

**Identifizierung, Klonierung und funktionale
Charakterisierung
neuartiger Fettsäure-Elongationsenzyme**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Thorsten Klaus Zank

Hamburg

Hamburg, Januar 2002

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. E. Heinz

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Priv.-Doz. Dr. I. Feussner

Tag der Disputation: 15. Februar 2002

Hamburg, den 01. Februar 2002



Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Für Indré

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
a	Dreifachbindungen in Acetylenfettsäuren
A. dest.	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
Ac	Transposon <i>Activator</i>
ACP	Acyl-Carrier-Protein
amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CDP	Cytidindiphosphat
cer	<i>eceriferum</i> (<i>Arabidopsis</i> -Mutante)
cis	auf der gleichen Seite einer Bezugsebene
CoA	Coenzym A
DAG	Diacylglycerin
ddNTP	2',3'-Didesoxynucleosidtriphosphat
Des	Desaturase
DGD	Digalactosyldiacylglycerin
DMOX	Dimethoxyoxazolin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosidtriphosphat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EST	<i>engl. expressed sequence tag</i>
FAD	<i>eng. fatty acid desaturase</i> (Fettsäure-Desaturase)
FAE	<i>engl. fatty acid elongase</i> (Fettsäure-Elongase)
G	Guanin
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G3P	Glycerin-3-phosphat
gl	<i>glossy</i> (Mais-Mutante)
IPC	Inositolphosphorylceramid
k	Kilo-
KAS	β -Ketoacyl-ACP-Synthase
kb	Kilobasenpaare
KCS	β -Ketoacyl-CoA-Synthase
kDa	Kilodalton
LCB	<i>engl. long-chain base</i> (langkettige Sphingobase)
LPA	Lysophosphatidsäure
MCS	<i>engl. multiple cloning site</i>
M(IP) ₂ C	Mannosyl-Diinositolphosphorylceramid
MGD	Monogalactosyldiacylglycerin
MIPC	Mannosyl-Inositolphosphorylceramid
NADH	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NADPH	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduziert)
NPTII	Neomycin-Phosphotransferase
OD	optische Dichte
PA	Phosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>engl. polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phosphatidylethanolamin, Petrolether
PEG	Polyethylenglycol
pfu	<i>engl. plaque forming units</i>
PG	Phosphatidylglycerin
PI	Phosphatidylinositol
POE1	Palmitölsäure-spezifische Elongase
PS	Phosphatidylserin
PSE1	PUFA-spezifische Elongase

PUFA	<i>engl. polyunsaturated fatty acid</i> (mehrfach ungesättigte Fettsäure)
rpm	<i>engl. revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
<i>sn</i>	stereospezifische Numerierung
SQD	Sulfochinovosyldiacylglycerin
T	Thymin
TAG	Triacylglycerin
U	<i>engl. unit</i> (Einheit für Enzymaktivität)
ü. N.	über Nacht
v/v	Volumen per Volumen
VLCFA	<i>engl. very-long-chain fatty acid</i> (sehr langkettige Fettsäure)
VLC-PUFA	<i>engl. very-long-chain polyunsaturated fatty acid</i> (sehr langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäure)
w/v	Gewicht per Volumen
WT	Wildtyp

Aminosäuren

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

Fettsäuren

Fettsäuren werden im Text auch in Zahlenform abgekürzt. So steht z. B. 18:3^{Δ6,9,12} für γ-Linolensäure. Dabei wird die Anzahl der Kohlenstoffatome in der Fettsäure durch die Zahl vor dem Doppelpunkt und die Anzahl der Doppelbindungen durch die Zahl nach dem Doppelpunkt angegeben. Die Position der Doppelbindungen wird durch die hochgestellten Zahlen wiedergegeben. Erfolgt die Bestimmung der Lage vom Carboxylende aus, so steht ein Δ vor den Zahlen. Erfolgt die Bestimmung vom Methylende aus, so ist dies durch ein ω gekennzeichnet.

Abkürzungen von Genen und deren Produkte

Gene aus allen Organismen werden in dieser Arbeit mit kursiven Großbuchstaben bezeichnet. Handelt es sich um ein Genprodukt, so sind die Buchstaben aufrecht und nur der erste Buchstabe ist ein Großbuchstabe. Mutierte Gene werden klein und kursiv geschrieben.

Beispiel: Gen: *PSE1*

Genprodukt: Pse1

mutiertes Gen: *pse1*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Strukturen, Vorkommen und Funktionen von sehr langkettigen Fettsäuren in verschiedenen Organismenreichen.....	2
1.1.1	Strukturen von sehr langkettigen Fettsäuren.....	2
1.1.2	Prokaryote.....	3
1.1.3	Algen und algenähnliche Pilze.....	4
1.1.4	Hefen	6
1.1.5	Pflanzen	11
1.1.6	Tiere und Menschen.....	16
1.2	Biosynthese von sehr langkettigen Fettsäuren.....	19
1.2.1	Biosynthese von Fettsäuren	19
1.2.2	Elongation von Fettsäuren	22
1.3	Biosynthese von VLC-PUFAs	31
1.3.1	Biosynthese von VLC-PUFAs in Eukaryoten.....	32
1.3.2	Biosynthese von VLC-PUFAs in Prokaryoten	36
1.4	Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit.....	40
2	Material und Methoden	43
2.1	Geräte, Verbrauchsmaterial, Enzyme und Chemikalien.....	43
2.1.1	Geräte.....	43
2.1.2	Laborchemikalien und Verbrauchsmaterial	44
2.2	Vektoren	44
2.3	Organismen	44
2.3.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	44
2.3.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	44
2.3.3	<i>Physcomitrella patens</i>	45
2.4	Kultur von <i>Escherichia coli</i>	45
2.5	Herstellung kompetenter Zellen	46
2.6	Transformation.....	46
2.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	47
2.7.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	47
2.7.2	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA.....	47
2.8	Reinigung, Fällung und Konzentrationsbestimmung von DNA und Oligonucleotiden	48
2.9	Polymerase-Kettenreaktion	48
2.9.1	<i>Taq</i> -Polymerase	49
2.9.2	<i>Pfu</i> -Polymerase.....	49
2.10	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Molekülen.....	51
2.11	Elution von DNA aus Agarose-Gelen und Aufreinigung von PCR-Fragmenten	52
2.12	Klonierungsmethoden	52
2.12.1	Restriktion.....	52
2.12.2	Aufbereitung der Vektoren	52
2.12.3	Ligation.....	53
2.13	Nichtradioaktive Sequenzierung	53
2.14	Computer-gestützte Sequenzauswertung.....	54
2.15	Strategien zur Klonierung rekombinanter Plasmide.....	54
2.15.1	Konstrukte zur Expression in <i>S. cerevisiae</i>	54
2.15.2	Konstrukte zur Zerstörung des <i>ppKCSI</i> -Gens und des <i>ppPSEI</i> -Gens in <i>P. patens</i>	56
2.16	Kultur von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
2.17	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	58
2.18	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	58
2.19	Heterologe Expression in <i>S. cerevisiae</i>	59

2.20	Kultur von <i>Physcomitrella patens</i> und Fettsäurefütterungen	60
2.21	Isolierung genomischer DNA aus <i>Physcomitrella patens</i>	61
2.22	Hybridisierungen mit DIG-markierten Sonden	62
2.23	Nichtradioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	62
2.24	Southern Blot	63
2.24.1	Restriktion.....	63
2.24.2	DNA-Transfer auf Nylonmembranen	63
2.24.3	Hybridisierung	64
2.24.4	Detektion.....	64
2.25	Isolierung von cDNA-Klonen aus cDNA-Banken	65
2.25.1	Anzucht und Vorbereitung der Bakterien	66
2.25.2	Titerbestimmung der cDNA-Bank	66
2.25.3	Plattieren der cDNA-Bank	67
2.25.4	Plaque-Transfer auf Nylon-Membranen	67
2.25.5	Plaque-Hybridisierung	68
2.25.6	Detektion.....	68
2.25.7	<i>in vivo</i> -Excision	69
2.26	Lipidanalytik	69
2.26.1	Isolierung von Fettsäuren.....	69
2.26.2	Trennung von Fettsäure-Methylestern über HPLC	71
2.26.3	Darstellung und GLC-Analyse von Fettsäuremethylestern.....	72

3 Ergebnisse und Diskussion 73

3.1	Identifizierung von cDNA-Klonen, die für putative Fettsäure-Elongationsenzyme kodieren	73
3.2	KCS-ähnliche Klone	75
3.2.1	Sequenzanalyse der KCS-ähnlichen cDNA-Klone	75
3.3	Versuche zur funktionalen Identifizierung der KCS-ähnlichen Klone	81
3.3.1	Heterologe Expression der KCS-ähnlichen Klone in <i>S. cerevisiae</i>	81
3.3.2	Zerstörung des ppKCS1-Gens in <i>P. patens</i>	84
3.3.2.1	Klonierung des Disruptionskonstruktes.....	84
3.3.2.2	Molekulare Analyse der transgenen Moospflanzen.....	85
3.3.2.3	Fettsäure-Analyse der transgenen Moospflanzen	86
3.4	ELO-ähnliche cDNA-Klone	87
3.4.1	Isolierung von Volllänge-Klonen aus cDNA-Banken	87
3.4.2	Sequenzanalyse der ELO-ähnlichen cDNA-Klone	88
3.5	Versuche zur funktionalen Identifizierung der ELO-ähnlichen Klone	93
3.5.1	Heterologe Expression der ELO-ähnlichen Klone in <i>S. cerevisiae</i>	93
3.5.2	Expression von ppPSE1 aus <i>P. patens</i>	94
3.5.3	Substratspezifität von ppPse1 aus <i>P. patens</i>	98
3.5.4	Substratspezifität von ppPse1 aus <i>P. patens</i>	102
3.5.5	Expression von piPSE1 aus <i>Phytophthora infestans</i>	105
3.5.6	Substratspezifität von piPse1 aus <i>P. infestans</i>	107
3.5.7	Expression von tsPOE1 aus <i>Thraustochytrium</i> sp.	108
3.5.8	Substratspezifität von tsPoe1 aus <i>Thraustochytrium</i> sp.	110
3.5.9	Expression von ts093 und cc041 aus <i>Thraustochytrium</i> sp. und <i>Cryptocodium cohnii</i>	112
3.5.10	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Hefe-Expressionsexperimenten	113
3.5.11	Gen-Deletion von ppPSE1 in <i>P. patens</i>	114
3.5.11.1	Erstellung eines Deletionskonstruktes	114
3.5.11.2	Transformation von <i>Physcomitrella patens</i>	115
3.5.11.3	Molekulare Analyse der Mutante <i>pse1</i>	116
3.5.11.4	Analyse der Fettsäure-Profile von <i>P. patens</i> WT und <i>pse1</i>	119
3.6	Weitergehende Versuche zur Charakterisierung der Elo-ähnlichen Proteine.....	123
3.6.1	Konstruktion chimärer Proteine.....	123
3.6.2	Einfluss von Cerulenin auf die Aktivität von Elo- und Kcs-ähnlichen Proteinen.....	126
3.6.3	Konvergente Entwicklung der Kcs- und der Elo-Proteinfamilien	129
3.7	Zukunftsperspektiven	134

4	Zusammenfassung.....	137
5	Literatur.....	140
6	Anhang.....	158

1 Einleitung

Sehr langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (engl. *very-long-chain polyunsaturated fatty acids*, VLC-PUFAs) sind wichtige, aber seltene Bestandteile der menschlichen Nahrung, die aufgrund ihrer gesundheitsfördernden Wirkung in den letzten Jahren zunehmendes Interesse erlangt haben. Primärproduzenten der VLC-PUFAs sind die Mikroorganismen des marinen Planktons (u. a. Bakterien, Algen und algenähnliche Pilze). Über die marine Nahrungskette gelangen die VLC-PUFAs vorwiegend über Fische in die menschliche Ernährung. Neben den marinen Mikroorganismen synthetisieren aber u. a. auch einige Landpflanzen wie Moose, Farne und Gymnospermen VLC-PUFAs, wohingegen Angiospermen dazu nicht mehr in der Lage sind.

Um der Gefahr einer zunehmenden Ausbeutung der Meere durch Überfischung entgegenzuwirken, sind in den letzten Jahren zahlreiche Anstrengungen unternommen worden, alternative Quellen für VLC-PUFAs zu entwickeln. Eine solche alternative und nachhaltige Quelle würde die Produktion von VLC-PUFAs in transgenen Ölsaaten darstellen. Erste Voraussetzung hierfür ist die Isolierung und Identifizierung von Genen, die in die Biosynthese von VLC-PUFAs involviert sind. Anschließend könnte durch gemeinsame Expression dieser Gene in den Speichergeweben transgener Pflanzen eine Akkumulation dieser VLC-PUFAs erzielt werden.

In den meisten eukaryoten Organismen werden VLC-PUFAs aus langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) synthetisiert. Ihre Biosynthese erfolgt dabei durch die alternierende Wirkung von Fettsäure-Desaturasen und -Elongasen. Während die Desaturasen in einer sauerstoffabhängigen Reaktion zusätzliche Doppelbindungen in die Kohlenstoffkette der PUFAs einfügen, katalysieren die Fettsäure-Elongasen die Kettenverlängerung von Fettsäuren um jeweils zwei Kohlenstoffatome. Bei der Fettsäure-Elongation handelt es sich um einen Reaktionszyklus aus vier Reaktionen, die denen der Fettsäure-Biosynthese ähnlich sind. Ziel dieser Doktorarbeit war die Klonierung und funktionale Charakterisierung von Genen, die in die Elongation von PUFAs involviert sind und so an der Biosynthese von VLC-PUFAs mitwirken.

In den folgenden Kapiteln dieser Einleitung soll zunächst ein Überblick über die Strukturen, das Vorkommen und die möglichen Funktionen sehr langkettiger Fettsäuren gegeben werden. Hierbei werden nicht nur die VLC-PUFAs, sondern auch gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren betrachtet. In den anschließenden Kapiteln wird dann auf die pflanzliche Biosynthese von Fettsäuren und hierbei im speziellen auf die Fettsäure-Elongationsreaktion eingegangen, bevor verschiedene Biosynthesewege von VLC-PUFAs aufgezeigt werden.

Doppelbindungen in *trans*-Konfiguration sind dagegen durch ein 't' hinter der jeweiligen Positionszahl gekennzeichnet. Dreifachbindungen werden durch ein 'a' hervorgehoben (a = Acetylengruppe).

In den meisten VLC-PUFAs sind die Doppelbindungen durch eine Methylengruppe voneinander getrennt. In einigen Fällen können sie aber auch durch mehr als eine CH₂-Gruppe voneinander getrennt sein. Man bezeichnet diese Fettsäuren dann als nicht-methylenunterbrochene PUFAs. Zudem können VLCFAs durch funktionelle Gruppen wie Hydroxygruppen modifiziert werden. Nur selten treten die VLCFAs als freie Fettsäuren auf, sondern bilden meistens Esterbindungen aus. Mit einwertigen Alkoholen formen sie so die Wachse und mit den Derivaten des mehrwertigen Alkohols Glycerin die Glycerolipide. In Sphingolipiden sind sie dagegen mit der Amidgruppe einer langkettigen Sphingobase (engl. *long-chain-base*, LCB) verbunden und als Acyl-CoA mit der Thiolgruppe des Coenzym A verestert. Im Gegensatz zu den langkettigen Fettsäuren, die als Hauptbestandteile der Membranlipide in allen Zellen in großen Anteilen vorkommen, ist die Akkumulation von gesättigten VLCFAs häufig auf spezialisierte Gewebe beschränkt. Dennoch sind sie in geringem Anteil in eukaryoten Membranen essentiell für die Zelle. VLC-PUFAs können dagegen durchaus zu größeren Anteilen in den Membranlipiden akkumulieren.

1.1.2 Prokaryote

Prokaryote enthalten langkettige gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren mit 16 und 18 Kohlenstoffatomen als Hauptendprodukte der Fettsäure-Biosynthese. In den einfach ungesättigten Fettsäuren entsteht die Doppelbindung meistens auf anaerobem Weg während der Fettsäure-Biosynthese (Campbell & Cronan, 2001). In anderen Fällen erfolgt ihre Insertion erst nachträglich durch sauerstoffabhängige Desaturierungen der Kohlenstoffkette (Wada *et al.*, 1991). Darüber hinaus synthetisieren Bakterien eine Vielzahl unterschiedlicher Fettsäuren, die verzweigte Kohlenstoffketten und funktionelle Gruppen enthalten (Kaneda, 1991). Cyanobakterien weisen dagegen eine den höheren Pflanzen ähnlichere Fettsäurezusammensetzung auf als andere Bakterien. Sie synthetisieren langkettige Fettsäuren mit bis zu 4 Doppelbindungen, die durch sauerstoffabhängige Desaturasen in die Fettsäurekette eingefügt werden (Tocher *et al.*, 1998). Gesättigte VLCFAs mit mehr als 20 Kohlenstoffatomen sind bisher nicht in Bakterien nachgewiesen worden. Dagegen sind einige Bakterien durchaus in der Lage VLC-PUFAs zu synthetisieren. Diese Fähigkeit ist aber auf einige wenige psychrophile marine Vertreter wie *Flexibacter*, *Vibrio* und *Shewanella* beschränkt (Johns & Perry, 1977; Ringø *et al.*, 1992, Yazawa, 1996). Während Arten der Gattung *Shewanella* Eicosapentaensäure (20:5^{Δ5,8,11,14,17}) synthetisieren (Yazawa, 1996), produzieren einige Vertreter der Gattung *Vibrio* und *Colwellia* Docosahexaensäure (22:6^{Δ4,7,10,13,16,19}) in ihren Membranlipiden (Morita *et al.*, 2000; Russell & Nichols, 1999). Diese Fettsäuren werden v. a. in die Phospholipide Phosphatidylglycerin und Phosphatidylethanolamin eingebaut (Yazawa, 1996, Nichols *et al.*, 1997). In

Shewanella konnte in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen eine Akkumulation von 20:5^{Δ5,8,11,14,17} bis 24-40 % der Gesamtfettsäuren nachgewiesen werden (Yazawa, 1996). Die Funktion dieser VLC-PUFAs ist noch weitgehend unbekannt. Bakterien, die diese Fettsäuren synthetisieren, sind in ihrer natürlichen Umgebung des Tiefseesediments und -wassers niedrigen Temperaturen und einem hohen Druck ausgesetzt. Dies deutet auf eine Korrelation zwischen der Notwendigkeit von VLC-PUFAs und dieser ökologischen Nische hin (Hamamoto *et al.*, 1995). So konnte für *Shewanella gelidimarina* eine temperaturabhängige Synthese von 20:5^{Δ5,8,11,14,17} nachgewiesen werden. Während das Bakterium bei 2 °C große Mengen der VLC-PUFA synthetisiert (16 % der Gesamtfettsäuren), führte eine Temperaturzunahme auf 20 °C zu einer starken Reduktion des Anteils dieser Fettsäure (< 1,6 % der Gesamtfettsäuren) (Nichols *et al.*, 1997). Für *Vibrio* konnte eine ähnliche Temperaturabhängigkeit gemessen werden (Hamamoto *et al.*, 1994). Die Tatsache, dass nicht alle Bakterien dieses Lebensraums VLC-PUFAs akkumulieren, zeigt aber, dass ein Überleben unter solchen extremen Bedingungen auch ohne VLC-PUFAs möglich ist. Zudem ist es nicht wahrscheinlich, dass VLC-PUFAs essentiell für die Aufrechterhaltung einer konstanten Membranfluidität sind. Zum einen hat die Insertion von mehr als zwei Doppelbindungen in Fettsäuren nur geringfügigen Einfluss auf die Phasenübergangstemperatur von Membranen (Russel & Nichols, 1999), und zum anderen reichen einfach ungesättigte Fettsäuren aus, den für die Membranfunktion essentiellen, flüssig-kristallinen Zustand noch bei Temperaturen knapp unter 0 °C zu gewährleisten (Russel & Nichols, 1999). Dennoch sind *Shewanella*-Mutanten mit reduzierter Biosynthese von VLC-PUFAs bei einer Temperatur von 2 °C nicht lebensfähig. Interessanterweise wiesen Revertanten, die ihre Lebensfähigkeit wiedererlangt hatten, keinen erhöhten Gehalt an VLC-PUFAs auf. Vielmehr wurde das Fehlen dieser Fettsäuren durch eine Steigerung der Synthese von einfach ungesättigten langkettigen Fettsäuren kompensiert (Russel & Nichols, 1999). Bestätigt werden diese Ergebnisse durch Untersuchungen mit dem Tiefsee-Bakterium *Photobacterium profundum*, die zeigten, dass einfach ungesättigte Fettsäuren und nicht VLC-PUFAs für ein Wachstum unter hohem Druck und niedrigen Temperaturen erforderlich sind (Allen *et al.*, 1999). Auch wenn eine Beteiligung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren an der adaptiven Antwort der Bakterien auf die extremen Umwelteinflüsse nicht ausgeschlossen werden kann, bleibt die essentielle Funktion dieser Fettsäuren unklar.

1.1.3 Algen und algenähnliche Pilze

Im Gegensatz zum Großteil der Prokaryoten akkumulieren zahlreiche marine eukaryote Mikroorganismen große Mengen VLC-PUFAs und stellen so zusammen mit den wenigen VLC-PUFA-produzierenden Bakterien als Plankton die Primärproduzenten dieser Fettsäuren in der marinen Nahrungskette dar (Yongmanitchai & Ward, 1989 und Literatur darin). So finden sich unter den als Phycomyceten bezeichneten algenähnlichen Pilzen zahlreiche Vertreter, die 20:4^{Δ5,8,11,14}, 20:5^{Δ5,8,11,14,17}

und/oder 22:6^{Δ4,7,10,13,16,19} synthetisieren (Yongmanitchai & Ward, 1989). Der Begriff Phycomycet (Algenpilz) ist dabei keine systematische Klassifizierung, sondern beschreibt Pilze mit Thalli in Form blasiger Einzelzellen oder nicht septierten Hyphen. Für die biotechnologische Gewinnung dieser Fettsäuren ist u. a. der Zygomycet *Mortierella alpina* von Interesse. *M. alpina* gehört zur Gruppe der oleagenen Pilze, die als Hauptspeicherform Fette in Ölkörpern deponieren, so dass der Fettanteil bei ihnen bis zu 40 % des Trockengewichtes erreichen kann (Wynn & Retledge, 2000). In Abhängigkeit von den Kulturbedingungen kann 20:4^{Δ5,8,11,14} über 40 % der Gesamtfettsäuren ausmachen. Andere *Mortierella*-Arten sind zudem in der Lage 20:5^{Δ5,8,11,14,17} zu synthetisieren; C₂₂-PUFAs konnten in ihnen jedoch nicht nachgewiesen werden. Weitere C₂₀- und z. T. C₂₂-PUFA-produzierende Phycomyceten sind u. a. *Pythium*-, *Phytophthora*-Arten (Yongmanitchai & Ward, 1989). Aufgrund ihrer Fähigkeit große Mengen 22:6^{Δ4,7,10,13,16,19} zu synthetisieren, stellen die beiden untereinander nah verwandten Arten der Gattungen *Thraustochytrium* und *Schizochytrium* eine Quelle für die Gewinnung von C₂₂-PUFAs dar. Während in *Schizochytrium limacinum* unter optimierten Kulturbedingungen 22:6^{Δ4,7,10,13,16,19} bis zu einem Anteil von 30 % der Gesamtfettsäuren akkumuliert (Yokochi *et al.*, 1998), kann die gleiche Fettsäure in *Thraustochytrium aureum* sogar über 60 % der Gesamtfettsäuren ausmachen (Bajpai *et al.*, 1991). Dabei wird in *Thraustochytrium* die synthetisierte 22:6^{Δ4,7,10,13,16,19} sowohl in die Neutrallipide als auch in die Membranlipide inkorporiert (Kendrick & Ratledge, 1992).

Auch Algen produzieren VLC-PUFAs. Innerhalb dieses Organisationstyps lassen sich aber große Unterschiede bezüglich der Akkumulation von C₂₀- und C₂₂-PUFAs ausmachen. Von wenigen Arten abgesehen, akkumulieren fast alle bisher untersuchten Rot-, Braun- und Grünalgen 20:4^{Δ5,8,11,14} und 20:5^{Δ5,8,11,14,17}. Aber auch in den anderen Klassen finden sich zahlreiche Organismen, die sogar 22:6^{Δ4,7,10,13,16,19} synthetisieren können. Zu erwähnen sind hier *Euglena gracilis* (9 % C₂₀ bzw. 8 % C₂₂) und *Isochrysis* sp. (0 % bzw. 15 %). Besonders hohe C₂₂-Anteile können bei diversen Arten der Dinophyceen wie *Cryptothecodinium cohnii*, *Glenodinium* sp. und *Amphidinium carteri* auftreten, die alle über 20 % C₂₂-PUFAs akkumulieren (Yongmanitchai & Ward, 1989).

Wie auch bei den VLC-PUFA-produzierenden Bakterien, kann den Fettsäuren in den Algen und Pilzen keine eindeutige Funktion zugeschrieben werden. Als Bestandteile von Speicherlipiden dienen sie sicher als Kohlenstoff- und Energiereserve. Aufgrund der Inkorporation von VLC-PUFAs in die Membranlipide könnten sie auch mit der Anpassung an bestimmte Umweltbedingungen in Verbindung gebracht werden. Hierzu gibt es aber bisher keine Beweise. Dennoch haben die Algen und v. a. die oleagenen Pilze als Quellen für die Isolierung von VLC-PUFAs großes Interesse erlangt. So wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen, die Kulturbedingungen für eine effiziente Synthese von VLC-PUFAs sowie eine Erhöhung des Lipidgehaltes in den Organismen zu optimieren. Faktoren, die die Produktion beeinflussen, sind u. a. die Zusammensetzung des Kulturmediums, die Temperatur, Licht, die Verfügbarkeit von Sauerstoff sowie das Alter der Kultur (Yongmanitchai & Ward, 1989).

Trotz der Optimierung der Biosynthese von VLC-PUFAs in diesen Organismen ist die biotechnologische Gewinnung dieser Fettsäuren ein sehr kosten- und zeitintensives Verfahren. Ein alternativer Ansatz ist die Synthese der VLC-PUFAs in transgenen Ölsaaten, zu deren Entwicklung auch diese Doktorarbeit beitragen soll. Dabei stellen die Algen und algenähnlichen Pilze eine Quelle für die Isolierung von Genen dar, die in die Biosynthese der VLC-PUFAs involviert sind.

1.1.4 Hefen

Im Gegensatz zu den Algen und algenähnlichen Pilzen synthetisieren Hefen keine VLC-PUFAs. Den Hauptanteil an ihren Fettsäuren machen C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren aus, die wie in *Saccharomyces cerevisiae* entweder nur eine oder wie in *Pichia pastoris* bis zu drei Doppelbindungen enthalten (Trotter *et al.*, 2001; Sakaki *et al.*, 2001). Darüber hinaus synthetisieren sie signifikante Mengen gesättigter VLCFAs. Diese werden in den Hefen hauptsächlich in die Sphingolipide inkorporiert, wo sie über eine Säureamidbindung mit einer langkettigen Base verbunden sind (Dickson, 1998). Sphingolipide sind charakteristische Komponenten eukaryoter Membranen. In Säugerzellen kommen sie hauptsächlich in der äußeren Schicht der Plasmamembran vor (Karlsson, 1989). Auch in *S. cerevisiae* sind sie v. a. in der Plasmamembran anzutreffen, wo sie bis zu 30 % der Phospholipide ausmachen (Hechtberger *et al.*, 1994). Es ist jedoch nicht bekannt, ob auch hier eine unsymmetrische Verteilung zwischen den beiden Hälften des Lipidbilayers existiert. Außerdem können sie im Golgi-Apparat, in der Vakuole und in Spuren in Mitochondrien nachgewiesen werden (Hechtberger, *et al.*, 1994). Die Präsenz von VLCFAs im Zellkern deutet zudem auf ein Vorhandensein von Sphingolipiden in der Kernmembran hin (Schneiter *et al.*, 1996). In Prokaryoten konnten Sphingolipide bisher fast ausschließlich in anaeroben Bakterien nachgewiesen werden (Olsen & Jantzen, 2001). VLCFAs-enthaltende Sphingolipide sind in den letzten Jahren sehr intensiv in *S. cerevisiae* und v. a. in Säugetierzellen untersucht worden. Aufgrund der engen Verknüpfung einiger Funktionen von gesättigten VLCFAs und Sphingolipiden soll hier daher ein kurzer Überblick über Biosynthese und mögliche Funktionen von Sphingolipiden und gesättigten VLCFAs gegeben werden.

Sphingolipide bestehen wie die Phosphoglycerolipide aus einer polaren Kopfgruppe, die mit dem hydrophoben Ceramid-Rest verbunden ist. Das Ceramid setzt sich dabei aus einer langkettigen Base und der Amid-gebundenen Fettsäure zusammen. Die Biosynthese von Sphingolipiden in *S. cerevisiae* ist in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt. Es ist hierbei hervorzuheben, dass der Sphingolipid-Metabolismus in der Hefe auch auf molekularer Ebene sehr gut erforscht ist und zahlreiche Gene bekannt sind, die in die Biosynthese von Sphingolipiden involviert sind. Die Biosynthese der Sphingolipide wird durch die irreversible Kondensation von Palmitoyl-CoA mit Serin initiiert, wodurch das 3-Ketodihydrosphingosin entsteht. Für die optimale Aktivität dieser Serin-Palmitoyltransferase sind drei mögliche Untereinheiten notwendig, deren Gene alle kloniert sind (Nagiec *et al.*, 1994; Gable *et al.*, 2000).

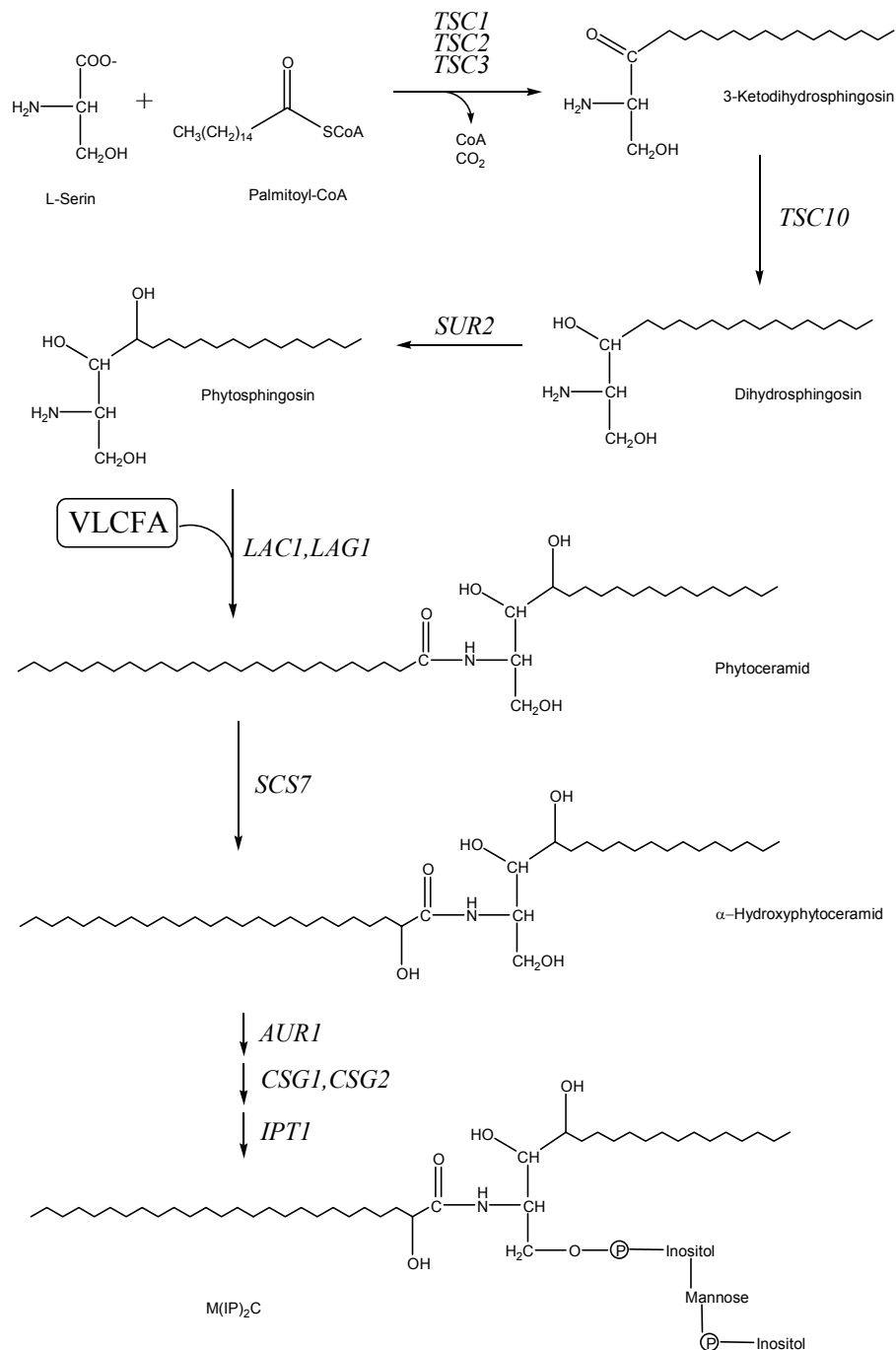


Abbildung 1.2. Schematische Darstellung der Biosynthese der VLCFA-enhaltenden Sphingolipide in *Saccharomyces cerevisiae*. Identifizierte Gene, die in die einzelnen Reaktionsschritte involviert sind, sind an den Reaktionspfeilen mit ihren jeweiligen Bezeichnungen aufgeführt. Die initiiierende Reaktion stellt die irreversible Kondensation von Palmitoyl-CoA mit (L)-Serin dar (*TSC1,2,3*). Durch Reduktion des Kondensationsproduktes 3-Ketodihydrosphingosin entsteht Dihydrosphingosin (*TSC10*), welches wiederum durch Hydroxylierung am C4-Kohlenstoff in das Phytosphingosin überführt wird (*SUR2*). Phytosphingosin ist der Akzeptor, mit dem die VLCFA über eine Säureamidbindung verbunden wird, wodurch das Phytoceramid entsteht (*LAC1, LAG1*), auf das nach weiteren Modifikation durch Hydroxylierung der VLCFA am α-C-Atom (*SCS7*) die polaren Kopfgruppen übertragen werden (*AUR1, CSG1* und *CSG2, IPT1*).

In der sich anschließenden NADPH-abhängigen Reaktion wird die Ketogruppe des 3-Ketodihydrosphingosins zur Hydroxygruppe reduziert, wodurch das Dihydrosphingosin (Sphinganin) entsteht (Beeler *et al.*, 1998). Durch die Wirkung des *SUR2*-Genprodukts wird das Sphinganin dann möglicherweise zunächst an der C4-Position zum Phytosphingosin hydroxyliert (Haak *et al.*, 1997). Im Anschluss erfolgt die Übertragung der VLCFA auf die NH₂-Gruppe des Phytosphingosins, wodurch das Phytoceramid entsteht. Die VLCFA ist in der Abbildung 1.2 besonders hervorgehoben. In *S. cerevisiae* ist diese Fettsäure gesättigt und hat eine Kettenlänge von C₂₄-C₂₆ (Lester *et al.*, 1993). Die Synthese des Phytoceramids wird durch die Acyl-CoA:Dihydrosphingosin-N-Acyltransferase (Ceramid-Synthase) katalysiert, von der kürzlich zwei mögliche Untereinheiten (Lag1 und Lac1) kloniert werden konnten (Guillas *et al.*, 2001). Die abschließende Reaktion der Biosynthese des Ceramids in der Bäckerhefe ist die Bildung des α -Hydroxyphytoceramids durch die *SCS7*-vermittelte Hydroxylierung der VLCFA an dem α -C-Atom (Dunn *et al.*, 1998). Im Unterschied zu *S. cerevisiae* können in anderen Hefen sowie Pflanzen und Säugern neben der C4-Hydroxylierung andere und/oder zusätzliche Modifikationen der Sphingobase, wie *trans*- Δ^4 -Desaturierung, *cis/trans*- Δ^8 -Desaturierung und C9-Methylierungen stattfinden. Die hierfür notwendigen Gene wurden ebenfalls z. T. identifiziert (Sperling *et al.*, 1998; Sperling *et al.*, 2001a; Sperling *et al.*, 2001b). Außerdem kann der Acyl-Rest durch *trans*- Δ^3 -Desaturierung modifiziert werden oder als α,β -Dihydroxyacyl vorliegen.

Bäckerhefe enthält drei verschiedene komplexe Sphingolipide: Inositolphosphorylceramid (IPC), Mannosyl-Inositolphosphorylceramid (MIPC) und Mannosyl-Diinositolphosphorylceramid (M(IP)₂C), wobei letzteres mit 75 % den größten Anteil an den Sphingolipiden ausmacht (Smith & Lester, 1974). Ihre Synthese erfolgt durch sukzessive Addition der polaren Kopfgruppen Inositol-phosphat, Mannose und wiederum Inositol-phosphat auf die 1-OH-Gruppe des α -Hydroxyphytoceramids. Für diese Reaktionen sind die Genprodukte von *AUR1* (Nagiec *et al.*, 1997), von *CSG1* und *CSG2* (Beeler *et al.*, 1994; Beeler *et al.*, 1997) sowie von *IPT1* (Dickson *et al.*, 1997b) verantwortlich. Die Synthese von IPC findet auch in anderen Pilzen und in Pflanzen statt, kann aber nicht in Säugetieren nachgewiesen werden. Zusammen mit der essentiellen Natur von IPC in Pilzen und der Hemmbarkeit des Aur1-Proteins durch Aureobasidin A (Nagiec *et al.*, 1997) stellt diese Reaktion ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung von Antimykotika dar. Der Verlust von MIPC durch Deletion eines der beiden *CSG*-Gene ist im Gegensatz zum IPC-Verlust nicht letal. Die Akkumulation von IPC führt aber zu einer erhöhten Sensitivität der Hefen gegenüber Ca²⁺ im Kulturmedium. Mutationen, die zu einer Reduktion der Sphingolipid-Synthese führen, supprimieren diese Ca²⁺-Sensitivität. Über dieses Selektionssystem erfolgte die Identifizierung eines Großteils der Gene, die in die α -Hydroxyphytoceramid-Biosynthese involviert sind. Während in *S. cerevisiae* ausschließlich Inositol-phosphat und Mannose auf das Ceramid übertragen werden, können die komplexen Sphingolipide in anderen Pilzen, Pflanzen und Säugetieren auch andere polare Kopfgruppen enthalten.

Auch die hierfür erforderlichen Gene konnten teilweise aus verschiedenen Organismen kloniert werden (Dickson, 1998; Dickson & Lester, 1999; Leipelt *et al.*, 2001)

Es würde den Rahmen dieser Doktorarbeit sprengen auf sämtliche zellulären Prozesse detailliert einzugehen, in die die Sphingolipide involviert sind. Daher sollen zunächst einige spezifische Funktionen der Sphingolipide erwähnt werden, bevor detaillierter auf Funktionen eingegangen wird, die auf der Struktur von Sphingolipiden basieren und auch das Vorhandensein von gesättigten VLCFAs erfordern.

Sphingolipide sowie ihre Vorstufen bzw. Metabolite - die Ceramide und Sphingobasen - sind in Signaltransduktionsketten involviert, die als Antwort auf verschiedene Stressfaktoren Zellzyklus, Apoptosis oder Seneszenz regulieren und auch eine Funktion bei der Zell-Zell-Kommunikation haben (Dickson, 1998 und Literatur darin). Sphingobasen sind in Hefen z. B. in die Signaltransduktion bei der Antwort auf Hitzestress involviert. Dies trifft besonders auf die Anfangsphase zum Erreichen von Thermotoleranz zu. So bewirkt die Akkumulation von Sphingobasen im Zuge der Stressantwort den vorübergehenden Verbleib der Zellen in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus (Jenkins & Hannun, 2001) sowie die Akkumulation von Trehalose zum Schutz von Membranen und Membranproteinen vor Denaturierung (Dickson *et al.*, 1997a). Dagegen scheinen sie nicht spezifisch in die Induktion von Hitzeschockproteinen involviert zu sein (Dickson *et al.*, 1997a). Die Akkumulation von Sphingobasen basiert dabei auf ihrer Neusynthese, da *lcb1*-Mutanten keine Stressantworten hervorrufen. Eine Degradierung von Sphingolipiden bei der Stressantwort kann trotz der Präsenz einer Ceramidase (Mao *et al.*, 2000) weitgehend ausgeschlossen werden (Jenkins & Hannun, 2001).

Die Sphingolipide sind nicht nur für die Stressantwort sondern auch für die Lebensfähigkeit der Hefen essentiell (Wells & Lester, 1983). *lcb1*- oder *lcb2*-Mutanten haben aufgrund des Fehlens der initiiierenden Serin-Palmitoyltransferase-Aktivität einen Defekt in der Biosynthese der langkettigen Sphingobase und synthetisieren keine Sphingolipide mehr. Diese Mutanten können nur überleben, wenn das Medium mit langkettigen Sphingobasen supplementiert wird (Pinto *et al.*, 1992). Der Defekt in der Sphingolipid-Biosynthese wird jedoch durch eine zusätzliche Mutation in dem *SLC1*-Gen supprimiert. Diese Mutation ermöglicht es den Bäckerhefen, ohne Sphingolipide zu überleben (Dickson *et al.*, 1990). Wie erwähnt, enthalten die Sphingolipide in *S. cerevisiae* ausschließlich sehr langkettige gesättigte Fettsäuren (C₂₄-C₂₆). Eine einzige Mutation in dem *SLC1*-Gen führt in Abwesenheit von langkettigen Sphingobasen zur Inkorporation der VLCFAs in die *sn*-2-Position von Phosphoglycerolipiden, die normalerweise keine VLCFAs enthalten. Folglich kodiert *SLC1* für eine Acyltransferase, in der ein einziger Aminosäureaustausch (G44L) zur Veränderung ihrer Substratspezifität führt (Nagiec *et al.*, 1993). Die Inkorporation der gesättigten VLCFAs in Glycerolipide führt zu Synthese neuartiger Phospholipide (PI, Mannosyl-PI und Inositol-P-(Mannosyl)-PI). Diese Membranlipide enthalten identische Kopfgruppen wie die Sphingolipide.

Zusammen mit der C₂₆-Fettsäure in der *sn*-2-Position des Glycerin-Restes weisen sie so eine den Sphingolipiden ähnliche Struktur auf (Lester *et al.*, 1993). Obwohl die *slc1*-Supressormutation in den *lcb*-Mutanten ein normales Wachstum der Hefen unter normalen Kulturbedingungen ermöglicht, sind sie nicht bei niedrigem pH-Wert sowie bei Salz- und Temperaturstress überlebensfähig. Die Antwort der Hefen auf diese Stressfaktoren erfordert also spezifisch die Existenz von Sphingolipiden. Andere essentielle Funktionen basieren möglicherweise auf strukturellen Eigenschaften der Sphingolipide und können auch durch VLCFAs-enthaltende Phosphatidylinositole erfüllt werden, die ihnen strukturell ähnlich sind. Dies hebt die essentielle Natur der VLCFAs in Hefen hervor und wird auch dadurch bestätigt, dass Mutanten, die keine VLCFAs mehr synthetisieren können, nicht lebensfähig sind (Dittrich *et al.*, 1998).

Darüber hinaus sind die Sphingolipide in Hefen und Säugetieren in den vesikulären Transport von GPI-verankerten Proteinen zur Plasmamembran involviert (Muñiz & Riezman, 2000). Sowohl die GPI-verankerten Proteine als auch ein Großteil der Sphingolipide befinden sich in der Plasmamembran, so dass ein gemeinsamer Transport wahrscheinlich ist. Es ist dabei unklar, ob die Sphingolipide für bestimmte Schritte wie die Entstehung und Ablösung der Vesikel von den Ursprungsmembranen (ER bzw. Golgi-Apparat) oder ihre Fusion mit den Zielmembranen (Golgi-Apparat bzw. Plasmamembran) erforderlich sind. So konnte in Säugetieren eine Beteiligung der Sphingolipide am Transport der GPI-verankerten Proteine vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran nachgewiesen werden (Simons & van Meer, 1998). Auch führt das Fehlen von Sphingolipiden in einer temperatursensitiven Hefe-Mutante zu einem Defekt im ER-Golgi-Transport (Sütterlin *et al.*, 1997). Eine alternative Erklärung für diese Funktion der Sphingolipide basiert auf der Beobachtung, dass Sterole in Membranen mit Sphingo- und Glycerolipiden assoziieren, wobei das planare tetracyclische Kohlenstoffringsystem des Sterols mit den hydrophoben Kohlenstoffketten der Lipide interagiert (Brown, 1998). Zusammen mit den Sphingolipiden, denen im Gegensatz zu den Glycerolipiden eine höhere Ordnung in Membranen sowie eine höhere Schmelztemperatur zugesprochen wird, könnte diese laterale Assoziation zur Bildung von geordneten Mikrodomänen in Membranen führen. Die Existenz dieser als *rafts* bezeichneten Domänen konnte mittlerweile auch in Hefen nachgewiesen werden (Bagnat *et al.*, 2000). Möglicherweise dienen diese *rafts* als Plattform für die Gruppierung der GPI-verankerten Proteine in bestimmte Membranbereiche und so der Sortierung der GPI-verankerten Proteine in die Vesikel (Simons & Ikonen, 1997). Interessanterweise enthält der Diacylglycerinrest einiger GPI-Anker in Hefen in der *sn*-2-Position eine gesättigte C₂₆-Fettsäure, die normalerweise nur in den Sphingolipiden vorkommt (Sipos *et al.*, 1997). Auch die Fettsäuren des in der Plasmamembran von Hefen nachgewiesenen Phosphatidylserins haben im Vergleich zu anderen Glycerolipiden den höchsten Sättigungsgrad (Schneider *et al.*, 1999). Die gesättigten Fettsäuren machen eine Assoziation mit Sphingolipiden wahrscheinlicher als mit Glycerolipiden. Außerdem wird in Hefen der Diacylglycerinrest der GPI-Anker einiger GPI-verankerten Proteine durch ein C₂₆-Phytocermamid

ersetzt (Reggiori *et al.*, 1997). In Hefen sind die VLCFAs daher ein wichtiges Strukturmerkmal der Sphingolipide und der mit ihnen assoziierten Glycerolipide und sind damit für den Transport der GPI-verankerten Proteine essentiell. Dies geht auch aus Untersuchungen mit Hefemutanten hervor, die nur noch geringe Mengen VLCFAs synthetisieren und einen Defekt im Transport dieser Proteine vom ER zum Golgi-Apparat aufweisen (David *et al.*, 1998). Übereinstimmend hiermit ist der vollständige Verlust von VLCFAs für die Hefen letal (Dittrich *et al.*, 1998).

Außerdem wird den gesättigten VLCFAs eine Rolle bei der Stabilisierung von stark gekrümmten Membranbereichen zugesprochen. In einer temperatursensitiven Hefe-Mutante führt eine Mutation in dem *ACCI*-Gen, das für eine Acetyl-CoA-Carboxylase kodiert, zur Produktion von nur noch geringen Mengen Malonyl-CoA (Schneiter *et al.*, 1996). Malonyl-CoA geht als Substrat in zahlreiche metabolische Prozesse wie Fettsäure-Synthese, Polyketid-Synthese, Isoprenoid-Synthese und auch Fettsäure-Elongation ein. Die limitierenden Mengen Malonyl-CoA führten in der Hefe-Mutante unter restriktiven Bedingungen zu einer Reduktion des VLCFA-Gehaltes um über 60 %. Diese Reduktion ging in den Zellen mit drastischen Veränderungen in der Struktur der Kernmembran einher. So konnten in der Mutante zahlreiche Einstülpungen der inneren Kernmembran und Vesikelbildung zwischen der inneren und äußeren Kernmembran beobachtet werden. Schneiter und Mitarbeiter postulieren, dass diese strukturellen Veränderungen möglicherweise auf eine Destabilisierung der Verbindung zwischen dem Kernporenkomplex und der Kernmembran zurückzuführen sind. Diese strukturellen Veränderungen wurden spezifisch durch die Reduktion der Biosynthese von VLCFAs hervorgerufen, da eine Hemmung der Fettsäure- und Sterol-Synthese nicht zu den gleichen Effekten führte. Dies lässt die Vermutung zu, dass die starken Krümmungen der Membranbereiche an den Kernporenkomplexen durch VLCFAs stabilisiert werden. Interessanterweise führt eine hohe Inkorporation von VLCFAs in Membranlipide von transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen ebenfalls zu starken strukturellen Veränderungen der Thylakoidmembran, so dass VLCFAs möglicherweise in allen Eukaryoten eine essentielle Funktion bei der Ausbildung und Stabilisierung bestimmter Membranstrukturen haben (Millar *et al.*, 1998).

1.1.5 Pflanzen

Pflanzen enthalten neben gesättigten Fettsäuren auch ungesättigte C₁₆- und C₁₈-Fettsäuren mit einer bis maximal fünf Doppelbindungen als Bestandteile ihrer Membran- und Speicherlipide. Die Moose, Farne und Gymnospermen zeichnen sich dabei gegenüber den Angiospermen dadurch aus, dass sie neben den C₁₈-PUFAs die VLC-PUFAs 20:4^{Δ5,8,11,14}, 20:5^{Δ5,8,11,14,17} und in seltenen Fällen 22:6^{Δ4,7,10,13,16,19} bilden können. Diese VLC-PUFAs werden dabei sowohl in die Triacylglycerine als auch in die polaren Glycerolipide inkorporiert (Dembitsky, 1993; Jamieson & Reid, 1975; Wolff *et al.*, 2001). Die Moose unterscheiden sich außerdem von den anderen Pflanzen, da sie größere Mengen an Triacylglycerinen in ihrem grünen, vegetativen Gewebe akkumulieren (Dembitsky, 1993). Auch

Physcomitrella patens synthetisiert signifikante Mengen C₂₀-PUFAs, die aber in die Glyco- und Phospholipide inkorporiert werden (Grimsley *et al.*, 1981). Mit ungefähr 20 % macht 20:4^{Δ5,8,11,14} dabei den Hauptanteil aus. Durch Klonierung der Δ⁶-Desaturase konnte aus diesem Organismus bereits ein Gen identifiziert werden, das in die Biosynthese der C₂₀-PUFAs involviert ist. Die Deletion des verantwortlichen Gens führte zu einer erheblichen Reduktion des C₂₀-PUFA-Anteils (Girke *et al.*, 1998). Die Tatsache, dass in diesen Mutanten noch Restmengen dieser Fettsäuren nachgewiesen werden konnten, deutet aber auf eine Redundanz in diesem Reaktionsschritt hin.

