positionen des Acylrestes auf, wie sie z. B. in Abbildung 1.2 am Beispiel der plastidären Δ3-*trans*- und Δ7-*cis*-Desaturasen dargestellt ist. Die ω3- und ω6-Desaturasen dagegen zeigen keine Präferenz gegenüber der Kopfgruppe und der *sn*-Position der plastidären Glycerolipide. Die mikrosomalen Δ12- und Δ15-Desaturasen zeigen eine Spezifität für Phospholipide, insbesondere Phosphatidylcholin. Wie die plastidären Enzyme weisen sie keine Spezifität gegenüber der *sn*-Position auf und desaturieren Ölsäure an *sn*-1 und *sn*-2 des Phospholipids (Griffiths *et al*., 1988). Dagegen wurde für die Δ6-Desaturasen aus Pflanzen und Pilzen eine Spezifitiät für die *sn*-2-Position festgestellt (Griffiths *et al*., 1988; Galle-Le Bastard *et al*., 2000; Kendrick & Ratledge, 1992a).

1.3.1 "Front End"-Desaturasen

Mit dem Begriff "Front End"-Desaturasen werden membrangebundene Desaturasen zusammengefasst, die eine N-terminale Cytochrom b5-Fusion aufweisen und eine Doppelbindung zwischen einer vorhandenen Doppelbindung und dem Carboxylende der Fettsäure einfügen (Napier *et al*., 1997). Die Gruppe beeinhaltet Desaturasen mit Δ8-, Δ6-, Δ5- und Δ4-Regiospezifität. Z. Zt. wird nicht zwischen Acyl-Lipid-Desaturasen oder Acyl-CoA-Desaturasen unterschieden, da fast immer ein Nachweis des Desaturasesubstrates aussteht. Tabelle 1.3 repräsentiert "Front End"-Desaturasen, deren Aktivität durch heterologe Expression bestätigt wurden.

Tab. 1.3: "Front End"-Desaturasen. [1]Die Aktivität dieser Desaturase wurde bisher noch nicht nachgewiesen. [2]Dieses Enzym hat sowohl Δ6-Desaturase- als auch Acetylenase-Aktivität.

Regiospezifität	**Organismus**	**Referenz**
Δ4	*Thraustochytrium* sp. *Thraustochytrium aureus*	Qiu *et al*., 2001 AF391543
Δ5	*Bacillus subtilis* *Thraustochytrium sp.* *Mortierella alpina* *Pythium irregulare* *Phaeodactylum tricornutum* *Physcomitrella patens* *Dictyostelium dicoideum* *Caenorhabditis elegans* *Homo sapiens*	Aguilar *et al*., 1998 Qiu *et al*., 2001 Michealson *et al*., 1998a Knutzon *et al*., 1998 Hong *et al*., 2003 Domergue *et al*., 2002 Sperling *et al*., 2003a Saito & Oichai, 1999 Saito *et al.*, 2000 Watts & Browse, 1999 Michaelson *et al*., 1998b Leonard *et al*., 2000b Cho *et al*., 1999b
Δ6	*Mucor rouxii* *Mortierella alpina* *Pythium irregulare* *Phaeodactylum trincornutum* *Ceratodon purpureus* *Physcomitrella patens* *Ceratodon purpureus*[2] *Borago officinalis* *Echium pitardii* *Caenorhabditis elegans* Mensch[1] Ratte Maus	Laoteng *et al.*, 2000 Sakuradani *et al*., 1999a Huang *et al*., 1999 Hong *et al*., 2002 Domergue *et al*., 2002 Sperling *et al*., 2000 Girke *et al*., 1998 Sperling *et al*., 2000 Sayanova *et al*., 1997 Garcia-Maroto *et al*., 2002 Napier *et al*., 1998 Cho *et al*., 1999b Aki *et al*., 1999 Cho *et al*., 1999b
Δ5/6	*Danio rerio*	Hastings *et al*., 2001
Δ8	*Euglena gracilis*	Wallis & Browse, 1999

Alle bisher beschriebenen Sequenzen für "Front End"-Desaturasen weisen einen H/Q-Austausch in der 3. Histidin-Boxen auf. Dieses Merkmal beschränkt sich jedoch nicht auf "Front End"-Desaturasen, sondern findet sich auch bei den Δ8-Sphingolipid-Desaturasen, die mit den pflanzlichen Δ6-Desaturasen nahe verwandt sind (Sperling *et al*., 1998). Sayanova *et al.* (2001) demonstrierten, dass eine Revertierung des H/Q-Austausches in der Δ6-Desaturase von *Borago officinalis* zum Verlust der Aktivität führt.

Obwohl es bereits eine große Auswahl an klonierten cDNAs für "Front End"-Desaturasen mit Δ6- und Δ5-Regiospezifität gibt, beschränkt sich die Kenntnis von Δ4-Desaturasen auf Vertreter der Gattung *Thraustochytrium*. Die Eignung der Desaturasen und Elongasen für die transgene Herstellung von VLPUFA in Ölsaaten hängt nicht nur von der Höhe der Aktivität der Enzyme ab, sondern auch von der Substratspezifität und -selektivität. So führt die Aktivität der Δ5-Desaturasen des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* zu C16- und C18-Dienfettsäuren mit nicht methylenunterbrochenen Doppelbindungen (Saito *et al*., 2000). Auch die bereits erwähnte Aktivität der Δ5-Desaturase aus *C. elegans* (Watts & Browse, 1999) führte bei einer Expression in Hefe zu Fettsäuren mit nicht methylenunterbrochenen Doppelbindungen wie $20{:}3^{\Delta5,11,14}$ oder $20{:}4^{\Delta5,11,14,17}$. Die in den Expressionsversuchen exogen verwendeten Substrate der Desaturase, $20{:}2^{\Delta11,14}$ und $20{:}3^{\Delta11,14,17}$, kommen in den Samen von Ölsaaten nicht vor, jedoch könnten sie in transgenen Pflanzen, die die Elongase aus *C. elegans* (Beaudoin *et al*., 2000), *Isochrysis galbana* (Qi *et al*., 2001) oder *P. patens* (Zank *et al*., 2001) exprimieren, als Elongationsprodukte aus $18{:}2^{\Delta9,12}$ und $18{:}3^{\Delta9,12,15}$ entstehen. Damit könnte sich eine Coexpression dieser Desaturasen und Elongasen in transgenen Ölsaaten als ungünstig erweisen. Während die Spezifität angibt, ob und wie gut ein Substrat von dem Enzym umgesetzt wird, beschreibt die Selektivität die Präferenz von einigen Substraten gegenüber anderen, wenn diese gleichzeitig dem Enzym angeboten werden. Die Expression in den Ölsaaten wird schließlich zeigen, inwieweit die Selektivität der Enzyme den Anteil unerwünschter Fettsäurenebenprodukte beeinflusst, und welche Kombinationen aus Desaturasen und Elongasen für den transgenen Ansatz zur Herstellung von VLCPUFA-Samenöl geeignet ist.

1.4 Problemstellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Die in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse über die wichtigen Rollen von VLCPUFA für die Gesundheit des Menschen führten zu einer intensiven Erforschung von potentiellen Produzenten, die sich für eine industrielle Produktion der Fettsäuren einsetzen lassen. Bei den ausgesuchten Organismen handelt es sich im Wesentlichen um ölreiche Arten der einfachen Pilze und einzelligen Algen, wie sie z. B. durch Oomyceten und Dinoflagellaten repräsentiert werden (Leman, 1997). Die Verwirklichung dieser Pläne schreitet auf zwei unterschiedlichen Wegen fort. Zum einen werden intensiv die Umweltbedingungen untersucht, die eine optimale Produktion der Fettsäuren in diesen Organismen bewirken (de Swaaf *et al*., 1999). Bei einigen Mikroorganismen erfolgt bereits eine Anzucht in Photobioreaktoren und Teichen (Zittelli *et al*., 1999). Zudem werden Gesundheitsrisiken durch den möglichen Verzehr unerwünschter Metaboliten der VLCPUFA-Produzenten untersucht. Der zweite Weg zur Produktion von VLCPUFA führt über transgene Ölsaaten, die Fettsäuren wie ARA, EPA oder DHA in einem zufriedenstellenden Anteil an den Fettsäuren der Speicherlipide synthetisieren sollen (Abbadi *et al*., 2001). Man nahm an, dass die Synthese von ARA, EPA und DHA aus Linol- und Linolensäure auf direktem Wege durch alternierend agierende Desaturasen und Elongasen erfolgt. In rascher Folge gelang die Klonierung von Sequenzen für Desaturasen, die an den ersten Schritten der Synthese von VLCPUFA aus den in den Pflanzen präsenten C_{18}-Fettsäuren beteiligt sind. Daneben konnten auch die ersten cDNA-Sequenzen für die Kondensierungsenzyme der Elongasen isoliert werden, die an der Synthese von ARA und EPA beteiligt sind. Damit stand eine Auswahl an allen Enzymen zur Verfügung, die Linol- und Linolensäure in ARA und EPA umwandeln sollten. Die erfolgreiche Synthese von ARA und EPA durch die Expressionen der entsprechenden Gene in Hefe kann als Beweis für die prinzipielle Durchführbarkeit des Konzeptes der transgenen Herstellung von VLCPUFA gelten.

Für eine direkte Synthese von DHA aus EPA werden zwei weitere Enzyme benötigt, die eine Elongation der Fettsäure um zwei Kohlenstoffatome katalysieren und die letzte Doppelbindung an der Δ4-Position einfügen. Das Gen für die entsprechende Elongase konnte bisher nur aus Mensch kloniert werden (Leonard *et al*., 2000a).

Parallel zur Klonierung der Desaturase- und Elongasegene deuteten biochemische Daten an, dass sich alternative Synthesewege in Säugetieren und marinen Bakterien entwickelt hatten. So konnten Sprecher *et al.* (1995) zeigen, dass die Synthese von DHA in Hoden und Testis von Säugetieren die peroxisomalen Enzyme der β-Oxidation involviert, während aus Bakterien Polyketidsynthase (PKS)-Systeme isoliert wurden, die VLCPUFA durch successive Kondensierung einer wachsenden Kohlenstoffkette mit Malonyl-CoA synthetisieren (Facciotti *et al*., 2000). Der in Säugetieren vorkommende Sprecher-Weg schließt den Einsatz einer Δ4-Desaturase aus, und auch für die bakteriellen Polyketidsynthasen gilt eine aerobe Desaturierung als unwahrscheinlich. Die Isolierung

eines PKS-Systems mit signifikanter Ähnlichkeit zum bakteriellen EPA-PKS aus einem eukaryotischen Organismus deutete darauf hin, dass dieser VLCPUFA-Syntheseweg nicht auf Prokaryoten beschränkt ist (Metz *et al*., 2001). Zudem ließ sich durch diesen Weg die hohe Anreicherung von VLCPUFA ohne signifikante Mengen der durch Desaturasen und Elongasen entstehenden Zwischenprodukte, wie sie insbesondere in Dinoflagellaten und Oomyceten beobachtet wird, erklären.

Unter diesen Voraussetzungen sollten mit der vorliegenden Arbeit zunächst Organismen ausgewählt werden, die nachweislich eine Δ4-Desaturase zur Biosynthese von DHA verwenden. Als Methode wurden *in vivo*-Markierungsversuche mit radiomarkierten Vorstufen der DHA-Synthese ausgewählt. Für die Auswahl der zu untersuchenden Organismen wurden publizierte Fettsäurezusammensetzungen zugrundegelegt, um auf dieser Basis sowohl Repräsentanten der PKS- als auch der Desaturasen/Elongasen-involvierenden Biosynthesewege zu erhalten. Anschließend sollte das Gen für die Δ4-Desaturase durch Polymerase-Kettenreaktion mit degenerierten Primern und durch EST-Massensequenzierungen isoliert werden. Die membrangebundenen Desaturasen, die hier von besonderem Interesse waren, zeigen in der Aminosäuresequenz nur wenige kurze Regionen mit hoher Homologie, die sich im Wesentlichen auf die konservierten Histidin-Boxen des aktiven Zentrums beschränken. Diese Bereiche sollten zum Ableiten der Sequenzen für die degenerierten Primer verwendet werden. Nach erfolgreicher Isolierung eines Gens für eine Δ4-Desaturase sollte der Nachweis der Funktion durch heterologe Expression erfolgen. Hierfür bietet sich die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* an, da es sich um ein eukaryotes System handelt, und die Hefe nur ein sehr einfaches endogenes Fettsäuremuster mit nur einfach ungesättigten Fettsäuren aufweist. Zudem inkorporiert sie exogen zugegebene Fettsäuren in ihre Lipide, die dann den heterolog exprimierten Enzymen als Substrate zur Verfügung stehen. Die Aktivität der Desaturasen ist von der Reduktion des Enzyms durch die Hefe-eigene Elektronentransportkette abhängig. Für viele Desaturasen konnte bereits eine erfolgreiche Interaktion mit den entsprechenden Proteinen gezeigt werden. Anschließend sollte die Sustratspezifität der Desaturase bestimmt werden, da sie ein wichtiges Kriterium für die Anwendung in transgenen Ölsaaten darstellt. Die Anreicherung von Fettsäuren mit ungewöhnlichen Positionen der Doppelbindungen und unbekannten physiologischen Eigenschaften in den Pflanzenölen aufgrund einer mangelnden Substratspezfität der Desaturase ist unerwünscht, da sie eine Beurteilung des Gesundheitsrisikos erfordert. Zusätzlich sollte die Spezifität gegenüber dem Lipidsubstrat, insbesondere hinsichtlich der *sn*-Position untersucht werden, da sich entsprechende Untersuchungen auf wenige Desaturasen mit anderer Regiospezifität beschränken, und dies Aufschluss über funktionelle Gemeinsamkeiten und Unterschiede sowie über mögliche verwandtschaftliche Beziehungen geben könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Verbrauchsmaterial, Enzyme und Chemikalien

2.1.1 Geräte

Gaschromatograph		
Gaschromatograph	H6850 Series	Hewlett Packard
Auto-Injektor	7683 Series	Hewlett Packard
Kapillarsäule	ZB-Wax 52 (30m x 320 µm x 0,5 µm)	Phenomenex
Auswertung	ChemStation Rev. 1.06.03[509]	Hewlett Packard
HPLC-System 1		
Säule	ODS-Hypersil RP-18 (5µm, 4,6 x 250 mm)	Bischoff
Pumpen	110 B Solvent Delivery Module	Beckman
Injektionssystem	System Organizer mit 20 µl Schleife	Beckman
Gradientensystem	System Gold Analog Interface 406	Beckman
Radio-Detektor	LB 507 A,	Berthold
UV-Detektor	System Gold Program Detector 166	Beckman
Auswertung	IBM Personal System/2, Modell 50 System Gold Chromatography	Beckman
HPLC-System 2		
Säule	ODS-Hypersil RP-18 (5 µm, 4,6 x 250 mm)	Bischoff
Pumpen	SpectraSYSTEM SCM1000	Thermo Separation Products Inc.
Injektionssystem	SpectraSYSTEM AS3000	Thermo Separation Products Inc.
Gradientensystem	SpectraSYSTEM SN4000	Thermo Separation Products Inc.
Radio-Detektor	RAMONA Star	Raytest
Lichtstreudetektor	SEDEX75	SEDERE, France
UV-Detektor	UV6000LP	Thermo Separation Products Inc.
Auswertung	ChromQuest Version 2.51	ThermoQuest Corporation
Zentrifugen		
Kühlzentrifuge	5810 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge	Centrikon 324	Kontron
Tisch-Kühlzentrifuge	MICRO 22R	Hettich
Tischzentrifuge	Biofuge 13	Heraeus
Rotoren	A6.9, A8.24, SW60, AS4.13 A-6-24	Kontron Eppendorf
Sonstige Geräte		
Elektrophoresekammern	Horizon 11.14	Gibco BRL
Elektroporator	Electroporator 2510	Eppendorf
Netzgeräte	PS304	Life Technologies
pH-Meter	766 Calimatic	Knick
Photometer	20 GENESYSTEM	Spectronic
UV-Photometer	GeneQuant II	Pharmacia Biotech
Bioimager	BAS-1000	Fujifilm
Hybridisierungsofen	OV2	Biometra
Ultraschallbäder		
unbeheizt	BRANSONIC 220	B. Braun
beheizbar	TRANSSONIC DIGITAL	Elma
Wasserheizbäder	THERMOMIXTM MM	B. Braun
Sterilbank	DLF/BSS4	Woerdau
Heizplatte/Magnetrührer	IKAMAG®RCT	IKA
Vortexschüttler	REAX 2000	Heidolph

Thermo-Cycler	PRIMUS	MWG Biotech
	T Gradient	Biometra
Thermo-Schüttler	Thermomixer compact	Eppendorf
UV-Crosslinker	UVC 500	Hoefer
UV-Transilluminatoren	UVT-28M	Herolab
	MultiImage™ Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation
Ultraschallstab	LABSONIC 2000	B. Braun
Videoprinter	429 K	Herolab

2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Isotope

Handelsübliche Grundchemikalien, Lösungsmittel, Puffersubstanzen, Detergenzien, Nährmediengrundstoffe, Kohlenhydrate, Vitamine, Aminosäuren und Antibiotika wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Fluka (Neu-Ulm), Biomol (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt), Duchefa (Haarlem, Niederlande), BD Biosciences Clontech (Heidelberg) und Carl Roth (Karlsruhe) bezogen. Fettsäuren wurden von der Firma Sigma-Aldrich geliefert.

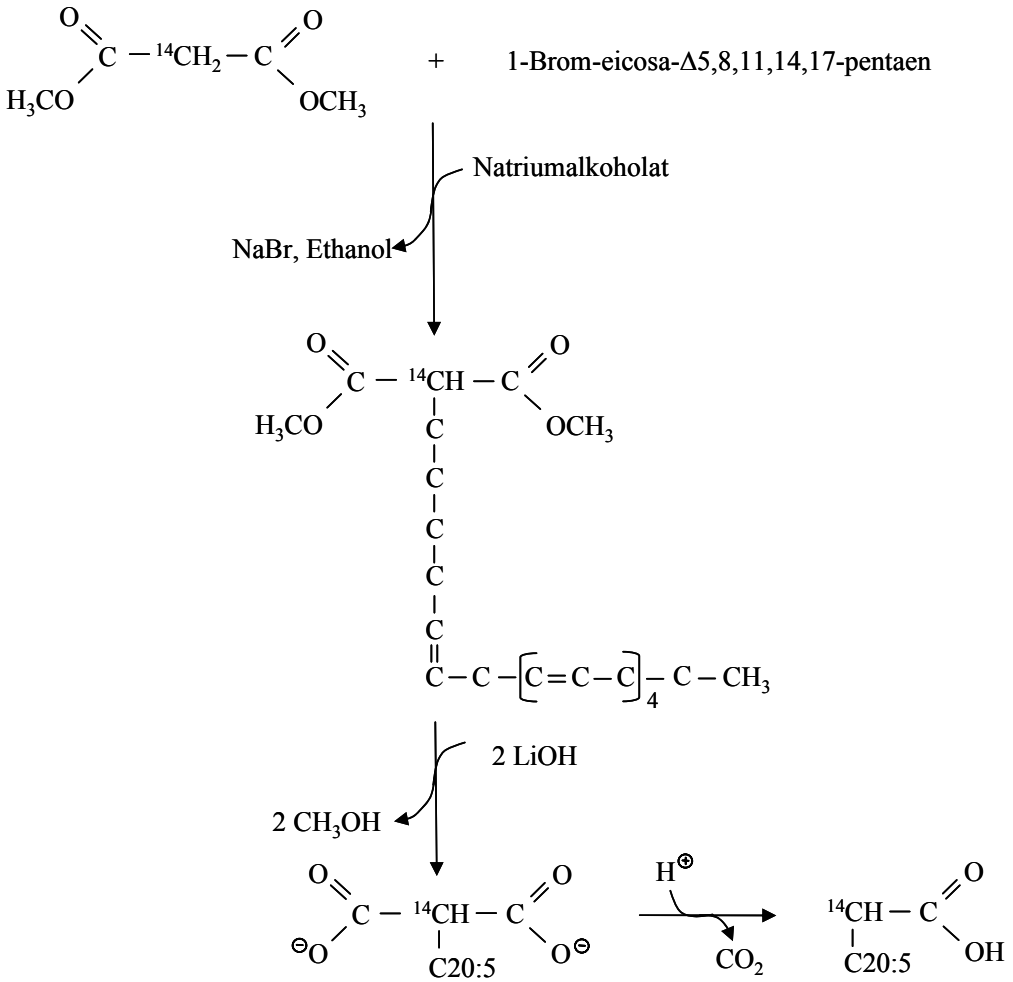
DNA-modifizierende Enzyme und Feinchemikalien für molekularbiologische Methoden wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Life Technologies (Karlsruhe), Amersham Pharmacia (Freiburg) und New England Biolabs (Schwalbach/Taunus) bezogen. Oligonuklotide lieferten die Firmen Sigma-ARK (Darmstadt), Life Technologies (Braunschweig) und Invitrogen (Groningen, Niederlande). Kits für molekularbiologische Anwendungen wurden von den Firmen Qiagen (Hilden), Machery und Nagel (Düringen), Promega (Mannheim), Stratagene (Amsterdam-Zuidoost, Niederlande) und BD Biosciences Clontech (Heidelberg) geliefert.

Die radioaktiv markierten Fettsäuren [2-^{14}C]Docosapentaensäure (40,8 mCi/mmol) und [2-^{14}C]Docosatetraensäure (40,8 mCi/mmol) wurden von der BASF AG (Ludwigshafen) zur Verfügung gestellt. [1-^{14}C]Ölsäure (ca. 50 mCi/mmol) und [1-^{14}C]Acetat (ca. 50 mCi/mmol) lieferte die Firma Amersham Pharmacia.

2.1.2.1 Synthese von [2-^{14}C]Docosapentaensäure und [2-^{14}C]Docosatetraensäure

Die Synthese von [2-^{14}C]Docosapentaensäure und [2-^{14}C]Docosatetraensäure erfolgte freundlicherweise durch Herrn Dr. Schlecker (BASF AG). 191 mg (1,45 mmol) [2-^{14}C]Dimethylmalonat wurden bei RT zu 730 µl (1,47 mmol) Natriumethylat (in Ethanol abs.) zugegeben. Die Mischung wurde 5 min bei RT gerührt, dann wurden 254 mg (0,949 mmol) 1-Brom-eicosa-Δ5,8,11,14,17-pentaen bei 50 °C zugegeben. Nach weiteren 3 h Rühren bei 50 °C und 10 h bei RT wurden 10 ml A. dest. hinzugegeben, und die Mischung wurde dreimal mit 20 ml Pentan extrahiert. Die organische Phase wurde isoliert und über Na_2SO_4 getrocknet. Es resultierten 730 mg eines rohen, gelben Öls aus [2-^{14}C]2-Eicosa-Δ5,8,11,14,17-pentaenyl-malonsäuredimethylester, der

ungereinigt im nächsten Schritt verwendet wurde. Der [2-^{14}C]2-Eicosa-Δ5,8,11,14,17-pentaenyl-malonsäuredimethylester wurde in 100 ml Tetrahydrofuran (THF) gelöst und mit 30 ml 1 M LiOH vermengt. Die Mischung wurde 10 bei RT im Dunkeln gerührt. Unter leichtem Druck wurde das THF entfernt, und 30 ml A. dest. wurden zu dem Ansatz gegeben. Dieser wurde mit 50 ml Hexan extrahiert, das anschließend verworfen wurde. Die wässrige Phase wurde mit K_2HSO_4 bis pH 5,0 angesäuert und viermal mit Ether extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und unter Vakuum konzentriert. Es resultierten 172 mg rohe [2-^{14}C]2-Eicosa-Δ5,8,11,14,17-pentaenyl-malonsäure als gelbliches Öl. Die rohe [2-^{14}C]2-Eicosa-Δ5,8,11,14,17-pentaenyl-malonsäure wurden in 6 ml Essigsäure aufgenommen und für 20 min mit einigen Kristallen 2,6-Di-tert.butyl-4-methylphenol inkubiert. Die Bildung von [2-^{14}C]Δ7,10,13,16,19-Docosapentaensäure wurde durch ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestätigt. Die Reinheit betrug laut HPLC-Analyse 84 %. Die Ausbeute lag bei 22 %. [2-^{14}C]Δ7,10,13,16-Docosatetraensäure wurde analog aus 1-Brom-eicosa-Δ5,8,11,14-tetraen synthetisiert. Ausbeute und Reinheit lagen bei 9 % bzw. 65 %.



2.2 Organismen

2.2.1 Bakterien

Escherichia coli XL1-Blue MRF' (Bullock *et al*., 1987)	Δ(*mcrA*) 183, Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1, gyrA96*, *relA1*, *lac*[F'*proAB*, *lacI*^{q}ZΔM15, Tn*10*(tet^r)]
Escherichia coli SOLR™ (Hay & Short, 1992)	e14$^-$(*mcrA*), Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 171, *sbsC*, *recB*, *recJ*, *umuC::*Tn*5*(kan^r), *uvrC*, *lac*, *gyrA96*, *relA1*, *thi-1*, *endA1*, λ^R, [F'*proAB*, *lacI*^{q}ZΔM15] Su$^-$ (nonsupressing)
Escherichia coli BM25.8 (Palazzolo *et al*., 1990)	*supE*44, *thi* Δ*(lac-proAB) [*F′ *traD*36, *proAB*$^+$, *lac*^{q}Z Δ*M15] λimm434 (kann^R)P1 (cam^R) hsdR (r$_{k12}$-m$_{k12}$-)*

2.2.2 Hefen

Saccharomyces cerevisiae 334 (Hovland *et al*., 1989)	MAT α, *pep4-3*, *prb1-1122*, *ura3-52*, *leu2-3*, *reg1-501, gal1*

2.2.3 Pilze und Algen

Art	Stamm	Abteilung
Thraustochytrium sp.	ATCC 26185[2,a]	Oomycota
Schizochytrium sp.	ATCC 20888[2,a]	Oomycota
Cricosphaera carterae (Braarud et Fagerland) Braarud	SAG944-1[1,a]	Haptophyta
Crypthecodinium cohnii (Seligo) Javornicky	ATCC 30556[2,a]	Dinophyta
Euglena gracilis Klebs	SAG 1224-5/3[1,a]	Euglenophyta
Euglena gracilis Klebs	SAG 1224-5/25[1,a] (Stamm Z)	Euglenophyta
MA13	Aus patentrechtlichen Gründen muss hier auf die Benennung und Klassifizierung der Alge verzichtet werden.	

[1] bezogen von der Sammlung für Algenkulturen, Göttingen (SAG)
[2] bezogen von der American Type Culture Collection (ATCC)
[a] axenisch

2.3 Vektoren

Klonierungsvektoren für *Escherichia coli*

Vektor	Selektionsmarker	Referenz
pGEM-T	Amp^R	Promega
pUC18	Amp^R	Yanish-Perron *et al*., 1989
pBluescript II SK-	Amp^R	Stratagene
pTriplEx2	Amp^R	BD Biosciences Clontech

Expressionsvektoren für *Saccharomyces cerevisiae*

Vektor	Selektionsmarker	Referenz
pYES2 (URA+)	Amp^R	Invitrogen

2.4 Anzucht der Organismen

2.4.1 Kultur von *Escherichia coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *Escherichia coli* wurden auf festen oder in flüssigen Vollmedien bei 37 °C angezogen. Die Flüssigkulturen wurden durch Schütteln (180-200 rpm) oder Rotation belüftet.

Zur Selektion plasmidhaltiger Stämme wurde dem Medium Ampicillin (100 µg/ml Endkonzentration) steril zugesetzt. Das Antibiotikum wurde als tausendfache Stammlösung in A. dest. gelöst, sterilfiltiert und bei –20 °C gelagert.

Bei Klonierungen in die Vektoren pUC18 und pGEM-T wurde den Selektionsplatten IPTG und X-Gal zugesetzt

IPTG: 200 µM Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (100 mM Stammlösung in A. dest.)

X-Gal: 80 µg 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid (in 5 ml *N,N*-Dimethylformamid) pro Liter Medium

LB-Medium

LB-Medium (Luria & Bertani Medium) enthielt 25 g/l LB-Broth (Duchefa), zusammengesetzt aus 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl. Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt. LB-Platten enthielten zusätzlich 1,4 % (w/v) Agar (AppliChem).

SOB-Medium

SOB-Medium enthielt 2 % (w/v) Bacto-Pepton (BD), 0,5 % (w/v) Hefeextrakt (BD), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgSO_4$ und 10 mM $MgCl_2$. $MgSO_4$ und $MgCl_2$ wurden als sterile Lösungen nach dem Autoklavieren zugegeben.

SOC-Medium

SOC-Medium enthielt 2 % (w/v) Bacto-Pepton (BD), 0,5 % (w/v) Hefeextrakt (BD), 0,05 % (w/v) NaCl, 10 mM $MgSO_4$, 10 mM $MgCl_2$ und 0,4 % (w/v) Glukose. Glukose, $MgSO_4$ und $MgCl_2$ wurden als sterile Lösungen nach dem Autoklavieren zugegeben

Zelldichte

Die Zelldichte einer *E. coli*-Kultur in Flüssigmedium wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Dabei enstprach eine OD_{600} = 1 einer Zelldichte von 1-2 x 10^9 Zellen/ml.

Dauerkulturen

Zum Anlegen einer Dauerkultur wurde eine Übernachtkultur der Zellen mit dem gleichen Volumen 70 % (w/v) Glycerin (autoklaviert) gemischt und bei -70 °C gelagert.

2.4.2 Kultur von *Saccharomyces cerevisiae*

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *S. cerevisiae* wurden auf festem oder in flüssigem Vollmedium (YPD) oder Minimalmedium (CMdum) bei 30 °C angezogen. Flüssigkulturen wurden durch Schütteln (180-200 rpm) oder Rotation belüftet. Die bei der normalen Anzucht verwendete Glukose im Medium CMdum (s.u.) wurde bei Expressionsversuchen durch die Kohlenstoffquelle Raffinose ersetzt, da Glukose den P_{GAL1}-Promotor des Hefe-Expressionsvektors pYES2 reprimiert (Lohr *et al*., 1995).

YPD

YPD-Medium enthielt 2 % (w/v) Hefeextrakt (BD), 2 % (w/v) Bacto-Pepton (BD) und 2 % (w/v) Glukose. Die Glukose wurde als sterilfiltrierte Lösung nach dem Autoklavieren dazugegeben. YPD-Platten enthielten zusätzlich 2 % (w/v) Bacto-Agar (BD).

CMdum

CMdum-Medium enthielt in einem Liter 1,155 g Dropout Powder (s. u.), 2 % (w/v) Glukose oder Raffinose, 0,67 % (w/v) YNB-AA (*Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids*, BD), 20 mg Histidin, 60 mg Leucin und 40 mg Tryptophan. Die Kohlenhydrate und die Aminosäuren wurden nach dem Autoklavieren als sterilfiltrierte Lösungen zugegeben. CMdum-Platten enthielten zusätzlich 2 % (w/v) Bacto-Agar (BD).

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

Die Substanzen wurden vermischt und mit einem Mörser pulverisiert.

2.4.3 Kultur von *Cricosphaera carterae*

C. carterae wurde in Brackwassermedium (BWM33) oder in dem Minimalmedium ESAW bei einem Licht (35 µE/sm^2)/Dunkel-Wechsel von 8 h/16 h angezogen. Die Anzucht erfolgte bei 23 °C in Standkulturen oder unter leichtem Schwenken. Die Alge wurde ca. alle 3 Wochen auf frischen BWM33-Platten ausgestrichen. In gleichen Abständen wurde eine Flüssigkultur 1:40 (v/v) in 20 ml frischem BWM33-Flüssigmedium verdünnt.

BWM33

	Stammlösung [g/100 ml]	BWM33 [ml]
KNO_3	10	2
K_2HPO_4	1	2
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1	2
Erdextrakt[1]		30
Spurenelemente-Lösung[2]		5
künstliches Meerwasser[3]		455
A. dest.		504

Dem Medium wurden $5 \cdot 10^{-6}$ g/l Cyanocobalamin (Vitamin B12) und $5 \cdot 10^{-4}$ g/l Thiamin (Vitamin B1) zugesetzt. Nach dem Zusammenfügen der Zutaten wurde das Medium sterilfiltriert. Bei BWM33-Platten wurden das A. dest. und der Erdextrakt mit Agar (AppliChem) versetzt und autoklaviert (15 g / l Medium). Nach dem Abkühlen wurden die anderen Medienbestandteile steril zugefügt.

[1]Erdextrakt

Ein 2 l Erlenmeyer-Kolben wurde bis zur 800 ml Markierung mit Vorgartenerde gefüllt. Daraufhin wurde A. dest. eingefüllt, bis der Wasserspiegel ca. 5 cm über der Erde stand. Der Kolben wurde zweimal in einem Abstand von mehr als 24 Stunden autoklaviert und die Erde durch Zentrifugation sedimentiert. Der flüssige Überstand wurde schließlich erneut autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

[2]Spurenelemente-Lösung

Die Spurenelementlösung wurde in zwei getrennten Lösungen (Lösungen I und II) aus Stammlösungen angesetzt. Die beiden Lösungen wurden getrennt autoklaviert und nach dem Abkühlen vereinigt:

Lösung I:

	Stammlösung [g/100 ml]	Lösung I [ml]
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,1	1
$MnSO_2 \cdot 4\ H_2O$	0,1	2
H_3BO_3	0,2	5
$Co(NO_3)_2 \cdot 6\ H_2O$	0,02	5
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,02	5
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,0005	1
EDTA		0,4 g
A. dest.		881

Lösung II:

$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,7 g
EDTA	0,4 g
A. dest.	100 ml

[3]Künstliches Meerwasser

33 g künstliches Meersalz (Tropic Aquamarin, Dreieich-Sprendlingen) wurden in 1 l A. dest. gelöst. Die Lösung wurde sterilfiltriert.

ESAW

Lösung I[1]	100 ml
Lösung II[2]	100 ml
Spurenelemente-Lösung[3]	10 ml
Vitaminlösung[4]	1,3 ml
A. dest.	790 ml

Die Lösungen wurden zusammengegeben und sterilfiltriert.

[1]Lösung I

	[g/l]
NaCl	211,940
Na_2SO_4	35,500
KCl	5,990
$NaHCO_3$	1,736
KBr	0,863
H_3BO_3	0,226
NaF	0,027

[2]Lösung II

	[g/l]
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	95,923
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	13,463
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,216

Lösung I und II wurde getrennt autoklaviert und nach 48 h vereinigt.

[3]Spurenelemente-Lösung

	[g/l]
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	0,612
H_3BO_3	0,380
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6\ H_2O$	0,234
$FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$	0,016
$NaNO_3$	4,667
Natronwasserglas	2,35 ml wurden in 100 ml H_2O gelöst und anschließend mit 1 N HCl auf pH 7,0 eingestellt

Die folgenden Substanzen wurden erst zugegeben, nachdem die obigen Spurenelemente bereits in einem Volumen von 900 ml H_2O gelöst waren:

	[g/l]
$MgSO_4 \cdot H_2O$	0,054
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,0073
$CoSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,0016

Nachdem sich die Spurenelemente in Lösung befanden, wurde die Lösung sterilfiltriert und anschließend 0,6667 g Na_2Glycerophosphat zugegeben, das zuvor in ca. 100 ml A. dest. gelöst und autoklaviert worden war.

[4]Vitaminlösung

B1 ($5 \cdot 10^{-4}$ g/ml)	200 µl
B12 ($2 \cdot 10^{-5}$ g/ml)	100 µl
Biotin ($1 \cdot 10^{-6}$ g/ml)	1 ml

Die Vitaminlösungen wurden sterilfiltriert und bei -20 °C im Dunkeln gelagert.

2.4.4 Kultur von *Crypthecodinium cohnii*

C. cohnii wurde bei 23 °C in dem Medium M460 (modifiziertes ATCC-Medium 460 A2E6) in Standkulturen oder unter leichtem Schwenken angezogen. Dabei wurde die Alge ca. alle 3 Wochen auf frischen M460-Platten ausgestrichen. Zudem wurde ständig eine Flüssigkultur der Alge in 20 ml M460 gehalten, die ca. alle 14 Tage 1:40 (v/v) in frischem Medium verdünnt wurde.

M460:

NaCl	23,48 g
$MgCl \cdot 6\ H_2O$	10,63 g
Na_2SO_4	3,92 g
$CaCl_2 \cdot H_2O$	1,47 g
KCl	0,66 g
$NaHCO_3$	0,19 g
KBr	0,10 g
H_3BO_3	0,03 g
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,04 g
$FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$	0,01 g
Na-Glycerinphosphat	0,15 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,05 g
Tris-Base	3,00 g
$K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$	0,014 g
Na-Glutamat	1,50 g
Glukose	20,0 g
Metall-Mix[1]	3 ml
Vitamine-Lösung[2]	1 ml
A. dest.	ad 1 l

[1]Metall-Mix

EDTA	1 g
$FeCl_3$	0,05 g
H_3BO_3	1 g
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	0,15 g
$ZnCl_2$	0,01 g
$CoCl_2$	0,005 g
A. dest.	100 ml

[2]Vitamine-Lösung

Biotin	0,003 g
Thiamin	1 g
A. dest.	1 l

Nachdem alle Zutaten für das Medium zusammengegeben worden waren, wurde der pH auf 6,4-6,6 eingestellt. Anschließend wurde das Medium autoklaviert. Bei M460-Platten wurden dem Medium 15 g/l Agar (AppliChem) zugefügt.

2.4.5 Kultur von *Euglena gracilis*

E. gracilis wurde bei 23 °C und einem Licht/Dunkel-Wechsel (8 h / 16 h) bei 35 µE/sm^2 in Vollmedium (EM) oder Minimalmedium (EMM) angezogen. Die Anzucht erfolgte in Standkulturen oder unter leichtem Schwenken. Die Alge wurde ca. alle 14 Tage auf frischen EMM- und EM-Platten ausgestrichen. Gleichzeitig wurde sie ca. 1:100 (v/v) in 20 ml frischem EMM-Flüssigmedium verdünnt.

EM

	Stammlösung [g/100 ml]	EM [ml]
Natriumacetat	10	10
Rindfleischextrakt	10	10
Bacto Trypton	10	20
Hefeextrakt	10	20
Erdextrakt*		30
A. dest.		910

*Erdextrakt wie in 2.4.3 beschrieben

Nach Zusammenfügen der Zutaten wurde das Medium autoklaviert. EM-Platten enthielten zusätzlich 15 g/l Agar (AppliChem).

EMM (modifiziert nach Calvayrac & Douce, 1970)

	Stammlösung [g/ml]	EMM [ml]
Lactat	27,275 /500	66
K_2HPO_4	4,565 /200	34
$MgSO_4$	4,93 /200	20,4
$FeCl_3$	0,027 /100	18,5
$ZnSO_4$	2,875 /100	3
$CaCl_2$	2,9404 /200	18
$MnSO_4$	1,69 /100	3,7
$(NH_4)_2HPO_4$	6,603 /500	38
Thiamin		5×10^{-4} g/l
Cyanocobalamin		5×10^{-6} g/l

Die Zutaten wurden zuammengefügt und der pH des Mediums mit HCl auf 3,0 eingetellt. Anschließend wurde das Medium autoklaviert.

2.4.6 Kultur von *Thraustochytrium* sp. und *Schizochytrium* sp.

Die Anzucht der Pilze erfolgte im Dunkeln bei 30 °C in TS-Flüssigmedium im Schüttler oder Rotor, oder auf TS-Festmedium.

TS

Hefeextrakt	2 g
Salzlösung[1]	100 ml
$NaHCO_3$ (10 g/l)	10 ml
KH_2PO_4 (10 g/l)	10 ml
$CaCO_3$ (10 g/l, durch Zutropfen von 1 M HCl in Lösung gebracht)	20 ml
40 % (w/v) Glukose	50 ml
A. dest.	810 ml
Cyancobalamin	1×10^{-6} g/l
Thiamin	1×10^{-5} g/l

Nach Zugabe aller Zutaten wurde das Medium sterilfiltriert. Bei TS-Platten wurde das A. dest. mit dem Hefeextrakt und Agar (15 g/l Medium, AppliChem) versetzt und autoklaviert. Die restlichen Zutaten wurden nach dem Abkühlen steril hinzugefügt.

[1]Salzlösung

NaCl	250 g
Na-Glutamat	20 g
$(NH_4)_2SO_4$	2 g
KCl	10 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	50 g
A. dest.	ad 1 l

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

2.5 Transformation von *Escherichia coli*

2.5.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfogte nach einer Methode von Inoue *et al.* (1990). Hierzu wurden 200 ml SOB-Medium mit 1 ml einer Übernachtkultur von *E. coli* XL1 Blue MFR' angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln (180 – 200 rpm) bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 10 min auf Eis gekühlt und zentrifugiert (4000 x g, 10 min, 4 °C). Die pelletierten Zellen wurden in 80 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen. Nach einer weiteren 10minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 8 ml eiskaltem TB-Puffer mit 0,56 ml DMSO (7% Endkonzentration) resuspendiert. Die jetzt kompetenten Zellen wurden in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei –70 °C gelagert.

TB-Puffer:	10 mM	PIPES pH 6,7 (KOH), sterilfiltriert
	55 mM	$MnCl_2$
	15 mM	$CaCl_2$
	250 mM	KCl

2.5.2 Transformation

Ein Aliquot kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit bis zu 20 µl Ligationsansatz oder Plasmid-DNA vermischt. Nach weiteren 30 min auf Eis wurden die Zellen 90 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Anschließend wurden sie für 2 min auf Eis gekühlt, mit 800 µl SOC-Medium versetzt und 30-60 min bei 37 °C im Rotor inkubiert, um die phänotypische Expression der neuen Eigenschaften zu erlauben. Danach wurden die Zellen pelletiert (22000 x g, 20 sec, RT) und in einem kleineren Volumen SOC-Medium resuspendiert. Ein Transformationsansatz wurde auf 1-2 Selektionsplatten ausplattiert.

SOC-Medium

SOC-Medium enthielt 2 % (w/v) Bacto-Pepton (BD), 0,5 % (w/v) Hefeextrakt (BD), 0,05 % (w/v) NaCl, 10 mM $MgSO_4$, 10 mM $MgCl_2$ und 0,4 % (w/v) Glukose. Glukose, $MgSO_4$ und $MgCl_2$ wurden als sterile Lösungen nach dem Autoklavieren dazugegeben.

2.6 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

2.6.1 Transformation mit der PEG-Methode

Eine Übernachtkultur von *S. cerevisiae* in YPD wurde 1:100 (v/v) im gleichen Medium vedünnt und bis zu einer OD_{600} von 1-2 bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Die exponentiell wachsenden Zellen wurden durch Zentrifugation (4000 x g, 10 min, RT) geerntet und einmal mit 10 ml 0,1 M Lithiumacetat gewaschen. Die Zellen wurden erneut pelletiert, in 10 ml 0,1 M Lithiumacetat aufgenommen und für 1 Stunde bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (3200 x g, 10 min, RT) und in 0,5 ml 0,1 M Lithiumacetat resuspendiert. 50 µl der Zellen wurden mit 1-3 µg Plasmid-DNA vermengt, und der Ansatz wurde 10 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl 40 % (w/v) Polyethylenglukol (PEG) 4000 (in 10 mM Tris/HCl pH 7,5) verdünnt und erneut 10 min bei 30 °C inkubiert. Nach einem 5minütigen Hitzeschock bei 42 °C wurden 900 ml A. dest. zu den Zellen gegeben. Der Ansatz wurde kurz anzentrifugiert (10 sec) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden erneut in 1 ml A. dest. resuspendiert, anzentrifugiert, und der Überstand wurde wieder verworfen. Schließlich wurden die Zellen in 100 µl A. dest. aufgenommen und auf einer Selektionsplatte ausplattiert. Die Platte wurde 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.6.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen

500 ml YPD-Medium mit 10 % (v/v) Glycerin wurden mit 5 ml einer Übernachtkultur der Hefen in Vollmedium angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 1,3-1,5 bei 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4000 x g, 10 min, 4 °C) und in 500 ml eiskaltem A. dest. resuspendiert. Bei allen nachfolgenden Schritten wurde darauf geachtet, dass die Zellen eiskalt gehalten wurden. Die Zellen wurden erneut geerntet und in 250 ml eiskaltem A. dest. aufgenommen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert, erneut pelletiert und anschließend in 0,5-1 ml 1 M Sorbitol + 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in Aliquots von 65 µl bei –70 °C eingefroren. Die Zellen wurden langsam eingefroren, um eine möglichst hohe Viabilität zu erreichen.

2.6.3 Elektroporation

Ein Aliquot elektrokompetenter Hefezellen wurde bei RT aufgetaut und mit bis zu 5 µl möglichst salzfreier DNA vermengt. Die Zellen wurden in eine vorgekühlte Küvette überführt und einem Spannungspuls von 1500 V ausgesetzt. Anschließend wurde sofort 1 ml eiskaltes 1 M Sorbitol hinzugegeben, um die osmotisch gestressten Zellen zu stabilisieren. Die Zellen wurden abzentrifugiert (22000 g, 30 sec, RT), in ca. 200 µl 1 M Sorbitol resuspendiert und auf einer Selektionsplatte ausplattiert. Die Platten wurden 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.7 Isolierung von Plasmid-DNA

2.7.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Für analytische Zwecke wurde Plasmid-DNA nach der Methode der alkalischen Lyse isoliert. Dazu wurde das Protokoll nach Sambrook *et al.* (1989) leicht modifiziert. 1,5 ml einer Übernachtkultur wurden pelletiert und vollständig in 100 µl GET-Puffer (50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,2 M NaOH + 1 % SDS setzte die Lyse der Zellen ein und durfte für maximal 5 min fortschreiten. Daraufhin wurde der Ansatz mit 150 µl 5 M Kaliumacetat versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Durch eine anschließende Zentrifugation (22000 x g, 10 min, RT) erfolgte die Trennung der Zelltrümmer vom plasmidhaltigen Überstand. Der Überstand wurde mit 1 ml Ethanol (abs.) gemischt und erneut 10 min zentrifugiert. Die so gefällte DNA wurde mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, zentrifugiert (22000 x g, 5 min, RT), luftgetrocknet und in 30 µl RNase-haltigem (1 mg/ml) A. dest. aufgenommen.

