

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 ω 3- und ω 6-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 Δ 4-Desaturase für die Synthese von Docosahexaensäure (DHA) verwenden. Dieses Enzym katalysiert den letzten Schritt der DHA-Synthese über den ω 3-Weg. Die Klonierung des zugehörigen Gens stand zu Beginn dieser Arbeit noch aus. Zum Nachweis einer Δ 4-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 $^{\Delta 7,10,13,16,19}$) 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 Δ 4-Desaturase in *Thraustochytrium* sp. und *E. gracilis*.

E. gracilis desaturierte auch Docosatetraensäure (^{14}C -22:4 $^{\Delta 7,10,13,16}$) an der Δ 4-Position, während in *Thraustochytrium* sp. dieses Substrat in der Δ 4- und der ω 3-Position desaturiert wurde. Dies ist der erste direkte Hinweis auf die Existenz einer ω 3-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 $\Delta 6$ -Desaturasegenen und $\Delta 8$ -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 $\Delta 6$ -Desaturase- bzw. $\Delta 8$ -Sphingolipid-Desaturaseaktivität nachgewiesen werden. Aus der Sequenzierung einer *Thraustochytrium* sp.-cDNA-Bank ergab sich ein Desaturase-Klon mit Ähnlichkeiten zu mikrosomalen $\Delta 12$ -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 $\Delta 4$ -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 $\Delta 4$ -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 $\Delta 7$ -Doppelbindung und mit strikter $\Delta 4$ -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 $\Delta 4$ -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 $\Delta 4$ -Desaturase von *E. gracilis* führte zum Verlust der Aktivität. Auch ein Austausch der Cytochrom b5-Domäne der $\Delta 4$ -Desaturase gegen die Cytochrom b5-Domäne der $\Delta 8$ -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 $\Delta 4$ -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.