Eine Eigenart einiger Moose ist die Fähigkeit, Fettsäuren zu akkumulieren, die Dreifachbindungen in ihren Kohlenstoffketten enthalten. So konnten u.a. in *Fontinalis antipyretica* und *Dicranum polysetum* hohe Mengen dieser Acetylenfettsäuren (18:3^{Δ6a,9,12}, 18:4^{Δ6a,9,12,15} und 20:3^{Δ8a,11,14}) nachgewiesen werden, die aber ausschließlich in die Triacylglycerine inkorporiert werden (Jamieson & Reid, 1976; Dembitsky, 1993). Die Einführung der Dreifachbindung erfolgt dabei durch aufeinanderfolgende Desaturierungen an dem gleichen Kohlenstoffpaar. Durch Klonierung einer bifunktionalen Δ⁶-Desaturase/Acetylenase konnte mittlerweile gezeigt werden, dass diese Reaktionen durch das gleiche Enzym katalysiert werden können (Sperling *et al.*, 2000). Für Gymnospermen ist charakteristisch, dass sie neben den methylenunterbrochenen Fettsäuren größere Mengen der sogenannten nicht-methylenunterbrochenen PUFAs synthetisieren (siehe Kapitel 1.1.1). In diesen Fettsäuren sind die ersten beiden carboxylständigen Doppelbindungen durch mehr als eine CH₂-Gruppe voneinander getrennt. Es entsteht daher häufig ein Gemisch aus sowohl methylenunterbrochenen als auch nicht-methylenunterbrochenen PUFAs, deren Bestandteile u. a. Taxolensäure (18:2^{Δ5,9}), Pinolensäure (18:3^{Δ5,9,12}), Coniferonsäure (18:4^{Δ5,9,12,15}), Sciadonsäure (20:3^{Δ5,11,14}) und Juniperonsäure (20:4^{Δ5,11,14,17}) sind (Wolff *et al.*, 200). Alle diese nicht-methylenunterbrochenen PUFAs haben eine Doppelbindung an der Δ⁵-Position. Es ist dabei nicht aufgeklärt, ob die Doppelbindung in den verschiedenen Fettsäuren durch eine einzige Desaturase eingefügt wird, die eine hohe Unspezifität gegenüber der Kettenlänge der Fettsäure sowie dem Abstand zu bereits existierenden Doppelbindungen aufweist. Ebenso könnte die parallele Synthese von 18:3^{Δ6,9,12} und 18:3^{Δ5,9,12} durch eine einzige regionspezifische Desaturase erfolgen, die sowohl Doppelbindungen in die Δ⁵- als auch in die Δ⁶-Position von C₁₈-PUFAs einfügt (Wolff *et al.*, 1999). Allerdings konnte aus Gymnospermen noch kein Gen isoliert werden, welches Aufschluss hierüber geben könnte.

Angiospermen enthalten in ihren Membranlipiden hauptsächlich C₁₆- und C₁₈-Fettsäuren mit 1 bis maximal vier Doppelbindungen. Darüber hinaus können geringe Mengen gesättigter VLCFAs in den Sphingolipiden und im Phosphatidylserin nachgewiesen werden (Murata *et al.*, 1984; Haschke *et al.*, 1990; Bohn *et al.*, 2000). Möglicherweise nehmen sie in Pflanzen ähnliche Funktionen wie in Hefen und Säugetieren (siehe Kapitel 1.1.4).

Auch die Triacylglycerine haben bei den meisten Pflanzen eine ähnliche Fettsäure-Zusammensetzung, in denen C₁₆- und C₁₈-Fettsäuren dominieren. Dagegen akkumulieren einige Pflanzen große Mengen VLCFAs in den Ölkörpern ihrer Samen. In traditionellen *B. napus*-Sorten ist Erucasäure (22:1^{Δ13}) mit einem Anteil von 45-60 % der Gesamtfettsäuren Hauptkomponente der Triacylglycerine. Aufgrund ihres nachteiligen Effekts für die Qualität des Speiseöls wurden in den letzten Jahrzehnten durch Kreuzungen Rapsorten gezüchtet, die fast keine 22:1^{Δ13} mehr enthalten (< 2 %) (Stefansson *et al.*, 1961; Loof & Appleqvist, 1972). Die Verminderung des VLCFAs-Gehaltes wurde durch die Einkreuzung von zwei rezessiven Allelen erzielt, die zu einer direkten Reduktion der Biosynthese von VLCFAs führten (Murphy, 1996). Auf der anderen Seite ist 22:1^{Δ13} ein wertvoller oleochemischer Rohstoff und findet bei der Produktion zahlreicher industrieller Erzeugnisse Verwendung (Johnson & Fritz, 1989). Daher wurden umgekehrt Anstrengungen unternommen, den 22:1^{Δ13}-Gehalt in Raps zu erhöhen. Aufgrund der Diskrimination von 22:1^{Δ13} durch die *sn*-1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase wird 22:1^{Δ13} jedoch nur in die *sn*-1- und *sn*-3-Position des Glyceringerüsts eingebaut und limitiert dadurch den 22:1^{Δ13}-Gehalt auf maximal 67 % (Bernerth & Frentzen, 1990). In transgenen *B. napus*-Pflanzen, die eine Acyltransferase aus *Limnanthes douglasii* für den Einbau von 22:1^{Δ13} in die mittlere Glycerinposition exprimieren, konnte jedoch trotz der Synthese von Trierucin keine Steigerung des 22:1^{Δ13}-Gehaltes erzielt werden (Lassner *et al.*, 1995; Brough *et al.*, 1996; Weier *et al.*, 1997). Dies deutet darauf hin, dass die Akkumulation von 22:1^{Δ13} in Raps nicht nur durch die Spezifität der *sn*-1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase limitiert wird, sondern möglicherweise auch von der Verfügbarkeit des 22:1^{Δ13}-CoA-Substrates abhängt. Aber auch die Coexpression dieser Acyltransferase mit einem Fettsäure-Elongationsenzym aus *B. napus* führte nicht zu einer Erhöhung des 22:1^{Δ13}-Anteils im Samenöl, so dass ihre Akkumulation möglicherweise von zusätzlichen Faktoren bestimmt wird (Han *et al.*, 2001). Die Samen von *Arabidopsis thaliana* enthalten ebenfalls große Mengen VLCFAs. Allerdings dominiert hier 20:1^{Δ11} mit einem Anteil von 21 % an den Gesamtfettsäuren der Speicherlipide gegenüber 22:1^{Δ13} (7 % der Gesamtfettsäuren; Millar & Kunst, 1997).

Eine andere Fettsäure, die aufgrund ihrer hohen oxidativen Stabilität für viele Anwendungen eingesetzt werden kann, ist Δ⁵-Eicosensäure (20:1^{Δ5}). Diese Fettsäure wird in verschiedenen *Limnanthes*-Arten synthetisiert, in denen sie in den Speicherölen bis zu 65 % der Fettsäuren ausmacht (Sandager & Stymne, 2000).

Das Samenöl von Jojoba (*Simmondsia chinensis*) unterscheidet sich dagegen vom Öl anderer Pflanzen dadurch, dass die Speicherlipide nicht als Triacylglycerine sondern als Wachsester vorliegen. Diese Wachsester setzen sich aus einer einfach ungesättigten Fettsäure und einem einfach ungesättigten, einwertigen Alkohol zusammen (Miwa, 1971). Dabei sind die synthetisierten Acyl-CoAs sowohl Vorstufen für den Fettsäure- als auch für den Alkohol-Rest (Pollard *et al.*, 1979). Von diesen Acyl-CoAs haben über 90 % eine Länge von mehr als 18 Kohlenstoffatomen. Die Gene der Enzyme, die für

die Wachsproduktion in Jojoba verantwortlich sind (d. h. β -Ketoacyl-CoA-Synthase, Acyl-CoA-Reduktase und Wachs-Synthase), konnten mittlerweile alle kloniert werden (Lassner *et al.*, 1996; Metz *et al.*, 2000; Lardizabal *et al.*, 2000).

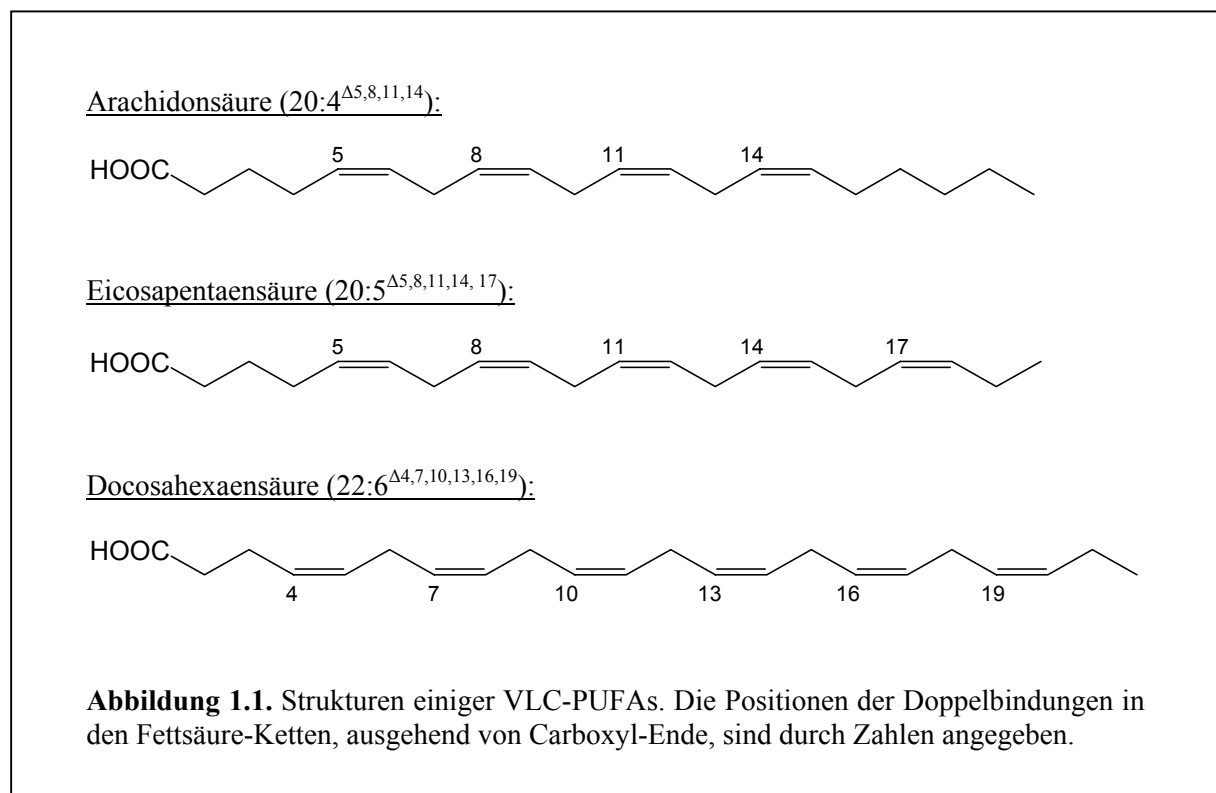
VLCFAs kommen in Pflanzen aber nicht nur in den Speicherlipiden einiger Ölsaaten vor, sondern sind auch Komponenten der pflanzlichen Cuticula sowie des Periderms, der Exodermis und des Casparystreifens. Hierbei stellen gesättigte VLCFAs zum einen Vorstufen zahlreicher aliphatischer Verbindungen dar und dienen ebenso als direktes Substrat für die Bildung von Wachsestern. Die Cuticula bedeckt die äußeren Zellwände der Epidermis luftexponierter Gewebe der Pflanze (Post-Beittenmiller, 1996), inklusive der beiden Schließzellen der Stomata (Gray *et al.*, 2000). Sie besteht aus Cutin, einem Polymer aus C₁₆- und C₁₈-Hydroxy-Fettsäuren, die miteinander verestert sind und ein verzweigtes Netzwerk ausbilden. Außerdem konnte ein zweites Polymer nachgewiesen werden, das als Cutan bezeichnet wird und größtenteils aus aliphatischen Kohlenwasserstoffen besteht, die über Etherbindungen mit einander verknüpft sind (Villena *et al.*, 1999). Das Suberin setzt sich dagegen aus Hydroxy-Fettsäuren und Dicarbonsäuren zusammen. Eingebettet in diese Cutin- bzw. Suberin-Polymere sind die Wachse, die ein komplexes hydrophobes Gemisch aus VLCFAs, langkettigen Kohlenwasserstoffen, Alkoholen, Aldehyden, Ketonen und Wachsester sowie Triterpenen, Sterolen und Flavonoiden darstellen (Kolattukudy, 1980). Hierbei kann sich die Zusammensetzung der Wachskomponenten zwischen verschiedenen Pflanzenarten und verschiedenen Gewebearten einer Pflanze unterscheiden (Post-Beittenmiller, 1996). An der Oberfläche der Cuticula kommt es häufig zur Ausbildung epicuticulärer Wachskristalle, deren Form und Erscheinung durch die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Wachse und folglich durch ihre Zusammensetzung bestimmt wird (Post-Beittenmiller, 1996).

Als Barriere zwischen der Pflanze und ihrer Umwelt hat die Cuticula eine essentielle Funktion für den Schutz der Pflanze vor diversen Einwirkungen. Aufgrund ihrer hydrophoben Natur verhindert sie effektiv den Wasserverlust luftexponierter Pflanzenteile, der aber selbst bei vollständig geschlossenen Stomata nicht gänzlich verhindert werden kann. Außerdem reflektieren Wachse teilweise das Licht und schützen die Pflanze daher begrenzt vor schädlichen UV-Strahlen (Post-Beittenmiller, 1996). Außerdem ist die Cuticula die erste Verteidigungslinie der Pflanze gegen bakteriellen und pilzlichen Pathogenbefall und behindert die Penetration durch Hyphen und Insektenstacheln (Kerstiens, 1996). Auf der anderen Seite haben die Wachse eine Funktion bei der Kommunikation der Pflanzen mit Insekten und Pathogenen. Die individuelle Zusammensetzung der epicuticularen Wachse verschiedener Pflanzen kann hierbei ein erstes Signal darstellen, über das Pflanzenpathogene ihren Wirt spezifisch erkennen können (Kolattukudy *et al.*, 1995). Auch bei anderen Erkennungsprozessen spielen die Wachse eine essentielle Rolle. So bestimmen sie die Oberflächeneigenschaften von Pollen mit und nehmen daher eine Schlüsselrolle bei den frühen Ereignissen der Pollen-Stigma Interaktion ein, welche die erste Voraussetzung bei der Befruchtung ist (Preuss *et al.*, 1993). Zahlreiche Mutanten

1.1 Strukturen, Vorkommen und Funktionen von sehr langkettigen Fettsäuren in verschiedenen Organismenreichen

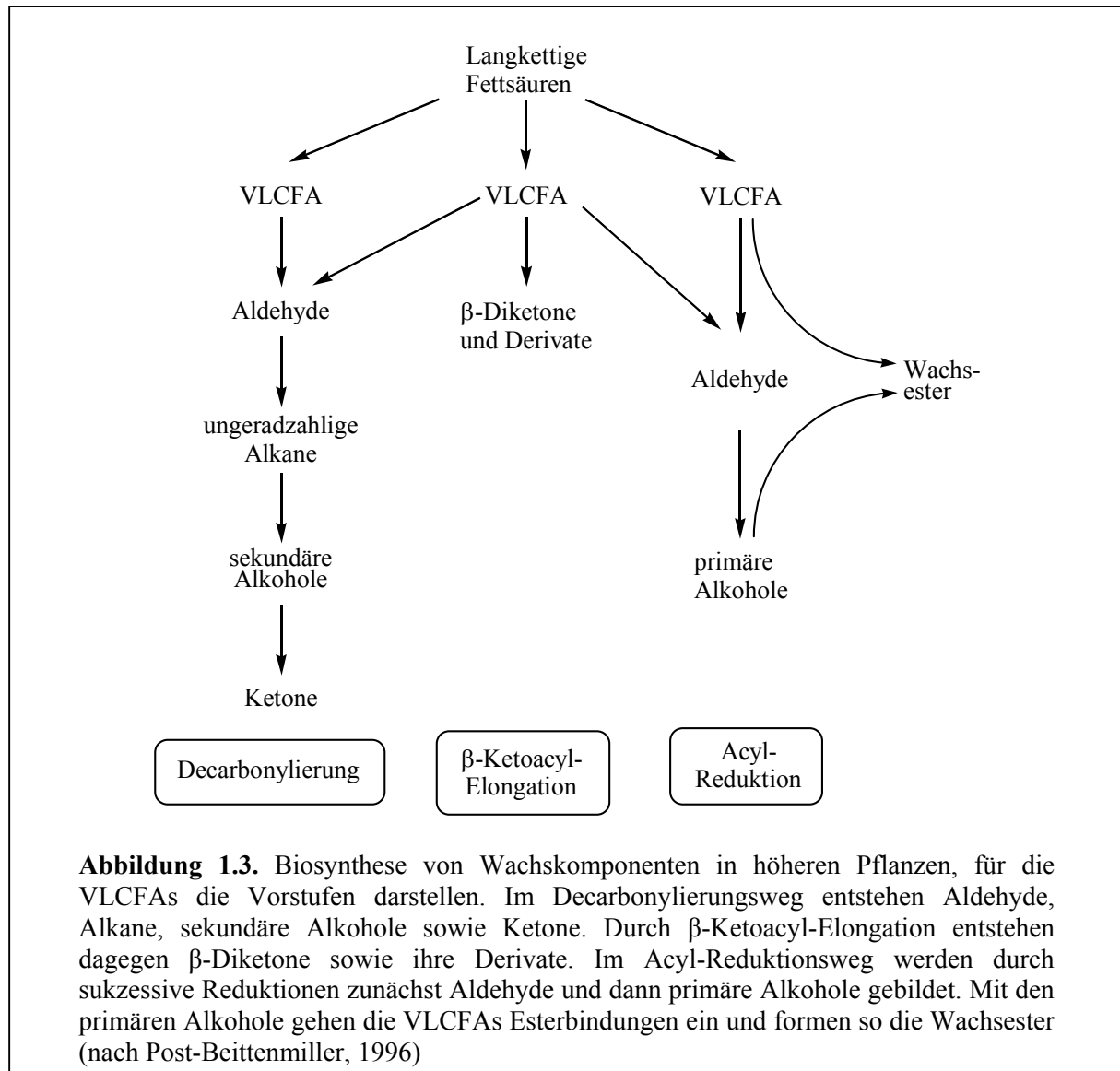
1.1.1 Strukturen von sehr langkettigen Fettsäuren

Sehr langkettige Fettsäuren (engl. *very-long-chain fatty acids*, VLCFAs) werden definiert als Carbonsäuren mit einer Kettenlänge von mehr als 18 Kohlenstoff-Atomen. Es handelt sich hierbei um Fettsäuren, die sowohl in Prokaryoten, in eukaryoten Mikroorganismen als auch in Pilzen, Pflanzen und Tieren nachgewiesen werden können.



Die Kohlenstoffketten der VLCFAs können gesättigt sein oder eine oder mehrere Doppelbindungen aufweisen. Im letzteren Fall spricht man von VLC-PUFAs. Wichtige Vertreter dieser VLC-PUFAs sind Eicosatetraensäure (Arachidonsäure, 20:4^{Δ5,8,11,14}), Eicosapentaensäure (20:5^{Δ5,8,11,14,17}) sowie Docosahexaensäure (22:6^{Δ4,7,10,13,16,19}), deren Strukturen in der Abbildung 1.1 dargestellt sind. Die Bezeichnung der Fettsäuren erfolgt in dieser Arbeit häufig in Zahlenform. So steht 20:4^{Δ5,8,11,14} für Arachidonsäure. Dabei steht die Zahl vor dem Doppelpunkt für die Anzahl der Kohlenstoffatome in der Fettsäure. Die Zahl hinter dem Doppelpunkt führt die Anzahl der Doppelbindungen auf und die hochgestellten Zahlen ihre Lage in der Fettsäurekette. Die Lage der Doppelbindungen wird in der Regel vom Carboxylende aus festgelegt und ist dann durch ein 'Δ' symbolisiert. Erfolgt die Bestimmung vom Methylende aus, so steht ein 'ω' vor den Ziffern. Da die Doppelbindungen in den meisten Fällen in der *cis*-Konfiguration vorliegen, wird auf eine besondere Hervorhebung verzichtet.

(siehe unten) mit reduzierten epicuticularen Wachsmengen weisen dementsprechend gleichzeitig eine männliche Sterilität auf. Andere Mutanten deuten weiterhin darauf hin, dass Oberflächenwachs eine wichtige Funktion bei anderen Entwicklungsprozessen (u. a. Stomataentwicklung) haben (Yephremov *et al.*, 1999; Pruitt *et al.*, 2000, Gray *et al.*, 2000).



Es wird vermutet, dass mehr als 30 enzymatische Schritte für die Biosynthese der Wachse notwendig sind (Post-Beittenmiller, 1996). Gesättigte VLCFAs sind dabei die Vorstufen vieler Wachskomponenten. Man unterscheidet drei verschiedene Biosynthesewege, die jeweils unterschiedliche Produkte hervorbringen (siehe Abbildung 1.3). Es ist aber noch nicht geklärt, ob die VLCFA-Substrate für die drei Biosynthesewege durch verschiedene Fettsäure-Elongationssysteme synthetisiert werden oder ob sie durch ein einziges System entstehen. Im Decarbonylierungsweg wird die VLCFA zunächst zum Aldehyd reduziert. Unter Abspaltung von Kohlenmonoxid entsteht dann ein

ungeradzahliger Kohlenwasserstoff, der innerhalb der Kette hydroxyliert werden kann. Der sekundäre Alkohol wird in einigen Fällen zu einem Keton oxidiert. Im Acyl-Reduktionsweg wird die VLCFA in zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen zunächst zum Aldehyd und dann zum primären Alkohol reduziert. Beide Reduktionsschritte werden durch das gleiche Enzym katalysiert, wobei das Carbonyl-Intermediat am Enzym gebunden bleibt. Somit unterscheidet sich das Enzym von der Reduktase aus dem Decarbonylierungsweg (Vioque & Kolattukudy, 1997). Der entstandene primäre Alkohol kann anschließend mit den VLCFAs verestert werden und die Wachsester ausbilden. Der dritte Weg wird als β -Ketoacyl-CoA-Elongation bezeichnet und führt zur Synthese von β -Diketonen und ihren Derivaten. Es ist hierbei unklar, wie die Wachskomponenten vom Ort ihrer Synthese in den Epidermiszellen an die Oberfläche gelangen. Ein intrazellulärer Transport über Lipid-Bindeproteine wird diskutiert, scheint aber eher unwahrscheinlich (Post-Beittenmiller, 1996). Auch ist noch nicht bekannt, ob die Wachskomponenten die Zellwand durch bestimmte Poren oder durch mikroskopisch kleine Räume passieren (Post-Beittenmiller, 1996).

Von Gerste, Mais und *A. thaliana* konnten zahlreiche Mutanten mit Veränderungen in Gehalt und Zusammensetzung der epicuticularen Wachse erzeugt werden (Post-Beittenmiller, 1996, Hannoufa *et al.*, 1993). Diese Mutanten lassen sich leicht durch Besprühen mit Wasser identifizieren, da sie durch die Reduktion in der Wachsschicht benetzt werden und eine glänzende (*glossy*) hellgrüne Erscheinung aufweisen. Mutanten von *Arabidopsis* und Gerste werden als *eceriferum* (*cer*) und die Maismutanten als *glossy* (*gl*) bezeichnet. Da die Mutanten Defekte in der Wachsbiosynthese aufweisen, stellen sie aussichtsreiche Kandidaten für die Identifizierung von Genen dar, die für die entsprechenden Enzyme kodieren. Einige der Gene konnten bereits kloniert werden, aber ein eindeutiger Funktionsnachweis ist aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Wachse und der scheinbaren Redundanz einiger biosynthetischer Schritte sehr schwierig. Aus *A. thaliana* konnte bisher lediglich die Funktion des *CER6*-Genproduktes eindeutig nachgewiesen werden (Fiebig *et al.*, 2000). Dieses Gen ist identisch mit *CUT1*, welches für eine β -Ketoacyl-CoA-Synthase kodiert und in die Biosynthese von gesättigten VLCFAs involviert ist (Millar *et al.*, 1999). *CER1* kodiert ebenfalls für ein Enzym, das direkt in die Biosynthese der Wachse involviert ist und möglicherweise eine Decarbonylase-Aktivität aufweist (Aarts *et al.*, 1995). Dagegen handelt es sich bei den *CER2*- und *CER3*-Genprodukten möglicherweise um regulatorische Proteine (Xia *et al.*, 1997; Mariani & Wolters-Arts, 2000). Auch die Funktionen einiger *glossy*-Gene aus Mais sind spekulativ. Für *glossy8* wird aufgrund von Sequenzhomologien vermutet, dass es für eine β -Ketoacyl-CoA-Reduktase kodiert und ebenfalls in die Elongation von Fettsäuren involviert ist (Xu *et al.*, 1997). Ein eindeutige Beweis steht hierfür aber noch aus.

1.1.6 Tiere und Menschen

Tiere und Menschen enthalten in verschiedenen Geweben hohen Mengen gesättigter und einfach ungesättigter sowie mehrfach ungesättigter VLCFAs. Gesättigte VLCFAs können in besonders hohen

Konzentrationen in den Sekreten einiger Talgdrüsen sowie im Gehirn und hier besonders in der Myelinschicht der Nervenzellen gefunden werden (Poulos, 1995). Darüber hinaus kommen gesättigte VLCFAs mit bis zu 24 Kohlenstoffatomen, wie bereits in Kapitel 1.1.4 erwähnt, in geringen Mengen in den Membranen vor.

In Säugetieren und auch im Menschen ist die pathologische Anreicherung gesättigter VLCFAs Ursache zahlreicher, zum Teil letaler Krankheiten. So ist die X-chromosomal-gekoppelte Erbkrankheit Adrenoleukodystrophy (ALD, Nebennierenentmarkungskrankheit) durch eine abnormale Akkumulation von 24:0 in der weißen Gehirnschicht und der Nebennierenrinde charakterisiert (Gärtner, 2000). Als Folge der Erhöhung des Gehalts an VLCFA kommt es bei den ALD-Patienten u. a. zu einer fortschreitenden Demyelinisierung der Nervenzellen und damit einhergehend zu einer neurodegenerativen Entwicklung, häufig bis zum Tod (Moser, 1997). Grund für die Anhäufung der gesättigten VLCFAs ist eine peroxisomale Funktionsstörung, die durch Mutationen im *ALD*-Gen ausgelöst wird (Gärtner *et al.*, 1998). Biochemisch ist die Krankheit durch einen Defekt im Abbau der VLCFAs gekennzeichnet, aber die genaue Funktion des *ALD*-Genproduktes ist noch ungeklärt. Das Ald-Protein weist Ähnlichkeiten zur Familie der ABC-Transporter auf (Mosser *et al.*, 1993), so dass es vermutlich am Import der VLCFAs in die Peroxisomen beteiligt ist. Allerdings wird ihm auch eine Rolle bei der Aktivierung der VLCFAs für die β -Oxidation zugeschrieben (Moser, 1997). Ebenso ist der kausale Zusammenhang zwischen der Anhäufung von gesättigten VLCFAs und den Symptomen der ALD (Destabilisierung der Myelinschicht) noch weitgehend unbekannt.

Eine ähnliche Akkumulation kann bei Patienten des Zellweger-Syndroms beobachtet werden. Diese Krankheit beruht aber nicht auf einer spezifischen Fehlfunktion beim Abbau von gesättigten VLCFAs, sondern ist auf einen Defekt in der Peroxisom-Biogenese zurückzuführen. Dieser wird durch Mutationen in Genen verursacht, die für Proteine des peroxisomalen Importapparates kodieren, so dass neben der β -Oxidation auch andere Stoffwechselprozesse betroffen sind (Gärtner, 2000). Interessanterweise führt die Krankheit zu einer Reduktion der VLC-PUFAs im Gehirn. Obwohl die Ursache hierfür noch nicht geklärt ist, deutet dies auf eine mögliche Involvierung der Peroxisomen in die Biosynthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren hin (Infante & Huszagh, 1997), auf die auch in einem späteren Kapitel eingegangen wird (siehe Kapitel 1.3.1).

VLC-PUFAs konnten in Gehirn, Hoden und Spermatozoen einiger Tiere nachgewiesen werden (Poulos, 1995). Dabei weisen diese Fettsäuren eine Kettenlänge von bis zu 36 Kohlenstoffatomen mit 4-6 methylenunterbrochenen Doppelbindungen auf. Darüber hinaus werden im Gehirn große Mengen 22:6 ^{Δ 4,7,10,13,16,19} akkumuliert. 22:6 ^{Δ 4,7,10,13,16,19} ist essentiell für das Wachstum und die funktionelle Entwicklung des Gehirns in Kindern und ist auch in Erwachsenen für die Aufrechterhaltung der Gehirnfunktionen notwendig (Horrocks & Yeo, 1999). Nach der Geburt ist es für die Zelldifferenzierung, die Synaptogenese und die Biogenese der Photorezeptormembran in großen

Mengen erforderlich (Scott & Bazan, 1989) und kann dort in den Membranen über 50 % der Fettsäuren in den Phospholipiden ausmachen. Darüber hinaus wird 22:6^{Δ4,7,10,13,16,19} wie auch einigen C₂₀-PUFAs eine positive Wirkung bei Behandlungen kardiovaskulärer Erkrankungen sowie Arthritis, Depression und einiger Krebsarten zugesprochen (Horrocks & Yeo, 1999). Für 20:4^{Δ5,8,11,14} konnte kürzlich außerdem gezeigt werden, dass es im Gehirn von Rindern und Ratten an Aminosäuren wie Glycin gebunden ist. Diesen bioaktiven Lipoaminosäuren wird eine Rolle bei der Unterdrückung von Entzündungsschmerzen zugeschrieben (Huang *et al.*, 2001).

C₂₀-PUFAs sind Vorstufen wichtiger Lipidmediatoren. Die vier wichtigsten Klassen dieser als Eicosanoide bezeichneten Botenstoffe sind die Prostaglandine, Prostacycline, Leukotriene und Thromboxane. Prostaglandine entstehen aus 20:3^{Δ8,11,14}, 20:4^{Δ5,8,11,14} oder 20:5^{Δ5,8,11,14,17} durch die Wirkung einer Cyclooxygenase (Prostaglandin-Synthase), wogegen eine Lipoxygenase für die Synthese der Leukotriene verantwortlich ist. Die Prostacycline und Thromboxane entstehen aus Prostaglandinen durch die zusätzliche Aktivität einer Prostacyclin-Synthase bzw. einer Thromboxan-Synthase. Die Wirkung der Eicosanoide ist in Abhängigkeit von der Natur der C₂₀-PUFA-Substrate unterschiedlich und z. T. antagonistisch. Bei der Immunabwehr wird den Prostaglandinen und Leukotrienen, die aus 20:3^{Δ8,11,14} und 20:5^{Δ5,8,11,14,17} entstehen, eine entzündungshemmende Wirkung zugesprochen, wogegen die Produkte von 20:4^{Δ5,8,11,14} entzündungsfördernd wirken (Fan & Chapkin, 1998). Außerdem inhibiert das 15-Lipoxygenase-Produkt der 20:3^{Δ8,11,14} die 5-Lipoxygenase, welche die Synthese von Leukotrienen aus 20:4^{Δ5,8,11,14} katalysiert. Eine generelle Wirkung kann den Eicosanoiden aber nicht zugeschrieben werden, da diese auch wesentlich von der Art der Zielzellen abhängt. Für die Inhibition der Proliferation von Zellen der glatten Muskulatur der Blutgefäße durch Prostaglandin 1 (welches aus 20:3^{Δ8,11,14} entsteht) wurde ein Modell entwickelt, wie die Mediatoren in ihren Zielzellen Effekte hervorrufen. Nach Bindung von Prostaglandin 1 an einen G-Proteingekoppelten Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzellen löst es eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die die Generierung von cAMP und eine Aktivierung einer Protein-Kinase A involviert, und so die Transkription von Genen reguliert (Fan & Chapkin, 1998).

Im Gegensatz zu Pflanzen, Pilzen und einigen niederen Tieren können die Säugetiere aufgrund des Fehlens einer Δ¹²- und Δ¹⁵-Desaturase in Fettsäuren keine Doppelbindungen zwischen einer bereits existierenden Doppelbindung und dem Methylen einbauen. Daher sind 18:2^{Δ9,12} und 18:3^{Δ9,12,15} essentielle Fettsäuren, die mit der Nahrung aufgenommen werden müssen. Allerdings sind die Säugetiere durchaus in der Lage, diese Fettsäuren weiter zu den C₂₀- und C₂₂-PUFAs umzusetzen, da die notwendigen Desaturasen und Elongasen exprimiert werden (siehe Kapitel 1.3.1). Allerdings stellen die geringen Aktivitäten dieser Enzyme limitierende Faktoren bei der Biosynthese von VLC-PUFAs dar, so dass eine zusätzliche Aufnahme von VLC-PUFAs mit der Nahrung sinnvoll ist.

1.2 Biosynthese von sehr langkettigen Fettsäuren

1.2.1 Biosynthese von Fettsäuren

Die Biosynthese von VLCFAs erfolgt an mikrosomalen Elongationskomplexen durch Elongation langkettiger Fettsäuren, die in Pflanzen *de novo* im Plastiden-Stroma aus Acetyl-CoA-Bausteinen gebildet werden. In den meisten Fällen stellen 16:0-ACP und 18:0-ACP die Endprodukte der Fettsäure-Biosynthese dar (Ohlrogge & Browse, 1995). Durch die Wirkung einer löslichen Stearoyl-ACP-Desaturase wird in der Regel an der Δ^9 -Position von 18:0-ACP eine Doppelbindung eingefügt, so dass als weiteres Produkt 18:1 $^{\Delta^9}$ -ACP entsteht. Diese Fettsäuren gehen anschließend entweder in die Biosynthese der plastidären Glycerolipide ein oder werden nach Hydrolyse durch eine Acyl-ACP-Thioesterase als freie Fettsäuren aus den Plastiden exportiert. Für die Bildung der plastidären Membranlipide werden die Acyl-Reste der Acyl-ACPs nacheinander mit der *sn*-1- und *sn*-2-Position von Glycerin-3-phosphat (G3P) verestert. Diese Reaktionen werden durch die Acyl-ACP:Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase (GPAT) sowie die *sn*-1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase (LPAAT) katalysiert. Aufgrund der Selektivitäten der plastidären Acyltransferasen wird in die *sn*-1-Position hauptsächlich 18:1 $^{\Delta^9}$ und in die *sn*-2-Position fast ausschließlich 16:0 eingebaut (Frentzen, 1993), so dass eine Fettsäureverteilung entsteht, welche aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den Cyanobakterien als prokaryot bezeichnet wird. Für die Synthese der plastidären Glycolipide wird die so entstandene Phosphatidsäure durch eine Phosphatase in das Diacylglycerin (DAG) überführt, an dessen *sn*-3-Position anschließend die Kopfgruppen übertragen werden. Monogalaktosyldiacylglycerin (MGD) und Sulfochinovosyldiacylglycerin (SQD) entstehen dabei jeweils aus DAG und UDP-Galaktose bzw. UDP-Sulfochinovose (Ohlrogge & Browse, 1995). Die Synthese von DGD erfolgt dagegen durch Übertragung eines weiteren Galaktose-Restes auf MGD. Die Klonierung einer UDP-Galaktose:MGD-Galaktosyltransferase zeigt, dass der Galaktose-Rest ebenfalls aus UDP-Galaktose stammt und möglicherweise nicht von einem anderen Molekül MGD übertragen wird (Froehlich *et al.*, 2001). Für die Bildung von Phosphatidylglycerin wird Phosphatidsäure zunächst in Cytidindiphosphat(CDP)-DAG umgewandelt, bevor die Glycerin-Kopfgruppe übertragen wird. Die Fettsäuren in den plastidären Membranlipiden stellen Substrate verschiedener Desaturasen dar. Eine Δ^3 -*trans*-Desaturase führt spezifisch am PG eine Δ^3 -*trans*-Doppelbindung in die 16:0 an der *sn*-2-Position ein (Browse *et al.*, 1985). Eine Δ^7 -Desaturase inseriert dagegen eine Δ^7 -*cis*-Doppelbindung in das 16:0 von MGD (Somerville & Browse, 1991). 16:1 $^{\Delta^7}$ und 18:1 $^{\Delta^9}$ können anschließend durch eine ω 6- und ω 3-Desaturase zu 16:2 $^{\Delta^7,10}$ bzw. 18:2 $^{\Delta^9,12}$ sowie 16:3 $^{\Delta^7,10,13}$ bzw. 18:3 $^{\Delta^9,12,15}$ desaturiert werden (Ohlrogge & Browse, 1995).

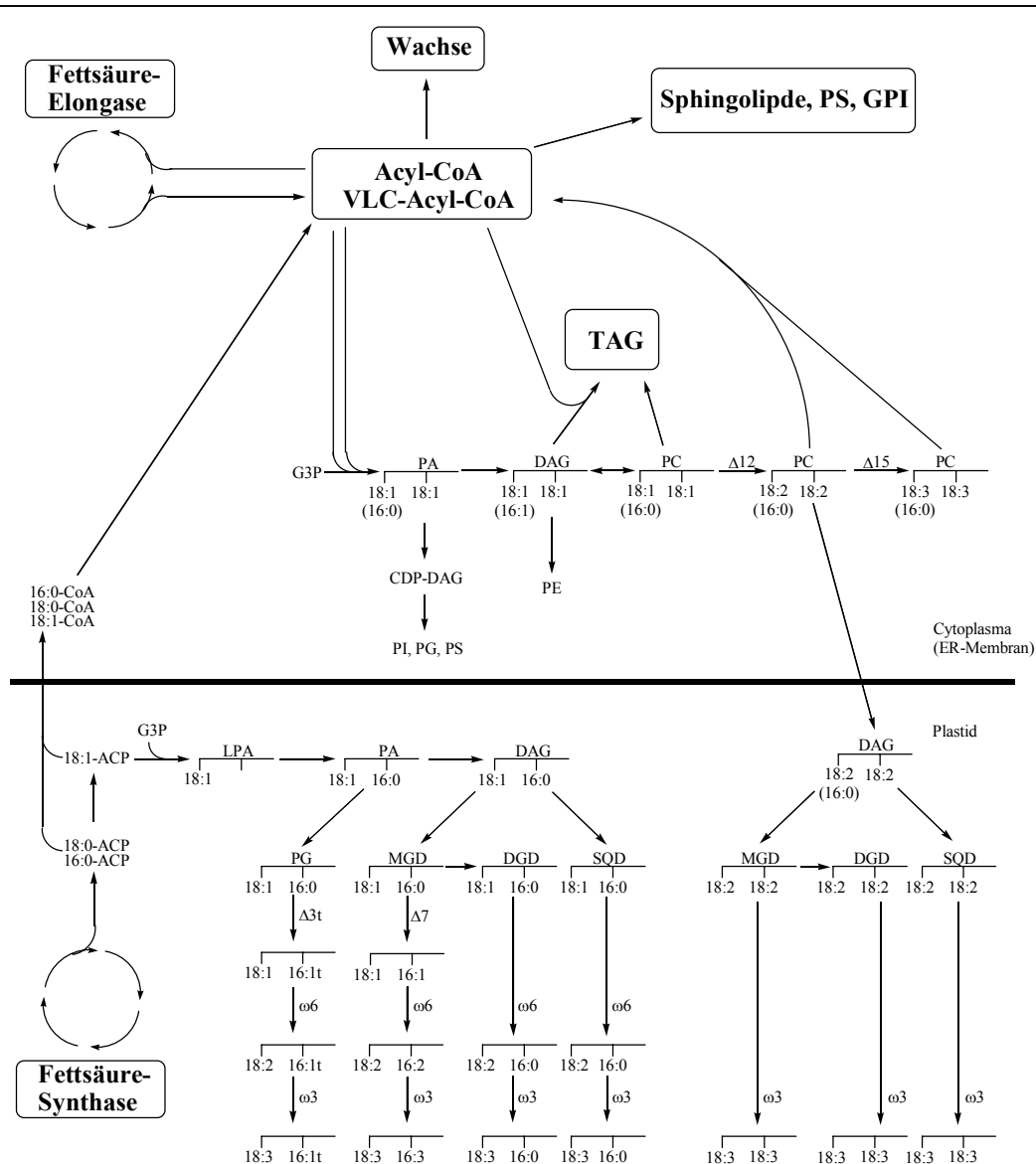


Abbildung 1.4. Fettsäure- und Lipidbiosynthese in höheren Pflanzen. Die Abbildung zeigt schematisch das Zusammenspiel von Plastiden und dem Cytoplasma (ER) bei der Biosynthese von Membranlipiden (nach Ohlrogge & Browse, Millar et al., 2000). Darüber hinaus sind auch Reaktionswege aufgeführt, die nur in spezialisierten Geweben stattfinden und zur Akkumulation von Wachsen oder Speicherlipiden führen. Die pflanzliche Fettsäure-Biosynthese ist im Stroma der Plastiden lokalisiert. Die Hauptendprodukte sind 16:0-, 18:0- und 18:1-ACP. Diese gehen entweder in die plastidäre Glycerolipidsynthese ein, wo sie weiteren, verschiedenen Desaturierungen unterworfen werden, oder sie werden nach Hydrolyse als freie Fettsäuren ins Cytosol exportiert, wo sie nach Aktivierung zu CoA-Thioestern in den cytoplasmatischen Acyl-CoA-Pool eingehen. Die Acyl-CoAs werden am ER im Zuge der mikrosomalen Membranlipid-Biosynthese mit dem Glycerol-3-phosphat verestert, wo sie ebenfalls zum Teil desaturiert werden. Außerdem werden aus ihnen in Speichergeweben die Triacylglycerole (TAG) gebildet. Darüber hinaus können die Acyl-Reste durch Fettsäure-Elongasen am ER zu den VLCFAs elongiert werden. Diese werden anschließend in die Sphingolipide und in geringen Anteilen in einige Phospholipide eingebaut. In Epidermiszellen stellen die VLCFA die Vorstufen zur Biosynthese der cuticularen Wachse dar und in einigen Ölsaaten werden sie in größeren Mengen in die TAGs eingebaut (siehe Kapitel 1.1.5), wobei die Biosynthese der TAGs auf unterschiedliche Weise erfolgen kann. Abkürzungen sowie eingehendere Beschreibungen der dargestellten und zusätzlicher Reaktionen sind im Text aufgeführt.

Die durch Hydrolyse der Acyl-ACPs freigesetzten und exportierten Fettsäuren der plastidären Fettsäure-Synthese werden an der äußeren Membran der Plastiden durch eine Acyl-CoA-Synthase zu Acyl-CoA-Thioestern aktiviert, die anschließend in verschiedene metabolische Prozesse eingehen können. Zum einen werden sie im Zuge der mikrosomalen Glycerolipidsynthese wie in den Plastiden mit der *sn*-1- und *sn*-2-Position des G3P verestert. Die Selektivität der *sn*-1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase im ER führt hierbei zu einem eukaryoten Fettsäuremuster in den Membranlipiden mit 18:1^{Δ⁹} in der *sn*-2-Position (Frentzen, 1993). Auch die Übertragung der Kopfgruppen erfolgt auf ähnliche Weise wie in den Plastiden. So entsteht aus CDP-DAG Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI) und PG, wogegen Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin aus DAG und CDP-Cholin bzw. CDP-Ethanolamin synthetisiert werden (Ohlrogge & Browse, 1995). Darüber hinaus ist eine Synthese von PC durch Methylierung von PE und einen Kopfgruppenaustausch von PE und PS möglich. Die 18:1^{Δ⁹}-Fettsäuren im PC sind im ER Substrat für die Δ¹²- sowie Δ¹⁵-Desaturase, so dass auch hier 18:2^{Δ^{9,12}} und 18:3^{Δ^{9,12,15}} gebildet werden (Ohlrogge & Browse, 1995). Dagegen findet keine Desaturierung von C₁₆-Fettsäuren statt. In einigen wenigen Angiospermen wie den *Boraginaceen* und in vielen niederen Pflanzen erfolgt noch die zusätzliche Einführung einer Δ⁶-Doppelbindung, so dass 18:3^{Δ^{6,9,12}} und 18:4^{Δ^{6,9,12,15}} entstehen (Gunstone, 1992). In vielen Pflanzen kommt es zu einem Reimport des DAG-Restes aus dem PC oder von Lyso-PC in die Plastiden (Ohlrogge & Browse, 1995; Mongrand *et al.*, 2000). Die Mechanismen hierfür sind noch unklar, sie führen aber dazu, dass in den plastidären Glycolipiden MGD, DGD und SQD sowohl eine prokaryote als auch eine eukaryote Fettsäureverteilung nachgewiesen werden kann (Ohlrogge & Browse, 1995). Die Fettsäuren werden aber nicht nur für die Biosynthese der Phosphoglycerolipide verwendet, sondern gehen auch in die Biosynthese von Sterolestern, acylierten Sterolglycosiden und Sphingolipiden ein (Wojciechowski, 1991; Lynch, 1993).

In den Triacylglycerinen sind alle 3 Positionen des Glycerins mit einer Fettsäure verestert. Ihre Biosynthese erfolgt auf unterschiedlichen Wegen. Zum einen kann eine dritte Fettsäure aus dem Acyl-CoA-Pool an der *sn*-3-Position des DAGs verestert werden. Diese Reaktion wird durch die *sn*-3-Diacylglycerin-Acyltransferase (DAGAT) katalysiert (Ohlrogge & Browse, 1995). Das DAG entsteht hierbei einerseits über den oben beschriebenen Weg durch sukzessive Veresterung der Fettsäuren an die *sn*-1- und *sn*-2-Position des Glycerin-3-phosphats und anschließende Umwandlung der PA in DAG durch die PA-Phosphatase. Andererseits ist auch eine Freisetzung des DAGs aus PC durch die reversible Aktivität der CDP-Cholin:DAG-Phosphocholyltransferase möglich (Millar *et al.*, 2000), wie es auch beim plastidären Reimport des DAGs vermutet wird. Die Tatsache, dass Phosphatidylcholin das Substrat für die Einführung funktioneller Gruppen wie Doppel- und Dreifachbindungen sowie Hydroxy- und Epoxygruppen ist, die auch oder z. T. ausschließlich in den Speicherlipiden der Pflanzen nachgewiesen werden können, macht zumindest die spezifische Freisetzung dieser Fettsäuren aus dem PC notwendig, um sie von den Membranlipiden auszuschließen (Millar *et al.*, 2000). Dies

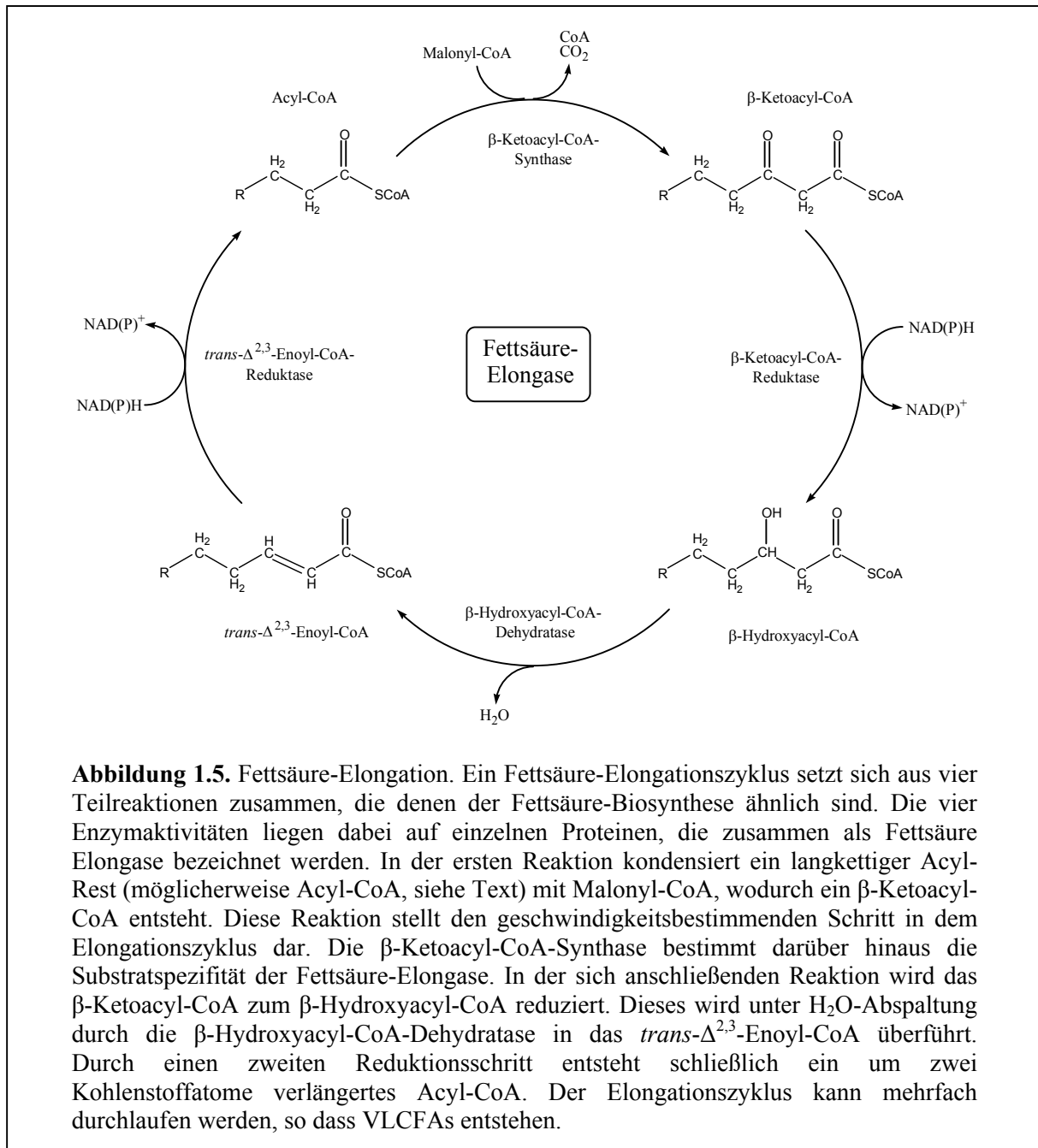
könnte alternativ auch durch die Wirkung von Phospholipasen (Stahl et al., 1995) oder einer *sn*-2-Lyso-PC-Acyltransferase erzielt werden. Letztere katalysiert in einer reversiblen Reaktion die Veresterung bzw. Hydrolyse von Fettsäuren an der *sn*-2-Position von PC und trägt so zur Aufrechterhaltung eines heterogenen Acyl-CoA-Pools bei. Obwohl diese Aktivität in Pflanzen, in *S. cerevisiae* und im Menschen nachgewiesen wurde (Stymne & Stobart, 1984; Bakken & Farstad, 1992; Richard & McMaster, 1998), konnte das entsprechende Gen noch nicht isoliert werden. Ein dritter möglicher Weg stellt die direkte Übertragung einer Fettsäure aus dem PC auf das DAG dar. Dieser Acyl-CoA unabhängige Acyltransfer wird durch die Phospholipid:DAG-Acyltransferase (PDAT) katalysiert und wurde u. a. in *Ricinus communis* charakterisiert, wo sie an der Inkorporation von Hydroxy- (Ricinolsäure) und Epoxyfettsäuren (Vernolsäure) in die TAGs beteiligt ist (Dahlqvist et al., 2000). Auch in *S. cerevisiae* existiert eine entsprechende Aktivität und das entsprechende Gen konnte hieraus kloniert werden (Dahlqvist et al., 2000).