2.7.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab wurde das DNA-Extraktions-Kit NUCLEOBOND® AX 500 der Firma Machery-Nagel verwendet. Es wurde nach Angaben der Hersteller vorgegangen. Die isolierte, gefällte DNA wurde in 300-500 µl A. dest. aufgenommen.

2.7.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

1-2 ml einer Übernachtkultur von *S. cerevisiae* in YPD wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (22000 x g, 1 min, RT). Das Zellpellet wurde in 200 µl TENS-Puffer resupendiert und mit ca. 700 mg sterilen Glasperlen (0,45-0,5 mm Durchmesser) versetzt. Der Ansatz wurde 1 min gevortext, mit 200 µl Phenol/Chloroform 1:1 (v/v) vermengt, erneut 1 min gevortext und schließlich 2 min zentrifugiert (22000 x g, RT). Die obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und in zwei weiteren Extraktionsschritten mit je 400 µl Phenol/Chloroform 1:1 (v/v) bzw. Chloroform extrahiert. Die zuletzt gewonnene obere Phase wurde mit 40 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 1 ml Ethanol (abs.) versetzt, gemischt, und für 30 min bei –70 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (22000 x g, 30 min, 4 °C) sedimentiert, mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (22000 x g, 5 min, 4 °C), luftgetrocknet und in 10 µl A. dest. aufgenommen. Da so präparierte DNA für eine Restriktionsanalyse in zu geringer Menge und in einem zu geringen Reinheitsgrad vorlag, wurde sie für die Transformation von *E. coli* verwendet (siehe 2.5). Nach ihrer Isolierung aus dem Bakterium wurde sie restringiert und über ein Agarosegel analysiert.

TENS-Puffer:	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA pH 8,0
	0,1 %	SDS

2.8 Isolierung genomischer DNA aus *Euglena gracilis*

Die Isolierung genomischer DNA aus *E. gracilis* erfolgte nach einer modifizierten Methode von Chen & Dellaporta (1994). 100 ml einer dichtgewachsenen Kultur wurden 1 min zentrifugiert (1000 x g, RT), und das Zellsediment wurde in 4 ml Extraktionspuffer (300 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 8), 20 mM EDTA, 1 % SDS und 7 M Harnstoff) resuspendiert und mit 2 ml Phenol/Chloroform 1:1 (v/v) versetzt, gevortext und 10 min geschüttelt. Anschließend wurden die beiden Phasen durch 20minütige Zentrifugation (22000 x g, RT) getrennt, und die obere Phase wurde auf 2 neue Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Jeweils 1 ml Ispropanol wurde dazugegeben, und die Ansätze wurden zur Fällung der Nukleinsäuren 30 min bei –20 °C inkubiert und anschließend 15 min zentrifugiert (22000 x g, RT). Das Sediment wurde mit 80 % (v/v) Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, luftgetrocknet, und schließlich zur vollständigen Lösung bei 65 °C in 500 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) inkubiert. Nachdem die DNA-Lösung kurz auf Eis abgekühlt wurde, wurde sie mit 1 Vol. 5 M LiCl versetzt und 10 min bei RT zentrifugiert (22000 x g), um die RNA zu fällen. Die im Überstand befindliche DNA wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung mit 1/10 Vol. 8 M LiCl und 2 Vol. Ethanol (abs.) vermischt. Schließlich wurde der Ansatz zentrifugiert (15 min, 22000 x g, RT), das Sediment mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und bei 65 °C in 50-100 µl A. dest. resuspendiert.

2.9 Isolierung von RNA

Bei der Isolierung von und beim Umgang mit RNA wurde versucht, die Kontamination mit RNase möglichst gering zu halten. Zudem wurden alle Arbeitsschritte rasch durchgeführt. A. dest. und die Lösungen wurden mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt (A. dest, Natriumacetat) oder mit DEPC-behandeltem A. dest. angesetzt (SDS, Tris/HCl, EDTA, 70 % (v/v) Ethanol). Dazu wurden die Lösungen bzw. das A. dest. vor dem Autoklavieren mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Zudem wurden RNase-freie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet. Flaschen, Spatel, Mörser, Pistille und Rührfische wurden 6-8 h bei 180 °C gebacken. pH-Elektroden wurden 10 min mit 3 % H_2O_2 inkubiert und gründlich mit DEPC-behandeltem A. dest. gespült.

2.9.1 Isolierung von Gesamt-RNA

4 x 50-100 ml einer *E. gracilis*-Kultur in EMM, 50 ml einer *Thraustochytrium* sp.-Kultur in TS-Medium, 50 ml einer *C. cohnii*-Kultur in M460 oder 300-500 ml einer Kultur von *C. carterae* in ESAW wurden zentrifugiert (4000 x g, 5 min, 4 °C), und das Zellpellet wurde in je 4 ml eiskaltem A. dest. resuspendiert und in je 4 Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach erneuter Zentrifugation (22000 x g, 20 sec, RT) wurden die Pellets in je 400 µl TES-Puffer aufgenommen und durch 10 s Vortexen mit 400 µl saurem Phenol (pH 4,3) gemischt. Der Ansatz wurde 30-45 min auf 65 °C erhitzt (mit gelegentlichem kurzen Vortexen) und dann 5 min auf Eis inkubiert und anschließend zur Phasentrennung 5 min zentrifugiert (22000 x g, 4 °C). Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion wurde mit 400 µl saurem Phenol wiederholt, bis die Interphase weitgehend von Verunreinigungen befreit war. Im letzten Extraktionsschritt wurden 400 µl Chloroform verwendet, und eine Inkubation auf Eis entfiel. Die obere Phase wurde vorsichtig mit 40 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,3) und 1 ml eiskaltem Ethanol (abs.) vermischt und 30 min bei 4 °C zentrifugiert (22000 x g). Das RNA-Sediment wurde mit 1 ml eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (15 min, 4 °C, 22000 x g), kurz luftgetrocknet und in 10-50 µl A. dest. aufgenommen. Bei hohem RNA-Gehalt wurde der Ansatz zur vollständigen Lösung 10-20 min bei 65 °C inkubiert.

TES-Puffer	10 mM	Tris/HCl pH 7,5
	10 mM	EDTA
	0,5 % (w/v)	SDS

2.9.2 Isolierung von poly(A)-RNA

Die Isolierung von mRNA erfolgte mit dem Oligotex Maxi Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Es wurde das *Batch Protocol* gewählt. Als Ausgangsmaterial diente zuvor isolierte Gesamt-RNA.

2.10 Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und Oligonukleotiden

Die Konzentration genomischer DNA, Plasmid-DNA, Gesamt-RNA oder von gelösten Oligonukleotiden wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die Extinktion der Probe bei 260 und 280 nm gemessen. OD_{260} = 1 entspricht etwa 50 µg/ml DNA oder 40 µg/ml RNA. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} gibt dabei den Grad der Verunreinigung durch Proteine an. Eine saubere DNA- oder RNA-Präparation sollte einen Quotienten von 1,8-2 aufweisen.

2.11 Synthese von cDNA

Für die Synthese von cDNA wurde die Stratascript Reverse Transcriptase (Stratagene) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.12 Klonierungsmethoden

2.12.1 Restriktion von DNA

Zur Restriktion von DNA wurden die Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs verwendet. Dabei wurden die Enzyme in 5-10fachem Überschuss eingesetzt. 1 Unit definiert sich dabei als Enzymmenge, die 1 µg DNA in einem 50 µl Ansatz in einer Stunde bei optimaler Temperatur vollständig schneidet. Analytische Restriktionsansätze wurden ca. 1 h bei empfohlener Temperatur inkubiert. Präparative Restriktionsansätze wurden mindestens 4 h, meist aber über Nacht inkubiert. Die Restriktion wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft (siehe 2.15).

2.12.2 Behandlung mit Alkalischer Phosphatase

Um einen hohen Ligationshintergrund durch religierte Vektoren, die zuvor mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten worden waren, zu vermeiden, wurden die Vektoren mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP, New England Biolabs) dephosphoryliert. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Anschließend wurde die DNA direkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) oder nach präparativer Agarose-Gelelektrophorese mit dem QIAquick Gel Elution Kit (Qiagen) gereinigt (siehe 2.15.3).

2.12.3 Ligation

Für Ligationen wurde die T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) verwendet. Für eine Ligation wurden 400 U T4 DNA-Ligase eingesetzt. Der Ansatz wurde bei 16 °C über Nacht inkubiert, bevor er für die Transformation von *E. coli* eingesetzt wurde.

2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis *et al*., 1986) wurden zwei unterschiedliche Enzyme verwendet. Die Taq-DNA-Polymerase (Gibco BRL) aus *Thermus aquaticus* wurde für die Amplifikation auf genomischer oder cDNA mit degenerierten

Primern verwendet. Aufgrund ihrer terminalen Transferase-Aktivität konnten die entstandenen PCR-Produkte in den Vektor pGEM-T kloniert werden. Für alle weiteren Amplifikationen wurde die VENT^{TM}-DNA-Polymerase (New England Biolabs) verwendet, die über eine *proof-reading*-Aktivität verfügt. Da sie keine terminale Transferase-Aktivität besitzt, wurden diese PCR-Produkte mit Hilfe des SureClone-Klonierungskits (Amersham Pharmacia) in den *Sma*I-geschnittenen Vektor pUC18 ligiert oder mit der Taq-DNA-Polymerase nachinkubiert und anschließend in den Vektor pGEM-T kloniert (pGEM-T-Klonierungskit, Promega).

Standard Taq-PCR-Ansatz:

10-100 pg	DNA
5 µl	10 x PCR-Puffer
3 µl	$MgCl_2$ (50 mM)
1 µl	dNTPs (10 mM)
100 pmol	Primer 1
100 pmol	Primer 2
2,5 U	Taq-DNA-Polymerase
ad 50 µl	A. dest.

Standard VENT^{TM}-PCR-Ansatz:

10-50 ng	DNA
5 µl	10 x PCR-Puffer
1 µl	dNTPs (10 mM)
100 pmol	Primer 1
100 pmol	Primer 2
5 U	VENT^{TM}-DNA-Polymerase
ad 50 µl	A. dest.

Temperaturprofil:

	96 °C	3 min
30 Zyklen	96 °C	30 sec
	T_m- 5 °C	30 – 45 sec
	72 °C	1 min für 1 kb zu amplifizierende DNA (Taq)
		2 min für 1 kb zu amplifizierende DNA (VENT^{TM})
	72 °C	10 min

Bei PCR-Primern mit sehr unterschiedlichen T_m-Werten wurde eine *touch down*-PCR durchgeführt, bei der die Hybridisierungstemperatur in jedem Zyklus um 0,1-0,3 °C verringert wurde.

Nachinkubation eines VENT^{TM}-PCR-Produktes mit der Taq-DNA-Polymerase:

50 µl	PCR-Ansatz
10 µl	10x PCR-Puffer
6 µl	$MgCl_2$ (50 mM)
10 U	Taq-DNA-Polymerase
ad 100 µl	A. dest.

Der Ansatz wurde 30 min bei 72 °C inkubiert.

Gewöhnlich wurden 10 µl des PCR-Ansatzes zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen. Sollten die Amplifikate direkt in einer Restriktion eingesetzt werden, so wurden sie zunächst mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt. Ansonsten erfolgte die Reinigung der PCR-Produkte nach Auftrennung über Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.15.3).

2.14 Overlap-PCR

Bei der *Overlap*-PCR zur Herstellung eines chimären Konstruktes aus zwei DNA-Fragmenten wurden zunächst die zur fusionierenden Fragmente durch eine PCR wie in Kapitel 2.13 mit der VENT^{TM}-Polymerase amplifiziert. Dabei wurden die Primer so konstruiert, dass das 3'-Ende des vorderen DNA-Fragmentes eine 26 bp lange Sequenzübereinstimmung mit dem 5'-Ende des hinteren DNA-Fragmentes, und das 5'-Ende des hinteren Fragmentes eine 26 bp lange Übereinstimmung mit dem 3'-Ende des vorderen Fragmentes aufwiesen (siehe auch Abb. 3.18). Anschließend wurden jeweils 1 µl der ungereinigten PCR-Ansätze als Matrize in einer weiteren PCR eingesetzt, bei der die ersten 10 PCR-Zyklen ohne Primer abliefen. Dies sollte die Hybridisierung der komplementären Überhänge und die Synthese der fehlenden Sequenz des jeweiligen Fragmentes durch die VENT^{TM}-Polymerase erlauben. Nach den 10 Zyklen wurden das Primerpaar zur Amplifikation des fusionierten Fragmentes hinzugefügt und die PCR-Reaktion für weitere 30 Zyklen fortgesetzt.

2.15 Agarose-Gelelektrophorese

2.15.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Für die Auftrennung von DNA-Restriktionsansätzen, PCR-Produkten und genomischer DNA wurden 0,7 %ige bis 1 %ige Agarosegele in 1 x TBE (89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3) verwendet. Als Probenpuffer diente 1 x GLB (50 % (w/v) Glycerin; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanolblau; 0,5 x TBE). Die Elektrophorese erfolgte in einer horizontalen Kammer bei 80-100 V und 40-100 mA in 1 x TBE. Zur Sichtbarmachung der DNA

wurde entweder dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt (3 µg/100 ml Gel), oder die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit SYBR® Green I (Molecular Probes, Leiden) inkubiert. Dazu wurde eine 100fache Stocklösung des SYBR® Green I 1:6 in 6 x GLB-Puffer verdünnt. 2 µl dieses GLB-Puffers wurden mit 10 µl DNA-Proben vermengt und 10 min bei RT inkubiert, bevor der Ansatz auf das Gel aufgetragen wurde. Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente mit einem Transilluminator (UV-Peak bei 302 nm) sichtbar gemacht und mit der AlphaDigiDoc™ System 1000 Software analysiert.

2.15.2 Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Zur kurzen Analyse der RNA wurden 1,2-1,5 %ige Agarosegele in 1 x TBE angesetzt. Elektrophoresekammer, Gelträger und Kämme wurden zuvor 10 min mit 3 %igem H_2O_2 inkubiert und anschließend sorgfältig mit DEPC-behandeltem A. dest. abgespült. Die RNA-Proben wurden mit je 1 µl Ethidiumbromid (1µg/µl) versetzt. Als Probenpuffer diente 1 x GLB (siehe 2.15.1).

2.15.3 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Zur präparativen Reinigung von PCR-Produkten oder restringierten DNA-Molekülen wurden diese nach präparativer Agarose-Gelelektrophorese mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) eluiert, oder sie wurden direkt nach der Reaktion mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

2.16 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nicht-radioaktiv nach der Methode von Sanger *et al.* (1977) durchgeführt. Sie beruht auf der Verwendung von Didesoxynukleotiden, die aufgrund ihrer fehlenden 3'-OH-Gruppe bei einer DNA-Polymerase-Reaktion zum Kettenabbruch führen. Es wurde eine "Cycle Sequencing"-Methode verwendet, bei der der zu sequenzierende Bereich in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert wird. Die Reaktion wurde mit dem "Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit" der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) durchgeführt. Die Didesoxynukleotide sind hierbei mit einem basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoff konjugiert.

Reaktionsansatz:	0,5-1 µg	DNA-Matrize
	3 µl	BDT *Ready Reaction Mix*
	7 µl	*half term*-Puffer
	15 pmol	Sequenzierungsprimer
	ad 20 µl	A. dest.

Optional wurde dem Ansatz 1 µl 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt.

Temperaturprofil:		2 min	96 °C
	25 Zyklen	30 sec	96° C
		25 sec	47-60 °C
		4 min	60 °C

Anschließend wurde der Ansatz mit 35 µl Ethanol (abs.) gefällt und die DNA durch Zentrifugation (20 min, 20000 g, RT) sedimentiert. Die DNA wurde luftgetrocknet und bis zur gelelektrophoretischen Analyse bei -20 °C gelagert. Die Analyse erfolgte mit dem "ABI Prism 377 DNA Sequencer" (Applied Biosystems, Weiterstadt) durch Frau Ulrike Peters im Haus.

2.17 Computer-gestützte Auswertung von Sequenzdaten

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte am PC mit Hilfe folgender Programme:

CHROMAS 1.4.3	http://trishil.sci.gu.edu.au/~conor/chromas.html
	Editierung von Sequenzdaten anhand ihres "Peakmusters"
CLUSTAL (X 1.81)	Higgins & Sharp, 1988
	Alignments von Sequenzen
BLAST	Altschul *et al.*, 1990
	Sequenzvergleiche mit Sequenzen der “GenBank” von NCBI (National Center of Biotechnology Information)

CLONE (Clone Manager for Windows, Version 4.1, 1995-1996, Scientific & Educational Software)

In silico-Klonierungen

Die Analyse von Proteinen erfolgte im Internet mit folgenden Programmen:

PSORT	http://psort.nibb.ac.jp/ (Nakei & Kanehisa, 1992)
	Vorhersage subzellulärer Lokalisationen von Proteinen
TMHMM 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/ (Krogh *et al.*, 2001)
	Vorhersage der Topologie von Membranproteinen

2.18 Southern Blot-Analyse

2.18.1 Restriktion der genomischen DNA

Je 10 µg genomische DNA aus den *Euglena gracilis*-Stämmen Z und SAG 1224-5/3 wurden mit 50-100 Units verschiedener Restriktionsenzyme für 12 h bei optimaler Temperatur geschnitten. Anschließend wurden die DNA-Fragmente über Nacht in einem 1 %igen TAE-Agarosegel getrennt. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde unter dem UV-Transilluminator überprüft, und die Laufweite des verwendeten Markers wurde mit einem Lineal festgestellt und durch den Photoprinter dokumentiert.

TAE (50x):	242 g	Tris-Base
	51,7 ml	Eisessig
	100 ml	0,5 M EDTA
	ad 1 l	A. dest.

2.18.2 DNA-Transfer auf eine Nylonmebran

Der Transfer der DNA aus dem Agarosegel auf eine NX-Nylonmembran (Pharmacia) erfolgte durch einen Kapillarblot nach Sambrook *et al.* (1989). Die Schritte sind im einzelnen unten beschrieben.

1. Inkubation des Gels für 8 min in 250 mM HCl, um die DNA zu depurinieren
2. 1 min Spülen des Gels in A. dest.
3. 30 min Inkubation des Gels in Denaturierungslösung bei RT
4. 1 min Spülen des Gels in A. dest.
5. 2 x 15 min Inkubation des Gels in Neutralisierungslösung
6. Äquilibrierung des Gels in 20 x SSC

Anschließend wurde ein Kapillarblot aus folgenden Schichten aufgebaut (von unten nach oben):

1. eine Lage Whatman-3M-Papier, dessen Enden in 20 x SSC tauchen
2. das Gel mit der Oberseite auf das Whatman-Papier
3. die Nylon-Membran
4. 3 Lagen Whatman-Papier
5. 10-20 cm Zellstoffpapier
6. eine Glasplatte mit einem leichten Gewicht

Der Transfer der DNA erfolgte über Nacht bei RT. Die DNA wurde am nächsten Tag durch UV-Crosslinken mit 2 x 0,12 J/cm^2 fixiert. Daraufhin wurde die Membran kurz mit A. dest. gewaschen und in der Prähybridisierung eingesetzt.

Denaturierungslösung:	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl

Neutralisierungslösung:	0,5 M	Tris/HCl pH 7,5
	3 M	NaCl
20 x SSC:	3 M	NaCl
	300 mM	Natriumcitrat
	pH 7,0	

2.18.3 Herstellung der DNA-Sonden

Die DNA-Sonden wurden mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers hergestellt. Als Matrize für die PCR wurde ein mit den gleichen Primern amplifiziertes, gereinigtes DNA-Fragment verwendet.

2.18.4 Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschen

Die Membran wurde zunächst in 20 ml der Hybrdisierungslösung DIG Easy Hyb (Roche) prähybridisiert. Dazu wurde sie für mindestens 2 h im Hybridisierungsofen bei 42 °C inkubiert.

Die Hybridisierung erfolgte bei 42 °C über Nacht im Hybridisierungsofen. Bevor die Sonde zur DIG Easy Hyb Hybridisierungslösung gegeben wurde, wurde sie 10 min bei 100 °C denaturiert. Für eine Membran wurden 4 ml Hybridisierungslösung mit einer Sondenkonzentration von ca. 25 ng/µl verwendet. Die verdünnte Sonde wurde nach Gebrauch bei -20 °C gelagert und vor der nächsten Verwendung 10 min bei 68 °C denaturiert.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran zweimal für 5 min bei RT mit 100 ml 2 x Waschlösung unter leichtem Schwenken gewaschen. Dazu wurde die Membran aus dem Hybridisierungsröhrchen genommen und in eine Schale überführt. Es folgten zwei stringente Waschschritte für je 15 min bei 68 °C im Hybridisierungsofen in 100 ml 0,5 x Waschlösung.

2 x Waschlösung:	2 x SSC mit 0,1 % (w/v) SDS
0,5 x Waschlösung:	0,5 x SSC mit 0,1 % (w/v) SDS

2.18.5 Detektion

Die Membran wurde nach den stringenten Waschschritten kurz in Maleinsäurepuffer äquilibriert und dann 60 min unter leichtem Schütteln bei RT in 50 ml 2 x Blocking-Lösung (Roche) inkubiert, um unspezifische Bindestellen auf der Membran abzudecken. Danach wurde die Membran 30 min bei RT und unter leichtem Schwenken mit 50 ml Antikörperlösung inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch zwei 15minütige Waschschritte bei RT in Maleinsäurepuffer abgewaschen.

Für die Detektion wurde die Membran kurz in Detektionspuffer äqulibriert und danach 10 min bei 37 °C im Hybridisierungsofen mit einer CSPD®-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran

luftblasenfrei in Folie eingeschweißt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte durch Belichtung eines Films (HYPERFILM^{TM}, 18 x 24 cm, Amersham Pharmacia Biotech), der je nach Signalstärke 30 min bis 24 h auf die Membran aufgelegt wurde. Die Entwicklung des Filmes erfolgte maschinell.

Maleinsäurepuffer:	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl pH 7,5 (mit NaOH-Plätzchen)
10 x Blocking-Lösung:	10 % (w/v) Blocking Reagent in Maleinsäurepuffer
Antikörperlösung:	20 µl Anti-Digoxigenin-AP (Fab-Fragment konjugiert mit alkalischer Phosphatase, 750 units/ml) in 200 ml 2 x Blocking-Lösung
Detektionspuffer:	0,1 M Tris/HCl pH 9,5 0,1 M NaCl
CSPD®-Lösung:	2 µl 25 mM 3-(4-Methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'chloro)tricyclo[3.3.1^{3,7}]decan}-4-yl)phenylphosphat, Dinatriumsalz in 2 ml Detektionslösung

2.19 Isolierung von cDNA-Klonen aus cDNA-Banken

Durch PCR mit degenerierten Primern und EST-Sequenzierungen wurden putative "Front End"-Desaturase-Klone aus *Cricosphaera carterae* und *Euglena gracilis* Stamm Z isoliert. Für die Isolierung der Volllängen-cDNA-Klone standen cDNA-Banken zur Verfügung, die bereits in EST-Sequenzierungsprojekten verwendet wurden. Hierbei handelt es sich um eine λZAPII (Stratagene) cDNA-Bank von *E. gracilis* und um eine λTriplEx2 (Clontech) cDNA-Bank von *C. carterae*. Die RNA für die Herstellung der *C. carterae* cDNA-Bank wurde aus einer eigenen Kultur der Alge in ESAW-Medium isoliert.

2.19.1 Anzucht der bakteriellen Wirtszellen für die Infektion

1 ml einer LB-Übernachtkultur von *E. coli* XL1 Blue MRF' wurde in 50 ml eines mit 0,2 % (w/v) Maltose und 10 mM $MgSO_4$ supplementierten LB-Mediums verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,5-1 bei 37 °C angezogen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000 g, 10 min, 4 °C) sedimentiert und zu einer OD_{600} von 0,5 in 10 mM $MgSO_4$ resuspendiert. Die Zellen konnten bis zu 2 Tage bei 4 °C gelagert werden.

2.19.2 Ermittlung des Phagentiters der cDNA-Bank

Für die Bestimmung der Phagenkonzentration in *plaque-forming units (pfu)*/µl wurden *E. coli* XL1 Blue MRF'-Zellen mit verschiedenen Verdünnungen der cDNA-Bank infiziert und ausplattiert. Dabei

wurden Verdünnungsreihen der Phagen bis zu einer Verdünnung von 1:10^8 in SM-Puffer erstellt.

Jeweils 600 µl der vobereiteten Bakterienzellen wurden für 15 min mit 10 µl der Phagenverdünnung bei 37 °C inkubiert, anschließend mit 6,5 ml 48 °C warmen Top-Agar vermischt und auf eine große NZY-Platte (∅ = 130 mm) gegossen und gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden für 10-12 h bei 37 °C inkubiert, bis sich Plaques von 1-2 mm Durchmesser gebildet hatten. Aus der Anzahl der Plaques pro Platte und den verwendeten Verdünnungen konnte der Phagentiter errechnet werden.

SM-Puffer:	5 g/l	NaCl
	2 g/l	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
	50 mM	Tris/HCl pH 7.5
	0,01 % (w/v)	Gelatine

NZY-Platten:	5 g/l	NaCl
	2 g/l	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NZ-Amin (Caseinhydrolysat)
	pH 7,5 mit NaOH	
	15 g/l	Difco-Microagar

Gewöhnlich wurde das NZY-Medium von Difco verwendet.

Top-Agar: wie NZY-Platten, jedoch 0,7 % (w/v) Agarose anstatt Agar

2.19.3 Plattieren der cDNA-Bank

Das Plattieren der cDNA-Bank erfogte wie in 2.19.2 beschrieben. Pro 600 µl Zellen wurden 5x10^4 *pfu* verwendet. Für das erste Durchmustern der Bank wurden 10 große NZY-Platten verwendet. Beim zweiten Durchmustern positiver Signale wurden nur je 200 µl der Bakterienzellen mit 1:100 bzw. 1:200 Verdünnungen der eluierten Phagenplaques aus dem vorhergehenden Durchmustern infiziert und in 4 ml Top-Agar (48 °C) auf kleinen NZY-Platten (∅ = 82mm) verteilt.

2.19.4 Plaque-Transfer auf Nylon-Membranen

Durch luftblasenfreies Auflegen der Nylon-Membranen auf den Top-Agar der NZY-Platten wurden die Phagen auf die Membran transferiert. Die Platten waren zuvor mindestens 2 h bei 4 °C gekühlt worden, um ein Festhaften des Top-Agars an die Membranen zu verhindern. Membran und Platte wurden durch mehrfache Nadelstiche markiert, damit später positive Signale den entsprechenden Plaques zugeordnet werden konnten. Die Membranen mit den anhaftenden Phagenpartikeln wurden vorsichtig von den Platten abgezogen, 5 min denaturiert, 5 min neutralisiert und 15 min mit 2 x SSC gewaschen. Dazu wurden die Membranen mit den Phagen auf der Oberseite auf 2 Lagen Whatman 3M-Papier gelegt, die mit den entsprechenden Lösungen getränkt worden waren. Nach kurzem

Trocknen der Membranen wurde die DNA durch UV-Crosslinken mit 0,12 J/cm^2 fixiert.

Denaturierungslösung:	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl
Neutralisierungslösung:	1 M	Tris/HCl pH 7,5
	1,5 M	NaCl
2 x SSC:	0,3 M	NaCl
	30 mM	Natriumcitrat
	pH 7,0	

2.19.5 Sonden-Synthese, Plaque-Hybridisierung und Waschen

Die Sonden-Synthese, die Prähybridisierung und die Hybridisierung erfolgten wie in 2.18.3 und 2.18.4 beschrieben, jedoch wurden die Membranen zusammen in einer Schale im Wasserbad und unter leichtem Schütteln in der Hybridisierungslösung inkubiert. Für die Prähybridisierung wurden pro Membran 10 ml, für die Hybridisierung 5 ml der Hybridisierungslösung verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass jede einzelne Membran vollständig mit der Hybridisierungslösung bedeckt war. Die Konzentration der Sonde in der Hybridisierungslösung betrug ca. 25 ng/ml.

Wie bei der Southern-Hybridisierung (2.18.4) beschrieben, wurden die Membranen anschließend 2 x mit 2 x Waschlösung (20 ml pro Membran) bei RT und 2 x stringent mit 0,5 x Waschlösung (20 ml pro Membran) bei 68 °C gewaschen.

2.19.6 Detektion

Im Gegensatz zur Southern-Hybridisierung basiert hier die Detektion nicht auf einem Chemilumineszenz-Signal, sondern auf eine Farbreaktion von 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat (BCIP) und Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT). Hierbei katalysiert die an den Antikörper konjugierte alkalische Phosphatase die Dephosphorylierung von BCIP. Das Reaktionsprodukt oxidiert dann in Gegenwart des Elektronenakzeptors NBT. Zusammen bilden die beiden Reaktionsprodukte einen blauen Niederschlag, der sich am Ort der Reaktionen auf den Membranen absetzt.

Die gewaschenen Membranen wurden 60 min bei RT in 2 x Blocking-Lösung (30 ml pro Membran) geschwenkt und 30 min mit der Antikörperlösung inkubiert (pro Membran 4 µl Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat und 20 ml 2 x Blocking-Lösung). Danach wurden die Membranen kurz in Detektionspuffer äquilibriert und anschließend einzeln mit 10 ml Detektionslösung sowie je 35 µl BCIP-Lösung (50 mg/ml) und NBT-Lösung (100 mg/ml) in Folie eingeschweißt und für 2-24 Stunden im Dunkeln inkubiert, bis sich sichtbare blaue Punkte auf der Membran bildeten. Zum Abstoppen der Reaktionen wurden die Membranen kurz mit A. dest. gewaschen und getrocknet. Aufgrund der Markierung mit Nadelstichen konnten den Signalen Bereiche auf den NZY-Platten, und beim 2. und 3. Durchmustern

einzelne Plaque zugeordnet werden. Diese wurden mit abgeschnittenen Plastik-Pipettenspitzen ausgestochen und über Nacht in 0,5 ml SM-Puffer eluiert. Die Eluate wurden beim wiederholten Durchmustern verwendet, in der *in vivo*-Excision eingesetzt oder im Fall des *C. carterae*-Klons als PCR-Matrize benutzt.

2.19.7 *In vivo*-Excision

Für die *in vivo*-Excision der positiven Phagenklone der cDNA-Bank von *E. gracilis* Stamm Z und der cDNA-Bank aus *C. carterae* gibt es zwei verschiedene Protokolle.

In vivo-Excision der *E. gracilis*-Klone

Die *E. coli*-Stämmen XL1 Blue MRF' und SOLR wurden über Nacht bei 30 °C in LB angezogen. Je 500 µl der Übernachtkulturen wurden verwendet, um 50 ml Hauptkulturen in LB-Medium (SOLR) und LB-Medium supplementiert mit 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO4 (XL1 Blue MRF' Tet^R) anzuimpfen. Die Hauptkulturen wurden unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,2-0,5 angezogen. Die SOLR-Kultur wurde kurz auf Eis abgekühlt und dann bei RT bis zu einer OD_{600} von 0,5-1,0 weiter inkubiert. Die XL1 Blue MRF' Tet^R-Kultur wurde abzentrifugiert (4000 g, 10 min, RT) und zu einer OD_{600} von 1,0 in 10 mM MgSO4 resuspendiert. Anschließend erfolgte die Co-Infektion der XL1-Blue MRF'-Zellen mit den eluierten Phagen und den ExAssist™-Helferphagen. Die Co-Infektion wurde in einem 15 ml Falcon Röhrchen durchgeführt:

200 µl	XL1-Blue MRF'
250 µl	Phageneluat (1:50 in SM-Puffer verdünnt)
1 µl	ExAssist™ Helferphage

Der Ansatz wurde 15 min bei 37 °C inkubiert, mit 2,5 ml LB-Medium verdünnt und weitere 2,5 h unter langsamen Rollern bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 g, 10 min, RT), und der Phagemid-enthaltende Überstand wurde in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Nach 10minütigem Erhitzen bei 70 °C wurde der Ansatz erneut zentrifugiert (4000 g, 10 min, RT), und der Überstand in ein neues Falcon-Röhrchen geschüttet. Die auf diese Weise präparierten Phagemide sind für 1-2 Monate bei 4 °C haltbar.

Die Umwandlung der Phagemide in Plasmide erfolgte in dem F-Pili exprimierenden Stamm SOLR. 200 µl der SOLR-Zellen wurden mit 10 µl der gewonnenen Phagemide gemischt und 15 min bei 37 °C inkubiert. 1 µl des Ansatzes wurde auf LB Amp-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Einzelne Klone wurden einer Mini-Plasmidisolierung unterzogen und durch Restriktion und Sequenzierung analysiert.

In vivo-Excision der *C. carterae*-Klone

Im Gegensatz zum oben beschriebenen Verfahren werden bei dem Protokoll von Invitrogen keine Helferphagen benötigt. Die Excision der Phagen erfolgt ausschließlich in *E. coli* BM25.8.

10 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie von *E. coli* BM25.8 angeimpft und über Nacht bei 31 °C inkubiert (190 rpm). Mit 1 ml dieser Übernachtkultur wurden 10 ml LB-Medium angeimpft, und die Zellen wurden bei 31 °C (190 rpm) inkubiert, bis sie eine OD_{600} von 1,2 erreicht hatten. Anschließend wurden 100 µl 1 M $MgCl_2$ zu der Kultur gegeben. Für die Infektion wurden 200 µl der BM25.8-Zellen mit 2 x 19^8 *pfu* versetzt und vorsichtig mit einer Pipette vermischt. Der Ansatz wurde 1 h bei 31 °C ohne Schütteln inkubiert, dann mit 500 µl LB verdünnt und eine weitere Stunde bei 31 °C geschüttelt (190 rpm). Schließlich wurden 10 bis 100 µl 1:1000 verdünnte Ansätze auf Ampicillin-enthaltenen Selektionsplatten ausgestrichen. Die Platten wurden bis zu 14 h bei 37 °C inkubiert.

Mit dem hier beschriebenen Protokoll wurden zahlreiche Ampicillin-resistente Kolonien erhalten, jedoch konnten keine Plasmide aus den Zellen isoliert werden. Nachdem verschiedene Versuche erfolglos waren, wurden die Phagenklone direkt in einer PCR eingesetzt, um die Inserts zu amplifizieren (siehe 2.13).

2.20 Klonierung rekombinanter Plasmide

Für die funktionelle Identifizierung isolierter cDNA-Klone wurden die offenen Leserahmen mit der Vent™-Polymerase durch PCR amplifiziert und in den Hefeexpressionsvektor pYES2 (Invitrogen) kloniert. Die verwendeten Primer enthielten Restriktionsschittstellen, um eine gerichtete Klonierung der Amplifikate in die multiple Klonierungsstelle des Vektors zu erlauben. Zudem enthielten sie vor dem Startcodon zumeist eine Hefe-spezifische Konsensussequenz zur verstärkten Translation (Donahue & Cigan, 1990). Die Amplifikate wurden entweder mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt, anschließend restringiert und dann nach präparativer Agarose-Gelelektrophorese mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) eluiert, oder sie wurden nach der PCR mit der Taq-Polymerase inkubiert und anschließend aus einem präparativen Agarose-Gel eluiert. Die geschnittenen PCR-Produkte wurden in den ebenfalls geschnittenen Expressionsverktor pYES2 ligiert. Ungeschnittene Amplifikate wurden zunächst in den Klonierungsvektor pGEM-T ligiert und anschließend mit den entsprechenden Enzymen herausgeschnitten, in einem präparativen Agarosegel von pGEM-T getrennt und nach Elution in den entsprechend geschnittenen Vektor pYES2 ligiert. *E. coli* XL1 Blue MRF' wurde mit den Ligationsansätzen transformiert und anhand der erworbenen Ampicillin-Resistenz selektioniert. Positive Klone wurden durch Restriktionsanalyse identifiziert. Anschließend wurden die Plasmide aus den Bakterienzellen isoliert und für die Transformation von *S. cerevisiae* 334 verwendet. Zur Kontrolle der Transformation wurden die Plasmide wieder aus den

Hefezellen isoliert, für die Transformation von *E. coli* eingesetzt, aus dem Bakterium isoliert und sequenziert. Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer befindet sich im Anhang.

Tab. 2.1: Rekombinante pYES2-Plasmide für die heterologe Expression in Hefe.

Konstrukt	cDNA-Klon	Kurzbeschreibung
pYES2-EgDES4-1	egDES	Putative Δ4-Desaturase aus *Euglena gracilis*
pYES2-EgDES4	egDES	Putative Δ4-Desaturase aus *Euglena gracilis* alternatives Startcodon
pYES2-EgDES4del	egDES	Putative Δ4-Desaturase aus *Euglena gracilis* mit Deletion der N-terminalen Extension
pYES2-egD8D4	egDES	chimäre Desaturase aus der Cytochrom b5-Domäne der *Euglena* Δ8-Desaturase und der egDES-Desaturase-Domäne
pYES2-CCA1	ccDES	Putative Δ6-Desaturase oder Δ8-Sphingolipid-Desaturase aus *Cricosphaera carterae*
pYES2-CCA2	ccDES	Putative Δ6-Desaturase oder Δ8-Sphingolipid-Desaturase aus *Cricosphaera carterae* alternatives Startcodon
pYES2-CCA3	ccDES	Putative Δ6-Desaturase oder Δ8-Sphingolipid-Desaturase aus *Cricosphaera carterae* alternatives Startcodon
pY249	TC049	Putative Δ12-Desaturase aus *Thraustochytrium* sp.

2.20.1 Isolierung und Klonierung des Klons ccDES aus *Cricosphaera carterae*

Mit degenerierten Primern für die 2. und 3. Histidin Box (s. Anhang) wurde mit positiven Phagenklonen der cDNA-Bank von *C. carterae* ein 592 bp langes Fragment amplifiziert, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz hohe Ähnlichkeiten zu bekannten "Front End"-Desaturasen aufwies. Das Fragment diente als Matrize bei der Herstellung einer DIG-markierten Sonde. Eine von der BASF Plant Science GmbH (Ludwigshafen) zur Verfügung gestellte cDNA-Bank in λTriplEx2 wurde mit der obigen Sonde nach einem Volllängenklon abgesucht. Aus den bei der Excision gewonnenen Ampicillin-resistenten *E. coli* BM25.8-Zellen konnte jedoch kein Plasmid isoliert werden. Daher wurden die positiven Phagenplaques in 100 µl SM-Puffer resuspendiert, und je 1 µl der Suspension wurden direkt für eine PCR mit der Vent^{TM}- Polymerase eingesetzt. Die Primer wurden so gewählt, dass sie stromaufwärts bzw. stromabwärts der 5'- bzw. 3'- Endes der cDNA an die multiple Klonierungsstelle des Phagen binden. Das größte PCR-Amplifikat mit einer Insertlänge von 1609 bp wurde nach einer Inkubation mit der Taq-Polymerase in den Vektor pGEM-T kloniert und sequenziert. Das amplifizierte Insert erhielt den Namen ccDES. Es konnte anhand der Sequenz nicht festgelegt

werden, ob es sich um einen Volllängenklon handelt, da ein den 3 putativen Startcodons voranstehendes Stopcodon fehlte. Die drei putativen offenen Leserahmen wurde durch PCR amplifiziert und in den Hefe-Expressionsvektor pYES2 kloniert. Es entstanden pYES2-ccDES1, pYES2-ccDES2 und pYES2-ccDES3. Eine Liste der verwendeten Restriktionsschnittstellen befindet sich im Anhang.

2.20.2 Klonierung des cDNA-Klons egDES aus *Euglena gracilis* Stamm Z

Durch Massensequenzierung einer λZAPII-cDNA-Bank aus *E. gracilis* Stamm Z, die freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. W. Martin (Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurde, wurde ein ca. 300 bp langes Fragment mit hoher Ähnlichkeit zur bereits klonierten Δ4-Desaturase aus *Thraustochytrium* sp. (Qui *et al.*, 2001) isoliert. Der Klon wurde als Matrize zur Herstellung einer DIG-markierten Sonde verwendet, die beim Durchmustern der cDNA-Bank eingesetzt wurde. Es wurde ein Klon mit einem 2600 bp großen cDNA-Insert (egDES) isoliert, der zwei putative Startcodons aufwies. Wie bei dem isolierten Desaturase-Klon aus *C. carterae* fehlte ein Stopcodon stromaufwärts der putativen Translationsstartpunkte. Die zwei putativen offenen Leserahmen wurden über PCR amplifiziert und in den Hefe-Expressionsvektor pYES2 kloniert. Es enstanden pYES2-EgDES4-1 und pYES2-EgDES4. Eine Liste der verwendeten Restriktionsschnittstellen befindet sich im Anhang.

2.21 Heterologe Expressionen in *Saccharomyces cerevisiae*

2.21.1 Heterologe Expression zur Identifizierung von Genfunktionen

Die Identifizierung von Genfunktionen erfolgte in *S. cerevisiae* Stamm 334, der neben der zur Selektion plasmid-haltiger Zellen gebräuchlichen Uracil-Auxotrophie eine Deletion des *REG1*-Gens enthält, das für den Glukose-induzierten P_{GAL}-Repressor kodiert. Dieser Repressor wirkt auf den im Hefe-Expressionsplasmid verwendeten Promotor P_{GAL1}. Dennoch wurde bei Expressionen im Stamm 334 auf die Verwendung von Glukose als Kohlenstoffquelle verzichtet, da eine Repression des P_{GAL1}-Promotors noch durch weitere Faktoren vermittelt wird (Lohr *et al*., 1995).

Für die Expressionen wurden 3-5 ml CMdum-Medium mit einer Vorkultur, die zwei Tage bei 30 °C inkubiert (180 rpm) wurde, zu einer OD_{600}=0,05 angeimpft und für 6 h bei 30 °C inkubiert (180 rpm). Anschließend erfolgte die Induktion der Genexpression durch Zugabe von 2 % (w/v) Galaktose. Zum gleichen Zeitpunkt wurden die Fettsäure-Substrate der putativen Desaturasen in einer Konzentration von 300 µM (oder 100 µM im Fall von $16{:}1^{\Delta 7}$) zur Kultur gegeben, da diese nicht von den Hefen synthetisiert werden können.

Für die Expression der putativen Desaturase-Klone aus *C. carterae* sowie *Thraustochytrium* sp. und für die Expression der Δ4-Desaturase-Klone aus *E. gracilis* wurden unterschiedliche Kulturbedingungen gewählt. Zellen mit den Desaturase-Klonen aus *C. carterae* und *Thraustochytrium* sp. wurden nach Galaktose- und Fettsäuresubstrat-Zugabe weitere 24 h bei 30 °C angezogen, wohingegen die Hefen, die die Desaturase-Klone aus *E. gracilis* exprimierten, für 4 Tage bei 15 °C (180 rpm) inkubiert wurden, bevor die Kulturen durch Zentrifugation (4000g, 5 min, RT) geerntet wurden. Nicht inkorporierte Fettsäuren wurden durch zweifaches Waschen mit 5 ml 100 mM $NaHCO_3$ entfernt. Die gesäuberten Zellsedimente wurden direkt zur Derivatisierung der Fettsäuren für die Gaschromatographie eingesetzt.

2.21.2 Heterologe Expression für die Positionsanalyse

Für die Positionsanalyse der Phospholipide Phosphatidylcholin (PtdCho) und Phosphatidylethanolamin (PtdEtn) wurden die Hefen in 100 ml CMdum-Medium kultiviert. Anzucht, Induktion der Genexpression und Substratzugabe erfolgten wie in 2.21.1 für die die *E. gracilis*-Klone exprimierenden Hefen beschrieben, jedoch wurden die Kulturen für eine höhere Zellausbeute 5 Tage anstatt 4 Tage bei 15 °C inkubiert. Die Zellen wurden ebenfalls zweimal mit je 50 ml 100 mM $NaHCO_3$ gewaschen. Ein Aliquot der Zellen (ca. 1/20 des Volumens) wurde direkt zur Derivatisierung der Fettsäuren für die gaschromatographische Analyse eingesetzt (s. 2.22.4). Die restlichen Zellen wurden für eine Extraktion der Gesamtlipide verwendet (s. 2.22.1).

2.22 Lipidanalytik

2.22.1 Isolierung von Gesamtlipiden

Das gesammelte Zellmaterial wurde 10 min in 0,45 % (w/v) NaCl bei 100 °C erhitzt, abzentrifugiert (4000 g, 5 min, RT), mit Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) versetzt und für mindestens 4 h bei 8 °C geschüttelt. Anschließend wurde der Extrakt erneut zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Zellen wurden im 2. Extraktionsschritt für mindestens 12 h mit Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) geschüttelt und erneut abzentrifugiert. Die beiden Lipidextrakte wurden vereinigt, in einem Rotationsverdampfer getrocknet und in Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) aufgenommen. Anschließend wurden die gelösten Lipide mit 0,45 % (w/v) NaCl versetzt, so dass ein Verhältnis von 2:1:1 von Chloroform/Methanol/0,45%NaCl gegeben war, und ausgeschüttelt. Die untere Lösungsmittelphase wurde über eine Wattesäule (gestopfte Pasteurpipette) zur Entfernung von Zellresten in ein neues Gefäß überführt.