Neben der Inkorporation in die Membran- und Speicherlipide sind die Acyl-Reste auch Substrate für die eingangs erwähnten mikrosomalen Fettsäure-Elongationskomplexe, die im nächsten Kapitel eingehender beschrieben werden. Die Produkte der Fettsäure-Elongation sind gesättigte sowie einfach ungesättigte VLCFAs, die als Acyl-CoAs wieder in verschiedene Biosyntheseprozesse eingehen. In Pflanzen, die in ihren Speicherlipiden VLCFAs akkumulieren, werden einfach ungesättigte VLCFAs in der Regel für die Biosynthese von TAGs verwendet. Über einen unbekannten Mechanismus erfolgt hierbei in den Speichergeweben ein Ausschluss der VLCFAs aus den Membranlipiden (Millar et al., 2000). Dennoch können gesättigte VLCFAs in geringen Mengen in einigen Membranlipiden wie Sphingolipiden, PS und dem DAG-Rest GPI-verankerter Proteine nachgewiesen werden (siehe Kapitel 1.1.4). In epidermalen Geweben dienen die gesättigten VLCFAs zusätzlich dem Aufbau der Cuticula, wo sie nach diversen Modifikationen für die Synthese der cuticularen und epicuticularen Wachse verwendet werden (siehe Kapitel 1.1.5).

1.2.2 Elongation von Fettsäuren

Wie bereits erwähnt, erfolgt die Biosynthese von VLCFAs an mikrosomalen Enzymsystemen in einem als Fettsäure-Elongation bezeichneten Prozess. Es handelt sich hierbei um einen der Fettsäure-Biosynthese ähnlichen Reaktionszyklus, bei dem mittel- und langkettige Fettsäuren durch Kondensation mit Malonyl-CoA um jeweils 2 Kohlenstoffatome verlängert werden. Die mittel- und langkettigen Acyl-Substrate stammen hierbei in Tieren und Pilzen aus der cytosolischen und in Pflanzen aus der plastidären Fettsäure-Biosynthese. Die einzelnen Reaktionen, die zur Elongation von Fettsäuren führen, konnten zuerst in Tieren aufgeklärt werden (Nugteren, 1965; Seubert & Podack, 1973; Bernert & Sprecher, 1977). Im ersten Schritt erfolgt die Kondensation des Acyl-Substrates mit Malonyl-CoA, wodurch unter Freisetzung von CO₂ ein β -Ketoacyl-CoA entsteht. Dieses wird in der darauffolgenden Reaktion zum β -Hydroxyacyl-CoA reduziert. Durch Dehydratation entsteht in der

dritten Reaktion aus dem β -Hydroxy-Intermediat ein *trans*- Δ^2 -Enoyl-CoA, welches in der abschließenden Reaktion zum Acyl-CoA reduziert wird.



Für Pflanzen wurde vordem lange Zeit ein gleicher Reaktionsweg vermutet, aber erst durch die Arbeiten von Lessire und Mitarbeitern sowie Fehling und Mukherjee konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Elongation von Fettsäuren in Pflanzen durch die gleichen Reaktionen erfolgt wie in Tieren. Lessire und Mitarbeiter zeigten in einem *in vitro*-Assay mit einer partiell gereinigten Acyl-CoA-Elongase aus Epidermiszellen von Lauch (*Allium porrum*), dass als erstes Zwischenprodukt ein β -Ketoacyl-CoA entsteht (Lessire *et al.*, 1989). Fehling und Mukherjee konnten durch ein ähnliches

Verfahren mit einer Membranfraktion aus Samen von *Lunaria annua* sogar alle Zwischenprodukte des Elongationszyklus nachweisen (Fehling & Mukherjee, 1991). Diese Ergebnisse wurden schließlich auch durch die Solubilisierung des Elongasekomplexes aus *Arabidopsis thaliana* bestätigt (Creach & Lessire, 1993). Letztere Studien deuteten zudem darauf hin, dass sich die Fettsäure-Elongasen aus einzelnen Enzymen zusammensetzen, die jeweils eine der Teilreaktionen katalysieren, und dass es sich bei ihnen, wie zunächst vermutet, nicht um multifunktionelle Proteine handelt (Agrawal und Stumpf, 1985).

Im Unterschied zur Fettsäure-Biosynthese sind die Substrate der Fettsäure-Elongasen im ER nicht mit einem Acyl-Carrier-Protein verestert. Während die Natur des Acyl-Substrates noch nicht aufgeklärt ist, stammt der C₂-Baustein bei der Kondensationsreaktion direkt aus Malonyl-CoA (und nicht Malonyl-ACP), welches durch eine cytosolische Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase) synthetisiert wird. In Tieren und in *S. cerevisiae* erfordert die Bereitstellung des Malonyl-Substrates für die cytoplasmatische Fettsäure-Biosynthese und für die mikrosomale Fettsäure-Elongation die Aktivität lediglich einer einzigen ACCase. Dementsprechend konnte für *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass eine Mutation im *ACCI*-Gen, welches für dieses Protein kodiert, zu einer Reduktion sowohl der *de novo* Synthese als auch der Fettsäure-Elongation führt (Schneider *et al.*, 1996). Aufgrund der Kompartimentierung der Fettsäure-Biosynthese und -Elongation und der Unpassierbarkeit der Plastidenhülle für Malonyl-CoA sind in Pflanzen dagegen mindestens zwei ACCasen erforderlich. Während in Dikotylen die cytosolische ACCase ein multifunktionelles Protein darstellt, bei dem alle Aktivitäten (d.h. Biotin-Carboxylase, Biotin-Carboxyl-Carrierprotein und Carboxyltransferase) auf einer Polypeptid-Kette liegen, sind diese Aktivitäten in der plastidären Form auf einzelne Proteine verteilt. Eine Ausnahme bilden die Gramineae, bei denen auch die plastidäre ACCase ein Multifunktionsprotein ist.

Die Natur des Acyl-Substrates ist dagegen weitgehend unklar. Agrawal und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Mikrosomen aus epidermalen Zellen von *A. porrum* in einem *in vitro*-System sowohl exogene Acyl-CoAs (Acyl-CoA-Elongation) als auch endogene Acyl-Substrate zu elongieren vermögen. Die Natur der endogenen Substrate war dabei unbekannt, ihre Elongation zeichnete sich aber durch eine absolute ATP-Abhängigkeit aus (ATP-abhängige Elongation; Agrawal *et al.*, 1984). Die ATP-abhängige Elongation der endogenen Substrate könnte auf die Synthese von Acyl-CoA-Substraten mit endogenem CoASH und freien Fettsäuren durch eine in den Mikrosomen vorhandene Acyl-CoA-Synthase zurückgeführt werden (Lessire & Cassagne, 1979). Die vollständige CoASH-Befreiung einer epidermalen Mikrosomenpräparation aus *A. porrum* führte tatsächlich zu einem kompletten Verlust der ATP-abhängigen Elongation. Durch die Zugabe von ATP und CoASH konnte dieser Effekt wieder rückgängig gemacht werden (Agrawal & Stumpf, 1985). Im Widerspruch hierzu stehen die Ergebnisse zahlreicher anderer Untersuchungen. So zeigten Hlousek-Radojcic und Mitarbeiter, dass in einem *in vitro*-Assay mit Ölkörpern von *B. napus* ausschließlich ATP als Cofaktor

für die Elongase notwendig ist und das CoASH zu keiner weiteren Stimulation führt (Hlousek-Radojcic *et al.*, 1995). In anderen Experimenten konnte sogar eine hemmende Wirkung von CoASH auf die Fettsäure-Elongation gemessen werden (Evenson & Post-Beittenmiller, 1995; Barrett & Harwood, 1998). Hlousek-Radojcic und Mitarbeiter konnten sogar eindeutig demonstrieren, dass die Elongation von Fettsäuren nicht von der Aktivität einer Acyl-CoA-Synthase abhängt. Interessanterweise zeigten sie jedoch, dass in Abwesenheit von CoASH in den Mikrosomen aus freien Fettsäuren dennoch Acyl-CoAs entstehen. Diese unbekannte CoASH-unabhängige Acyl-CoA-Synthase-Aktivität war auf das Vorhandensein von ATP und Malonyl-CoA oder Acetyl-CoA angewiesen. Es konnte jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob die so gebildeten Acyl-CoAs direktes Substrat für die Elongase sind (Hlousek-Radojcic *et al.*, 1998). Die Charakterisierung der ATP-abhängigen und Acyl-CoA-Elongation in Rapssamen führte außerdem zum Nachweis einer unterschiedlichen Wirkung von CoASH auf die beiden Elongationssysteme. Während die ATP-abhängige Elongation keinem CoASH-Einfluss unterliegt, sinkt die Aktivität der Acyl-CoA-abhängigen Elongase in Gegenwart von CoASH (Domergue *et al.*, 1999). Die Hemmung durch CoASH könnte darauf zurückgeführt werden, dass der Acyl-Rest des Acyl-CoAs, ähnlich wie bei der Fettsäure-Biosynthese, auf die Sulfhydrylgruppe eines Cysteins im aktiven Zentrum der β -Ketoacyl-CoA-Synthase übertragen wird (Abbadi *et al.*, 2000). Bei dieser Reaktion entsteht freies CoASH. Durch Zugabe von CoASH könnte so das Reaktionsgleichgewicht der Acyl-Übertragung in Richtung des Acyl-CoAs verschoben werden, und folglich würden geringere Mengen enzymgebundene Acylreste zur Kondensation mit dem Malonyl-CoA zur Verfügung stehen. Eine alternative Erklärung wäre, dass freies CoASH eine nicht-kovalente Bindung des Acyl-CoAs an das kondensierende Enzym kompetitiv hemmt. Die Tatsache, dass CoASH eine unterschiedliche Wirkung auf die ATP-abhängige und die Acyl-CoA-Elongation in Rapssamen hat, könnte darauf hindeuten, dass die beiden coexistierenden Aktivitäten durch unterschiedliche Elongationssysteme katalysiert werden (Domergue *et al.*, 1999). Ihre Wirkung ist unter den gewählten *in vitro*-Bedingungen allerdings nicht additiv, da optimale Bedingungen für jeweils eine Elongase die Aktivität der anderen hemmen. Darüber hinaus unterscheiden sich die beiden Elongationsarten dadurch, dass bei der Acyl-CoA-Elongation mehrere Elongationsrunden stattfinden, wohingegen die ATP-abhängige Elongation nur zur Verlängerung von Fettsäuren um eine C₂-Einheit führt (Agrawal & Stumpf, 1984).

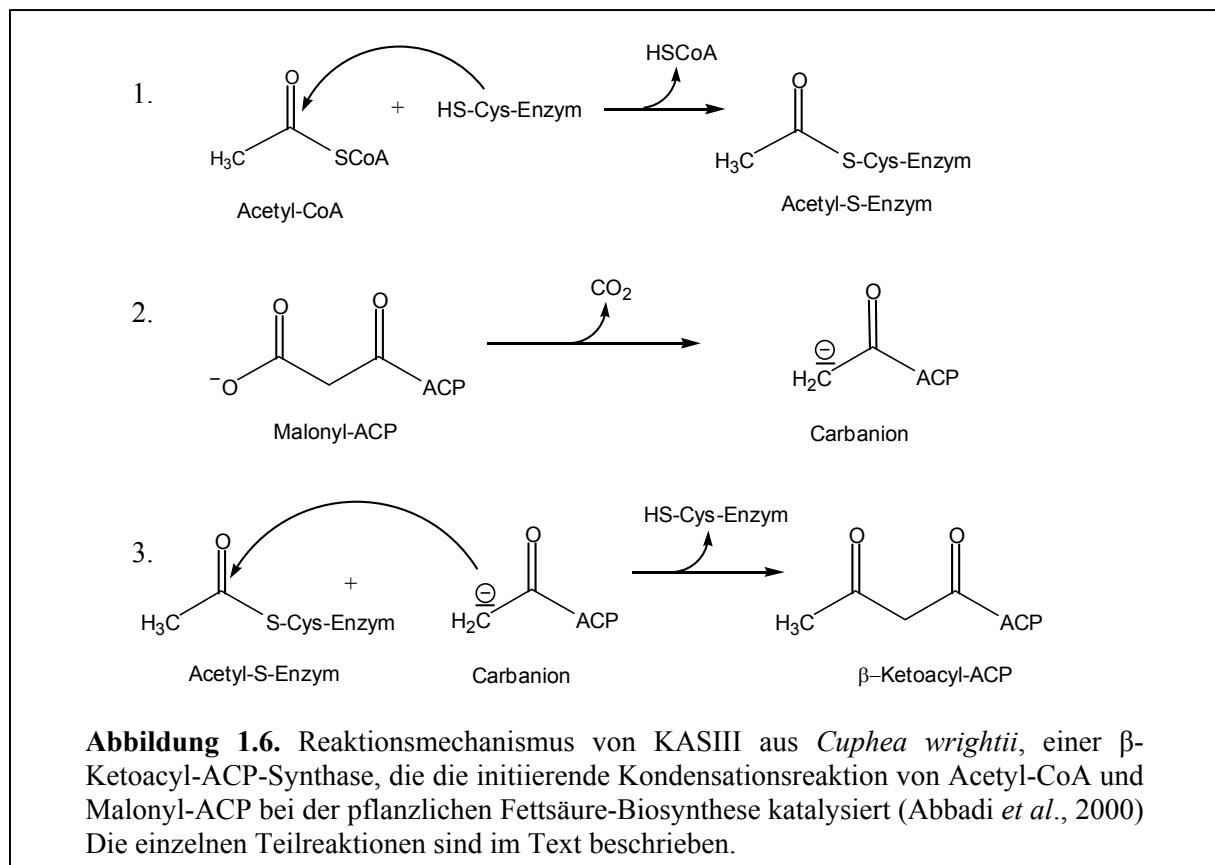
Die Ergebnisse von Hlousek-Radojcic und Mitarbeitern deuten weiterhin darauf hin, dass Acyl-CoA vermutlich in keinem Fall direktes Substrat für die Fettsäure-Elongation ist, sondern aus einem anderen metabolischen Pool stammt (Hlousek-Radojcic *et al.*, 1995). Die Vermutung basiert auf der Tatsache, dass radioaktive Acyl-CoAs in einem *in vitro*-System mit Ölkörpern von Raps sehr schnell in die Glycerolipide (v.a. PC) inkorporiert werden. Diese Inkorporation, welche gleichzeitig einen Verlust an möglichem Acyl-CoA-Substrat für die Elongase darstellt, hatte aber keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der Elongase. Sie vermuten, dass die radioaktiven Acyl-Reste des Acyl-

CoAs in einen intermediären Pool eintreten und erst dann elongiert werden. Bestätigt wird dies dadurch, dass die spezifische Aktivität des radioaktiv Substrates größer ist als die des Elongationsproduktes. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Radioaktivität des Substrates durch das Eintreten in den intermediären Pool durch endogene Acylreste verdünnt wird. Die ATP-Abhängigkeit könnte dabei entweder im Eintritt des Acyl-CoAs in den intermediären Pool oder in der Übertragung des Acyl-Restes auf die Elongase begründet sein. Ein solcher Pool könnte nach Hlousek-Radojcic und Mitarbeitern Phosphatidylcholin darstellen, das auch ein Reservoir für Acyl-Modifikationen (z.B. Desaturierung) darstellt. Außerdem spielt PC eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung eines heterogenen Acyl-CoA-Pools und ist in höheren Pflanzen am Reimport von Diacylglycerin und Lyso-PC in die Chloroplasten beteiligt. So wäre es nicht überraschend, wenn die Acyl-Substrate für die Elongation ebenfalls aus dem PC kommen. Dabei ist aber nicht klar, ob PC-gebundene Acyl-Reste direkt das Substrat darstellen oder auf einen anderen Träger übertragen werden, bevor sie elongiert werden (Hlousek-Radojcic *et al.*, 1995). Die Tatsache, dass Mikrosomen und Ölkörper sehr heterogene Gemische zahlreicher, noch unbekannter Enzymaktivitäten darstellen, verhindert die Aufklärung der Frage nach der Natur des Acyl-Substrates auf diesem Weg. Eindeutigere Ergebnisse könnten durch die Reinigung der β -Ketoacyl-CoA-Synthase erzielt werden. Erste Ansätze in diese Richtung wurden von Blacklock und Mitarbeitern unternommen, die verschiedene β -Ketoacyl-CoA-Synthasen aus *Arabidopsis* mit einem His-Tag fusionierten, in einem heterologen System überexprimierten und die rekombinanten Proteine isolierten. Erstaunlicherweise diente den aufgereinigten Enzymen in einem *in vitro*-Assay Acyl-CoA als direktes Substrat (Blacklock *et al.*, 2001).

Die aus den biochemischen Untersuchungen gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass in Pflanzen möglicherweise unterschiedliche Elongationsenzyme existieren, die verschiedene Acyl-Substrate akzeptieren und die sich auch im Bedarf von Cofaktoren unterscheiden. Über diesen Ansatz wurde jedoch nicht geklärt, ob es sich tatsächlich um unterschiedliche Elongationsenzyme handelt. Erst die Isolierung und biochemische Charakterisierung weiterer Elongationsenzyme könnte Aufschluss darüber geben, ob z. B. die Acyl-CoA- bzw. ATP-abhängige Elongation auf die Existenz verschiedener Elongationsenzyme zurückzuführen ist.

Auch über den durch die β -Ketoacyl-CoA-Synthase der Fettsäure-Elongasen katalysierten Reaktionsmechanismus besteht noch größtenteils Unklarheit. Für die β -Ketoacyl-ACP-Synthasen (KAS) der pflanzlichen plastidären Fettsäure-Biosynthese wird ein Reaktionsmechanismus aus drei Teilreaktionen postuliert, der anhand von KASIII kurz beschrieben werden soll (siehe Abbildung 1.6). KASIII katalysiert die initiiierende Kondensationsreaktion von Acetyl-CoA und Malonyl-ACP durch:

1. Transfer des Acetyl-Restes von Acetyl-CoA auf ein Cystein im katalytischen Zentrum des Enzyms durch nucleophilen Angriff der Sulfhydrylgruppe des Cysteins auf die Carbonyl-Gruppe des Acetyl-CoAs.
2. Bildung eines Carbanions durch Decarboxylierung von Malonyl-ACP.
3. Nucleophiler Angriff des Carbanions auf das Carbonyl-Atom des Thioesters des enzymgebundenen Acyl-Restes, Bildung des β -Ketoacyl-ACPs unter Lösung des Thioesters am Cystein.



Ob im ER die Kondensation des Malonyl-CoA mit dem Acyl-Substrat durch die β -Ketoacyl-CoA-Synthase der Elongasen auf die gleiche Weise erfolgt, konnte noch nicht bewiesen werden. Zahlreiche Inhibitoren wurden in *in vitro*-Studien verwendet, um reaktive Aminosäure-Reste der Elongationsenzyme zu detektieren. Cerulenin, ein effektiver Inhibitor der β -Ketoacyl-ACP-Synthase II (KAS II) der plastidären Fettsäure-Biosynthese, führte in Lauch ebenfalls zu einer nicht-kompetitiven Hemmung der extraplastidären β -Ketoacyl-CoA-Synthase der Fettsäure-Elongation. Allerdings ist die Hemmung nicht so stark wie bei KAS II und erfordert wesentlich höhere Konzentrationen des Inhibitors (Schneider *et al.*, 1993). Die Wirkung des Cerulenins basiert vermutlich auf einer kovalenten Bindung an die Sulfhydrylgruppe eines Cysteins im aktiven Zentrum der Kondensationsenzyme. Eine mögliche Beteiligung von Thiolgruppen an der Elongation wurde auch

aufgrund von Hemmstudien mit *p*-Chloromercuribenzoat und Iodoacetamid vermutet (Agrawal & Stumpf, 1985). Markierungsexperimente mit radioaktivem Iodoacetamid zeigten außerdem, dass es sich spezifisch um die Thiolgruppe eines Cysteins handelte (Agrawal & Stumpf, 1985), so dass die Kondensation der langkettigen Acyl-Substrate mit Malonyl-CoA durch die pflanzlichen β -Ketoacyl-CoA-Synthasen möglicherweise durch den gleichen Reaktionsmechanismus erfolgt, wie bei der Fettsäure-Biosynthese.

Auch die Reaktionen der Nachfolgeenzyme der β -Ketoacyl-CoA-Synthase sind noch weitgehend uncharakterisiert. So erfordert ein vollständiger Elongationszyklus die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für die Reduktion des β -Ketoacyl-CoAs und des *trans*- $\Delta^{2,3}$ -Enoyl-CoAs. Hierbei fungieren sowohl NADPH als auch NADH als Elektronendonatoren, wobei NADPH der bevorzugte Donor ist (Domergue *et al.*, 1998). Auch ist noch nicht eindeutig geklärt, ob und inwieweit die mikrosomalen Elektronentransportketten $\text{NADH} \rightarrow \text{Cytochrom } b_5\text{-Reduktase} \rightarrow \text{Cytochrom } b_5$ sowie $\text{NADPH} \rightarrow \text{Cytochrom P450 Reduktase} \rightarrow \text{Cytochrom P450}$ und Vernetzungen dieser beiden Transportwege an der Bereitstellung der Reduktionsäquivalente beteiligt sind (Nagi *et al.*, 1983). Untersuchungen von Demirkapi und Mitarbeitern deuten in Säugetieren auf einen direkten Transfer der Elektronen von NAD(P)H auf die beiden Reduktasen hin (Demirkapi *et al.*, 1991).

Durch die *in vitro*-Experimente wurde zudem deutlich, dass in Pflanzen zahlreiche Elongationssysteme existieren, die sich nicht nur in ihrer räumlichen und zeitlichen Expression, sondern auch in ihrer Substratspezifität unterscheiden (Agrawal & Stumpf, 1985). Es ist naheliegend zu vermuten, dass die Spezifität hierbei durch die β -Ketoacyl-CoA-Synthase bestimmt wird, da sie die erste Reaktion bei der Fettsäure-Elongation katalysiert. Zahlreiche Gene konnten in den letzten Jahren aus diversen Pflanzen identifiziert und kloniert werden, die für diese Komponente der Elongasen kodieren. So gelang James und Mitarbeitern als ersten die Klonierung des *FAEI*-Gens aus *A. thaliana* durch Insertion des transponierbaren Elements *Activator* (*Ac*) aus Mais (James *et al.*, 1995). Die Insertion des *Ac*-Elements in den *FAEI*-Locus führte zu einem vollständigen Verlust von 20:1 Δ^{11} und 22:1 Δ^{13} in den Samen von *A. thaliana*. Sequenzanalysen ergaben signifikante Ähnlichkeiten von FaeI zu Chalcon- und Stilben-Synthasen sowie KASIII-Enzymen aus *E. coli* und Spinat, die alle Kondensationsreaktionen von Malonyl-Thioestern und CoA-Startermolekülen katalysieren, so dass für das *FAEI*-Genprodukt eine Aktivität als β -Ketoacyl-CoA-Synthase vorhergesagt wurde (James *et al.*, 1995). Weiterhin führte die heterologe Expression von *FAEI* in *S. cerevisiae* und in den Samen von Tabak (*N. tabacum*) zu einer Akkumulation von C₂₀- und C₂₂-Fettsäuren in diesen Organismen und verdeutlicht, dass die Selektivität der Fettsäure-Elongasen durch die β -Ketoacyl-CoA-Synthase bestimmt wird (Millar & Kunst, 1997). Die samenspezifische Überexpression des *FAEI*-Gens in *A. thaliana* selbst resultierte in einer weiteren Zunahme des Anteils von VLCFAs in den Speicherlipiden, so dass das kondensierende Enzym auch die Aktivität der Elongasen limitiert (Millar & Kunst, 1997). Interessanterweise führte die ectopische Expression des *FAEI*-Gens in vegetativen Geweben zur

Akkumulation von VLCFAs in den Membranlipiden (Millar *et al.*, 1998), obwohl in Pflanzen normalerweise Mechanismen (z. B. die Spezifität von Acyltransferasen oder Lipasen) existieren, die zu einem Ausschluss ungewöhnlicher Hydroxy- oder kurzkettiger Fettsäuren aus den Membranen führen und so eine Aufrechterhaltung der Integrität und Struktur von Membranen gewährleisten (van de Loo *et al.*, 1993; Millar *et al.*, 2000). Übereinstimmend mit der Funktion von VLCFAs bei der Stabilisierung stark gekrümmter Membranbereiche (siehe Kapitel 1.1.4) war die Akkumulation von VLCFAs in den Membranlipiden dieser Pflanzen mit einer dramatischen Veränderung der Struktur der Thylakoid-Membran assoziiert, welche starke Krümmungen aufwies (Millar *et al.*, 1998).

Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu *FAEI* konnten mittlerweile auch aus *B. napus* sowie *B. juncea* die homologen Gene kloniert und charakterisiert werden (Venkateswari, *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2001). Außerdem gelang die Isolierung eines *KCS*-Gens aus *Simmondsia chinensis*, welches ebenfalls für eine β -Ketoacyl-CoA-Synthase kodiert und für die Akkumulation von VLCFAs in den Wachsen des Jojoba-Öls verantwortlich ist und dessen Überexpression in den Samen VLCFAs-freier Rapspflanzen zu einer Wiederherstellung des ursprünglichen VLCFAs-Anteils in den Speicherlipiden von *B. napus* führte (Lassner *et al.*, 1996). Darüber hinaus konnte aus *Limnanthes douglasii* ein *KCS*-Gen isoliert werden, welches an der Biosynthese von 20:1 ^{Δ^5} beteiligt ist (Cahoon *et al.*, 2000; Sandager & Stymne, 2000). Durch Coexpression mit der Δ^5 -Desaturase gelang es, den Biosyntheseweg dieser Fettsäure in somatischen Embryonen von Soja (*Glycine max*) heterolog zu rekonstituieren (Cahoon *et al.*, 2000). Kürzlich gelang zudem die Klonierung eines Gens, das für eine β -Ketoacyl-CoA-Synthase ungewöhnlicher Substratspezifität kodiert. Diese ist in *Lesquerella fendleri* in die Elongation von Fettsäuren involviert, die eine Hydroxygruppe aufweisen (Moon *et al.*, 2001).

Neben diesen samenspezifischen β -Ketoacyl-CoA-Synthasen konnten aus *A. thaliana* auch Gene kloniert werden, die in die Biosynthese von VLCFAs in epidermalen Geweben involviert sind. So führte die Insertion eines Transposons in das *KCSI*-Gen zu einer dramatischen Reduktion des Anteils der C₂₆-C₃₀ Alkohole, der C₃₀-Aldehyde sowie der C₂₉-Alkane in den cuticularen Wachsen dieser Pflanzen, die wiederum durch Modifikationen aus den VLCFAs entstehen (siehe Kapitel 1.1.5). Diese Reduktion führte in den Pflanzen zu einer geringeren Resistenz gegenüber Wasserstress (Todd *et al.*, 1999). Die Tatsache, dass die Mutation in dem *KCSI*-Gen aber nicht zu einem vollständigen Verlust der Wachskomponenten führte, zeigt, dass die Elongationsaktivität in den Epidermiszellen eine Redundanz aufweist. Außerdem verdeutlicht die gleichzeitige Reduktion der Alkohole und der Alkane, dass das *KCSI*-Gen für die Bereitstellung von VLCFAs sowohl für den Acyl-Reduktionsweg als auch für den Decarbonylierungsweg verantwortlich ist. Auch *CUT1* ist in den Epidermiszellen von *A. thaliana* in die Biosynthese von gesättigten VLCFAs mit mindestens 26 Kohlenstoffatomen involviert. Sense-Suppression der Expression von *CUT1* führte in den transgenen Pflanzen ebenfalls zu einer Reduktion der Wachskomponenten. Den Pflanzen fehlten sämtliche epicuticularen Wachskristalle. Außerdem zeichneten sie sich durch eine männliche Sterilität aus (Millar *et al.*, 1999). Die Pflanzen

wiesen somit einen den *eceriferum*-Mutanten ähnlichen, veränderten Phänotyp auf (siehe Kapitel 1.1.5).

Mit dem mittlerweile abgeschlossenen genomischen Sequenzierungsprojekt und verschiedenen EST-Sequenzierungsprojekten von *A. thaliana* kann die Existenz von mindestens 21 β -Ketoacyl-CoA-Synthasen postuliert werden (Mekhedov, *et al.*, 2000). Dies hebt die komplexe Natur der Biosynthese von VLCFAs mit verschiedenen β -Ketoacyl-CoA-Synthasen hervor, die in ihrer Spezifität und Aktivität divergieren. Die *KCS*-Gene unterscheiden sich zudem deutlich in ihrer zeitlichen und räumliche Expression und sind an verschiedenen Biosyntheseprozessen wie der Produktion von Wachsen und Speicherlipiden beteiligt. So konnte für das *HIC*-Gen, welches ebenfalls für eine β -Ketoacyl-CoA-Synthase kodiert, eine ausschließliche Expression in den Schließzellen der Stomata demonstriert werden (Gray *et al.*, 2000). Den Kcs-Proteinen ist ein konserviertes Cystein gemeinsam, welches möglicherweise auch für ihre katalytische Aktivität essentiell ist. Ghanevati und Jaworski konnten tatsächlich zeigen, dass ein Austausch dieser Aminosäure durch Alanin zu einem vollständigen Verlust der Elongationsaktivität von Fae1 aus *A. thaliana* führte (Ghanevati & Jaworski, 2001).

Darüber hinaus konnten Gene aus nichtpflanzlichen Organismen wie *S. cerevisiae* kloniert werden, die ebenfalls in die Biosynthese von VLCFAs involviert sind. Die Isolierung von *ELO1* basierte auf der Komplementation von *fas2*-Mutanten durch Myristinsäure (14:0). In diesen Mutanten ist das *FAS2*-Gen deletiert, welches für eine der beiden Untereinheiten der Fettsäure-Synthase kodiert. Als Resultat sind die Hefen nicht mehr in der Lage, Fettsäuren *de novo* zu synthetisieren. Dennoch wird die inkorporierte 14:0 in diesen Zellen elongiert, so dass 16:0 und 18:0 sowie die entsprechenden einfach ungesättigten Fettsäuren 16:1 ^{Δ^9} und 18:1 ^{Δ^9} entstehen. Die zusätzliche Mutation oder Deletion des *ELO1*-Gens führte zu einem Verlust der Elongationsaktivität mit 14:0. Die *fas2/elo1*-Doppelmutanten sind aber in Gegenwart von 16:0 lebensfähig, und elongieren diese Fettsäure weiterhin (Toke & Martin, 1996; Dittrich *et al.*, 1998). Dies zeigt, dass *ELO1* spezifisch für die Elongation von 14:0 nach 16:0 verantwortlich ist und dass zusätzliche Elongationssysteme in der Hefe existieren, die für die Elongation von langkettigen und sehr langkettigen Fettsäuren verantwortlich sind. In einem späteren Ansatz konnte gezeigt werden, dass *ELO1* auch zur Elongation von 14:1 ^{Δ^9} führt (Schneiter *et al.*, 2000). Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten erfolgte schließlich die Identifizierung und Klonierung von *ELO2* und *ELO3*, die in die Elongation der langkettigen und sehr langkettigen Fettsäuren involviert sind (Oh *et al.*, 1997). Hierbei ist Elo2 für die Elongation von 16:0 nach 24:0 verantwortlich. Elo3 hat eine mit Elo2 überlappende Substratspezifität, ist aber für die Elongation von 24:0 nach 26:0 essentiell. Die Deletion eines der beiden Gene resultierte in einem signifikanten Verlust der Elongationsaktivität und ging mit einer Reduktion in der Biosynthese der komplexen Sphingolipide sowie einer Akkumulation der Intermediate Phytosphingosin und Dihydrosphingosin einher (Oh *et al.*, 1997). Die Letalität einer *elo2/elo3*-Doppelmutante verdeutlicht hierbei die

essentiellen Funktionen von VLCFAs in den Hefen. Mittlerweile konnten auch die zu *ELO1*, *ELO2* und *ELO3* homologen Gene aus Maus kloniert werden (Tvrdik *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2001).

Die Elo-Proteine aus *S. cerevisiae* und Maus weisen keine Aminosäure-Sequenzähnlichkeiten zu den pflanzlichen β -Ketoacyl-CoA-Synthasen auf. Auch ein für die katalytische Aktivität der pflanzlichen Enzyme essentielles Cystein kann in der Primärstruktur der Elo-Proteine nicht detektiert werden. Dennoch zeigten Moon und Mitarbeiter in einem *in vitro*-Assay mit Mikrosomen menschlicher Zelllinien, die das *ELO1*-homologe *LCB*-Gen aus Maus exprimieren, dass durch die Wirkung des rekombinanten Lcb-Proteins in Abwesenheit von Reduktionsäquivalenten ein β -Ketoacyl-CoA entsteht (Moon *et al.*, 2001). Folglich katalysieren sowohl Kcs- als auch Elo-ähnliche Proteine die initiiierende Kondensationsreaktion bei der Fettsäure-Elongation. Die fehlende Verwandtschaft zwischen den Elo- und Kcs-Enzymen deutet dabei auf zwei unterschiedliche Reaktionsmechanismen hin. Die Ursachen für diese anscheinend konvergente Entwicklung im ersten Schritt der Fettsäure-Elongation ist unbekannt und wird in einem späteren Kapitel dieser Dissertation diskutiert. Die Existenz von Elo- und Kcs-Enzymen ist aber keine Erklärung für die unterschiedlichen Daten der biochemischen Untersuchungen (siehe oben), da Mutationen im *FAEI*-Gen aus *B. napus* zu einem Ausfall sowohl der Acyl-CoA- als auch der ATP-abhängigen Elongation führen (Roscoe *et al.*, 2001).

Neben diesen Proteinen, die die Kondensationsreaktion bei der Elongation gesättigter und/oder einfach ungesättigter Fettsäuren katalysieren, konnten in den letzten Jahren verschiedene Gene aus *M. alpina*, *C. elegans* und Mensch isoliert werden, die in die Elongation von PUFAs involviert sind (Beaudoin *et al.*, 2000; Leonard *et al.*, 2000; Parker-Barnes *et al.*, 2000). Die kodierten Proteine weisen ebenfalls keine Sequenzähnlichkeiten zu den pflanzlichen Kcs-Enzymen auf und gehören zur Elo-Proteinfamilie.

Dagegen sind die Gene, die in die nachfolgenden Reaktionen involviert sind, weitgehend unbekannt. Für das *glossy8*-Gen aus *Z. mays* wird angenommen, dass es für eine β -Ketoacyl-CoA-Reduktase kodiert (siehe Kapitel 1.1.5). Allerdings steht für dieses Gen ein eindeutiger Funktionsnachweis noch aus. Darüber hinaus konnten Kohlwein und Mitarbeiter aus *S. cerevisiae* ein Gen isolieren, das vermutlich für die *trans*- $\Delta^{2,3}$ -Enoyl-CoA Reduktase kodiert (Kohlwein *et al.*, 2001).

1.3 Biosynthese von VLC-PUFAs

Die Biosynthese von VLC-PUFAs kann prinzipiell auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen. In VLC-PUFA-produzierenden Bakterien und auch in einigen eukaryoten Mikroorganismen erfolgt ihre Biosynthese *de novo* auf anaerobem Weg durch Polyketid-Synthasen aus den Bausteinen Acetyl-ACP und Malonyl-ACP. In Eukaryoten entstehen VLC-PUFAs dagegen aus vorgeformten langkettigen Fettsäuren durch sauerstoffabhängige Desaturasen und Elongationsenzyme. Im Folgenden soll zunächst auf die eukaryote Synthese eingegangen werden.

1.3.1 Biosynthese von VLC-PUFAs in Eukaryoten

Im Gegensatz zur Elongation gesättigter und einfach ungesättigter Fettsäuren, bei der die Acyl-Substrate mehrere Elongationszyklen durchlaufen können, erfordert die Biosynthese von VLC-PUFAs in Eukaryoten die alternierende Wirkung von Elongasen und Desaturasen. Dabei können in verschiedenen eukaryoten Organismen unterschiedliche Reaktionswege realisiert werden, die in Abbildung 1.7 schematisch dargestellt sind.

Für die Biosynthese der C₂₀-PUFAs Arachidonsäure (20:4^{Δ^{5,8,11,14}}) und Eicosapentaensäure (20:5^{Δ^{5,8,11,14,17}}) sind ausgehend von Linolsäure (18:2^{Δ^{9,12}}) bzw. α-Linolensäure (18:3^{Δ^{9,12,15}}) zwei Desaturierungsschritte und ein Elongationszyklus notwendig. In den meisten VLC-PUFA-produzierenden Organismen wird in diese beiden Fettsäuren zunächst eine zusätzliche Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 6 und 7 eingefügt. Die Reaktion ist sauerstoffabhängig und erfordert die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten. Die Elektronen werden hierbei von NADH bereitgestellt und über das Flavoprotein NAD(P)H:Cytochrom-*b*₅-Oxidoreduktase auf Cytochrom *b*₅ übertragen, welches bei allen mikrosomalen Desaturasen als direkter Elektronendonator genutzt wird (Sperling & Heinz, 2001). Die hierfür notwendige Δ⁶-Desaturase konnte mittlerweile aus Pilzen, Pflanzen und Tieren kloniert werden (siehe Tabelle 1.1). Diese Enzyme zeichnen sich gegenüber den mikrosomalen Δ¹²- und Δ¹⁵-Desaturasen der Pflanzen dadurch aus, dass sie Fusionsproteine aus einer N-terminalen Cytochrom *b*₅-Domäne und einer C-terminalen Desaturase-Domäne darstellen. Die Enzyme benötigen dementsprechend kein freies Cytochrom *b*₅ für die Bereitstellung der Elektronen (Sperling & Heinz, 2001). Im nächsten Schritt werden die Desaturierungsprodukte γ-Linolensäure (18:3^{Δ^{6,9,12}}) und Stearidonsäure (18:4^{Δ^{6,9,12,15}}) carboxyterminal um jeweils zwei Kohlenstoffatome verlängert. Wie im vorangehenden Kapitel eingehend erläutert, erfordert diese Elongationsreaktion die Aktivität von vier Enzymen, die zusammen als Δ⁶-Elongase bezeichnet werden, wobei die Spezifität und Aktivität durch das initiiierende Kondensationsenzym bestimmt wird. Die Identifizierung und Klonierung von Genen, die für dieses Enzym kodieren, stand zu Beginn dieser Doktorarbeit noch aus und war das Ziel dieser Arbeit. Mittlerweile konnten aber auch Gene aus verschiedenen nichtpflanzlichen Organismen kloniert werden, die in die Elongation dieser PUFAs involviert sind (siehe Tabelle 1.1). Der abschließende Schritt in der Biosynthese von 20:4^{Δ^{5,8,11,14}} und 20:5^{Δ^{5,8,11,14,17}} ist die Einführung einer weiteren Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 5 und 6 in die Elongationsprodukte Di-homo-γ-Linolensäure (20:3^{Δ^{8,11,14}}) bzw. Di-homo-γ-Stearidonsäure (20:4^{Δ^{8,11,14,17}}). Die hierfür notwendige Δ⁵-Desaturase ist wie die Δ⁶-Desaturase ein Cytochrom *b*₅-Fusionsprotein, und die hierfür kodierenden Gene konnten aus Pilzen und Tieren kloniert werden (siehe Tabelle 1.1).

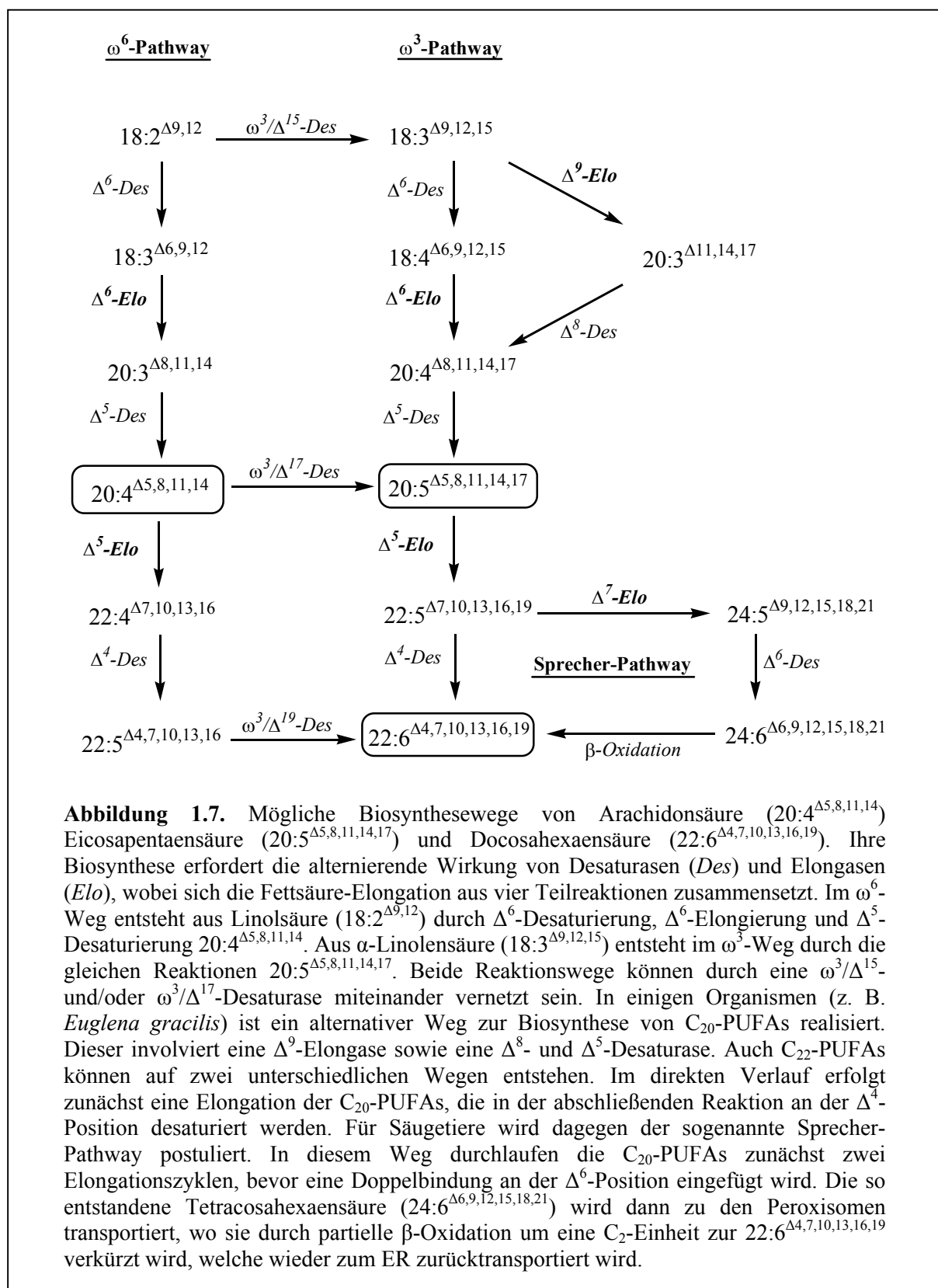


Abbildung 1.7. Mögliche Biosynthesewege von Arachidonsäure (20:4^{Δ5,8,11,14}), Eicosapentaensäure (20:5^{Δ5,8,11,14,17}) und Docosahexaensäure (22:6^{Δ4,7,10,13,16,19}). Ihre Biosynthese erfordert die alternierende Wirkung von Desaturasen (*Des*) und Elongasen (*Elo*), wobei sich die Fettsäure-Elongation aus vier Teilreaktionen zusammensetzt. Im ω⁶-Weg entsteht aus Linolsäure (18:2^{Δ9,12}) durch Δ⁶-Desaturierung, Δ⁶-Elongierung und Δ⁵-Desaturierung 20:4^{Δ5,8,11,14}. Aus α-Linolensäure (18:3^{Δ9,12,15}) entsteht im ω³-Weg durch die gleichen Reaktionen 20:5^{Δ5,8,11,14,17}. Beide Reaktionswege können durch eine ω³/Δ¹⁵- und/oder ω³/Δ¹⁷-Desaturase miteinander vernetzt sein. In einigen Organismen (z. B. *Euglena gracilis*) ist ein alternativer Weg zur Biosynthese von C₂₀-PUFAs realisiert. Dieser involviert eine Δ⁹-Elongase sowie eine Δ⁸- und Δ⁵-Desaturase. Auch C₂₂-PUFAs können auf zwei unterschiedlichen Wegen entstehen. Im direkten Verlauf erfolgt zunächst eine Elongation der C₂₀-PUFAs, die in der abschließenden Reaktion an der Δ⁴-Position desaturiert werden. Für Säugetiere wird dagegen der sogenannte Sprecher-Pathway postuliert. In diesem Weg durchlaufen die C₂₀-PUFAs zunächst zwei Elongationszyklen, bevor eine Doppelbindung an der Δ⁶-Position eingefügt wird. Die so entstandene Tetracosahexaensäure (24:6^{Δ6,9,12,15,18,21}) wird dann zu den Peroxisomen transportiert, wo sie durch partielle β-Oxidation um eine C₂-Einheit zur 22:6^{Δ4,7,10,13,16,19} verkürzt wird, welche wieder zum ER zurücktransportiert wird.

In einigen Organismen wie *Euglena gracilis* und auch in den Hoden von Ratte und Mensch konnte ein alternativer Biosyntheseweg der C₂₀-PUFAs nachgewiesen werden (Wallis & Browse, 1999). Dieser

Weg beginnt mit der Elongation der beiden Ausgangsverbindungen 18:2^{Δ^{9,12}} und 18:3^{Δ^{9,12,15}}. Die beiden Produkte 20:2^{Δ^{11,14}} und 20:3^{Δ^{11,14,17}} werden dann in zwei sukzessiven Desaturierungsreaktionen - katalysiert durch eine Δ⁸- und die Δ⁵-Desaturase - zu den beiden entsprechenden C₂₀-PUFAs umgesetzt. Sowohl die Δ⁸-Desaturase als auch die spezifitätsbestimmende Komponente der Δ⁹-Elongase konnten mittlerweile kloniert werden (siehe Tabelle 1.1).

20:4^{Δ^{5,8,11,14}} ist das Endprodukt des ω⁶-Weges und 20:5^{Δ^{5,8,11,14,17}} ein Intermediat oder auch das Endprodukt des ω³-Weges. Beide Biosynthesewege können durch eine Δ¹⁵-Desaturase und/oder eine ω³-Desaturase miteinander verknüpft sein. Während die Δ¹⁵-Desaturase die Umwandlung von 18:2^{Δ^{9,12}} zu 18:3^{Δ^{9,12,15}} katalysiert, fügt die ω³-Desaturase eine Doppelbindung zwischen den methylständigen Kohlenstoffatomen 3 und 4 ein, so dass bei C₁₈-Fettsäuren eine Δ¹⁵- und bei C₂₀-Fettsäuren eine Δ¹⁷-Doppelbindung entsteht. Inwieweit die beiden Desaturasen an der Biosynthese von ω³-VLC-PUFAs beteiligt sind, ist nicht ganz klar und kann zwischen verschiedenen Organismen variieren. In *P. tricornutum* scheint die Desaturierung sowohl auf dem C₁₈-Level als auch auf dem C₂₀-Level zu erfolgen (Arao & Yamada, 1994). Dagegen trägt die ω³-Desaturase in *Porphyridium cruentum* nur geringfügig zur Bildung von 20:5^{Δ^{5,8,11,14,17}} bei (Khozin *et al.*, 1997). In einer *Nannochloropsis*-Mutante führt ein Defekt in der Biosynthese von 20:5^{Δ^{5,8,11,14,17}} zu einer Akkumulation von 20:4^{Δ^{5,8,11,14}}, was auf eine ω³-Desaturierung hindeutet (Schneider *et al.*, 1995). Während die ω³-Desaturase auch die Konversion von 18:2^{Δ^{9,12}} nach 18:3^{Δ^{9,12,15}} katalysiert, scheint in dem Pilz *Saprolegnia parasitica* ausschließlich eine ω³-Desaturierung der C₂₀-PUFAs stattzufinden, so dass es sich hierbei um eine ungewöhnliche Δ¹⁷-Desaturase handelt (Gellerman & Schlenk, 1979). In dem C₂₀-PUFA-produzierenden Nematoden *C. elegans* kodiert das *FAT1*-Gen für eine ω³-Desaturase, da die Expression von *FAT1* in *A. thaliana* sowohl zu einer Desaturierung der endogenen 18:2^{Δ^{9,12}} als auch der exogen applizierten und inkorporierten 20:3^{Δ^{8,11,14}} und 20:4^{Δ^{5,8,11,14}} führte (Spychalla *et al.*, 1997). Darüber hinaus resultierte die Expression des *FAT1*-Gens in humanen Zelllinien zu einem signifikanten Veränderung des Verhältnisses von ω⁶- zu ω³-Fettsäuren. Dies drückte sich v. a. in einer Reduktion des 20:4^{Δ^{5,8,11,14}}-Gehaltes und in einer Akkumulation von 20:5^{Δ^{5,8,11,14,17}} aus (Kang *et al.*, 2001).

Auch für die Biosynthese von Docosahexaensäure (22:6^{Δ^{4,7,10,13,16,19}}) sind alternative Wege beschrieben worden. Im direkten Weg erfolgt ausgehend von 20:5^{Δ^{5,8,11,14,17}} zunächst ein zweiter Elongationszyklus, welcher durch die Δ⁵-Elongase katalysiert wird. In der abschließenden Reaktion wird das entstandene 22:5^{Δ^{7,10,13,16,19}} durch eine Δ⁴-Desaturase in das terminale Produkt 22:6^{Δ^{4,7,10,13,16,19}} überführt. Auch in diesem Fall kann die Biosynthese über den ω⁶-Weg ausgehend von 20:4^{Δ^{5,8,11,14}} erfolgen. Dieser Weg erfordert die zusätzliche Aktivität einer ω³-(Δ¹⁹)-Desaturase. Biochemische Untersuchungen mit Mikrosomen aus Leberzellen von Säugetieren deuten jedoch auf einen anderen Reaktionsweg hin. In diesem durchläuft 22:5^{Δ^{7,10,13,16,19}} einen weiteren Elongationszyklus, so dass 24:5^{Δ^{9,12,15,18,21}} entsteht, welche anschließend wieder einer Δ⁶-Desaturierung unterworfen wird. Die so

entstandene Tetracosahexensäure ($24:6^{\Delta 6,9,12,15,18,21}$) wird in die Peroxisomen transportiert, wo sie durch partielle β -Oxidation um zwei Kohlenstoffatome verkürzt wird. Des Endprodukt $22:6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ wird anschließend wieder zum ER rücktransportiert, wo es in die Phospholipide eingebaut wird (Sprecher, 2000). Ein ähnlicher Reaktionsweg wird auch in Dinoflagellaten für die Biosynthese der ungewöhnlichen $18:5^{\Delta 3,6,9,12,15}$ aus $20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$ vermutet (Tocher *et al.*, 1998). Während die Gene in diesem als Sprecher-Pathway bezeichneten Biosyntheseweg noch nicht bekannt sind, gelang Qiu und Mitarbeitern kürzlich die Klonierung eines Gens, das in *Thraustochytrium* für eine Δ^4 -Desaturase kodiert. Seine heterologe Expression führte sowohl in Raps als auch in *S. cerevisiae* in Gegenwart von $22:4^{\Delta 7,10,13,16}$ und $22:5^{\Delta 7,10,13,16,19}$ zur Insertion einer Δ^4 -Doppelbindung in diese Fettsäuren und demonstriert, dass dieser direkte Weg tatsächlich existiert (Qiu *et al.*, 2001). Eine Zusammenfassung aller bisher klonierten Gene, die an der Biosynthese von VLC-PUFAs beteiligt sind, ist in Tabelle 1.1 aufgeführt.

Tabelle 1.1. Klonierte Gene, die für Enzyme kodieren, welche an der Biosynthese von VLC-PUFAs beteiligt sind.

Enzym	Organismus	Literatur
Δ^6 -Desaturase	<i>Borago officinalis</i>	Sayanova <i>et al.</i> , 1997
	<i>Physcomitrella patens</i>	Girke <i>et al.</i> , 1998
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Napier <i>et al.</i> , 1998
	<i>Mortierella alpina</i>	Huang <i>et al.</i> , 1999
	<i>Mus musculus</i>	Cho <i>et al.</i> , 1999a
	<i>Homo sapiens</i>	Cho <i>et al.</i> , 1999a
	<i>Rattus norvegicus</i>	Aki <i>et al.</i> , 1999
	<i>Ceratodon purpureus</i>	Sperling <i>et al.</i> , 2000
	<i>Mucor rouxii</i>	Laoteng <i>et al.</i> , 2000
	<i>Danio rerio</i>	Hastings <i>et al.</i> , 2001
Δ^5 -Desaturase	<i>Mortierella alpina</i>	Knutzon <i>et al.</i> , 1998;
		Michaelson <i>et al.</i> , 1998a
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Michaelson <i>et al.</i> , 1998b
		Watts & Browse, 1999
	<i>Homo sapiens</i>	Cho <i>et al.</i> , 1999b
	<i>Danio rerio</i>	Hastings <i>et al.</i> , 2001
Δ^4 -Desaturase	<i>Thraustochytrium</i> sp.	Qiu <i>et al.</i> , 2001
Δ^8 -Desaturase	<i>Euglena gracilis</i>	Wallis & Browse, 1999
Δ^6 -Elongase	<i>Mortierella alpina</i>	Parker-Barnes <i>et al.</i> , 2000
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Beaudoin <i>et al.</i> , 2000
	<i>Homo sapiens</i>	Leonard <i>et al.</i> , 2000
	<i>Homo sapiens</i>	Leonard <i>et al.</i> , 2000
Δ^5 -Elongase	<i>Homo sapiens</i>	Leonard <i>et al.</i> , 2000
Δ^9 -Elongase	<i>Isochrysis galbana</i>	Qi <i>et al.</i> , 2001

Hinsichtlich der Natur der Acyl-Substrate besteht, wie für die Elongasen, auch für die Δ^6 -, Δ^5 -und die Δ^4 -Desaturase noch Unklarheit. Für die Δ^6 -Desaturase aus *B. officinalis* konnte eine Desaturierung von $18:2^{\Delta 9,12}$ nachgewiesen werden, das mit der *sn*-2-Position von PC verestert war (Griffiths *et al.*, 1988). Auch für die Δ^6 -Desaturase aus *P. patens* werden Lipid-gekoppelte Fettsäuren als Substrate

angenommen (Girke *et al.*, 1998). Markierungsexperimente deuten zudem darauf hin, dass in niederen Pflanzen die Δ^6 - und die Δ^5 -Desaturierung an Phospholipiden (PC oder PE) erfolgt (Schneider & Roessler, 1994; Arao & Yamada, 1994; Khozin *et al.*, 1997). Dagegen konnte mit Mikrosomen aus Rattenleber *in vitro* eine Δ^5 -Desaturierung von sowohl PC-gekoppeltem 20:3 $^{\Delta 8,11,14}$ als auch mit dem entsprechenden Acyl-CoA Thioester gemessen werden (Pugh & Kates, 1977, Pugh & Kates, 1979) und später eine 18:2-CoA-Desaturase hieraus partiell gereinigt werden (Okayasu *et al.*, 1981). Die Acyl-CoA-abhängige Desaturierung wurde aber noch nicht mit den mittlerweile klonierten Δ^5 - und Δ^6 -Desaturasen aus Säugetieren bestätigt. Wenn die Acyl-Substrate der Desaturasen (Acyl-Phospholipid) und Elongasen (Acyl-CoA) als verschiedene Ester vorliegen, so erfordert die alternierende Wirkung der beiden Enzyme eine zusätzliche Aktivität, die einen Austausch der Acyl-Reste zwischen den beiden Substrat-Pools ermöglicht. Inwieweit die im Kapitel 1.2.1 erwähnten Enzyme, Lyso-PC-Acyltransferasen oder Lipasen, dabei eine Rolle spielen, ist nicht klar.

1.3.2 Biosynthese von VLC-PUFAs in Prokaryoten

Im Gegensatz zu den Eukaryoten erfolgt die Biosynthese der VLC-PUFAs in Bakterien auf anaerobem Weg über Polyketid-Synthasen (PKSs) (Yazawa, 1996). Der größte Unterschied besteht dabei darin, dass Doppelbindungen nicht aerob durch Sauerstoff-abhängige Desaturierungsreaktionen in gesättigte Kohlenstoffketten eingefügt werden, sondern als Relikte unvollständiger Reduktionen während der Kettenverlängerung erhalten bleiben.

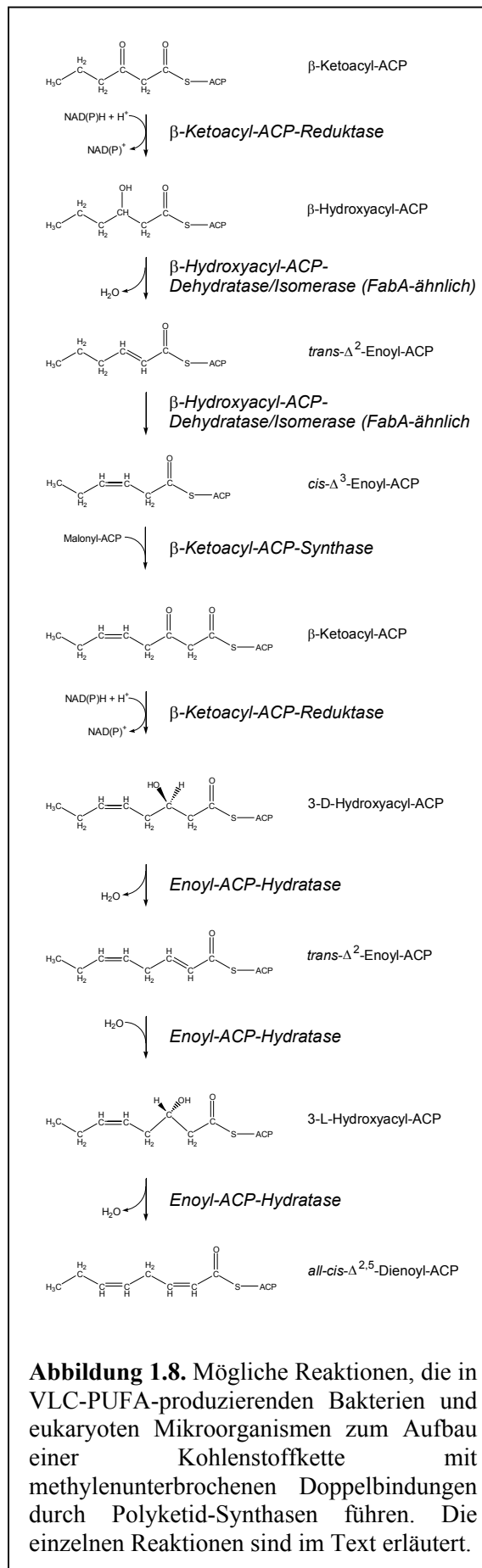
PKSs sind große Multienzymsysteme, die die Biosynthese zahlreicher, sehr komplexer Naturstoffe aus kurzkettigen Kohlenstoffverbindungen katalysieren. Als Substrate dienen ihnen hierfür u. a. Acetyl-ACP, Propionyl-ACP und Butyryl-ACP sowie ihre carboxylierten Derivate Malonyl-ACP, Methylmalonyl-ACP und Ethylmalonyl-ACP (Khosla *et al.*, 1999). Der Aufbau langkettiger Verbindungen erfolgt durch sukzessive Kondensationsreaktionen, die der Kettenverlängerung in der Fettsäure-Biosynthese ähnlich sind. In der Fettsäure-Biosynthese erfolgt nach jeder Kondensationsreaktion eine Reaktionssequenz aus Ketoreduktion, Dehydratation und Enoyl-Reduktion, so dass vollständig reduzierte Kohlenstoffketten ohne funktionelle Gruppen außer der Carboxylgruppe entstehen. Im Gegensatz hierzu ist die Biosynthese von Polyketiden dadurch gekennzeichnet, dass die Prozessierung der Kondensationsprodukte partiell oder vollständig ausbleibt. Die synthetisierten Produkte können somit *trans*-Doppelbindungen, Hydroxy- und Ketogruppen enthalten. Häufig schließen sich noch Zyklisierungen und weitere Modifikationen an, so dass eine Reihe komplexer Verbindungen entstehen. PKSs sind in Bakterien, Pilzen und höheren Pflanzen nachgewiesen worden, wo sie für die Synthese von Antibiotika, Aflatoxinen und zahlreichen pflanzlichen Sekundärmetaboliten verantwortlich sind (Khosla *et al.*, 1999).

Man unterscheidet drei Typen von PKSs. Typ I-Synthasen sind den Fettsäure-Synthasen der Vertebraten analog. Es handelt sich um Multidomänen-Proteine, die alle aktiven Zentren für die Biosynthese der Polyketide enthalten. Typ II-Synthasen ähneln strukturell den bakteriellen und plastidären Fettsäure-Synthasen. Bei ihnen sind die Aktivitäten auf kleinere, häufig monofunktionale Proteine verteilt. Der dritte Typ, der auch für die Biosynthese von VLC-PUFAs in Bakterien verantwortlich ist, wird als modulare PKS bezeichnet. Hier sind mehrere, z. T. identische Aktivitäten auf verschiedene multifunktionelle Proteine (Module) verteilt. Die einzelnen Module unterscheiden sich dabei in der Zusammensetzung ihrer Aktivitäten voneinander (Khosla *et al.*, 1999).

Die Reaktionssequenz, die zur Biosynthese von VLC-PUFAs durch Polyketid-Synthasen führt, ist noch nicht im Detail bekannt. Im Gegensatz zu anderen Polyketiden enthalten VLC-PUFAs lediglich *cis*-Doppelbindungen als funktionelle Gruppen. Durch die unvollständige Reduktion in der Polyketid-Synthese entstehen dagegen Doppelbindung in der *trans*-Konfiguration. Es müssen also Aktivitäten in den PKSs vorhanden sein, die entweder nicht der Fettsäure-Biosynthese analog sind oder solche, die zu *cis*-Doppelbindungen führen. Ein weiteres Problem stellt der Abstand der Doppelbindungen zueinander dar. Während die Doppelbindungen in den VLC-PUFAs durch jeweils eine Methylengruppe unterbrochen sind, entstehen durch das Ausbleiben der Enoyl-Reduktion entweder konjugierte Doppelbindungen (wenn die Reduktion in zwei aufeinanderfolgenden Zyklen ausbleibt) oder Doppelbindungen, die durch mindestens 2, 4, 6, etc. CH₂-Gruppen voneinander getrennt sind.

In der Abbildung 1.8 ist ein hypothetischer Weg aufgezeigt, wie die Biosynthese von ω^3 -PUFAs mit methylenunterbrochenen *cis*-Doppelbindungen erfolgen könnte. Im ersten Zyklus entsteht aus Malonyl-ACP und Acetyl-ACP zunächst das vollständig reduzierte Butyryl-ACP. Dieser ist dem vollständigen initiiierenden Zyklus der Fettsäure-Biosynthese identisch und daher nicht gezeigt. Im zweiten Zyklus muss nun die Doppelbindung in der ω^3 -Position eingefügt werden. Durch die Wirkung der ersten drei Enzyme würde eine *trans*-Doppelbindung entstehen, die sich an der ω^4 -Position befindet. Eine regio- und stereospezifische Isomerisierung könnte durch eine Aktivität erfolgen, die der des FabA-Proteins aus *E. coli* analog ist. FabA ist ein bifunktionales Protein, welches neben der Dehydratation von β -D-Hydroxydecanoyl-ACP, die Isomerisierung des Produktes *trans*-2-Decenoyl-ACP zu *cis*-3-Decenoyl-ACP katalysiert und so für die anaerobe Einführung der *cis*-Doppelbindung bei der Biosynthese von einfach ungesättigten Fettsäuren (v.a. 18:1 ^{Δ^{11}}) in *E. coli* verantwortlich ist (Cronan *et al.*, 1988).

Es wäre aber auch möglich, dass dies durch eine Isomerase-ähnliche Enzymdomäne erfolgt. Eine solche Isomerase ist bei der β -Oxidation für den Abbau von ungesättigten Fettsäuren notwendig und katalysiert die Isomerisierung von *cis*- Δ^3 -Doppelbindungen zu *trans*- Δ^2 -Doppelbindungen, welche dann durch das nachfolgende Enzym hydratisiert werden können (Geisbrecht *et al.*, 1998).



Im dritten Zyklus muss eine *cis*-Doppelbindung an der ω^6 -Position verbleiben. Das Kondensationsprodukt wird in diesem Fall zunächst zum 3-D(R)-Hydroxyacyl-ACP reduziert. Durch die Dehydratase würde daraus eine *trans*-Doppelbindung an der ω^6 -Position entstehen. Metz *et al.* vermuten, dass die sich anschließende Stereoisomerisierung durch einen Mechanismus erfolgt, der auch bei der Regeneration des 11-*cis*-Retinal für die Photorezeption stattfindet (Metz *et al.*, 2001). Bei der Regeneration wird das durch die Photoisomerisierung entstandene all-*trans*-Retinal zunächst zum all-*trans*-Retinol reduziert und anschließend in die benachbarten Pigmentepithelzellen der Retina transportiert. Dort findet auf bisher unbekanntem Weg die Isomerisierung zum 11-*cis*-Retinol statt und wird nach Oxidation zu 11-*cis*-Retinal wieder in die Photorezeptorzellen importiert (Jang *et al.*, 2000).

Eine andere Möglichkeit lehnt sich wieder an die β -Oxidation ungesättigter Fettsäuren in Hefen und Säugern an und ist in der Abbildung 1.8 aufgeführt. Bei der β -Oxidation werden Doppelbindungen, die sich an geradzahligen Kohlenstoff-Atomen befinden, nicht isomerisiert, sondern durch eine als Hydratase 1 bezeichnetes Enzym in einer reversiblen Reaktion in das 3-D(R)-Hydroxyacyl-CoA überführt. Durch die reversible Reaktion der Hydratase 2 entsteht hieraus das *trans*- Δ^2 -Enoyl-CoA, das schließlich wieder durch die Hydratase 1 zum 3-L(S)-Hydroxyacyl-CoA hydratisiert wird. Nur das L-Isomer ist Substrat der die anschließende Reaktion katalysierenden Dehydrogenase, die den weiteren Abbau der Kohlenstoffkette ermöglicht. Durch eine der Hydratase 1 ähnlichen Enzymdomäne könnte folglich im Fall der

Biosynthese von VLC-PUFAs die *cis*-Doppelbindung direkt aus dem 3-D(R)-Hydroxyacyl-ACP entstehen. Zusammenfassend kann man die Biosynthese von Kohlenstoffketten mit methylenunterbrochenen *cis*-Doppelbindungen durch die alternierende Wirkung von drei verschiedenen Modulen beschreiben, die jeweils einen der soeben beschriebenen Reaktionszyklen katalysieren.

1996 konnte Yazawa erstmals ein Gencluster aus dem marinen Bakterium *Schewanella* isolieren, dessen heterologe Expression in *E. coli* zur Biosynthese von 20:5^{Δ5,8,11,14,17} führte (Yazawa, 1996). *Schewanella* akkumuliert diese Fettsäure bis zu 24-40% der Gesamtfettsäuren. Über 90% der 20:5^{Δ5,8,11,14,17} sind an die *sn*-2 Position der Phospholipide PE und PG verestert (Yazawa, 1996). Das exprimierte Gencluster war Teil eines 38 kb großen, genomischen DNA-Fragments. Eine detaillierte Sequenzanalyse ergab, dass das DNA-Fragment 8 offene Leserahmen enthielt, von denen aber lediglich 5 für die Biosynthese von EPA essentiell waren (Yazawa, 1996). Expression dieser 5 offenen Leserahmen in dem marinen Cyanobakterium *Synechococcus* sp. führte ebenfalls zu Biosynthese von 20:4^{Δ5,8,11,14} und 20:5^{Δ5,8,11,14,17}. In Abhängigkeit von den Kulturbedingungen akkumulierten die transgenen Cyanobakterien diese VLC-PUFAs bis zu 13 % der Gesamtfettsäuren (Yu *et al.*, 2000). Metz und Mitarbeiter identifizierten innerhalb dieser 5 offenen Leserahmen 11 Regionen als putative katalytische Enzymdomänen (Metz *et al.*, 2001). Sequenzvergleiche ergaben, dass diese Regionen alle notwendigen Aktivitäten eines vollständigen Elongationszyklus der Fettsäure-Biosynthese enthielten, d.h. zwei β -Ketoacyl-CoA-Synthasen, eine β -Ketoacyl-CoA-Reduktase, eine β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydratase mit putativer Isomerase-Aktivität sowie eine Enoyl-CoA-Reduktase. Das Vorkommen einer *FabA*-ähnlichen Dehydratase bestätigt, dass die Regio- und Stereoisomerisierung der Doppelbindung im oben beschriebenen Zyklus durch eine Dehydratase/Isomerase erfolgt und nicht durch eine Aktivität, die der Isomerase aus der β -Oxidation analog wäre. Die anderen Regionen konnten ebenfalls als Enzymdomänen identifiziert werden, die für die Biosynthese von Fettsäuren erforderlich sind: eine Malonyl-CoA:ACP-Acyltransferase, ein Cluster aus 6 Acyl-Carrier-Proteinen, eine Acyltransferase, eine Phosphopantethein-Transferase sowie eine als sog. *chainlength factor* bezeichnete Domäne.

Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten mit den *Schewanella*-Enzymdomänen konnten Tanaka *et al.* später ein Gencluster aus dem 22:6^{Δ4,7,10,13,16,19}-produzierenden marinen Bakterium *Vibrio marinus* isolieren (Tanaka *et al.*, 1999). Die Expression dieses Clusters in *E. coli* führte jedoch nicht zur Biosynthese von 22:6^{Δ4,7,10,13,16,19}. Dies ist vermutlich auf das Fehlen einiger Enzymdomänen in dem klonierten genomischen DNA-Fragment zurückzuführen. So fehlt in dem Cluster aus *Vibrio* der offene Leserahmen, der in dem *Schewanella*-Gencluster für die Phosphopantetheintransferase-Domäne kodiert (Tanaka *et al.*, 1999).

Dass die anaerobe Biosynthese von VLC-PUFAs durch Polyketid-Synthasen nicht nur auf Prokaryoten beschränkt ist, konnte kürzlich durch die Isolierung von drei offenen Leserahmen aus

dem marinen Eukaryoten *Schizochytrium* mit Sequenzhomologien zum *Schewanella*-Gencluster gezeigt werden (Metz *et al.*, 2001). Zwar konnten durch heterologe Expression noch nicht die Funktion der offenen Leserahmen nachgewiesen werden, aber Fütterungsexperimente mit radioaktiv markiertem Acetat sowie 16:0, 18:1 und 18:3 unterstützen die Vermutung, dass die Biosynthese der VLC-PUFAs in *Schizochytrium* durch PKSs erfolgt. Radioaktives Acetat als Substrat der Polyketid-Synthasen konnte bereits nach einer Minute in 22:6^{Δ4,7,10,13,16,19} nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte auch nach 24 Stunden Kultivierung in Gegenwart von markierten Fettsäuren, die Zwischenprodukte im Desaturase/Elongase-Biosyntheseweg sind, keine Radioaktivität in 22:6^{Δ4,7,10,13,16,19} detektiert werden (Metz *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass VLC-PUFAs in *Schizochytrium* hauptsächlich *de novo* durch Polyketid-Synthasen und nicht durch den Desaturase/Elongase-Weg synthetisiert werden. Die Anordnung der einzelnen Enzymdomänen auf den offenen Leserahmen der isolierten Gencluster deutet dabei aber auf eine komplexere Organisation dieser Polyketid-Synthasen hin als die oben beschriebene Struktur aus drei unterschiedlichen Modulen, die jeweils unterschiedliche Reaktionszyklen katalysieren.

Die Tatsache, dass eine Δ^4 -Desaturase aus dem nah verwandten Organismus *Thraustochytrium* kloniert werden konnte (Qiu *et al.*, 2001), zeigt, dass sich die aerobe und anaerobe Biosynthese von VLC-PUFAs nicht gegenseitig ausschließen. In welchem Umfang die beiden Wege jedoch zur Akkumulation von 22:6^{Δ4,7,10,13,16,19} beitragen, ist unbekannt. Die Tatsache, dass im Fettsäureprofil von *Schizochytrium* fast keine Intermediate des Desaturase/Elongase-Weges detektiert werden können, lässt auf einen größeren Beitrag durch die Polyketid-Synthasen schließen.

1.4 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit 20 oder 22 Kohlenstoffatomen sind aufgrund ihrer gesundheitsfördernden Eigenschaften wichtige Bestandteile der menschlichen Nahrung. Eine Hauptquelle für diese VLC-PUFAs sind marine Fische, die diese wiederum weniger durch eigene Biosynthese akkumulieren, sondern durch den Verzehr marinen Planktons erwerben. Die prokaryoten und eukaryoten Mikroorganismen des Planktons stellen somit die Primärproduzenten für VLC-PUFAs in dieser Nahrungskette dar. Darüber hinaus sind auch Moose, Farne und Gymnospermen in der Lage, signifikante Mengen C₂₀-PUFAs zu synthetisieren.

Wie in Abbildung 1.7 aufgeführt, sind für die Biosynthese von C₂₀- und C₂₂-PUFAs in Eukaryoten die Aktivitäten verschiedener Desaturasen und Elongasen notwendig. Zu Beginn dieser Arbeit waren lediglich die Gene für die Δ^6 - und die Δ^5 -Desaturase verfügbar. Dagegen konnten bis zu diesem Zeitpunkt weder die mittlerweile klonierte Δ^4 -Desaturase noch die beiden Elongasen identifiziert werden. In einem ersten Ansatz zur Biosynthese von PUFAs in transgenen Rapspflanzen resultierte die Co-Expression einer Δ^{12} - und einer Δ^6 -Desaturase aus *M. alpina* in der Biosynthese von 18:3^{Δ6,9,12}

in den Samen transgener Rapspflanzen (Liu *et al.*, 2000). Der Anteil der 18:3^{Δ6,9,12} in den Speicherlipiden deutet mit 45 % auf eine hohe Aktivität der rekombinanten Desaturasen in den Pflanzen hin und untermauert die Perspektive einer möglichen Gewinnung von VLC-PUFAs über diesen Ansatz. Für die Synthese der VLC-PUFAs sind neben der Δ^5 - bzw. Δ^4 -Desaturase zwei Elongationsschritte notwendig. Diese werden durch die Δ^6 - bzw. Δ^5 -Elongase katalysiert, welche somit die Bindeglieder zwischen den verschiedenen Desaturasen darstellen. Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, besteht ein Elongationszyklus aus vier Teilreaktionen, die jeweils durch einzelne Proteine katalysiert werden. Dabei wird die Aktivität und die Spezifität der Elongasen durch das Enzym bestimmt, welches die initiiierenden Kondensationsreaktion katalysiert.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Klonierung und funktionale Charakterisierung von Genen, die für diese spezifitäts- und aktivitätsbestimmende Komponente der Δ^6 - sowie der Δ^5 -Elongase kodieren. Zu diesem Zweck sollten EST-Datenbanken aus den VLC-PUFA-produzierenden Organismen *Physcomitrella patens*, *Phytophthora infestans*, *Thraustochytrium* sp. und *Cryptocodinium cohnii* nach putativen Elongationsenzymen abgesucht werden. Die Identifizierung von cDNA-Klonen basierte dabei auf einem Ähnlichkeitsvergleich mit Aminosäuresequenzen von Proteinen, die in Pflanzen oder Hefen in die Elongation von Fettsäuren involviert sind. In Pflanzen stellen diese Enzyme die β -Ketoacyl-CoA-Synthasen dar, in Hefen sind dies die Mitglieder der Elo-Proteinfamilie. Anschließend sollten zunächst vollständige cDNA-Klone aus den entsprechenden cDNA-Banken isoliert werden.

Die funktionale Identifikation der cDNA-Klone kann prinzipiell auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen. Zum einen besteht die Möglichkeit, die isolierten cDNAs in einem heterologen Wirt zu exprimieren. Aufgrund der eukaryoten Natur der Elongationsenzyme ist in diesem Fall die Expression in der Hefe *S. cerevisiae* einer Expression in prokaryoten Organismen wie *E. coli* vorzuziehen. Da die Hefen aber aufgrund der fehlenden Desaturasen keine eigenen PUFAs synthetisieren (diese aber durchaus aufnehmen), ist für die Detektion dieser Elongationsaktivitäten die Bereitstellung der entsprechenden Fettsäure-Substrate (d. h. 18:3^{Δ6,9,12} oder 20:4^{Δ5,8,11,14}) notwendig. Darüber hinaus setzt die Identifizierung der cDNA-Klone eine erfolgreiche Interaktion der rekombinanten Enzyme mit den Enzymen der hefeeigenen Elongasen voraus, die die nachfolgenden Reaktionen katalysieren. Das Erscheinen einer elongierten Fettsäure stellt hierbei einen besonders signifikanten Hinweis auf die Funktion der Elongationsproteine dar, da hierdurch weitgehend ausgeschlossen werden kann, dass die cDNA für ein regulatorisches Protein kodiert.

Für das Moos *P. patens* besteht darüber hinaus eine alternative Methode zum funktionalen Nachweis von Genprodukten. Dieser Ansatz basiert auf der Transformierbarkeit und der spezifischen und effizienten Rekombination homologer DNA-Bereiche in *P. patens* (Schaefer & Zryd, 1997). Über diesen Ansatz konnte zuvor bereits ein Gen deletiert werden, das in dem Moos für die Δ^6 -Desaturase

kodiert und ebenfalls in die Biosynthese von VLC-PUFAs involviert ist (Girke *et al.*, 1998). In diesem Fall sollten die entsprechenden Gene der putativen Elongationsenzyme durch die Insertion eines Selektionsmarkers über homologe Rekombination gezielt zerstört werden. Die hierfür klonierten Gen-Disruptionskonstrukte bestanden dabei aus einer Selektionskassette, die von homologen Bereichen der identifizierten cDNA-Klone flankiert war. Die spezifische Insertion dieser Disruptionskonstrukte führt dabei zu einem vollständigen Funktionsausfall der entsprechenden Gene. Ein verändertes Fettsäureprofil in den Mutanten könnte so Aufschluss über mögliche Funktionen des zerstörten Gens geben. Darüber hinaus eröffnet sich durch die Deletion von Fettsäure-Elongationsenzymen und dem damit einhergehenden Verlust an VLC-PUFAs ein Zugang zur Aufklärung möglicher Funktionen dieser Fettsäuren in *P. patens*.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Verbrauchsmaterial, Enzyme und Chemikalien

2.1.1 Geräte

Elektrophoresekammer	Horizon 11.14	Gibco BRL
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. A.06.03[509]	Hewlett Packard
HPLC-System		
Pumpen	110 B Solvent Delivery Module	Beckman
Injektionssystem	System Organizer mit 20 µl Schleife	Beckman
Gradientensystem	System Gold Analog Interface 406	Beckman
Detektor	System Gold Pogram Detector 166	Beckman
Auswertung	IBM Personal System/2, Modell 50	Beckman
Säule	System Gold Chromatography	
Kieselgel-Platten	ODS-Hypersil RP-18 5µm; 4,6 x 250 mm	Bischoff
Membranen	Kieselgel 60, 20 x 20 cm, 0,25 mm	Merck
	Qiabrane Nylon	Qiagen
	Nylon Membranen	Boehringer
Netzgerät	PS304	Life Technologies
pH-Meter	766 Calimatic	Knick
Röntgenfilm	HYPERFILM TM -MP, 18 x 24 cm	Amersham
Rotoren	A6.9, A8.24, SW60, AS4.13	Kontron
	A-6-24	Eppendorf
Photometer	20 GENESYS TM	Spectronic
UV-Photometer	GeneQuant II	Pharmacia Biotech
Bioimager	BAS 100	Raytest
Hybridisierungsöfen	OV2	Biometra
Ultraschallstab	2000	B.Braun
Ultra-Turrax	TP 18/10	IKA
Wasserheizbäder	THERMOMIX [®] MM	B.Braun
Sterilbank	DLF/BSS4	Woerdau
Heizplatte/Magnetrührer	IKAMAG [®] RCT	IKA
Magnetrührer	IKAMAG [®] REO	N
Vortex-Schüttler	REAX 2000	Heidolph
Thermo-Cycler	TRIO Thermoblock	Biometra
UV-Transilluminator	UVT-28M	Herolab
Video-Printer	429 K	Herolab
Zentrifugen:		
Kühlzentrifuge	5810 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge	Centrikon 324	Kontron
Ultrazentrifuge	T-1075	Kontron
Tischzentrifuge	Microfuge E TM	Beckmann

2.1.2 Laborchemikalien und Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders vermerkt, stammen alle Chemikalien in Analyse-Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Biomol (Hamburg), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen).

Restriktionsendonucleasen, DNA-modifizierende Enzyme sowie DNA-Längenstandards und Nucleotide wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Sigma-ARK (Darmstadt), Life Technologies (Karlsruhe), MBI Fermentas (Vilnius/Litauen), Invitrogen (Groningen/Niederlanden) und New England Biolabs (Schwalbach/Taunus) bezogen.

2.2 Vektoren

Plasmid	Selektionsmarker	Referenz
pUC18	<i>amp^R</i>	Yanish-Perron <i>et al.</i> (1985)
pBluescript II SK-	<i>amp^R</i>	Stratagene
pZERO-2	<i>kan^R</i>	Invitrogen
pGEM-T	<i>amp^R</i>	Promega
pYES2	<i>amp^R/URA3</i>	Invitrogen
pVT 102 U	<i>amp^R/URA3</i>	Vernet <i>et al.</i> (1987)
pRT101neo	<i>amp^R/nptII</i>	Girke <i>et al.</i> (1998)

2.3 Organismen

2.3.1 *Escherichia coli*-Stämme

XL1-Blue MRF⁺ (Bullock *et al.*, 1987)

$\Delta(mcrA)$ 183, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac[F'proAB, lacI^qZΔM15, Tn10 (tet^r)]*

SOLRTM (Hay & Short, 1992)

e14'(mcrA), $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 171, *sbsC*, *recB*, *recJ*, *umuC::Tn5(kan^r)*, *uvrC*, *lac*, *gyrA96*, *relA1*, *thi-1*, *endA1*, λ^R , *[F'proAB, lacI^qZΔM15]* Su⁻ (nonsuppressing)

2.3.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

INVSc1 (Invitrogen)

Mat α , *his3-Δ1*, *leu2*, *trp1-289*, *ura3-52*

334 (Hovland *et al.*, 1989)

MAT α , *pep4-3*, *prb1-1122*, *ura3-52*, *leu2-3,112*, *reg1-501*, *gal1*

2.3.3 *Physcomitrella patens*

Für diese Arbeit wurde das Laubmoos *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. (Blasenmützenmoos) verwendet. Der Wildtyp stammte aus der Sammlung des genetischen Arbeitsbereiches der Universität Hamburg und geht auf den Stamm 16/14 zurück, der von H. L. K. Whitehouse in Gransden Wood, Huntingdonshire (England) gesammelt und von Engel (1968) aus einer Spore subkultiviert wurde.

2.4 Kultur von *Escherichia coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *Escherichia coli* wurden, soweit nicht anders vermerkt, in LB- und SOB-Flüssigmedien bei 37 °C im Schüttler bzw. Rotor oder auf LB-Festmedien kultiviert (nach Luria & Bertani; Sambrook *et al.*, 1989). Wo Selektionsdruck erforderlich war, wurden die entsprechenden Antibiotika in den unten angegebenen Konzentrationen den Medien nach dem Autoklavieren aus sterilfiltrierten Stammlösungen zugefügt.

Zur Blau-Weiß-Selektion bei Klonierungen in die Vektoren pUC 18 und pBluescript II SK- wurden den Festmedien neben dem Antibiotikum folgende Agenzien zugesetzt:

- IPTG:** 200 µM Isopropyl-β-thiogalactosid
aus 100 mM Stammlösung in A. dest.
- X-Gal:** 80 µg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid
aus 2 % (w/v) Stammlösung in Dimethylformamid

Die Dichte einer *E. coli*-Kultur wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Dabei wurde bei einer OD₆₀₀ von 1,0 ein Wert von 1-2 x 10⁹ Zellen/ml zugrunde gelegt.

Dauerkulturen wurden mit Zellen angelegt, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase (bei OD₆₀₀ = 0,5) befanden. Hierfür wurden die Kulturen mit dem gleichen Volumen von 70% (v/v) Glycerin (sterilfiltriert) versetzt und bei -70 °C gelagert.

- LB-Medium:** 10g Trypton
5g Hefeextrakt
5g NaCl
ad 1 l mit A. dest.
pH 7,5 mit NaOH
15 g Difco Microagar bei LB-Platten

SOB-Medium:	2% (w/v) Pepton
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂ *
	10 mM MgSO ₄ *

*Lösungen nach dem Autoklavieren zugesetzt

Ampicillin (Na-Salz):	Stammlösung:	100 mg/ml
	Endkonzentration:	100 µg/ml
Kanamycin:	Stammlösung:	68 mg/ml in Ethanol
	Endkonzentration:	34 µg/ml

2.5 Herstellung kompetenter Zellen

Die Präparation transformationskompetenter Zellen von *E. coli* erfolgte nach der Methode von Inoue *et al.* (1990). Die Methode basiert auf der Behandlung der Bakterien mit bivalenten Kationen. Hierfür wurden 100 ml SOB-Medium mit 1 ml einer ü.N.-Kultur von *E. coli* XL1 Blue MFR' tet angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln mit 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 10 min auf Eis gekühlt und mit 5000 x g bei 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellsediment vorsichtig in 40 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und erneut unter den gleichen Bedingungen wie oben sedimentiert. Die Zellen wurden nun in 8 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, mit 0,56 ml DMSO (Endkonzentration 7% (v/v)) versetzt und wiederum für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension kompetenter Zellen in 200 µl-Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und 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

2.6 Transformation

Für die Transformation wurde ein Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen (200 µl XL1 Blue MFR' tet) langsam auf Eis aufgetaut, mit bis zu 20 µl eines Ligationsansatzes bzw. Plasmid-DNA vermenget und 30 min auf Eis belassen. Anschließend wurden die Zellen für 90 s einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und für 2 min auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration wurden die Zellen mit 800 µl SOC versetzt und für 60 min bei 37 °C im Rotor inkubiert. Bis zu 250 µl wurden schließlich auf LB-Selektivplatten mit den geeigneten Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

SOC-Medium:	2 % (w/v) Bacto-Trypton
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	0,05 % (w/v) NaCl
	10 mM MgCl ₂ *
	10 mM MgSO ₄ *
	0,4 % (w/v) Glucose *

* nach dem Autoklavieren aus sterilfiltrierten Lösungen hinzugegeben

2.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

2.7.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die analytische Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach einer Methode von Riggs & McLachlan (1986). Hierfür wurden 2 ml einer *E. coli* ü.N.-Kultur in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 200 µl BF-Puffer mit 1 mg/ml Lysozym resuspendiert und 1 min bei 100 °C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden anschließend mit 13.000 rpm bei RT für 30 min in der Laborzentrifuge sedimentiert. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde mit 480 µl IS-Mix gefällt und mit 13.000 rpm bei RT für 15 min in der Laborzentrifuge abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol (p.a.) gewaschen, erneut für 5 min bei RT mit 13.000 rpm in der Laborzentrifuge zentrifugiert, das DNA-Sediment getrocknet, in 100 µl H₂O mit 1 mg/ml RNase resuspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

BF-Puffer:	8 % Sucrose
	0,5 % Triton X-100
	50 mM EDTA, pH 8,0
	10 mM Tris/HCl, pH 8,0

Lysozym-Stammlösung:	20 mg/ml in A. dest. (sterilfiltriert)
-----------------------------	--

IS-Mix	400 µl Isopropanol
	80 µl 5 M NH ₄ -Acetat

Phenol:Chloroform	Phenol (mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,5-8 äquilibriert) und Chloroform im Verhältnis 1:1
--------------------------	--

2.7.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Maxi-Präparation von Plasmid-DNA wurde mit dem DNA-Extraktion Kit NUCLEOBOND® AX 500 der Firma Macherey-Nagel (Düdingen) durchgeführt. Die Präparation basiert hierbei auf einer selektiven Bindung der DNA an eine Matrix unter Hochsalzbedingungen und deren Elution unter Niedrigsalzbedingungen. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Die eluierte, gefällte Plasmid-DNA wurde in 200-500 µl H₂O aufgenommen. Die Konzentration wurde anschließend photometrisch und/oder über ein Agarosegel bestimmt. Mit diesem Kit ließen sich so 100-500 µg DNA präparieren.

2.8 Reinigung, Fällung und Konzentrationsbestimmung von DNA und Oligonucleotiden

Die Entfernung von Proteinverunreinigungen aus Mini-DNA-Präparationen erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Phenol/Chloroform. Hierfür wurde das Volumen der DNA-Lösungen auf 300 µl erhöht und wiederholt mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, zur Phasentrennung für 2 min mit 13.000 rpm zentrifugiert und die Oberphase entnommen. Die Entfernung von Phenolresten aus der Oberphase erfolgte durch einmalige Extraktion mit dem gleichen Volumen Chloroform.

Die Fällung der gereinigten DNA diente meistens deren Konzentrierung und wurde auf zwei verschiedene Arten durchgeführt. Eine schnelle Fällung erfolgte durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol und Inkubation für 5 min bei RT. Eine salzarme Fällung erreicht man mit 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat, pH 5,2 und 2,5 Volumen Ethanol (p.a.) für 30 min bei -70 °C.

Die Konzentration von DNA und Oligonucleotiden wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zwischen der DNA- bzw. Oligonucleotid-Konzentration und der OD_{260nm} wurde nach Sambrook *et al.* (1989) folgender Zusammenhang zugrunde gelegt:

DNA: 1 OD_{260nm} = 50 mg DNA/ml

Oligonucleotide: 1 OD_{260nm} = 33 mg Oligonucleotid/ml

Verunreinigungen der Nukleinsäuren mit Proteinen wurden anhand des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm (dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren) und bei 280 nm (dem Absorptionsmaximum der Proteine) bestimmt. Dieses Verhältnis sollte bei sauberen DNA-Lösungen 1,8-1,9 betragen.

2.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR; Mullis & Faloona, 1987) ist eine Methode, die mit Hilfe von sogenannten Starteroligonucleotiden (Primer) und hitzestabilen DNA-Polymerasen die Vervielfältigung bestimmter Abschnitte einer als *template* dienenden DNA ermöglicht. Das Denaturieren der DNA, das Binden der Primer (Annealing) sowie die DNA-Synthese erfordern dabei verschiedene Temperaturen. Diese werden durch ein für jede Reaktion spezifisches Temperaturprogramm in einem Thermocycler (Biometra) realisiert. Die PCR diente u.a. dem Nachweis spezifischer Rekombinationsereignisse in *P. patens*, der Kontrolle von Klonierungen und der Synthese von DNA-Fragmenten für die Klonierung in Vektoren. In einigen Fällen erfolgte über PCR auch eine Modifikation von offenen Leserahmen. In diesen Ansätzen wurden den DNA-

Fragmenten durch zusätzliche Nucleotide an den Primer-Enden Restriktionsschnittstellen angefügt, die für die Klonierung in verschiedenen Hefe-Expressionsvektoren genutzt werden konnten.

2.9.1 *Taq*-Polymerase

Die DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* ist eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase, die eine terminale Transferaseaktivität aufweist, wodurch am 3'-Ende eines jeden DNA-Strangs ein Adenosinüberhang entsteht. Einige Vektoren, wie der pGEM-T, verfügen über einen komplementären 3'-Desoxythymidinüberhang und ermöglichen so eine effiziente Klonierung von PCR-Fragmenten.

Standard-PCR-Ansatz:	10-100 pg DNA
	5 µl 10 x PCR-Puffer (0,2 M Tris/HCl pH 8,0; 0,5 M KCl)
	3 µl MgCl ₂ (50 mM)
	1 µl 10 mM dNTPs
	100 pmol Primer I
	100 pmol Primer II
	ad 50 µl A. dest

Die PCR wurde im Thermocycler (Biometra) mit folgendem Standard-Temperaturprogramm durchgeführt.

Temperaturprofil:	96 °C	3 min
25-30 Zyklen	96 °C	30 sec
	T _m -5 °C	45 sec
	72 °C	1 min für die Synthese von 1kb DNA
	72 °C	10 min

Anschließend wurde die PCR gelelektrophoretisch überprüft. Hierfür wurden dem PCR-Ansatz 10 µl entnommen und wie in Kapitel 10 verfahren. Die Berechnung der Primer-Hybridisierungstemperatur (T_m- 5 °C) erfolgte wie im Anhang 1 erklärt.

2.9.2 *Pfu*-Polymerase

Im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase verfügt die Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* über eine *proof-reading* Aktivität. Sie baut Nucleotide mit der geringsten untersuchten Fehlerrate (Flaman *et al.* 1994) ein. Sie ist daher besonders für die Amplifikation von offenen Leserahmen geeignet, deren genetische Information später in Expressionsvektoren transkribiert und translatiert werden soll. Die geringere Fehlerrate der *Pfu*-Polymerase hat allerdings auch eine geringere Synthesegeschwindigkeit und somit eine geringere Ausbeute zur Folge.

Die Reaktion wurde nach den Angaben des Herstellers wie folgt gewählt:

Reaktionsansatz: 10-50 ng *template* DNA
5 µl *Pfu*-Puffer
10 mM dNTPs
50 pmol Primer I
50 pmol Primer II
1 µl *Pfu*-Polymerase Enzym Mix
add 50 µl A. dest

Temperaturprogramm: 96 °C 3 min
25-30 Zyklen { 96 °C 30s
T_m-5 °C 30s
72 °C 2 min für ein 1 kb zu synthetisierende DNA
72 °C 10 min

Anschließend wurde die amplifizierte DNA in einem präparativen Gel aufgetrennt und/oder mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt (siehe Kapitel 2.11) und für Ligationen eingesetzt. Im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase erzeugt die *Pfu*-Polymerase keine Adenosinüberhänge. Bei Amplifikation mit der *Pfu*-Polymerase wurden die aufgereinigten DNA-Fragmente *blunt-end* in die *Sma*I-Schnittstelle von pUC18 ligiert. Hierfür wurde der SURECLONE Ligation Kit (Pharmacia Biotech) verwendet und nach Herstellerangaben vorgegangen.

In einigen Fällen erfolgt die PCR mit der *Taq*- und der *Pfu*-Polymerase mit einem sogenannten *touch-down* Programm, bei dem die Hybridisierungstemperatur der Primer mit jedem Zyklus um 1 °C erniedrigt wurde:

touch-down Temperaturprogramm: 96 °C 3 min
20 Zyklen { 96 °C 30s
60 °C 30s (-1 °C/Zyklus)
72 °C 1 bzw. 2 min pro 1 kb DNA
25 Zyklen { 96 °C 30s
40 °C 30s
72 °C 1 bzw. 2 min pro 1 kb DNA
72 °C 10 min

2.10 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Molekülen

Die Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Molekülen wurde nach einer Methode von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Abhängig von der erwarteten Fragmentgröße wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,7-1,2 % (w/v) in 1 x TBE-Puffer verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer aufgekocht und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 50 ng/ml versetzt, bevor sie in eine Flachbettkammer gegossen wurde. Zum Aushärten der Gele wurden diese für mindestens 1 h bei RT belassen. Die DNA-Proben wurden mit 0,2 Volumen DNA-Probenpuffer gemischt und in die Geltasche pipettiert. Als DNA-Längenstandards dienten:

Lambda-DNA/*Bst*EII:

Fragmente: 14410*, 8454, 7242, 6369, 5686, 4822, 4324, 3675, 2323,
1929, 1371, 1264, 702, 224, 117 bp

pBR322/*Alw*44I/*Mva*I:

Fragmente: 2619, 1857, 1246, 1058, 929, 498, 383, 121, 13 bp

1 kb Ladder:

Fragmente: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500 bp

100 bp Ladder:

Fragmente: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp

*Die Bande entsteht aufgrund der Fusion der *cos*N-haltigen 8454 bp und 5686 bp großen DNA Fragmente der Lambda-DNA.

Die Gelelektrophorese wurde bei einer angelegten Spannung von 60-80 V mit 1 x TBE und 50 ng/ml Ethidiumbromid durchgeführt. Nach der Auftrennung wurden die DNA-Banden auf dem Transilluminator (Herolab) mit UV-Licht (304 nm) sichtbar gemacht und mit einem Photoprinter (Herolab) dokumentiert. Die Agarose-Gelelektrophorese diente v.a. der Kontrolle von Restriktionen, PCR-Experimenten, DNA-Präparationen und DNA-Elutionen. Außerdem wurden in präparativen Ansätzen DNA-Moleküle für spätere Ligationen aufgereinigt.

10 x TBE:

890 mM Tris
890 mM Borsäure
20 mM EDTA, pH 8.3

DNA-Probenpuffer:	0,25 M EDTA, pH 8.0
	10 % (w/v) Ficoll
	0,25 % (w/v) Bromphenolblau
	0,25 % (w/v) Xylencyanol

2.11 Elution von DNA aus Agarose-Gelen und Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen sowie die Aufreinigung restringierter DNA-Fragmente erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen/Hilden). Dieses Verfahren beruht auf der selektiven Bindung von DNA an Kieselgel-Partikel auf einer speziell entwickelten Membran in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Agarose-Reste sowie andere Verunreinigungen können unter diesen Bedingungen entfernt werden. Die Elution der DNA erfolgt anschließend unter Niedrigsalzbedingungen mit 30 µl A. dest. Prinzipiell wurde hierbei nach Herstellerangaben vorgegangen.

2.12 Klonierungsmethoden

Die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungstechniken erfolgten nach den Standardmethoden aus Sambrook *et al.* (1989).

2.12.1 Restriktion

Die hydrolytische Spaltung von DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen der Klasse II (New England Biolabs). Diese prokaryoten Enzyme erkennen palindromische Sequenzabschnitte auf der DNA und spalten die DNA, so dass 5'- oder 3'-Überhänge oder glatte Enden entstehen. Bei der Restriktion wurden die Enzyme im 5-10fachen Überschuss eingesetzt, um eine vollständige Restriktion zu gewährleisten. 1 unit ist dabei als diejenige Enzymmenge definiert, die 1 µg DNA in einem Volumen von 50 µl in 1 h bei 37 °C zu 100 % verdaut. Analytische Restriktionsansätze wurden 1 h bei 37 °C inkubiert. Präparative Verdaue liefen bis zu 4 h. Anschließend wurde die Reaktion gelelektrophoretisch überprüft (siehe Kapitel 2.10).

2.12.2 Aufbereitung der Vektoren

Die für Klonierungen eingesetzten Vektoren wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Zur Vermeidung von hohem Hintergrund bei Klonierungen durch Selbstligation des Vektors wurde dieser mit Hilfe der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) dephosphoryliert. Hierbei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Im Anschluss an die Dephosphorylierung wurden die linearisierten Vektoren ohne weitere Behandlungen über ein Agarosegel aufgereinigt (siehe Kapitel 2.10 und 2.11).

2.12.3 Ligation

Die Ligation wurde mit Hilfe der T4 DNA-Ligase durchgeführt. Für eine optimale Ligationseffizienz wurden in einem möglichst kleinen Volumen Insert-DNA und linearisierter Vektor in einem molaren Verhältnis von 2:1 bis 3:1 eingesetzt und mit 400 u T4 DNA-Ligase in einem ATP-haltigen Ligase-Puffer für mindestens 3 h bei 16 °C inkubiert. Die Ligationsansätze wurden anschließend für die Transformation von *E. coli* verwendet.

2.13 Nichtradioaktive Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde nach der Didesoxy-Methode nach Sanger *et al.* (1977) durchgeführt. Sie beruht auf dem statistisch verteilten Abbruch einer PCR aufgrund von eingebauten Didesoxy-Nucleotiden (ddNTPs). Diese besitzen keine 3'-OH-Gruppe, so daß keine Phosphodiester-Brücke mit weiteren Nucleotiden ausgebildet werden kann.

Die Sequenzreaktionen wurden mit dem „Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit“ der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) durchgeführt. Bei diesen sind die vier Didesoxynucleotide mit einem basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoff konjugiert. Die entstandenen Produkte lassen sich somit einer bestimmten Abbruchreaktion durch eines der vier ddNTPs zuordnen.

Die Sequenzreaktion erfolgte bei beiden Kits durch die *Taq*-Polymerase. Es handelt sich hierbei um eine hemi-PCR mit nur einem Primer. Im einzelnen wurden die Reaktionsansätze wie folgt erstellt und die Sequenzierungsreaktion mit dem angegeben Temperaturprogramm durchgeführt:

Reaktionsansatz	0,5 – 1 µg DNA- <i>template</i>		
	3 µl BDT <i>Ready Reaction Mix</i>		
	7 µl <i>half term</i> Puffer		
	15 pmol Sequenzierprimer		
	ad 20 µl H ₂ O		
Temperaturprofil	2 min	96 °C	
	30 sec	96 °C	
	25 sec	47-60 °C	25 Zyklen
	4 min	60 °C	

Anschließend wurde der Ansatz mit 35 µl Ethanol (p.a.) gefällt und die DNA mit 13.000 rpm in der Laborzentrifuge (Eppendorf) für 20 min bei RT sedimentiert. Für die anschließende gelelektrophoretische Analyse wurde das DNA-Sediment getrocknet und bei –20 °C gelagert.

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte auf dem „ABI Prism 377 DNA Sequencer“ (Applied Biosystem, Weiterstadt) im Haus durch Frau Ulrike Peters. Hierfür wurde das getrocknete Pellet in 2

µl Formamid/25 mM EDTA, pH 8.0 im Verhältnis 5:1 aufgenommen, 2 min bei 90 °C denaturiert und 1-2 µl aufgetragen.

2.14 Computer-gestützte Sequenzauswertung

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

CHROMAS 1.4.3 (<http://trishil.sci.gu.edu.au/~conor/chromas.html>)

CLUSTAL (Higgins & Sharp, 1988)

BLAST (Altschul *et al.*, 1990)

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

Die Sequenzdaten wurden zunächst mit dem Programm Chromas editiert. Hierfür wird die computergestützte Auswertung des „Peakmasters“ anhand des farbigen Ausdrucks überprüft und gegebenenfalls geändert. Sequenzvergleiche erfolgten mit den Programmen CLUSTAL. Sequenzvergleiche mit Datenbanken im Internet erfolgten in der „GenBank“ des NCBI (National Center of Biotechnology Information) über das Programm BLAST (Basic Local Alignment Tool/ Altschul *et al.*, 1990). Klonierungen wurden zunächst virtuell am Computer mit dem Programm Clone Manager durchgeführt.