2.22.2 Isolierung der Fettsäuren aus Monogalaktosyldiacylglycerin (MGD)

Hexadecatriensäure (16:3$^{\Delta 7,10,13}$) ist eine Fettsäure, die im Monogalaktosyldiacylglycerin (MGD) von 16:3-Pflanzen angereichert ist. Aliquots von je ca. 50 mg MGD aus *Aquilegia vulgaris* wurden mit 1 ml Methanol und 0,5 ml 1 N KOH versetzt und 1 h auf 80 °C erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 ml 1 N HCl angesäuert, und die freien Fettsäuren wurden dreimal mit 2 ml Petrolether extrahiert. Für die Konzentrationsbestimmung der isolierten Fettsäuren wurde ein Aliquot für die gaschromatographische Analyse derivatisiert (2.22.4). Vor der sauren Methanolyse wurde dem Ansatz 16:0 in bekannter Konzentration als interner Standard hinzugefügt. Für Hefe-Expressionsversuche wurden die Fettsäuren des MGD in einer Menge zugegeben, so dass die Konzentration der Hexadecatriensäure in der Kultur 100 µM betrug.

2.22.3 Positionsanalyse der Fettsäuren in Phospholipiden

Die Positionsanalyse erfolgte abgewandelt nach Fischer *et al*. (1973). Der Gesamtlipidextrakt, gewonnen aus den Hefekulturen für die Positionsanalyse (s. 2.21.2), wurde dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel 60-Platten aufgetrennt. Als Laufmittel diente Chloroform/Methanol/Eisessig 65:25:8 (v/v/v). Die Phospholipide PtdCho und PtdEtn wurden getrennt abgekratzt und mit Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) extrahiert. Dazu wurden die Suspensionen 10 min im Ultraschall-Wasserbad inkubiert und anschließend mit 0,45 % NaCl ausgeschüttelt, so dass ein Verhältnis Chloroform/Methanol/0,45%NaCl von 2:1:1 (v/v/v) eingestellt wurde. Die lipidhaltige untere Phase wurde über eine mit Watte gestopfte Pasteurpipette von Kieselgelresten gereinigt. Das PtdCho und das PtdEtn wurden unter Argon eingeengt und jeweils in 200 µl Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) aufgenommen. Je 20 µl der Lipide wurden zur Derivatisierung der Fettsäuren für die gaschromatographische Analyse eingesetzt (s. 2.22.4). Das restliche PtdCho und PtdEtn wurde erneut getrocknet und mit 50 µl 100 % Triton X-110 versetzt. Um die Lipide in dem Detergenz in Lösung zu bringen, wurden die Suspensionen 10 min in ein Ultraschall-Wasserbad (ca. 60 °C) gestellt. Anschließend wurden die Volumen mit jeweils 1 ml 50 mM HEPES / 2 mM $CaCl_2$ (pH 7.2) erhöht, und die Lipide zweimal 10 sec mit einem Ultraschallstab behandelt. Die Volumina wurden daraufhin mit 50 mM HEPES/2 mM $CaCl_2$ (pH 7.2) auf 1,5 ml erhöht und je 10.000 Units der Lipase aus *Rhizopus arrhizus delemar* (SIGMA, Taufkirchen) hinzugegeben. Die Lipase hydrolisiert spezifisch die an die *sn*-1-Position gebundenen Fettsäuren der Lipide. Die Ansätze wurden 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend mit einem Tropfen Eisessig angesäuert. Die entstandenen Gemische aus freie Fettsäuren, Lyso-PtdCho oder Lyso-PtdEtn und verbliebenem PtdCho bzw. PtdEtn wurden in zwei Schritten extrahiert. Zunächst wurde mit Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) ausgeschüttelt, so dass ein Verhältnis von Chloroform/Methanol/Puffer von 2:1:1 (v/v/v) entstand. Die untere Phase wurde über eine mit Watte gestopfte Pasteurpipette in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurde der Puffer noch mit reinem Chloroform ausgeschüttelt. Die unteren Phasen wurden vereinigt und unter

Argon eingeengt. Die Trennung der freien Fettsäuren von den Lyso-Phospholipiden und den Phospholipiden erfolgte über Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60-Platten mit Chloroform/Methanol/NH_3 65:35:2,5 (v/v/v) als Laufmittel. Die einzelnen Fraktionen wurden getrennt abgekratzt und direkt für die Derivatisierung der Fettsäuren für die gaschromatographische Analyse eingesetzt.

2.22.4 Darstellung und GC-Analyse von Fettsäuremethylestern und DMOX-Derivaten

Die Darstellung der Fettsäuremethylester (FAME) für die gaschromatographische Analyse erfolgte durch saure Methanolyse. Hierfür dienten entweder gereingte Zellsedimente von Hefen, Algen und Pilzen, oder Lipidextrakte und von Kieselgelplatten abgekratzte Fettsäure- und Lipidfraktion als Ausgangsmaterial. Das Material wurde möglichst wasserfrei in ein Pyrrex-Röhrchen überführt und mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2 % Dimethoxypropan versetzt und 1 h bei 80 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die entstandenen FAME mit 2-4 ml Petrolether extrahiert. Nicht derivatisierte, freie Fettsäuren wurden durch Waschen mit jeweils dem gleichen Volumen 100 mM $NaHCO_3$ und A. dest. entfernt. Die (obere) Petroletherphase wurde jeweils in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurde sie mit Na_2SO_4 (in einer mit Watte gestopften Pasteurpipette) getrocknet, unter Argon eingeengt und für die Verwendung in der gaschromatographischen Analyse in 100-200 µl Petrolether aufgenommen.

GC-Bedingungen:

Säule:	DB23, 30 m, 0252 mm, 0,25 µm Film (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen)
Trägergas:	Stickstoff 5.0
Detektor:	Flammenionisationsdetektor

Die Darstellung von Dimethyloxazolin (DMOX)-Derivaten für die Analyse mit GC-Massenspektrometrie (GC-MS) erfolgte nach einer Methode von Christie (1998). FAME wurden unter Argon getrocknet und in 250 µl 2-Amino-2-methyl-1-propanol (1 µg/µl) resuspendiert, kurz mit Argon begast und 16 h auf 180 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 1 ml Dichlormethan, 5 ml Isohexan und 2 ml A. dest. hinzugefügt. Der Ansatz wurde geschüttelt, zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Gefäß überführt, unter Argon getrocknet und in ca. 30 µl Chloroform resuspendiert. Die Trennung der entstandenden DMOX-Derivate von den verbliebenen FAME erfolgte über Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60-Platten mit Diethylether/Petrolether 2:1 (v/v) als Laufmittel. Die DMOX-Derivate wurden abgekratzt und mit Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) und 0,45 % NaCl wie in 2.21.3 beschieben extrahiert. Die GC-MS-Analyse der Proben erfolgte

freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. U. Zähringer im Forschungszentrum Borstel.

2.22.5 Sphingobasen-Analyse

$Ba(OH)_2$-Hydrolse der Sphingolipide

Bis zu 0,5 mg Hefe-Zellmaterial wurde mit 1,5 ml A. dest., 1,5 ml 1,4-Dioxan und ca. 300 mg 20 % (w/v) $Ba(OH)_2 \cdot H_2O$ (in H_2O) vermischt und 20 h bei 110 °C in einem Sovirell-Röhrchen inkubiert. Nach dem Abkühlen wurder der Ansatz in ein 20 ml Spitzröhrchen überführt. Das Sovirell-Glas wurde nacheinander mit 1,5 ml Methanol und 1,5 ml A. dest. nachgespült und die Lösungen wurden mit der Probe vereinigt. Anschließend wurde die Probe mit 6 ml A. dest und 9 ml Chloroform gründlich vermengt und zur Phasentrennung kurz zentrifugiert. Die untere Phase wurde in ein 40 ml Schliffglas überführt und die obere Phase erneut mit 9 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten unteren Phasen wurden erneut mit 18 ml 0,1 M KOH/0,5 M KCl extrahiert und die gewaschene untere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und unter Argon getrocknet.

Dinitrophenol (DNP)-Derivatisierung der freien langkettigen Basen (LCBs)

5 µl 0,5 % (v/v) 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (FDNB) wurden in 1 ml Methanol verdünnt. Von der verdünnten FDNB-Lösung wurden 200 µl auf den getrockneten Hydrolysatextrakt gegeben. Darauf wurde 1 ml Boratpuffer (2 M Borat, pH 10,5 mit KOH) gegeben und der Ansatz für 30 min auf 60 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die DNP-Basen mit 1,13 ml Methanol und 2,67 ml Chloroform extrahiert, und die untere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt. Die obere Phase wurde erneut mit 2,67 ml Chloroform extrahiert. Die unteren Phasen wurden vereinigt und unter Argon getrocknet. Es erfolgte eine Reinigung der DNP-Basen über Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60-Platten mit Chloroform/Methanol (9:1) als Laufmittel. Die DNP-Basen wurden unter UV-Licht identifiziert. Auf ein Anfärben der Lipide konnte verzichtet werden, da DNP-Basen unter UV-Licht nicht leuchten und sich dadurch vom leuchtenden Kieselgelhintergrund abheben. Das Kieselgel an den entsprechenden Stellen auf der Platte wurde abgekratzt, und die Basen mit 1 ml Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert. Die Probe wurde über eine Wattesäule gegeben, getrocknet und für eine Analyse über RP-HPLC in einer kleinen Menge Methanol aufgenommen (Tab. 2.2).

2.22.6 *In vivo*-Markierungsversuche mit ^{14}C-Fettsäuren

$5 \cdot 10^6$ Zellen einer gutwachsenden *E. gracilis*-Kultur (SAG 1224-5/3) und $2 \cdot 10^7$ Zellen einer gutwachsenden C. *cohnii*-Kultur wurden abzentrifugiert (4000 g, 5 min, RT) und in 3 ml frischem Medium resupendiert, bevor 0,5-10 µCi der ^{14}C-markierten Fettsäure dazugegeben wurden. Die Zellen wurden unter Schwenken 24 h mit dem Substrat inkubiert, wobei die *E. gracilis*-Kulturen durchgehend belichtet wurden (10 $E \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$). $5 \cdot 10^8$ Zellen einer wachsenden Kultur der Alge M13 wurden abzentrifugiert (4000 g, 50 min, RT) und sehr vorsichtig in 1-2 ml Medium resuspendiert,

bevor 0,5-10 µCi der ^{14}C-markierten Fettsäure dazugegeben wurden. Die Zellen wurden unter leichtem Schwenken 24 h mit dem Substrat inkubiert, wobei die Kultur durchgehend belichtet wurde (10 $E \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$). 2 Tage alte Kulturen von *Thraustochytrium* sp. und *Schizochytrium* sp. wurden 1:100 in 3-5 ml frischem Medium verdünnt und bei 30 °C bis zu einer OD_{600} von 0,9-1,2 angezogen (180 rpm), bevor 0.5-10 µCi der ^{14}C-markierten Fettsäure zugegeben wurden. Die Kulturen wurden unter starkem Schütteln (150 rpm) für 24 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Kulturen abzentrifugiert (4000 g, 5-10 min, RT) und einmal mit 5 ml 100 mM $NaHCO_3$ gewaschen. Die Gesamtlipide wurden extrahiert, getrocknet und die Fettsäuren durch Verseifung gewonnen, oder die Lipide wurden einer sauren Methanolyse unterzogen (2.22.4). Für die Verseifung der Lipide wurden diese mit 0,5 ml wäßrigem 0,5 M KOH und 1 ml Methanol für 2 h bei 80 °C inkubiert. Danach wurden die Ansätze mit einem Tropfen konz. HCl angesäuert, und die entstandenen freien Fettsäuren zweimal mit 2 ml Petrolether extrahiert, unter Argon getrocknet, und in passendem Lösungsmittel resuspendiert.

2.22.7 α-Oxidation von ^{14}C-markierten Fettsäureprodukten

Unmarkierte und radioaktiv markierte DHA wurde als freie Fettsäure über RP-HPLC aus 2-3 Markierungsversuchen mit *E. gracilis* oder *Thraustochytrium* sp. isoliert, vereinigt, unter Argon getrocknet und in 1-2 ml Methanol gelöst. Um die Fettsäure zu Behensäure (22:0) zu hydrieren, wurde sie in einem luftdicht verschlossenen Gefäß in Gegenwart einer kleinen Spatelspitze Platin-IV-Oxid und Wasserstoffgas für 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Behensäure-haltige Methanol über eine Wattesäule (gestopfte Pasteurpipette) in ein Spitzröhrchen überführt, um das Lösungsmittel von dem Platin-IV-Oxid-Pulver zu befreien. Das für die Hydrierung verwendete Gefäß wurde mehrfach mit heißem Isopropanol nachgespült, um den Verlust an der schwer löslichen Behensäure gering zu halten. Die Behensäure wurde unter Argon eingeengt und in Aceton resupendiert. Für die aus *E. gracilis* stammende Behensäure wurde 1 ml Aceton verwendet. Aufgrund der geringen Fettsäuremenge wurden 100 µg unmarkierte Behensäure zu dem Ansatz gegeben. Zum Lösen der aus *Thraustochytrium* sp. stammenden Behensäure wurden 4-6 ml Aceton verwendet, die in 1 ml-Aliquots aufgeteilt wurden. Aufgrund des hohen endogenen DHA-Gehaltes von *Thraustochytrium* sp. wurde auf eine Zugabe unmarkierter Behensäure verzichtet. Zu jedem Ansatz wurden 22 mg $KMnO_4$ hinzugegeben, und die luftdicht verschlossenen Pyrrex-Röhrchen wurden 12 h in einem beheizten Ultraschallwasserbad (54 °C) inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit je 1 ml 5 N H_2SO_4 angesäuert, und $Na_2S_2O_5$ wurde hinzugefügt, bis die Ansätze klar wurden. Das bei der Beschallung entstandene Gemisch aus unterschiedlich langen, gesättigten Fettsäuren wurde mit 3 x 3 ml Diethylether extrahiert, unter Argon getrocknet, und in einem kleinen Volumen Diethylether aufgenommen. Zur Reinigung wurden die Fettsäuren dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel 60-Platten getrennt. Als Laufmittel diente Diethylether/Petrolether/Eisessig 8:2:0.01 (v/v/v). Die Detektion der markierten Fettsäuren erfolgte an einem Phosphoimager (Fujifilm BAS-1000), und die

Daten wurden mit der PC BAS 2.09g Software ausgewertet. Die freien Fettsäuren wurden abgekratzt und mit Chloroform/Methanol/0,45%NaCl 2:1:1 (v/v/v) extrahiert. Anschließend erfolgte eine weitere Extraktion mit 100 % Isopropanol. Die Fettsäuren wurden unter Argon getrocknet und in einer Mischung aus 160 µl Dimethylformamid, 20 µl p-Bromphenacylbromid und 20 µl Diisopropylethylamin aufgenommen. Die Ansätze wurden anschließend 1 h auf 65 °C erhitzt. Die entstandenen Bromphenacylester (BPE)-Derivate wurden mit 2 x 3 ml Diethylether extrahiert, mit gleichem Volumen 0,1 M K_2HPO_4 (pH 7,0) gewaschen und unter Argon eingeengt. Es folgte ein Reinigungsschritt über DC auf Kieselgel 60-Platten mit Chloroform/Petrolether 8:2 (v/v) als Laufmittel. Die Detektion der BPE-Derivate erfolgte am Phosphoimager. Die Bromphenacylester-Derivate wurden abgekratzt, wie oben beschrieben extrahiert, unter Argon eingeengt und für die Analyse durch RP-HPLC in einem entsprechenden Volumen Isopropanol resuspendiert (Tab. 2.2).

Tab. 2.2: Reversed Phase (RP)-HPLC zur Analyse von freien Fettsäuren (FFA), Fettsäuremethylestern (FAME), Bromphenacylester-Derivaten (BPE) und Dinitrophenyl-Derivaten (DNP) von Sphingobasen. Als Säule wurde immer ODS Hypersil RP18 verwendet. A und B repräsentieren die verwendeten Pumpen.

Probe	Laufmittel	Gradient	Flußrate	Detektion
FFA	A: H_2O B: Methanol/Acetonitril/Eisessig 9:1:0,01 (v/v/v)	88,5 % B isokratisch	1 ml/min	UV bei 210 nm und Radiodetektor
FAME	A: H_2O B: Methanol/Acetonitril 9:1 (v/v)	88,5 % B isokratisch	1 ml/min	UV bei 210 nm und Radiodetektor
BPE	A: H_2O B: Methanol/Acetonitril 9:1 (v/v)	5 min 92% B, dann in 45 min auf 100 % B	1 ml/min	UV bei 254 nm und Radiodetektor
DNP	A: H_2O B: Methanol/Acetonitril/Isopropanol 10:3:1 (v/v/v)	in 50 min von 84 % B auf 96 % B; dann in 0,1 min auf 100 % B	0,8 ml/min	UV bei 340 nm

3 Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von Acyl-Lipid-Desaturasen mit Spezifität für das Carboxylende (sogenannte "Front End"-Desaturasen). Diese sind z. B. an der Biosynthese von sehr langkettigen, mehrfach ungesättigen Fettsäuren (VLCPUFA) wie Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) beteiligt. Besonderes Interesse galt dabei der Klonierung einer cDNA, die für eine Desaturase mit Δ4-Regiospezifität kodiert. Dieses Enzym ist für den letzten Schritt in der Synthese von DHA verantwortlich. Im Gegensatz zu den kodierenden Sequenzen für Desaturasen mit Δ6- und Δ5-Regiospezifität war eine für die Δ4-Desaturase kodierende cDNA zu Beginn dieser Arbeit noch nicht kloniert worden. Zudem gab es keine biochemischen Hinweise auf die Existenz dieses Enzyms.

Neben der putativen Verwendung einer Δ4-Desaturase kommen alternative Wege für die Biosynthese von DHA vor. Die Markierungsversuche von Sprecher und Kollegen hatten gezeigt, dass in Leberzellen von Säugetieren die Synthese von DHA keine Δ4-Desaturierung involviert, sondern auf der Δ6-Desaturierung eines C_{24}-Fettsäuresubstrates mit anschließender β-Oxidation zu DHA beruht (zusammengefasst in Sprecher, 2000). Parallel wurde gezeigt, dass einige marine Bakterienarten EPA und DHA in sauerstoffunabhängigen Reaktionen synthetisieren, die von Polyketidsynthasen (PKS) katalysiert werden (Yazawa, 1996; Facciotti *et al*., 2000). Die PKS synthetisieren VLCPUFA aus Acetyl- und Malonyl-CoA in successiven Reaktionszyklen, die der Fettsäure-Synthese ähneln. Da verschiedene Möglichkeiten der Synthese von DHA ohne die Beteiligung einer Δ4-Desaturierung in der Natur bestehen, sollten zunächst biochemische Beweise für die Existenz einer Δ4-Desaturase in verschiedenen Organismen erbracht werden. Anhand der Ergebnisse sollten die für eine Klonierung der entsprechenden cDNA am besten geeigneten Organismen ausgesucht werden.

Tabelle 3.1 gibt eine Liste der in dieser Arbeit untersuchten Organismen und die Gehalte der wichtigsten Fettsäuren an. *Schizochytrium* sp. und *Thraustochytrium* sp. sind sehr lipidreiche, marine Pilze der Thraustochytriaceae und zeichnen sich durch einen hohen Anteil DHA an ihren Fettsäuren aus. Zudem kommen sehr langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren nur in sehr geringen Mengen vor. Auch der Dinoflagellat *Crypthecodinium cohnii* weist ein den Thraustochytriaceen ähnliches Fettsäureprofil auf. Er besitzt jedoch außer DHA keine anderen langkettigen und sehr langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Diese Organismen werden als potentielle DHA-Produzenten betrachtet und stellen möglicherweise eine geeignete Quelle für das Klonieren von cDNAs für entsprechende "Front End"-Desaturasen und Elongasen dar. Die Abwesenheit signifikanter Mengen putativer Zwischenstufen der DHA-Synthese kann jedoch auch für die Beteiligung eines VLCPUFA-PKS-Systems und die Abwesenheit von Desaturasen und Elongasen sprechen. Die Algen MA13 und *Cricosphaera carterae* reichern weniger DHA an. Sie zeigen dafür aber ein vielfältigeres

Fettsäuremuster mit signifikanten Mengen von Fettsäuren, die putative Zwischenstufen der DHA-Synthese durch "Front End"-Desaturasen und Elongasen darstellen. Auch *Euglena gracilis* zeigt eine den Thraustochytriaceen entgegengesetzte Vielfalt an (mittel- und) langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren, besitzt jedoch nur einen sehr geringen Anteil an DHA.

Tab. 3.1: Die in dieser Arbeit untersuchten Organismen und die Anteile der wichtigsten mehrfach ungesättigen Fettsäuren. Die Fettsäurezusammensetzung wurde durch GC-Analyse der Fettsäuremethylester (FAME)-Derivate bestimmt. Zur FAME-Gewinnung wurden Zellsedimente direkt in der sauren Methanolyse eingesetzt. Bei dem verwendeten *E. gracilis*-Stamm handelt es sich um SAG 1224-5/3. Angaben in Mol %.

	Thraustochytrium sp.	*Schizochytrium* sp.	*C. cohnii*	MA13	*C. carterae*	*E. gracilis*
18:2	-	-	-	4	5	17
18:3ω6	-	-	-	-	-	-
18:3ω3	-	-	-	10	11	17
18:4ω3	-	-	-	22	16	-
18:5ω3	-	-	-	11	2	-
ARA	< 1	< 1	-	< 1	-	< 1
EPA	< 1	< 1	-	< 1	3	3
22:5ω6	18	9	-	5	< 1	3
22:5ω3	2	-	-	< 1	< 1	< 1
DHA	34	24	21	12	7	2

Die ermittelten Fettsäureprofile und DHA-Anteile stimmen unterschiedlich gut mit den Angaben in der Literatur überein. Weete *et al.* (1997) stellten für den hier untersuchten *Thraustochytrium*-Stamm nur einen Anteil von 25 % DHA an den Gesamtfettsäuren fest und ermittelten einen geringeren Anteil von 22:5ω6 (8 %). Die von Ashford *et al*. (2000) beschriebenen 33 % DHA bei *Schizochytrium* sp. übersteigen dagegen den hier für den gleichen Stamm festgestellten Wert von 24 %. Die Fettsäurezusammensetzungen können stark mit Kulturbedingungen wie Mediumzusammensetzung, pH und Alter des Inokulums variieren. So schwankte der von Jiang & Chen (2000) beobachtete DHA-Anteil in dem hier verwendeten *C. cohnii*-Stamm zwischen 37 und 53 % bei unterschiedlicher Glukosekonzentration im Medium, wobei eine hohe Konzentration (40 g/l) zu einem verringerten DHA-Anteil führte. Da sich jedoch sowohl Biomasse als auch Lipidgehalt mit zunehmender Glukosekonzentration erhöhen, kommt es insgesamt zu einer effizienteren DHA-Produktion (Bowles *et al*., 1999). Die in dieser Arbeit festgestellten 7 % DHA in *C. carterae* übertreffen die

Literaturangaben zu dieser Art (Singh & Ward, 1997). Wallis & Browse (1999) ermittelten einen DHA-Anteil von 2 % an den Fettsäuren von *E. gracilis*, der mit der hier gemachten Beobachtung übereinstimmt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in der Auswahl dieser Organismen zwei Gruppen von DHA-Produzenten vertreten sind: Zum einen sehr effiziente Produzenten, bei denen jedoch die Verwendung eines PKS-Systems in Betracht gezogen werden muss (*Thraustochytrium* sp., *Schizochytrium* sp., *C. cohnii*), zum anderen Organismen mit durchschnittlichem bis sehr geringem DHA-Anteil, bei denen die Synthese vermutlich auf der Aktivität von "Front End"-Desaturasen und Elongasen beruht (MA13*, C. carterae, E. gracilis*).

3.1 Biochemischer Nachweis einer Δ4-Desaturase in *Thraustochytrium* sp. und *Euglena gracilis*

Für den biochemischen Nachweis einer Δ4-Desaturase wurden *in vivo*-Markierungsversuche mit radioaktiven Fettsäuren durchgeführt. Hierfür standen die Fettsäuren [2-^{14}C]Docosapentaensäure (22:5$^{\Delta7,10,13,16,19}$), [2-^{14}C]Docosatetraensäure (22:4$^{\Delta7,10,13,16}$), [1-^{14}C]Ölsäure (18:1$^{\Delta9}$) und [1-^{14}C]Acetat zur Verfügung. In den Markierungsversuchen wurden zunächst ungereinigte und über HPLC gereinigte ^{14}C-22:4$^{\Delta7,10,13,16}$ und ^{14}C-22:5$^{\Delta7,10,13,16,19}$ eingesetzt. Da sich kein wesentlicher Unterschied in den Ergebnissen der anschließenden Analysen zeigte, wurde in allen hier repräsentierten Versuchen auf die Reinigung der Fettsäure verzichtet. Mit Ausnahme der Alge *C. carterae* wurden alle in Tabelle 3.1 aufgeführten Organismen 24 h mit einer Auswahl der markierten Fettsäuren inkubiert. Durch geringe Kulturvolumen in großen Inkubationsgefäßen und durch Schütteln sollte eine ausreichende Sauerstoffzufuhr gewährleistet werden. Durch Radio-HPLC-Analyse der aus den Organismen isolierten Fettsäuren wurde im Anschluß an die Inkubation überprüft, ob die Substrate umgesetzt worden waren.

3.1.1 *In vivo*-Umsetzung von [2-^{14}C]Docosapentaensäure

In Abbildung 3.1 sind die Radiochromatogramme dargestellt, die nach Inkubation der Mikroorganismen mit der Fettsäure [2-^{14}C]Docosapentaensäure (^{14}C-22:5$^{\Delta7,10,13,16,19}$, ^{14}C-22:5ω3) und anschließender HPLC-Analyse erhalten wurden. Durch die Einführung einer Δ4-Doppelbindung entsteht DHA aus ^{14}C-22:5$^{\Delta7,10,13,16,19}$. Mit Ausnahme von *Schizochytrium* sp. waren alle getesteten Organismen in der Lage, die angebotene Fettsäure umzusetzen. So zeigten die Radiochromatogramme neben dem Substrat nur eine zweite, radioaktiv markierte Fettsäure, die die Retentionszeit von DHA aufwies. Keine weiteren radiomarkierten Produkte konnten detektiert werden. Die Intensität des neuen Radiosignals fiel bei den veschiedenen Arten unter den gewählten Versuchsbedingungen

unterschiedlich aus. So übertraf es bei MA13 das Signal des aufgenommenen Substrates. *Thraustochytrium* sp. und *E. gracilis* SAG 1224-5/3 hatten ca. 50 % der inkorporierten ^{14}C-22:5ω3 umgewandelt. Die Markierungsversuche bei *E. gracilis* wurden mit zwei Stämmen durchgeführt, wobei die Umwandlung von ^{14}C-22:5ω3 mit dem Stamm Z geringer war als mit dem Stamm SAG 1224-5/3 (Daten nicht gezeigt). Auch bei *C. cohnii* war das Radiosignal der neu entstandenen Fettsäure im Vergleich zum Substrat geringer ausgeprägt. Eine Erhöhung der Zelldichte von *C. cohnii* durch Reduktion des Kulturvolumens bei der Inkubation führte zu einer besseren Aufnahme des markierten Substrates, jedoch ging damit auch eine Verringerung der Substratumwandlung einher (Daten nicht gezeigt). Eine ähnliche Beobachtung wurde mit *Thraustochytrium* sp. gemacht. Wurde eine dichtgewachsene Kultur mit der markierten Docosapentaensäure inkubiert, konnten neben dem Substrat keine weiteren markierten Fettsäuren entdeckt werden (Daten nicht gezeigt). Frisch verdünnte Kulturen dieses Pilzes lieferten jedoch das in Abbildung 3.1 abgebildete Radiochromatogramm.

Die Retentionszeiten der neu entstandenen Fettsäuren in MA13*, Thraustochytrium* sp., *E. gracilis* und *C. cohnii* deuteten darauf hin, dass es sich in allen Fällen um DHA handelte. Da Fettsäuren unterschiedlicher Länge und unterschiedlichen Desaturierungsgrades bei der *reversed phase*-HPLC (RP-HPLC) sehr ähnliche Retentionszeiten aufweisen können, wurde die Zahl der Kohlenstoffatome im Kohlenstoffgerüst der putativen DHA überprüft. Die Hydrierung der aus *Thraustochytrium* sp., *C. cohnii*, *E. gracilis* und MA13 isolierten DHA und die anschließende Analyse durch Radio-HPLC demonstrierten, dass das Hydrierungsprodukt in allen Fällen die Retentionszeit der gesättigten Fettsäure Behensäure aufwies, und die isolierte Fettsäure somit eine Kettenlänge von 22 Kohlenstoffatomen besaß (Daten nicht gezeigt). Zudem konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Umwandlung des gefütterten Fettsäuresubstrates in den Organismen um eine Desaturierung handelte, da die Hydrierung einer andersartig derivatisierten Fettsäure nicht zur Umwandlung in Behensäure geführt hätte.

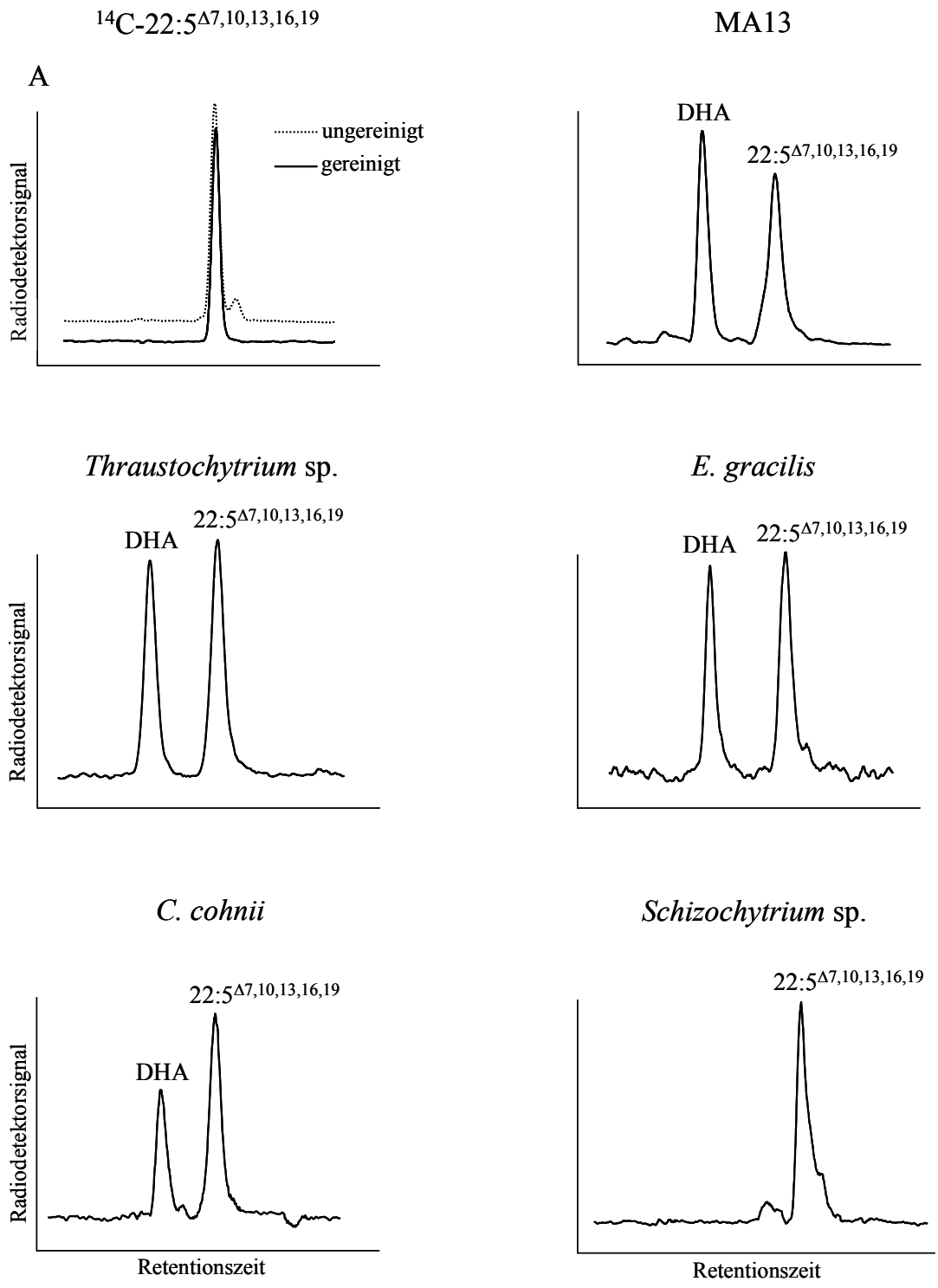


Abbildung 3.1: *In vivo*-Markierungsversuche mit [2-^{14}C]22:5$^{\Delta7,10,13,16,19}$. Die Organismen wurden 24 h mit dem radioaktiven Substrat inkubiert. Die Fettsäuren wurden als freie Fettsäuren isoliert und über Radio-HPLC analysiert. Das erste Chromatogramm (A) zeigt die ^{14}C-22:5$^{\Delta7,10,13,16,19}$ als freie Fettsäure vor und nach der Reinigung über HPLC. Bei *E. gracilis* handelt es sich um den Stamm SAG 1224-5/3.

Auch Arao & Yamada (1994) verwendeten *in vivo*-Markierungsversuche zur Untersuchung des VLCPUFA-Biosyntheseweges in einer Kieselalge. Sie inkubierten die EPA-produzierende Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* mit verschiedenen radiomarkierten Fettsäuren und stellten fest, dass alle verwendeten Fettsäuren (18:1, 18:2, α- und γ-18:3, 20:3ω6 und ARA) *in vivo* zur Synthese von EPA verwendet wurden. Zudem konnte eine Abnahme der aufgenommenen Fettsäuren detektiert werden, die mit einem Anstieg der Radioaktivität in dem Endprodukt EPA sowie sämtlicher Zwischenprodukte, die sich aus dem ω3- bzw. ω6-Weg der VLCPUFA-Biosynthese ergeben, einherging. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits durch Moreno *et al.* (1979) gemacht, die diese Alge ebenfalls mit radiomarkierten Fettsäuren inkubiert hatten. Sie schlugen für *P. tricornutum* einen EPA-Syntheseweg mit Desaturasen und Elongasen vor, der durch die Klonierung von cDNAs für eine Δ6- und eine Δ5-Desaturase unterstützt wurde (Domergue *et al*., 2002). Sowohl Arao & Yamada (1994) als auch Moreno *et al.* (1979) konnten keine markierte DHA in der Alge feststellen. Es wäre interessant zu wissen, ob diese Fettsäure unter geeigneten experimentellen Bedingungen markiert wird, da *P. tricornutum* die Fähigkeit besitzt, diese Fettsäure zu synthetisieren (Yongmanitchai *et al*., 1993). Der Gehalt an EPA und DHA unterliegt jedoch Schwankungen, die auf Variationen in den Kulturbedingungen zurückzuführen sind (Alonso *et al*., 2000).

Nichols & Appleby (1969) inkubierten *E. gracilis* mit radiomarkierter 18:1, $18:2^{\Delta 9,12}$, γ-18:3 und Eicosadiensäure ($20:2^{\Delta 11,14}$). Mit Ausnahme von γ-18:3 wurden alle Fettsäuren für die Synthese von ARA verwendet. γ-18:3 (generell Δ6-desaturierte Fettsäuren) kommt in dieser Alge nicht vor und wurde auch bei der Synthese von ARA aus markierter 18:1 und 18:2 nicht detektiert. Es wird angenommen, dass die Synthese von ARA nicht die Desaturierung von 18:2 an der Δ6-Position mit anschließender Elongation einbezieht, sondern 18:2 direkt zu $20:2^{\Delta 11,14}$ elongiert und anschließend an der Δ8- und Δ5-Position desaturiert wird (Nichols & Appleby, 1969). Die Klonierung einer cDNA aus *E. gracilis*, die für eine Δ8-Desaturase kodiert, bekräftigte dies (Wallis & Browse, 1999). Interessanterweise wurden bei den Markierungsversuchen von Nichols & Appleby (1969) die Fettsäuren EPA und DHA in keinem Fall markiert. Möglicherweise ist dies auf das Fehlen von ω3-Desaturasen, die C_{20}- oder C_{22}-Polyenfettsäuren desaturieren, zurückzuführen. In diesem Fall würden EPA und DHA ausschließlich über den ω3-Weg der VLCPUFA-Synthese aus $18:3^{\Delta 9,12,15}$ entstehen (Abbildung 1.3). Die radiomarkierte 18:2 wurde jedoch bevorzugt elongiert und kaum an der Δ15-Position desaturiert.

Im Gegensatz zu *P. tricornutum* und *E. gracilis* verwendete das marine Bakterium *Shewanella* sp. radiomarkierte langkettige und sehr langkettige ungesättigte Fettsäuren nicht zur Synthese von VLCPUFA (Watanabe *et al*., 1996). Die Radiomarkierung aus ^{14}C-Acetat konnte dagegen aus EPA zurückgewonnen werden, während andere Polyenfettsäuren keine Markierung aufwiesen. Die Isolierung eines EPA-produzierenden PKS-Systems aus diesem Stamm bestätigte die Vermutung, dass der in diesem Organismus realisierte Biosyntheseweg ohne Desaturasen und Elongasen auskommt

(Yazawa, 1996).

Beach *et al.* (1974) untersuchten mit *in vivo*-Markierungsexperimenten, inwieweit *C. cohnii* verschiedene radioaktiv markierte Fettsäuren zur Synthese von DHA nutzt. Sie beobachteten, dass fast ausschließlich kurzkettige, gesättigte Fettsäuren für die Synthese von DHA verwendet wurden. Mittelkettige, gesättigte Fettsäuren wurden bis C_{18} elongiert und zu Ölsäure desaturiert, aber nicht weiter elongiert und desaturiert. Ähnlich verhielt es sich mit Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure, die ebenfalls in die Lipide inkorporiert jedoch nicht weiter umgesetzt wurden. Eine Positionsanalyse der Radiomarkierung in DHA, die bei der Inkubation mit [1-^{14}C]8:0 entstanden war, zeigte, dass jedes zweite Kohlenstoffatom markiert war. Somit war die markierte DHA das Resultat einer Neusynthese aus Acetat-Bausteinen, die durch den Abbau der markierten 8:0 entstanden waren, und nicht das Ergebnis einer Kettenverlängerung. Möglicherweise wurde dafür wie in *Shewanella* sp. ein PKS-System verwendet.

Die Markierungsexperimente mit *P. tricornutum*, *E. gracilis* und *C. cohnii* deuteten an, dass unterschiedliche Wege zur Synthese von langkettigen und sehr langkettigen ungesättigten Fettsäuren in verschiedenen Algenarten beschritten werden. Auch für die markierte DHA, die in dieser Arbeit aus den Markierungsversuchen mit *Thraustochtrium* sp., *C. cohnii*, *E. gracilis* und MA13 mit ^{14}C-22:5ω3 isoliert wurde, bestanden neben einer direkten Δ4-Desaturierung weitere Möglichkeiten der Synthese. Der Ursprung der radiomarkierten DHA könnte in einer Degradierung der gefütterten ^{14}C-22:5ω3 und anschließender Neusynthese von DHA aus dem Abbauprodukt Acetyl-CoA durch ein Fettsäure-PKS-System gelegen haben. Bei der Verwendung dieser Bausteine durch ein PKS-System würde sich die im Substrat an C2 befindliche Radiomarkierung gleichmäßig im Kohlenstoffgerüst der neu synthetisierten DHA verteilen, während eine direkte Desaturierung an C4 und C5 keine Veränderung im Markierungsmuster verursachen würde. Daher wurde das Markierungsmuster in der aus *Thraustochytrium* sp. und *E. gracilis* isolierten DHA, die zur Behensäure hydriert worden war, durch α-Oxidation überprüft. Aus *C. cohnii* und MA13 konnten nicht für eine α-Oxidation ausreichende Mengen markierter DHA isoliert werden. Bei der α-Oxidation erfolgt eine sequentielle Verkürzung des Carboxylendes der Fettsäure. Die Analyse der Oxidationsprodukte ist in Abb. 3.2 dargestellt. Das mit dem UV-Detektor erhaltene Chromatogramm gibt die Effizienz der α-Oxidationen wieder, während das Radiochromatogramm Rückschlüsse auf die Lage der Radiomarkierung liefert. Im Fall von *E. gracilis* waren nur die um ein Kohlenstoffatom verkürzte und die ungekürzte Behensäure radioaktiv markiert. Bei der aus *Thraustochytrium* sp. isolierten DHA zeigte sich ein ähnliches Bild, jedoch deuteten sich auch bei den Spaltungsprodukten 20:0, 19:0 und 18:0 radioaktive Markierungen an. Die relative Intensität der entsprechenden Signale im Radiochromatogramm war jedoch deutlich geringer als die des UV-Chromatogramms und repräsentierte daher nur einen sehr kleinen Teil der α-oxidierten Fettsäure. Somit beschränkte sich die Position der Radiomarkierung in der isolierten DHA aus *E. gracilis* und *Thraustochytrium* sp. im Wesentlichen auf das C2 (möglicherweise auch auf das C1). Da die Verteilung der Radiomarkierung in den Oxidationsprodukten mit der übereinstimmt, die

bei einer α-Oxidation des radioaktiv markierten Fettsäuresubstrates zu erwarten ist, kann eine Neusynthese der DHA durch Abbauprodukte des Substrates, z. B. durch ein PKS-System, ausgeschlossen werden.

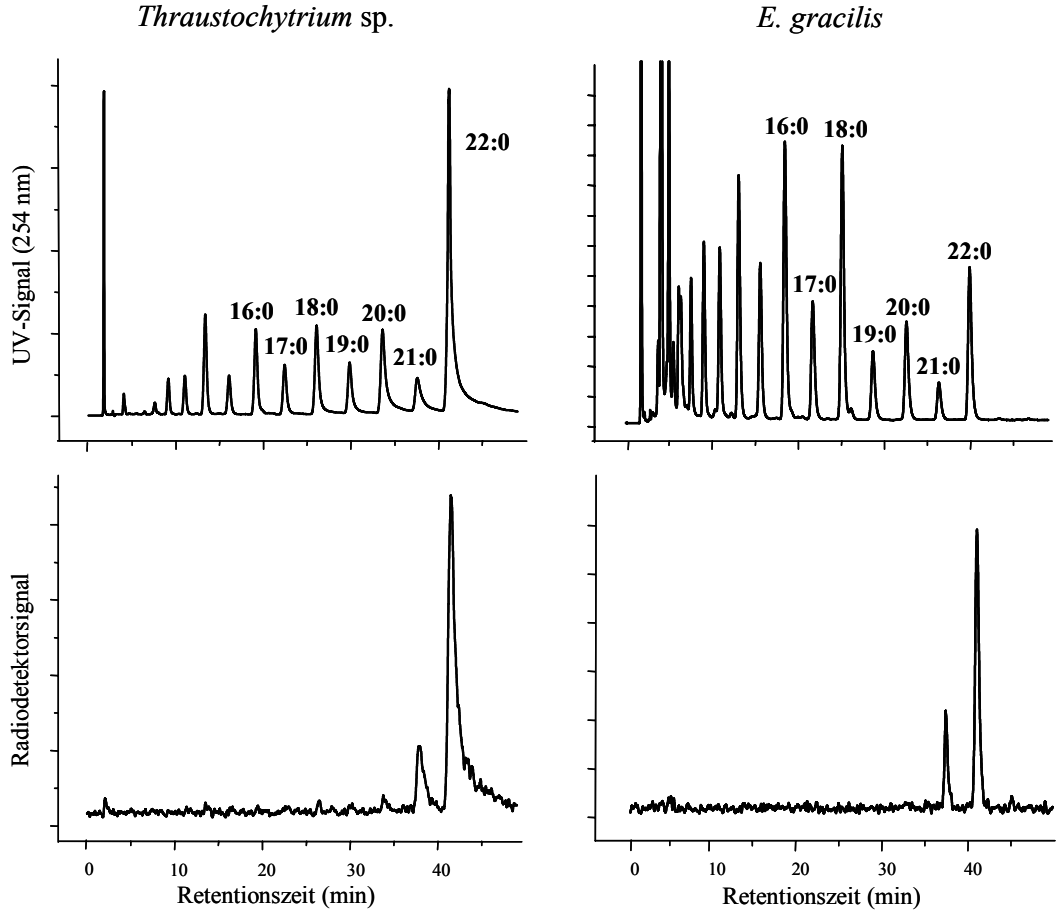


Abbildung 3.2: α-Oxidationen markierter und unmarkierter DHA. Die bei den *in vivo*-Markierungsexperimenten mit [2-^{14}C]22:5$^{\Delta7,10,13,16,19}$ isolierte DHA aus *Thraustochytrium* sp. und *E. gracilis* wurde zu Behensäure (22:0) hydriert und α-oxidiert. Durch Radio-HPLC wurde die Radiomarkierung der Oxidationsprodukte bestimmt. Die große Menge von aus *Thraustochytrium* sp. isolierter DHA führte zu einer geringeren Effizient der α-Oxidation.

Eine weitere Möglichkeit der Synthese von DHA in den getesteten Organismen liegt in der Aktivität der Enzyme des Sprecher-Weges. Die Methode der α-Oxidation erlaubt keine Unterscheidung zwischen Δ4-Desaturierung und dem Sprecher-Weg, da sich auch im letztgenannten Fall die Position der radioaktiven Markierung von ^{14}C-22:5ω3 bei der Umwandlung in DHA nicht verändern würden. Gegen eine Beteiligung des Sprecher-Weges sprach jedoch, dass in den Markierungsversuchen neben DHA und dem Substrat keine weiteren Produkte detektiert werden konnten. Voss *et al*. (1991) konnten bei Markierungsexperimenten mit ^{14}C-22:5ω3 und Mikrosomen sowie Hepatozyten aus Rattenleber stets die Zwischenprodukte ^{14}C-24:5$^{\Delta9,12,15,18,21}$ und ^{14}C-24:6$^{\Delta6,9,12,15,18,21}$ nachweisen.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen der *in vivo*-Markierungen schließen, dass für die Entstehung von DHA aus Docosapentaensäure in *Thraustochytrium* sp. und *E. gracilis* mit großer Wahrscheinlichkeit eine Δ4-Desaturase verantwortlich ist. Dies gilt vermutlich auch für die anderen getesteten Organismen.

3.1.2 *In vivo*-Umsetzung von [2-^{14}C]Docosatetraensäure, [1-^{14}C]Ölsäure und [1-^{14}C]Acetat

In allen Fällen, in denen Substratspezifitäten von "Front End"-Desaturasen untersucht wurden, desaturierten die Enzyme sowohl ω3- als auch ω6-Fettsäuren. Durch die *in vivo*-Anwendung der ω6-Fettsäure [2-^{14}C]22:4$^{\Delta7,10,13,16}$ konnte gezeigt werden, dass die in *Thraustochytrium* sp. und *E. gracilis* aktiven Δ4-Desaturasen ebenfalls ω6-Fettsäuren desaturieren (Abbildung 3.3).

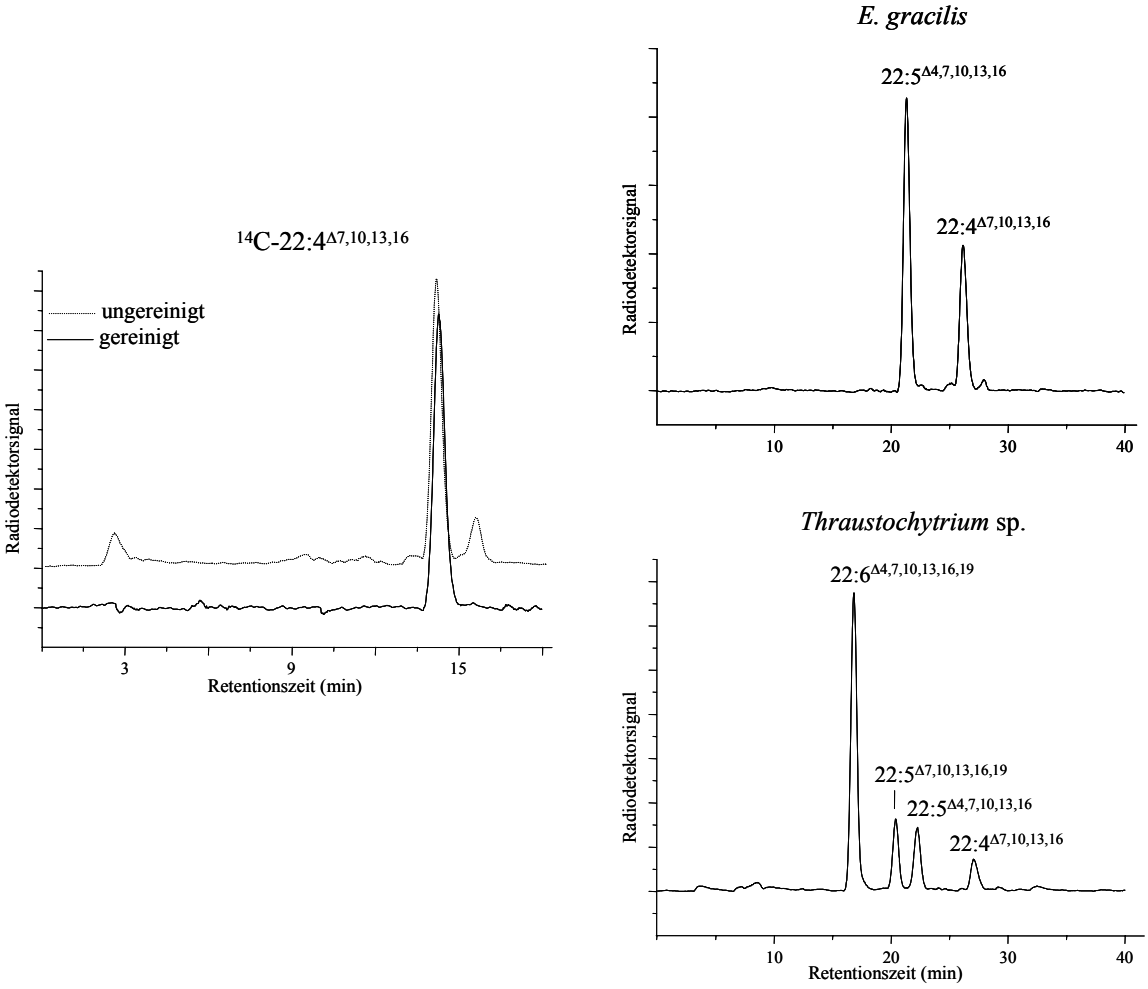


Abbildung 3.3: Desaturierung von [2-^{14}C]22:4$^{\Delta7,10,13,16}$ durch *Thraustochytrium* sp. und *E. gracilis*. *Thraustochytrium* sp. und *E. gracilis* SAG 1224-5/3 wurden 24 h mit dem markierten Substrat inkubiert. Das linke Chromatogramm zeigt das verwendete Substrat als freie Fettsäure vor und nach der Reinigung über HPLC. Nach der Inkubation wurden die Fettsäuren aus den Organismen in Form von FAME isoliert und durch Radio-HPLC analysiert. Die Zuordnung der Produkte erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen von Fettsäurestandards oder mit denen von *Thraustochytrium*-eigenen Fettsäuren.

Während jedoch in *E. gracilis* nur eine Umsetzung des Substrates in eine Fettsäure mit der Retentionszeit von ^{14}C-22:5$^{\Delta4,7,10,13,16}$ erfolgte, konnten in *Thraustochytrium* sp. noch zwei weitere markierte Fettsäuren detektiert werden. Ein Vergleich der Retentionszeiten mit denen von Standards wies diese Fettsäuren als ^{14}C-22:5$^{\Delta7,10,13,16,19}$ und DHA aus, wobei das Radiosignal von DHA am intensivsten war (Abbildung 3.3). Aus dem Chromatogramm von *Thraustochytrium* sp. lassen sich folgende Reaktionen ableiten: Eine Umsetzung der aufgenommenen ^{14}C-22:4$^{\Delta7,10,13,16}$ in das Δ4-desaturierte Produkt ^{14}C-22:5$^{\Delta4,7,10,13,16}$ sowie das Δ19/ω3-desaturierte Produkt ^{14}C-22:5$^{\Delta7,10,13,16,19}$ und eine anschließende Umsetzung zu ^{14}C-22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$ (DHA). Die fast identischen Intensitäten der Radiosignale der beiden 22:5-Fettsäuren lassen vermuten, dass die Aktivitäten der Δ4-Desaturase und der ω3-Desaturase vergleichbar sind. Die hier beschriebene ω3-Desaturierung ist der erste direkte Hinweis auf die Existenz einer ω3-Desaturase, die Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 22 Kohlenstoffatomen akzeptiert.

Eine auf der Stufe von C_{22}-Fettsäuren agierende ω3-Desaturase stellt eine weitere Verbindung zwischen dem ω6- und ω3-Syntheseweg für langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren dar. Die fehlende Aktivität dieses Enzyms in *E. gracilis* unterstützt die bereits genannte Vermutung, dass die Verknüpfung der beiden Wege in diesem Organismus nicht auf Ebene der C_{22}-Fettsäuren erfolgt (und vermutlich auch nicht auf Ebene der C_{20}-Fettsäuren). In *Thraustochytrium* sp. hingegen kann die Verbindung des ω6- und ω3-Syntheseweges einen Grund für die effiziente Synthese von DHA repräsentieren. Jedoch kontrastiert die in den Markierungsexperimenten deutlich gewordene hohe Aktivität der ω3-Desaturase mit dem signifikanten Anteil endogener 22:5ω6 in diesem Organismus (18 %). Es stellt sich die Frage, ob in *Thraustochytrium* sp. neben dem ω6- und ω3-Weg auch VLCPUFA-PKS-Systeme für die Biosynthese von DHA und 22:5ω6 verantwortlich sind, um eine besonders hohe Effizienz zu gewährleisten. Metz *et al.* (2001) konnten aus dem *Thraustochytrium*-verwandten Organismus *Schizochytrium* sp. ein PKS-System mit hoher Ähnlichkeit zum EPA-PKS aus *Shewanella* sp. (Yazawa, 1996) isolieren, jedoch fehlt bisher noch ein Nachweis der Funktion. Sie machten zudem *in vivo* mit *Schizochytrium* sp. die Beoachtung, dass exogen zugegebenes ^{14}C-Acetat umgehend für die Biosynthese von DHA verwendet wurde, und keine weiteren Fettsäuren eine radioaktive Markierung aufwiesen. Die Inkorporation des markierten Acetats in DHA wurde durch die Inkubation der Zellen mit Thiolactomycin gehemmt. Thiolactomycin inhibiert verschiedene PKS-Systeme inklusive des EPA-PKS aus *Shewanella* sp. (Facciotti *et al*., 2000). Dagegen wurde die EPA-Synthese in der Alge *Phaeodactylum tricornutum*, aus der bereits verschiedene, in die Synthese von VLCPUFA involvierte Desaturasegene isoliert wurden (Domergue *et al*., 2002), nicht beeinflusst (Facciotti *et al*., 2000). Die mittel- und langkettigen Fettsäuren ^{14}C-Palmitinsäure, ^{14}C-Ölsäure und ^{14}C-Linolensäure wurden in den Experimenten von Metz *et al*. (2001) in Lipide eingebaut, aber nicht weiter elongiert oder desaturiert. Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit mit *Schizochytrium* sp. und ^{14}C-Ölsäure bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Auch *Thraustochytrium* sp. wurde in dieser Arbeit mit ^{14}C-Acetat sowie ^{14}C-Ölsäure inkubiert. Im Gegensatz zu *Schizochytrium* sp. verwendete

dieser Organismus beide Substrate für die Synthese von DHA (Abbildung 3.4). Die Kettenlänge der aus beiden Markierungsversuchen isolierten DHA wurde durch Hydrierung zu Behensäure und anschließender Radio-HPLC bestätigt.

Es bleibt zu klären, ob *Thraustochytrium* sp. ein PKS-System besitzt, und in wieweit es in die Biosynthese von DHA und 22:5ω6 involviert ist. Parallel und unabhängig von dieser Arbeit wurden von Qiu *et al.* (2001) die Gene für die Δ4- und Δ5-Desaturase aus *Thraustochytrium* sp. kloniert, und die Genprodukte wurden funktional verifiziert und charakterisiert. Damit wurden die in den *in vivo*-Markierungsversuchen gewonnenen Beweise für die Existenz einer Δ4-Desaturase in diesem Organismus auf molekularer Ebene bestätigt.

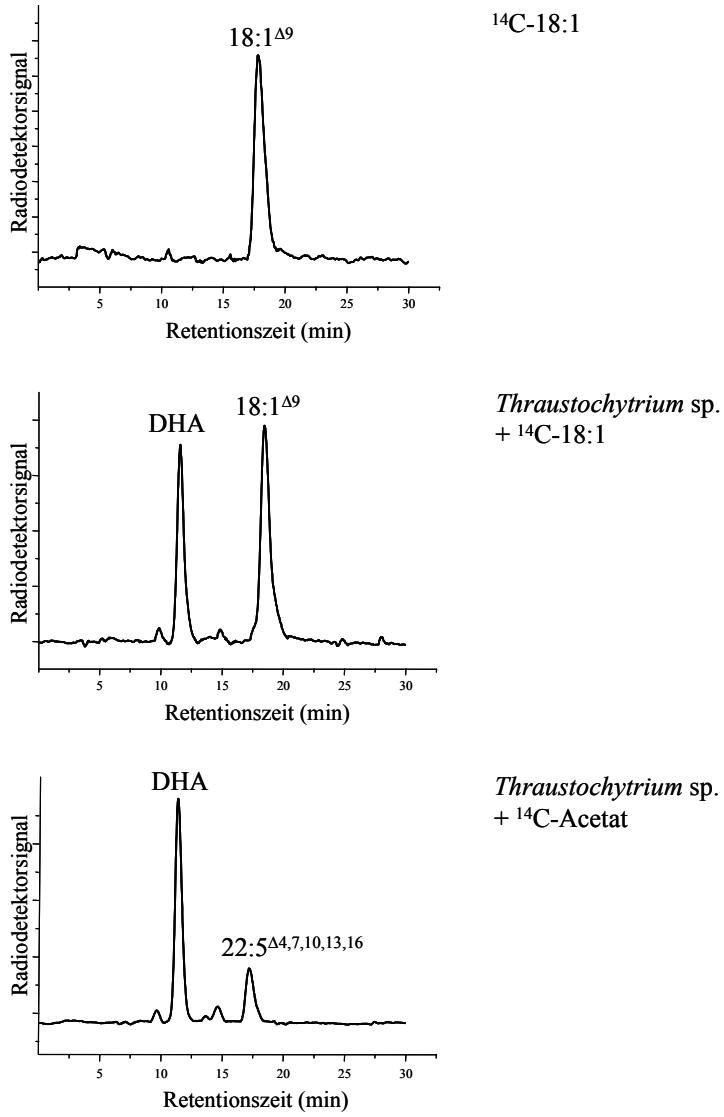


Abbildung 3.4: *In vivo*-Markierung mit [1-^{14}C]Ölsäure und ^{14}C-Acetat. *Thraustochytrium* sp. wurde 24 h mit den radioaktiven Substraten inkubiert. Das oberste Chromatogramm zeigt die verwendete ^{14}C-Ölsäure. Die Fettsäuren wurden aus *Thraustochytrium* sp. als freie Fettsäuren isoliert und über Radio-HPLC analysiert. Die beschrifteten Fettsäuren wurden aufgrund ihrer Retentionszeiten zugeordnet. Die Kettenlänge der DHA wurde zudem durch HPLC-Analyse des Hydrierungsproduktes bestätigt.

3.2 Identifizierung von Klonen mit Ähnlichkeiten zu "Front End"-Desaturasen

3.2.1 Strategien zur Isolierung von Genen für "Front End"-Desaturasen

Die *in vivo*-Markierungsversuche hatten gezeigt, dass *Thraustochytrium* sp., *E. gracilis*, *C. cohnii* und die Alge MA13 als potentielle Kandidaten für die Klonierung einer cDNA für die Δ4-Desaturase und möglicherweise auch für weitere "Front End"-Desaturasen angesehen werden konnten. Aus diesen Organismen und zusätzlich aus der Alge *Cricosphaera carterae* wurde poly(A)-RNA isoliert, die zur Synthese von cDNA diente. Die cDNA wurde als Matrize in PCR-Reaktionen mit degenierten Primern (spezifisch für die zweite und dritte Histidin-Box von "Front End"-Desaturasen) verwendet (Primer-Liste im Anhang). Die erhaltenen PCR-Amplifikate von der erwarteten Größe wurden kloniert und sequenziert. Eine amplifizierte Sequenz aus *C. carterae* zeigte Ähnlichkeiten zu "Front End"-Desaturasen (ccDES).

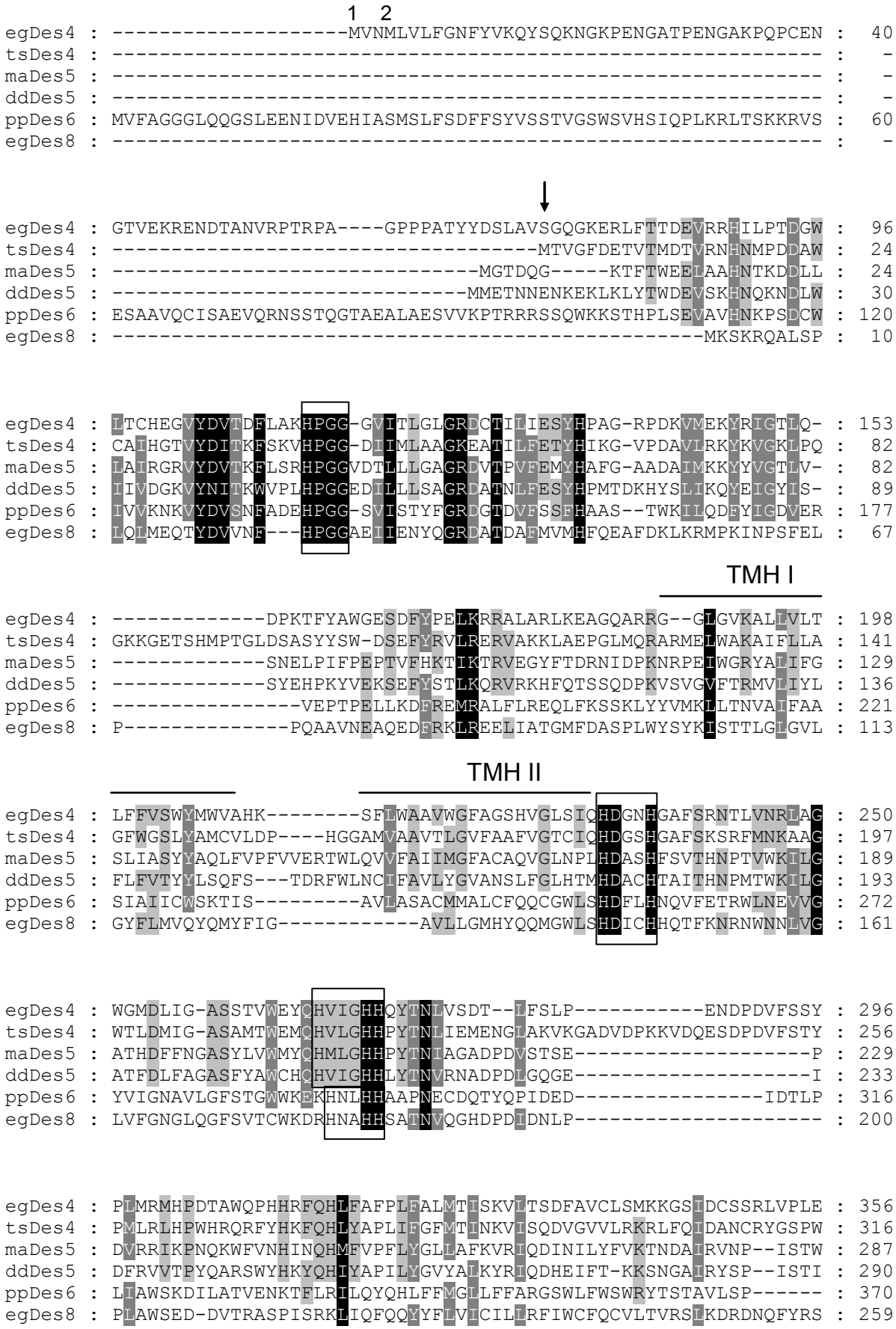
In einem parallelen Ansatz sollten cDNA-Banken hergestellt werden, die für eine Massensequenzierung verwendet werden sollten. Als Organismen wurden *Thraustochytrium* sp., *E. gracilis*, *C. carterae*, *C. cohnii* und MA13 gewählt. Die cDNA-Bank von *E. gracilis* wurde aus dem Stamm Z erstellt. Die Sequenzierungen erfolgten am 5'-Ende der cDNA-Klone, das bei den Genen von "Front End"-Desaturasen für die fusionierte Cytochrom b5-Domäne kodiert. Die Herstellung der *E. gracilis*-cDNA-Bank erfolgte mit dem λZAPII-System durch Herrn Prof. Dr. Martin (Universität Düsseldorf). Die cDNA-Banken von *Thraustochytrium* sp., *C. carterae* und MA13 wurden durch Herrn Dr. Thümmler (TU München, Freising-Weihenstephan) unter Verwendung des λTriplEx2-Systems hergestellt. Dazu wurde Zellmaterial (MA13) oder Gesamt-RNA (*C. carterae*, *Thraustochytrium* sp.) aus den in dieser Arbeit angezogenen Kulturen zur Verfügung gestellt. Die *C. cohnii*-cDNA-Bank in λZAPII war Eigentum der BASF Plant Science GmbH (Ludwigshafen). Die Massensequenzierungen erfolgten durch die BASF Plant Science GmbH. Bis zum Ende dieser Arbeit waren die cDNA-Banken von *Thraustochytrium* sp., *E. gracilis* und *C. cohnii* in der Sequenzierung eingesetzt worden.

Die bei den Sequenzierungen erfassten *expressed sequence tag* (EST)-Klone mit Ähnlichkeit zu Cytochrom b5-Sequenzen wurden vollständig sequenziert, um Hinweise zu finden, dass es sich nicht um andere Cytochrom b5-Fusionsproteine oder freies Cytochrom b5 handelte. Keiner der ca. 1700 sequenzierten einmaligen EST-Klone von *Thraustochytrium* sp. und der ca. 2900 einmaligen EST-Klone von *C. cohnii* wies eine Ähnlichkeit zu bekannten "Front End"-Desaturasen auf. Der Vergleich erfogte mit Hilfe von tBLASTn (Altschul *et al*., 1990) auf Ebene der Aminosäuresequenz mit den in alle sechs Leserahmen übersetzten EST-Klonen, da die Nukleotidsequenzen der Desaturasen sehr stark voneinander abweichen können. Aus der cDNA-Bank von *Thraustochytrium* sp. konnte ein cDNA-Klon (TC049) isoliert werden, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten zu Δ12-Desaturasen aufwies. Zwei aus der cDNA-Bank von *C. cohnii* isolierte Klone (CC020 und CC095)

kodieren für putative Acyl-CoA-Dehydrogenasen mit C-terminalen Erkennungssequenzen für eine Lokalisation in den Peroxisomen (PTS1; Gould *et al*., 1989). Die Aminosäuresequenzen besitzen eine für diese Enzyme ungewöhnliche Cytochrom b5-Fusion am N-Terminus. Solche fusionierten Acyl-CoA-Dehydrogenasen wurden auch für die Pilze *Neurospora crassa* und *Glomus intraradices* beschrieben (Bago *et al*., 2002). Unter 2700 EST-Klonen aus *E. gracilis* zeigte ein Klon (egDES) Ähnlichkeiten zu "Front End"-Desaturasesequenzen.

3.2.2 Identifizierung eines putativen Δ4-Desaturase-Klons aus *E. gracilis* Stamm Z

Der bei der Massensequenzierung der *E. gracilis*-cDNA-Bank isolierter Klon zeigte hohe Ähnlichkeit zu der kurz zuvor klonierten cDNA für die Δ4-Desaturase aus *Thraustochytrium* sp. (Qiu *et al*., 2001). Da das cDNA-Insert zufällig in falscher Orientierung in den Phagen-Vektor kloniert worden war, enthielt die abgeleitete Aminosäuresequenz das dritte Histidin-Box-Motiv (H/QXXHH). Das Insert war nur ca. 300 bp lang, so dass die Isolierung eines Volllängenklons aus der cDNA-Bank erforderlich war. Es wurden ca. 50000 *plaque forming units* analysiert, von denen zwei ein positives Signal zeigten. Der größere positive Klon wies ein cDNA-Insert mit einer Länge von 2600 bp auf (egDES). Die Länge des cDNA-Klons ließ vermuten, dass es sich um einen Volllängenklon handelte, obwohl eine Poly(A)-Sequenz fehlte. Er kodiert für zwei putative offene Leserahmen (ORF), die sich nur in der Position des Startcodons unterscheiden. Der längere ORF (egDES4-1) von 1635 bp kodiert für ein Polypeptid von 544 Aminosäuren (aa) (egDes4-1), der kürzere (egDES4) mit 1626 bp für eins von 541 aa (egDes4). egDes4-1 wurde in der BLAST-Suche mit allen bekannten Peptiden der PubMed-Datenbanken verglichen. Dabei zeigte die Sequenz die höchste Übereinstimmung mit der Δ4-Desaturase aus *Thraustochytrium* sp. (Qiu *et al*., 2001), mit 41 % Identität über eine Länge von 449 aa der egDes4-1-Sequenz. Die nächst ähnlichen Sequenzen gehörten zu einer Δ5-Desaturase aus *Dictyostelium discoideum* (Saito *et al*., 2000) und der Δ5-Desaturase aus *Mortierella alpina* (Knutzon *et al*., 1998; Michaelson *et al*., 1998) (Tabelle 3.2). Abbildung 3.6 zeigt einen Vergleich von egDes4-1 mit den oben genannten Desaturasen. Zudem wird die Sequenz von egDes4-1 mit der der Δ6-Desaturase aus *Physcomitrella patens* (Girke *et al*., 1998) und der der Δ8-Desaturase aus *E. gracilis* (Wallis & Browse, 1999) verglichen. Die zugehörigen Identitäts- und Ähnlichkeitswerte über die volle Sequenzlänge von egDes4-1 werden ebenfalls in Tabelle 3.2 dargestellt.


1 2
TMH I
TMH II

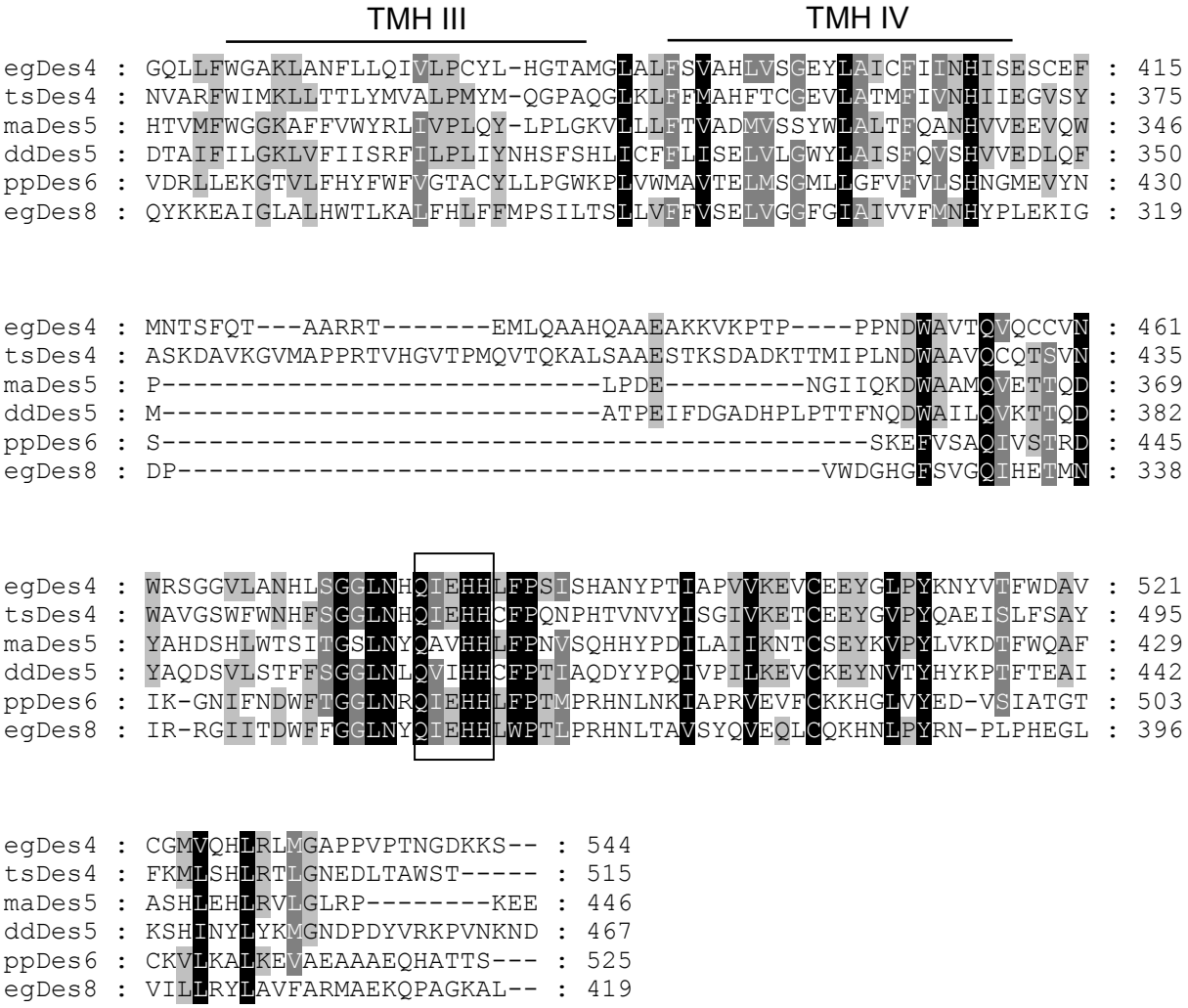


Abb. 3.6: Aminosäuresequenzvergleich von egDes4-1 mit verschiedenen "Front End"-Desaturasen. Verwendet wurden die Sequenzen der in Tabelle 3.2 angegebenen Desaturasen. Der Vergleich erfolgte mit dem Programm ClustalX. Die putativen Starts von egDes4-1 und egDes4 sind durch die Ziffern 1 (egDes4-1) und 2 (egDes4) angedeutet. Die konservierten Histidin-Boxen und das HPGG-Motiv der fusionierten Cytochrom b5-Domäne sind umrandet. Die Bereiche der putativen transmembranen Helices (TMH) sind gekennzeichnet. Ein Pfeil markiert die Stelle, an der in späteren Experimenten die N-terminale Extension deletiert wurde (siehe 3.4.3.4). Die verwendete Sequenz von egDes8 entspricht nicht dem Datenbankeintrag, sondern wurde durch Sequenzierung ermittelt (siehe auch Kapitel 3.7).

Tab. 3.2 Identität und Ähnlichkeit von egDes4-1 zu verschiedenen "Front End"-Desaturasen. Die durch das Programm ClustalX ermittelten Identitäts- (vor dem Querstrich) und Ähnlichkeitswerte (nach dem Querstrich) sind in Prozent angegeben und beziehen sich auf die gesamte Aminosäuresequenz von egDes4-1. tsDes4: Δ4-Desaturase aus *Thraustochytrium* sp., ddDes5: Δ5-Desaturase aus *D. discoideum*, maDes5: Δ5-Desaturase aus *M. alpina*, ppDes6: Δ6-Desaturase aus *P. patens*, egDes8: Δ8-Desaturase aus *E. gracilis* Stamm Z. Die Referenzen befinden sich im Text.

	tsDes4	**ddDes5**	**maDes5**	**ppDes6**	**egDes8**
egDes4-1	33/46	24/41	23/38	16/31	14/27

Die Peptidsequenz von egDes4-1 weist verschiedene, für "Front End"-Desaturasen typische Elemente wie die drei konservierten Histidin-Boxen des katalytischen Zentrums und eine N-terminale Cytochrom b5-Fusion auf. Die 7-8 Histidine des aktiven Zentrums sind für die Funktion der Desaturasen essentiell (Shanklin *et al*., 1994). Die zweite Histidin-Box von egDes4-1 zeigt das seltenere HXXXHH-Motiv (Abbildung 3.6), das bisher nur bei der Δ6-Desaturase aus *Synechocystis* sp. (Reddy *et al*., 1993), den Δ5-Desaturasen aus *D. discoideum* (Saito & Ochiai, 1999; Saito *et al*., 2000), *P. irregulare* (Hong *et al*., 2003) und *M. alpina* (Knutzon *et al.*, 1998; Michaelson *et al.*, 1998) sowie der Δ4-Desaturase aus *Thraustochytrium* sp. (Qiu *et al*., 2001) gefunden wurde. Die dritte Histidin-Box enthält den bei den "Front End"-Desaturasen üblichen H/Q-Austausch in der ersten Position. Dieses Glutamin spielt ebenfalls eine essentielle Rolle für die Funktion der Desaturasen, da ein Ausstausch gegen ein Histidin zum Verlust der Aktivität führt (Sayanova *et al*., 2001).

Das Programm PSORT (Nakai & Kanehisa, 1992) weist egDes4-1 den Membranproteinen des endoplasmatischen Retikulums (ER) zu. Obwohl das KKX-Motiv von egDes4-1 nicht dem Di-Lysin-Motiv K(X)KXX von ER-Membranproteinen des Typs I und II entspricht (Teasdale & Jackson, 1996), deutet die C-terminale Position auf eine Funktion als Retentionssignal des ER hin. Zudem wurde auch für die Δ8-Δ7-Sterol-Isomerase aus *S. cerevisiae* (Arthington *et al*., 1992), einem Membranprotein des ER, ein C-terminales KKX-Motiv beschrieben (Soustre *et al*., 2000). Ein Hydropathie-Profil wurde nach Kyte und Doolittle (1982) angefertigt, und mit dem Programm TMHMM 2.0 (Krogh *et al*., 2001) wurden die ungefähren Positionen der transmembranen Helices (TMH) bestimmt. Abbildung 3.7 zeigt einen Vergleich der erstellten Profile für egDes4-1 und der Δ4-Desaturase aus *Thraustochytrium* sp. (tsDes4). Es besteht Unklarheit, mit wievielen α-Helices die "Front End"-Desaturasen die Membran des ER durchziehen. Das bislang allgemein akzeptierte Modell mit vier TMH wurde anhand experimenteller Daten für die Δ5-Desaturase aus *Bacillus subtilis* in Frage gestellt, für die ein neues Modell mit sechs transmembranen Bereichen vorgeschlagen wurde (Diaz *et al*., 2002). Auch das Programm TMHMM ordnet egDes4-1 und tsDes4 ein bis zwei weitere TMH zu (TMH IIa und IIb in Abbildung 3.7), wobei TMH IIb mit einer TMH der *Bacillus*-Desaturase übereinstimmt. Die im Hydropathie-Profil der *Bacillus*-Desaturase angedeutete dritte TMH, die hinter der zweiten Histidin-

Box liegt, findet jedoch keine Äquivalente in den hier gezeigten Profilen von egDes4-1 und tsDes4. Dagegen ist die hier dargestellte, putative dritte TMH (TMH IIa) zwischen der ersten und zweiten Histidin-Box positioniert. Da in diesem Fall die beiden Histidin-Boxen an verschiedenen Seiten der Membran zu liegen kommen würden, erscheint diese Membrantopologie unrealistisch und wurde auch für die Δ5-Desaturase verworfen. Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei den dargestellten hydrophoben Bereichen IIa und IIb nicht um transmembrane Helices handelt, sondern um membranassoziierte Strukturen. Dies könnte insbesondere im Fall von IIa dazu dienen, die zweite Histidin-Box des aktiven Zentrums in der Nähe der Membranlipide und somit des Substrates zu positionieren.

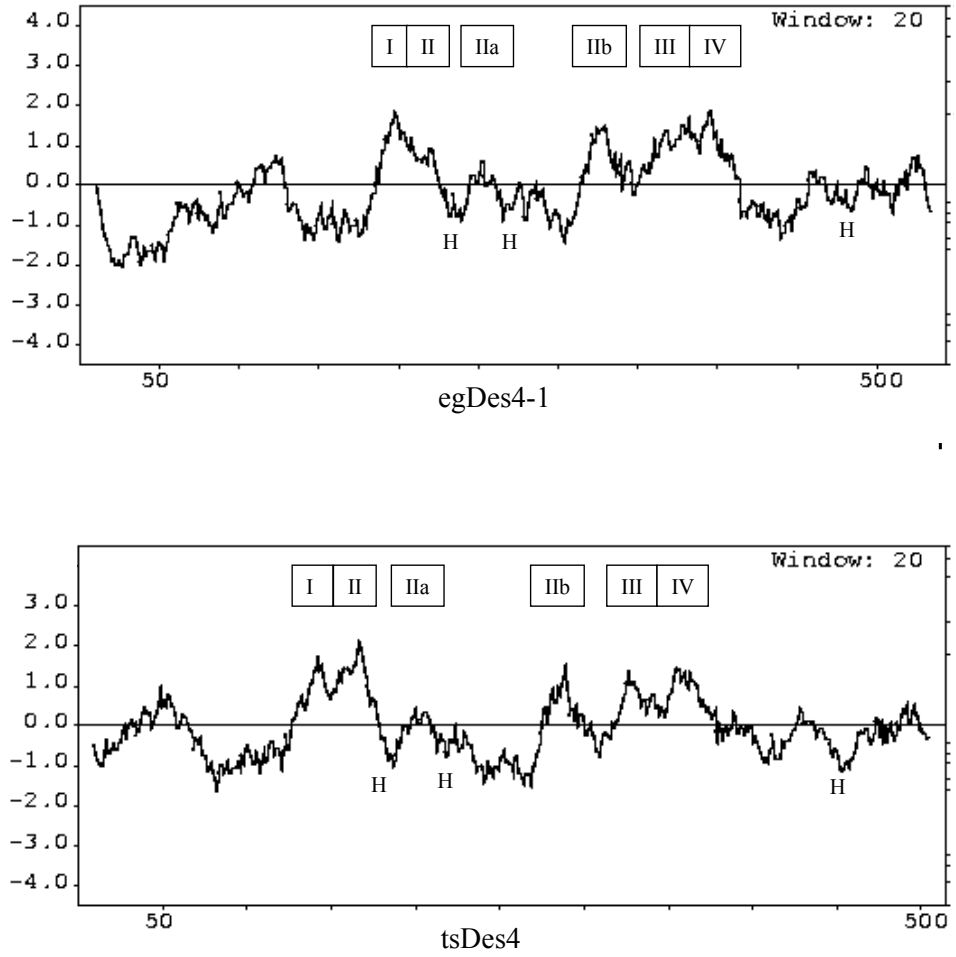


Abb. 3.7: Vergleich der Hydropathie-Profile (nach Kyte & Doolittle, 1982) von egDes4-1 und der Δ4-Desaturase aus *Thraustochytrium* sp. (tsDes4) (Qiu *et al*., 2001). Die Positionen der potentiellen transmembranen Helices wurden mit dem Programm TMHMM 2.0 (Krogh *et al*., 2001) bestimmt und in das Profil eingezeichnet. Die Helices I, II, III und IV entsprechen dem allgemein akzeptierten Topologie-Modell, wohingegen noch diskutiert wird, ob es sich bei den Bereichen IIa und IIb tatsächlich um TMH handelt. Die Positionen der drei Histidin-Boxen des aktiven Zentrums werden durch ein "H" angezeigt.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei egDes4-1 um ein mit Cytochrom b5-fusioniertes Polypeptid. Das Cytochrom b5 stellt den Elektronendonator für die fusionierte Desaturase-Domäne der "Front End"-Desaturasen dar. So führte die Deletion der Cytochrom b5-Domänen der Δ6-Desaturase aus *B. officinalis* (Sayanova *et al.*, 1997) und der Δ9-Desaturase aus *S. cerevisiae* in beiden Fällen zu einer Inaktivierung der Desaturase (Mitchell & Martin, 1995; Sayanova *et al*., 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass das Histidin des konservierten HPGG-Motivs für die Funktion essentiell ist (Sayanova *et al*., 1999).

Ein auffälliges Merkmal der egDes4-1-Sequenz ist die lange N-terminale Extension der Cytochrom b5-Domäne. Diese Verlängerung der Cytochrom b5-Domäne wurde bislang nur für “Front End“-Desaturasen / Acetylenasen mit Δ6-Regiospezifität aus den Moosen *P. patens* (Girke *et al*., 1998) und *Ceratodon purpureus* (Sperling *et al*., 2000) beschrieben. Jedoch konnte diesen Extensionen bisher keine Funktion zugewiesen werden. Interessanterweise weist die Extension von egDes4-1 keine Ähnlichkeiten zu denen der Moos-Desaturasen auf (Abbildung 3.6), die unter sich ca. 50 % identisch sind.

Die Fusion mit dem Elektronendonator Cytochrom b5 geht bei "Front End"-Desaturasen mit einer Reduzierung der Anzahl von sauren Aminosäuren in der Häm-Bindedomäne einher (Sperling & Heinz, 2001). Freie Cytochrome b5 weisen in diesem Bereich im Durchschnitt 12 saure Aminosäuren auf. Diese Zahl reduziert sich auf 5-7 saure Aminosäuren bei fusionierten Cytochromen b5. Auch egDes4-1 zeigt diese Tendenz mit nur 7 sauren Aminosäuren in der Umgebung des HPGG-Motivs (zwischen dem konservierten W96 und G150, vgl. Abbildung 3.6). Es wird angenommen, dass diese Reduzierung einer Optimierung der unpolaren Interaktion zwischen dem Cytochrom b5 und der Desaturase dient (Sperling & Heinz, 2001). Dies stellt möglicherweise die Ursache dar, warum die Expression der Δ6-Desaturasen aus *B. officinalis* mit deletiertem Cytochrom b5 in Blättern von *Arabidopsis thaliana* aktivitätslos blieb (Sayanova *et al*., 1999).

Aus Abbildung 3.6 wird ersichtlich, dass die Aminosäuresequenzen von egDes4-1 und der Δ8-Desaturase aus *E. gracilis* nur in sehr konservierten Positionen übereinstimmen. Im Gegensatz zur verlängerten Cytochrom b5-Fusion von egDes4-1 besitzt die Δ8-Desaturase eine sehr kurze Cytochrom b5-Domäne. Zur genaueren Analyse der Verwandschaft von egDes4-1 zu dieser Desaturase und anderen "Front End"-Desaturasen aus verschiedenen Organismen wurde die Aminosäuresequenz mit den in Tabelle 1.3 verwendeten "Front End"-Desaturasen verglichen und ein Phylogramm erstellt (Abbildung 3.8).

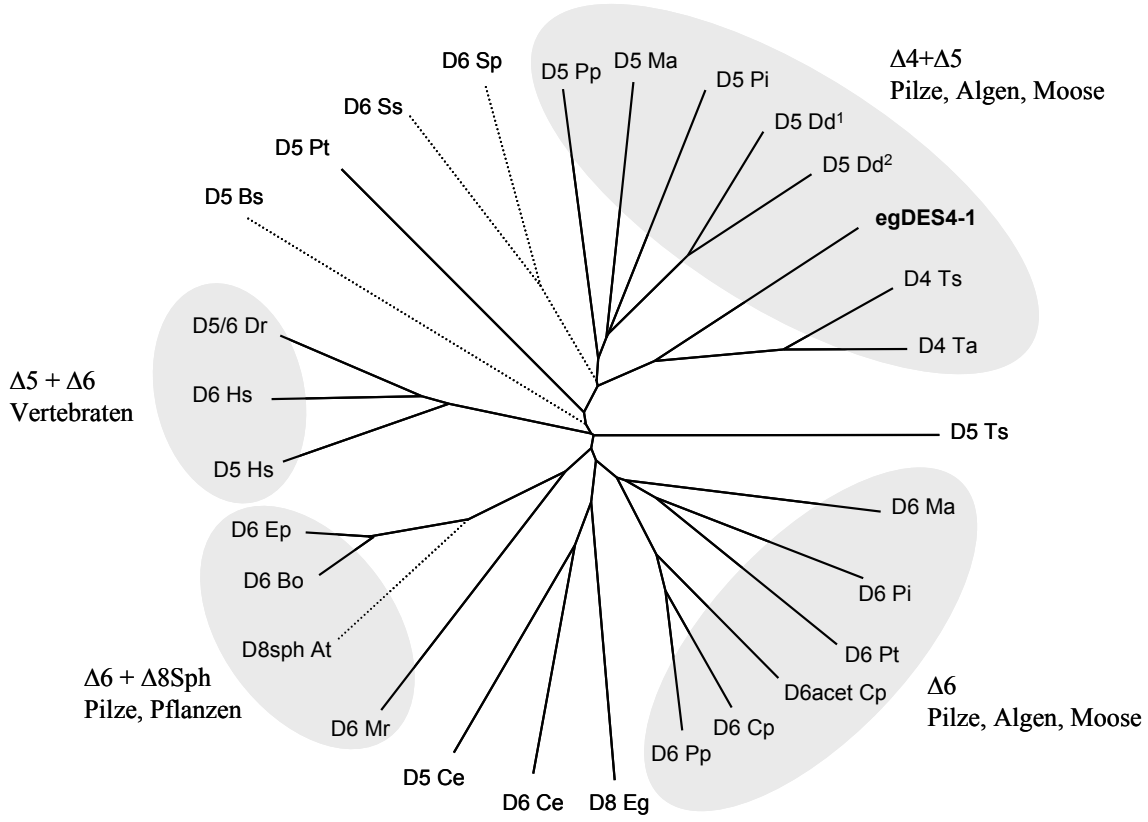


Abb. 3.8: Einordnung von egDes4-1 in ein Phylogramm mit "Front End"-Desaturasen. Das Phylogramm wurde mit ClustalX und Treeview erstellt. Bei den gepunkteten Linien handelt es sich nicht um "Front End"-Desaturasen. Sie wurden zur Veranschaulichung miteinbezogen. D4, D5, D6, D8: Δ4-,Δ5-, Δ6-, Δ8-Desaturasen; D6acet: Δ6-Desaturase/Acetylenase; Δ8sph: Δ8-Sphingolipid-Desaturase; Sp: *Spirulina platensis*, Ss: *Synechocystis* sp., Pp: *Physcomitrella patens*, Ma: *Mortierella alpina*, Pi: *Pythium irregulare*, Dd: *Dictyostelium discoideum*, Eg: *Euglena gracilis*, Ts: *Thraustochytrium* sp., Ta: *T. aureus*, Pt: *Phaeodactylum tricornutum*, Cp: *Ceratodon purpureus*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Mr: *Mucor rouxii*, At: *Arabidopsis thaliana*, Bo: *Borago officinalis*, Ep: *Echium pitardii*, Hs: *Homo sapiens*, Dr: *Danio rerio*, Bs: *Bacillus subtilis*. Referenzen in Tab. 1.3.