Zur Analyse von Proteinen wurden im Internet zudem folgende Programme genutzt:

PSORT <http://psort.nibb.ac.jp/>
Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Proteinen (Nakai & Kanehisa, 1992)

PROSITE: <http://www.expasy.ch/>
Detektion von konservierten Sequenzmotiven in Proteinen (Hofmann *et al.*, 1999)

TMHMM 2.0: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>
Vorhersage der Topologie von Membranproteinen (Krogh *et al.*, 2001)

2.15 Strategien zur Klonierung rekombinanter Plasmide

2.15.1 Konstrukte zur Expression in *S. cerevisiae*

Für die funktionale Identifizierung der isolierten cDNA-Klone durch heterologe Expression in *S. cerevisiae* wurden die entsprechenden offenen Leserahmen in die beiden Expressionsvektoren pYES2 und pVT102U kloniert (siehe Kapitel 2.2). Zu diesem Zweck erfolgte zunächst eine Amplifikation der offenen Leserahmen über PCR mit der *Pfu*-Polymerase. Durch nichtkomplementäre Überhänge an den

verwendeten Primern wurden gleichzeitig Restriktionsschnittstellen an das 5'- und das 3'-Ende der offenen Leserahmen angefügt. Diese Schnittstellen dienten der Klonierung der offenen Leserahmen in die Hefe-Expressionsvektoren. In einigen Fällen wurden die aufgereinigten PCR-Amplifikate zunächst in die *Sma*I-Schnittstelle von pUC18 des SURECLONE Ligation Kits (Pharmacia Biotech) ligiert (siehe Kapitel 2.9.2). Die entstandenen Konstrukte wurden anschließend für die Transformation von *E. coli* XL1 Blue eingesetzt (siehe Kapitel 2.6). Nach präparativer Isolation der rekombinanten Plasmide (siehe Kapitel 2.7.2) wurden die Inserts mit Hilfe von Enzymen, die an den angefügten Schnittstellen restringieren, aus den Vektoren herausgeschnitten und über Agarose-Gelelektrophorese von dem pUC18-Vektor getrennt (siehe Kapitel 2.10) und aufgereinigt (siehe Kapitel 2.11). Anschließend wurden die Inserts in die entsprechend geschnittenen Hefe-Expressionsvektoren ligiert. Zur Selektion und Vervielfältigung der rekombinanten Plasmide erfolgte zunächst eine Transformation von *E. coli* XL1 Blue mit den jeweiligen Ligationsansätzen. Nach erneuter präparativer DNA-Plasmid-Isolation wurden die Expressionskonstrukte schließlich für die Transformation von *S. cerevisiae* eingesetzt (siehe Kapitel 2.17).

In einer alternativen Strategie wurde die Subklonierung in den pUC18-Vektor umgangen. Hierfür war es notwendig, den Primern neben den Restriktionsschnittstellen 3-4 weitere Nucleotide anzufügen, um eine effiziente Restriktion der PCR-Amplifikate durch die Enzyme zu ermöglichen. In diesem Fall wurden die PCR-Amplifikate nach präparativer Agarose-Gelelektrophore und Aufreinigung durch den QIAquick Gel Purification Kit (Qiagen, Hilden) sofort mit den entsprechenden Enzymen restringiert. Nach erneuter Reinigung der verdauten DNA wurden diese direkt für die Ligation mit den entsprechend geschnittenen Expressionsvektoren eingesetzt.

Tabelle 2.1. Rekombinante Plasmide, die im Rahmen dieser Arbeit zur heterologen Expression der isolierten cDNA-Klone erstellt wurden. Die entsprechenden Vektorkarten sind auch im Anhang 3 aufgeführt.

Konstrukt	Vektor	Markergen	Gen	Promotor	Klonierung
pY2ppKCS1	pYES2	amp ^R /URA3	ppKCS1	GAL1	indirekt
pY2ppKCS2	pYES2	amp ^R /URA3	ppKCS2	GAL1	indirekt
pVcpKCS1	pVT102U	amp ^R /URA3	cpKCS1	ADH	indirekt
pY2ppPSE1	pYES2	amp ^R /URA3	ppPSE1	GAL1	indirekt
pY2piPSE1	pYES2	amp ^R /URA3	piPSE1	GAL1	direkt
pY2tsPOE1	pYES2	amp ^R /URA3	tsPOE1	GAL1	direkt
pY2ts093	pYES2	amp ^R /URA3	ts093	GAL1	indirekt
pY2cc041	pYES2	amp ^R /URA3	cc041	GAL1	direkt

In Tabelle 2.1 sind die rekombinanten Plasmide aufgeführt, die für die Hefe-Expression der isolierten cDNA-Klone erstellt worden waren. Außerdem ist angegeben, ob die entsprechenden offenen Leserahmen direkt oder erst nach Subklonierung in pUC18 (indirekt) für die Ligation mit pYES2 bzw. pVT102 verwendet wurden.

2.15.2 Konstrukte zur Zerstörung des *ppKCSI*-Gens und des *ppPSEI*-Gens in *P. patens*

Das Konstrukt (pGKCS1) zur Gen-Zerstörung von *ppKCSI* in *P. patens* durch homologe Rekombination entstand durch Insertion einer Selektionskassette in den offenen Leserahmen der *ppKCSI*-cDNA. Die Selektionskassette bestand dabei aus dem *nptII*-Gen, welches vom CaMV 35S-Promotor und -Terminator flankiert war und der Selektion stabil transformierter Moospflanzen mit dem Antibiotikum G 418 diente. Für die Klonierung des Konstruktes pGKCS1 wurde die *ppKCSI*-cDNA aus dem Vektor pBluescript II SK- mit *EcoRI* herausgeschnitten und in die *EcoRI*-Schnittstelle des Vektors pZERO-2 ligiert. Die *nptII*-Kassette wurde über *HindIII*-Verdau aus dem Vektor pRT101neo (Girke et al., 1998) gewonnen und über glatte Enden in die *XmnI*-Schnittstelle des offenen Leserahmens der *ppKCSI*-cDNA in pZERO-2 kloniert. Bei der Selektion des Ligationsproduktes wurde darauf geachtet, dass die *ppKCSI*-cDNA und das *nptII*-Gen die gleiche Orientierung aufwiesen, um einen Antisense des Selektionsmarkers durch mögliche *nptII*-*ppKCSI*-Fusionstranskripte auszuschließen. Für die Transformation von *P. patens* wurde das Disruptionskonstrukt pGKCS1 aus einer Plasmid-Maxipräparation (siehe Kapitel 2.7.2) mit *SfiI* und *ClaI* verdaut, wodurch ein lineares Fragment entstand, das in der Mitte die *nptII*-Kassette und an den Enden die Segmente der *ppKCSI*-cDNA trug. Eine schematische Darstellung des Disruptionskonstruktes pGKCS1 ist in Abbildung 3.3 aufgeführt.

Das Deletionskonstrukt pGPSE1 entstand dagegen durch Substitution eines 221 bp langen Fragments des offenen Leserahmens von *ppPSEI* durch die *nptII*-Selektionskassette. Hierfür wurde der offene Leserahmen der *ppPSEI*-cDNA zunächst über PCR amplifiziert und an die Enden jeweils *BamHI*-Schnittstellen angefügt. Das PCR-Amplifikat wurde anschließend mit dem *SmaI/EcoRV*-verdauten Vektor pBluescript II SK- ligiert. Aus diesem rekombinanten Plasmid (pMPSE1) wurde das 221 bp-Fragment des offenen Leserahmens von *ppPSEI* durch *HindIII*-Verdau herausgeschnitten und durch die *HindIII*-geschnittene *nptII*-Selektionskassette aus pRT101neo ersetzt. Vor der Transformation wurde das Konstrukt pGPSE1 mit *BamHI* verdaut. Hierdurch entstand ein lineares Fragment aus der *nptII*-Selektionskassette, das von Sequenzen der *ppPSEI*-cDNA flankiert war. Eine schematische Darstellung des Deletionskonstruktes pGPSE1 ist in Abbildung 3.16 aufgeführt.

Die Transformation und Selektion von *P. patens* wurde freundlicherweise von Dr. Hauke Holtorf in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Reski an der Universität Freiburg durchgeführt. Transformierte

Pflanzen wurden mir auf Festmedium zur Verfügung gestellt und für weitere Analysen in Flüssigmedium kultiviert (siehe Kapitel 2.20).

2.16 Kultur von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *S. cerevisiae* erfolgte bei 30 °C in zwei unterschiedlichen Medien. Als Vollmedium diente YPD, während als Minimal-Medium CMdum mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen verwendet wurde (Ausubel et al., 1995). Zum normalen Wachstum auf Platten oder in Flüssigkultur enthielt dieses Medium 2 % (w/v) Glucose. In Expressionsversuchen enthielt das Medium 2 % (w/v) Raffinose. Glucose reprimiert den Promotor des in dieser Arbeit verwendeten Hefe-Expressionsvektors pYES2. Zur besseren Solubilisierung der Fettsäuren wurde den Medien 1 % (w/v) Tergitol NP-40 beigelegt.

YPD:

- 2 % (w/v) Hefeextrakt
- 2 % (w/v) Bacto Pepton
- 2 % (w/v) Glucose*

* nach dem Autoklavieren aus sterilfiltrierten Lösungen hinzugegeben

CMdum:

- 1,155 g/l DP (s. unten)
- 2 % (w/v) Glucose* oder 2% (w/v) Raffinose*
- 0,67 % (w/v) yeast nitrogen base without amino acid (YNB-AA)*
- 20 mg/l Histidin*
- 60 mg/l Leucin*
- 40 mg/l Tryptophan*
- 1 % (w/v) Tergitol NP-40

* nach dem Autoklavieren aus sterilfiltrierten Lösungen hinzugegeben

Für Platten wurde den Medien vor dem Autoklavieren 2 % (w/v) Bacto-Agar und ein NaOH-Plättchen zugegeben.

DP (dropout powder)	Adenin (Hemisulfat)	2,5 g
	L-Arginin (HCl)	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
Substanzen vermischen und mit einem Mörser pulverisieren		

2.17 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation der *S. cerevisiae*-Stämme erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode nach einem modifizierten Protokoll von Ausubel *et al.* (1995). Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass Alkali-Kationen Hefezellen für die DNA-Aufnahme kompetent machen. Die Transformation erfolgt dann mittels Zugabe von Polyethylenglycol (PEG) und einem Hitzeschock.

Hiefür wurde eine *S. cerevisiae*-ü. N.-Kultur 1:100 in YPD-Medium verdünnt. Nach Inkubation im Schüttler bei 30 °C bis zu einer OD_{600nm} von 1 bis 2 wurden die Zellen durch Zentrifugation mit 1000 x g bei RT für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment in 10 ml 0,1 M Lithiumacetat resuspendiert und unter identischen Bedingungen erneut sedimentiert. Die Zellen wurden dann in 10 ml 0,1 M Lithiumacetat aufgenommen, für 60 min bei 30 °C inkubiert und wieder sedimentiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellen in 0,5 ml 0,1 M Lithiumacetat resuspendiert. Portionen von 50 µl dieser Suspension wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und ca. 3 µg Plasmid-DNA in A. dest. zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden für 10 min bei 30 °C inkubiert, worauf die Zugabe von 0,5 ml PEG-Lösung erfolgte. Der Transformationsansatz wurde durch Schwenken gemischt, für 10 min bei 30 °C inkubiert und dann für 5 min einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 900 µl A. dest. und eine Durchmischung durch Schwenken. Nach kurzer Zentrifugation (13.000 rpm, 5 sec. RT) wurde das Sediment mit 1 ml A. dest. gewaschen, erneut zentrifugiert (s. oben) und in 100 µl A. dest. aufgenommen, bevor die Ansätze auf Selektivmedien (CMdum) ausplattiert wurden.

PEG-Lösung: 40 % (w/v) PEG 4000 in
 10 mM TrisHCl, pH 7.5

2.18 Plasmid-DNA Isolierung aus *S. cerevisiae*

Um die Identität der erhaltenen transgenen Hefe-Klone zu überprüfen, wurden aus diesen die Plasmide isoliert, in *E. coli* amplifiziert und über Restriktions- und Sequenzanalyse kontrolliert. Hierbei wurde eine Schnellmethode von Ausubel *et al.* (1995) verwendet, bei der die Hefezellen durch Behandlung mit Glasperlen und Detergenzien aufgebrochen und deren Plasmide freigesetzt werden. Dazu wurden 2 ml YPG-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und bis zur Sättigung kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß durch Zentrifugation (13.000 rpm, 5 s) sedimentiert, in 200 µl Aufschlusspuffer resuspendiert, mit 0,3 g Glasperlen (Ø=0,4 mm) versetzt und für eine min geschüttelt (Vortex-Schüttler). Nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform wurde erneut für 1 min geschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert (13.000 rpm, 2 min, RT). Die Oberphase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und einer erneuten Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen (siehe Kapitel 2.8). Die gefällte Plasmid-DNA wurde in 20 µl A. dest. gelöst und 2 µl für die Retransformation von *E. coli* eingesetzt.

Aufschlusspuffer: 2 % (v/v) Triton X-100
1 % (v/v) SDS
100 mM NaCl
10 mM Tris-HCl, pH 8.0
1 mM EDTA, pH 8.0

2.19 Heterologe Expression in *S. cerevisiae*

Eine Möglichkeit diverse Genfunktionen zu identifizieren, stellt deren heterologe Expression in einem geeigneten System dar. Die Expressionsexperimente in dieser Doktorarbeit wurden in den *S. cerevisiae*-Stämmen INVSc1 sowie Sc334 durchgeführt. Beide Stämme zeichnen sich u. a. durch eine Uracil-Auxotrophie aus, über die eine Selektion transgener Zellen erfolgen kann. Im Stamm Sc334 ist zusätzlich das *REG1*-Gen deletiert, welches für einen Glucose-induzierten P_{GAL} -Repressor kodiert. Hierfür wurden die Hefen mit den Vektoren pYES2 und pVT102U (siehe Kapitel 2.2) sowie verschiedenen Expressionskonstrukten transformiert, die in Kapitel 2.15.1 aufgelistet sind und in den entsprechenden Kapiteln der Ergebnisse und Diskussion beschrieben werden. Hefen, die pYES2 und pVT102U enthielten, stellen dabei eine Leervektor-Kontrolle dar. Ihr Phänotyp entspricht mit Ausnahme der komplementierten Uracil-Auxotrophie dem des jeweiligen Wirtes. Zur Herstellung der Expressionskonstrukte wurden die offenen Leserahmen der isolierten cDNA-Klone stromabwärts des Galaktose-induzierbaren Promotors P_{GAL1} (für pYES2) sowie des konstitutiven Promotors P_{ADH} (für pVT102U) mit den Vektoren ligiert und in *E. coli* amplifiziert. Restriktionsanalyse ermöglichte schließlich die Selektion von Konstrukten, in denen die offenen Leserahmen die gleiche Orientierung aufwiesen wie die Promotoren.

Die Anzucht der transgenen Hefen des Stamms INVSc1 erfolgte in Minimalmedium CMdum mit 2 % Raffinose als Kohlenstoffquelle. Glucose wurde nur bei Expressionsexperimenten unter Kontrolle des konstitutiven ADH-Promotors von pVT102U eingesetzt, da durch Glucose der $GAL1$ -Promotor des pYES2-Vektors reprimiert wird. Die Expression im Stamm Sc334 kann dagegen auch in Gegenwart von Glucose erfolgen. Dennoch diente auch hier Raffinose als Kohlenstoffquelle, da die P_{GAL1} -Repression nicht ausschließlich durch *REG1* vermittelt wird (Lohr *et al.*, 1995). Zur Expression wurden jeweils 2 ml Minimalmedium mit einer Einzelkolonie der transgenen Hefeklone angeimpft und bis zur Sättigung vorkultiviert. Zur Herstellung der Expressionskulturen wurden 10 ml Minimalmedium mit den Vorkulturen auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft und bei 30 °C und 180 rpm solange kultiviert, bis sie eine OD_{600} von 0,5 erreicht hatten. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Induktion des $GAL1$ -Promotors durch Zugabe von 1 ml 20 % (w/v) Galaktose. Im gleichen Moment erfolgte in einigen Ansätzen die Applikation von verschiedenen Fettsäuren (500 μ M Endkonzentration), die mögliche Substrate von Fettsäure-Elongasen darstellen, aber in den Hefen nicht synthetisiert werden. Nach weiteren 24 h Kultivierung bei 30 °C und 180 rpm wurden die Kulturen bei einer OD_{600} von 3,0-6,0 in ein Pyrex-Röhrchen überführt und die Zellen durch

Zentrifugation (1000 x g, 5 min, 8 °C) geerntet. Nach Dekantierung des Mediums wurde das Zellsediment zur Entfernung nicht inkorporierter Fettsäuren in 5 ml 100 mM NaHCO₃ resuspendiert und erneut mit den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die so erhaltenen, gereinigten Zellsedimente wurden anschließend direkt zur Derivatisierung der Fettsäuren für die gaschromatographische Analyse eingesetzt (siehe Kapitel 2.26.3).

Um den Effekt von Cerulenin auf die rekombinanten Elongationsproteine zu untersuchen, wurde dem Medium von Beginn an Cerulenin in einer Endkonzentration von 50 µM aus einer ethanolischen Stammlösung (100 mM) zugefügt. Gleichzeitig erfolgt in diesem Fall die zusätzliche Applikation von gesättigten und einfach ungesättigten C₁₆- und C₁₈-Fettsäuren (100 bzw. 200 µM), um die Hemmung der Fettsäure-Biosynthese durch Cerulenin zu komplementieren.

2.20 Kultur von *Physcomitrella patens* und Fettsäurefütterungen

Die Kultivierung von *Physcomitrella patens* erfolgte in einem modifizierten Knop-Flüssig- oder Festmedium (Reski & Abel, 1985). Dabei wurden die Kulturen in einer Phytokammer bei 25 °C unter einer Lichtstärke von 55 µE x m⁻² x s⁻¹ (Weißlicht, Philips TL, 65 W/25) und einem Licht/Dunkelwechsel von 16/6 Stunden inkubiert.

Knop-Flüssigmedium: 0,25 g/l KH₂PO₄*
 0,25 g/l KCl*
 0,25 g/l MgSO₄ · 7 H₂O*
 1,0 g/l Ca(NO₃)₂ · 4 H₂O*
 12,5 mg FeSO₄ · 7 H₂O
 * aus 100 x konzentrierten Stammlösungen
 mit 1 N KOH vorsichtig auf pH 5,6-5,8 einstellen
 autoklavieren

Knop-Festmedium: 10 g Oxid-Agar (Unipath, Basingstoke, England) pro Liter Knop-Flüssigmedium
 autoklavieren

Für die Kultivierung auf Festmedium wurden einzelne Moos-Pflanzen auf Knop-Festmedium gesetzt und die verschlossenen Platten mit Parafilm abgedichtet. Alle 2-3 Monate erfolgte ein Umsetzen der Pflanzen auf frisches Festmedium.

Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben, die mit Silikonkappen (Bellco, Vineland, New Jersey) steril abgedeckt waren, inkubiert und zur Durchlüftung dauerhaft bei 100 rpm geschüttelt. Zur Vermehrung der Moospflanzen wurden die Pflanzen alle 14 Tage mit einem sterilen Ultra-Turrax-Stab

zerkleinert und in frisches Knop-Flüssigmedium überführt. Die Vermehrung wurde dabei nach folgendem Schema durchgeführt.

1. Kultur: 20 ml (in 100 ml Erlenmeyerkolben) mit einigen Moospflanzen vom Festmedium versetzt
2. Kultur: 20 ml Kultur mit 30 ml frischem Medium versetzt (100 ml Kolben)
3. Kultur: 50 ml Kultur mit 70 ml frischem Medium versetzt (250 ml Kolben)
4. Kultur: 120 ml Kultur mit 120 ml frischem Medium versetzt (500 ml Kolben)
5. Kultur: 240 ml Kulturen geteilt und mit jeweils 120 ml frischem Medium versetzt (500 ml Kolben).

Die Ernte der Pflanzen erfolgte 14 Tage nach dem letzten Umsetzen mittels Filtration durch Nylongaze (100 μm , Züricher Beuteltuchfabrik). Zur späteren Isolierung von genomischer DNA (siehe Kapitel 2.21) wurden diese sofort mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für die Analyse der Fettsäureprofile wurden die Pflanzen sofort nach der Ernte für die Darstellung von Fettsäuremethylestern eingesetzt (siehe Kapitel 2.26.3).

Die Kultivierung von *P. patens* in Gegenwart von $20:3^{\Delta 8,11,14}$ erfolgte wie in der Dissertation von Dr. Thomas Girke (1998) beschrieben. Hierfür wurde die Fettsäure zunächst in das leichter wasserlösliche Ammoniumsalz überführt und den Flüssigkulturen in einer Endkonzentration von $50\text{ }\mu\text{M}$ zugegeben. Die Applikation erfolgte dabei 3 Tage nach dem letzten Umsetzen. Anschließend wurden die Kulturen für 10 weitere Tage kultiviert und dann nach mehrmaligen Waschungen mit 100 mM NaHCO_3 (pH 8.0) für die Darstellung der Fettsäuremethylester eingesetzt (siehe Kapitel 2.26.3).

$20:3^{\Delta 8,11,14}$ -Ammoniumsalz: 36 $\mu\text{mol } 20:3^{\Delta 8,11,14}$, 100 μl Methanol und 100 μl Ammoniaklösung (25 %) vermischen und 15 min bei RT inkubieren. Unter Argon gründlich abdampfen, in 4 ml abs. Ethanol lösen. Für eine Endkonzentration von $50\text{ }\mu\text{M}$ in 40 ml Medium 224 μl der ethanolischen Fettsäure-Lösung zugeben.

2.21 Isolierung genomischer DNA aus *Physcomitrella patens*

Die Isolierung genomischer DNA aus *P. patens* erfolgte nach einer abgeänderten Methode von Rogers & Bendich (1988; Girke, 1998). Hierfür wurden ca. 1,5 g gemörserte Moospflanzen in ein 14 ml-Falcon-Röhrchen überführt, mit 3 ml Aufschlusspuffer versetzt und eine Stunde bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, wobei das Falcon-Röhrchen alle 10 min invertiert wurde. Nach Abkühlung wurde zweimal mit 3 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) für 5 min extrahiert und zur Phasentrennung jeweils mit $3220 \times g$ 30 min bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Die Oberphasen der Extraktionen wurden anschließend in einem neuen Gefäß vereinigt. Die darin enthaltene genomische DNA wurde nach Zugabe des gleichen Volumens eiskalten Isopropanols für 30 min bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt und durch Zentrifugation ($3220 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 45 min)

pelletiert. Das getrocknete Pellet wurde dann in 180 µl TE-Puffer gelöst, auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und mit je 1 ml eiskaltem Ethanol (p.a.) für 15 min auf Eis erneut gefällt. Nach Pelletierung durch Zentrifugation (14.000 rpm, 4 °C, pH 7,5) und Waschen der DNA mit je 500 µl 70 % (v/v) Ethanol wurde die DNA über Nacht in 50 µl TE-Puffer mit 0,5 µl RNase A (10 mg/ml) bei 4 °C gelöst. Die DNA-Ausbeuten lagen i. d. R. bei 30 µg DNA pro g Pflanzenmaterial, obwohl die Bestimmung über Gelelektrophorese und Photometrie z. T. stark unterschiedliche Werte aufwiesen.

CTAB-Puffer: 2 % (w/v) N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB)
100 mM Tris-HCl, pH 8.0
1,4 M NaCl
20 mM EDTA

N-Lauroylsarcosin-Puffer: 10 % (w/v) N-Lauroylsarcosin
100 mM Tris-HCl, pH 8.0
20 mM EDTA

Aufschluss-Puffer: 6 ml CTAB-Puffer
0,6 ml N-Lauroylsarcosin-Puffer
0,12 ml β-Mercaptoethanol
0,6 mg Proteinase K

2.22 Hybridisierungen mit DIG-markierten Sonden

Sämtliche Hybridisierungen wurden mit dem DIG-System der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Es beruht auf der Hybridisierung von DNA mit Digoxigenin-markierten Sonden. Diese Sonden werden durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP in die DNA markiert. Die DIG-markierten Sonden werden durch ein Anti-Digoxigenin Antikörper-Alkalische Phosphatase-Konjugat erkannt. Die Detektion der Sonde erfolgte über eine Chemilumineszenz-Reaktion einer CSPD®-Lösung oder über eine Farbreaktion, welche beide durch die Alkalische Phosphatase katalysiert werden.

2.23 Nichtradioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die nichtradioaktive Markierung von DNA erfolgte mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche/Mannheim). Sie beruht auf dem Einbau von Digoxigenin-11-UTP während einer PCR.

Nach Herstellerangaben wurde folgender Reaktionsansatz erstellt:

50 ng	<i>template</i> DNA
5 µl	10 x PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl; 500 mM KCl; pH 8.3 (20 °C)
3 µl	25 mM MgCl ₂
2,5 µl	PCR DIG Probe Synthesis Mix
2,5 µl	10 mM dNTPs
50 pmol	Primer I
50 pmol	Primer II
2-3 u	<i>Taq</i> DNA-Polymerase
ad 50 µl	A. dest.

Die PCR erfolgte nach dem Standard-Temperaturprofil. Sonden wurden für die Isolierung von Volllänge-Klonen aus cDNA-Banken von *P. infestans* (PI-DIG), *Thraustochytrium* sp. (TS-DIG) und *C. cohnii* (CC-DIG) sowie für die Southern-Analysen der *P. patens* Disruptions- und Deletionsmutanten erstellt (KCS1-DIG bzw. PSE-DIG). Die hierfür abgeleiteten Primer sind im Anhang 1 aufgelistet.

2.24 Southern Blot

2.24.1 Restriktion

Für die Southern Blot-Analyse wurden je 6 µg genomische DNA von *Physcomitrella patens* mit 20 units verschiedener Restriktionsenzyme für 4 h bei 37 °C verdaut. Die DNA-Fragmente wurden anschließend in einem 0,7 %igen Agarose-Gel in TBE-Puffer mit 80 V für 6 h bei RT aufgetrennt. Als Längenstandard dienten hierbei 500 ng Lambda-DNA/*Bst*EII. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde am UV-Transilluminator überprüft und durch den Photoprinter dokumentiert.

2.24.2 DNA-Transfer auf Nylonmembranen

Der DNA-Transfer aus dem Gel auf eine Nylonmembran (QIABRANE, Qiagen, Hilden) erfolgte über einen Kapillar-Blot nach Sambrook *et al.* (1989). Um den Transfer von großen DNA-Fragmenten zu erleichtern, wurden die DNA-Fragmente im Agarose-Gel durch HCl-Behandlung depuriniert. Durch anschließende Alkalibehandlung zerbrechen die DNA-Fragmente an den depurinierten Stellen. Im einzelnen sahen diese Vorbehandlungen wie folgt aus:

1. Waschen des Agarose-Gels in 250 mM HCl für 10 min bei RT
2. Spülen des Gels mit A. dest.
3. 2 x 15 min Waschen des Gels in Denaturierungs-Lösung bei RT
4. Spülen des Gels mit A. dest.

5. 2 x 15 min Waschen des Gels in Neutralisierungs-Lösung bei RT

Anschließend wurde der Kapillar-Blot mit 20 x SSC als Transferpuffer ü.N. bei RT durchgeführt. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte am nächsten Tag durch UV-Crosslink mit 0,12 J/cm² im UV-Crosslinker. Anschließend wurden die Membranen kurz mit A. dest. gespült und konnten dann entweder bei +4 °C gelagert oder direkt für die Hybridisierung eingesetzt werden.

Denaturierungs-Lösung: 0,5 N NaOH
1,5 M NaCl

Neutralisierungs-Lösung: 0,5 M Tris/HCl, pH 7.5
3 M NaCl

20 x SSC: 3 M NaCl
300 mM Na-Acetat, pH 7.0

2.24.3 Hybridisierung

Zum Blockieren der Bereiche auf den Nylonmembranen, an die keine DNA fixierte, wurde die Membran zunächst prä-hybridisiert. Dies erfolgte pro Membran mit 20 ml DIG Easy Hyb, einem gebrauchsfertigen Hybridisierungspuffer der Firma Roche (Mannheim), bei 42 °C für 3 h im Hybridisierungssofen.

Für die Hybridisierung wurden je 5 ml DIG Easy Hyb mit 25 ng/ml der Sonde KCS1-DIG bzw. PSE-DIG versetzt. Die Hybridisierung erfolgte ü. N. bei 42 °C im Hybridisierungssofen. Dieser schlossen sich am nächsten Tag einige Waschschrte zur Entfernung nicht-hybridisierter Sonden an. Zunächst wurden die Membranen je 2 x 5 min in 2 x Waschlösung gespült. Anschließend wurde je 2 x 15 min unter stringenteren Bedingungen bei 68 °C in 0,5 x Waschlösung gewaschen.

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

2.24.4 Detektion

Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz ausgelöst durch eine Lumineszenz-Reaktion, die durch eine Antikörper-konjugierte alkalische Phosphatase katalysiert wird. Hierfür wurden die Membranen zunächst 1 min in Waschpuffer äquilibriert und unspezifische Bindungsstellen auf der Membran mit 50 ml 2 % Blockinglösung für 60 min bei RT blockiert. Anschließend wurde die Membran für 30 min in 30 ml Antikörperlösung bei RT inkubiert. Dem schlossen sich zwei 15minütige Waschungen in Waschpuffer bei RT an, bevor die Membranen zur Vorbereitung der Lumineszenz-Reaktion in Detektionslösung äquilibriert wurden. Für diese wurden die Membranen mit 1 ml CSPD®-Lösung versetzt und unter Ausschluß von Luftblasen in Kunststoffolie eingeschweißt. Zunächst wurden die

Membranen für 5 min bei RT im Dunkeln belassen. Anschließend wurden sie für 15 min bei 37 °C inkubiert.

Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte über die Belichtung eines Röntgenfilms (HYPERFILM™; 18 x 24 cm), der zu diesem Zweck im Dunkeln für 5 min auf die Membran gelegt wurde. Die Entwicklung der Filme erfolgte maschinell.

Maleinsäurepuffer:	0,1 M Maleinsäure, pH 7.5 (mit NaOH-Plätzchen) 0,15 M NaCl
Waschpuffer:	Maleinsäurepuffer mit 0,3 % (w/v) Tween®20
10 % Blocking-Lösung:	10 % (w/v) Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer
Antikörper-Lösung:	3 µl Anti-Digoxigenin-AP (Fab-Fragmente mit alkalischer Phosphatase konjugiert; 750 units/ml) in 30 ml 2 % (w/v) Blockierungslösung
Detektionslösung:	0,1 M Tris/HCl, pH 9.5 0,1 M NaCl
CSPD®-Lösung:	10 µl 25 mM 3-(4-Methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'chloro)tricyclo[3.3.1 ^{3,7}]decan}-4-yl) phenylphosphat, Dinatrium-Salz in 1 ml Detektionslösung

2.25 Isolierung von cDNA-Klonen aus cDNA-Banken

Für die Isolierung von cDNA-Klonen, die für putative Elongationsenzyme kodieren, standen mir cDNA-Banken von *Physcomitrella patens*, *Thraustochytrium* sp., *Cryptocodinium cohnii* und *Phytophthora infestans* zur Verfügung. Bei allen Banken handelt es sich um Lambda-ZAP II-cDNA-Banken, welche auch in den EST-Sequenzierungsprojekten verwendet wurden.

Hierbei handelt es sich um ein System, welches die Biologie des Lambda-Phagen mit der des f1-Phagen kombiniert und die einfache Handhabung von Plasmiden integriert. In dem Lambda-DNA-ZAP II-Vektor ist der entbehrliche Bereich der Lambda-Phagen-DNA durch das die cDNA enthaltende Plasmid pBluescript SK⁻ ersetzt. Flankiert ist dieser Bereich vom Replikationsursprung des Bakteriophagen f1, der für die Initiation bzw. Termination der Positiv-Strang-Synthese erforderlich ist. Dadurch läßt sich das Plasmid zusammen mit der einklonierten cDNA durch Coinfektion von *E.coli*-XL1 Blue-Zellen mit dem Helferphagen ExAssist™ als einzelsträngiger Phagemid gewinnen. Der Helferphage kodiert Proteine des Replikationsapparates des f1-Bakteriophagen, die den Replikationsursprung erkennen und die dazwischenliegende DNA als

Einzelstrang replizieren. Dieser wird zirkularisiert, mit Proteinen verpackt und als Phagemid aus der *E.coli*-Zelle sekretiert. Der Phagemid wird durch Einschleusen in *E.coli* SOLR-Zellen in die doppelsträngige Plasmid-Form überführt. Durch Verwendung von zwei verschiedenen *E.coli*-Stämmen kann die Replikation der Phagen-DNA von der Plasmid-Synthese getrennt werden. Der *E.coli*-SOLR-Stamm ist zum einen gegen eine Infektion durch den Lambda-Phagen resistent. Außerdem kann der Helferphage ExAssist™, dessen Genom eine amber-Mutation enthält, nicht repliziert werden, da es sich bei SOLR um einen Stamm handelt, dessen Zellen diese Mutation nicht supprimieren können.

2.25.1 Anzucht und Vorbereitung der Bakterien

Für die Infektion wurden 50 ml LB-Flüssigmedium (ergänzt durch 0,2 % (w/v) Maltose und 10 mM MgSO_4) mit 1 ml einer ü.N.-Kultur von *Escherichia coli* XL1 Blue angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5-1,0 bei 37 °C unter Schütteln mit 200 rpm angezogen. Die Supplementation des LB-Mediums mit Maltose diente der Erhöhung der Infektionsrate, da Maltose die Expression des Maltoserezeptors fördert, an welchen die Phagen binden. Nach Infektion wurden die Bakterien in Top-Agar auf NZY-Platten kultiviert.

Anschließend wurden die Zellen mit 3000 x g für 10 min bei 4 °C sedimentiert, in 10 mM MgSO_4 resuspendiert und bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,5$ verdünnt. Die Zellen konnten so für 48 h bei 4 °C gelagert werden.

2.25.2 Titerbestimmung der cDNA-Bank

Vor dem Screening der Bank mußte der Titer der cDNA-Bank bestimmt werden, d.h. die *plaque-forming units* (pfu)/ μl . Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe der cDNA-Bank bis zu einer Verdünnung von $1:10^8$ in SM-Puffer erstellt. Für die Infektion wurden 600 μl der Bakteriensuspension von 2.17.1 mit 10 μl jeder Phagenverdünnung vermengt und 15 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Dies ermöglichte den Phagen an den Maltoserezeptoren der Bakterien „anzudocken“ und die Infektion einzuleiten. Anschließend wurden die Bakterien zu 6,5 ml 48 °C warmen Top Agar gegeben und kurz geschüttelt. Der Top Agar wurde nun auf große NZY-Platten ($\varnothing = 130$ mm) gegossen und durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig verteilt. Nachdem der Top Agar erstarrt war, wurden die Platten kopfüber bei 37 °C für 10-12 h bebrütet, bis sich auf der Platte *plaques* von 1-2 mm Durchmesser gebildet hatten. Durch Auszählen der *Plaques* konnte anschließend der Titer der Phagen berechnet werden.

SM-Puffer: 5 g/l NaCl
 2 g/l MgSO_4
 50 mM Tris/HCl, pH7.5

0,01 % (w/v) Gelatine

2.25.3 Plattieren der cDNA-Bank

Das Plattieren der cDNA-Banken für die Isolierung von cDNA-Klonen erfolgte prinzipiell wie in Kapitel 2.25.2 beschrieben. Beim ersten Absuchen der Bank wurden pro Platte 600 µl Bakteriensuspension mit je 5×10^4 pfu der Phagenbank infiziert und nach Zugabe zu 6,5 ml Top Agar auf große NZY-Platten plattiert. Von jeder Bank wurden für die Isolierung von cDNA-Klonen 10 solcher Platten hergestellt. Beim Rescreening der positiven Signale wurden je 200 µl der Bakteriensuspension mit 1:100 bzw. 1:1000 Verdünnungen der in SM-Puffer eluierten Phagen infiziert, mit 4 ml Top Agar (48 °C) vermennt und auf kleine NZY-Platten ($\varnothing = 82$ mm) plattiert. Nach ca. 8 h konnten auf den Platten plaques mit bis zu 2 mm Durchmesser detektiert werden.

NZY-Medium:	5 g/l NaCl 2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NZ-Amin (Caseinhydrolysat) pH 7.5 mit NaOH
NZY-Platten:	1 l NZY-Medium 15 g Difco Microagar/ 1 l NZY-Medium
Top Agar:	0,7% (w/v) Agarose in NZY-Medium

2.25.4 Plaque-Transfer auf Nylon-Membranen

Der Plaque-Transfer auf Nylon-Membranen erfolgte durch luftblasenfreies Auflegen einer Membran auf die Top Agar-Oberfläche der NZY-Platten für 1 min. Die Platten mußten zuvor mindestens für 2 h bei 4 °C gehalten werden, um zu gewährleisten, dass der Top Agar nicht an der Membran haften bleibt. Durch Nadeleinstich in Membran und Platte wurden beide so markiert, dass positive Signale auf dem Film den entsprechenden Plaques auf den Platten zugeordnet werden konnten.

Die Membranen mit den daran haftenden Phagenpartikeln wurden nun mit der Unterseite nach oben für 5 min auf Whatman 3M-Papier gelegt, welches mit Denaturierungslösung durchtränkt war. Anschließend wurden sie auf Whatman 3M-Papier transferiert, welches in Neutralisierungs-Lösung getränkt wurde. Nach 5 min wurden sie für 15 min gewaschen, indem sie auf in 2 x SSC durchtränktes Whatman 3M-Papier gelegt wurden. Nachdem die Membranen getrocknet waren, wurde anhaftende DNA durch UV-Crosslinken mit $0,12 \text{ J/cm}^2$ fixiert.

Denaturierungs-Lösung:	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisierungs-Lösung:	1 M Tris/HCl, pH 7,5 1,5 M NaCl
2 x SSC:	0,3 M NaCl 30 mM Natriumcitrat, pH 7.0

2.25.5 Plaque-Hybridisierung

Prä-Hybridisierung und Hybridisierung erfolgten wie bei der Southern-Hybridisierung mit der Hybridisierungslösung DIG Easy Hyb (siehe Kapitel 2.24.3). Die Prähybridisierung erfolgte im Wasserbad bei 42 °C in einem Behälter mit 10 ml Hybridisierungspuffer pro Nylonmembran für 2 h unter leichtem Schütteln. Die Membranen werden einzeln in den Behälter gelegt und geschwenkt, bis sie vollständig mit Puffer bedeckt waren. Die Hybridisierung erfolgte unter gleichen Bedingungen mit 5 ml Hybridisierungspuffer pro Nylonmembran ü.N. Die Sondenkonzentration betrug 25 ng/ml Hybridisierungspuffer. Die Denaturierung der Sonde erfolgte durch 10minütiges Kochen im Wasserbad und anschließendem Abkühlen auf Eis. Die Hybridisierungslösung mit der Sonde ist mehrmals wiederverwendbar und kann bei –20 °C gelagert werden. Die sich anschließenden Waschungen erfolgten wie bei der Southern-Hybridisierung zunächst 2 x mit 2 x Waschlösung (20 ml/Membran) bei RT und 2 x mit 0,5 x Waschlösung (20 ml/Membran) bei 68 °C.

2.25.6 Detektion

Auch die Detektion erfolgte in den ersten Schritten prinzipiell wie bei der Southern-Hybridisierung. Zum Blockieren (1 h, RT) dienten 30 ml 2 % Blockierungslösung pro Membran. Für das Binden des Antikörpers (30 min, RT) an die hybridisierte Sonde wurden pro Membran 4 µl Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat in 20 ml 2 x Blockierungslösung verdünnt. Die Detektion hybridisierter Sonden basiert diesmal aber nicht auf einer Chemilumineszenzreaktion, sondern auf einer Farbreaktion von 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat (BCIP) und Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT). Hierbei katalysiert die alkalische Phosphatase des Anti-Digoxigenin-AP-Konjugates die Dephosphorylierung von BCIP. Das Reaktionsprodukt oxidiert dann in Gegenwart des Elektronenakzeptors NBT. Beide bilden so einen blauen Niederschlag aus, der sich auf den hybridisierten Sonden niederlässt. Zu diesem Zweck wurden die Membranen zunächst in Detektionslösung äquilibriert und anschließend einzeln mit 10 ml Detektionslösung sowie je 35 µl BCIP- (50 mg/ml) und NBT-Lösung (100 mg/ml) in Folie eingeschweißt und für 2 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch einmaliges Waschen der Membranen in A. dest. Die Signale auf den Membranen konnten dann anhand der Markierungen bestimmten Bereichen auf der NZY-Platte zugeordnet werden. Diese

Bereiche wurden mit einem Korkbohrer bzw. beim dritten Screening mit einer Pasteur-Pipettenspitze ausgestochen und in 1 ml bzw. 0,5 ml SM-Puffer ü.N. bei 4 °C eluiert. Die Eluate wurden nun für ein Rescreening eingesetzt oder für die *in vivo* Excision herangezogen.

2.25.7 *in vivo*-Excision

Für die *in vivo*-Excision wurden ü.N.-Kulturen der *Escherichia coli*-Stämme SOLR und XL1 Blue MFR⁺ bei 30 °C in LB-Medium angezogen. Mit 500 µl der ü.N.-Kulturen wurden am nächsten Tag 50 ml Hauptkulturen angeimpft und bei 37 °C auf eine OD₆₀₀ von 0,2 - 0,5 angezogen. Die Kultur mit dem SOLR-Stamm wurde bei RT bis auf eine OD₆₀₀ von 0,5 – 1,0 weiter inkubiert. Die Kultur der XL1 Blue MFR⁺-Zellen wurde mit 1500 x g für 10 min bei 4 °C sedimentiert und das Zellsediment in 10 mM MgSO₄ resuspendiert und bis auf eine OD₆₀₀ = 1,0 verdünnt. In einem 15 ml Falcon-Röhrchen wurde nun für die Co-Infektion dieser Zellen folgender Ansatz erstellt:

200 µl XL1 Blue MRF⁺ (OD_{600nm} = 1,0)
250 µl Phageneluat (1:50 in SM-Puffer verdünnt)
1 µl ExAssist™ Helferphage

Dieser Ansatz wurde 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 3 ml LB-Medium hinzugegeben und 2,5 h bei 37 °C inkubiert. Die Kultur der Zellen wurde nun mit 2000 x g für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert und der die Phagemide enthaltende Überstand in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und für 15 min auf 70 °C erhitzt. Anschließend wurde mit 4000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den Phagemiden wurde erneut in ein neues Gefäß überführt und war so für 1-2 Monate haltbar.

Zum Erlangen der Plasmide wurden nun 200 µl der SOLR-Zellen mit 10 µl der Phagemide infiziert. Hierfür wurde der Ansatz für 15 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. 1 µl dieses Ansatzes wurde auf LB-Amp 100 Platten, auf die 50 µl LB-Medium vorgelegt wurden, ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Einzelne Klone konnten nun einer DNA-Mini-Präparation (siehe Kapitel 2.7.1) unterzogen werden und mittels Restriktion (siehe Kapitel 2.12.1) und Sequenzierung (siehe Kapitel 2.13) analysiert werden.

2.26 Lipidanalytik

2.26.1 Isolierung von Fettsäuren

Zur Bestimmung der Substratspezifität der isolierten Elongationsenzyme wurden Hefe-Expressionsexperimente in Gegenwart einer Vielzahl verschiedener Fettsäuren durchgeführt, von denen einige nicht kommerziell erwerbbar waren. Zum Teil wurden diese Fettsäuren freundlicherweise von Dr. Christoph Beckmann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wilhelm Boland

am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie der Universität Jena synthetisiert. Andere Fettsäuren wurden wiederum aus verschiedenen pflanzlichen Organismen isoliert. So diente Petersilie mit einem hohen Anteil an $16:3^{\Delta 7,10,13}$ in der *sn*-2-Position des plastidären MGDs als Quelle für diese Fettsäure. Pinolensäure ($18:3^{\Delta 5,9,12}$) und Columbinsäure ($18:3^{\Delta 5,9,12}$) wurden dagegen aus Lärchen- bzw. Akeleisamen isoliert.

Hexadecatriensäure

Zur Isolierung von Hexadecatriensäure ($16:3^{\Delta 7,10,13}$) wurde zunächst das MGD aus Petersilie (*Petroselinum crispum*) extrahiert und aufgereinigt. Hierzu wurden 100 g Petersilienblätter in 100 ml Methanol mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 ml Chloroform. Die untere organische, lipidhaltige Phase wurde entfernt und Restlipide in der wässrigen Phase durch Zugabe von 100 ml Chloroform/Methanol (2:1) über Nacht extrahiert. Die beiden organischen Phasen wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer bis zur Trockenheit eingeeengt und schließlich in 18 ml Chloroform/Methanol aufgenommen. Anschließend wurde die organische Phase mit 6 ml 0,45% NaCl vermischt und nach Zentrifugation für 5 min bei 1000 x g die untere lipidhaltige Phase über eine mit Watte verschlossene Pasteurpipette zur Trennung von Zellrückständen in ein Spitzröhrchen filtriert und unter Argon wieder bis zur Trockenheit eingeeengt. Die Trennung des MGDs von den anderen Lipiden erfolgte dann über eine Kieselgelsäule, die zuvor mit Chloroform/Aceton (9:1) äquilibriert worden war. Hierfür wurden die extrahierten Lipide in 2 ml Chloroform/Aceton (9:1) aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Dem schlossen sich fünf verschiedene Elutionsschritte mit den aufgeführten Lösemitteln an:

1. Elution: 150 ml Chloroform/Aceton (9:1)
2. Elution: 100 ml Chloroform/Aceton (75:25)
3. Elution: 100 ml Chloroform/Aceton (75:25)
4. Elution: 100 ml Chloroform/Aceton (65:35)
5. Elution: 100 ml Chloroform/Aceton (60:40)

Die einzelnen Eluate wurden in Rundkolben aufgefangen, im Rotationsverdampfer bis zur Trockenheit eingeeengt, in 1 ml Chloroform aufgenommen und ihre Lipidzusammensetzung über Dünnschichtchromatographie analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Eluate auf Kieselgel-Platten (Kieselgel 60, Schichtdicke 0,25 mm, Merck) aufgetragen und mit Chloroform/Methanol/A. dest. (70:30:4) als Laufmittel entwickelt. Für die Zuordnung der Lipid-Banden wurden Referenz-Substanzen aufgetragen. Zur Detektion der Glycolipide wurden die entwickelten Platten mit einem α -Naphthol/Schwefelsäure-Reagenz besprüht und erhitzt. Das gereinigte MGD befand sich in den Eluate 3 und 4. Zur Bestimmung der Ausbeute erfolgte eine erneute Einengung der vereinigten Eluate am Rotationsverdampfer. Aus 100 g Petersilie konnten 250 mg MGD isoliert werden. Die darin enthaltenen Fettsäuren wurden anschließend durch saure Methanolyse in die

Fettsäuremethylester (FAMES) überführt und extrahiert (siehe Kapitel 2.26.3). Zur Auftrennung der verschiedenen Komponenten über HPLC wurden die unter Argon eingeeengten FAMES in 200 µl Methanol gelöst und zu 20 µl-Anteilen in den Chromatographen injiziert (siehe 2.26.2).

α -Naphthol/Schwefelsäure: 8 g α -Naphthol in 250 ml Methanol lösen, 20 ml A. dest. zugeben und unter Kühlung im Eisbad langsam 30 ml konzentrierte H₂SO₄ zugeben.

Pinolen- und Columbinsäure

Zur Isolierung von Pinolensäure (18:3 ^{$\Delta^{5,9,12}$}) aus *Larix decidua* sowie Columbinsäure (18:3 ^{$\Delta^{5trans,9,12}$}) aus *Aquilegia vulgaris* wurden je 1 g Lärchen- bzw. Akeleisamen in einer Schwingmühle für 1 min mit einer Stahlkugel pulverisiert. Das Samenpulver wurde anschließend zu gleichen Teilen auf 2 Pyrex-Röhrchen verteilt und die darin enthaltenen Fettsäureester wurden durch saure Methanolyse in die Fettsäuremethylester (FAMES) überführt (siehe Kapitel 2.26.3). Die extrahierten FAMES wurden unter Argon bis zur Trockenheit eingeeengt und in 200 µl Methanol aufgenommen, von denen wiederum jeweils Anteile von 20 µl für die Auftrennung der verschiedenen FAMES über HPLC eingesetzt wurden.

2.26.2 Trennung von Fettsäure-Methylestern über HPLC

Für die Auftrennung der FAMES über HPLC wurden die extrahierten FAMES aus Petersilienblättern sowie Lärchen- und Akeleisamen wie bereits erwähnt in 200 µl Methanol aufgenommen und in 20 µl Aliquots in den Chromatographen injiziert.

HPLC-Bedingungen:

Säule:	ODS-Hypersil RP-18, 5 µm, 4,6 x 250 mm (Bischoff)
Flußrate:	1 ml/min
Detektion:	UV-Absorption bei 210 nm
Mobile Phase:	Methanol/Acetonitril/A. dest. (90:10:20)
Elution:	45 min isokratisch

Die am UV-Detektor detektierten Fettsäuremethylester wurden einzeln in Spitzröhrchen aufgefangen, unter Argon bis zur Trockenheit eingeeengt und in Petrolether (PE) aufgenommen. Die Identifizierung und Konzentrationsbestimmung der FAMES erfolgte anschließend mittels GLC-Analyse durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen entsprechender Standards (siehe Kapitel 2.26.3).

Für die Hefe-Expressionsexperimente wurden die FAMES wieder bis zur Trockenheit eingeeengt und durch Inkubation mit 2 ml 0,1 N KOH in 50 % (v/v) Methanol in Fettsäuresalze überführt. Nach

Neutralisierung mit H_2SO_4 wurden die freien Fettsäuren mit 2 x 2 ml PE extrahiert, bis zur Trockenheit eingengt und in einem solchen Volumen Ethanol (abs.) aufgenommen, dass sie in einer Konzentration von 100 mM vorlagen. Den Expressionsmedien wurden sie dann in solchen Mengen zugefügt, dass sie in einer Endkonzentration von 500 μM vorlagen (siehe Kapitel 2.19).

2.26.3 Darstellung und GLC-Analyse von Fettsäuremethylestern

Die Darstellung von Fettsäuremethylestern für die GLC-Analyse erfolge durch saure Methanolyse. Dazu wurden entweder ganze Moospflanzen (siehe Kapitel 2.20), gereinigte Hefe-Zellsedimente (siehe Kapitel 2.19), pulverisierte Lärchen- oder Akelei-Samen (*Larix decidua* bzw. *Aquilegia vulgaris*) (siehe Kapitel 2.26.1) sowie gereinigtes MGD aus Petersilie (*P. crispum*) (siehe Kapitel 2.26.1) in einem Pyrex-Gläschen mit 2-5 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2 % (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80 °C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte nach Abkühlung der Ansätze durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Die oberen PE-Phasen wurden in einem Spitzröhrchen vereinigt und zur Entfernung nichtderivatisierter freier Fettsäuren je 1 x mit 2 ml 100 mM NaHCO_3 , pH 8.0 und 2 ml A. dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na_2SO_4 getrocknet, unter Argon eingedampft und in 50-100 μl PE aufgenommen. Zur GLC-Analyse wurden 1-5 μl in den Gaschromatographen injiziert. Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma) sowie über GLC-Massenspektroskopie (GLC-MS) der jeweiligen Dimethoxyoxazolin-Derivate. Die GLC-MS-Analyse sowie die notwendige weitere Derivatisierung der FAMES wurde freundlicherweise von Herrn Dr. H. Moll und PD Dr. U. Zähringer im Forschungszentrum Borstel durchgeführt.