In dem Phylogramm teilen sich die meisten "Front End"-Desaturasen in vier große Hauptgruppen: Die Desaturasen aus Pilzen, Algen und Moosen mit Δ4- und Δ5-Regiospezifität, die Desaturasen aus den genannten Organismen mit Δ6-Regiospezifität, die mit den Δ8-Sphingolipid-Desaturasen eng verwandten Δ6-Desaturasen der Pflanzen und Pilze, sowie die "Front End"-Desaturasen der Vertebraten. Die Δ8-Desaturase aus *E. gracilis* und die Δ5- und die Δ6-Desaturase des Nematoden *Caenorhabditis elegans* sind den Δ6-Desaturasen der Pilze, Algen und Moose am ähnlichsten. Die Δ5-Desaturase aus *Thraustochytrium* sp. ordnet sich in keine der genannten Gruppen. egDes4-1 fällt in die Gruppe der "Front End"-Desaturasen mit Δ4- und Δ5-Regiospezifität aus Pilzen, Algen und Moosen. Dabei ist das Polypeptid den Δ4-Desaturasen der *Thraustochytrium*-Arten am ähnlichsten. egDes4-1 und die Δ8-Desaturase aus *E. gracilis* zeigen keine Ähnlichkeit. Eine frühe evolutionäre Trennung von Desaturasen mit unterschiedlicher Regiospezifität wurde für alle bisher beschriebenen "Front End"-Desaturasen aus Algen, Pilzen und Moosen beschrieben (Sperling *et al*., 2003). Dagegen stellt die

getrennte Entwicklung der "Front End"-Desaturasen mit Δ6- und Δ5-Regiospezifität aus *C. elegans* oder aus den Vertebraten ein neueres Ereignis in der Evolution dieser Enzyme dar.

3.2.3 Nachweis von egDES4-1 im Genom von *E. gracilis*

Die für die EST-Sequenzierung und Isolierung des egDES-Klons verwendete cDNA-Bank von *E. gracilis* Stamm Z wurde nicht mit Zellmaterial aus eigener Kultur hergestellt. Daher wurde durch Southern-Analyse überprüft, ob das Gen für die Δ4-Desaturase im Genom der Alge vorkommt. Zudem sollte untersucht werden, ob eine für das Desaturase-Gen aus dem Stamm Z spezifische Sonde auch mit dem Desaturase-Gen des bei den *in vivo*-Markierungsversuchen verwendeten Stamms SAG 1224-5/3 hybridisiert.

Die Sequenz der eingesetzten DIG-markierten Sonde befindet sich im Anhang. Die Sonde ist komplementär zu einem Bereich von egDES4-1, der für den hinteren Teil der Cytochrom b5-Domäne und den Beginn der Desaturase-Domäne kodiert. Die genomische DNA wurde einzeln mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI, *BamH*I und *Kpn*I geschnitten. *Eco*RI und *Kpn*I wurden zusätzlich zusammen in einem Restriktionsansatz verwendet. In der cDNA-Sequenz des Klons egDES befinden sich keine Erkennungsstellen für diese Enzyme. Für beide Stämme wurden stringente Bedingungen beim Waschen der Membran nach der Hybridisierung gewählt (siehe 2.17). Abbildung 3.11 stellt die mit der genomischen DNA aus dem Stamm Z erhaltenen Ergebnisse der Southern-Analyse dar.

Mit der genomischen DNA aus *E. gracilis* Stamm Z wurden in allen Spuren Signale erhalten. Im Falle der mit *Eco*RI-geschnittenen DNA wurden mit der Sonde zwei DNA-Banden mit einer Größe von 3,1 kb und 1,9 kb markiert. Möglicherweise befindet sich ein Intron mit einer Erkennungsstelle für *Eco*RI im dem zur Sonde komplementären Bereich des Gens, so dass diese mit zwei DNA-Fragmenten hybridisiert. Da das Signalmuster des *Eco*RI-*Kpn*I-Doppelverdaus mit dem Muster des *Eco*RI-Einzelverdaus identisch ist, kann davon ausgegangen werden, dass die *Kpn*I-Erkennungssequenzen stromaufwärts und stromabwärts der Erkennungsstellen von *Eco*RI liegen. Dies wird auch durch die Größe des Signal-gebenden *Kpn*I-Fragmentes bestätigt (ca. 8,4 kb). Es deuten sich zusätzlich schwach markierte Banden in allen Spuren an. Diese könnten auf eine Hybridisierung der Sonde mit weiteren Desaturasegenen oder mit Sequenzen, die für ein Cytochrom b5 kodieren, zurückzuführen sein. Es ist nicht auszuschließen, dass solche Gene auch für Desaturasen mit der gleichen Regiospezifität wie egDes4 kodieren können. So konnte auch für den Schleimpilz *D. discoideum* gezeigt werden, dass sie zwei homologe Gene für "Front End"-Desaturasen mit Δ5-Regiospezifität besitzt, deren Genprodukte beide in Hefe aktiv waren (Saito & Ochiai, 1999; Saito *et al*., 2000). Diese Desaturasen zeigen eine unterschiedliche aber auch überschneidende Substratspezifität (Saito *et al*., 2000).

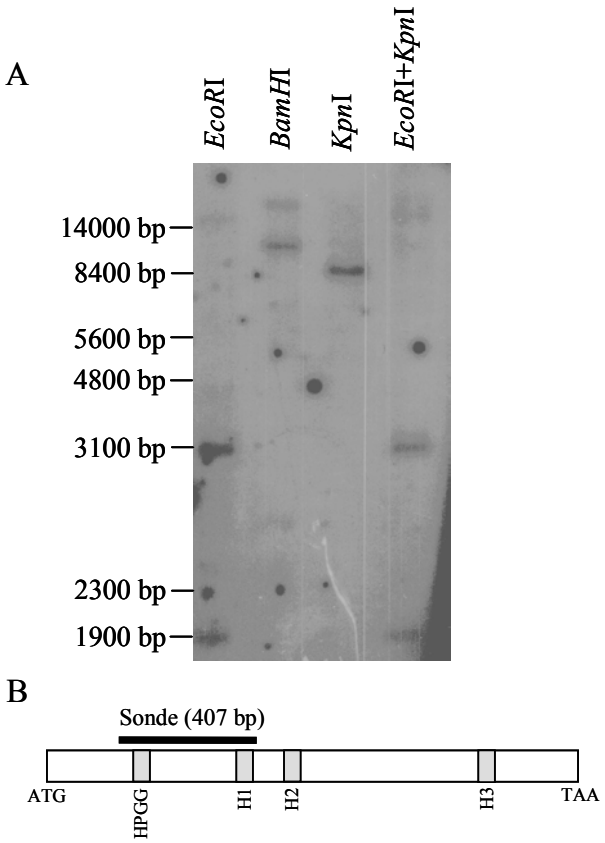


Abb. 3.11: Southern-Analyse von genomischer DNA aus *E. gracilis* Stamm Z (A). Jeweils 10 µg der mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnittenen genomischen DNA wurden in einem 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt und nach Kapillartransfer auf eine Membran mit der DIG-markierten Sonde hybridisiert. In dem unteren Schema (B) wird der Bereich des ORF egDES4-1, der komplementär zur verwendeten Sonde ist, durch einen schwarzen Balken angezeigt. HPGG, H1, H2, und H3 repräsentieren die für das HPGG-Motiv des Cytochroms b5 und die für die drei Histidin-Boxen kodierenden Sequenzen.

Die Sonde hybridisierte nicht mit der genomischen DNA aus *E. gracilis* SAG 1224-5/3 (Daten nicht gezeigt). Auch eine Reduktion der Stringenz (Temperatursenkung auf 50 °C beim Waschen der Membran) führte bei diesem Stamm nicht zur Detektion von DNA-Banden. In einem zweiten Ansatz wurde eine Sonde verwendet, die komplementär zum 3'-Ende des egDES4-1-ORF und einem Teil des stromabwärts liegenden untranslatierten Bereiches ist (Sequenz im Anhang). Wie schon für die erste Sonde beobachtet, hybridisierte die zweite Sonde mit genomischer DNA aus dem Stamm Z, jedoch nicht mit genomischer DNA aus dem Stamm SAG 1224-5/3 (Daten nicht gezeigt). Es stellt sich die Frage, ob dieser Unterschied auf großen Sequenzunterschieden beruht, und inwieweit die beiden Stämme der Art *E. gracilis* miteinander verwandt sind.

3.2.4 Identifizierung eines putativen Δ6-Desaturase-Klons aus *Cricosphaera carterae*

Durch PCR mit degenerierten Primern konnte aus *C. carterae* ein Fragment mit Ähnlichkeit zu bekannten "Front End"-Desaturasesequenzen amplifiziert werden. Es wurde für die Synthese einer DIG-markierten Sonde verwendet, mit der eine *C. carterae*-cDNA-Bank nach einem Volllängenklon durchgemustert wurde. Da sich die Excision der positiven Klone als erfolglos erwies, wurden die cDNA-Inserts durch PCR mit Phagen-DNA als Matrize amplifiziert. Der längste erhaltene Klon, ccDES, hatte eine Insertlänge von 1609 bp und wurde vollständig sequenziert. Die Sequenz wies drei putative Startcodons auf, aus denen sich ORF mit einer Länge von 1497 bp (ccDES1), 1467 bp (ccDES2) und 1311 bp (ccDES3) ergeben, die für Polypeptide mit 499 Aminosäuren (aa) (ccDes1), 489 aa (ccDes2) und 437 aa (ccDes3) kodieren. Eine BLAST-Suche mit ccDes1 in den Datenbanken ergab höchste Ähnlichkeit zu Δ6-Desaturasen und Δ8-Sphingolipid-Desaturasen. So liegen die mit ClustalX errechneten Identitätswerte von ccDes1 bei jeweils 32 % (51 % Ähnlichkeit) zu der Δ6-Desaturase aus *Borago officinalis* (Sayanova *et al*., 1997) und zu der Δ8-Sphingolipid-Desaturase aus *Aquilegia vulgaris* (Michaelson *et al*., 2001). Abbildung 3.9 zeigt einen Vergleich der Aminosäure-Sequenzen. Die Länge von Δ6-Desaturasen und Δ8-Sphingolipid-Desaturasen liegt im Allgemeinen bei knapp unter 450 aa, so dass zumindest die beiden längeren ORF des ccDES-cDNA-Klons für ein funktionales Protein kodieren sollten. Die Identitätswerte zu Desaturasen mit anderer Regiospezifität sind deutlich geringer, wobei ccDes1 nach den Δ6-Desaturasen und Δ8-Sphingolipid-Desaturasen der Δ5-Desaturase aus Mensch (Leonard *et al*., 2000b) am ähnlichsten ist (23% Identität / 37 % Ähnlichkeit).

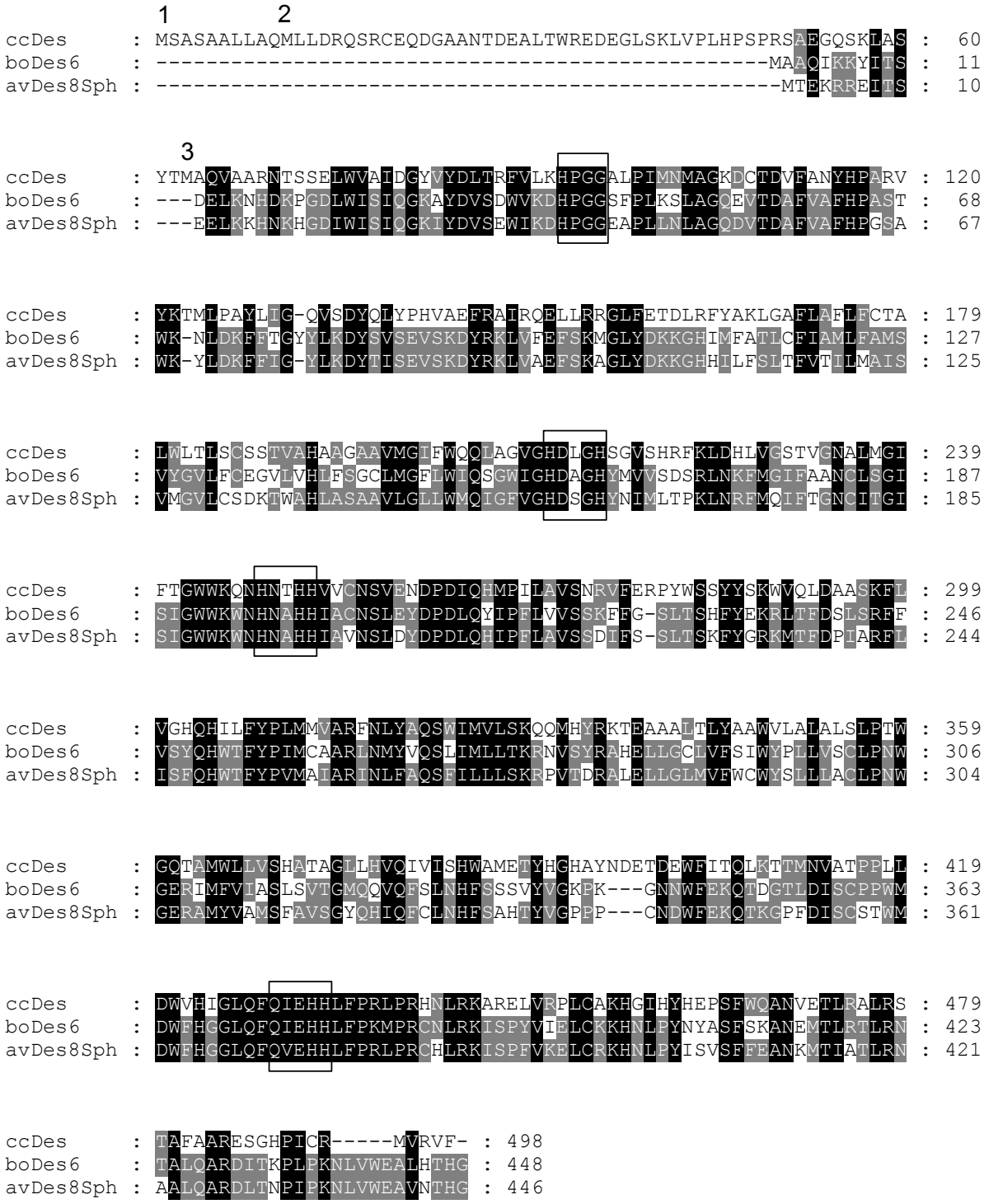


Abb. 3.9: Aminosäuresequenzvergleich von ccDes mit einer Δ6-Desaturase und einer Δ8-Spingolipiddesaturase aus Pflanzen. Der Vergleich erfolgte mit dem Programm ClustalX. Die putativen Starts der drei Polypeptide sind durch die Ziffern 1 (ccDes1), 2 (ccDes2) und 3 (ccDes3) gekennzeichnet. Die konservierten Histidin-Boxen und das HPGG-Motiv der fusionierten Cytochrom b5-Domäne sind umrandet. boDes6: Δ6-Desaturase aus *B. officinalis* (Sayanova *et al*., 1997), avDes8Sph: Δ8-Sphingolipid-Desaturase aus *Aquilegia vulgaris* (Michaelson *et al*., 2001).

3.3 Funktionale Identifizierung eines "Front End"-Desaturase-ähnlichen Klons aus *E. gracilis*

Die Versuche zur funktionalen Identifizierung der putativen Klone für "Front End"-Desaturasen erfolgten durch Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Dazu wurden die ORF durch PCR amplifiziert und gerichtet in den Expressionsvektor pYES2 kloniert (2.19). Der Leervektor pYES2 und die Konstrukte wurden für die Transformation von *S. cerevisiae* 334 (Hovland *et al*., 1989) verwendet. Die Expression offener Leserahmen wurde durch den P_{GAL1}-Promotor kontrolliert und durch Zugabe von Galaktose induziert. In den Fällen, in denen das potentielle Substrat der exprimierten Polypeptide nicht Bestandteil der endogenen Lipide von *S. cerevisiae* war, wurden Fettsäuren zu den Kulturen zugegeben. Es wurde davon ausgegangen, dass die aufgenommenen Fettsäuren durch die Enzyme der Hefe in Lipide eingebaut wurden, die das eigentliche Substrat der pflanzlichen "Front End"-Desaturasen darstellen. Daher wird im Weiteren zur Vereinfacherung auf diese Unterscheidung verzichtet, und die Fettsäuren werden als Substrate bezeichnet. Die Hefen, die mit dem Leervektor pYES2 transformiert waren, dienten als Kontrollen.

3.3.1 Expression von egDES4-1 und egDES4

Aufgrund der Sequenzanalyse wurde vermutet, dass der aus *E. gracilis* Stamm Z isolierte cDNA-Klon für eine Δ4-Desaturase kodiert (Tabelle 3.2). Wie bereits erwähnt, besitzt der Klon zwei putative ORF, die beide in *S. cerevisiae* exprimiert wurden. Die durch die Klonierung in pYES2 erhaltenen Konstrukte erhielten die Bezeichnungen pYES2-EgDES4-1 und pYES2-EgDES4. Die Hefekulturen wurden mit potentiellen Fettsäuresubstraten 4 Tage bei 15 °C inkubiert, da sich diese Temperatur bei der funktionalen Identifizierung der Δ4-Desaturase aus *Thraustochytrium* sp. als geeignet erwiesen hat (Qiu *et al*., 2001).

Transgene Hefen, die mit den Konstrukten pYES2-EgDES4-1 oder pYES2-EgDES4, bzw. dem Leervektor pYES2 transformiert worden waren, wurden in Gegenwart von Docosapentaensäure ($22:5^{\Delta7,10,13,16,19}$, 22:5ω3) als potentiellem Fettsäuresubstrat der Δ4-Desaturase kultiviert. Anschließend wurden die Fettsäuren als Fettsäuremethylester (FAME) isoliert und über Gaschromatographie (GC) analysiert (2.21.4). Das Fettsäureprofil der pYES2-tragenden Hefen zeigt, dass 22:5ω3 in die Zellen aufgenommen wurde und dort ca. 9 % der Gesamtfettsäuren repräsentierte (Tabelle 3.3 und Abbildung 3.10). Neben 22:5ω3 weist das Chromatogramm auch die Signale für die Hefe-eigenen Fettsäuren 16:0, $16:1^{\Delta9}$, 18:0, $18:1^{\Delta9}$ und Vaccensäure ($18:1^{\Delta11}$) auf. Weitere Fettsäuren konnten nicht in signifikanten Mengen entdeckt werden. Dagegen weist das Fettsäureprofil der pYES2-egDES4-enthaltenen Hefe eine neue Fettsäure auf, die beim Vergleich mit den Retentionszeiten von Fettsäure-Standards als DHA ($22:6^{\Delta4,7,10,13,16,19}$) identifiziert werden konnte (Abbildung 3.10).

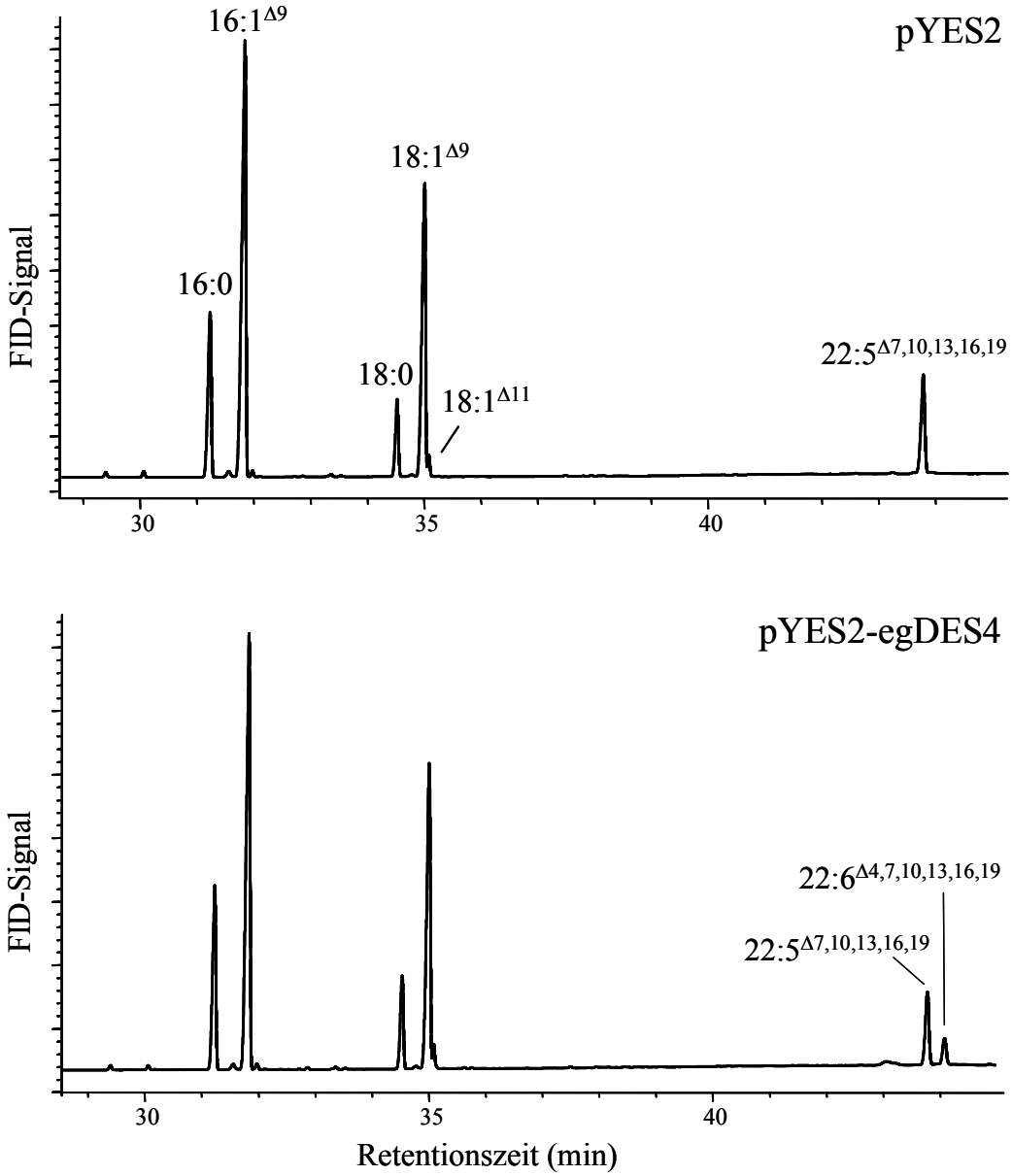


Abb. 3.10: Δ4-Desaturierung von 22:5ω3 in egDES4-exprimierenden Hefen. Wiedergegeben werden die Fettsäureprofile der mit dem Leervektor pYES2 bzw. dem Konstrukt pYES2-egDES4 transformierten Hefezellen. Die Kulturen wurden 4 Tage bei 15 °C mit 300 µM $22:5^{\Delta7,10,13,16,19}$ inkubiert. Gezeigt werden die Gaschromatogramme der aus den Zellsedimenten isolierten FAME. Die Zuordnung der Fettsäuren erfolgte nach Vergleich der Retentionszeiten mit Standards.

Tab. 3.3: Fettsäurezusammensetzungen der mit dem Leervektor pYES2 bzw. dem Konstrukt pYES2-egDES4 transformierten Hefen. Angegeben sind die Anteile der Fettsäuren in Prozent der Gesamtfettsäuren. Sie entsprechen den in Abbildung 3.9 dargestellten Chromatogrammen.

Fettsäure	pYES2	pYES2-egDES4 + $22:5^{\Delta 7,10,13,16,19}$
16:0	14	15
$16:1^{\Delta 9}$	43	40
18:0	6	7
$18:1^{\Delta 9}$	27	27
$18:1^{\Delta 11}$	1	1
$22:5^{\Delta 7,10,13,16,19}$	9	7
$22:6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ (DHA)	-	3

Die Umsetzung der inkorporierten Docosapentaensäure betrug in drei unabhängigen Expressionen durchschnittlich 30 %. Da bisher keine Angaben zur Aktivität der Δ4-Desaturase aus *Thraustochytrium* sp. (Qiu *et al*., 2001) in Hefe-Expressionsexperimenten vorliegen, können die beiden Desaturasen hier nicht verglichen werden. Eine Desaturierung der Hefe-eigenen, gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren konnte nicht detektiert werden. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass der ORF egDES4 für eine Desaturase mit Δ4-Regiospezifität kodiert, die an der Synthese von DHA beteiligt ist. Zudem wurde demonstriert, dass die Desaturase mit der Elektronentransportkette der Hefe interagieren kann. Im Gegensatz zu den egDES4-exprimierenden Kulturen wiesen die egDES4-1-exprimierenden Kulturen keine Δ4-Desaturaseaktivität auf (Daten nicht gezeigt). Dies ist unerwartet, da die Startcodons der ORF egDES4-1 und egDES4 nur wenige Basen auseinenander liegen (vgl. Abbildung 3.6). Jedoch ist eine Sequenzierung der ersten Basen des klonierten ORF egDES4-1 nicht gelungen, so dass dieser Fehler in der Sequenz aufweisen kann.

3.4 Expression von ccDES1 aus *Cricosphaera carterae*

Die drei putativen ORF ccDES1, ccDES2 und ccDES3 (Abbildung 3.8) wurden jeweils in den Vektor pYES2 kloniert, so dass die Konstrukte pYES2-ccDES1, pYES2-ccDES2 und pYES2-ccDES3 entstanden (2.19.1). Da die Aminosäuresequenzanalyse gezeigt hat, dass der Klon vermutlich für eine Δ6-Desaturase oder eine Δ8-Sphingolipid-Desaturase kodiert, wurde Linolsäure ($18:2^{\Delta 9,12}$) als Substrat für den Funktionsnachweis ausgewählt, da sie ein potentielles Substrat für eine Δ6-Desaturaseaktivität darstellt. Die Fettsäuren der transgenen Hefen wurden über GC analysiert. Gegenüber der Kontrollkultur mit dem Leervektor pYES2 konnten in keiner der transgenen Hefen neu entstandene Fettsäuren detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Da es sich bei ccDES mit der gleichen

Wahrscheinlichkeit um einen Klon für eine Δ8-Sphingolipid-Desaturase handeln konnte, wurden zusätzlich die Sphingolipide der transgenen Hefen untersucht. In diesem Fall konnte auf eine Substratzugabe verzichtet werden, da *S. cerevisiae* keine Sphingolipid-Desaturasen besitzt, ihre endogenen Sphingolipide jedoch Substrate für heterolog exprimierte Sphingolipid-Desaturasen darstellen (Sperling *et al*., 1998; Ternes *et al*., 2002). Die Analyse der aus den transgenen Hefen isolierten Sphingobasen erfolgte über RP-HPLC der Dinitrophenyl (DNP)-Derivate. Auch hier konnten beim Vergleich mit den Leervektor-Kontrollkulturen keine neuen Sphingobasen detektiert werden, die auf die Einführung einer Δ8-Doppelbindung zurückzuführen sind (Daten nicht gezeigt).

Die fehlende Aktivität des Klons ccDES kann unterschiedlich interpretiert werden. Obwohl sich nicht mit Gewissheit sagen lässt, ob es tatsächlich sich um einen Volllängenklon handelt, spricht die Länge des Klons dafür. Die Aktivität der Desaturase ist von der Hefe-eigenen Elektronentransportkette abhängig. Dies betrifft die Übertragung der Elektronen von NADH auf das fusionierte Cytochrom b5 der Desaturase durch die NADH-Cytochrom-b5-Reduktase. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die durch ccDES kodierte Desaturase nicht mit der Reduktase der Hefen interagierten kann. Es muss zudem beachtet werden, dass die Isolierung des Klons ccDES1 zu Fehlern in der Basensequenz geführt haben kann, da eine PCR verwendet wurde. Die Sequenz der eigentlichen cDNA ist unbekannt.

3.5 Expression eines putativen Δ12-Desaturasegens aus *Thraustochytrium* sp.

Aus *Thraustochytriums* sp. wurde durch EST-Sequenzierung ein cDNA-Klon (TC049) isoliert, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz die größte Ähnlichkeit zu der mikrosomalen Δ12-Desaturase aus *P. tricornutum* (Domergue *et al*., eingereicht) aufweist (Sequenz im Anhang). Die erste Histidin-Box besitzt das konservierte HECGH-Motiv aller mikrosomalen und plastidären Δ12-Desaturasen. Die Sequenzanalyse ergab, dass es sich vermutlich um einen Volllängenklon handelte. Der ORF wurde für eine Expression in *S. cerevisiae* SC334 in den Vektor pYES2 kloniert. Das Konstrukt erhielt die Bezeichnung pYES249 und wurde für die Transformation der Hefe verwendet. Die Expression erfolgte zunächst in Abwesenheit exogener Substrate, da die Oleoyl-Reste der endogenen Phospholipide ein potentielles Substrat für Δ12-Desaturasen darstellen. Die transgenen Hefen zeigten keine Veränderung im Fettsäureprofil gegenüber den pYES2-Kontrollkulturen. In weiteren Expressionsversuchen wurden Linolsäure, Eisosatriensäure ($20{:}3^{\Delta 8,11,14}$) und Docosatetraensäure ($22{:}4^{\Delta 7,10,13,16}$) zu den Kulturen gegeben. Auch hier zeigte sich keine Desaturaseaktivität. Wie bereits in Kapitel 3.3.2 erwähnt, ist die Aktivität der heterolog in Hefe exprimierten Desaturasen von einer Interaktion mit der Elektronentransportkette abhängig. Da die Δ12-Desaturasen kein fusioniertes Cytochrom b5 besitzen, müssen sie die Elektronen durch das Cytochrom b5 der Hefe erhalten.

Möglicherweise kommt es im Fall der putativen Δ12-Desaturase aus *Thraustochytrium* sp. nicht zu dieser Interaktion.

3.6 Substratspezifität von egDes4

3.6.1 Spezifität gegenüber dem Acylrest

Die *in vivo*-Markierungversuche hatten gezeigt, dass *E. gracilis* sowohl Docosapentaensäure als auch die ω6-Fettsäure Docosatetratensäure (22:4$^{\Delta7,10,13,16}$) an der Δ4-Position desaturiert (3.1.1. und 3.1.2). Durch Hefe-Expressionsversuche mit pYES2-egDES4 und der pYES2-Leervektorkontrolle sollte diese Beobachtung für die Δ4-Desaturase bestätigt werden. Dazu wurden die Hefen in Gegenwart von 22:4ω6 inkubiert. Die aufgenommene 22:4ω6 repräsentierte ca. 10 % der Fettsäuren in dem Leervektor-exprimierenden Stamm (Tabelle 3.4).

Tab. 3.4: Fettsäurezusammensetzung der mit dem Leervektor pYES2 bzw. dem Konstrukt pYES2-egDES4 transformierten Hefenzellen. Die Hefen wurden 4 Tage bei 15 °C mit 300 µM 22:4$^{\Delta7,10,13,16}$ inkubiert. Angegeben sind die Anteile der Fettsäuren in Prozent der Gesamtfettsäuren. Die Positionen der Doppelbindungen in 22:5$^{\Delta4,7,10,13,16}$ wurden durch GC-MS-Analyse des DMOX-Derivates bestätigt.

Fettsäure	**pYES2**	**pYES2-egDES4**
	+ 22:4$^{\Delta7,10,13,16}$	
16:0	13	14
16:1$^{\Delta9}$	41	44
18:0	6	6
18:1$^{\Delta9}$	29	28
18:1$^{\Delta11}$	1	2
22:4$^{\Delta7,10,13,16}$	10	5
22:5$^{\Delta4,7,10,13,16}$	-	2

Durchschnittlich 29 % der inkorporierten Docosatetraensäure wurde im egDES4-exprimierenden Stamm zu einer neuen Fettsäure umgesetzt, deren Retentionszeit mit der von 22:5$^{\Delta4,7,10,13,16}$ übereinstimmte. 22:5$^{\Delta4,7,10,13,16}$ ist nicht kommerziell erhältlich, jedoch stellt sie einen Hauptbestandteil der Lipide von *Thraustochytrium* sp. dar, dessen Fettsäuren als Standards für die Gaschromatographie verwendet wurden. Zudem wurden die Kettenlänge und die Positionen der Doppelbindungen der aus den transgenen Hefen gewonnenen 22:5$^{\Delta4,7,10,13,16}$ durch GC-MS-Analyse des DMOX-Derivates bestätigt. Zusammen mit dem Ergebnis des egDES4-Funktionsnachweises, bei dem 22:5ω3 desaturiert

wurde, bestätigt die hier beschriebene Desaturierung von 22:4ω6, dass die Δ4-Desaturase sowohl ω6- als auch ω3-Fettsäuren desaturiert. Diese Unspezifität gegenüber dem Desaturierungszustand des Methylendes wurde für alle untersuchten "Front End"-Desaturasen beschrieben. So ist auch die Δ8-Desaturase aus *E. gracilis* in dieser Hinsicht relativ unspezifisch und desaturierte 73 % und 70 % der inkorporierten 20:3ω3 bzw. 20:2ω6 (Wallis & Browse, 1999).

Neben den beiden bisher beschriebenen Fettsäuren $22:4^{\Delta7,10,13,16}$ und $22:5^{\Delta7,10,13,16,19}$ wurden weitere potentielle Substrate der Δ4-Desaturase getestet, die sich in der Länge der Kohlenstoffkette sowie in Anzahl und Positionen der Doppelbindungen unterschieden. Dazu wurden Hefe-Expressionen mit pYES2-egDES4 und der pYES2-Leervektorkontrolle durchgeführt, wobei die zu testenden Substrate jeweils einzeln eingesetzt wurden. Wie sich im Vergleich mit den pYES2-Kontrollkulturen zeigte, akzeptiert egDes4 nicht die Hefe-eigenen Fettsäuren 16:0, $16:1^{\Delta9}$, 18:0, $18:1^{\Delta9}$, $18:1^{\Delta11}$ oder die gefütterten Fettsäuren $18:2^{\Delta6,9}$, $18:2^{\Delta9,12}$ und $20:3^{\Delta8,11,14}$. Jedoch wurden Substrate, die bereits eine Δ7-Doppelbindung aufwiesen, desaturiert. So wurden neben den zuvor getesteten C_{22}-Substraten auch die Fettsäuren Hexadecensäure ($16:1^{\Delta7}$) und Hexadecatriensäure ($16:3^{\Delta7,10,13}$) in die entsprechenden Δ4-desaturierten Edukte umgewandelt (Abbildung 3.12 und Tabelle 3.5).

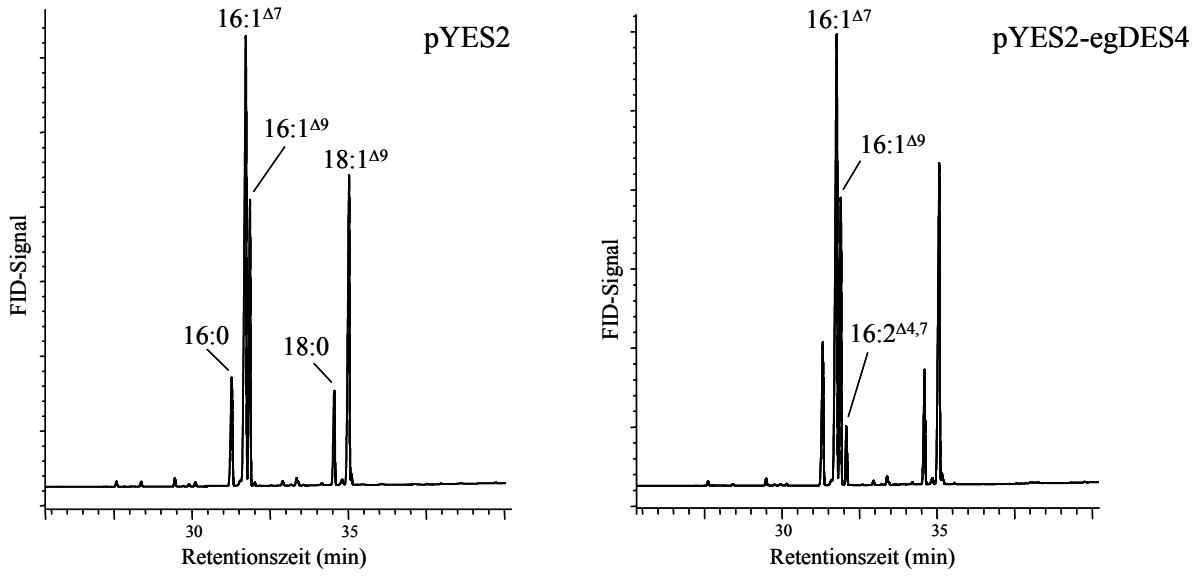


Abb. 3.12: Δ4-Desaturierung von $16:1^{\Delta7}$ in egDES4-exprimierenden Hefen. Fettsäureprofile der mit dem Leervektor pYES2 bzw. dem Konstrukt pYES2-egDES4 transformierten Hefen**.** Die Hefekulturen wurden 4 Tage bei 15 °C mit 100 µM $16:1^{\Delta7}$ inkubiert. Die Identität von $16:2^{\Delta4,7}$ wurde durch GC-MS-Analyse des DMOX-Derivates bestätigt.

Tab. 3.5: Fettsäurezusammensetzungen der mit dem Leervektor pYES2 bzw. dem Konstrukt pYES2-egDES4 transformierten Hefen. Angegeben sind die Anteile in Prozent der wichtigsten Fettsäuren an den Gesamtfettsäuren. Im Fall der Expression in Gegenwart von $16:1^{\Delta7}$ entsprechen sie den in Abbildung 3.12 dargestellten Chromatogrammen. Die egDes4-Substrate und ihre Desaturierungsedukte wurden fett markiert. MGD: Monogalaktosyldiacylglycerin

Fettsäure	pYES2	pYES2-egDES4	pYES2	pYES2-egDES4
	+ $16:1^{\Delta7}$		+ Fettsäuren des MGD	
16:0	9	10	11	3
$16:1^{\Delta7}$	39	**37**	-	-
$16:1^{\Delta9}$	19	18	6	9
$16:2^{\Delta4,7}$	-	**3**	-	-
$16:3^{\Delta7,10,13}$	-	-	12	**7**
$16:4^{\Delta4,7,10,13}$	-	-	-	**2**
18:0	7	7	10	9
$18:1^{\Delta9}$	24	23	7	10
$18:2^{\Delta9,12}$	-	-	2	2
$18:3^{\Delta9,12,15}$	-	-	52	48

$16:3^{\Delta7,10,13}$ wurde im Expressionsexperiment als ein Bestandteil der aus Monogalaktosyldiacylglycerin (MGD) isolierten Fettsäuren gefüttert, die daneben einen großen Anteil an $18:3^{\Delta9,12,15}$ aufwiesen. Die inkorporierte $18:3^{\Delta9,12,15}$ repäsentierte ca. 48 % der Gesamtfettsäuren und verursachte eine Reduktion des Anteils der Hefe-eigenen ungesättigten Fettsäuren. Dies kann durch eine Regulierung der endogenen Δ9-Desaturase Ole1p erfolgen. Eine Regulierung der Expression des OLE1-Gens erfolgt auf der Ebene der Transkription (Choi *et al*., 1996) bzw. durch Destabilisierung des Transkriptes (Gonzalez & Martin, 1996). Ausschlaggebend für die Regulierung ist der Desaturierungsgrad des Acyl-CoA-Pools sowie der Fettsäuren in den Membranlipiden.

$16:3^{\Delta7,10,13}$ repräsentierte ca. 10 % der Gesamtfettsäuren, während $16:1^{\Delta7}$ mit ca. 40 % in den Gesamtfettsäuren präsent war (Tabelle 3.5). Aus Abbildung 3.13 wird ersichtlich, dass die dreifach ungesättigte C_{16}-Fettsäure dreimal besser desaturiert wurde als $16:1^{\Delta7}$ (21 % im Vergleich zu 7 %). Hier kann der Eindruck gewonnen werden, dass der Desaturierungsgrad des Substrates im Wesentlichen die Aktivität der Δ4-Desaturase bestimmt. Die mit $16:1^{\Delta7}$ inkubierten Hefen waren jedoch in ihrem Wachstum gehemmt. Dies zeigte sich darin, dass sie zum Ende der Inkubation nur ein Drittel der Zelldichte erreicht hatten, die eine entsprechende Kulutr bei Inkubation mit $22:4^{\Delta7,10,13,16}$ erreicht hatte. Daher ist es wahrscheinlich, dass die geringere Aktivität von egDes4 gegenüber $16:1^{\Delta7}$ ein Ausdruck des veränderten physiologischen Zustandes der Zellen ist. Es bleibt zu untersuchen, inwiefern sich der hohe Anteil von $16:1^{\Delta7}$ als toxisch für die Hefen erweist. Ein Vergleich des Verhältnisses von gesättigten zu einfach ungesättigten Fettsäuren in den mit $16:1^{\Delta7}$ oder $22:4^{\Delta7,10,13,16}$

inkubierten Hefen zeigt keinen signifikanten Unterschied (0,2 bei $16:1^{\Delta 7}$ und 0,3 bei $22:4^{\Delta 7,10,13,16}$), so dass der Desaturierungsgrad der Membranlipide vermutlich nicht die Ursache darstellt.

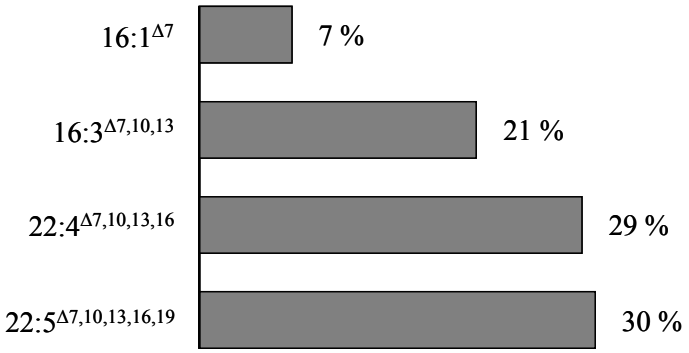


Abb. 3.13: Substratspezifität von egDes4. Transgene Hefen mit pYES2-egDES4 wurden jeweils mit dem exogen zugegebenen Substrat inkubiert. Angegeben ist der Umsatz in Prozent als $\%_{Produkt}$ x 100 / ($\%_{Produkt}$ + $\%_{Substrat}$).

Aus den Ergebnissen der Expressionsversuche läßt sich schließen, dass es sich bei egDes4 um eine Desaturase mit strikter Δ4-Regiospezifität handelt, die die Doppelbindung in Abhängigkeit von einer vorhandenen Δ7-Doppelbindung einfügt. Zudem demonstrierte das Enzym keine Spezifität gegenüber der Fettsäurekettenlänge und desaturiert sowohl C_{22}-Substrate als auch C_{16}-Fettsäuren. Es ist anzunehmen, dass auch entsprechende Δ7-Polyenfettsäuren mit 18 und 20 Kohlenstoffatomen akzeptiert werden.

Eine mit egDes4 vergleichbar breite Substratspezifität mit einer Akzeptanz von einem Fettsäurekettenlängenunterschied von sechs Kohlenstoffatomen wurde bisher nur für Δ6-Desaturasen aus Mensch und Ratte beschrieben (de Antueno *et al*., 2001; D'Andrea *et al*., 2002). Diese Desaturasen desaturieren sowohl C_{18}-Fettsäuren als auch C_{24}-Fettsäuren und sind daher wahrscheinlich an der Synthese von DHA über den Sprecher-Weg beteiligt. Für die Δ6-Desaturase aus Ratte wurde zudem gezeigt, dass sie neben den C_{18}- und C_{24}-Fettsäuren auch Palmitinsäure (16:0) desaturiert (Guillou *et al*., 2003). *E. gracilis* weist neben DHA und $22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$ viele ungewöhnliche Fettsäuren wie $15:2^{\Delta 4,7}$, $15:4^{\Delta 4,7,10,13}$, $16:4^{\Delta 4,7,10,13}$ und $21:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$ auf (Korn, 1964). Sollte egDes4 für die Δ4-Doppelbindung in all diesen Fettsäuren verantwortlich sein, stellt sich die Frage, wo die Grenzen der Kettenlängenakzeptanz liegen. Da $13:1^{\Delta 7}$ und $14:1^{\Delta 7}$ ebenfalls Bestandteil der Fettsäuren in *E. gracilis* sind, $13:2^{\Delta 4,7}$ und $14:2^{\Delta 4,7}$ jedoch nicht detektiert werden konnten, könnte die untere Grenze bei 15 Kohlenstoffatomen liegen. Möglich ist auch, dass diese Einschränkung auf eine Spezifität der Acyl-Transferasen zurückzuführen ist, und $13:1^{\Delta 7}$ und $14:1^{\Delta 7}$ nicht in die *sn*-2-Position der Phospholipide, den vermuteten Substraten der "Front End"-Desaturasen (Griffiths *et al*., 1988; Galle-Le Bastard *et al*., 2000; siehe auch 3.6.2), gelangen. Es bleibt zu untersuchen, ob die Δ4-Desaturase aus *Thraustochytrium* sp. (Qiu *et al.*, 2001) eine der *E. gracilis*-Desaturase ähnlich breite Substratspezifität

aufweist.

Nimmt man an, dass sich "Front End"-Desaturasen den Acylresten ihrer Lipidsubstrate aus der Richtung des Glyerin-Rückgrades nähern, scheint die für egDes4 und für die Δ6-Desaturasen der Säugetiere beobachtete fehlende Spezifität für die Länge der Kohlenstoffkette nicht ungewöhnlich. Möglicherweise liegt das Methylende des Acylrestes in der Membran verborgen und kommt mit der Desaturase nicht direkt in Berührung. In diesem Fall müssten die in Abbildung 1.7 gezeigten Modelle für Desaturasen mit Spezifität für das Carboxylende verändert werden, so dass sie das Methylende des Acylrestes nicht umschließen. Ein solches Modell unterscheidet sich von den Beobachtungen, die für lösliche Acyl-ACP-Desaturasen gemacht wurden (Cahoon *et al*., 1997). Diese weisen im kristallographischen Modell eine tiefe Substratbindetasche auf, deren Struktur die Substratlänge und die Position der neuen Doppelbindung bestimmt. So wurde durch ortsspezifische Mutagenese gezeigt, dass die Verkürzung der Tasche in der 18:0-ACP-Desaturase durch Aminosäuren, die mehr Raum einnehmen, dazu führt, dass die Desaturase eine Spezifität für 16:0-ACP erlangt. Leider stehen Kristallstrukturen für membrangebundene Desaturasen noch aus.

3.6.2 Spezifität gegenüber der *sn*-Position von Phospholipiden

Durch die Untersuchungen mit Mikrosomenpräparationen aus *B. officinalis* und aus dem filamentösen Pilz *Mucor circinelloides* wurde demonstriert, dass die Δ6-Desaturasen aus Pflanzen und Pilzen eine Spezifität für die *sn*-2-Position von Phospholipiden aufweisen (Griffiths *et al.*, 1988; Galle-Le Bastard *et al.*, 2000; Kendrick & Ratledge, 1992a). Für die Δ6-Desaturasen aus Tieren hingegen wird angenommen, dass sie im Wesentlichen Acyl-CoA-Ester als Substrate akzeptieren (Okayasu *et al*., 1981). Da es diesbezüglich keine Untersuchungen mit Desaturasen anderen Ursprungs und mit anderer Regiospezifität gibt, wurde in dieser Arbeit das Vorkommen und die prozentuale Verteilung der Desaturierungsedukte von egDes4 in den *sn*-Positionen ausgewählter Phospholipide transgener Hefen untersucht. Als dominante und repräsentative Lipide wurden Phosphatidylcholin (PtdCho) und Phosphatidylethanolamin (PtdEtn) gewählt, die ca. 40 % (PtdCho) und 20 % (PtdEtn) der Phospholipide in Hefe ausmachen (Daum *et al*., 1999).

Die transgenen Hefekulturen wurden wie in 2.21.2 beschrieben kultiviert und mit $22{:}4^{\Delta 7,10,13,16}$ gefüttert. Anschließend wurden die Gesamtlipide extrahiert und die Phospholipide PtdCho und PtdEtn durch Dünnschichtchromatographie gereinigt. Es folgte eine spezifische Hydrolyse der *sn*-1-gebundenen Fettsäuren durch Inkubation mit Lipase aus *Rhizopus arrhizus delemar* (Fischer *et al*., 1973). Die freien Fettsäuren und das resultierende lyso-PtdCho und lyso-PtdEtn wurden durch Dünnschichtchromatographie getrennt. Durch saure Methanolyse wurden die Fettsäuren in der *sn*-2-Position der lyso-Phospholipide als FAME gewonnen. Diese wurden neben den ebenfalls zu FAME derivatisierten Fettsäuren der *sn*-1-Position gaschromatographisch analysiert (Abbildung 3.14).

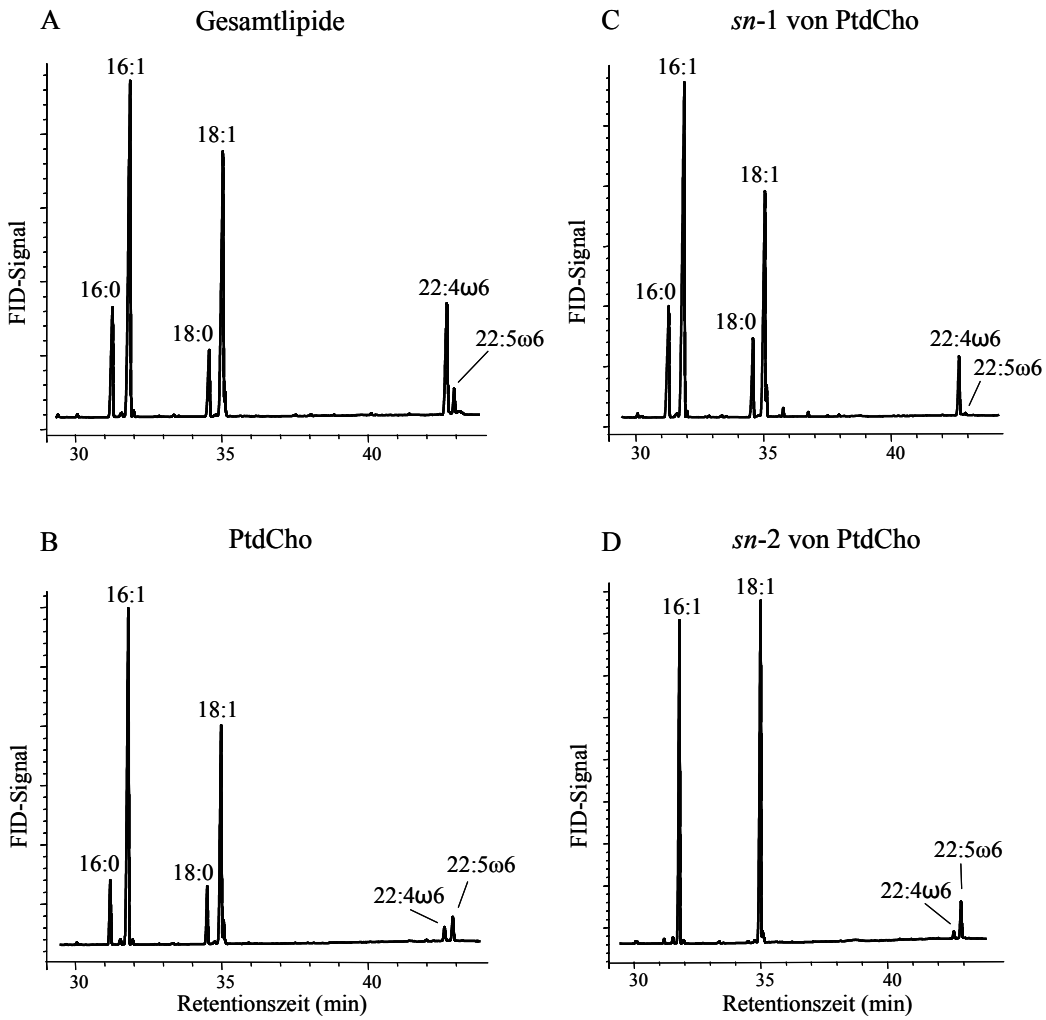


Abb. 3.14: Positionsanalyse von Phosphatidylcholin (PtdCho) aus transgenen Hefen, die mit 22:4$^{\Delta7,10,13,16}$ inkubiert wurden. Gezeigt werden die Gaschromatogramme der Fettsäuren der Gesamtlipide (A), des PtdCho (B) und der *sn*-1- (C) und *sn*-2-Position (D) des PtdCho. Transgene, egDES4-exprimierende Hefen wurden 5 Tage bei 15 °C mit 300 µM 22:4$^{\Delta7,10,13,16}$ inkubiert. Für die Analyse der Gesamtlipide wurde ein Aliquot der Kultur in der sauren Methanolyse eingesetzt (siehe 2.22.4). Aus dem Gesamtlipidextrakt der restlichen Kultur wurde PtdCho isoliert und wie im Text beschrieben analysiert.

Ein Vergleich der Fettsäureprofile von Gesamtlipiden und PtdCho zeigt, dass die 22:4$^{\Delta7,10,13,16}$ des PtdCho nur einen Teil der insgesamt inkorporierten Fettsäure darstellt. Eine Analyse transgener Hefen mit dem Leervektor pYES2 hat gezeigt, dass 22:4$^{\Delta7,10,13,16}$ ca. 11 % der Fettsäuren der Triacylglycerine repräsentierte, wohingegen diese Fettsäure nur ca. 2 % in den polaren Lipiden darstellte (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise wird die aufgenommene Fettsäure nach ihrer Aktivierung zum Acyl-CoA von der Diacylglycerin-Acyltransferase sofort zur Synthese von Triacylglycerinen verwendet, ohne zunächst zur weiteren Modifizierung in PtdCho inkorporiert zu werden.

In der in Abbildung 3.14 präsentierten Kultur betrug der Anteil der zurückgewonnenen C_{22}-Fettsäuren (die Summe aus $22{:}4^{\Delta 7,10,13,16}$ und $22{:}5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) 5,5 % der Fettsäuren des PtdCho und lag damit noch über den zuvor beobachteten 2 %. Die Umsetzung der inkorporierten Fettsäuren zu den Δ4-desaturierten Edukten betrug unter den gewählten Bedingungen 16,5 % für $22{:}4^{\Delta 7,10,13,16}$. Diese im Vergleich zu den in 3.6.1 erhaltenen geringeren Umsätze können in einer geringeren Belüftung durch das erhöhte Kulturvolumen begründet sein (2.21.1 und 2.21.2). Trotz der schlechten Inkorporation von $22{:}4^{\Delta 7,10,13,16}$ in das PtdCho der Hefe wird aus Abbildung 3.14 ersichtlich, dass das Δ4-desaturierte Edukt einen größeren Anteil an dessen Fettsäuren ausmacht als das Substrat und besonders in der *sn*-2-Position des PtdCho angereichert ist. In Abbildung 3.15 werden die Ergebnisse der Chromatogramme aus Abbildung 3.14 dargestellt.

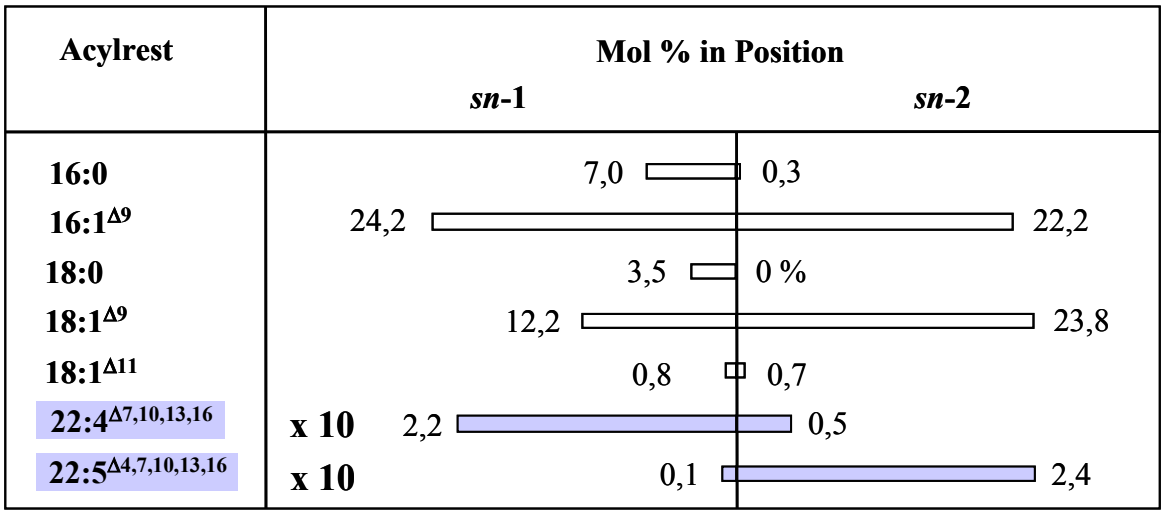


Abb. 3.15: Diagramm der Positionsverteilung der Fettsäuren im PtdCho der transgenen Hefen. Angegeben sind die Mol % der Fettsäuren in den *sn*-Positionen des PtdCho. Die Werte entstammen dem in Abbildung 3.14 repräsentierten Versuch. Die inkorporierte Fettsäure und das Desaturierungsprodukt sind grau unterlegt. Bei den C_{22}-Fettsäuren wurden die Balken in beiden *sn*-Positionen (aber nicht die Prozentangaben) um den Faktor 10 verlängert.

Die C_{22}-Fettsäuren liegen relativ gleichmäßig verteilt in den beiden *sn*-Positionen vor, mit 2,3 % in der *sn*-1-Position und 2,9 % in der *sn*-2-Position. Jedoch zeigt sich, wie bereits erwähnt, ein signifikanter Unterschied in der positionalen Verteilung der Δ4-desaturierten Fettsäure, die gegenüber der *sn*-1-Position (0,1 %) etwa zwanzigfach in der *sn*-2-Position (2,4 %) angereichert ist. Während der größte Teil des in der *sn*-2-Position gebundenen Substrates desaturiert wurde, blieb das Substrat in der *sn*-1-Position fast unangetastet. Dies deutet darauf hin, dass egDes4 spezifisch die Acylreste in der *sn*-2-Position des PtdCho desaturiert.

Eine interessante, aber nicht unerwartete Beobachtung ist die fast vollständige Abwesenheit von gesättigten Fettsäuren in der *sn*-2-Position des PtdCho. Ein Austausch des Acylrestes an dieser Position des PtdCho erfolgt in Pflanzen durch die Aktivität der Lysophosphatidylcholin-

Acyltransferase (LPC-AT). Stymne & Stobart (1984) konnten zeigen, dass die pflanzliche LPC-AT eine hohe Spezifität für ungesättigte Fettsäuren aufweist, insbesondere für Ölsäure. Auch in *S. cerevisiae* konnte eine LPC-AT-Aktivität mit Spezifität für Ölsäure nachgewiesen werden (Richard & MacMaster, 1998). Eine solche Spezifität würde auch die hier beobachtete Bevorzugung der einfach ungesättigten Fettsäuren an der *sn*-2-Position erklären. Ein weiteres Enzym, das die Positionsverteilung der Acylreste beeinflusen kann, ist die Lysophosphatidsäure-Acyltransferase, die durch das Gen *SLC1* kodiert wird (Nagiec *et al*., 1993).

Eine Positionsanalyse des PtdCho transgener Hefen, die mit der Fettsäure $16:1^{\Delta 7}$ inkubiert wurden, sollte zeigen, ob sich die oben beschriebenen Ergebnisse für die *sn*-2-spezifische Desaturierung von $22:4^{\Delta 7,10,13,16}$ auch auf eine langkettige Monoenfettsäure übertragen lassen. Abbildung 3.16 zeigt die Fettsäure-Chromatogramme, die mit den transgenen Hefen erhalten wurden.

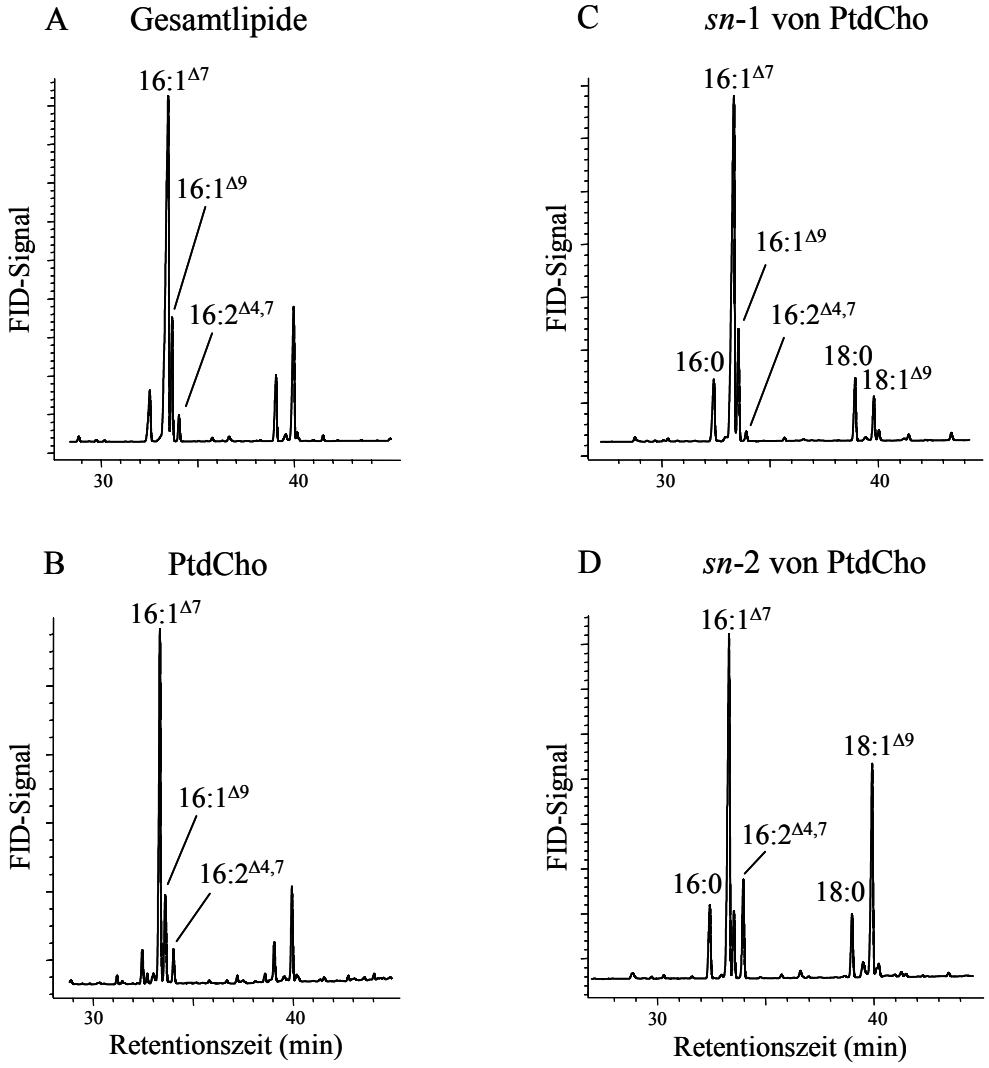


Abb. 3.16: Positionsanalyse von Phosphatidylcholin (PtdCho) aus transgenen Hefen, die mit $16:1^{\Delta 7}$ inkubiert wurden. Erklärung wie in Abb. 3.14.

$16:1^{\Delta 7}$ wurde sehr gut in das Phospholipid eingebaut, so dass die zurückgewonnenen C_{16}-Fettsäuren (die Summe aus $16:1^{\Delta 7}$ und $16:2^{\Delta 4,7}$) 60 % der Fettsäuren des PtdCho repräsentierten. Allerdings konnte auch in diesen Expressionsexperimenten die schon in 3.6.1 beschriebene Beobachtung gemacht werden, dass die mit dieser Fettsäure inkubierten Hefen nicht gut wuchsen. 4,1 % der $16:1^{\Delta 7}$ wurden zu $16:2^{\Delta 4,7}$ desaturiert. Obwohl sich die Verhältnisse von Substrat und Edukt in den Gesamtlipiden und PtdCho nicht so deutlich voneinander unterschieden, wie sie es bei den C_{22}-Fettsäuren getan haben, zeigen die Chromatogramme auch hier eine signifikante Anhäufung der Δ4-desaturierten Fettsäure in der *sn*-2-Position des PtdCho. Einen genaueren Überblick über die Fettsäureverteilung gibt das Diagramm in Abbildung 3.17.

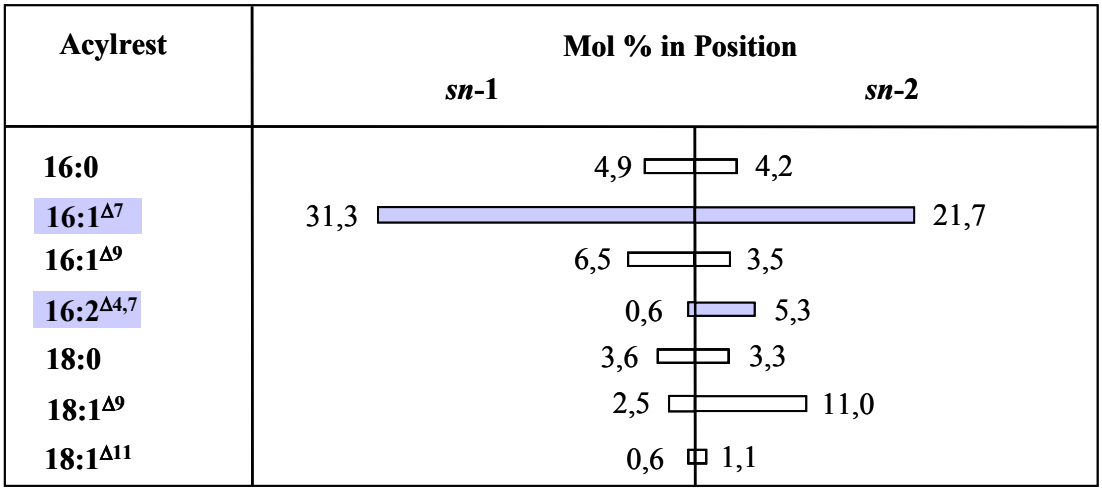


Abb. 3.17: Diagramm der Positionsverteilung der Fettsäuren im PtdCho der transgenen Hefen. Angegeben sind die Mol % der Fettsäuren in den *sn*-Positionen des PtdCho. Die Werte entstammen dem in Abbildung 3.16 repräsentierten Versuch. Die inkorporierte Fettsäure und das Desaturierungsprodukt sind grau unterlegt.

Wie bereits für $22:4^{\Delta 7,10,13,16}$ beobachtet, wurde auch $16:1^{\Delta 7}$ annähernd gleichmäßig in beide *sn*-Positionen des PtdCho inkorporiert, mit 32 % in *sn*-1 und 27 % in *sn*-2. Das Δ4-desaturierte Edukt befindet sich jedoch fast ausschließlich in der *sn*-2-Positionen des PtdCho, mit 5,3 % im Vergleich zu 0,6 % in der *sn*-1-Position. Dies deutet an, dass die *sn*-2-Spezifität von egDes4 unabhängig von Desaturierungsgrad und Kettenlänge der Acylgruppe des PtdCho ist.

Eine interessante Beobachtung ist die Anwesenheit signifikanter Mengen gesättigter Fettsäuren in der *sn*-2-Position des PtdCho. Tatsächlich waren 16:0 und 18:0 gleichmäßig in beide *sn*-Positionen verteilt. Die Inkorporation der Fettsäure $16:1^{\Delta 7}$ beeinflußt demnach die Spezifität von Acyltransferasen der Hefen. Somit könnte eine Störung in der Membranstruktur durch eine Anreicherung von PtdCho-Species mit gesättigten Fettsäuren in beiden *sn*-Positionen einen Grund für den abweichenden physiologischen Zustand dieser Zellen repräsentieren.

Als ein weiteres potentielles Substrat für die Desaturierung durch egDes4 wurde das PtdEtn untersucht. In Abbildung 3.18 wird die Verteilung der Fettsäuren in den beiden *sn*-Positionen des Lipids wiedergegeben. Zur Veranschaulichung werden die Ergebnisse aus Abbildung 3.18 in Abbildung 3.19 und 3.20 zusammengefaßt.

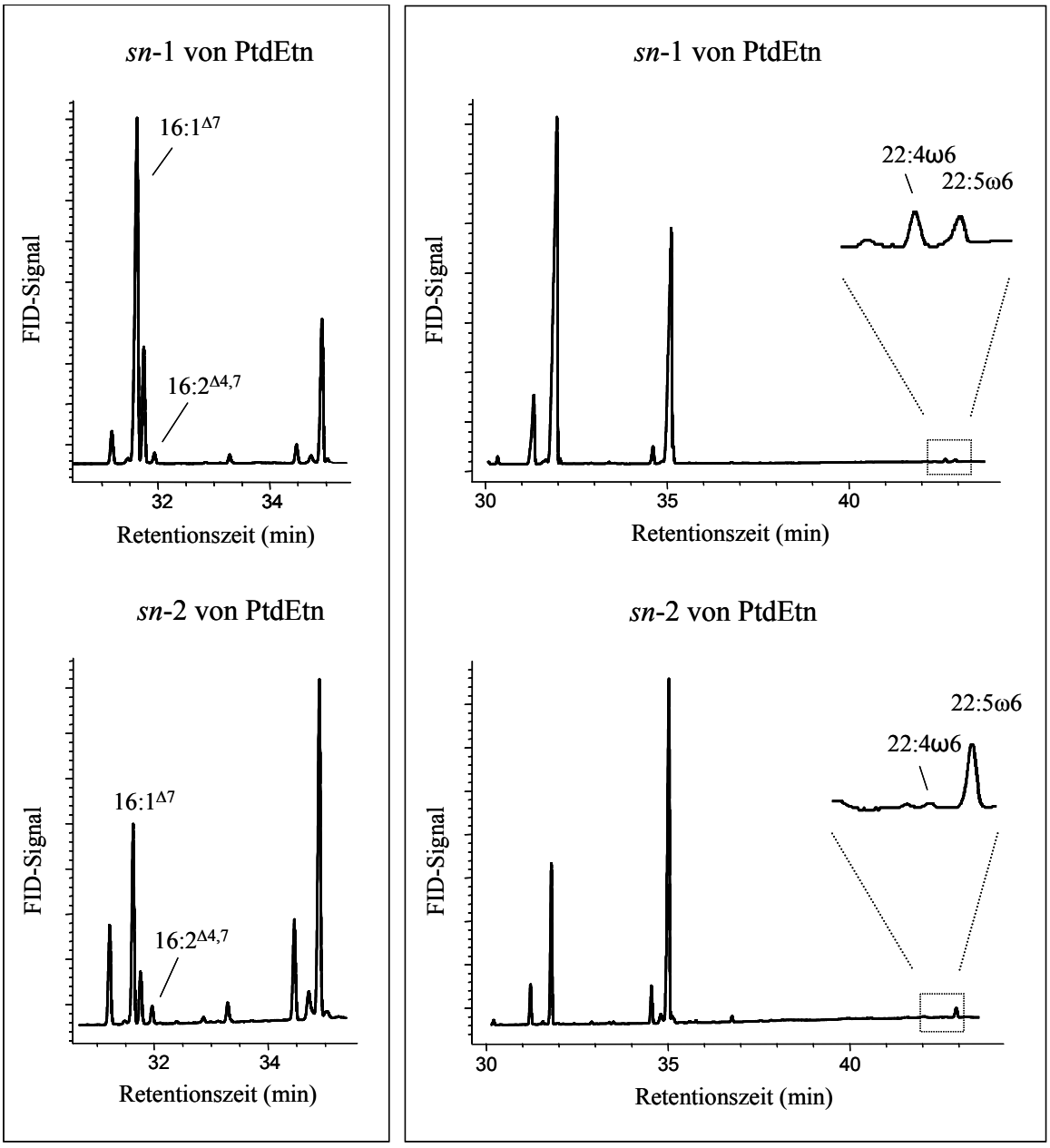


Abb. 3.18: Positionsanalyse von Phosphatidylethanolamin (PtdEtn) aus egDES4-exprimierenden Hefen, die mit 16:1$^{\Delta 7}$ (links) oder 22:4$^{\Delta 7,10,13,16}$ (rechts) inkubiert wurden. Erklärungen wie in Abb. 3.14. Zur Verdeutlichung wurde ein Ausschnitt aus den rechten Chromatogrammen vergrößert.

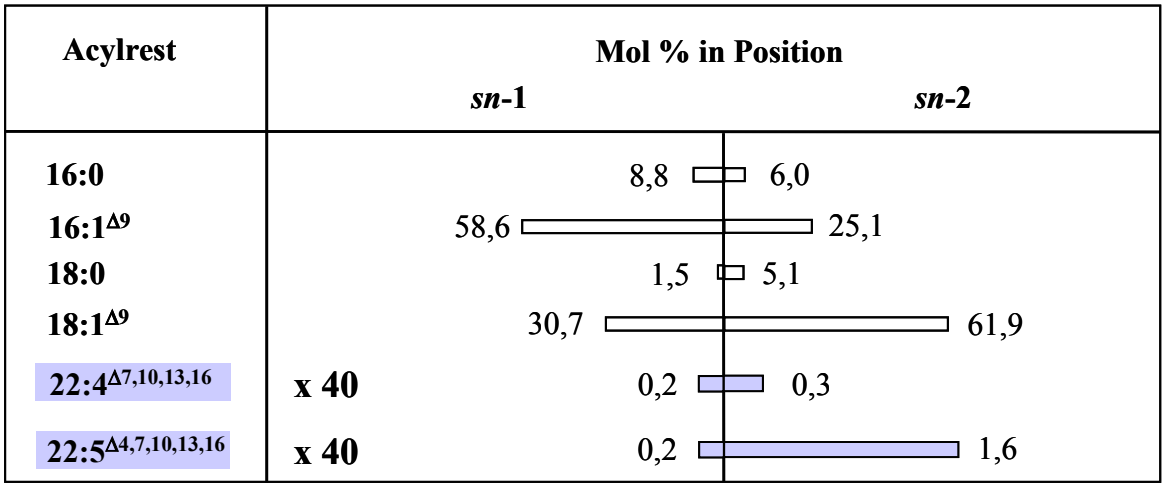


Abb. 3.19: Diagramm der Positionsverteilung der Fettsäuren im PtdEtn der transgenen Hefen. Angegeben sind die Mol % der Fettsäuren in den *sn*-Positionen des PtdEtn. Die Werte entstammen dem in Abbildung 3.18 (rechts) repräsentierten Versuch. Die inkorporierte Fettsäure und das Desaturierungsprodukt sind grau unterlegt. Bei bei den C_{22}-Fettsäuren wurden die Balken in beiden *sn*-Positionen (aber nicht die Prozentangaben) um den Faktor 40 verlängert.

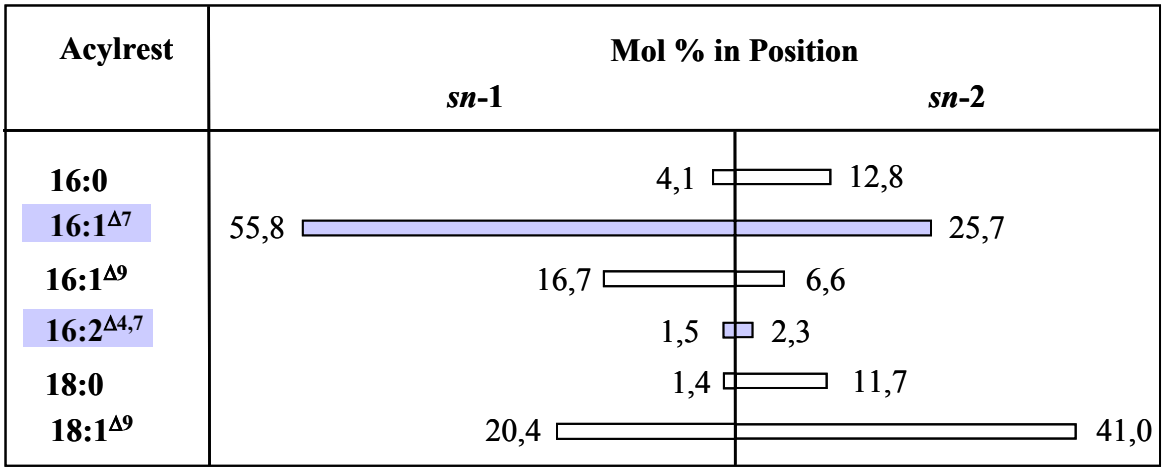


Abb. 3.20: Diagramm der Positionsverteilung der Fettsäuren im PtdEtn der transgenen Hefen. Angegeben sind die Mol % der Fettsäuren in den *sn*-Positionen des PtdEtn. Die Werte entstammen dem in Abbildung 3.18 (links) repräsentierten Versuch. Die inkorporierte Fettsäure und das Desaturierungsprodukt sind grau unterlegt.

Die Fettsäuren $16{:}1^{\Delta7}$ und $16{:}2^{\Delta4,7}$ repräsentierten insgesamt 38 % der Fettsäuren des PtdEtn, wobei der Anteil an $16{:}1^{\Delta7}$ in der *sn*-1-Position (56 %) etwa doppelt so groß war wie der in der *sn*-2-Position (26 %). $22{:}4^{\Delta7,10,13,16}$ und dessen Desaturierungsprodukt $22{:}5^{\Delta4,7,10,13,16}$ ergaben hingegen weniger als 2 % der Fettsäuren des PtdEtn. Bei den Expressionsversuchen mit $22{:}4^{\Delta7,10,13,16}$ befand sich das desaturierte Edukt im Wesentlichen in der *sn*-2-Position. Dies könnte bedeuten, dass egDes4 auch Acylreste in der *sn*-2-Position von PtdEtn desaturiert. Vergleicht man jedoch die Anteile von $16{:}2^{\Delta4,7}$ in den beiden

sn-Positionen, so zeigt sich fast keine Anreicherung in der *sn*-2-Position (2,1 %) gegenüber der *sn*-1-Position (1,5 %). Die Anreicherung von 22:5$^{\Delta 4,7,10,13,16}$ in der *sn*-2-Position des PtdEtn ist möglicherweise auf ein *remodelling* der Lipide zurückzuführen. Die Untersuchungen von Domergue *et al*. (unveröffentlichte Ergebnisse) haben jedoch gezeigt, dass die Fettsäuren der *sn*-2-Position des PtdCho nur sehr begrenzt wieder dem Acyl-CoA-Pool der Hefen zugeführt werden, so dass ein Transfer der desaturierten Edukte von PtdCho über den Acyl-CoA-Pool zu PtdEtn unwahrscheinlich ist.

3.7 Expressionen von egDES4 mit verkürzter oder ausgetauschter Cytochrom b5-Domäne

Obwohl die Δ6-Desaturasen aus den Moosen und die Δ4-Desaturase aus *E. gracilis* nicht eng miteinander verwandt sind, weisen alle N-terminale Extensionen ihrer fusionierten Cytochrom b5-Domänen auf (Girke *et al*., 1998; Sperling *et al*., 2000). Eine solche Extension fehlt in der Δ8-Desaturase aus *E. gracilis* und der Δ4-Desaturase aus *Thraustochytrium* sp. (Qiu *et al*., 2001). Durch Deletion der N-terminalen Extension sollte überprüft werden, ob diese für die Funktion von egDes4 essentiell ist. Mit PCR wurde ein verkürzter ORF amplifiziert, bei dem das in Abbildung 3.6 markierte Serin gegen ein Methionin ausgetauscht und als Start verwendet wurde. Daraus resultiert ein Polypeptid mit einer Cytochrom b5-Länge, die der der Δ4-Desaturase aus *Thraustochytrium* sp. entspricht. Der ORF wurde in den Expressionsvektor pYES2 kloniert und für die Transformation von *S. cerevisiae* 334 verwendet. Im Expressionsexperiment wurde die Hefe 4 Tage bei 15 °C mit 300 µM 22:4$^{\Delta 7,10,13,16}$ inkubiert. Das Fettsäureprofil zeigte keine Unterschiede zur Leervektor-tragenden Kontrollkultur, somit hatte die Desaturase ihre Aktivität verloren (Daten nicht gezeigt).

Da mit der Deletion der N-terminalen Extension ein Verlust der Aktivität der Δ4-Desaturase aus *E. gracilis* einhergeht, wurde die vollständige Cytochrom b5-Domäne gegen eine in *E. gracilis* aktive Cytochrom b5-Domäne ausgetauscht. Das Gen für die Δ8-Desaturase stellt neben dem hier isolierten Gen für die Δ4-Desaturase die einzige klonierte Sequenz für eine "Front End"-Desaturase aus *E. gracilis* dar. Daher wurde ihr für die Cytochrom b5-Domäne kodierender Bereich durch eine überlappende PCR an die Sequenz für die Desaturase-Domäne der Δ4-Desaturase fusioniert (Abbildung 3.21). Ein pYES2-Konstrukt mit dem Gen für die Δ8-Desaturase wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Browse (Washington State University, USA) zur Verfügung gestellt. Eine Sequenzierung des Klons ergab Abweichungen in der Sequenz von dem zugehörigen Datenbankeintrag. Da die Desaturase jedoch bei einer heterologen Expression in Hefe aktiv war (Domergue, persönliche Mitteilung), wurde der Klon für die Herstellung des chimären Konstruktes verwendet. Die Primer wurden so gewählt, dass in dem abgeleiteten Polypeptid das Glycin G132 der Δ8-Desaturase an das Phenylalanin F221 der 2. TMH der Δ4-Desaturase fusioniert ist (Abbildung

3.6). Der resultierende chimäre ORF wurde in pYES2 ligiert und in *S. cerevisiae* exprimiert. Als Substrat wurde auch hier $22{:}4^{\Delta 7,10,13,16}$ verwendet. Die GC-Chromatogramme des Expressionsstammes und der Leervektorkontrolle wiesen auch in diesem Fall keine Unterschiede auf (Daten nicht gezeigt). Offenbar sind die Cytochrom b5-Domänen der beiden "Front End"-Desaturasen aus *E. gracilis* nicht austauschbar.

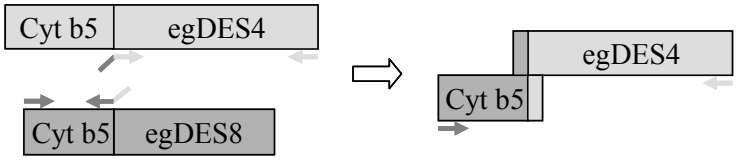


Abb. 3.21: Überlappende PCR zur Konstruktion eines chimären ORF mit Domänen der Δ8- und Δ4-Desaturase von *E. gracilis*. Die aus der ersten PCR erhaltenen Fragmente (links) wurden in einer zweiten PCR (rechts) als Matrize verwendet, so dass ein PCR-Produkt mit den fusionierten Fragmenten entstand. Die Sequenzen der verwendeten Primer befinden sich im Anhang.

Auch Libisch *et. al.* (2000) verwendeten eine *Overlap*-PCR zur Herstellung chimärer Konstrukte aus Δ6-Desaturase und Δ8-Sphingolipid-Desaturase aus *B. officinalis*. Da die beiden Desaturase-Aminosäuresequenzen 58 % identisch sind, eignen sie sich gut zur Lokalisierung der katalytischen Funktionen. Ein Austausch der Cytchrom b5-Domäne der Δ6-Desaturase gegen die entsprechende Domäne der Δ8-Sphingolipid-Desaturase führte zu einer starken Reduktion der Δ6-Desaturase-Aktivität. Der Austausch betraf nicht wie in dieser Arbeit die erste TMH, sondern beschränkte sich auf den cytoplasmatischen Bereich. Wurden die ersten beiden TMH inklusive der durch Sequenzvergleiche als Linkerdomäne zum Cytochrom b5 definierten Sequenzen der Δ6-Desaturase gegen die entsprechende Region der Δ8-Sphingolipid-Desaturase ausgetauscht, so beschränkte sich die Δ6-Desaturase-Aktivität auf Δ9-desaturierte Fettsäuren mit 16 und weniger Kohlenstoffatomen. Interessanterweise wies das chimäre Protein im Gegensatz zum Wildtyp-Protein eine höhere Aktivität gegenüber $14{:}1^{\Delta 9}$ als $16{:}1^{\Delta 9}$ auf. Dies deutet darauf hin, dass der ausgetauschte Bereich für die Substratspezifität der Desaturase eine Rolle spielt. Möglicherweise wurden bei dem Austausch der Cytochrom b5-Domäne der Δ4-Desaturase aus *E. gracilis* wichtige strukturelle Elemente der ersten TMH betroffen. Die Δ8-Desaturase weist eine wesentlich geringere Hydrophobie im Bereich der ersten TMH auf als die Δ4-Desaturase (Daten nicht gezeigt). Daher gilt es in weiterführenden Versuchen festzustellen, ob eine Einschränkung der auszutauschenden Sequenz auf den cytoplasmatischen Bereicht die Aktivität des Enzymes erhält, und inwieweit die Substratspezifität beeinflußt wird. Zudem sollte getestet werden, ob die N-terminalen Extension oder die vollständige Cytochrom-b5-Domäne der Δ4-Desaturase durch die entsprechenden Bereiche der Δ6-Desaturase *aus P. patens* oder *C. purpureus* komplementiert werden können, und inwiefern die Aktivität des Enzyms beeinflußt wird. Dies könnte einen Hinweis auf ihre Funktion geben.

4 Zusammenfassung

Für den Ansatz zur Herstellung transgener Ölsaaten, die sehr langkettige Polyenfettsäuren wie Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) in den Samen synthetisieren, wird nach geeigneten Quellen für die Synthesegene geforscht. In verschiedenen Organismen sind unterschiedliche Synthesewege für sehr langkettige Polyenfettsäuren realisiert. So beruht die Synthese beim ω3- und ω6-Weg verschiedener Algen und Pilze auf alternierenden Desaturase- und Elongaseaktivitäten. Beim Sprecher-Weg der Säugetiere sind neben Desaturasen und Elongasen auch die Enzyme der β-Oxidation beteiligt. Für marine, psychrophile Bakterien wurden dagegen Polyketidsynthase (PKS)-Systeme beschrieben, die EPA und DHA aus Malonyl- oder Acetyl-CoA in sauerstoffunabhängigen Reaktionen synthetisieren.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten Organismen ausgewählt werden, die eine Δ4-Desaturase für die Synthese von Docosahexaensäure (DHA) verwenden. Dieses Enzym katalsysiert den letzten Schritt der DHA-Synthese über den ω3-Weg. Die Klonierung des zugehörigen Gens stand zu Beginn dieser Arbeit noch aus. Zum Nachweis einer Δ4-Desaturaseaktivität wurden *in vivo*-Markierungsversuche mit ^{14}C-markierten Fettsäuren verwendet. Die DHA-reichen Mikroorganismen *Thraustochytrium* sp. und *Crypthecodinium cohnii*, die Alge MA13 mit gemäßigtem DHA-Anteil sowie *Euglena gracilis*, die nur einen sehr geringen Anteil von DHA enthält, setzten die exogen zugegebene Fettsäure Docosapentaensäure (^{14}C-22:5$^{\Delta7,10,13,16,19}$) effektiv zu DHA um. Keine weiteren Fettsäureprodukte wurden detektiert. Im *Thraustochytrium*-verwandten Pilz *Schizochytrium* sp. erfolgte keine Umsetzung des Substrates. *Thraustochytrium* sp. verwendete zudem radiomarkierte Ölsäure zur Synthese von DHA, worin er sich ebenfalls von *Schizochytrium* sp. unterschied. Die aus der Docosapentaensäure synthetisierte DHA wurde aus *Thraustochytrium* sp. und *E. gracilis* isoliert. Die Bestimmung der Radiomarkierung ergab keine Unterschiede zum Substrat. Damit konnte eine Synthese von DHA aus den Abbauprodukten der Docosapentaensäure, z. B. durch ein PKS-System, ausgeschlossen werden. Zusammen mit der Abwesenheit der beim Sprecher-Weg detektierbaren C_{24}-Fettsäuren sprachen diese Ergebnisse für die Existenz einer Δ4-Desaturase in *Thraustochytrium* sp. und *E. gracilis*.

E. gracilis desaturierte auch Docosatetraensäure (^{14}C-22:4$^{\Delta7,10,13,16}$) an der Δ4-Position, während in *Thraustochytrium* sp. dieses Substrat in der Δ4- und der ω3-Position desaturiert wurde. Dies ist der erste direkte Hinweis auf die Existenz einer ω3-Desaturase mit Spezifität für C_{22}-Polyenfettsäuren.

Die Isolierung von Desaturasegenen erfolgte durch Polymerase-Kettenreaktionen mit degenerierten Primern und durch von der BASF Plant Science GmbH durchgeführte EST-Massensequenzierungen. Für die funktionale Identifizierung und Charakterisierung wurden heterologe Expressionen in *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt.

Durch PCR wurde aus *Cricosphaera carterae* ein DNA-Fragment mit Ähnlichkeit zu Δ6-Desaturasegenen und Δ8-Sphingolipid-Desaturasegenen isoliert. Der zugehörige cDNA-Klon wurde aus einer cDNA-Bank isoliert, und die drei putativen offenen Leserahmen wurden in Hefe exprimiert. In keinem Fall konnte eine Δ6-Desaturase- bzw. Δ8-Spingolipid-Desaturaseaktivität nachgewiesen werden. Aus der Sequenzierung einer *Thraustochytrium* sp.-cDNA-Bank ergab sich ein Desaturase-Klon mit Ähnlichkeiten zu mikrosomalen Δ12-Desaturasegenen. Die Expression des offenen Leserahmen in Hefe blieb ebenfalls aktivitätslos.