GC-Bedingungen:

Gaschromatograph:	Hewlett-Packard 6850
Säule:	ZB-Wax, 30 m, 0.32 mm, 0.25 μm film (Phenomenex, Torrance, CA)
Detektor:	Flammenionisationsdetektor
Trärgas:	Stickstoff 5.0
Software:	HP ChemStation Rev. A 06.03.

3 Ergebnisse und Diskussion

Ziel dieser Doktorarbeit war die Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von Fettsäure-Elongationsenzymen, die an der Biosynthese mehrfach ungesättigter sehr langkettiger Fettsäuren beteiligt sind (PSE1 = PUFA-spezifische Elongasen). Dies geschah mit besonderem Fokus auf Enzyme, die die initiiierende Kondensationsreaktion der vier Reaktionen beinhaltenden Fettsäure-Elongation katalysieren (siehe Abbildung 1.5), da sowohl Aktivität als auch Selektivität der Elongase durch dieses Protein bestimmt wird (Millar & Kunst, 1997). Die Biosynthese von C₂₂-VLC-PUFAs erfordert die Aktivität von zwei unterschiedlichen PUFA-Elongasen. Die Δ^6 -Elongase katalysiert die Elongation von C₁₈-PUFAs mit einer Δ^6 -Doppelbindung, während die Δ^5 -Elongase für die Elongation von C₂₀-PUFAs mit einer Δ^5 -Doppelbindung verantwortlich ist (siehe Abbildung 1.7).

In Tabelle 3.1 sind die Organismen mit ihrem jeweiligen Gehalt an C₂₀- und C₂₂-PUFAs aufgeführt, aus denen die Isolierung der Elongase-Gene erfolgen sollte. Das Moos *Physcomitrella patens* akkumuliert mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit bis zu 20 Kohlenstoff-Atomen und enthält dementsprechend nur die Δ^6 -Elongase (Grimsley *et al.*, 1981). Der pflanzenpathogene Oomycet *Phytophthora infestans* synthetisiert darüber hinaus geringe Mengen C₂₂-PUFAs (Yongmanitchai & Ward, 1989). Der marine Pilz *Thraustochytrium* sp. und die marine Dinophyceae *Crypthecodinium cohnii* produzieren hingegen abhängig von den Kulturbedingungen große Mengen C₂₂-PUFAs (Yongmanitchai & Ward, 1989; Bajpai *et al.*, 1991), so dass sie erfolgversprechende Kandidaten für die Isolierung von Komponenten sowohl der Δ^6 -Elongase als auch der Δ^5 -Elongase darstellen.

Tabelle 3.1. Organismen, aus denen die Isolierung von Komponenten der PUFA-Elongasen erfolgen sollte, mit dem jeweiligen Anteil von C₂₀- und C₂₂-PUFAs (in mol%) an den Gesamtfettsäuren. Außerdem ist der Umfang ihrer EST-Datenbanken als Anzahl nicht-identischer cDNA-Klone angegeben.

Organismus	C ₂₀ -PUFAs	C ₂₂ -PUFAs	EST-Klone
<i>Physcomitrella patens</i>	25 %	-	~20000
<i>Phytophthora infestans</i>	12 %	8 %	~2200
<i>Thraustochytrium</i> sp.	5 %	57 %	~1700
<i>Crypthecodinium cohnii</i>	-	30 %	~2900

3.1 Identifizierung cDNA-Klonen, die für putative Fettsäure-Elongationsenzyme kodieren

Zur Identifizierung von Genen, die für PUFA-Elongasen kodieren, standen mir EST-Datenbanken der BASF Plant Science GmbH (Ludwigshafen) zur Verfügung. Die Erstellung der hierfür notwendigen

cDNA-Banken erfolgte mit dem λ -ZAP II-System (Stratagene, Amsterdam). In Tabelle 3.1 sind ebenfalls die Anzahl der cDNA-Klone aufgeführt, die die EST-Datenbanken der verschiedenen Organismen umfassen. Die Größe der Datenbanken wurde bereits jeweils um die Anzahl identischer EST-Sequenzen korrigiert, so dass die Anzahl der Klone der Zahl der *uni*-Gene entspricht.

Die Identifizierung putativer Elongase-Klone erfolgte durch Sequenzvergleiche mit Genen, die in Pflanzen und Hefen in die Elongation gesättigter und/oder einfach ungesättigter Fettsäure involviert sind. Im speziellen waren dies die Gene der pflanzlichen β -Ketoacyl-CoA-Synthasen aus *Simmondsia chinensis* (*KCS*, Accession-Nummer: AAC49186) und *Arabidopsis thaliana* (*FAE1*; Accession-Nummer: AAA70154) als Vertreter der *KCS*-Gruppe sowie die Gene *ELO1*, *ELO2* und *ELO3* aus *Saccharomyces cerevisiae* (Accession-Nummern: NP_012339, NP_009963 und NP_013476) repräsentativ für die *ELO*-Gruppe. Die Suche wurde mit Hilfe des BLAST-Algorithmus durchgeführt (*basic local alignment search tool*; Altschul *et al.*, 1990). Hierfür wurden Proteinsequenzen der identifizierten β -Ketoacyl-CoA-Synthasen und Elo-Proteine mit den EST-Klonen verglichen, deren Nucleotidsequenzen zuvor in alle 6 Leserahmen übersetzt worden waren (tBLASTn). In der Tabelle 3.2 sind die so identifizierten EST-Klone aufgelistet. Zudem ist neben der jeweilige Länge der Klone und ihrer jeweilige Zugehörigkeit zur Kcs- bzw. Elo-Proteinfamilie angegeben, ob es sich um Volllänge-Klone handelte. Darüber hinaus standen mir je eine Sequenz aus *P. patens* und *Ceratodon purpureus* (ebenfalls ein C₂₀-PUFA-produzierendes Moos) mit Sequenzähnlichkeiten zu den pflanzlichen β -Ketoacyl-CoA-Synthasen zur Verfügung. Diese wurden von Dr. Thomas Girke über PCR mit Hilfe degenerierter Primer aus cDNAs beider Moosarten amplifiziert. Die Isolierung der jeweiligen cDNA-Klone (pp*KCS1* und cp*KCS1*) erfolgte anschließend durch der BASF Plant Science GmbH.

Tabelle 3.2. EST- sowie PCR-Klone, die aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten zu den pflanzlichen *KCS*-Genen oder zu den *ELO*-Genen aus *S. cerevisiae* als putative Elongasen identifiziert wurden.

Organismus	cDNA-Klon	Herkunft	Länge	Volllänge	Ähnlichkeit zu
<i>P. patens</i>	pp <i>PSE1</i>	EST	1192 bp	ja	<i>ELO</i>
	pp <i>KCS1</i>	PCR	2143 bp	ja	<i>KCS</i>
	pp <i>KCS2</i>	EST	1791 bp	nein	<i>KCS</i>
<i>C. purpureus</i>	cp <i>KCS1</i>	PCR	1972 bp	nein	<i>KCS</i>
<i>P. infestans</i>	pi <i>PSE1</i>	EST	276 bp	nein	<i>ELO</i>
<i>T. sp.</i>	ts <i>POE1</i>	EST	688 bp	nein	<i>ELO</i>
	ts093	EST	952 bp	ja	<i>ELO</i>
<i>C. cohnii</i>	cc041	EST	698 bp	nein	<i>ELO</i>

Die cDNA-Klone *piPSE1* aus *P. infestans*, *tsPOE* aus *Thraustochytrium* sp. sowie *cc041* aus *C. cohnii* beinhalten sehr kurze DNA-Fragmente. Ein Vergleich ihrer Proteinsequenzen mit denen von Elo1p, Elo2p und Elo3p zeigte eindeutig, dass diese Fragmente nicht für vollständige Proteine kodieren (Daten nicht gezeigt). Dagegen entspricht die Länge des von Klon *ts093* kodierten Proteins mit 282 Aminosäuren ungefähr der Länge der Elo-Proteine aus der Hefe. Allerdings kann auch für diesen Klon nicht mit absoluter Sicherheit davon ausgegangen werden, dass er vollständig ist, da vor dem putativen Startcodon kein Stopcodon ausgemacht werden konnte. Gleiches gilt für die *KCS*-ähnlichen Klone aus *P. patens* sowie *C. purpureus*, bei denen dem putativen Translationsinitiationscodon kein Stopcodon vorangeht.

In den folgenden Kapiteln werden zunächst die cDNA-Klone mit Sequenzähnlichkeit zu den pflanzlichen *KCS*-Genen behandelt. Nach einer kurzen Beschreibung ihrer Sequenzen wird auf die Versuche zu ihrer funktionalen Identifizierung eingegangen, die jedoch keine eindeutigen Hinweise auf ihre Funktion ergaben. Danach wird detaillierter auf die Isolierung und Charakterisierung der *ELO*-ähnlichen cDNA-Klone eingegangen, von denen zwei Klone als Komponenten der Δ^6 -Elongase identifiziert wurden. Abschließend werden die Unterschiede von *Kcs*- und *Elo*-Proteinen eingehender untersucht und mögliche Gründe für die anscheinend konvergente Entwicklung im ersten Schritt der Fettsäure-Elongation vorgeschlagen.

3.2 *KCS*-ähnliche Klone

3.2.1 Sequenzanalyse der *KCS*-ähnlichen cDNA-Klone

Aus den beiden Moosen *P. patens* und *C. purpureus* konnten insgesamt 3 cDNA-Klone mit Sequenzähnlichkeiten zu pflanzlichen β -Ketoacyl-CoA-Synthasen isoliert werden (siehe Tabelle 3.2). Die Nucleotidsequenzen sowie die abgeleiteten Aminosäuresequenzen dieser Klone sind jeweils im Anhang 2 dargestellt. Hier soll lediglich eine kurze Beschreibung der Aminosäuresequenzen erfolgen.

In der Tabelle 3.3 sind einige Merkmale der drei cDNA-Klone aufgelistet. Das Insert des cDNA-Klons *ppKCS1* hat eine Länge von 2143 bp und enthält einen offenen Leserahmen von 1560 bp, welcher für ein Polypeptid von 519 Aminosäuren (aa) mit einer molekularen Masse von 58,6 kDa kodiert. Obwohl stromaufwärts des offenen Leserahmens kein Stopcodon nachgewiesen werden konnte, handelt es sich hierbei vermutlich um einen Volllängeklon, da die Länge des Polypeptids ungefähr der Länge anderer β -Ketoacyl-CoA-Synthasen entspricht (siehe Abbildung 3.1). Die Inserts der beiden anderen Klone *ppKCS2* und *cpKCS1* haben jeweils eine Länge von 1791 bp und 1972 bp. Die jeweils längsten offenen Leserahmen sind in diesen Klonen mit je 1251 bp (kodieren für 416 aa-Polypeptide mit molekularen Massen von je 46,8 kDa) wesentlich kürzer als der offene Leserahmen von *ppKCS1*. In keinem der beiden Klone konnte ein Stop-Codon vor dem ersten Startcodon des offenen Leserahmens

nachgewiesen werden. In *ppKCS2* konnte zudem 95 Nukleotide stromaufwärts von diesem Startcodon ein zusätzliches ATG-Triplett in einem anderen Leserahmen detektiert werden. Im Insert von *cpKCS1* befinden sich sogar 5 zusätzliche ATG-Codons 79, 164, 176, 197 und 290 bp vor dem Startcodon. Diese Triplets würden die Translationseffizienz beginnend vom Startcodon des offenen Leserahmens der transkribierten mRNAs erheblich senken. Zusätzlich weist die abgeleitete Proteinsequenz vor dem Startcodon signifikante Sequenzähnlichkeiten zu anderen β -Ketoacyl-CoA-Synthasen auf (siehe Abbildung 3.1), so dass es sich bei *ppKCS2* und *cpKCS1* mit großer Wahrscheinlichkeit um N-terminal unvollständige Klone handelt.

Tabelle 3.3. Eigenschaften der 3 cDNA-Klone mit Sequenzähnlichkeiten zu den pflanzlichen β -Ketoacyl-CoA-Synthasen.

Klon	Länge (ohne polyA)	ATG...Stop	orf	Polypeptid	Masse	Volllänge
<i>ppKCS1</i>	2143 bp	248...1807	1560 bp	519 aa	58,6 kDa	ja
<i>ppKCS2</i>	1791 bp	121...1371	1251 bp	416 aa	46,8 kDa	nein
<i>cpKCS1</i>	1972 bp	299...1549	1251 bp	416 aa	46,8 kDa	nein

Abbildung 3.1 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen der drei cDNA-Klone mit denen anderer identifizierter pflanzlicher β -Ketoacyl-CoA-Synthasen. Da die beiden Klone *ppKCS2* und *cpKCS1* nicht für vollständige Proteine kodieren, wurden in das Alignment die Aminosäuresequenzen vor dem Startcodon des offenen Leserahmens mit einbezogen. Die vorhandenen Startmethionine der in den beiden Klonen detektierten offenen Leserahmen sind in dem Alignment durch einen kleinen Pfeil gekennzeichnet. Alle Proteine dieser Enzymfamilie weisen eine große Ähnlichkeit zueinander auf. Dies drückt sich vor allem durch zahlreiche konservierte Bereiche aus, die sich über die gesamte Aminosäuresequenz erstrecken. Lediglich im N-terminalen Bereich sind die Sequenzen weniger konserviert. Die errechneten Ähnlichkeits- und Identitätswerte der in das Alignment einbezogenen Aminosäuresequenzen sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. Die Identitätswerte der Polypeptide liegen über die Gesamtlänge bei 45 – 85 %, die Ähnlichkeitswerte bei 63 – 92 %. *ppKcs1* hat die größte Ähnlichkeit zu *atCut1* aus *A. thaliana*, einer β -Ketoacyl-CoA-Synthase, die für die Elongation sehr langkettiger gesättigter Fettsäuren ($\geq C_{24}$) verantwortlich ist, welche nach weiteren Modifikationen für die Synthese der cuticularen Wachse verwendet werden (Millar *et al.*, 1999). *ppKcs2* und *cpKcs2* haben die größte Ähnlichkeit jeweils zueinander. Darüber hinaus weisen sie die größte Verwandtschaft zu einer β -Ketoacyl-CoA-Synthase aus *Z. mays* auf, die dort in der Wurzel vermutlich an der Elongation von gesättigten langkettigen Fettsäuren (C_{16} und C_{18}) beteiligt ist (Schreiber *et al.*, 2000).

```

atCut1 : MDGAGESRLGGDGGGDSGVGVQIRQTRMLPDLFQSVNLKYVKLGYH---YLISNLLTICLFPIAVVISVE
ppKcs1 : --MAPSPIQEAPTREAERVSVHVSRRRLPDLFQSVNLKYVKLGYH---YLITHLLTILFIPILLAILLE
ldFae1 : -----MSETKPEKPLIATVKN-----TLPLDLKLSINLKHVKLGYH---YLITHGMYLCLPPIALVIFAQ
scKcs1 : ---MKAKTITNPEIQVSTMTMTTATLPNFKSSINLHHVKLGYH---YLISNALFIVFIPIGLASAH
zmKcs1 : -----METSAPPNAPAPPAQH-----GGCRDFQQSVRLKYVKLGYH---YLISHGMYLLSPIMALVAVQ
ppKcs2 : -----LQVE
cpKcs1 : -----SGDGRSGSGSGPAVQIRVRQRLPDLFQSVNLKYVKLGYH---YVVSHALFIFVLPILLAVAVE
atKcs1 : ---MDRERLTAEMAFRDSSSAVIRRRRLPDLTSLVKLYVKLGLHNSCNVTILFELIILPIITGTVLVQ
atFae1 : -----MTSVN---VKLLYR---YVLTNFFNLCLFPITAFLAGK
bnFae1 : -----MTSVN---VKLLYH---YVITNLFNLCLFPITAFIVAGK
lfKcs1 : -----MTSLN---IKLLYH---YILTNLNLFNLCLFPITAFIVAGK

```



```

atCut1 : ASQNPDDIKQLWI--HLCYNLVSIIICSAILVFGTLVYVMTRPRPVYLVDSCYLEPDPHLAPYARFME
ppKcs1 : AGRMGPEDLWQLWE--NLQFNLSVVIACSAALLVFVGTVMFMSRPRPIFLVDFACYLDEKLVSVPLFME
ldFae1 : ISTLSLKDFNDLWE--QLQFNLSVVSSTLLVSLILLYFMTRPREVYLMDFACYKDETRKSTREHFEMK
scKcs1 : LSSFSAHDLSLDFD--LRRNLLPVVCSFLVLLATLHFLTRPRNVYLVDFACYKHPNLTISHEMFMD
zmKcs1 : LSTVSPHDIADLWE--QLRFNLLSVVACSTLLVFLSTVYFLTRPRPVYLDFACYKESERKCTRETFMH
ppKcs2 : FGRIGRDDILQLWD--HLCYNLVSVIACSGALVFVATLYFMSRPRPVYLVDSCYLEPDERKVTMTQTFIQ
cpKcs1 : FGRIGRDDIVQLWT--HLCYNLVSVIACSGALVFVATLYFMSRPRPVYLVDFACYKPEERKVTMTQTFIQ
atKcs1 : LTGLTFDFTFSELWSNQAVQLDTATRLTCLVFLSFVLTLTYVANRSKPVYLVDSCYLEPDERKISVDSFLT
atFae1 : ASRLTINDLHN-FLS-YLQHNLTITVTLFAFTVFGVLVYIVTRENPVYLVDYSCYLEPPPHLKVS SVSKVMD
bnFae1 : AYRLTIDDIHHLIYS-YLQHNLTITAPLFAFTVFGSVLYIATRKPVYLVVEYSCYLEPPTHCRSSISKVMD
lfKcs1 : ASHLTKSDLLM-FLS-HLQDNLTITVIVLFTFTIFCLVLYIVTKPKIYLVVDYSCYLEPDPHLKVSISVMD

```

```

atCut1 : HSRLTGDFDDSD-----ALBFQKILERSGLGEDTYVPEAMHYVPERISMAAAREEAEQVMFGALD
ppKcs1 : RTRLAGGFDEK-----SMEFQKILERSGLGAKTYLPAAMHSLPECPMSKAAAREEAEQVMFGCLD
ldFae1 : CGESLGSFTED-----NIDFQKILERSGLGDATYIPEATGTIPAHPSMKAAREEAEQVMFGAID
scKcs1 : RTSRAGSFSKE-----NIEFQKILERSGLGEMRETYVPKSVTKVPEPSIAAAREEAEQVMYGAID
zmKcs1 : CSKLTGSFTDE-----NLEFQKILERSGLGEDTYLPPAVLRVPPNCPMDEARKEARAVMFGAID
ppKcs2 : RSIEAGKFDEK-----SLEFQKILERSGLGQETYLPRAVVSAPNCPMKEARLEAEQVMFGALD
cpKcs1 : KSLEAGKFDEK-----SMEFQKILERSGLGHETYLPRAVVSSPPNCPMKEARLEAEQVMFGALD
atKcs1 : MTEENGSTFDD-----TVQFQQRISNRAGLGDETYLPRGITSTPEKLNMSERAREEAEQVMFGALD
atFae1 : IFYQIRKADTSSRNACDDPSSLDLFRKIQERSGLGDETYSPGELIHVPERKTFAAAREETEKVIIIGALE
bnFae1 : IFYQVRKADPS-RNGTCDSSWDLFRKIQERSGLGDETHGPEGLLQVPERKTFAAAREETEKVIIIGALE
lfKcs1 : IFYELRKVDPL-CEVGCDDSS-LBFMRKVLERSGLGDETYVPLGLHQVPEQKTFAAIKDETEQVIKGALE

```

*

```

atCut1 : NLFANTNVKPKDIGILVNCNLSFNPTPSLSAMIVNHYKLRGNIRSYNLGGMGCSAGVIAIDLAKDMLLVH
ppKcs1 : ELFEKTKIKPKDIGVLVNCNLSFNPTPSLSAMIVNHYKMRGNIRTY-LGGMGCSAGVIAIDLARDMLQVH
ldFae1 : QLLEKTKVNPCKDIGILVNCNLSFPTPSLSAMIVNHYKLRGNIRSYNLGGMGCSAGLISVDLAKRLLETN
scKcs1 : EVLEKTVGPKQDIGILVNCNLSFNPTPSLSAMIVNHYKLRGNIRSYNLGGMGCSAGLISIDLAKDLLQVY
zmKcs1 : QLLEKTVGPKDIGVLVNCNLSFNPTPSLSAMIVNHYKLRGNIRSYNLGGMGCSAGLISIDLAKDLLQVH
ppKcs2 : ELFEKTVGPKDIGVLVNCNLSFNPTPSLSAMIVNHYKMRGNIRSYNLGGMGCSAGVIAIDLAKDLLQVH
cpKcs1 : ELFEKTVGPKDIGVLVNCNLSFNPTPSLSAMIVNHYKMRGNIRSYNLGGMGCSAGVIAIDLAKDLLQVH
atKcs1 : SLFEKTVGPKPAEVLIVNCNLSFNPTPSLSAMIVNHYKMRGNIRSYNLGGMGCSAGLISIDLANNLLKAN
atFae1 : NLFENTKVNPREIGILVNCNLSFNPTPSLSAMVNTFKLRNIRSYNLGGMGCSAGVIAIDLAKDLLVH
bnFae1 : NLFKNTNVNPKDIGILVNCNLSFNPTPSLSAMVNTFKLRNIRSYNLGGMGCSAGVIAIDLAKDLLVH
lfKcs1 : NLFENTKVNPREIGILVNCNLSFNPTPSLSAMVNTFKLRNIRSYNLGGMGCSAGVIAIDLAKDLLVH

```

```

atCut1 : RNTYAVVSTENITQNTYFGNKKSMILPNCFLRVGGSAVLLSNKSRDKRRSKYRLVHVVRTHRGADDKAF
ppKcs1 : GNTYAVVSTENITQNTYFGNRRSMLIPNCFLRVGGAAILLNKRDRGSRKSKYQLVHVVRTHRGADDKCY
ldFae1 : PNTYALVSTENITLNTYMGNDRSKIVSNCLFRMGGAIVLLSNKTSDDKRRSKYQLVTVRTHRGADDNCOY
scKcs1 : RNTYVLVSTENITLNTYMGNDRSMLITNCLFRMGGAAILSNRWRDRRRSKYQLVTVRTHRGADDKSY
zmKcs1 : PNSYALVSMENITLNTYFGNRRSMLIVSNCLFRMGGAAILSNRRSDRRRSKYELVHTVTRTHRGANDKCF
ppKcs2 : GGSYAVVSMENITLNTYFGNDRSKIVSNCLFRMGGAAILSNKRSEERRAKYELVHTVTRTHRGADKCF
cpKcs1 : GGSYAVVSMENITLNTYFGNDRSKIVSNCLFRMGGAAILSNKRSEERRAKYELVHTVTRTHRGADKCF
atKcs1 : PNSYAVVSTENITLNTYFGNDRSMLLNCNCLFRMGGAAILSNRRQDRKRSKYSLNVVVRTHRGSDDKNY
atFae1 : KNTYALVSTENITQNTYAGNRRSMVSNCLFRVGGAAILLNKRSGDRRRSKYKLVHTVTRTHRGADDKSF
bnFae1 : KNTYALVSTENITYNTYAGNRRSMVSNCLFRVGGAAILLNKRSGDRRRSKYKLVHTVTRTHRGADDKSF
lfKcs1 : KNTYALVSTENITITAYAGNRRSMVSNCLFRIGGAAILSNKRPRDKRRSKYKLVHTVTRTHRGADDMSY

```

```

atCut1 : RCVYQEQDDTCTRTGVSLSKDLMAIAGETLKTNITTLGPLVLPLSEQLLFMTLVVKKLFNGK-VKPYIPD
ppKcs1 : NCVYQEQDEQCNMGVSLSKDLMAIAGETLKANITTLGPLVLPLSEQLLFSTLVARKVFNMK-VKPYIPD
ldFae1 : GCIFQEEEDSNCKTIGVSLSKNLMAVAGDALKTNITTLGPLVLPLMSEQLLFATLVARKVFKKK-IKPYIPD
scKcs1 : RCVLQOEDENNKVGVALSKDLMAVAGEALKANITTLGPLVLPLMSEQLLFATLVARKVFKMTNVKPYIPD
zmKcs1 : GCVTQEEDEICKTIGVSLSKDLMAVAGDALKTNITTLGPLVLPLSEQLLFMGTLLAKKVLKMK-IKPYIPD
ppKcs2 : RCVFQEEEDSECTMGVSLSRELMDVAGDALKANITTLGPLVLPLSEQLLFATLVARKVFLNMK-VKPYIPD
cpKcs1 : RCVFQEEEDENCTMGVSLSRELMDVAGDALKANITTLGPLVLPLSEQLLFATLVARKVFLNMK-VKPYIPD
atKcs1 : NCVYQKEDERCTTIGVSLARELMSVAGDALKTNITTLGPMVLPLSEQLMFLLSLVKRKMFKLK-VKPYIPD
atFae1 : RCVQOEDDESCKTIGVCLSKDITNVAGTTLTKNIATLGPLILPLSEKFLFFATFVAKLLKDKIKHYYPD
bnFae1 : RCVQOEGDDENCKTIGVSLSKDITDVAGRTVKNIATLGPLILPLSEKLLFFVTFMGKKLFDKIKHYYPD
lfKcs1 : RCVQOEEDEMCKVGVRLSKDITTVAGTAVKKNISTLGPLILPLSEKLLYVVSFIKKLLKEIKNYYPD

atCut1 : FKLAFEHFHCIHAGGRAVIDELEKNLQLSPVHVEASRMTLHFRFGNTSSSSIWYELAYTEAKGRMRGRNRVW
ppKcs1 : FKLAFDHFCIHAGGRAVIDELEKNLQLTPGHCEPSRMTLHFRFGNTSSSSIWYELAYTEAKGRMRGRNRVW
ldFae1 : FKLAFDHFCIHAGGRAVIDELEKNLQLSSWHLEPSRMTLYRFGNTSSSSIWYELAYTEAKGRIRKGRVW
scKcs1 : FKLAAKHFCIHAGGKAVLDELETNLELTPWHLEPSRMTLYRFGNTSSSSIWYELAYTEAKGRIRKGRVW
zmKcs1 : FKLAFEHFHCIHAGGRAVIDELEKNLELTDWHMEPSRMTLYRFGNTSSSSIWYELAYTEAKGRIRKGRVW
ppKcs2 : FKLAFDHFCIHAGGRAVIDELEKNLSLSQWHMEPSRMTLYRFGNTSSSSIWYELAYTEAKGRVRRGDKVW
cpKcs1 : FKLAFDHFCIHAGGRAVIDEMEKNLQLSEWHMEPSRMTLYRFGNTSSSSIWYELAYTEAKGRVRRGDKVW
atKcs1 : FKLAFEHFHCIHAGGRAVIDEVQKNLGLDKWHMEPSRMTLHFRFGNTSSSSIWYEMAYTEAKGRVKAQDRVW
atFae1 : FKLAVDHFCIHAGGRAVIDELEKNLGLSPIDVEASRSTLHFRFGNTSSSSIWYELAYTEAKGRMKGNKAW
bnFae1 : FKLAI DHFCIHAGGRAVIDVLEKNLALAPIDVEASRSTLHFRFGNTSSSSIWYELAYTEAKGRMKGNKAW
lfKcs1 : LKLAINHFHCIHAGGRGVLVLEKNLRLSPIDVEASRSTLHFRFGNTSSSSIWYELAYTEAKGRMKGNKAW

atCut1 : QIAFGSGFKCNSAIWEALRHVKPSNNS--PWEDCIDKVPVTLSTY-----
ppKcs1 : QIAFGSGFKCNSAVWQALENIKPSSEK--PWAHCIDEMPQHVDIQQVS-----
ldFae1 : QIGFGSGFKCNSAVWALKSVDPKKEK-NEWMDEIHQEPVAVV-----
scKcs1 : MIGFGSGFKCNSVWVRALESVNPAREK-NEWMDEIENEPVHVPKIAPAS-----
zmKcs1 : QIAFGSGFKCNSAVWKALETVNPAKEK-SPWMDEIDNEPVDVPKISKVGA-----
ppKcs2 : QIAFGSGFKCNSAVWRALETVKPSQYS--PWRDCIDKLPVEVPTYANIS-----
cpKcs1 : QIAFGSGFKCNSAVWRALETVKPPKYS--PWSDCIDKLPVEVPTYANIS-----
atKcs1 : QIAFGSGFKCNSAVWKALETVSTEEMTGNWAGSIDQVPVKVQV-----
atFae1 : QIAFGSGFKCNSAVWVALENVVKASANS--PWOHCIDRVPVKIDSLSKSKTHVQNGRS
bnFae1 : QIAFGSGFKCNSAVWVALENVVKASTNS--PWEHCIDRVPVKIDSLSGKSETRVQNGRS
lfKcs1 : QIAFGSGFKCNSAVWVALENVVKASANS--PWEHCIDRVPVP-----DTCVENGKS

```

Abbildung 3.1. Aminosäure-Sequenz-Alignment von ppKcs1, ppKcs2 und cpKcs1 mit ausgewählten und identifizierten pflanzlichen β -Ketoacyl-CoA-Synthasen. Das Alignment wurde mit dem Programm Clustal errechnet. Die jeweils ersten Methionine der unvollständigen Proteine ppKcs2 und cpKcs1 sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das für die katalytische Aktivität essentielle konservierte Cystein ist durch einen Stern markiert. Die in das Alignment einbezogenen Sequenzen stammen aus folgenden Organismen: atCut1 aus *A. thaliana* (Millar *et al.*, 1999), ldFae1 aus *Limnanthes douglasii* (Cahoon *et al.*, 2000), scKcs1 aus *Simmondsia chinensis* (Lassner *et al.*, 1996), zmKcs1 aus *Zea mays* (Schreiber *et al.*, 2000), atKcs1 aus *A. thaliana* (Todd *et al.*, 1999), atFae1 aus *A. thaliana* (James *et al.*, 1995), bnFae1 aus *B. napus* (Han *et al.*, 2001) und lfKcs aus *Lesquerella fendleri* (Chowrira *et al.*, 2001).

Darüber hinaus haben die Proteine der KCS-Familie begrenzte Ähnlichkeiten zu anderen Enzymen, die ebenfalls Kondensationsreaktionen katalysieren (Daten nicht gezeigt). Zum einen sind dies Chalcon-Synthasen, die die sukzessive Kondensation von C2-Einheiten aus Malonyl-CoA mit Cumaroyl-CoA katalysieren und so an der Biosynthese pflanzlicher phenolischer Verbindungen beteiligt sind

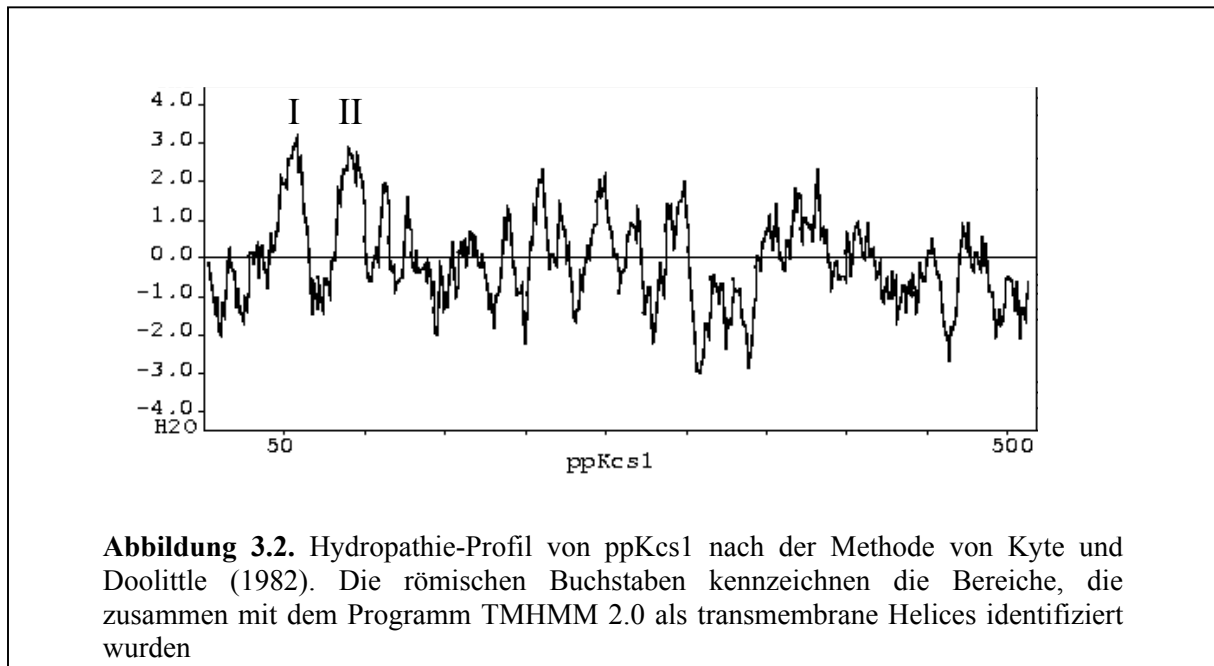
(Schröder & Schröder, 1990). Zum anderen sind die Kcs-Proteine den KasIII-Enzymen begrenzt ähnlich, welche bei der pflanzlichen und bakteriellen Fettsäure-Biosynthese die initiiierende Kondensation von Acetyl-CoA und Malonyl-ACP katalysieren (Jaworski *et al.*, 1989). Allen diesen Kondensationsenzymen ist ein konserviertes Cystein gemeinsam, welches in dem Sequenzvergleich der Kcs-Proteine in Abbildung 3.1 durch ein Sternchen gekennzeichnet ist. Für KasIII aus *Cuphea wrightii* konnte gezeigt werden, dass dieses Cystein essentiell für die katalytische Aktivität ist und in die Bindung des Acetyl-Restes an das katalytische Zentrum des Enzyms involviert ist (Abbadi *et al.*, 2000). Auch für die β -Ketoacyl-CoA-Synthase (atFae1) aus *A. thaliana* konnte durch gerichtete Mutagenese demonstriert werden, dass das Cystein essentiell für deren katalytische Aktivität ist (Ghanevati & Jaworski, 2001). Ob dieses Cystein ebenfalls an der Bindung des langkettigen Acyl-Restes beteiligt ist, ist jedoch unklar. Auf die Bedeutung dieses konservierten Cysteins und den katalytischen Mechanismus der kondensierenden Enzyme wird in einem späteren Kapitel detaillierter eingegangen.

Tabelle 3.4. Identitätswerte der cDNA-Klone ppKCS1, ppKCS2 und cpKCS1 mit pflanzlichen β -Ketoacyl-CoA-Synthasen. Die Spalten enthalten Identitäts- und Ähnlichkeitswerte in Prozent, die bei einem Aminosäure-Sequenzvergleich mit dem Programm Clustal ermittelt wurden. Die höchsten Ähnlichkeitswerte der drei cDNA-Klone zu Kcs-Proteinen sind grau hervorgehoben. Die Herkunft der Sequenzen ist in der Legende von Abbildung 3.1 aufgeführt.

	ppKcs2	cpKcs1	atCut1	ldFae1	scKcs1	zmKcs1	atKcs1	atFae1	bnFae1	lfKcs1
ppKcs1	63/76	70/83	71/82	60/76	61/77	63/77	57/75	53/67	53/66	50/66
ppKcs2		84/87	60/71	59/73	57/72	64/77	56/70	53/67	52/68	51/66
cpKcs1			65/78	63/78	61/78	68/82	61/77	52/67	52/68	49/67
atCut1				60/76	58/75	62/75	56/74	57/72	58/72	54/71
ldFae1					65/80	70/83	57/74	50/66	50/65	49/67
scKcs1						67/81	54/74	49/66	48/66	48/66
zmKcs1							58/76	52/65	52/66	50/65
atKcs1								46/63	46/63	45/64
atFae1									85/92	80/88
bnFae1										76/87

Übereinstimmend mit der mikrosomalen Lokalisation der Fettsäure-Elongation in Pflanzen (Agrawal *et al.*, 1984; von Wettstein-Knowles, 1993) wird mit einem Programm zur Lokalisierung von Proteinen (PSORT; Nakai & Kanehisa, 1992) für alle drei Proteine vorhergesagt, dass sie in mikrosomale Membranen integriert sind. ppKcs1p ist mit größter Wahrscheinlichkeit in der Plasmamembran oder dem Golgi-Apparat lokalisiert. Für die beiden anderen Proteine ppKcs2p (ER) und cpKcs1p (Plasmamembran) wurde ebenfalls eine mikrosomale Lokalisation vorhergesagt.

Allerdings sind letztere Vorhersagen nur unter Vorbehalt zulässig, da ihre vollständigen Sequenzen nicht bekannt sind.



Das in Abbildung 3.2 dargestellte Hydropathie-Profil (Kyte & Doolittle, 1982) von ppKcs1 zeigt, dass die Polypeptidsequenz zwei hydrophobe Bereiche im N-Terminus enthält. Ein Programm zur Vorhersage von Proteintopologien (TMHMM2.0; Krogh *et al.*, 2001) demonstriert, dass es sich um zwei transmembrane Helices handelt, mit denen das Protein in der Membran verankert ist. Diese Membrantopologie wird nicht nur für ppKcs1, sondern für fast alle Proteine der Kcs-Proteinfamilie vorhergesagt. Interessanterweise lokalisiert das Programm das essentielle Cystein des aktiven Zentrums nicht auf die cytosolische, sondern auf die luminal Seite der ER Membran, was die Frage der subzellulären Lokalisation der Fettsäure-Elongation aufwirft. Übereinstimmend mit dieser Orientierung des Proteins konnten mit dem Programm PROSITE (Hofmann *et al.*, 1999) im luminalen Teil des Proteins mehrere Asparagin-Glycosylierungs-Motive gefunden werden. Asparagin-Glycosylierungen sind charakteristische Modifizierungen zahlreicher mikrosomaler Proteine und finden nur auf der luminalen Seite des ERs statt (Lerouge *et al.*, 1998). Andere Vorhersageprogramme von Membrantopologien deuten hingegen auf eine entgegengesetzte Orientierung des Proteins hin. Immunologische Untersuchungen sind daher notwendig, um die Topologie der Kcs-Proteine und die subzelluläre Lokalisation der Fettsäure-Elongation aufzuklären. In den Proteinen ppKcs2p und cpKcs1p konnten keine transmembranen Helices nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies ist nicht verwunderlich, da es sich bei ihnen nicht um Volllängeklone handelt und die N-terminalen, Helices-ausbildenden Sequenzabschnitte fehlen. Bezieht man von dem Klon cpKCS1 die Aminosäuren stromaufwärts des Startcodons vom offenen Leserahmen mit ein, so zeigt sich, dass dieser Bereich zwei transmembrane Helices ausbildet. Folglich fehlen dem Klon vermutlich nur einige wenige

Aminosäuren, was auch durch den in Abbildung 3.1 dargestellten Sequenzvergleich deutlich wird. Für ppKCS2 trifft dies nicht zu, da die N-terminale Aminosäuresequenz vor dem Startcodon sehr kurz ist und nicht den N-terminalen Membrananker umfasst.

3.3 Versuche zur funktionalen Identifizierung der KCS-ähnlichen Klone

Die Aufklärung von Genfunktionen kann prinzipiell auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Zum einen besteht die Möglichkeit einer funktionalen Expression der Gene in heterologen Systemen (in diesem Fall *S. cerevisiae*). Über die Analyse des daraus resultierenden neuen Phänotyps in den transgenen Organismen (in diesem Fall eines veränderten Fettsäure-Profiles) können dann Rückschlüsse auf die Funktion des Gens gezogen werden. Diese Methode führte bereits zur Identifizierung der Genprodukte von *atFAEI* und *atKCSI* (Millar & Kunst, 1997; Todd *et al.*, 1999) aus *A. thaliana* sowie des Genproduktes von *bnFAEI* aus *B. napus* (Han *et al.*, 2001), die in den Pflanzen in die Elongation von gesättigten und/oder einfach ungesättigten Fettsäuren involviert sind. Ein zweiter Weg stellt die Ausschaltung des zu identifizierenden Gens in dem Organismus dar, aus welchem es isoliert wurde. Eine partielle Ausschaltung kann zum einen durch einen Antisense-Ansatz erreicht werden (Bird & Ray, 1991). Außerdem führt in einigen Fällen auch ein Überexpressionsansatz (Sense) zu einer Reduktion der Expression des Gens. Die Ursache dieses in Pflanzen als *gene silencing* bezeichneten Phänomens ist jedoch unbekannt (Depicker & Montagu, 1997). Eine dritte Möglichkeit besteht bei einigen Organismen wie dem Moos *P. patens* in der vollständigen Ausschaltung (Knockout) des Gens durch gezielte Insertion eines Selektionsmarkers durch homologe Rekombination (Schaefer & Zryd, 1997). Über diesen Weg erfolgte z. B. schon die Identifizierung der Δ^6 -Desaturase aus dem Moos *P. patens* (Girke *et al.* 1998). Da die Sense- und Antisense-Ansätze keine Effekte in dem Moos zeigten (Girke, 1998), wurde für die Identifizierung der Funktion von ppKCSI neben der heterologen Expression in Hefe die Knockout-Strategie gewählt.

3.3.1 Heterologe Expression der KCS-ähnlichen Klone in *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Identifizierung der Funktion der Proteine ppKcs1p und ppKcs2p aus *P. patens* sowie cpKcs1p aus *C. purpureus* wurden die offenen Leserahmen der jeweiligen cDNA-Klone zunächst in *S. cerevisiae* exprimiert. Nach erfolgreicher Expression der rekombinanten Proteine sollte dies entweder zur Elongation der in der Hefe vorkommenden oder exogen applizierten und durch die Hefe inkorporierten Fettsäuren führen und somit Aufschluss über die jeweilige Funktion der Proteine geben. Zu diesem Zweck wurde der Hefestamm *S. cerevisiae* INVSc1 mit den Expressionsvektoren pYES2 und pVT102U sowie den Expressionskonstrukten pY2ppKCS1, pY2ppKCS2 und pVTcpKCS1 transformiert. Die mit pYES2 und pVT102U transformierten Hefen stellen dabei die Leervektor-Kontrollen dar. Ihr Phänotyp entspricht, mit Ausnahme der komplementierten Uracil-Auxotrophie, dem des Wirtes INVSc1. Zur Klonierung des Expressionskonstruktes wurden die kodierenden

Bereiche der cDNA-Klone zunächst über PCR modifiziert. Zum einen erfolgte eine Veränderung der dem Startcodon angrenzenden 5'-untranslatierten Sequenz, die eine optimale Translationseffizienz in Hefe ermöglichen sollte (Donahue & Cigan, 1990). Zum anderen wurden dem 5'- und 3'-Ende des offenen Leserahmens jeweils eine Schnittstelle angefügt, die für die Klonierung in den Vektor pYES2 genutzt werden sollten. Nach Subklonierung in den Vektor pUC18 und Überprüfung der Sequenz des PCR-Amplifikats wurden die modifizierten offenen Leserahmen von pp*KCS1* und pp*KCS2* stromabwärts des Galactose-induzierbaren GAL1-Promotors von pYES2 kloniert. Der offene Leserahmen von cp*KCS1* wurde stromabwärts des konstitutiven ADH-Promotors von pVT102U kloniert. Restriktionsanalysen ermöglichten anschließend die Selektion der Konstrukte, in denen die offenen Leserahmen in *sense*-Orientierung mit dem Promotor vorlagen. Von dem unvollständigen Klon cp*KCS1* wurde zudem ein Konstrukt erstellt, in dem dem ersten Triplet des durchgehenden Leserasters ein ATG-Codon angefügt wurde und so der offene Leserahmen um die N-terminale Sequenz vor dem detektierten Startcodon erweitert wurde. Tabelle 3.5 fasst die Strategien zur Herstellung der jeweiligen Expressionskonstrukte zusammen. Die schematischen Vektorkarten der Expressionskonstrukte sind im Anhang dargestellt.

Tabelle 3.5. Konstrukte, die zur heterologen Expression der cDNA-Klone pp*KCS1*, pp*KCS2* und cp*KCS1* erstellt wurden. Angegeben sind die Schnittstellen, die an die offenen Leserahmen über PCR durch Primerüberhänge angefügt wurden und der Klonierung in die Hefe-Expressionsvektoren pYES2 bzw. pVT102U dienen. Darüber hinaus sind die Promotoren der Vektoren aufgeführt, unter deren Kontrolle die Expression in der Bäckerhefe erfolgte. Über Restriktionsanalyse mit verschiedenen Enzymen wurden schließlich die Konstrukte selektiert, bei denen der Promotor und der jeweilige offene Leserahmen die gleiche Orientierung aufwies.

Konstrukt	5'-Schnittstelle	3'-Schnittstelle	Primer zur Modifikation	Promotor	Restriktionsanalyse
pY2pp <i>KCS1</i>	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	KCS1-F/-R	GAL1	<i>Pvu</i> II
pY2pp <i>KCS2</i>	<i>Eco</i> RI	<i>Xho</i> I	KCS2-F/-R	GAL1	<i>Bam</i> HI
pVTcp <i>KCS1.1</i>	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	CPEX1-F1/-R	ADH	<i>Eco</i> RI
pVTcp <i>KCS1.2</i>	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	CPEX1-F2/-R	ADH	<i>Nco</i> I

Nach der Transformation wurden die transgenen Hefen in Minimalmedium ohne Uracil kultiviert und die Expression in der frühen logarithmischen Wachstumsphase durch Zugabe von Galaktose induziert (siehe Kapitel 2.19). Zum gleichen Zeitpunkt erfolgte die Applikation von 18:3^{Δ^{6,9,12}}. Diese Fettsäure stellt ein potientes Substrat der Δ⁶-Elongase dar, kann aber in der Hefe aufgrund der fehlenden Δ⁶- und Δ¹²-Desaturase nicht synthetisiert werden. Im Fall von cp*KCS1* erfolgte keine Induktion, da der offene Leserahmen unter Kontrolle des konstitutiven ADH-Promotors stand. Weder die Applikation der Fettsäure noch die Überexpression der *KCS*-Klone führten dabei zu einer Beeinträchtigung des

Wachstums der transgenen Hefen. Nach 24stündiger Induktion wurden die Hefezellen geerntet und ihre Gesamtfettsäuren wie in Kapitel 2.26.3 beschrieben derivatisiert.

Die gaschromatographische Analyse der Fettsäuremethylester ergab keinen Unterschied zwischen den Kontrollhefen, die die Leervektoren pYES2 und pVT102 enthielten, und den transgenen Hefen, die mit den Expressionskonstrukten transformiert worden waren (Daten nicht gezeigt). Die Hefen inkorporierten zwar die exogene Fettsäure 18:3^{Δ6,9,12} bis zu 60 % der Gesamtfettsäuren (siehe auch Kapitel 3.5.2), allerdings führte die Expression der *KCS*-Klone nicht zur Elongation dieser Δ^6 -PUFA. Auch konnten keine Elongationsprodukte der in den Hefen vorkommenden langkettigen Fettsäuren 16:0, 16:1^{Δ9}, 18:0 und 18:1^{Δ9} nachgewiesen werden. Expressionsexperimente in Gegenwart von 18:2^{Δ9,12}, 18:3^{Δ9,12,15}, 18:4^{Δ6,9,12,15} und 20:4^{Δ5,8,11,14} zeigten außerdem, dass die rekombinanten Kcs-Proteine nicht in die Elongation dieser Fettsäuren involviert sind (Daten nicht gezeigt).

Für die beiden Klone pp*KCS2* und cp*KCS1* ist dieses Ergebnis nicht überraschend, da sie für nicht vollständige Proteine kodieren. Daher führt ihre Expression wahrscheinlich nicht zur Ausbildung aktiver Proteine, oder die Proteine werden aufgrund fehlender Signalsequenzen und/oder transmembraner Helices nicht in die mikrosomalen Membranen integriert. Für pp*KCS1* liegt die fehlende Aktivität jedoch an anderen Faktoren, da es für ein vollständiges Protein kodiert. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, erfordert die Elongation von Fettsäuren in Pflanzen und Säugern die Aktivität von vier distinkten Enzymen: der β -Ketoacyl-CoA-Synthase, der β -Ketoacyl-CoA-Reduktase, der β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydratase sowie der *trans*- $\Delta^{2,3}$ -Enoyl-CoA-Reduktase (Fehling & Mukherjee, 1991). Daher hängt das Auftreten einer neuen Elongationsaktivität nicht allein von der Aktivität der rekombinanten Kcs-Proteine ab, sondern auch von deren Fähigkeit, mit den anderen Enzymen des Fettsäure-Elongasekomplexes aus der Hefe zu interagieren. Eine Erklärung für eine ausbleibende Elongation wäre, dass Kcs1p zu einer solchen Interaktion nicht fähig ist. Allerdings konnte in anderen Experimenten gezeigt werden, dass die Expression von *KCS*-Genen in *S. cerevisiae* zum Auftreten neuer Elongationsaktivitäten führt und somit eine Interaktion mit den Folgeenzymen möglich ist (Millar & Kunst, 1997; Todd *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2001). Die plausibelste Erklärung ist, dass dem rekombinanten ppKcs1 in der Hefe keine geeigneten Substrate zur Verfügung stehen. Wie schon aus der Betrachtung des Sequenzvergleichs hervorgeht, können pp*KCS1* und auch die beiden anderen cDNA-Klone mit hoher Wahrscheinlichkeit mit der Wachsbiosynthese in Verbindung gebracht werden. Möglicherweise ist ppKcs1 in die Elongation sehr langkettiger gesättigter Fettsäuren ($\geq C_{28}$) involviert, wohingegen *S. cerevisiae* durch eigene Elongationssysteme nur Fettsäuren mit maximal 26 C-Atomen synthetisiert (Oh *et al.*, 1997). Fütterungsexperimente mit gesättigten VLCFAs sind aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit und der geringen Inkorporation dieser Fettsäuren durch die Hefen nicht einfach realisierbar, so dass die Aufklärung der möglichen Funktion der drei Kcs-ähnlichen Proteine bisher nicht durch das Hefe-Expressionssystem erfolgen konnte.

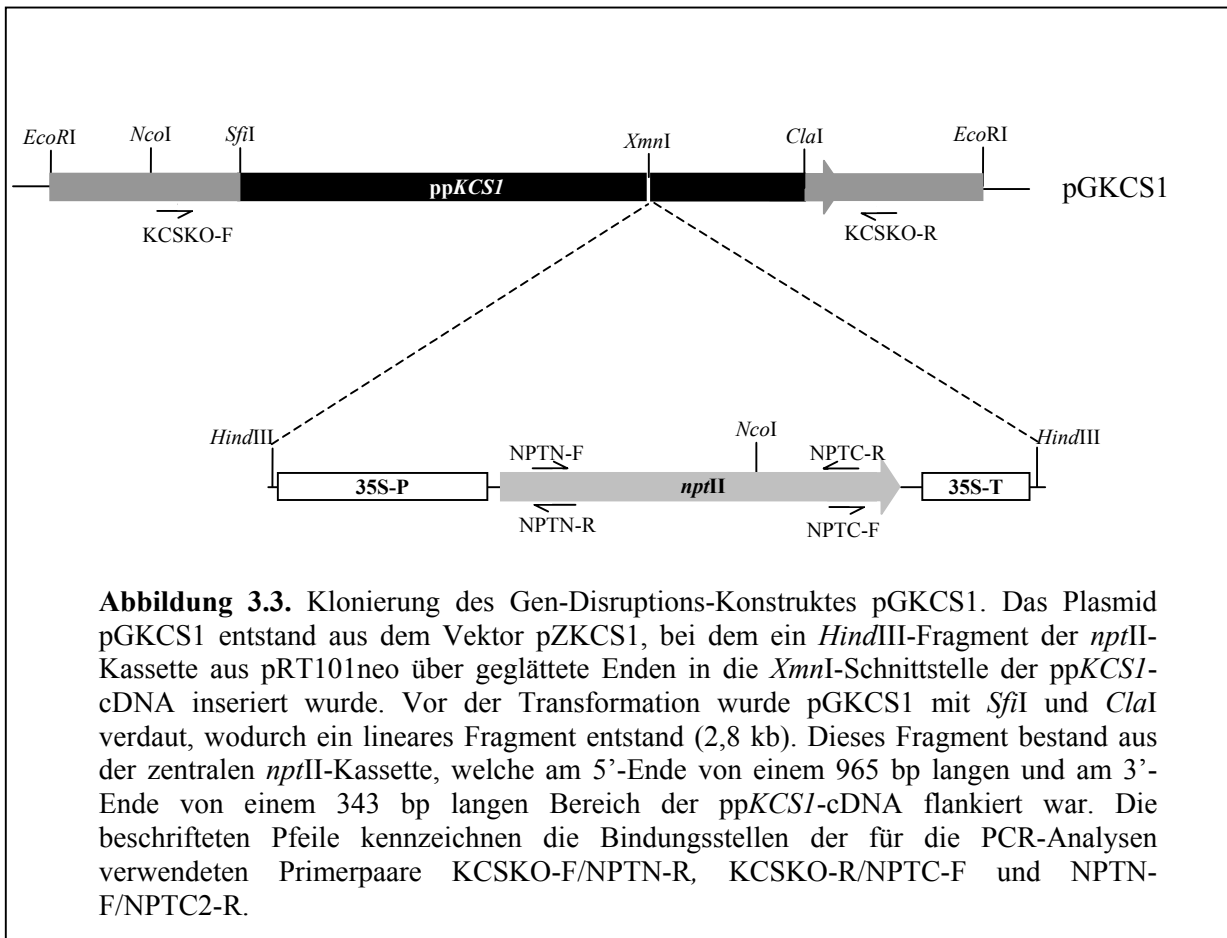
3.3.2 Zerstörung des ppKCS1-Gens in *Physcomitrella patens*

Eine alternative Methode zur funktionalen Identifikation von ppKCS1 stellt die mittlerweile für das Moos *P. patens* etablierte Gen-Zerstörung dar (Girke *et al.*, 1998; Strepp *et al.*, 1998, Schaefer, 2001). Hierbei führt die Insertion eines Selektionsmarkers in den kodierenden Bereich eines Gens über homologe Rekombination zu dessen vollständigen Funktionsausfall. Durch die Analyse des resultierenden Phänotyps (in diesem Fall eines veränderten Fettsäureprofils), lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion des ausgefallenen Gens ziehen.

3.3.2.1 Klonierung des Disruptionskonstruktes

Zur Herstellung des Gen-Disruptions-Konstruktes wurde in die *Xmn*I-Schnittstellen des offenen Leserahmens der ppKCS1-cDNA die *npt*II-Kassette inseriert. Diese diente der Selektion stabil transformierter Pflanzen und enthielt den offenen Leserahmen der Neomycin-Phosphotransferase flankiert vom CaMV 35S-Promotor und -Terminator. Im Detail wurde die ppKCS1-cDNA durch *Eco*RI-Restriktion aus dem Vektor pBluescript SK II⁺ herausgeschnitten und in die *Eco*RI-Schnittstelle des Vektors pZERO-2 ligiert (pZKCS1). Die Umklonierung war erforderlich, da pZERO-2 im Gegensatz zum pBluescript keine *Xmn*I-Schnittstelle aufweist. Anschließend wurde die *npt*II-Selektionskassette durch *Hind*III aus dem Vektor pRT101neo (Girke *et al.*, 1998) gewonnen und die Überhänge an den Enden wurden durch T4 DNA-Polymerase geglättet. Das Kassette wurde schließlich in die *Xmn*I-Schnittstelle von ppKCS1 in pZKCS1 kloniert. *Nco*I-Verdau ermöglichte schließlich die Selektion des Konstruktes pGKCS, in dem die *npt*II-Kassette die gleiche Orientierung aufwies wie der offene Leserahmen von ppKCS1. Dies war notwendig, da sonst mögliche Fusionstranskripte aus ppKCS1 und dem Antisense *npt*II-Gen mit dem *npt*II-Transkript hybridisieren und so eine Selektion verhindern könnten. Vor der Transformation wurde das Disruptionskonstrukt aus pGKCS mit *Sfi*I und *Cla*I herausgeschnitten, wodurch ein lineares Fragment (2,8 kb) entstand. Dieses Fragment enthielt die *npt*II-Selektionskassette, welche am 5'-Ende von einem 965 bp langen und am 3'-Ende von einem 343 bp langen Bereich der ppKCS1-cDNA flankiert war (siehe Abbildung 3.3).

Die Transformation von *P. patens* und die Selektion transgener Pflanzen wurden freundlicherweise von Dr. Hauke Holtorf aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Reski an der Universität Freiburg durchgeführt. Die Transformation erfolgte hierbei wie von Strepp *et al.* beschrieben mit 25 µg DNA und 3x10⁵ protoplastierten Zellen (Strepp *et al.*, 1998). Zur Selektion transgener Pflanzen enthielt das Medium nach der Transformation und Regeneration 50 µg/ml G 418.



3.3.2.2 Molekulare Analyse der transgenen Moospflanzen

Insgesamt wurden mir 10 G418-resistente Moospflanzen zur Verfügung gestellt, die jeweils zwei Selektionsrunden überlebt hatten. Um zu überprüfen, ob in diesen Pflanzen eine spezifische Integration des Gen-Disruptions-Konstruktes in das *ppKCS1*-Gen stattgefunden hatte, wurden PCR-Experimente durchgeführt (siehe Kapitel 2.9). Hierfür wurde als Template genomische DNA der zehn transgenen Moospflanzen eingesetzt (siehe Kapitel 2.21). Die Bindungsstellen der verwendeten Primer sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Primer KCSKO-F bzw. KCSKO-R wurden dabei vom 5'- bzw. 3'-Ende des offenen Leserahmens und die Primer NPTN-R/F und NPTC-R/F von dem *nptII*-Gen abgeleitet. Bei spezifischer Integration des Disruptionskonstruktes müsste durch die PCR mit dem Primerpaar KCSKO-F/NPTN-R ein Fragment von ungefähr 1,5 kb und mit dem Primerpaar KCSKO-R/NPTC-F ein Fragment von ungefähr 0,5 kb amplifiziert werden. Mit beiden Primer-Paaren konnte jedoch weder mit genomischer DNA des Wildtyps noch mit der DNA der transformierten Pflanzen ein DNA-Fragment der entsprechenden Größen amplifiziert werden, so dass vermutlich kein Rekombinationsereignis am *ppKCS1*-Gen stattgefunden hat. Anschließend wurden PCR-Experimente mit den Primern NPTN-F und NPTC-R durchgeführt, die beide vom *nptII*-Gen abgeleitet wurde. Bei Pflanzen, die mit dem Expressionskonstrukt transformiert worden waren, ist mit diesem Primer-Paar

ein DNA-Fragment mit einer Größe von 1,4 kb zu erwarten. Tatsächlich erfolgte in 4 der 10 der transformierten Pflanzen die Amplifikation eines DNA-Fragments der erwarteten Größe (Daten nicht gezeigt). Bei diesen Linien handelt es sich folglich um stabile Transformanten. Aufgrund des Fehlens eines Amplifikates mit den beiden anderen Primerpaaren kann aber eine spezifische Integration in das *ppKCS1*-Gen ausgeschlossen werden. Vermutlich handelt es sich hierbei um illegitime Rekombinationsereignisse, die zu einer unspezifischen Insertion des Expressionskonstruktes in andere Bereiche des Moos-Genoms führen (Schaefer & Zyrd, 1997, Strepp *et al.*, 1998). Das Scheitern einer spezifischen Integration mit dem Disruptionskonstrukt pGKCS1 liegt möglicherweise daran, dass für die Klonierung lediglich die Sequenz der *ppKCS1*-cDNA bekannt war und folglich keine Informationen bezüglich Vorhandensein und Lage von Introns vorhanden waren. Zwar konnte in *P. patens* bereits zuvor eine effiziente Gendisruption mit einem Konstrukt erzielt werden, das auf einem cDNA-Klon basierte (Strepp *et al.*, 1998), dennoch birgt dies das Risiko, dass die linearen Fragmente zu kurze überlappende Bereiche enthalten, um spezifisch mit dem *ppKCS1*-Gen zu rekombinieren. Auch bei Rekombinationsexperimenten mit Hefen wurde gezeigt, dass die Effizienz der homologen Rekombination wesentlich durch die Länge der homologen Bereich determiniert wird (Rothstein, 1991). In einem späteren Kapitel wird nochmals auf dieses Problem eingegangen (siehe Kapitel 3.5.11.3).

3.3.2.3 Fettsäure-Analyse der transgenen Moospflanzen

In einem parallelen Ansatz wurden von den 10 G418-resistenten Pflanzen und dem Wildtyp-Moos die Gesamtfettsäuren wie in Kapitel 2.26.3 beschrieben über GLC analysiert. In keiner der 10 *kcs*-Mutanten konnte eine signifikante Veränderung der Fettsäurezusammensetzung detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies trifft besonders auf die VLC-PUFAs zu. So ist der Anteil der C₂₀-PUFA 20:4^{Δ5,8,11,14} an den Gesamtfettsäuren mit bis zu 25 % in der transgenen Pflanzen genauso groß wie im Wildtyp (zum Fettsäureprofil von *P. patens* siehe auch Kapitel 3.5.11.4). Die Ursache hierfür liegt vermutlich darin, dass das *ppKCS1*-Gen nicht durch das Rekombinationsereignis zerstört wurde, wie es auch durch die PCR-Experimente gezeigt wurde. Daher konnte weder durch die heterologe Expression in *S. cerevisiae* noch durch die Gen-Zerstörung in *P. patens* eine Beteiligung von *ppKCS1* an der Elongation von Δ⁶-PUFAs oder anderen Fettsäuren demonstriert werden.

Wie bereits in Kapitel 3.3.1. erwähnt, lässt die hohe Sequenzähnlichkeit von *ppKcs1p* zu *atCut1p* die Vermutung zu, dass *ppKcs1p* für eine β-Ketoacyl-CoA-Synthase kodiert, die an der Elongation sehr langkettiger gesättigter Fettsäuren (≥ C₂₈) beteiligt ist. Die Analyse dieser Fettsäuren in den Moospflanzen kann jedoch nicht mit der bei der GLC verwendeten polaren Kapillarsäure erfolgen. Außerdem werden diese sehr langkettigen Fettsäuren zum Teil zu Aldehyden, Alkoholen und Alkanen reduziert, bevor sie für die Synthese der epicuticulaeren Wachse verwendet werden (Post-Beittenmiller, 1996). Diese Verbindungen werden bei der hier verwendeten GLC-Analyse nicht erfasst.

Zusammenfassend muss gefolgert werden: Weder durch Hefe-Expression noch durch Gen-Zerstörung konnten die drei cDNA-Klone funktional identifiziert werden. Die Hefe-Expressionsexperimente zeigen jedoch, dass *ppKCS1* vermutlich nicht für eine Komponente der Δ^6 -Elongase aus *P. patens* kodiert, sondern möglicherweise in die Synthese sehr langkettiger gesättigter Fettsäuren involviert ist. Wahrscheinlich trifft dies auch für die beiden anderen cDNA-Klone *ppKCS2* und *cpKCS2* zu, obwohl sich hier aufgrund ihrer Unvollständigkeit keine eindeutigen Aussagen machen lassen. Die Bestätigung dieser putativen Funktion der *KCS*-ähnlichen Klone wurde aufgrund der anderen Problemstellung dieser Doktorarbeit nicht weiter verfolgt.

3.4 *ELO*-ähnliche cDNA-Klone

Die Identifizierung weiterer putativer cDNA-Klone, die möglicherweise in die Elongation von Δ^6 -PUFAs involviert sind, basierte auf einem Sequenzvergleich mit den *ELO*-Genen aus *S. cerevisiae*. Die *ELO*-Gene kodieren für Enzyme, die in der Bäckerhefe für die Elongation von gesättigten und einfach ungesättigten, mittel- und langkettigen Fettsäuren verantwortlich sind (Toke & Martin, 1996; Oh *et al.* 1997). Insgesamt fünf EST-Klone zeigten eine begrenzte Ähnlichkeit zu den *ELO*-Genen (siehe Tabelle 3.2). Aus *P. patens* (*ppPSE1*), *P. infestans* (*piPSE1*) und *C. cohnii* (*cc041*) wurde jeweils ein Klon und aus *Thraustochytrium* sp. (*tsPOE1*, *ts093*) wurden zwei EST-Klone identifiziert. Die offenen Leserahmen der *ELO*-Gene aus Hefe haben eine Länge von 933 bp bis 1044 bp. Die Inserts der cDNA-Klone *piPSE1*, *cc041* und *tsPOE1* waren mit Längen von 276 bp, 698 bp bzw. 688 bp somit zu kurz, um für vollständige Proteine zu kodieren. Daher wurde zunächst versucht, die entsprechenden Volllängeklone aus cDNA-Banken zu isolieren. Für die Klone *ppPSE1* und *ts093*, deren Inserts mit 929 bp und 1192 bp eine ausreichende Länge hatten, um für vollständige Proteine zu kodieren, war dies nicht notwendig.

3.4.1 Isolierung von Volllänge-Klonen aus cDNA-Banken

Um cDNA-Klone zu identifizieren, die längere Inserts als *piPSE1*, *tsPOE1* und *cc041* enthalten, wurden von den Inserts über PCR Digoxigenin-markierte Sonden hergestellt, mit denen anschließend λ -ZAP[®]-cDNA-Banken von *P. infestans*, *Thraustochytrium* sp. bzw. *C. cohnii* abgesucht wurden (siehe Kapitel 2.25). Die Plaque-Hybridisierung der cDNA-Banken erfolgte dabei nach Ausplattierung von jeweils ungefähr 5×10^5 Plaques.

Mit der Sonde *piPSE1*-DIG konnten in der cDNA-Bank von *P. infestans* 10 Klone detektiert werden, von denen sich 8 als positiv erwiesen. Mit der Sonde *tsPOE1*-DIG konnten aus der Bank von *Thraustochytrium* sp. 11 Klone identifiziert werden, von denen 6 als positiv bestätigt wurden. Mit der Sonde *CC041*-DIG wurden insgesamt 40 bestätigte positive Klone von *C. cohnii* untersucht. Es wurden vereinzelte Klone ausgestochen und durch *in vivo*-Excision sowie Plasmid-DNA-Minipräparation die zugehörigen Plasmide isoliert (siehe Kapitel 2.7.1). Die partielle Sequenzanalyse

der Inserts zeigte, dass sie jeweils untereinander und mit den EST-Klonen in den Überlappungsbereichen identisch waren. Diese Übereinstimmungen deuten darauf hin, dass es sich bei den isolierten cDNA-Klonen aus den verschiedenen Organismen ausschließlich um identische Klone handelte und keine verwandten Sequenzen isoliert wurden. Eine Restriktionsanalyse ermöglichte die Identifizierung der jeweils längsten Klone, die anschließend vollständig sequenziert wurden.

3.4.2 Sequenzanalyse der *ELO*-ähnlichen cDNA-Klone

In Tabelle 3.6 sind einige Eigenschaften der isolierten cDNA-Klone mit Sequenzähnlichkeiten zu den *ELO*-Genen aufgelistet. Die vollständigen Nukleotidsequenzen der Inserts sowie ihre abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind in Anhang 2 dargestellt.

Das Insert des cDNA-Klons *ppPSE1* hat ohne die poly(A)-Sequenz eine Länge von 1192 bp. Es enthält einen offenen Leserahmen mit einer Länge von 873 bp. Hieraus lässt sich ein Polypeptid aus 290 Aminosäuren und einer berechneten Masse von 33,4 kDa ableiten. Es kann mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, dass der Klon für die vollständige Polypeptidsequenz kodiert. Erstens kann stromaufwärts vom Startcodon in keinem Leserahmen ein weiteres ATG ausgemacht werden, welches die Translationseffizienz der entstandenen mRNA vom Initiationscodon in Position 58 erheblich senken würde. Zweitens befindet sich 34 Nukleotide stromaufwärts vom ATG im gleichen Leserahmen ein Stopcodon, welches die Vollständigkeit eines offenen Leserahmens sehr wahrscheinlich macht. Die flankierende Sequenz um das Startcodon CGCAATGGGA ähnelt aber nur bedingt der für Eukaryoten beschriebenen Consensus-Sequenz. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da in Eukaryoten starke Variationen möglich sind (Cavener & Ray, 1991).

Aus der cDNA-Bank von *P. infestans* konnte ein cDNA-Klon (*piPSE1*) isoliert werden, dessen Insert eine Länge von 1008 bp hat. Der darin enthaltenen offene Leserahmen hat eine Länge von 837 bp und kodiert für ein 278 aa langes Polypeptid. Die Länge des Polypeptids macht eine Vollständigkeit wahrscheinlich, auch wenn vor dem putativen Startcodon kein Stopcodon detektiert werden konnte. Dies trifft auch für die beiden Klone aus *Thraustochytrium* zu. Mit einer Länge von 924 bp entspricht das Insert *tsPOE1* dem längsten Klon, der mit der Sonde *tsPOE1-DIG* aus der cDNA-Bank isoliert wurde. Er enthält einen offenen Leserahmen aus 816 bp und kodiert für ein Polypeptid mit 271 aa. Der offene Leserahmen des 929 bp Inserts von *ts093* hat eine Länge von 849 bp und kodiert für ein 282 aa Polypeptid. Dagegen konnte aus der cDNA-Bank von *C. cohnii* kein vollständiger Klon isoliert werden, obwohl insgesamt 40 (!) positive Klone analysiert wurden. Das Insert des längsten Klons kodiert wahrscheinlich nicht für ein komplettes Polypeptid (offener Leserahmen: 768 bp; Polypeptid: 255 aa).

Tabelle 3.6. Eigenschaften der cDNA-Klone, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu *ELO1*, *ELO2* und *ELO3* aus *S. cerevisiae* identifiziert wurden.

Klon	Länge	ATG...Stop	ORF	Polypeptid	M _R	polyA	Volllänge
ppPSE1	1192 bp	58...930	873 bp	290 aa	33,4 kDa	ja	ja
piPSE1	1008 bp	38...874	837 bp	278 aa	33,0 kDa	ja	ja?
tsPOE1	924 bp	29...844	816 bp	271 aa	31,3 kDa	ja	ja?
ts093r	929 bp	60...908	849 bp	282 aa	32,6 kDa	ja	ja?
cc041r	909 bp	79...846	768 bp	255 aa	28,9 kDa	nein	nein

Das in Abbildung 3.4 dargestellte Aminosäure-Sequenzalignement der cDNA-Klone mit Proteinen, die in die Elongation gesättigter/einfach ungesättigter Fettsäuren (scElo1, scElo2, scElo3) und PUFAs (maGlelo, cePea1, hsHelo, mmSsc2) involviert sind, zeigt, dass es sich bei dieser Proteinfamilie um eine wesentlich heterogenere Gruppe handelt als bei den pflanzlichen β -Ketoacyl-CoA-Synthasen (siehe Abbildung 3.1). Dies wird auch durch die in Tabelle 3.7 aufgelisteten Identitäts- und Ähnlichkeitswerte verdeutlicht. Die Identitätswerte zwischen den Proteinen liegen über die Gesamtlänge bei nur 12 - 54 % und die Ähnlichkeitswerte bei 24 % - 72 %. Die beiden Proteine ppPse1 und piPse1 haben jeweils die größte Ähnlichkeit zu maGlelo aus *M. alpina*, einem Protein, das mittlerweile als Komponente einer Δ^6 -Elongase identifiziert wurde. Auch die beiden Klone ts093 und cc041 zeigen die größte Ähnlichkeit zu einem Protein aus *C. elegans*, das in die Elongation von Δ^6 -PUFAs involviert ist. Andererseits weist der Klon tsPOE1 eine größere Verwandtschaft mit den Elongasen aus *S. cerevisiae* auf. Wie erwartet haben die Elo-ähnlichen Proteine keinerlei Ähnlichkeiten zu den pflanzlichen β -Ketoacyl-CoA-Synthasen (Daten nicht gezeigt). Auch ein für die katalytische Aktivität der Kcs-Proteine essentielles konserviertes Cystein kann in den Elo-ähnlichen Proteinen nicht nachgewiesen werden.

Obwohl die Sequenzen sehr unterschiedlich sind, weisen sie einige gemeinsame Merkmale auf. So können zwei sehr konservierte Sequenzmotive ausgemacht werden. Zum einen ein als Histidin-Box bezeichnetes Motiv mit der Aminosäuren-Folge HxxHH. Histidin-Boxen sind charakteristische Merkmale von Desaturasen und verwandten Enzymen. Sie kommen in diesen Enzymen in dreifacher Kopienzahl vor und sind essentiell für deren katalytische Aktivität. Die Histidin-Reste fungieren in Desaturasen wahrscheinlich als Eisenliganden im katalytischen Zentrum und sind so an der Ausbildung des Di-Eisen-Oxo-Zentrums beteiligt (Shanklin *et al.*, 1997). Ob die Histidin-Box essentiell für die Aktivität der Elongasen ist und welche Funktion sie in ihnen hat, ist unbekannt. In der Sequenz von cc041r findet man in der Box anstelle des ersten Histidins (H) ein Glutamin (Q). Diese Abweichung tritt auch in der dritten Box der sogenannten „front end“-Desaturasen auf, die in Fettsäuren Doppelbindung zwischen einer bereits existierenden Doppelbindung und dem

Carboxylende einfügen (Sayanova *et al.*, 2001). Ein weiteres konserviertes Motiv ist reich an Tyrosinen (MYxYY), eine Funktion kann dieser Box aber noch nicht zugeschrieben werden. Nur in dem Polypeptid tsPoe1 weicht die Sequenz insofern ab, dass das zweite Tyrosin (Y) durch ein Histidin (H) ersetzt ist.

```

hsHelo : -----MEHFDASLSTYFKALLGPRDTRVKGW
mmSsc2 : -----MEQLKAFDNEVNAFLDNMFGPRDSRVRGW
maGlelo : -----MESIAPFLPSKMPQDLFMDLATAIGVRAAPYVDPLEAALVAQAEKYIPTIVHHTRGFL
ppPsel : -----MEVERFYG-----ELDGKVSQGVNALLGSFGVELTDTPTTKGLPLVDSPTPIV
scElo1 : ---MVSDWKNFCLEKASRFR-----PTIDRPFFNIYLWDYFNRAVGWATAGRFQPKDFEFTVGK
scElo2 : MNSLVTQYAAPLFERYPQLHD-----YLPTLERPFFNISLWEHEDDVVTRVTNGRFPSEFQFIAGE
scElo3 : MNTTSTVIAAVADQFQSLNSSSSCFLKVHVPSIENPFG-IELWPIFSKVFEYFSG--YPAEQFEFIHNK
piPsel : -----MSTELLQSYAWANATEAKLDWVDPEGGWKVHPMADYP
cePea1 : -----MAQHPLVQRLLDVKEDTKRFVAIATHGPKNFPDAEGRK
ts093 : -----MKFDTAEVVSVM
cc041 : -----
tsPOE1 : -----MMEPLDRYRALAELAARYASSAAFKWQVTYDAKDSFV

```

```

hsHelo : LLDNYIPT-----FICSVIYLLIVWLGPYMRNK--QPFSCRGILVVYNLGLTLLSLYMFCELV
mmSsc2 : LLDSYLPT-----FILTITYLLSIWLGNYMKNR--PALSIRGILTYNLATLLSAYMLVELI
maGlelo : VAVESPLARELPLMNPFFHVLIVLAYLVTFVGMQIMKNF--ERFEVKTFSILHNFCLVISIAYMCGGIL
ppPsel : LGVSVYLT-----IVIGGLWIKARDLKPRAS--EPFLLQALVLVHNLFCFALSLYMVCVGI
scElo1 : QPLSEPRP-----VLLFIAMYYVIFGGRSLVKSC--KPLKLRFSISQVHNLMTSVSFLWLILMV
scElo2 : LPLSTLPP-----VLVAITAYYVIFGGRFLLSKS--KPKLNGFLQHNLVITSLSLTLLLLMV
scElo3 : TFLANGYH-----AVSIIIVYYIIIFGGQAILRALNASPLKFKLLFETHNLFTSISVLWLLML
piPsel : LANFSSVY-----AICVGYLLEFVIFTALMKMG-VPAIKTSPLQFVYNPIQVIACSYMCVEAA
cePea1 : FFADHFDVT-----IQASILYMVVEGTFKWFMRNR--QPFQITIPNLWNFI--AAFSIAGAVKMT
ts093 : LRTHMWVP-----FLMCFIYLVVIFGIQYYMEDR--KEFDLRKPLAASAF--AIFSIGASIRTV
cc041 : -----MVYAARRPMAQHS-HMLAVDRCAAWNLF--SVFSTWGVYHMG
tsPOE1 : GPLGIREPLG-----LLVGSVVLYL--SLAVVYALRNY--LGGLMALRSVHNLGLCLFSGAVWIYTS

```

HxxHH

```

hsHelo : TGVEGKYN-FFCQGTRTAGESD-----MKIIRVLWYYF--SKLIEFMDTFF--ILRKNNHQITVIVHVVHH
mmSsc2 : LSSWEGGYN-LQCQNLDASAGEGD-----VRVAKVLWYYF--SKLVEFMDTFF--FVLRKKNQITFIVHVVHH
maGlelo : YEAYQANYG-LFENAADHTFKG-----LPMAKMIWLFYF--SKLIMEFVDTIMVLRKKNRQISFIVHVVHH
ppPsel : YQAITWRYS-LWGNAYNPKHK-----EMAILVYLFYMSKYVEFMDTVMILKRSTQISFIVHVVHH
scElo1 : EQMLPIVYRHGLYFAVCNVESTW-----QPMETLYYLYNMTKFVEFADTVLMVLKH--RKLTFIHTYHH
scElo2 : EQLVPIIVQHGLYFAICNIGAWT-----QPLVTLYYMNIVKFIETIDTFEIVLKH--KKLTFIHTYHH
scElo3 : EQLVPMVYHNGLFWSICSKEAFA-----PKLVTLYYLYNLTKFVELIDTVELVLR--KKLTFIHTYHH
piPsel : IQAYRNGYTAAPCNAFKSDDP-----VMGNVLYLFYLSKMLDLCDTVEF--ILGKKWKQLSTIVHVVHH
cePea1 : PEFFGTIANKGIVASYCKVDFDK-----GENGYWVWLFMAKLEFELVDTEIVLVR--RPLMEIHWYHH
ts093 : PVLKMLYEKGTHHVLCGDTRNDWV--IDNPAGVWTFMAFIFSKIPELIDTEIVLVR--RKLTIHWYHH
cc041 : KGLYNMTEKRGQLQFTICGSTGELVQNLQDGPTALALCLCFFSKIPELMDTVFELILKG--KKVREIQWYHH
tsPOE1 : YLMIQDGHFRSLEAATCEPLKHP-----HFQLISLLFALS--KIWEWFDTVLIVK--NKLREIHLVHH

```

MYxYY

```

hsHelo : ASMLNIWTFVMNWVPCGHSYFGATLNSFIHVMISYYGLSSVPS-----MRPYLWKKYITQGGOLLQFVL
mmSsc2 : ASMFNIWCVLWNPICGQSFFGPTLNSFIHVMISYYGLSVFPS-----MHKYLWKKYLTQAQLVQFVL
maGlelo : SSIPTIWLVTFFVAPNGEAYFSAALNSFIHVMISYYGLSALGFKQVSFIKFIYTR-SQMTQFCMMSVQS
ppPsel : SSISLIWMAIAHAPGGEAYWSAALNSGVHVMISYYFLAACLRSSPKLKNKYLFWGRYLTQFCMFOFVL
scElo1 : GATALLCYNQLVGyta-VTWVPVTLNLAHVHVMISYYFLSASGIR-----VWWKAWVTRLOIVQFVL
scElo2 : GATALLCYTQLMGTTs-ISWVPISLNLGVHVMISYYFLAARGIR-----VWWKEWVTRFOIIOFVL
scElo3 : GATALLCYTQLIGRTS-VEWVILLNLGVHVMISYYFLSSCGIR-----VWWKQWVTRFOIIOFVL
piPsel : LTVLFVYVTFRAAQDGSYATIVLNGEVHTIMYTYFVSATRN-----IWWKKYLTRIQLIOFVT
cePea1 : ILTMIYATYSHPLTPG-FNRVGIYLNLFVHAFMISYYFLRSMKIR-----VPGFIAQAITSLQIVQFII
ts093 : VTLLFCYHAWATFAL-TGIVFAAINASVHVMISYYAFTALGYR-----PTSYAIVITLIQIMQMVV
cc041 : ATVMLFCYALATEYT-PGLWFAATNYVHVSIMYMYFFMTFKAATAK----VVKPIAPLITITQIAQMVW
tsPOE1 : ATTFWLYAIDHIFLSS--IKYGVAVNAFHTVMYAHYFRPFPGK-----LRPLITQLQIVQFIF

```

```

hsHelo  : TTIQTSCGVIV-----PCTFPLGWLYFQIGYMISLTALFTNFIYIQT
mmSsc2  : TITHTLSAVVK-----PCGFPPGCLIFQSSYMMILVILEFLNFIYIQT
maGlelo : SWDMYAMKVLG-----RPGYPFFITALLWFYMWIMLGLFYNFYRKN
ppPse1  : NIVQAYYDMKT-----NAPYPQWLKILFYIMISLLFLEFGNEFYVQK
scElo1  : DLIVVYYVLYQKIVAAYFKN-----ACTPQCEDCLGSMTAIAAGAAILTSYLLFLEFISFYIEV
scElo2  : DIGFIYFAYYQKAVHLYFP-----ILPHCGDCVGSTTATFAGCAIISYLLFLEFISFYINV
scElo3  : DLVVFYFATYTFYAHKYLDG-----ILPNKGTCTYGTQAAAAYGYLILTSYLLFLEFISFYIQS
piPse1  : MNVQGYLTYSR-----QCPGMPPKVPLMYLVYVQSLFWLFMNFYIRA
cePea1  : SCAVLAHLGYLMHFTN-----ANCDFEPSVFKLAVFMDTYLALFVNEFLQS
ts093   : GTAVTFYIGYDMAFVTPQPFRLDMKLNWDPLSKGENTEPTCKGANSSNAIFGVIMYASYLLFLECFEYFMA
cc041   : GLIVNGIATTTFFTTG-----ACQIQSVTVYSAIVMYASYFYLFLFSQLFLEA
tsPOE1  : SIGIHTAIYWHYDCEP-----LVHTHFWHEYVTPYLFVVPFLILLFLEFNFYLOQ

hsHelo  : YNKKGASRRKDHLKDHQNGSMAAVNGHTNSFSPLENNVKPRKLRKD-----
mmSsc2  : YRKK---PVKKELQEKE-----VKNGFPAHLIVANGMTDKKAQ-----
maGlelo : AKLA-----KQAKADAAEKEKARKLQ-----
ppPse1  : YIKP-----SDGKQKGAKTE-----
scElo1  : YKRGSASGKKKINKNN-----
scElo2  : YKRKGTKTSRVVVKRAHG---GVAAKVNEYVNVDLKNVPTSPSPKPKQHRRRK
scElo3  : YKKGKKTVKKESEVSG---SVASGSSTGVKTSNTKVSSRKA-----
piPse1  : YVFG-----PKKPAVEESKKKL-----
cePea1  : YVLRG-----GKDKYKAVPKKKNN-----
ts093   : YLRP-----KKSTPAAKKTN-----
cc041   : YGSAGKNKKKLAR-----ELSRKISEALLNSGDEVAKHKLK-----
tsPOE1  : YVLAP-----AKTKKA-----

```

Abbildung 3.4. Aminosäure-Sequenz-Alignment der Polypeptide ppPse1, piPse1, tsPoe1, ts093 und cc041 mit Elo-Proteinen aus Hefen, Pilzen, Tieren und Mensch. Das Alignment wurde mit dem Programm Clustal berechnet. Die beiden konservierten Boxen (HxxHH und MYxYY) sind durch Umrahmungen hervorgehoben. Die in das Alignment einbezogenen Sequenzen stammen aus folgenden Organismen: hsHelo aus *Homo sapiens* (Leonard *et al.*, 2000), mmSsc2 aus *Mus musculus* (Tvrdik *et al.*, 2000), maGlelo aus *Mortierella alpina* (Parker-Barnes *et al.*, 2000), scElo1 (Toke & Martin, 1996), scElo2 sowie scElo3 aus *S. cerevisiae* (Oh *et al.*, 1997) und cePea1 aus *C. elegans* (Beaudoin *et al.*, 2000).

Gemeinsam ist den Proteinen außerdem eine hypothetische subzelluläre Lokalisation in der Membran des Endoplasmatischen Reticulums (ER), vorhergesagt durch das Programm PSORT (Nakai & Kanehisa, 1992). Dies wird vor allem durch die Konzentration von basischen Aminosäure-Resten (Lysin und Arginin) am C-terminalen Ende der Proteine verdeutlicht, welche mit der Konsensus-Sequenz KKXX oder KXXXX als ER Retentionssignal von Typ I-Membranproteinen fungiert (Teasdale & Jackson, 1996; Andersson *et al.*, 1999). Die in Abbildung 3.5 repräsentativ für die Elo-Enzyme dargestellten Hydropathie-Profile von ppPse1 und tsPoe1 zeigen, dass es sich um sehr hydrophobe Proteine handelt. Das Programm zur Vorhersage der Membrantopologie TMHMM2.0 (Krogh *et al.*, 2001) weist den Proteinen 5-7 transmembrane Helices zu.

Tabelle 3.7. Identitätswerte der Elo-ähnlichen Klone ppPse1, piPse1, tsPoe1, ts093 und cc041 mit Proteinen, die in die Elongation von Fettsäuren involviert sind. Die Spalten enthalten Identitätswerte in Prozent, die bei einem Aminosäure-Sequenzvergleich mit dem Programm Clustal ermittelt wurden. Die jeweils größten Identitätswerte der 5 cDNA-Klone zu anderen Proteinen sind grau hervorgehoben. Die Herkunft der Proteine ist in der Legende von Abbildung 3.4 aufgeführt.

	piPse1	tsPoe1	ts093	cc041	hsHelo	mmSsc2	maGlelo	scElo1	scElo2	scElo3	cePse1
ppPse1	29/44	19/34	14/27	14/24	25/41	26/43	31/47	22/36	18/34	20/37	19/35
piPse1		16/33	17/29	14/25	23/37	24/43	22/42	16/32	16/29	18/33	17/35
tsPoe1			14/30	16/30	15/33	16/35	16/34	17/33	15/29	15/29	21/37
ts093				25/37	16/30	16/30	14/27	18/31	17/28	16/29	25/39
cc041					15/31	13/29	12/24	15/26	15/28	17/28	19/33
hsHelo						54/72	21/41	17/36	20/36	16/35	19/37
mmSsc2							24/43	19/36	19/37	18/37	19/35
maGlelo								17/31	14/29	14/31	18/31
scElo1									50/67	40/60	20/36
scElo2										46/63	18/35
scElo3											21/36

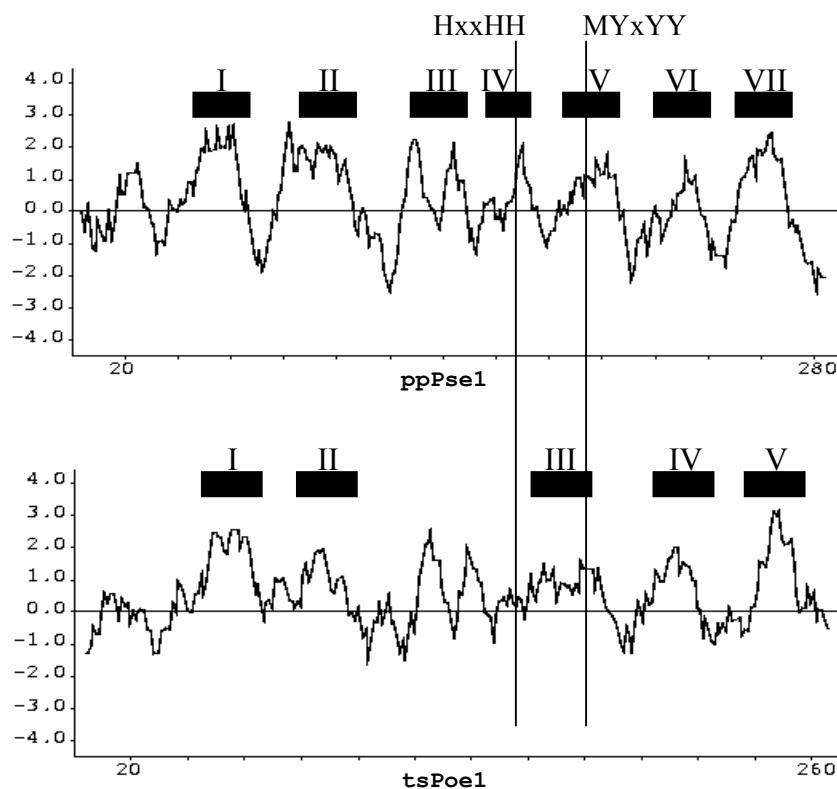


Abbildung 3.5. Hydropathie-Profil von ppPse1 und tsPoe1 nach Kyte und Doolittle (1982). Die mit den römischen Buchstaben bezeichneten schwarzen Balken kennzeichnen die Bereiche, die mit dem Programm TMHMM 2.0 als transmembrane Helices identifiziert wurden. Die Lage der konservierten Histidin- und Tyrosin-Boxen ist ebenfalls angegeben.

Das N-terminale Ende weist dabei nach diesem Programm eine cytoplasmatische Orientierung auf. Die Proteine tsPoe1 und scElo1 haben jeweils 5 transmembrane Helices, alle anderen Proteine besitzen 7 solcher Bereiche. Die Tatsache, dass ein Grossteil des Proteins innerhalb der Membran lokalisiert ist, beschränkt das katalytische Zentrum auf wenige Aminosäuren an der Membranoberfläche. Dies trifft im besonderen auf die Bindung des Malonyl-CoA zu, das aufgrund seiner Polarität nicht in die Membran eindringen kann. Interessanterweise befinden sich die konservierten Sequenzmotive innerhalb der Membran, was eine direkte Beteiligung dieser Boxen an der katalytischen Aktivität unwahrscheinlich macht. Die Erkennung des Acyl-Substrates kann hingegen sehr wohl durch transmembrane Bereiche erfolgen, wie bereits für Desaturasen gezeigt werden konnte (Libisch *et al.*, 2000). Gerichtete Mutagenisierungsexperimente könnten hierbei Aufschluss darüber geben, welche Aminosäuren an der Enzymkatalyse beteiligt sind.

3.5 Versuche zur funktionalen Identifizierung der *ELO*-ähnlichen Klone

Zur Identifizierung der *ELO*-ähnlichen Klone wurden zunächst wieder Expressionsexperimente in *S. cerevisiae* durchgeführt. In den folgenden Kapiteln werden die daraus gewonnenen Ergebnisse beschrieben und diskutiert. Für den Klon pp*PSE1* bestand zudem die Möglichkeit eines funktionalen Nachweis durch Deletion des Gens in dem Moos *P. patens*. Dieser Ansatz wird in den sich anschließenden Kapiteln behandelt.

3.5.1 Heterologe Expression der *ELO*-ähnlichen Klone in *S. cerevisiae*

Die heterologe Expression der *ELO*-ähnlichen Proteine erfolgte entweder in *S. cerevisiae* Stamm INVSc1 oder in dem Stamm Sc334 (Hovland *et al.*, 1989), jeweils unter Verwendung des pYES2-Systems. Die Erstellung der Expressionskonstrukte erfolgte prinzipiell wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben. Die offenen Leserahmen der cDNA-Klone wurden zunächst über PCR modifiziert und dann in die entsprechenden Schnittstellen des Expressionsvektors pYES2 kloniert. In einigen Fällen wurden die PCR-Fragmente zunächst in den Vektor pUC18 subkloniert und die durch Restriktion gewonnenen offenen Leserahmen erst anschließend mit dem entsprechend restringierten Vektor pYES2 ligiert (pp*PSE1*, ts*093*). In anderen Fällen erfolgte die Klonierung direkt (geglättet, *blunt*) oder nach Restriktion mit dem gereinigten PCR-Fragment, das dann mit den entsprechend geschnittenen pYES2-Vektoren ligiert wurde (pi*PSE1*, ts*POE1*, cc*041*). Über Restriktionsanalyse wurden schließlich jene Konstrukte selektiert, in denen die offenen Leserahmen die gleiche Orientierung aufwiesen wie der Promotor. In Tabelle 3.8 sind die Klonierungsstrategien der so erstellten Expressionskonstrukte aufgelistet. Die schematischen Vektorkarten sind im Anhang 3 dargestellt.

Tabelle 3.8. Konstrukte, die zur heterologen Expression der cDNA-Klone *ppPSE1*, *piPSE1*, *tsPOE1*, *ts093* und *cc041* hergestellt wurden. Angegeben sind die Schnittstellen, die an die offenen Leserahmen über PCR durch Primerüberhänge angefügt wurden und der Klonierung in den Hefe-Expressionsvektor pYES2 dienten. Darüber hinaus sind die Promotoren der Vektoren aufgeführt, unter deren Kontrolle die Expression in der Bäckerhefe erfolgte. Über Restriktionsanalyse mit verschiedenen Enzymen wurden schließlich solche Konstrukte selektiert, bei denen der Promotor und der jeweilige offene Leserahmen die gleiche Orientierung aufwiesen.

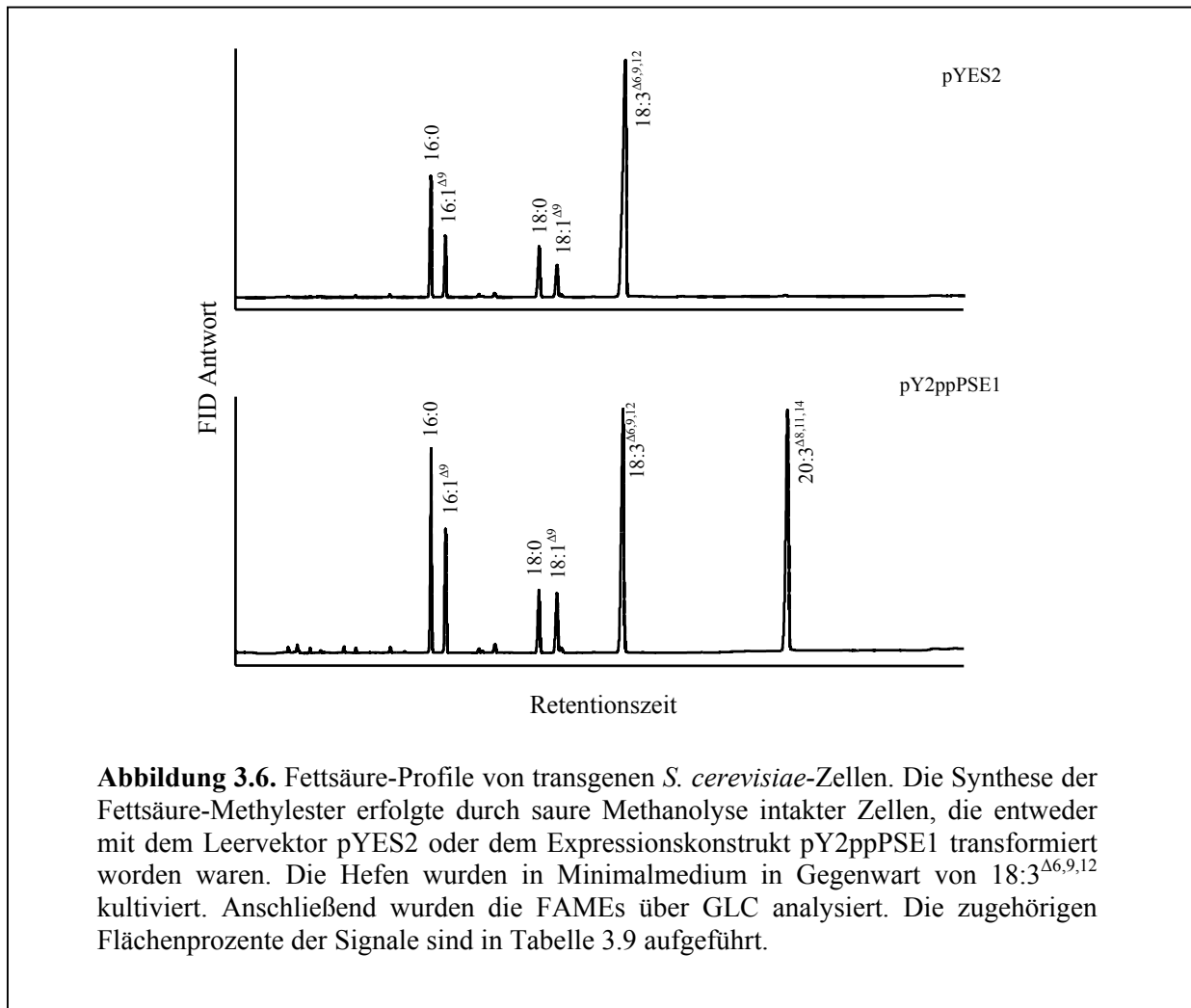
Konstrukt	5'-Schnittstelle	3'-Schnittstelle	Primer	Promotor	Restriktionsanalyse
pY2ppPSE1	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	PPEX-F/R	GAL1	<i>Hind</i> III
pY2piPSE1	<i>Kpn</i> I	<i>Xba</i> I	PIEX-F/R	GAL1	<i>Nde</i> I
pY2tsPOE1	- (<i>blunt</i>)	- (<i>blunt</i>)	TS1EX-F/R	GAL1	<i>Apa</i> I
pY2ts093	<i>Bam</i> H	<i>Xho</i> I	TS2EX-F/R	GAL1	<i>Apa</i> LI
pY2cc041	- (<i>blunt</i>)	- (<i>blunt</i>)	CCEX-F/R	GAL1	<i>Bam</i> HI

Auch die Expression erfolgte wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 3.3.1). In einigen Fällen wurde dem Medium 18:3^{Δ6,9,12} beigefügt, welche das Substrat der Δ⁶-Elongase ist. Weder die Applikation der Fettsäure noch die Überexpression der *ELO*-ähnlichen Klone führte dabei zu einer Beeinträchtigung des Wachstums der transgenen Hefen. Nach 24stündiger Induktion wurden die Hefezellen geerntet und ihre Gesamtfettsäuren wie in Kapitel 2.26.3 beschrieben über GLC analysiert.

3.5.2 Expression von *ppPSE1* aus *P. patens*

Die Expression von *ppPSE1* erfolgte in *S. cerevisiae* INVSc1 zunächst in Gegenwart oder Abwesenheit exogener 18:3^{Δ6,9,12}. Hierfür wurden die Hefen mit dem Leervektor pYES2 oder dem Expressionskonstrukt pY2ppPSE1 transformiert. Im oberen Gaschromatogramm der Abbildung 3.6 ist das Fettsäureprofil der transgenen Hefen dargestellt, die den Kontrollvektor pYES2 enthalten und in Gegenwart von 500 μM 18:3^{Δ6,9,12} kultiviert wurden. Neben den hefeeigenen gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren 16:0, 16:1^{Δ9}, 18:0, 18:1^{Δ9} sowie geringen Anteilen 18:1^{Δ11} zeigt das Chromatogramm, dass große Mengen der exogen applizierten Fettsäure 18:3^{Δ6,9,12} von den Hefen aufgenommen wurden. Ihr Anteil an den Gesamtfettsäuren betrug ca. 60 % (siehe Tabelle 3.9). Darüber hinaus konnten aber keine signifikanten Mengen weiterer Fettsäuren detektiert werden, die durch die Elongation von 18:3^{Δ6,9,12} durch hefeeigene Enzyme entstehen könnten. Auch die in der Hefe vorkommenden gesättigten VLCFAs sind in dem Chromatogramm nicht nachweisbar. Diese Fettsäuren kommen v.a. in den Sphingolipiden vor und sind dort über Amidbindungen an die langkettige Base gebunden. Daher lassen sie sich nicht vollständig über die gewählte Methode der einstündigen sauren Methanolyse mit 1 N H₂SO₄ derivatisieren und extrahieren. Im Gegensatz hierzu konnte in den Hefen, die das Konstrukt pY2ppPSE1 enthielten, eine neue Fettsäure detektiert werden (Abbildung 3.6). Durch Vergleich mit den Retentionszeiten bekannter Fettsäure-Standards konnte die neue Fettsäure als 20:3^{Δ8,11,14} identifiziert werden, dem Elongationsprodukt von 18:3^{Δ6,9,12}. Die

Kettenlänge sowie die Position der Doppelbindungen in der neu entstandenen Fettsäure wurde über GLC-MS-Analyse der Dimethyloxazolin-Derivate durch Dr. H. Moll und PD Dr. U. Zähringer am Forschungszentrum Borstel bestätigt. Insgesamt wurden 51 % der inkorporierten $18:3^{\Delta 6,9,12}$ umgesetzt. Dagegen führte die Expression von ppPSE1 nicht zu einer detektierbaren Elongation der gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren aus der Hefe (Abbildung 3.6). Dies Resultat zeigt eindeutig, dass ppPSE1 für ein Protein kodiert, das in der Hefe zur Elongation der Δ^6 -PUFA $18:3^{\Delta 6,9,12}$ führt.