Bei der Sequenzierung der cDNA-Bank von *E. gracilis* Stamm Z wurde ein Klon isoliert, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz die höchste Ähnlichkeit zu der unabhängig von dieser Arbeit isolierten Δ4-Desaturase aus *Thraustochytrium* sp. aufwies. Das entsprechende Gen konnte im Genom der Alge nachgewiesen werden, jedoch nicht im Genom eines anderen Stamms der gleichen Art. Hefe-Expressionen identifizierten den Klon als Sequenz für eine Δ4-Desaturase, die an der Synthese von DHA beteiligt ist. Eine Analyse der Substratspezifität ergab eine ungewöhnlich breite Spezifität für Monoen- und Polyenfettsäuren mit 16 und 22 Kohlenstoffatomen. Die Desaturase setzte die Doppelbindung in Abhängigkeit von einer vorhandenen Δ7-Doppelbindung und mit strikter Δ4-Regiospezifität. Eine Positionsanalyse des Phosphatidylcholins der transgenen Hefen ergab, dass sich die desaturierten Produkte fast ausschließlich in der *sn*-2-Position befanden, obwohl die Substrate gleichmäßig über beide *sn*-Positionen des Phospholipids verteilt waren. Dies deutet an, dass die Δ4-Desaturase aus *E. gracilis* spezifisch die Fettsäuren in der *sn*-2-Position von Phosphatidylcholin desaturiert. Eine Positionsanalyse des Phosphatidylethanolamins gab keinen deutlichen Hinweis auf eine positionsspezifische Desaturierung dieses Lipids. Eine Deletion der N-terminalen Extension der Δ4-Desaturase von *E. gracilis* führte zum Verlust der Aktivität. Auch ein Austausch der Cytochrom b5-Domäne der Δ4-Desaturase gegen die Cytochrom b5-Domäne der Δ8-Desaturase aus dem gleichen Organismus führte zu einem Verlust der Aktivität.

Mit den verwendeten *in vivo*-Markierungsversuchen wurde eine Methode demonstriert, mit der die Aktivität einer Δ4-Desaturase nachgewiesen werden konnte, die an der Biosynthese von DHA beteiligt ist. Die Klonierung der zugehörigen cDNA aus einem anhand der Markierungsergebnisse ausgewählten Organismus bestätigt dies und stellt einen weiteren Schritt auf dem Weg zur Rekonstruktion der DHA-Synthese in transgenen Ölsaaten dar.

5 Literaturverzeichnis

Abbadi, A., Domergue, F., Meyer, A., Riedel, K., Sperling, P., Zank, T.K., und Heinz, E. (2001). Transgenic oilseeds as sustainable sources of nutritionally relevant C20 and C22 polyunsaturated fatty acids? Eur J Lipid Sci Technol **103**, 106-113.

Aguilar, P.S., Cronan, J.E., Jr., und de Mendoza, D. (1998). A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. J Bacteriol **180,** 2194-2200.

Aki, T., Shimada, Y., Inagaki, K., Higashimoto, H., Kawamoto, S., Shigeta, S., Ono, K., und Suzuki, O. (1999). Molecular cloning and functional characterization of rat Δ-6 fatty acid desaturase. Biochem Biophys Res Commun **255**, 575-579.

Alonso, D.L., Belarbi, E.H., Fernandez-Sevilla, J.M, Rodriguez-Ruiz, J., und Molina Grima, E. (2000). Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continious culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Phytochemistry **54**, 461-471.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., und Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. J Mol Biol **215,** 403-410.

Anderson, W.H., Gellerman, J.L., und Schlenk, H. (1975). Acetylenic acids from mosses. Lipids **10,** 501-502.

Arao, T., und Yamada, M. (1994). Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. Phytochemistry **35,** 1177-1181.

Arthington, B.A., Hoskins, J., Skatrud, P.L., und Bard, M. (1991). Nucleotide sequence of the gene encoding yeast C-8 sterol isomerase. Gene **107,** 173-174.

Ashford, A., Barklay, W.R., Weaver, C.A., Giddings, T.H., und Zeller, S. (2000). Electron microscopy may reveal structure of docosahexaenoic acid-rich oil within *Schizochytrium* sp. Lipids **35**, 1377-1386.

Bajpai, P.K., Bajpai, P., und Ward, O.P. (1991). Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. J Am Oil Chem Soc **68**, 509-513.

Baykousheva, S.P., Luthria, D.L., und Sprecher, H. (1995). Peroxisomal-microsomal communication in unsaturated fatty acid metabolism. FEBS Lett **367,** 198-200.

Beach, D.H., Harrington, G.W., Gellerman, J.L., Schlenk, H., und Holz, G.G., Jr. (1974). Biosynthesis of oleic acid and docosahexaenoic acid by a heterotrophic marine dinoflagellate, *Crypthecodinium cohnii*. Biochim Biophys Acta **369,** 16-24.

Beaudoin, F., Michaelson, L.V., Hey, S.J., Lewis, M.J., Shewry, P.R., Sayanova, O., und Napier, J.A. (2000). Heterologous reconstitution in yeast of the polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway. Proc Natl Acad Sci USA **97,** 6421-6426.

Berge, J.-P., Gouygou, J.-P., Dubacq, J.-P. und Durand, P. (1995). Reassessment of lipid composition of the diatom, *Skeletonema costatum*. Phytochemistry **39**, 1017-1021.

Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Boussiba, S., Vonshak, A., und Cohen, Z. (2002). Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. Phytochemistry **60,** 497-503.

Bowles, R.D., Hunt, A.E., Bremer, G.B., Duchars ,M.G., und Eaton, R.A. (1999). Long-chain *n*-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: screening of isolates and optimisation of docosahexaenoic acid production. J Biotech **70**, 193-202.

Broadwater, J.A., Whittle, E., und Shanklin, J. (2002). Desaturation and hydroxylation. Residues 148 and 324 of *Arabidopsis* FAD2, in addition to substrate chain length, exert a major influence in partitioning of catalytic specificity. J Biol Chem **277,** 15613-15620.

Bullock, W.O., Fernandez, J.M., und Short, J.M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *rec*A *Escherichia coli* strain with beta-glucosidase selection. Biotechnique **5,** 376-378.

Cahoon, E.B., Cranmer, A.M., Shanklin, J., und Ohlrogge, J.B. (1994). Δ^6Hexadecenoic acid is synthesized by the activity fo a soluble Δ^6 palmitoyl-acyl carrier protein desaturase in *Thunbergia alata* endosperm. J Biol Chem **269**, 27519-27526.

Cahoon, E.B., Lindqvist, Y., Schneider, G., und Shanklin, J. (1997). Redesign of soluble fatty acid desaturases from plants for altered substrate specificity and double bond position. Proc Natl Acad Sci USA **94**, 4872-4877.

Cahoon, E.B., Ripp, K.G., Hall, S.E., und Kinney, A.J. (2001). Formation of conjugated Δ^8,Δ^{10}-double bonds by Δ^{12}-oleic-acid desaturase-related enzymes. J Biol Chem **276**, 2637-2643.

Cahoon, E.B., Shanklin, J., und Ohlrogge, J.B. (1992). Expression of a coriander desaturase results in petroselinic acid production in transgenic tobacco. Proc Natl Acad Sci USA **89**, 11184-11188.

Calvyrac, R., und Douce, R. (1970). Les polyglycerophospholipides d'*Euglena gracilis*. FEBS Lett **7**, 259-262.

Chen, J., und Dellaporta, S. (1994). *Urea-based plant DNA minipreparation*. In: Freeling, M., Walbot, V. (Eds). The Maize Handbook, Springer Verlag, NY, 526-527.

Cho, H.P., Nakamura, M., und Clarke, S.D. (1999a). Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human Δ-5 desaturase. J Biol Chem **274,** 37335-37339.

Cho, H.P., Nakamura, M.T., und Clarke, S.D. (1999b). Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Δ-6 desaturase. J Biol Chem **274,** 471-477.

Choi, J.Y., Stukey, J., Hwang, S.Y., und Martin, C.E. (1996). Regulatory elements that control transcription activation and unsaturated fatty acid-mediated repression of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene. J Biol Chem **271,** 3581-3589.

Christie, W.W. (1998). Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. Lipids **33**, 343-353.

Cohen, Z., Norman, H.A., und Heimer, Y.M. (1995). Microalgae as a source of ω3 fatty acids. World Rev Nutr Diet **77,** 1-31.

Cohen, Z., Khozin-Goldberg, I., Adlerstein, D., und Bigogno, C. (2000). The role of triacylglycerol as a reservoir of polyunsaturated fatty acids for the rapid production of chloroplastic lipids in certain microalgae. Biochem Soc Trans **28,** 740-743.

Dahlqvist, A., Stahl, U., Lenman, M., Banas, A., Lee, M., Sandager, L., Ronne, H., und 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.

D'Andrea, S., Guillou, H., Jan, S., Catheline, D., Thibault, J.N., Bouriel, M., Rioux, V., und Legrand, P. (2002). The same rat Δ6-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.

Daum, G., Tuller, G., Nemec, T., Hrastnik, C., Balliano, G., Cattel, L., Milla, P., Rocco, F., Conzelmann, A., Vionnet, C., Kelly, D.E., Kelly, S., Schweizer, E., Schuller, H.J., Hojad, U., Greiner, E., und Finger, K. (1999). Systematic analysis of yeast strains with possible defects in lipid metabolism. Yeast **15,** 601-614.

de Antueno, R.J., Knickle, L.C., Smith, H., Elliot, M.L., Allen, S.J., Nwaka, S., und Winther, M.D. (2001). Activity of human Δ5 and Δ6 desaturases on multiple n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. FEBS Lett **509,** 77-80.

de Swaaf, M.E., de Rijk, T.C, Eggink G., und Sijtsma, L. (1999). Optimization of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Crypthecodinium cohnii*. J Biotech **70**, 185-192.

Dembitsky, V.M., und Rezanka, T. (1995). Distribution of acetylenic acids and polar lipids in some aquatic bryophytes. Phytochemistry **40,** 93-97.

Diaz, A.R., Mansilla, M.C., Vila, A.J., und de Mendoza, D. (2002). Membrane topology of the acyl-lipid desaturase from *Bacillus subtilis*. J Biol Chem **277,** 48099-48106.

Diekmann, S., Weston, J., Anders, E., Boland, W., Schonecker, B., Hettmann, T., von Langen, J., Erhardt, S., Mauksch, M., Brauer, M., Beckmann, C., Rost, M., Sperling, P., und Heinz, E. (2002). Metal-mediated reactions modeled after nature. J Biotech **90,** 73-94.

Domergue, F., Lerchl, J., Zähringer, U., und 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, T.F., und Cigan, A.M. (1990). Sequence and structural requirements for efficient translation in yeast. Methods Enzymol **185**, 366-372.

Dörmann, P., Frentzen, M., und Ohlrogge, J.B. (1994). Specificities of the acyl-acyl carrier protein (ACP) thioesterase and glycerol-3-phosphate acyltransferase for octadecenoyl-ACP isomers (Identification of a petroselinoyl-ACP thioesterase in Umbelliferae). Plant Physiol **104**, 839-844.

Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Barrett, S.M., Leroi, J.-M., und Jeffrey, S.W. (1994). Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). Phytochemistry **35**, 155-161.

Eichenberger, W. (1976). Lipids of *Chlamydomonas reinhardi* under different growth conditions. Phytochemistry **15**, 459-463.

Facciotti D., Metz, J., und Lassner, M. (2000). *Schizochytrium* PKS genes. Patent WO00/42195

Fauconnot, L., und Buist, P.H. (2001). γ-Linolenic acid biosynthesis: cryptoregiochemistry of Δ^6 desaturation. J Org Chem **66,** 1210-1215.

Ferdinandusse, S., Denis, S., Mooijer, P.A., Zhang, Z., Reddy, J.K., Spector, A.A., und Wanders, R.J. (2001). Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid. J Lipid Res **42,** 1987-1995.

Fischer, W., Heinz, E., und Zeus, M. (1973). The suitability of lipase from *Rhizopus arrhizus delemar* for analysis of fatty acid distribution in dihexosyl diglycerides, phospholipids and plant sulfolipids. Hoppe Seyler's Z Physiol Chem **354,** 1115-1123.

Fleurence, J., Butbier, G., Mabeau, S., und Leray, C. (1994). Fatty acids from 11 marine macroalgae of the French Brittany coast. J Appl Phyc **6**, 527-532.

Fritsche, K., Hornung, E., Peitzsch, N., Renz, A., und Feussner, I. (1999). Isolation and characterization of a calendic acid producing (8,11)-linoleoyl desaturase. FEBS Lett **462**, 249-253.

Fulco, A.J. (1974). Metabolic alterations of fatty acids. Annu Rev Biochem **43,** 215-241.

Galle-Le Bastard, A.M., Demandre, C., Oursel, A., Joseph, M., Mazliak, P., und Kader, J.C. (2000). Phosphatidylcholine molecular species involved in γ-linolenic acid biosynthesis in microsomes from borage seeds. Physiol Plant **108,** 118-124.

Garcia-Maroto, F., Garrido-Cardenas, J.A., Rodriguez-Ruiz, J., Vilches-Ferron, M., Adam, A.C., Polaina, J., und Alonso, D.L. (2002). Cloning and molecular characterization of the Δ6-desaturase from two *Echium* plant species: production of GLA by heterologous expression in yeast and tobacco. Lipids **37,** 417-426.

Gellerman, J.L., und Schlenk, H. (1979). Methyl-directed desaturation of arachidonic to eicosapentaenoic acid in the fungus, *Saprolegnia parasitica*. Biochim Biophys Acta **573**, 23-30.

Girke, T., Schmidt, H., Zähringer, U., Reski, R., und Heinz, E. (1998). Identification of a novel Δ6-acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. Plant J **15,** 39-48.

Gonzalez, C.I., und Martin, C.E. (1996). Fatty acid-responsive control of mRNA stability. Unsaturated fatty acid-induced degradation of the *Saccharomyces* OLE1 transcript. J Biol Chem **271**, 25801-25809.

Gould, S.J., Keller, G.A., Hosken, N., Wilkinson, J., und Subramani, S. (1989). A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. J Cell Biol **108**, 1657-1664.

Griffiths, G., Stobart, A.K., und Stymne, S. (1988). Δ6- and Δ12-desaturase activities and phosphatidic acid formation in microsomal preparations from the developing cotyledons of common borage (*Borago officinalis*). Biochem J **252**, 641-647.

Guillou, H., Rioux, V., Datheline, D., Thiboult, J.N., Bouriel, M., Jan, S., D'Andrea, S., und Legrand, P. (2003). Conversion of hexadecanoic acid to hexadecenoic acid by rat Δ6-desaturase. J Lipid Res **44**, 450-454.

Hamamoto, T., Takata, N., Kudo, T., und Horikoshi, K. (1994). Effect of temperature and growth phase on fatty acid composition of the psychrophilic *Vibrio* sp. strain no 5710. FEMS Microbiol Lett **119**, 77-82.

Hastings, N., Agaba, M., Tocher, D.R., Leaver, M.J., Dick, J.R., Sargent, J.R., und Teale, A.J. (2001). A vertebrate fatty acid desaturase with Δ5 and Δ6 activities. Proc Natl Acad Sci USA **98,** 14304-14309.

Hay, B., und Short, J.M. (1992). ExAssistTM helper phage and SOLR^{TM} cells for lambda ZAP II excision. Strategies **5**, 16-18.

Henderson, R.J., Leftley, J.W., und Sargent, J.R. (1988). Lipid composition and biosynthesis in the marine dinoflagellate *Crypthecodinium cohnii*. Phytochemistry **27**, 1679-1683.

Henderson, R.J., und Mackinlay, E.E. (1992). Radiolabelling studies of lipids in the marine cryptomonad *Chroomonas salina* in relation to fatty acid desaturation. Plant Cell Physiol **33**, 395-406.

Higgins, D.G., und Sharp, P.M. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. Gene **73**, 237-244.

Hitz, W.D., Carlson, T.J., Booth, J.R., Jr., Kinney, A.J., Stecca, K.L., und Yadav, N.S. (1994). Cloning of a higher-plant plastid ω-6 fatty acid desaturase cDNA and its expression in a cyanobacterium. Plant Physiol **105**, 635-641.

Hong, H., Datla, N., MacKenzie, S.L., und Qiu, X. (2003). Identification of a Δ5 fatty acid desaturase from *Pythium irregulare* and production of Δ5 polyunsaturated fatty acids in flax and *Brassica juncea*. eingereicht

Hong, H., Datla, N., Reed, D.W., Covello, P.S., und MacKenzie, S.L. (2002). High-level production of γ-linolenic acid in *Brassica juncea* using a Δ6 desaturase from *Pythium irregulare*. Plant Physiol **129**, 354-362.

Hovland, P., Flick, J., Johnston, M., und Sclafani, R.A. (1989). Galactose as a gratuitous inducer of GAL gene expression in yeasts growing on glucose. Gene **83**, 57-64.

Huang, Y.S., Chaudhary, S., Thurmond, J.M., Bobik, E.G., Jr., Yuan, L., Chan, G.M., Kirchner, S.J., Mukerji, P., und Knutzon, D.S. (1999). Cloning of Δ12- and Δ6-desaturases from *Mortierella alpina* and recombinant production of γ-linolenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. Lipids **34,** 649-659.

Infante, J.P., und Huszagh, V.A. (1998). Analysis of the putative role of 24-carbon polyunsaturated fatty acids in the biosynthesis of docosapentaenoic (22:5n-6) and docosahexaenoic (22:6n-3) acids. FEBS Lett **431,** 1-6.

Inoue, H., Nojima, H., und Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene **96**, 23-28.

Itoh, R., Toda, K., Takahashi, H., Takano, H, und Kuroiwa, H. (1998). Δ-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., und Imamura, J. (2003). Δ12-oleate desaturase-related enzymes associated with formation of conjugated *trans*-Δ11,*cis*-Δ13 double bonds. J Biol Chem **278**, 4603-4610.

Jackson, F.M., Fraser, T.C., Smith, M.A., Lazarus, C., Stobart, A.K., und Griffiths, G. (1998). Biosynthesis of C18 polyunsaturated fatty acids in microsomal membrane preparations from the filamentous fungus *Mucor circinelloides*. Eur J Biochem **252**, 513-519.

Jiang, Y., und Chen, F., (2000). Effects of medium glucose concentration and pH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic *Crypthecodinium cohnii*, Proc Biochem **35**, 1205-1209.

Johns, R.B., und Perry, G.J. (1977). Lipids of the bacterium *Flexobacter polymorphus*. Arch Microbiol **114**, 267-271.

Kamisaka, Y., Noda, N., Sakai, T., und Kawasaki, K. (1999). Lipid bodies and lipid body formation in an oleaginous fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispora.* Bioch Biophys Acta **1438**, 185-198.

Kang, Z.B., Ge, Y., Chen, Z., Cluette-Brown, J., Laposata, M., Leaf, A., und Kang, J.X. (2001). Adenoviral gene transfer of *Caenorhabditis elegans* n-3 fatty acid desaturase optimizes fatty acid composition in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA **98,** 4050-4054.

Karunen, P., und Aro, E.-M. (1979). Fatty acid composition of polar lipids in *Ceratodon purpureus* and *Pleurozium schreberi*. Physiol Plant **45,** 265-269.

Kato, M., Hajiro-Nakanashi, K., Sano, H., und Miyachi, S. (1995). Polyunsaturated fatty acids and betaine lipids from *Pavlova lutheri*. Plant Cell Physiol **36**, 1607-1611.

Kelly, A.A., und 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.

Kendrick, A., und Ratledge, C. (1992a). Desaturation of polyunsaturated fatty acids in *Mucor circinelloides* and the involvement of a novel membrane-bound malic enzyme. Eur J Biochem **209,** 667-673.

Kendrick, A., und Ratledge, C. (1992b). Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. Lipids **27,** 15-20.

Khosla, C., Gokhale, R.S., Jacobsen, J.R., und Cane, D.E. (1999). Tolerance and specificity of polyketide synthases. Annu Rev Biochem **68,** 219-253.

Knutzon, D.S., Thurmond, J.M., Huang, Y.S., Chaudhary, S., Bobik, E.G., Jr., Chan, G.M., Kirchner, S.J., und Mukerji, P. (1998). Identification of a Δ^5-desaturase from *Mortierella alpina* by heterologous expression in Bakers' yeast and canola. J Biol Chem **273,** 29360-29366.

Kohn, G., Demmerle, S., Vandekerkhove, O., Hatmann, E., und Beutelmann, P. (1987). Distribution and chemotaxonomic significance of acetylenic fatty acids in mosses of the Dicranales. Phytochemistry **26,** 2271-2275.

Korn, E.D. (1964). The fatty acids of *Euglena gracilis*. J Lipid Res **5**, 352-362.

Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., und Sonnhammer, E.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J Mol Biol **305**, 567-580.

Kyte, J., und Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol **157**, 105-132.

Laoteng, K., Mannontarat, R., Tanticharoen, M., und Cheevadhanarak, S. (2000). Δ^6-desaturase of *Mucor rouxii* with high similarity to plant Δ^6-desaturase and its heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Biophys Res Commun **279,** 17-22.

Lee, M., Lenman, M., Banas, A., Bafor, M., Singh, S., Schweizer, M., Nilsson, R., Liljenber, C., Dahlqvist, A., Gummeson, P.O., Sjodahl, S., Green, A., and Stymne, S. (1998). Identification of non-heme diiron proteins that catalyze triple bond and epoxy group formation. Science **280**, 915-918.

Leman, J. (1997). Oleaginous microorganisms: An assessment of the potential. Adv Appl Microbiol **43**, 195-243.

Leonard, A.E., Bobik, E.G., Dorado, J., Kroeger, P.E., Chuang, L.T., Thurmond, J.M., Parker-Barnes, J.M., Das, T., Huang, Y.S., und Mukerji, P. (2000a). Cloning of a human cDNA encoding a novel enzyme involved in the elongation of long-chain polyunsaturated fatty acids. Biochem J **350**, 765-770.

Leonard, A.E., Kelder, B., Bobik, E.G., Chuang, L.T., Parker-Barnes, J.M., Thurmond, J.M., Kroeger, P.E., Kopchick, J.J., Huang, Y.S., und Mukerji, P. (2000b). cDNA cloning and characterization of human Δ^5-desaturase involved in the biosynthesis of arachidonic acid. Biochem J **347**, 719-724.

Libisch, B., Michaelson, L.V., Lewis, M.J., Shewry, P.R., und Napier, J.A. (2000). Chimeras of Δ^6-fatty acid and Δ^8-sphingolipid desaturases. Biochem Biophys Res Commun **279**, 779-785.

Lohr, D., Venkov, P., und Zlatanova, J. (1995). Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. FASEB J **9**, 777-787.

Los, D.A., und Murata, N. (1998). Structure and expression of fatty acid desaturases. Biochim Biophys Acta **1394,** 3-15.

Luthria, D.L., Mohammed, B.S., und Sprecher, H. (1996). Regulation of the biosynthesis of 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid. J Biol Chem **271,** 16020-16025.

Meesapyodsuk, D., Reed, D.W., Savile, C.K., Buist, P.H., Ambrose, S.J., und Covello, P.S. (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, J.G., Roessler, P., Facciotti, D., Levering, C., Dittrich, F., Lassner, M., Valentine, R., Lardizabal, K., Domergue, F., Yamada, A., Yazawa, K., Knauf, V., und Browse, J. (2001). Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. Science **293,** 290-293.

Michaelson, L.V., Lazarus, C.M., Griffiths, G., Napier, J.A., und Stobart, A.K. (1998a). Isolation of a Δ^5-fatty acid desaturase gene from *Mortierella alpina*. J Biol Chem **273,** 19055-19059.

Michaelson, L.V., Napier, J.A., Lewis, M., Griffiths, G., Lazarus, C.M., und Stobart, A.K. (1998b). Functional identification of a fatty acid Δ^5 desaturase gene from *Caenorhabditis elegans*. FEBS Lett **439**, 215-218.

Michaelson, L.V., Longman, A.J., Sayanova, O., Stobart, A.K., und Napier, J.A. (2001). Isolation and characterization of a cDNA encoding a Δ^8-sphingolipid desaturase from *Aquilegia vulgaris*. Biochem Soc Trans **30,** 1073-1075.

Millar, A.A., Smith, M.A., und Kunst, L. (2000). All fatty acids are not equal: discrimination in plant membrane lipids. Trends Plant Sci **5**, 95-101.

Millar, A.A., und Kunst, L. (1997). Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. Plant J **12**, 121-131.

Mitchell, A.G., und Martin, C.E. (1995). A novel cytochrome b5-like domain is linked to the carboxyl terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* Δ9 fatty acid desaturase. J Biol Chem **270,** 29766-29772.

Montgrand, S., Cassagne, C., und Bessoule, J.-J. (2000). Import of lyso-phosphatidylcholine into chloroplasts likely at the origin of eukaryotic plastidial lipids. Plant Physiol **122**, 845-852.

Moreno, V.J., de Moreno, J.A.E., und Brenner, R.R. (1979). Biosynthesis of unsaturated fatty acids in the diatom *Phaeodyctylum tricornutum*, Lipids **14**, 15-19.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51**, 263-273

Nagiec, M.M., Wells, G.B., Lester, R.L., und Dickson, R.C. (1993). A suppressor gene that enables *Saccharomyces cerevisiae* to grow without making sphingolipids encodes a protein that resembles an *Escherichia coli* fatty acyltransferase. J Biol Chem **268**, 22156-22163.

Nakai, K., und Kanehisa, M. (1992). A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. Genomics **14,** 897-911.

Napier, J.A., Sayanova, O., Stobart, A.K., und Shewry, P.R. (1997). A new class of cytochrome b5 fusion proteins. Biochem J **328**, 717-718.

Napier, J.A., Hey, S.J., Lacey, D.J., und Shewry, P.R. (1998). Identification of a *Caenorhabditis elegans* Δ^6-fatty-acid-desaturase by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem J **330**, 611-614.

Nichols, B.W., und Appleby, R.S. (1969). The distribution and biosynthesis of arachidonic acid in algae. Phytochemistry **8**, 1907-1915.

Nichols, D.S., Nichols, P.D., und McMeekin, T.A. (1992). Anaerobic production of polyunsaturated fatty acids by *Shewanella putrefaciens* strain ACAM 342. FEMS Microbiol Lett **98,** 117-122.

Nichols, D.S., Nichols, P.D., Russell, N.J., Davies, N.W., und McMeekin, T.A. (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.

O'Brien, D.J., Kurantz, M.J., und Kwoczak, R. (1993). Production of eicosapentaenoic acid by the filamentous fungus *Pythium irregulare*. Appl Microbiol Biotechnol **40,** 211-214.

Ohlrogge, J., und Browse, J. (1995). Lipid biosynthesis. Plant Cell **7**, 957-970.

Okayasu, T., Nagao, M., Ishibashi, T., und Imai, Y. (1981). Purification and partial characterization of linoleoyl-CoA desaturase from rat liver microsomes. Arch Biochem Biophys **206**, 21-28.

Palazzolo, M.J., Hamilton, B.A., Ding, D.L., Martin, C.H., Mead, D.A., Mierendorf, R.C., Raghavan, K.V., Meyerowitz, E.M., und Lipshitz, H.D. (1990). Phage lambda cDNA cloning vectors for subtractive hybridization, fusion-protein synthesis and Cre-loxP automatic plasmid subcloning. Gene **88**, 25-36.

Parker-Barnes, J.M., Das, T., Bobik, E., Leonard, A.E., Thurmond, J.M., Chaung, L.T., Huang, Y.S., und Mukerji, P. (2000). Identification and characterization of an enzyme involved in the elongation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. Proc Natl Acad Sci USA **97,** 8284-8289.

Qi, B., Beaudoin, F., Fraser, T., Stobart, A.K., Napier, J.A., und Lazarus, C.M. (2002). Identification of a cDNA encoding a novel C18-Δ^9 polyunsaturated fatty acid-specific elongating activity from the docosahexaenoic acid (DHA)-producing microalga, *Isochrysis galbana*. FEBS Lett **510,** 159-165.

Qiu, X., Hong, H., und MacKenzie, S.L. (2001). Identification of a Δ4 fatty acid desaturase from *Thraustochytrium* sp. involved in the biosynthesis of docosahexanoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*. J Biol Chem **276,** 31561-31566.

Reddy, A.S., Nuccio, M.L., Gross, L.M., und Thomas, T.L. (1993). Isolation of a Δ6-desaturase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by gain-of-function expression in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. Plant Mol Biol **22,** 293-300.

Reed, D.W., Schafer, U.A., und Covello, P.S. (2000). Characterization of the *Brassica napus* extraplastidial linoleate desaturase by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Plant Physiol **122,** 715-720.

Richard, M.G., und McMaster, C.R. (1998). Lysophosphatidylcholine acyltransferase activity in *Saccharomyces cerevisiae*: regulation by a high-affinity Zn2+ binding site. Lipids **33,** 1229-1234.

Russell, N.J., und Nichols, D.S. (1999). Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria – a dogma rewritten. Microbiology **145**, 767-779.

Saito, T., und Ochiai, H. (1999). Identification of Δ5-fatty acid desaturase from the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. Eur J Biochem **265**, 809-814.

Saito, T., Morio, T., und Ochiai, H. (2000). A second functional Δ5 fatty acid desaturase in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. Eur J Biochem **267**, 1813-1818.

Sakamoto, T., Wada, H., Nishida, I., Ohmori, M., und Murata, N. (1994a). Δ9 acyl-lipid desaturases of cyanobacteria. Molecular cloning and substrate specificities in terms of fatty acids, *sn*-positions, and polar head groups. J Biol Chem **269**, 25576-25580.

Sakamoto, T., Los, D.A., Higashi, S., Wada, H., Nishida, I., Ohmori, M., und Murata, N. (1994b). Cloning of ω3 desaturase from cyanobacteria and its use in altering the degree of membrane-lipid unsaturation. Plant Mol Biol **26**, 249-263.

Sakuradani, E., Kobayashi, M., und Shimizu, S. (1999a). Δ6-fatty acid desaturase from an arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus. Gene cloning and its heterologous expression in a fungus, *Aspergillus*. Gene **238,** 445-453.

Sakuradani, E., Kobayashi, M., und Shimizu, S. (1999b). Δ9-fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing fungus. Unique gene sequence and its heterologous expression in a fungus, *Aspergillus*. Eur J Biochem **260,** 208-216.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA **74**, 5463-54657.

Sayanova, O., Beaudoin, F., Libisch, B., Castel, A., Shewry, P.R., und Napier, J.A. (2001). Mutagenesis and heterologous expression in yeast of a plant Δ^6-fatty acid desaturase. J Exp Bot **52**, 1581-1585.

Sayanova, O., Smith, M.A., Lapinskas, P., Stobart, A.K., Dobson, G., Christie, W.W., Shewry, P.R., und Napier, J.A. (1999). Histidine-41 of the cytochrome b5 domain of the borage Δ^6 fatty acid desaturase is essential for enzyme activity. Plant Physiol **121**, 641-646.

Sayanova, O., Smith, M.A., Lapinskas, P., Stobart, A.K., Dobson, G., Christie, W.W., Shewry, P.R., und Napier, J.A. (1997). Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b(5) domain results in the accumulation of high levels of Δ^6-desaturated fatty acids in transgenic tobacco. Proc Nat Acad Sci USA **94**, 4211-4216.

Schenk, H.E.A., Poralla, K., Härtner, T., Deimel, R., und Thiel, D. (1985). Lipids in *Cyanophora paradoxa*. I. Unusual fatty acid pattern of *Cyanocyta korschikoffiana*. Endocyt Cell Res **2**, 233-238.

Schneider, J.C., Livne, A., Sukenik, A., und Roessler, P.G. (1995). A mutant of *Nannochloropsis* deficient in eisosapentaenoic acid production. Phytochemistry **40**, 807-814.

Schultz, E.J., Cahoon, D.B., Shanklin, J., Craig, R., Cox-Foster, D.L., Mumma, R.O., und Medford, J.I. (1996). Expression of a Δ^9 14:0-acyl carrier protein fatty acid desaturase gene is necessary for the production of ω^5 anacardic acids found in pest-resistent geranium (*Pelargonium xhortorum*). Proc Natl Acad Sci USA **93**, 8771-8775.

Schwartzbeck, J.L., Jung, S., Abbott, A.G., Mosley, E., Lewis, S., Pries, G.L., und Powell, G.L. (2001). Endoplasmic oleoyl-PC desaturase references the second double bond. Phytochemistry **57,** 643-652.

Shanklin, J., und Cahoon, E.B. (1998). Desaturation and related modifications of fatty acids. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **49**, 611-641.

Shanklin, J., und Sommerville, C. (1991). Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs. Proc Natl Acad Sci USA **88**, 2510-2514.

Shanklin, J., Whittle, E., und Fox, B.G. (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.

Shewry, P.R., und Napier, J.A. (1997). Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of Δ6-desaturated fatty acids in transgenic tobacco. Proc Natl Acad Sci USA **94**, 4211-4216.

Singh, A., und Ward, O.P. (1997). Microbial production of docosahexaenoic acid (DHA, C22:6). Adv Appl Microbiol **45**, 271-312.

Soustre, I., Dupuy, P.H., Silve, S., Karst, F., und Loison, G. (2000). Sterol metabolism and ERG2 gene regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett **470,** 102-106.

Sperling, P., und 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., und Heinz, E. (2000). A bifunctional Δ^6-fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss *Ceratodon purpureus*. A new member of the cytochrome b5 superfamily. Eur J Biochem **267,** 3801-3811.

Sperling, P., Lucht, J.M., Egener, T., Reski, R., Cirpus, P., und Heinz, E. (2003a). Identification of a Δ5-fatty acid desaturase from *Physcomitrella patens*. Biochem Soc Trans, in press

Sperling, P., Ternes, P., Zank, T.K., und Heinz, E. (2003b). The evolution of desaturases. Prostaglandins Leukotr Essent Fatty Acids **68,** 73-95.

Sperling, P., Zähringer, U., und Heinz, E. (1998). A sphingolipid desaturase from higher plants. Identification of a new cytochrome b5 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, D.L., Mohammed, B.S., und Baykousheva, S.P. (1995). Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. J Lipid Res **36,** 2471-2477.

Spychalla, J.P., Kinney, A.J., und Browse, J. (1997). Identification of an animal omega-3 fatty acid desaturase by heterologous expression in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA **94,** 1142-1147.

Stukey, J.E., McDonough, V.M., und Martin, C.E. (1990). The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the Δ9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene. J Biol Chem **265,** 20144-20149.

Stymne, S., und Stobart, A.K. (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.

Takeyama, H., Takeda, D., Yazawa, K., Yamada, A., und Matsunaga, T. (1997). Expression of the eicosapentaenoic acid synthesis gene cluster from *Shewanella* sp. in a transgenic marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. Microbiology **143**, 2725-2731.

Tanaka, M., Ueno, A., Kawasaki, K., Yumoto, I., Ohgiya, S., Hoshino, T., Ishizaki, K., Okuyama, H., und Morita, N. (1999). Isolation of clustered genes that are noteably homologous to the eicosapentaenoic acid biosynthesis gene cluster from the docosahexaenoic acid-producing bacterium *Vibrio* strain MP-1. Biotechnol Lett **21,** 939-945.

Teasdale, R.D., und Jackson, M.R. (1996). Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. Annu Rev Cell Dev Biol **12**, 27-54.

Ternes, P., Franke, S., Zähringer, U., Sperling, P., und Heinz, E. (2002). Identification and characterization of a sphingolipid Δ4-desaturase family. J Biol Chem **277**, 25512-25518.

Terrados, J., und Lopez-Jimenez, J.A. (1996). Fatty acid composition and chilling resistence in the green alga *Caulerpa prolifera* (Forrskal) Lamouroux (Chlorophyta, Caulerpales). Biochem Mol Biol Internat **39**, 863-869.

Thompson, G.A., Scherer, D.E., Foxall-VanAken, S., Kenny, J.W., Young, H.L., Shintani, D.K., Kridl, J.C., und Knauf, V.C. (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.

van de Loo, F.J., Broun, P., Turner, S., und Somerville, C. (1995). An oleate 12-hydroxylase from *Ricinus communis* L. is a fatty acyl desaturase homolog. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 6743-6747.

Vazhappily, R., und Chen, F. (1998). Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. J Am Oil Chem Soc **75**, 393-397.

Voelker, T., und Kinney, A.J. (2001). Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **52**, 335-361.

Voss, A., Reinhart, M., Sankarappa, S., und Sprecher, H. (1991). The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. J Biol Chem **266,** 19995-20000.

Wada, H., Avelange-Macherel, M.H., und Murata, N. (1993). The desA gene of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 is the structural gene for Δ12 desaturase. J Bacteriol **175**, 6056-6058.

Wada, M., Fukunaga, N., und Sasaki, S. (1991). Aerobic synthesis of unsaturated fatty acids in a psychrophilic bacterium, *Pseudomonas* sp. strain E-3, having two mechanisms for unsaturated fatty acid synthesis. J Gen Appl Microbiol **37**, 355-362.

Wallis, J.G., und Browse, J. (1999). The Δ^8-desaturase of *Euglena gracilis*: an alternate pathway for synthesis of 20-carbon polyunsaturated fatty acids. Arch Biochem Biophys **365,** 307-316.

Watanabe, K., Ishikaba, C., Yazawa, K., Kondo, K., und Kawaguchi, A. (1996). Fatty acid and lipid composition of an eicosapentaenoic acid-producing marine bacterium. J Mar Biotechnol **4,** 104-112.

Watts, J.L., und Browse, J. (1999). Isolation and characterization of a Δ^5-fatty acid desaturase from *Caenorhabditis elegans*. Arch Biochem Biophys **362,** 175-182.

Weete, J.D., Kim, H., Gandhi, S.R., Wang, Y., und Dute, R. (1997). Lipids and ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. ATCC26185. Lipids, *32*, 839-45.

Wolff, R.L., Christie, W.W., Pedrono, F., und Marpeau, A.M. (1999). Arachidonic, eicosapentaenoic and biosynthetically related fatty acids in the seed lipids from a primitive gymnosperm, *Agathis robusta*. Lipids **34**, 1083-1097.

Wolff, R.L., Pedrono, F., Pasquier, E., und Marpeau, A.M. (2000). General characteristics of *Pinus* spp. seed fatty acid compositions, and importance of Δ5-olefinic acids in the taxonomy and phylogeny of the genus. Lipids **35**, 1-22.

Wongwathanarat, P., Michaelson, L.V., Carter, A.T., Lazarus, C.M., Griffiths, G., Stobart, A.K., Archer, D.B., und MacKenzie, D.A. (1999). Two fatty acid Δ9-desaturase genes, ole1 and ole2, from *Mortierella alpina* complement the yeast ole1 mutation. Microbiology **145**, 2939-2946.

Yadav, N.S., Wierzbicki, A., Aegerter, M., Caster, C.S., Perez-Grau, L., Kinney, A.J., Hitz, W.D., Booth, J.R., JR., Schweiger, B., und Stecca, K.L. (1993). Cloning of higher plant omega-3 fatty acid desaturases. Plant Physiol **103**, 467-476.

Yanish-Perron, C., Vieira, J., und Porath, J. (1989). Improved M13 cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of M13mp18 and pU19 vectors. Gene 33, 103-109.

Yano, Y., Nakayama, A., Saito, H., und Ishihara, K. (1994). Production of docosahexaenoic acid by marine bacteria isolated from deep sea fish. Lipids **29**, 527-528.

Yazawa, K. (1996). Production of eicosapentaenoic acid from marine bacteria. Lipids **31 Suppl,** S297-300.

Yin, F.Q., Chen, Q., und Sprecher, H. (1999). A comparison of the metabolism of [3-^{14}C]-labeled 22- and 24-carbon (n-3) and (n-6) unsaturated fatty acids by rat testes and liver. Biochim Biophys Acta **1438,** 63-72.

Yokochi, T., Honda, D., Higashihara, T., und Nakahara, T. (1998). Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. Appl Microbiol Biotechnol **49**, 72-76.

Yongmanitchai, W., und Ward, O.P. (1993). Positional distribution of fatty acids, and molecular species of polar lipids, in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, J General Microbiology **139**, 465-472.

Yu, R., Yamada, A., Watanabe, K., Yazawa, K., Takeyama, H., Matsunaga, T., und Kurane, R. (2000). Production of eicosapentaenoic acid by a recombinant marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. Lipids **35,** 1061-1064.

Zank, T.K., Zähringer, U., Beckmann, C., Pohnert, G., Boland, W., Holtorf, H., Reski, R., Lerchl, J., und Heinz, E. (2002). Cloning and functional characterisation of an enzyme involved in the elongation of Δ6-polyunsaturated fatty acids from the moss *Physcomitrella patens*. Plant J **31**, 255-268.

Zhang, L., Ge, L., Parimoo, S., Stenn, K., und Prouty, S.M. (1999). Human stearoyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites. Biochem J **340**, 255-264.

Zittelli, G.C., Lavista, F., Bastianini, A., Rodolfi, L., Vincenzini, M., und Tredici, M.R. (1999). Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. J Biotechnology **70**, 299-312.

Anhang

Anhang I: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten cDNA-Klone

Klon: egDES
Organismus: *Euglena gracilis*
Länge des cDNA-Inserts: 2600 bp

Die Sequenzen, die homolog zu den bei den Southern-Analysen verwendeten Sonden sind, wurden dick markiert.

```
AATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTG
ATATCGAATTCGCGGCCGCTAGACATGCCACCAGTTGTGGTATGGTTAACCGAATATGAACAAACACCCGATTCC
AGTCCAAGATTGCTCAATAAGGAACAGGGTGGGGGAGCAACTTGTGAGAGTTTCGACGCCATGGGTGCCTACAGA
TTAAGTAGATCCTTCTTGTCCAACTTGTTGACCTTGCGCTCGGCACATTCTGAGAGCTGGTTTCGCAGCCGGTAG
ATTTCGTCGTTGGCCTGTTGCAACTGGGTCCGCAGCTCGGAGTCGCAAAGATTGTTCGCTGTGAGGATCTCAGCA
CGGATTTCTTCTAATTCAGAAGCCGCAGCACGGAGTTGATTCCCAAGGGTATCAAGGCGGCCATATGCTTGCTCC
AATAATTTCTCAACACGGTCGGGGGTGATGCTCAGCTTAACAGATTCTTCTGGTGGTTTTGGAAGCTCTCCAGCA
GGCTCCACGGGGGGCGCAGGGGGCGCGGCGGGAACCAGTGGAAGAGTTGGCAACGTCGACAGGGGGTACTGTGCT
TGAGGGCCAGGAATCACGGACGGGACTTGCGGAATGTAAGATGGACCAGTAGGAAATGACGGAAATGTTCGAGCA
AATCCGCCAAAACCCGTGTACGCAGGTGCCGGGGGCGTAATTAACAATCGACAGCGGCCGCGAATTCGCGGCCGCT
CACATTCCATTTATGTGTGGATTTGCGGGTCAGAGATCTACCCACGGCCTCTGACTGCTTTGCAGTCGTTCGTGA

TGGTCAATATGTTGGTGCTGTTTGGCAATTTCTATGTCAAGCAATACTCCCAAAAGAACGGCAAGCCGGAGAACG
 M  V  N  M  L  V  L  F  G  N  F  Y  V  K  Q  Y  S  Q  K  N  G  K  P  E  N

GAGCCACCCCTGAGAACGGAGCGAAGCCGCAACCTTGCGAGAACGGCACGGTGGAAAAGCGAGAGAATGACACCG
 G  A  T  P  E  N  G  A  K  P  Q  P  C  E  N  G  T  V  E  K  R  E  N  D  T

CCAACGTTCGGCCCACCCGTCCAGCTGGACCCCCGCCGGCCACGTACTACGACTCCCTGGCAGTGTCGGGGCAGG
 A  N  V  R  P  T  R  P  A  G  P  P  P  A  T  Y  Y  D  S  L  A  V  S  G  Q

GCAAGGAGCGGCTGTTCACCACCGATGAGGTGAGGCGGCACATCCTCCCCACCGATGGCTGGCTGACGTGCCACG
 G  K  E  R  L  F  T  T  D  E  V  R  R  H  I  L  P  T  D  G  W  L  T  C  H

AAGGAGTCTACGATGTCACTGATTTCCTTGCCAAGCACCCTGGTGGCGGTGTCATCACGCTGGGCCTTGGAAGGG
 E  G  V  Y  D  V  T  D  F  L  A  K  H  P  G  G  G  V  I  T  L  G  L  G  R

ACTGCACAATCCTCATCGAGTCATACCACCCTGCTGGGCGCCCGGACAAGGTGATGGAGAAGTACCGCATTGGTA
 D  C  T  I  L  I  E  S  Y  H  P  A  G  R  P  D  K  V  M  E  K  Y  R  I  G

CGCTGCAGGACCCCAAGACGTTCTATGCTTGGGGAGAGTCCGATTTCTACCCTGAGTTGAAGCGCCGGGCCCTTG
 T  L  Q  D  P  K  T  F  Y  A  W  G  E  S  D  F  Y  P  E  L  K  R  R  A  L

CAAGGCTGAAGGAGGCTGGTCAGGCGCGGCGCGGCGGCCTTGGGGTGAAGGCCCTCCTGGTGCTCACCCTCTTCT
 A  R  L  K  E  A  G  Q  A  R  R  G  G  L  G  V  K  A  L  L  V  L  T  L  F

TCGTGTCGTGGTACATGTGGGTGGCCCACAAGTCCTTCCTCTGGGCCGCCGTCTGGGGCTTCGCCGGCTCCCACG
 F  V  S  W  Y  M  W  V  A  H  K  S  F  L  W  A  A  V  W  G  F  A  G  S  H

TCGGGCTGAGCATCCAGCACGATGGCAACCACGGCGCGTTCAGCCGCAACACACTGGTGAACCGCCTGGCGGGGT
 V  G  L  S  I  Q  H  D  G  N  H  G  A  F  S  R  N  T  L  V  N  R  L  A  G

GGGGCATGGACTTGATCGGCGCGTCGTCCACGGTGTGGGAGTACCAGCACGTCATCGGCCACCACCAGTACACCA
 W  G  M  D  L  I  G  A  S  S  T  V  W  E  Y  Q  H  V  I  G  H  H  Q  Y  T

ACCTCGTGTCGGACACGCTATTCAGTCTGCCTGAGAACGATCCGGACGTCTTCTCCAGCTACCCGCTGATGCGCA
```

```
 N  L  V  S  D  T  L  F  S  L  P  E  N  D  P  D  V  F  S  S  Y  P  L  M  R

TGCACCCGGATACGGCGTGGCAGCCGCACCACCGCTTCCAGCACCTGTTCGCGTTCCCACTGTTCGCCCTGATGA
 M  H  P  D  T  A  W  Q  P  H  H  R  F  Q  H  L  F  A  F  P  L  F  A  L  M

CAATCAGCAAGGTGCTGACCAGCGATTTCGCTGTCTGCCTCAGCATGAAGAAGGGGTCCATCGACTGCTCCTCCA
 T  I  S  K  V  L  T  S  D  F  A  V  C  L  S  M  K  K  G  S  I  D  C  S  S

GGCTCGTCCCACTGGAGGGGCAGCTGCTGTTCTGGGGGGCCAAGCTGGCGAACTTCCTGTTGCAGATTGTGTTGC
 R  L  V  P  L  E  G  Q  L  L  F  W  G  A  K  L  A  N  F  L  L  Q  I  V  L

CATGCTACCTCCACGGGACAGCTATGGGCCTGGCCCTCTTCTCTGTTGCTCACCTTGTGTCGGGGGAGTACCTCG
 P  C  Y  L  H  G  T  A  M  G  L  A  L  F  S  V  A  H  L  V  S  G  E  Y  L

CGATCTGCTTCATCATCAACCACATCAGCGAGTCTTGTGAGTTTATGAATACAAGCTTTCAAACCGCCGCCCGGA
 A  I  C  F  I  I  N  H  I  S  E  S  C  E  F  M  N  T  S  F  Q  T  A  A  R

GGACAGAGATGCTTCAGGCAGCACATCAGGCAGCGGAGGCCAAGAAGGTGAAGCCCACCCCTCCACCGAACGATT
 R  T  E  M  L  Q  A  A  H  Q  A  A  E  A  K  K  V  K  P  T  P  P  P  N  D

GGGCTGTGACACAGGTCCAATGCTGCGTGAATTGGAGATCAGGTGGCGTGTTGGCCAATCACCTCTCTGGAGGCT
 W  A  V  T  Q  V  Q  C  C  V  N  W  R  S  G  G  V  L  A  N  H  L  S  G  G

TGAACCACCAGATCGAGCATCATCTGTTCCCCAGCATCTCGCATGCCAACTACCCCACCATCGCCCCTGTTGTGA
 L  N  H  Q  I  E  H  H  L  F  P  S  I  S  H  A  N  Y  P  T  I  A  P  V  V

AGGAGGTGTGCGAGGAGTACGGGTTGCCGTACAAGAATTACGTCACGTTCTGGGATGCAGTCTGTGGCATGGTTC
 K  E  V  C  E  E  Y  G  L  P  Y  K  N  Y  V  T  F  W  D  A  V  C  G  M  V

AGCACCTCCGGTTGATGGGTGCTCCACCGGTGCCAACGAACGGGGACAAAAAGTCATAAGCCACGACATCATTTG
 Q  H  L  R  L  M  G  A  P  P  V  P  T  N  G  D  K  K  S  *

GGGCTCACTCCGTGCAGCCTTTTCTTGGGCTGCCCACGAAGATGCGCGATGAGGCACCTGGTGGTTGCCCTCCGC
CGGCCTCGGAAAACGGTTCGACGCCTGCTCCTTCAGCCCAGAGCACTCCGGCGAAGAGTGAAAGAGCACTGACCT
GAATTTTATGATGACCCATTTAGCGGCCGC
```

Klon: ccDES
Organismus: *Cricosphaera carterae*
Länge des cDNA-Inserts: 1609 bp

Die Vektor-Restriktionsstellen am 5'-Ende der cDNA wurde markiert.

```
CGGGAAGCGCGCCATTGTGTTGGTACCCGGGAATTCGGCCATTATGGCCGGGCGATGGGGCGTCATGTCGGCGAG
                                                                 M  S  A

CGCCGCACTGCTGGCGCAGATGCTGCTTGACCGGCAGTCACGGTGTGAGCAGGACGGTGCGGCCAACACTGATGA
S  A  A  L  L  A  Q  M  L  L  D  R  Q  S  R  C  E  Q  D  G  A  A  N  T  D

GGCACTCACGTGGCGCGAGGATGAGGGGCTGAGCAAGCTCGTGCCGCTGCACCCTTCGCCGCGCTCGGCCGAGGG
E  A  L  T  W  R  E  D  E  G  L  S  K  L  V  P  L  H  P  S  P  R  S  A  E

GCAAAGCAAACTCGCAAGCTACACCATGGCGCAGGTGGCTGCGCGGAACACGAGTTCTGAGCTGTGGGTGGCGAT
G  Q  S  K  L  A  S  Y  T  M  A  Q  V  A  A  R  N  T  S  S  E  L  W  V  A

TGACGGCTACGTGTATGACCTGACACGCTTCGTGCTCAAGCACCCGGGCGGCGCGCTGCCCATCATGAACATGGC
I  D  G  Y  V  Y  D  L  T  R  F  V  L  K  H  P  G  G  A  L  P  I  M  N  M

TGGCAAAGACTGCACAGACGTCTTTGCCAACTACCACCCGGCGCGTGTGTACAAGACCATGCTGCCGGCCTACTT
A  G  K  D  C  T  D  V  F  A  N  Y  H  P  A  R  V  Y  K  T  M  L  P  A  Y
```

```
GATCGGGCAGGTGTCCGACTACCAGCTTTACCCTCACGTGGCCGAGTTTCGCGCCATTCGGCAGGAGCTGCTCCG
L  I  G  Q  V  S  D  Y  Q  L  Y  P  H  V  A  E  F  R  A  I  R  Q  E  L  L

GCGTGGCCTTTTCGAGACAGACCTGCGCTTCTACGCCAAGCTCGGCGCCTTCCTCGCTTTCCTCTTCTGCACGGC
R  R  G  L  F  E  T  D  L  R  F  Y  A  K  L  G  A  F  L  A  F  L  F  C  T

GCTCTGGCTCACGCTGAGCTGTAGCTCGACGGTGGCGCACGCGGCGGGGGCGGCCGTGATGGGCATCTTCTGGCA
A  L  W  L  T  L  S  C  S  S  T  V  A  H  A  A  G  A  A  V  M  G  I  F  W

GCAGCTCGCCGGCGTGGGGCACGATTTGGGCCACAGTGGTGTGTCGCACCGCTTCAAGCTCGACCACCTGGTCGG
Q  Q  L  A  G  V  G  H  D  L  G  H  S  G  V  S  H  R  F  K  L  D  H  L  V

ATCGACCGTGGGTAACGCGCTCATGGGCATCTTTACGGGCTGGTGGAAGCAGAACCACAACACGCACCACGTTGT
G  S  T  V  G  N  A  L  M  G  I  F  T  G  W  W  K  Q  N  H  N  T  H  H  V

GTGCAACTCTGTTGAGAATGACCCCGACATCCAGCACATGCCCATCCTCGCCGTCTCCAACCGCGTCTTCGAGCG
V  C  N  S  V  E  N  D  P  D  I  Q  H  M  P  I  L  A  V  S  N  R  V  F  E

GCCCTACTGGTCGAGCTACTACTCGAAGTGGGTGCAGCTTGATGCGGCCAGCAAGTTCCTCGTCGGCCACCAGCA
R  P  Y  W  S  S  Y  Y  S  K  W  V  Q  L  D  A  A  S  K  F  L  V  G  H  Q

CATCCTCTTCTACCCGCTGATGATGGTCGCGCGCTTCAACCTGTACGCCCAGTCGTGGATCATGGTGCTGTCCAA
H  I  L  F  Y  P  L  M  M  V  A  R  F  N  L  Y  A  Q  S  W  I  M  V  L  S

GCAGCAGATGCACTACCGGAAGACCGAGGCCGCGGCACTGACGCTCTACGCTGCGTGGGTGCTCGCGCTCGCCCT
K  Q  Q  M  H  Y  R  K  T  E  A  A  A  L  T  L  Y  A  A  W  V  L  A  L  A

CTCGCTGCCAACGTGGGGTCAGACAGCCATGTGGCTGCTCGTCTCGCACGCGACCGCTGGTCTCCTCCACGTACA
L  S  L  P  T  W  G  Q  T  A  M  W  L  L  V  S  H  A  T  A  G  L  L  H  V

AATCGTCATCTCACACTGGGCCATGGAGACGTACCACGGCCACGCGTACAATGACGAGACGGACGAGTGGTTCAT
Q  I  V  I  S  H  W  A  M  E  T  Y  H  G  H  A  Y  N  D  E  T  D  E  W  F

CACGCAGCTCAAGACGACGATGAACGTTGCTACTCCGCCGCTGCTCGACTGGGTGCACATCGGGCTGCAGTTCCA
I  T  Q  L  K  T  T  M  N  V  A  T  P  P  L  L  D  W  V  H  I  G  L  Q  F

GATCGAGCACCACCTCTTCCCGCGGCTGCCACGGCACAACCTGCGCAAGGCGCGCGAGCTCGTGCGGCCGCTTTG
Q  I  E  H  H  L  F  P  R  L  P  R  H  N  L  R  K  A  R  E  L  V  R  P  L

CGCCAAGCACGGGATACACTACCACGAGCCGAGCTTCTGGCAGGCCAACGTCGAGACGCTGCGCGCGCTCCGCTC
C  A  K  H  G  I  H  Y  H  E  P  S  F  W  Q  A  N  V  E  T  L  R  A  L  R

CACCGCCTTTGCCGCGCGGGAATCGGGTCATCCGATTTGTCGAATGGTAAGAGTTTTTTGAGCAGAAAAAAAAAA
S  T  A  F  A  A  R  E  S  G  H  P  I  C  R  M  V  R  V  F  *

AAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Klon: TC049
Organismus: *Thraustochytrium* sp.
Länge des cDNA-Inserts: 1874 bp

```
TACGCCAAGCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGA
ACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGCTCGTGCCGAATTCGGCACGAGCCCAACTTCGCAAAC
TGCAAACGCGAACTAGCACACAAGAACCTGTTGATTGAGCAGCATCGTCTAAATCTTCAAGACCATGTGCAAGGT
                                                                M  C  K

GGAGCCCACGCGTCACGAGCAGACGGCTACGGCCAAGCCTGAGGCACTTGCGCCGGCGGAGCCGCAAGAGCAACA
V  E  P  T  R  H  E  Q  T  A  T  A  K  P  E  A  L  A  P  A  E  P  Q  E  Q
```

```
GCAGCAGCCCATCATCCATGGCAAGCACAACCCGGACCTGCCGACGCTCGGCGAGATTCGTGCTGTGGTACCAAA
Q  Q  Q  P  I  I  H  G  K  H  N  P  D  L  P  T  L  G  E  I  R  A  V  V  P

GCACTGCTTTGAGCGCTCGCTCGTGACGAGCTCGCTATACCTGGGCCGCGACCTCGTCATGGCGGCCTGCCTCCT
K  H  C  F  E  R  S  L  V  T  S  S  L  Y  L  G  R  D  L  V  M  A  A  C  L

CTTCCTCGCCAGGCAGTACCTTCCCGTCTATGATATGGGCCTCTCAGGCGCGCTCGGCTGGACTGCCTATGTCAT
L  F  L  A  R  Q  Y  L  P  V  Y  D  M  G  L  S  G  A  L  G  W  T  A  Y  V

TGTGCAGGGCACCGTCTGTGCCGGCCTTTGGGTGCTCGGGCATGAGTGCGGCCACCAGGCCTTTTCGAACTACAG
I  V  Q  G  T  V  C  A  G  L  W  V  L  G  H  E  C  G  H  Q  A  F  S  N  Y

GATCGTCAACGACGGCGTCGGCTATCTGGTCCACACGAGCCTGCTGGTGCCTTACTTTAGCTGGGCGTACACGCA
R  I  V  N  D  G  V  G  Y  L  V  H  T  S  L  L  V  P  Y  F  S  W  A  Y  T

CGGCCTGCACCACGCCCGCGTCAACCACATGCTCGACGGCGAGTCGCACACGCCGAACCTGCAGAAAAAGGTGGC
H  G  L  H  H  A  R  V  N  H  M  L  D  G  E  S  H  T  P  N  L  Q  K  K  V

CGCCAGCTTTCAGAAGTTCTGCGACATGATGGGCGATGAGGCGTTTGCCGTTCTTCACGTCTTCATCTACCTTCT
A  A  S  F  Q  K  F  C  D  M  M  G  D  E  A  F  A  V  L  H  V  F  I  Y  L

CTTGGCCTGGCCGCTCTACATCATCAACGGGAGCGGCGCGTCGAAGCGCAACCACGAGGGCAAGCGGTGGTCGAA
L  L  A  W  P  L  Y  I  I  N  G  S  G  A  S  K  R  N  H  E  G  K  R  W  S

GGATTTCTGGAAGCGCCCCAACCACTTTATGCCCACCTCGGAGCTCTTCCCGGACAAGATGCGCGTCAAGGCCGC
K  D  F  W  K  R  P  N  H  F  M  P  T  S  E  L  F  P  D  K  M  R  V  K  A

CATCTCCACGATCGGCGTCCTGACCGTCATTGCCGGCCTCTGCTACTGGGGCGCTGTCGAGGGCGGACGCACCGT
A  I  S  T  I  G  V  L  T  V  I  A  G  L  C  Y  W  G  A  V  E  G  G  R  T

GCTGCTCCAGTACTTTCTGCCCTACCTCGTGGTCAACGCCTACCTCATTGGGTTTACCTGGATGCAGCACACGCA
V  L  L  Q  Y  F  L  P  Y  L  V  V  N  A  Y  L  I  G  F  T  W  M  Q  H  T

CCCGGACGTCCCGCATCTCGGCGAGGACGAGTGGTCCTGGGTCGCGGGCACTGTGCTCACCGTCGACCGCCCGTA
H  P  D  V  P  H  L  G  E  D  E  W  S  W  V  A  G  T  V  L  T  V  D  R  P

CCCGCCCTTTATCGACGTCCTGACCCACCGCATCGGGTCCACGCACGTGGCGCACCACCTCTTCTCCAAGATGCC
Y  P  P  F  I  D  V  L  T  H  R  I  G  S  T  H  V  A  H  H  L  F  S  K  M

GTGGTACCATGCGCGCGAGGCGACGACCCACATCCGGGCCCTCCTCGAGCCCAAGGGCGTCTACAACTACGACCC
P  W  Y  H  A  R  E  A  T  T  H  I  R  A  L  L  E  P  K  G  V  Y  N  Y  D

GATGCCCTTTTACAAGGCCTTGTTCCACACGGCCAAGCACTGCCACTACATGGAGGGCGTTGAAGGCATCCAGTT
P  M  P  F  Y  K  A  L  F  H  T  A  K  H  C  H  Y  M  E  G  V  E  G  I  Q

CTTCAAGCACGCCACCGCCCAGCCCAAGGCCAAGACGCTCTAATGTCGTTCTCTGGCTCGCGCGTCTCGCATGTA
F  F  K  H  A  T  A  Q  P  K  A  K  T  L  *

AATCTAAATCTCATGTTGTCTCACTTTCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Anhang II: Klonierungen in pYES2

Konstrukt	Restriktionsenzyme	Forward-Primer	Reverse-Primer
pYES2-egDES4-1	*Kpn*I-*Xho*I	EGD4F1	EGD4R1
pYES2-egDES4	*Kpn*I-*Xho*I	EGD4F2	EGD4R1
pYES2-egDES4del	*Kpn*I-*Xho*I	EGD4F5	EGD4R1
pYES2-egD8D4	*blunt end*-Klonierung in *Ecl*136	EGD8CYTF EGD8F	EGD8CYTR EGD4R1
pYES2-CCA1	*Hin*dIII-*Kpn*I	CCADESF1	CCADESR1
pYES2-CCA2	*Hin*dIII-*Kpn*I	CCADESF2	CCADESR1
pYES2-CCA3	*Hin*dIII-*Kpn*I	CCADESF3	CCADESR1
pYES249	*Bam*HI-*Not*I	TC049F	TC049R

Anhang III: Primer-Sequenzen

Der Buchstabe 'F' im Namen des Primers bezeichnet *Sense*-Primer, 'R' bezeichnet *Antisense*-Primer.

A) Primer, die für Klonierungen in pYES2 verwendet wurden:
Die zur Matrize komplementären Sequenzen wurden unterstrichen.

Primer	Sequenz (5'-3')	Matrize
EGD4F1	CCCGGGTACCACATAATGGTCAATATGTTGGTGCTG	egDES
EGD4F2	CCCGGGTACCACATAATGTTGGTGCTGTTTGGCAAT	egDES
EGD4F5	CCCGGGTACCATGGGGCAGGGCAAGGAGCGG	egDES
EGD4R1	CCCGCTCGAGTTATGACTTTTTGTCCCCGTT	egDES
CCADESF1	CCCAAGCTTACATAATGTCGGCGAGCGCCGCAC	ccDES
CCADESF2	CCCAAGCTTACATAATGCTGCTTGACCGGCAGTC	ccDES
CCADESF3	CCCAAGCTTACATAATGGCGCAGGTGGCTGCGC	ccDES
CCADESR1	GCCGGTACCTCAAAAAACTCTTACCATTCGACAAATCGG	ccDES
D8D4CYTF	CCACATAATGAAGTCAAAGCGCCAAGCGCTA	egDES8*
D8D4F	TATTTCATTGGGGCAGTGTTGCTTGGGTTCGCCGGCTCCCACGTCGG	egDES
D8D4CYTR	GCTCAGCCCGACGTGGGAGCCGGCGAACCCAAGCAACACTGCCCCAATGA	egDES8*
TC049F	GGATCCACATAATGTGCAAGGTGGAGCCCACG	TC049
TC049R	GCGGCCGCGGTTAGAGCGTCTTGGCCTTGGG	TC049

*cDNA-Klon der Δ8-Desaturase aus *E. gracilis*

B) Primer, die bei der Synthese von DNA-Sonden verwendet wurden:

EG015SONDEF1	CCACCAGATCGAGCATCATCTGTTC
EG015SONDER1	CACTCTTCGCCGGAGTGCTCTGG
EG015SONDEF2	TACGATGTCACTGATTTCCTTGCC
EG015SONDER2	AACGCGCCGTGGTTGCCATCG

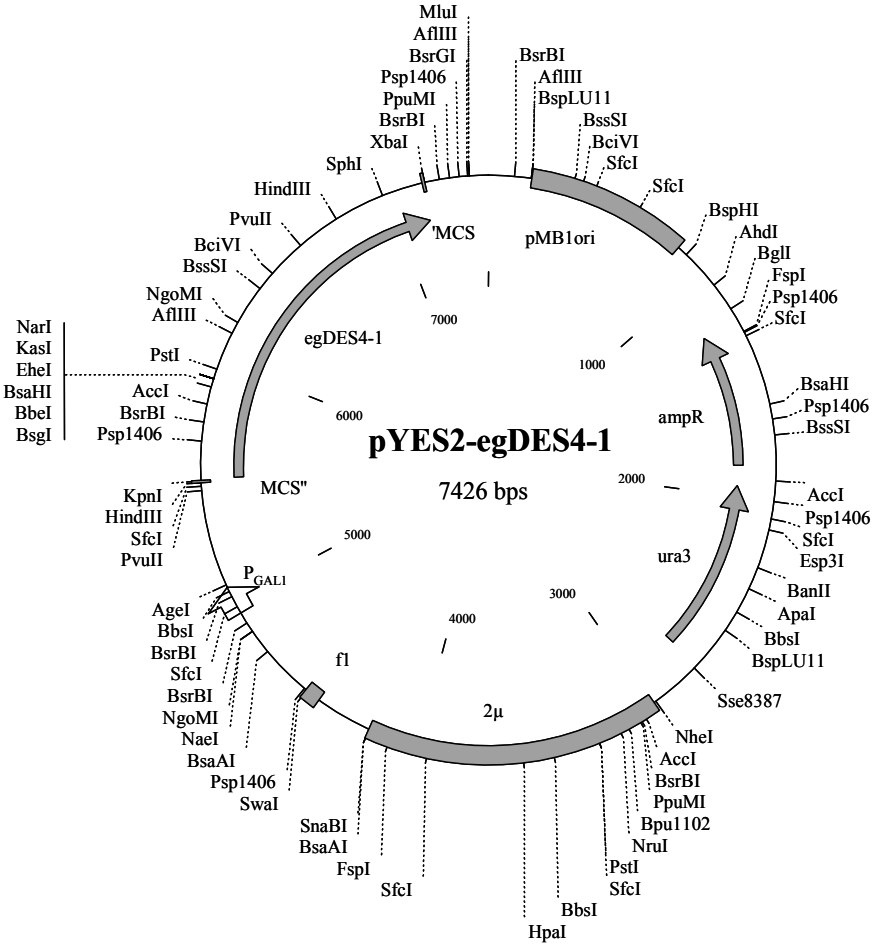
C) Degenerierte Primer, mit denen ein Desaturase-Sequenzfragment auf cDNA von *C. carterae* amplifiziertwurde:

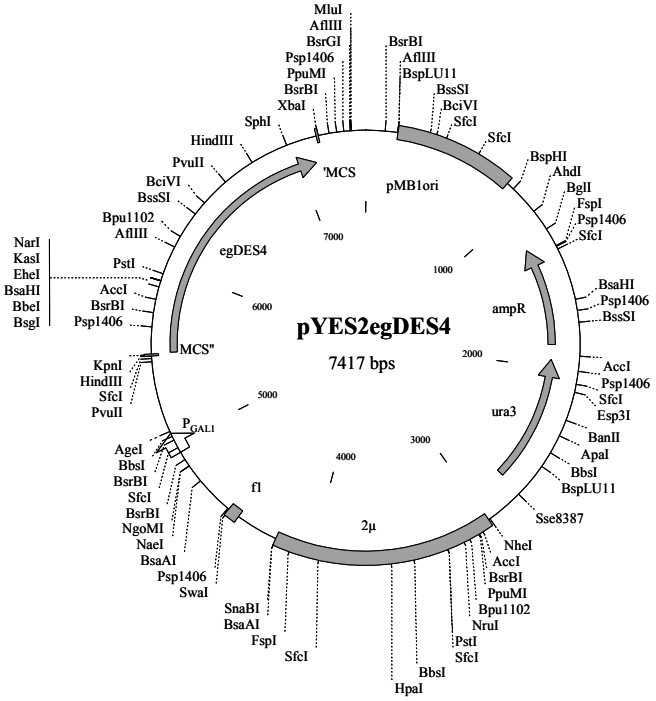
D5F	TGGTGGAARTGGAMICAYAA
SCH2 (*antisense*)	AANARRTGRTGYTCDATYTG

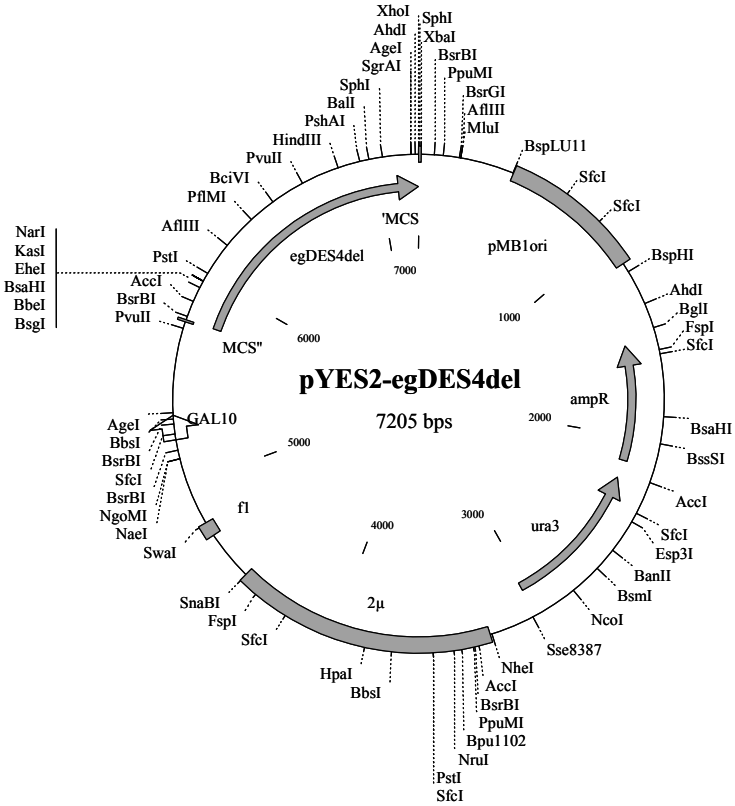
R: G + A, M: C + A, Y: T + C, D: T +G +A, N: A +T +C + G

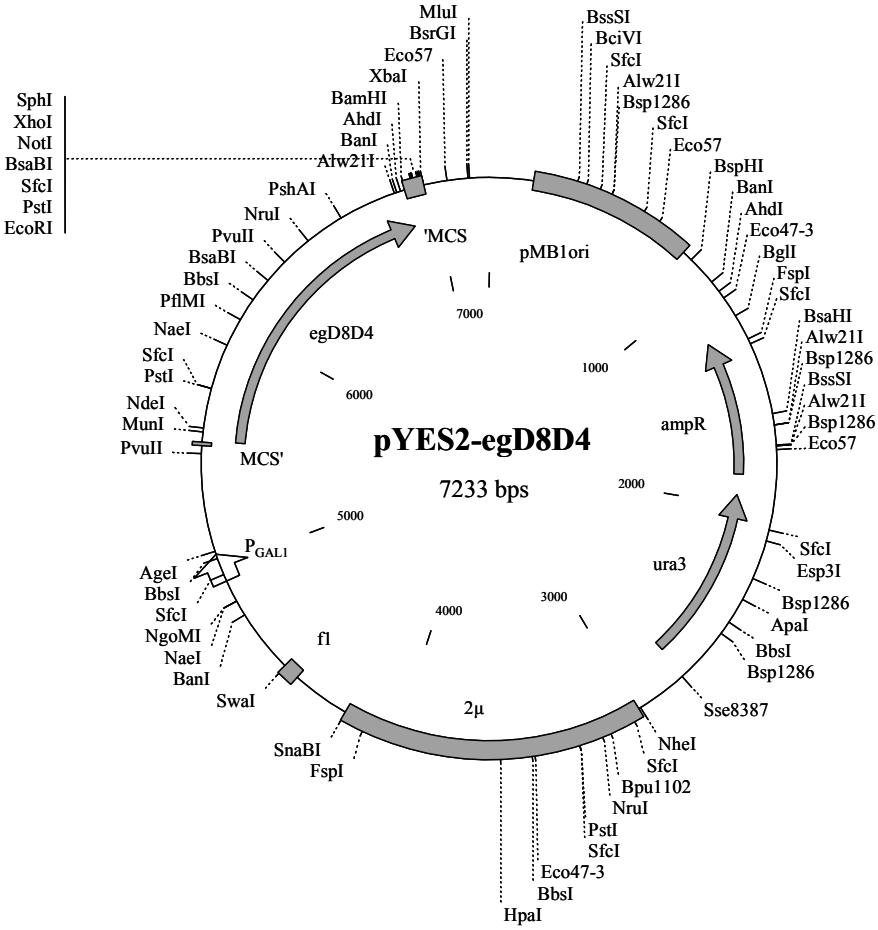
Anhang IV: Konstrukte, die im Rahmen dieser Doktorarbeit zur Expression der isolierten cDNA-Klone in *S. cerevisiae* hergestellt wurden.

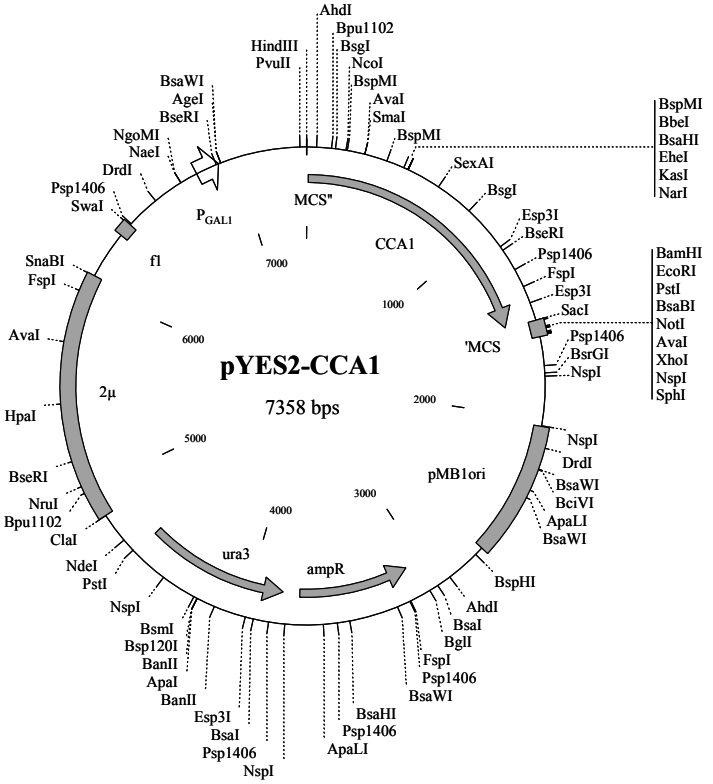
Als Vektor wurde ausschließlich pYES2 verwendet. MCS: Multiple Klonierungsstelle, ampR: β-Lactamasegen, f1: Replikationsursprung (f1 Phage), 2µ: Replikationsursprung (Hefe), ura3: URA3-Gen, P_{GAL1}: Promotor, pMB1ori: Replikationsursprung (*E. coli*)

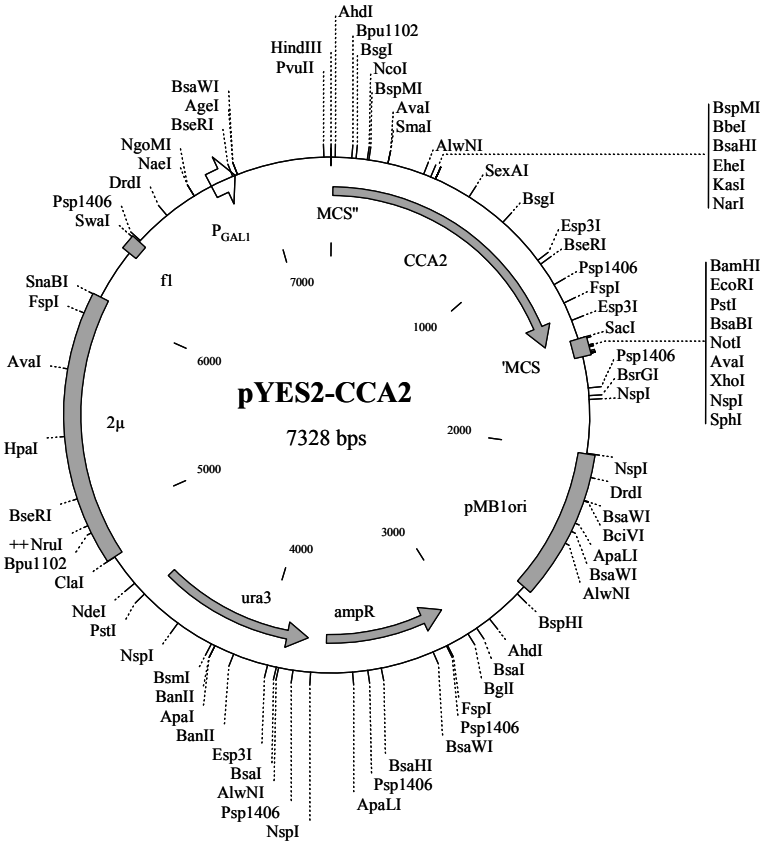


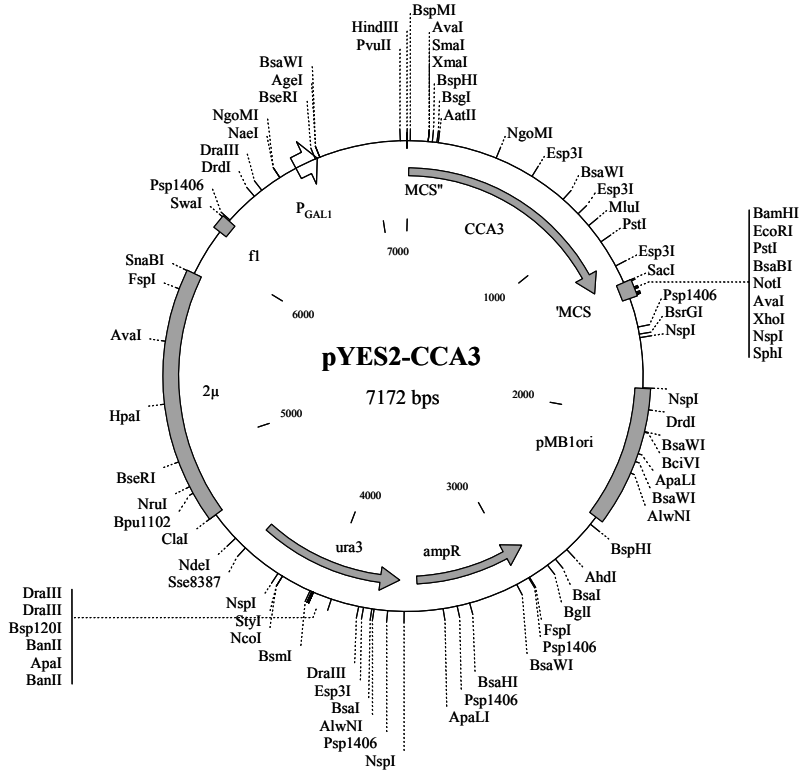

pYES2egDES4
7417 bps
pMB1ori
'MCS
egDES4
MCS"
ampR
ura3
f1
2μ
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
MluI
AflIII
BsrGI
Psp1406
PpuMI
BsrBI
XbaI
SphI
HindIII
PvuII
BciVI
BssSI
Bpu1102
AflIII
NarI
KasI
EheI
BsaHI
BbeI
BsgI
PstI
AccI
BsrBI
Psp1406
KpnI
HindIII
SfcI
PvuII
PGAL1
AgeI
BbsI
BsrBI
SfcI
BsrBI
NgoMI
NaeI
BsaAI
Psp1406
SwaI
SnaBI
BsaAI
FspI
SfcI
HpaI
BbsI
PstI
SfcI
NruI
Bpu1102
PpuMI
BsrBI
AccI
NheI
Sse8387
BspLU11
BbsI
ApaI
BanII
Esp3I
SfcI
Psp1406
AccI
BsaHI
BssSI
Psp1406
BsaHI
SfcI
Psp1406
FspI
BglI
AhdI
BspHI
SfcI
SfcI
BspLU11
BssSI
BciVI
SfcI
BsrBI
AflIII
BspLU11

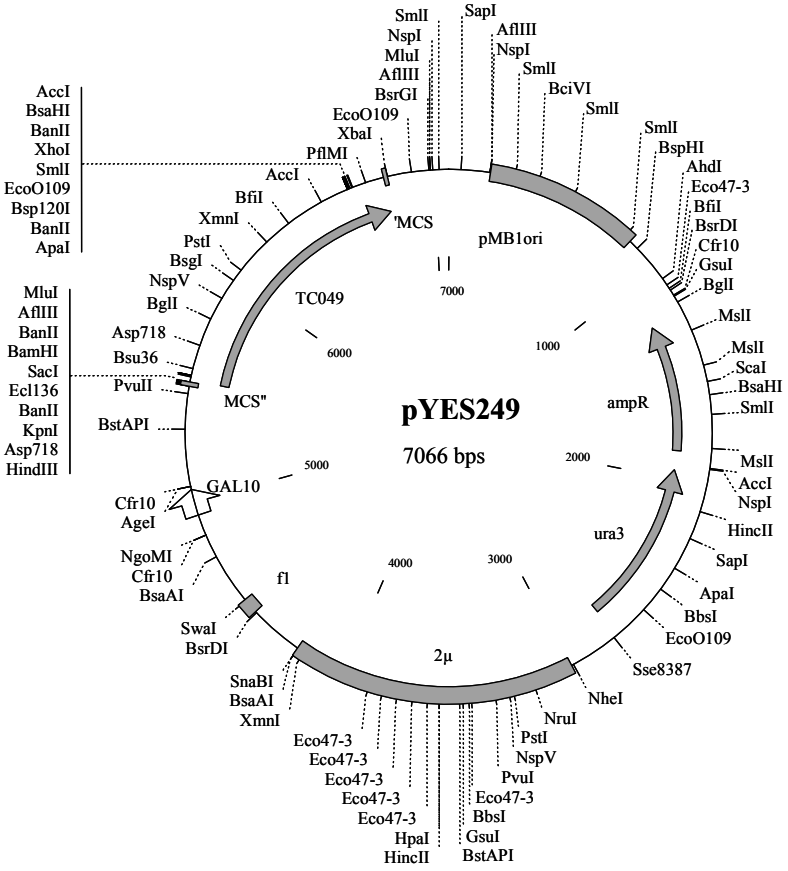

pYES2-egDES4del
7205 bps
pMB1ori
'MCS
egDES4del
MCS"
ampR
ura3
f1
2μ
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
XhoI
AhdI
AgeI
SgrAI
SphI
BalI
PshAI
HindIII
PvuII
BciVI
PflMI
AflIII
NarI
KasI
EheI
BsaHI
BbeI
BsgI
PstI
AccI
BsrBI
PvuII
GAL10
AgeI
BbsI
BsrBI
SfcI
BsrBI
NgoMI
NaeI
SwaI
SnaBI
FspI
SfcI
HpaI
BbsI
PstI
SfcI
NruI
Bpu1102
PpuMI
BsrBI
AccI
NheI
Sse8387
NcoI
BsmI
BanII
Esp3I
SfcI
AccI
BssSI
BsaHI
SfcI
FspI
BglI
AhdI
BspHI
SfcI
SfcI
BspLU11
SfcI
BsrBI
PpuMI
BsrGI
AflIII
MluI
SphI
XbaI
BsrBI
PpuMI
BsrGI
AflIII
BspLU11


pYES2-egD8D4
7233 bps
MluI
BsrGI
Eco57
XbaI
BamHI
AhdI
BanI
Alw21I
SphI
XhoI
NotI
BsaBI
SfcI
PstI
EcoRI
PshAI
NruI
PvuII
BsaBI
BbsI
PflMI
NaeI
SfcI
PstI
NdeI
MunI
PvuII
'MCS
MCS'
egD8D4
pMB1ori
ampR
ura3
2µ
f1
P GAL1
BssSI
BciVI
SfcI
Alw21I
Bsp1286
SfcI
Eco57
BspHI
BanI
AhdI
Eco47-3
BglI
FspI
SfcI
BsaHI
Alw21I
Bsp1286
BssSI
Alw21I
Bsp1286
Eco57
SfcI
Esp3I
Bsp1286
ApaI
BbsI
Bsp1286
Sse8387
NheI
SfcI
Bpu1102
NruI
PstI
SfcI
Eco47-3
BbsI
HpaI
SnaBI
FspI
SwaI
AgeI
BbsI
SfcI
NgoMI
NaeI
BanI
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000


pYES2-CCA1
7358 bps
MCS"
CCA1
'MCS
P GAL1
f1
2µ
pMB1ori
ampR
ura3
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
AhdI
Bpu1102
HindIII
PvuII
BsgI
NcoI
BspMI
AvaI
SmaI
BsaWI
AgeI
BseRI
NgoMI
NaeI
DrdI
Psp1406
SwaI
SnaBI
FspI
AvaI
HpaI
BseRI
NruI
Bpu1102
ClaI
NdeI
PstI
NspI
BsmI
Bsp120I
BanII
ApaI
BanII
Esp3I
BsaI
Psp1406
NspI
BsaHI
Psp1406
ApaLI
BspHI
AhdI
BsaI
BglI
FspI
Psp1406
BsaWI
NspI
DrdI
BsaWI
BciVI
ApaLI
BsaWI
BspMI
BbeI
BsaHI
EheI
KasI
NarI
SexAI
BsgI
Esp3I
BseRI
Psp1406
FspI
Esp3I
SacI
Psp1406
BsrGI
NspI
BamHI
EcoRI
PstI
BsaBI
NotI
AvaI
XhoI
NspI
SphI


pYES2-CCA2
7328 bps
MCS"
CCA2
'MCS
P GAL1
f1
2µ
pMB1ori
ampR
ura3
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
AhdI
Bpu1102
HindIII
PvuII
BsgI
NcoI
BspMI
AvaI
SmaI
BsaWI
AgeI
BseRI
NgoMI
NaeI
DrdI
Psp1406
SwaI
SnaBI
FspI
AvaI
HpaI
BseRI
++NruI
Bpu1102
ClaI
NdeI
PstI
NspI
BsmI
BanII
ApaI
BanII
Esp3I
BsaI
AlwNI
Psp1406
NspI
BsaHI
Psp1406
ApaLI
BspHI
AhdI
BsaI
BglI
FspI
Psp1406
BsaWI
NspI
DrdI
BsaWI
BciVI
ApaLI
BsaWI
AlwNI
BspMI
BbeI
BsaHI
EheI
KasI
NarI
AlwNI
SexAI
BsgI
Esp3I
BseRI
Psp1406
FspI
Esp3I
SacI
Psp1406
BsrGI
NspI
BamHI
EcoRI
PstI
BsaBI
NotI
AvaI
XhoI
NspI
SphI


pYES2-CCA3
7172 bps
BspMI
HindIII
PvuII
AvaI
SmaI
XmaI
BspHI
BsgI
AatII
BsaWI
AgeI
BseRI
NgoMI
NaeI
DraIII
DrdI
Psp1406
SwaI
NgoMI
Esp3I
BsaWI
Esp3I
MluI
PstI
Esp3I
SacI
Psp1406
BsrGI
NspI
BamHI
EcoRI
PstI
BsaBI
NotI
AvaI
XhoI
NspI
SphI
P GAL1
MCS"
CCA3
'MCS
f1
SnaBI
FspI
AvaI
HpaI
BseRI
NruI
Bpu1102
ClaI
NdeI
Sse8387
2µ
pMB1ori
ura3
ampR
NspI
DrdI
BsaWI
BciVI
ApaLI
BsaWI
AlwNI
BspHI
AhdI
BsaI
BglI
FspI
Psp1406
BsaWI
BsaHI
Psp1406
ApaLI
DraIII
DraIII
Bsp120I
BanII
ApaI
BanII
NspI
StyI
NcoI
BsmI
DraIII
Esp3I
BsaI
AlwNI
Psp1406
NspI
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000


pYES249
7066 bps
SmlI
SapI
NspI
MluI
AflIII
BsrGI
AflIII
NspI
SmlI
BciVI
SmlI
SmlI
BspHI
AhdI
Eco47-3
BfiI
BsrDI
Cfr10
GsuI
BglI
MslI
MslI
ScaI
BsaHI
SmlI
MslI
AccI
NspI
HincII
SapI
ApaI
BbsI
EcoO109
Sse8387
NheI
NruI
PstI
NspV
PvuI
Eco47-3
BbsI
GsuI
BstAPI
AccI
BsaHI
BanII
XhoI
SmlI
EcoO109
Bsp120I
BanII
ApaI
EcoO109
XbaI
PflMI
AccI
BfiI
XmnI
PstI
BsgI
NspV
BglI
Asp718
Bsu36
PvuII
BstAPI
MluI
AflIII
BanII
BamHI
SacI
Ecl136
BanII
KpnI
Asp718
HindIII
'MCS
pMB1ori
TC049
MCS"
ampR
GAL10
ura3
f1
2µ
Cfr10
AgeI
NgoMI
Cfr10
BsaAI
SwaI
BsrDI
SnaBI
BsaAI
XmnI
Eco47-3
Eco47-3
Eco47-3
Eco47-3
Eco47-3
HpaI
HincII
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Februar 1999 bis März 2003 in der physiologischen Abteilung des Instituts für Allgemeine Botanik und Botanischer Garten der Universität Hamburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Ernst Heinz durchgeführt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ernst Heinz für die interessante Themenstellung, für sein reges Interesse an der Arbeit, sowie seine intensive Betreuung und seine anregende Diskussionsbereitschaft, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Herrn Dr. Jens Lerchl und Frau Dr. Petra Cirpus von der BASF Plant Science GmbH danke ich für die sehr gute Kooperation und die Hilfsbereitschaft während dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Ivo Feussner danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Zähringer bedanke ich mich für die Analysen der Fettsäuren durch GC-MS.

Herrn Prof. Dr. Wilhelm Boland danke ich für die Synthese und Bereitstellung einer Fettsäure für die Expressionsexperimente.

Herrn Dr. Rainer Schlecker von der BASF AG danke ich für die Synthese und Bereitstellung der radiomarkierten Fettsäuren.

Bei Frau Claudia Ott möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bei den α-Oxidationen und den HPLC-Analysen bedanken.

Darüber hinaus danke ich allen Labormitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Heinz für die angenehme Laboratmosphäre in den letzten Jahren sowie für die Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Besonderer Dank gilt Dr. Thorsten Zank, Dr. Hjördis Drexler, Patricia Spiekermann und Dr. Frédéric Domergue für anregende Diskussionen, aufmunternde Worte und für ihre Hilfsbereitschaft. Herrn Dr. Dirk Warnecke und Herrn Dr. Amine Abbadi danke ich für die interessanten Diskussionen während des Verfassens dieser Dissertation.