Wie bereits in der Einleitung beschrieben (Kapitel 1.2.2) und in Kapitel 3.3.1 erwähnt, erfordert die Elongation von Fettsäuren in Pflanzen und Säugern die Aktivität von vier distinkten Enzymen: der β -Ketoacyl-CoA-Synthase, der β -Ketoacyl-CoA-Reduktase, der β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydratase sowie der *trans*- $\Delta^{2,3}$ -Enoyl-CoA-Reduktase (Fehling & Mukherjee, 1991; Bernert & Sprecher, 1977). Daher ist es unwahrscheinlich, dass die Elongation der exogenen Fettsäure $18:3^{\Delta 6,9,12}$ in transgenen Hefezellen allein auf die Aktivität des rekombinanten ppPse1 zurückzuführen ist. Vielmehr hängt die Synthese der neuen Fettsäure auch von der Fähigkeit von ppPse1 ab, mit den anderen Enzymen des Fettsäure-Elongasekomplexes aus der Hefe zu interagieren. Darüber hinaus konnten Millar und Kunst

zeigen, dass die Aktivität und die Selektivität der Fettsäure-Elongasen in höheren Pflanzen durch die β -Ketoacyl-CoA-Synthasen bestimmt wird, welche die initiiierende Kondensationsreaktion des Acyl-Substrates mit Malonyl-CoA katalysiert (Millar and Kunst, 1997). Obwohl ppPse1 keine Sequenzähnlichkeit mit diesen pflanzlichen Enzymen aufweist, ist es naheliegend zu vermuten, dass ppPSE1 für ein Protein kodiert, welches die initiiierende Reaktion katalysiert und eine dem kondensierenden Enzym identische oder zumindest ähnliche Aktivität aufweist. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Klonierung des *TSC13*-Gens aus Bäckerhefe, welches für die *trans*- $\Delta^{2,3}$ -Enoyl-CoA-Reduktase kodiert (Kohlwein *et al.*, 2001). Die Existenz dieses Enzyms zeigt, dass die Elongation von Fettsäuren in *S. cerevisiae* über die gleichen Zwischenprodukte und folglich durch ähnliche Reaktionen wie in Pflanzen und Tieren erfolgt. Außerdem konnten Moon und Mitarbeiter kürzlich erstmals zeigen, dass durch die Wirkung eines rekombinanten Elo-ähnlichen Proteins aus Maus in Mikrosomen transgener menschlicher Zelllinien als erstes Intermediat ein β -Ketoacyl-CoA entsteht (Moon *et al.*, 2001). In jedem Fall werden durch das hier präsentierte Resultat die Ergebnisse anderer Expressionsexperimente bestätigt, die zeigten, dass die Expression von *KCS*- oder *ELO*-Genen in transgenen Organismen für die Entstehung einer neuen Elongationsaktivität ausreicht und die Nachfolgeenzyme in der Bäckerhefe vorhanden sind und keine Substratpräferenzen besitzen (Millar & Kunst, 1997; Todd *et al.*, 1999; Beaudoin *et al.*, 2000; Leonard *et al.*, 2000; Parker-Barnes *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2001)

Tabelle 3.9. Fettsäure-Zusammensetzung (in mol%) transgener Hefen, die mit dem Leervektor pYES2 oder dem Expressionskonstrukt pY2ppPSE1 transformiert wurden. Die Hefezellen wurden in Minimalmedium ohne Uracil kultiviert und die Expressionen in der logarithmischen Wachstumsphase durch Zugabe von 2 % Galactose induziert. In einem Ansatz erfolgte die Expression ohne exogene Fettsäuren. In einem anderen Ansatz wurde dem Medium 500 μ M 18:3 $^{\Delta 6,9,12}$ beigefügt. Die Daten des letzteren Ansatzes (Spalte 3 und 5) geben die Fettsäurezusammensetzung der Gaschromatogramme in der Abbildung 3.6 wieder. Die Fettsäuremethylester wurden durch saure Methanolyse ganzer Zellen gewonnen und über GLC analysiert.

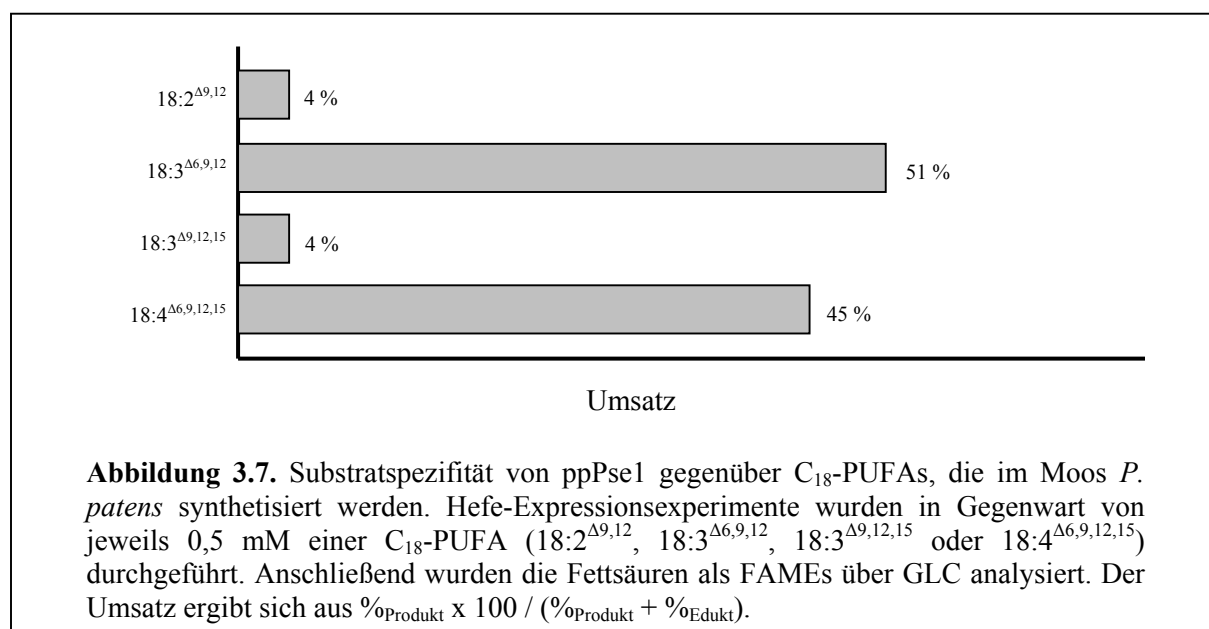
Fettsäuren	pYES2		pY2ppPSE1	
	-	+ 18:3 $^{\Delta 6,9,12}$	-	+ 18:3 $^{\Delta 6,9,12}$
16:0	13,5	14,0	13,3	14,2
16:1 $^{\Delta 9}$	46,3	7,3	44,0	8,9
18:0	4,7	8,5	4,3	6,2
18:1 $^{\Delta 9}$	33,5	5,6	32,3	6,2
18:1 $^{\Delta 11}$	2,0	0,3	6,1	0,4
18:3 $^{\Delta 6,9,12}$	-	64,0	-	31,7
20:3 $^{\Delta 8,11,14}$	-	0,3	-	32,4

Der Umsatz von ungefähr 50 % der $18:3^{\Delta 6,9,12}$ ist ein sehr hoher Wert verglichen mit den Aktivitäten der in *S. cerevisiae* heterolog exprimierten Δ^6 -, Δ^5 und Δ^4 -Desaturasen, die ebenfalls in die Biosynthese von C_{20} - und C_{22} -PUFAs involviert sind (Girke *et al.*, 1998; Knutzon *et al.*, 1998; Michaelson *et al.*, 1998a; Michaelson *et al.*, 1998b; Aki *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999; Watts & Browse, 1999; Qiu *et al.*, 2001). Der Umsatz von $18:3^{\Delta 6,9,12}$ durch ppPse1 stimmt allerdings mit den Aktivitäten nicht-pflanzlicher PUFA-Elongationsenzyme überein, die von anderen Arbeitsgruppen parallel zu dieser Doktorarbeit charakterisiert wurden (Beaudoin *et al.*, 2000; Leonard *et al.*, 2000; Parker-Barnes *et al.*, 2000). Auf jeden Fall demonstriert der hohe Umsatz, dass das Reaktionsprodukt des rekombinanten ppPse1 nicht durch die Nachfolgeenzyme der Hefe-Elongase diskriminiert wird. Außerdem scheint die neue Elongationsaktivität in den ppPSE1-exprimierenden Hefen nicht durch die Verfügbarkeit der Nachfolgeenzyme limitiert zu werden. Zwar sind die Nachfolgeenzyme nicht für die Geschwindigkeit der Fettsäure-Elongation verantwortlich, dennoch könnte die Verfügbarkeit dieser Enzyme für die Ausbildung der Elongationskomplexe mit ppPse1 und den Elo-Proteinen einen limitierenden Faktor darstellen. Gen-Expressionsstudien durch Northern Blot- oder Mikroarray-Analysen könnten Aufschluss darüber geben, ob die Überexpression von ppPSE1 in transgenen Hefen zu einer Zunahme der mRNA-Mengen der Nachfolgeenzyme führt und so den möglichen zusätzlichen Bedarf für diese Proteine kompensiert. Eine andere Möglichkeit ist, dass sich ppPse1 und die Elo-Proteine die Nachfolgeenzyme effektiv teilen und eventuell mit ihnen zusammen in einem Komplex assoziiert sind, wie dies bereits für Elo2p, Elo3p und die Enoyl-Reduktase Tsc13p gezeigt werden konnte (Kohlwein *et al.*, 2001).

Ein weiteres interessantes, aber nicht überraschendes Ergebnis stellt der Einfluss der inkorporierten $18:3^{\Delta 6,9,12}$ auf den Desaturierungsgrad der hefeeigenen Fettsäuren dar (siehe Tabelle 3.9). So beträgt das Verhältnis von gesättigten zu einfach ungesättigten Fettsäuren in Hefen, die in Abwesenheit von PUFAs kultiviert wurden, etwa 0,2. Die Inkorporation der exogen applizierten $18:3^{\Delta 6,9,12}$ führt zu einer Zunahme des Anteils der gesättigten Fettsäuren (Zunahme des Verhältnisses auf 1,7). Der Desaturierungsgrad von Fettsäuren in Hefen wird durch die Aktivität der Δ^9 -Acyl-CoA-Desaturase bestimmt, welche in der Hefe durch das *OLE1*-Gen kodiert wird (Stukey *et al.*, 1990). Eine Reduktion der Desaturierung durch inkorporiertes $18:3^{\Delta 6,9,12}$ kann dabei auf zwei verschiedene Mechanismen zurückgeführt werden. Zum einen reprimiert die aufgenommene $18:3^{\Delta 6,9,12}$ die Expression von *OLE1* (Choi *et al.*, 1996), und zum anderen führt sie zu einer Destabilisierung des *OLE1*-Transkripts (Gonzalez & Martin, 1996). Der Grund hierfür liegt einerseits in der Kontrolle des Desaturierungsgrades des Acyl-CoA-Pools und ist andererseits auf eine Regulierung der Membranfluidität zurückzuführen, welche wiederum u. a. durch den Desaturierungsgrad der Fettsäuren in den Membranlipiden bestimmt wird. Übereinstimmend hiermit ist das Verhältnis von gesättigten zu (einfach und mehrfach) ungesättigten Fettsäuren in Gegenwart und Abwesenheit exogener $18:3^{\Delta 6,9,12}$ ähnlich (0,2 ohne $18:3^{\Delta 6,9,12}$ bzw. 0,3 mit $18:3^{\Delta 6,9,12}$).

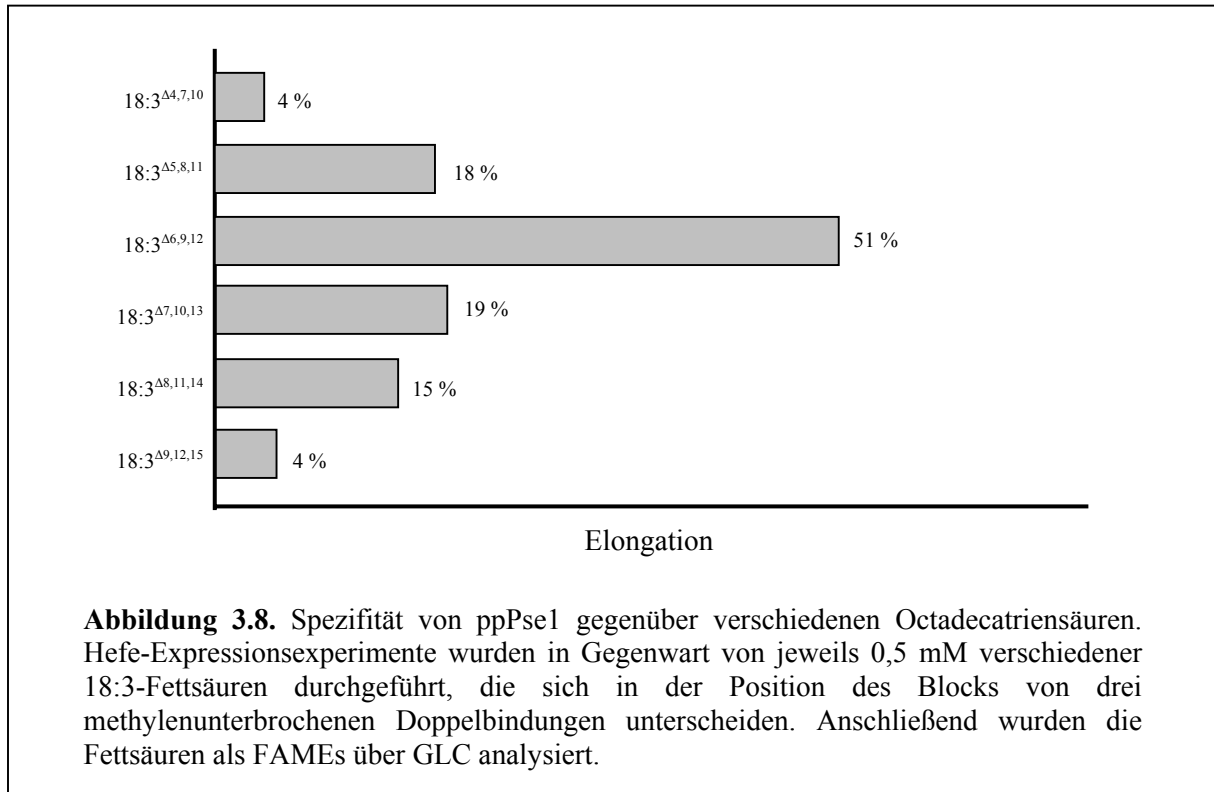
3.5.3 Substratspezifität von ppPse1 aus *P. patens*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Expression von ppPSE1 in Bäckerhefe zur Elongation von 18:3 $\Delta^{6,9,12}$ führt, sollte nun untersucht werden, ob auch andere Fettsäuren als Substrate von ppPse1 akzeptiert werden. Zu diesem Zweck wurden weitere Expressionsexperimente mit transgenen Hefen durchgeführt, die entweder den Leervektor pYES2 oder das Expressionskonstrukt pY2ppPSE1 enthielten. Die Expression erfolgte diesmal in Gegenwart einer Vielzahl mehrfach ungesättigter Fettsäuren, die jeweils einzeln appliziert wurden. Die diversen Fettsäuren wurden dafür entweder aus verschiedenen Quellen in präparativen Maßstäben isoliert (siehe Kapitel 2.26.1), kommerziell erworben oder freundlicherweise von Dr. Christoph Beckmann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Boland synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

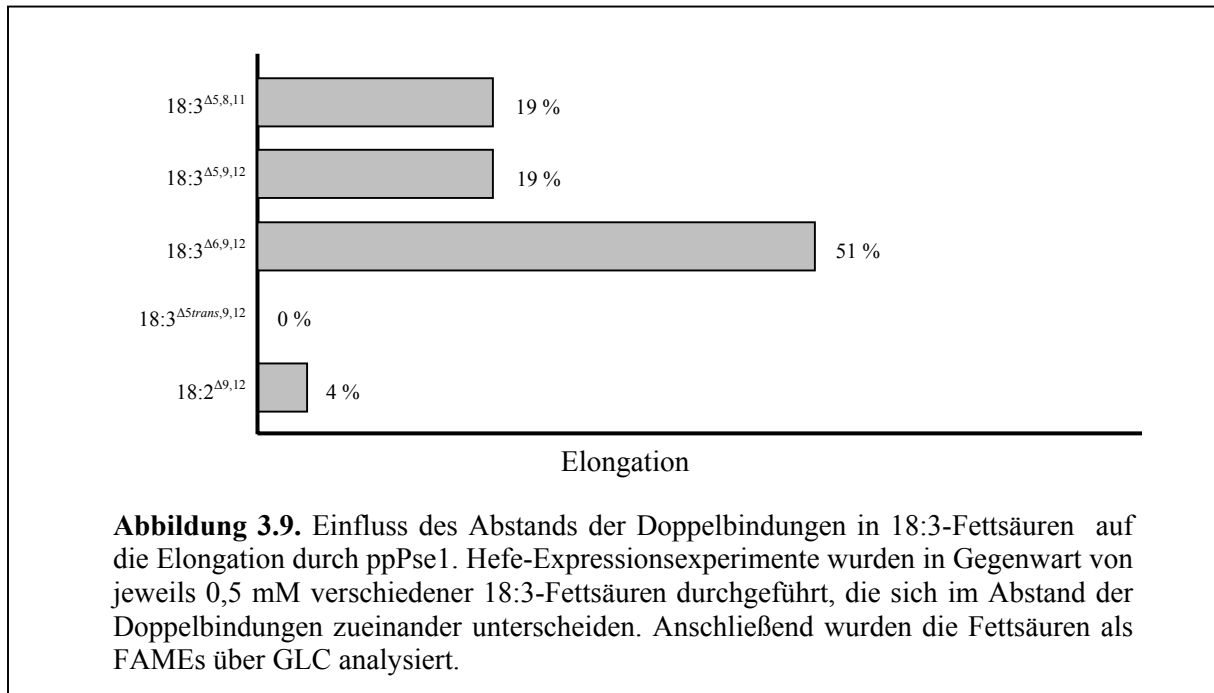


In einem ersten Ansatz wurde die Spezifität von ppPse1 gegenüber den im Moos *P. patens* synthetisierten C₁₈-PUFAs untersucht. Im einzelnen sind dies Linolsäure (18:2 $\Delta^{9,12}$), γ -Linolensäure (18:3 $\Delta^{6,9,12}$), α -Linolensäure (18:3 $\Delta^{9,12,15}$) sowie Stearidonsäure (18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$). In Hefezellen, die den Leervektor pYES2 enthielten, wurde keine dieser Fettsäuren elongiert (Ergebnisse nicht gezeigt). Dagegen konnten in transgenen Hefen, die ppPSE1 exprimieren, neben der Elongation von 18:3 $\Delta^{6,9,12}$ ein hoher Umsatz mit 18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$ gemessen werden (Abbildung 3.7). Mit einem Umsatz von 45 % stellt diese Fettsäure ein ähnlich gutes Substrat für ppPse1 dar wie 18:3 $\Delta^{6,9,12}$ (51 %). Die beiden Δ^9 -PUFAs (18:2 $\Delta^{9,12}$ und 18:3 $\Delta^{9,12,15}$) wurden hingegen mit jeweils 4 % nur zu geringen Anteilen elongiert. Dies zeigt, dass ppPse1 spezifisch für die Elongation von Δ^6 -PUFAs verantwortlich ist und Δ^9 -PUFAs diskriminiert. ppPse1 unterscheidet dabei nicht zwischen Δ^6 -PUFAs der $\omega 3$ - und $\omega 6$ -Serie (siehe Kapitel 1.1.1). Dieses Ergebnis stimmt mit dem Biosyntheseweg von VLC-PUFAs in *P. patens*

überein (siehe Kapitel 1.3.1), da die Verfügbarkeit der beiden Substrate für die Δ^6 -Elongase im Moos durch die Spezifität der Δ^6 -Desaturase bestimmt wird (Girke *et al.*, 1998). Die Δ^6 -Desaturase bevorzugt $18:2^{\Delta 9,12}$ ($\omega 6$) als Substrat gegenüber $18:3^{\Delta 9,12,15}$ ($\omega 3$), so dass größere Mengen an $18:3^{\Delta 6,9,12}$ ($\omega 6$) als an $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$ ($\omega 3$) entstehen. Dementsprechend werden im Moos überwiegend C_{20} -PUFAs der $\omega 6$ -Serie (d.h. $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$) synthetisiert.



Um detaillierter den Einfluss der Position der Doppelbindungen auf den Umsatz zu untersuchen, wurden die Expressionsexperimente mit synthetischen Octadecatriensäuren durchgeführt, in denen sich der Block von drei methylenunterbrochenen Doppelbindung an verschiedenen Positionen innerhalb der Kohlenstoffkette befindet. Auch in diesem Experiment wurde keine der applizierten Fettsäuren in Hefen, die den Leervektor pYES2 enthielten, elongiert (Ergebnisse nicht gezeigt). Dagegen wurden $18:3^{\Delta 5,8,11}$ und $18:3^{\Delta 7,10,13}$, in denen die Doppelbindungen ausgehend von $18:3^{\Delta 6,9,12}$ jeweils nur um eine Position in Richtung Carboxyl- bzw. Methylende verschoben sind, in den ppPSE1-exprimierenden Hefezellen mit relativ hohen Ausbeuten von 18 % bzw. 19 % umgesetzt und stellen somit noch gute Substrate von ppPse1 dar (siehe Abbildung 3.8). Auch $18:3^{\Delta 8,11,14}$, von der 15 % in das Elongationsprodukt $20:3^{\Delta 10,13,16}$ umgesetzt wurde, wird noch als Substrat von ppPse1 akzeptiert. Hingegen nimmt die Aktivität von ppPse1 mit weiterer Verschiebung der Doppelbindungen drastisch ab. So wurden $18:3^{\Delta 4,7,10}$ und $18:3^{\Delta 9,12,15}$ mit Umsätzen von je 4 % weitgehend durch ppPse1 diskriminiert. Die Ergebnisse zeigen, dass ppPse1 nicht streng spezifisch nur Δ^6 -PUFAs elongiert, sondern auch Fettsäuren als Substrate akzeptiert, die der $18:3^{\Delta 6,9,12}$ strukturell ähnlich sind.

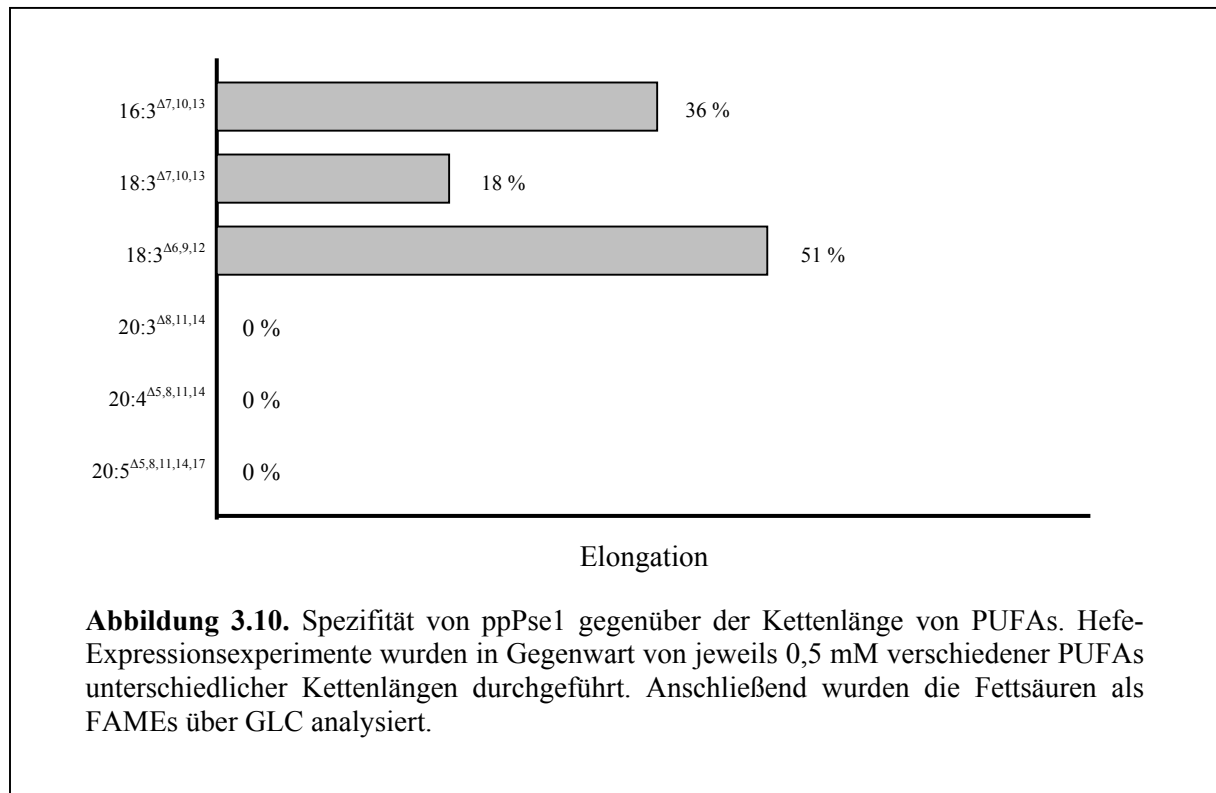


Ein Vergleich des Umsatzes von Pinolensäure (18:3^{Δ5,9,12}) mit der von 18:3^{Δ5,8,11} zeigt, dass diese beiden Δ^5 -PUFAs zu gleichen Anteilen elongiert werden (siehe Abbildung 3.9). In beiden Fällen wurden ungefähr 19 % der applizierten Fettsäure in die Elongationsprodukte 20:3^{Δ7,11,14} bzw. 20:3^{Δ8,11,14} umgesetzt. In der Pinolensäure, die in Samen zahlreicher Gymnospermen nachgewiesen werden kann (Wolff *et al.*, 1999; Wolff *et al.*, 2000), sind die ersten beiden Doppelbindungen am Carboxylende durch eine Ethylengruppe und nicht durch eine Methylengruppe voneinander getrennt. Der Umsatz beider Fettsäuren ist aber wesentlich geringer als der von 18:3^{Δ6,9,12}. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Position der ersten carboxylständigen Doppelbindung determiniert, inwieweit eine Fettsäure von ppPse1 als Substrat akzeptiert wird. Der Abstand der Doppelbindungen zueinander scheint dagegen keinen signifikanten Einfluss hierauf zu haben. Dies müsste jedoch durch weitere Experimente mit isomeren 18:3-PUFAs (z. B. 18:3^{Δ6,10,13} und 18:3^{Δ6,11,14}) bestätigt werden.

Obwohl die Expression von ppPSE1 zur Elongation von 18:3^{Δ5,9,12} führte, konnte keine Aktivität von ppPse1 mit Columbinsäure (18:3^{Δ5trans,9,12}) festgestellt werden. In der Columbinsäure befindet sich die Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 5 und 6 in der *trans*-Konfiguration. Daher ähnelt diese Fettsäure strukturell der Linolsäure (18:2^{Δ9,12}), welche ebenfalls nur zu 4 % elongiert wird und somit ein schwaches Substrat für ppPse1 darstellt.

In einem nächsten Ansatz wurden die Expressionsexperimente mit PUFAs unterschiedlicher Kettenlänge durchgeführt. Der scheinbar größte Umsatz erfolgte hierbei mit Hexadecatriensäure (16:3^{Δ7,10,13}). In transgenen Hefen, die ppPSE1 exprimieren, wurden über 60 % der inkorporierten Fettsäure zur 18:3^{Δ9,12,15} elongiert (Daten nicht gezeigt). Aber auch Kontroll-Hefen, die den Leervektor

pYES2 enthalten, elongieren $16:3^{\Delta 7,10,13}$ zur $18:3^{\Delta 9,12,15}$. Der in Abbildung 3.10 aufgeführte Umsatz von 36 % ist bereits durch Subtraktion der Hefe-Hintergrundaktivität (29 % Elongation) korrigiert und entspricht somit der durch ppPse1 katalysierten „Netto“-Elongation. Auf jeden Fall zeigt ein Vergleich der Umsätze von $16:3^{\Delta 7,10,13}$ und von $18:3^{\Delta 7,10,13}$ (19 %), dass ppPse1 keine strikte Spezifität gegenüber der Kettenlänge des Fettsäure-Substrates aufweist und auch C_{16} -PUFAs zu elongieren vermag. Dagegen stellen C_{20} -PUFAs keine Substrate für ppPse1 dar, wie aus den Expressionsexperimenten mit diesen VLC-PUFAs hervorgeht. Weder $20:3^{\Delta 8,11,14}$ noch $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ oder $20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$ werden in transgenen Hefen, die ppPSE1 exprimieren, elongiert. Dies ist nicht überraschend, da im Moos *P. patens* lediglich C_{20} -PUFAs und keine C_{22} -PUFAs synthetisiert werden.



Der Umsatz von $16:3^{\Delta 7,10,13}$ in den Hefezellen, die den Leervektor pYES2 enthalten, ist vermutlich auf die unspezifische Aktivität eines der drei Elo-Proteine zurückzuführen. Elo1 ist normalerweise in die Elongation von mittelkettigen gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren involviert (Toke & Martin, 1996; Schneiter *et al.*, 2000). Dagegen sind Elo2 und Elo3 für die Biosynthese gesättigter VLCFAs verantwortlich (Oh *et al.*, 1997). Da C_{18} - und C_{20} -PUFAs in den Kontroll-Hefen nicht elongiert werden, ist anzunehmen, dass Elo1 für die Elongation von $16:3^{\Delta 7,10,13}$ verantwortlich ist. Der hohe Umsatz ist dennoch überraschend, da die Aktivität der Hefe-Elongase gegenüber $16:1^{\Delta 9}$ sehr gering ist und nur 4 % zur Vaccensäure ($18:1^{\Delta 11}$) elongiert werden (siehe Tabelle 3.9). Eine Erklärung könnte die Verfügbarkeit der Substrate für die Elongase darstellen. Während das endogen synthetisierte $16:1^{\Delta 9}$ vermutlich sofort durch die Aktivität der Acyltransferasen in die Membranlipide eingebaut wird und somit dem Substratpool für die Elongase entzogen wird, ist es möglich, dass die

aufgenommene 16:3^{Δ7,10,13} kein gutes Substrat für die Acyltransferasen darstellt und somit größere Mengen für die Elongation zur Verfügung stehen. Eine detaillierte Analyse der Fettsäurezusammensetzung in den einzelnen Lipidklassen und des Acyl-CoA-Pools der Hefe könnte hierüber Aufschluss geben. Auf jeden Fall konnte mit diesem Ergebnis zum ersten Mal gezeigt werden, dass *S. cerevisiae* selbst PUFAs zu elongieren vermag.

Zusammenfassend lässt sich anhand der Ergebnisse aus den Hefe-Expressionsexperimenten schlussfolgern, dass ppPSE1 für eine Komponente der Δ⁶-Elongase aus *P. patens* kodiert. ppPse1 weist dabei eine hohe Spezifität für Δ⁶-PUFAs auf und diskriminiert die im Moos ebenfalls vorkommenden Δ⁹-PUFAs. Dies bestätigt den Biosynthese-Weg der C₂₀-PUFAs im Moos über Δ⁶-Desaturase, Δ⁶-Elongase und Δ⁵-Desaturase und schließt den in *Euglena gracilis* realisierten Weg über Δ⁹-Elongase, Δ⁸-Desaturase und Δ⁵-Desaturase aus (Kapitel 1.3.1). Übereinstimmend mit dem Fettsäureprofil von *P. patens*, in dem keine C₂₂-PUFAs detektiert werden können, werden C₂₀-PUFAs nicht von ppPse1 elongiert. Die Tatsache, dass die Expression von ppPSE1 in Hefe auch zur Elongation zahlreicher anderer PUFAs führt, steht nicht im Widerspruch zu ihrer natürlichen Spezifität. Diese synthetischen oder auch natürlich vorkommenden Fettsäuren können in *P. patens* nicht nachgewiesen werden. Daher besteht im Moos keine Notwendigkeit, dass diese Fettsäuren durch die Δ⁶-Elongase diskriminiert werden. Ein ähnliches Phänomen kann auch bei anderen Enzymen beobachtet werden. So besitzen Sterol-Glucosyltransferasen *in vitro* eine hohe Spezifität gegenüber dem Zucker-Nucleotid, wohingegen sie eine Vielzahl verschiedener Sterole als Substrat akzeptieren (Warnecke *et al.*, 1999). Da die Organismen, aus denen die Sterol-Glucosyltransferasen isoliert wurden, jedoch nur bestimmte Sterole synthetisieren, besteht auch hier keine Notwendigkeit einer hohen Spezifität. Da in den Organismen aber eine Reihe verschiedener Zuckernucleotide synthetisiert werden, ist hier eine hohe Spezifität erforderlich.

3.5.4 Substratspezifität von ppPse1 aus *P. patens*

Die Ergebnisse der vorherigen Kapitel zeigten, dass ppPse1 spezifisch in die Elongation von Δ⁶-PUFAs involviert ist. Die Spezifität eines Enzyms ist definiert als seine Aktivität in Gegenwart eines einzigen Substrates (in diesem Fall einer einzigen PUFA). Die Expressionsexperimente zur Bestimmung der Substratspezifität von ppPse1 spiegeln aber nur unzureichend die Situation im Moos wieder, in der der Δ⁶-Elongase gleichzeitig verschiedene PUFAs zur Verfügung stehen. Daher ist es notwendig, die Substratspezifität von ppPse1 zu bestimmen. Die Selektivität beschreibt dabei die Auswahl eines bestimmten Substrates aus einem Substratgemisch durch das Enzym.

Zu diesem Zweck wurden Expressionsexperimente in Hefen durchgeführt, die entweder den Leervektor pYES2 oder das Expressionskonstrukt pY2ppPSE1 enthielten. Die Expression erfolgte diesmal aber in Gegenwart eines Substratgemischs aus 4 verschiedenen C₁₈-PUFAs (18:2^{Δ9,12},

18:3^{Δ6,9,12}, 18:3^{Δ9,12,15} und 18:4^{Δ6,9,12,15}), die alle im Moos synthetisiert werden und somit potentielle Substrate für ppPse1 darstellen. Hierfür wurde ein äquimolares Gemisch aus den vier PUFAs erzeugt. Dieses Gemisch wurde in solchen Mengen dem Expressionsmedium beigelegt, dass jede Fettsäure in einer Endkonzentration von 125 µM (alle vier zusammen 500 µM) vorlag.

Das in Abbildung 3.11 dargestellte obere Gaschromatogramm zeigt, dass alle vier C₁₈-PUFAs in dem für dieses Experiment verwendeten Gemisch in nahezu äquimolaren Mengen vertreten waren. Alle vier Fettsäuren wurden zu etwa gleichen Anteilen von den Hefezellen inkorporiert, die den Leervektor pYES2 enthielten (siehe Abbildung 3.11). Die Anteile der vier PUFAs an den Gesamtfettsäuren betrug hierbei 12 % - 19 %. In Hefen, die ppPSE1 exprimieren, wurden von diesen vier Fettsäuren jedoch nur die beiden Δ⁶-PUFAs in großen Anteilen elongiert. Die beiden Elongationsprodukte 20:3^{Δ8,11,14} und 20:4^{Δ8,11,14,17} akkumulierten zu einem Anteil von 5,8 % bzw. 6,0 % der Gesamtfettsäuren. Dies führte gleichzeitig zu einer Reduktion der beiden Substrate um ungefähr 50 %. Die Umsätze von 18:3^{Δ6,9,12} und 18:4^{Δ6,9,12,15} entsprechen mit 41 % bzw. 52 % den bei den Spezifitätsversuchen ermittelten Werten. Dagegen wurden die beiden Δ⁹-PUFAs mit Umsätzen von nur 1,3 % (für 18:2^{Δ9,12}) und 2,6 % (für 18:3^{Δ9,12,15}) noch schlechter umgesetzt als in den Spezifitätsexperimenten. Diese Ergebnisse bestätigen die aus den Spezifitätsexperimenten gewonnenen Erkenntnisse, dass ppPSE1 für eine Komponente der Δ⁶-Elongase kodiert, die sehr spezifisch und selektiv nur Δ⁶-PUFAs elongiert. Dabei unterscheidet sie nicht zwischen PUFAs der ω3- und ω6-Serie.

Die Selektivität der Δ⁶-Elongase ist gerade dann von Bedeutung, wenn die Enzyme für die transgene Produktion von VLC-PUFAs in Ölsaaten eingesetzt werden sollen. So kann die unspezifische Elongation von verschiedenen Fettsäuren zu unerwünschten Nebenprodukten in dem Öl führen. Die hier präsentierten Ergebnisse stellen die bisher umfangreichste Untersuchung der Substratspezifität eines rekombinanten Elongaseproteins dar. Ein Vergleich der Aktivitäten mit anderen mittlerweile isolierten PUFA-Elongase-Komponenten zeigt, dass es sich bei ppPse1p um eine sehr spezifische Komponente der Δ⁶-Elongase handelt. Während cePae1 aus *C. elegans* in Bäckerhefe neben der Elongation von Δ⁶-PUFAs auch zur Elongation von 16:1^{Δ9} führt (Beaudoin *et al.*, 2000), ist hsHelo aus *H. sapiens* in die Elongation einer Vielzahl von Fettsäuren involviert (Leonard *et al.*, 2000). Nur maGlelo aus *M. alpina* weist eine dem ppPse1-Enzym ähnliche hohe Spezifität auf, auch wenn für dieses Enzym keine umfangreichen Spezifitätsexperimente durchgeführt wurden (Parker-Barnes *et al.*, 2000).

Auf jeden Fall ist es erforderlich, die Aktivität sowie Selektivität von ppPse1 in transgenen Pflanzen zu überprüfen, da sich hier die Verfügbarkeit der Acyl-Substrate (vermutlich Acyl-CoAs) für die Elongase von der Situation in der Bäckerhefe unterscheiden kann. Außerdem muss noch gezeigt werden, ob ppPse1 als Elo-ähnliches Enzym mit den Nachfolgenzymen in den Pflanzen zu

interagieren vermag. Auf diese und andere Probleme, die sich bei der transgenen Produktion von VLC-PUFAs ergeben, soll aber in einem späteren Kapitel eingegangen werden (siehe Kapitel 3.7).

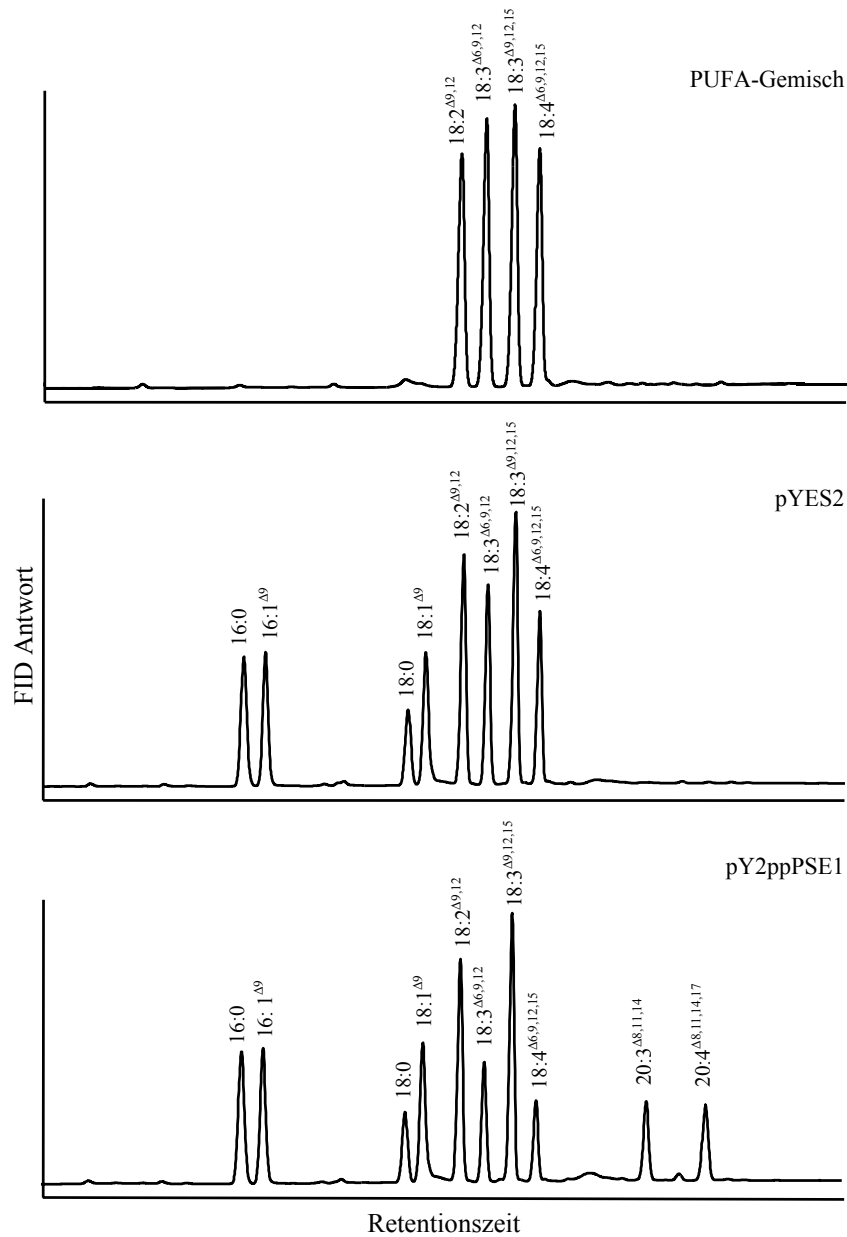


Abbildung 3.11. Substratspezifität von ppPse1. Das obere Chromatogramm zeigt ein annähernd äquimolares Gemisch aus $18:2^{\Delta 9,12}$, $18:3^{\Delta 6,9,12}$, $18:3^{\Delta 9,12,15}$ und $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$. Die beiden unteren Chromatogramme zeigen die Fettsäure-Profile transgener *S. cerevisiae*-Zellen, die entweder den Leervektor pYES2 oder das Expressionskonstrukt pY2ppPSE1 enthielten und die in Gegenwart des PUFA-Gemischs kultiviert wurden. Nach der Expression wurden die FAMES über GLC analysiert. Die Derivatisierung der Fettsäuren erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen.

3.5.5 Expression von piPSE1 aus *P. infestans*

Die Expression des offenen Leserahmens von piPSE1 aus *P. infestans* erfolgte in *S. cerevisiae* Sc334 (Hovland *et al.* 1989) mit dem pYES2-System. Der Stamm Sc334 eignet sich besonders für Expressionsexperimente unter Kontrolle von Galactose-induzierbaren Promotoren (P_{GAL}), da in ihm das Gen *REG1* mutiert ist, welches für die Glucose-Repression Galactose-induzierter Promotoren verantwortlich ist. Daher können die Expressionsexperimente in Gegenwart von Glucose durchgeführt werden, die eine bessere und erheblich billigere Kohlenstoffquelle für die Hefen darstellt als die für Stamm INVSc1 verwendete Raffinose. Die Expression in Sc334 wurde dennoch in Gegenwart von Raffinose durchgeführt, da die Repression von P_{GAL} durch Glucose nicht ausschließlich durch *REG1* vermittelt wird (Lohr *et al.*, 1995). In einem ersten Ansatz wurden die transgenen Hefen wieder in Gegenwart von $18:3^{\Delta 6,9,12}$ kultiviert, um piPse1 als Komponente der Δ^6 -Elongase zu identifizieren.

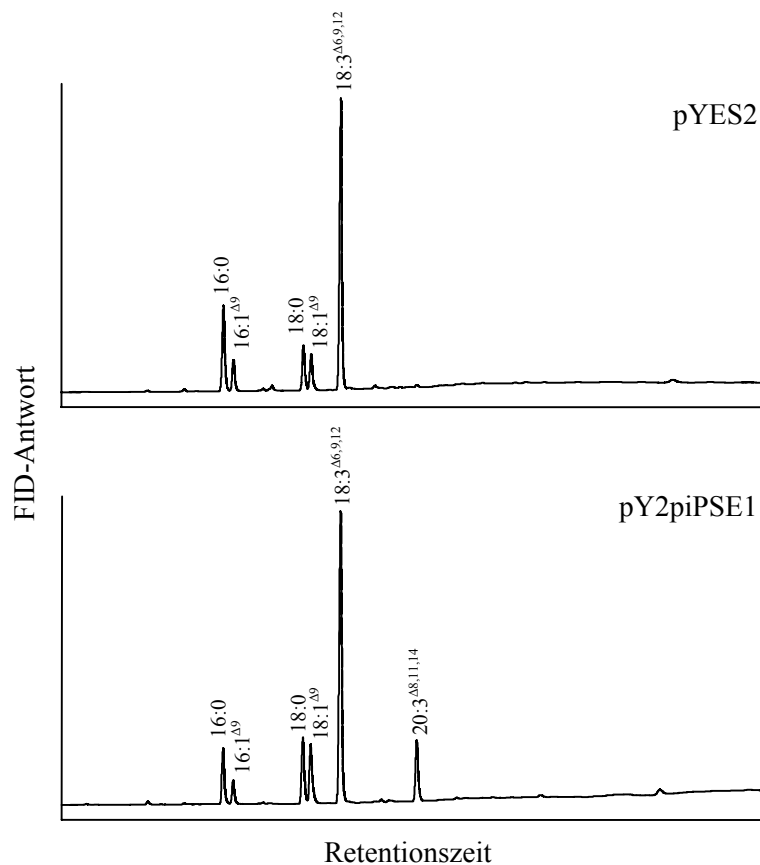


Abbildung 3.12. Funktionale Expression von piPSE1 in *S. cerevisiae* Sc334. Gaschromatogramme der Fettsäuremethylester transgener Hefezellen, die den Leervektor pYES2 (Kontrolle, oberes Chromatogramm) oder das Expressionskonstrukt pY2piPSE1 (unteres Chromatogramm) enthalten. Die Hefen wurden in Gegenwart von 0,5 mM $18:3^{\Delta 6,9,12}$ kultiviert. Die Expression sowie die Derivatisierung, Extraktion und Analyse der Fettsäuremethylester erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben (Kapitel 2.19 und 2.26.3).

Die in der Abbildung 3.12 aufgeführten Chromatogramme stellen die Fettsäureprofile der transgenen Hefen dar, die entweder mit dem Leervektor pYES2 oder dem Expressionskonstrukt pY2piPSE1 transformiert worden waren. Die prozentualen Anteile der detektierten Fettsäuren sind in Tabelle 3.10 wiedergegeben. Wie bereits zuvor gezeigt wird, die exogene Fettsäure von den Kontroll-Hefen inkorporiert, aber nicht elongiert. Dagegen wird in den piPSE1-exprimierenden Hefezellen eine neue Fettsäure synthetisiert, die aufgrund eines Retentionszeitenvergleichs als 20:3^{Δ8,11,14} identifiziert wurde. Wie ppPSE1 ist piPSE1 in die Elongation der applizierten 18:3^{Δ6,9,12} involviert und kodiert somit für eine Komponente der Δ^6 -Elongase aus *P. infestans*. Auch in diesem Fall ist die Synthese der neuen Fettsäure sowohl auf die Aktivität des rekombinanten Proteins piPse1 als auch auf die der Nachfolgenzyme aus der Hefe zurückzuführen. Darüber hinaus führt die Expression von piPSE1 zu einer Verschiebung des Verhältnisses der C₁₆ zu den C₁₈ gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren. In den Hefen, die den Leervektor pYES2 enthielten beträgt das Verhältnis 1,3 (mol%_{C16} / mol%_{C18}). In den piPSE1-exprimierenden Zellen nimmt der Anteil an C₁₈-Fettsäuren dagegen zu, so dass das Verhältnis auf 0,6 sinkt. Vermutlich ist piPse1 daher auch in die Elongation von C₁₆-Fettsäuren involviert. Diese Aktivität ist aber auf gesättigte Fettsäuren beschränkt, da keine Zunahme des Anteils der 18:1^{Δ11} (dem Elongationsprodukt von 16:1^{Δ9}) nachgewiesen werden konnte. Die Zunahme von 18:1^{Δ9} ist dagegen auf die Aktivität der Δ^9 -Desaturase Ole1 aus der Hefe zurückzuführen, der aufgrund der Aktivität von piPse1 größere Mengen des 18:0-Substrates zur Verfügung stehen.

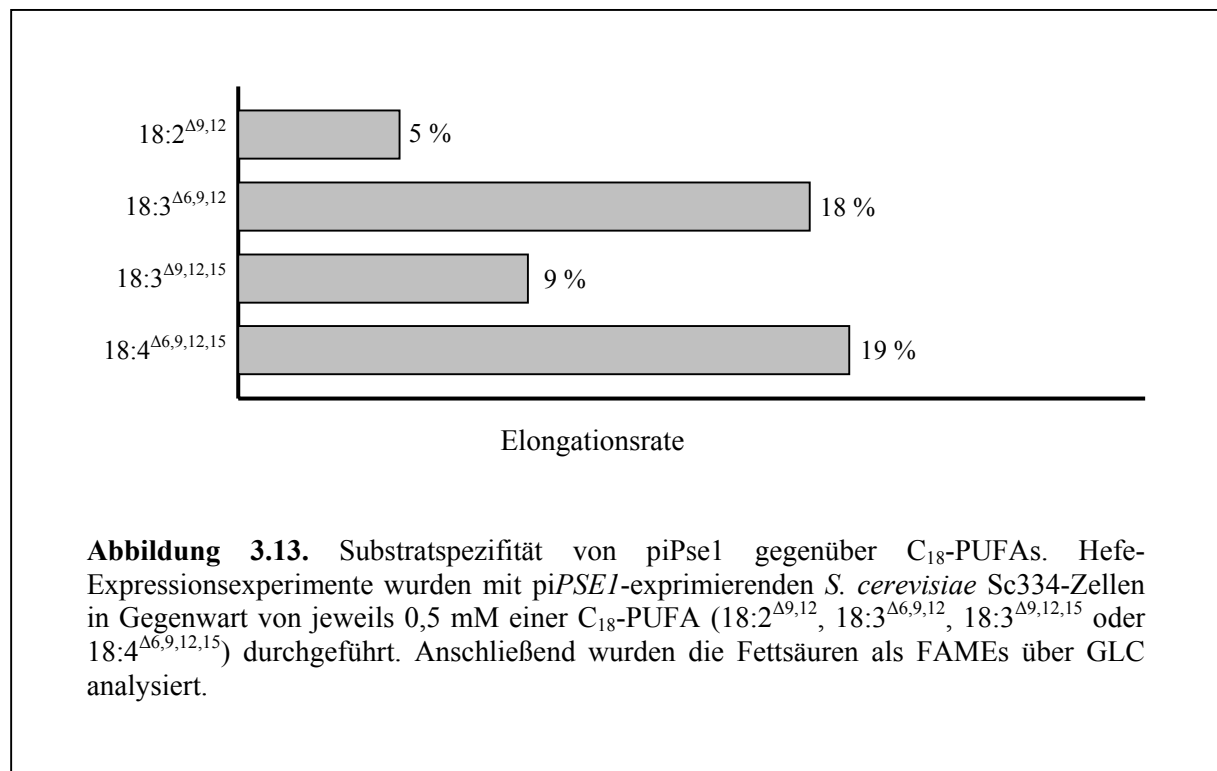
Tabelle 3.10. Fettsäure-Zusammensetzung (in mol%) transgener Hefen, die mit dem Leervektor pYES2 oder dem Expressionskonstrukt pY2piPSE1 transformiert worden waren. Die Hefezellen wurden in Minimalmedium ohne Uracil kultiviert und die Expressionen in der logarithmischen Wachstumsphase durch Zugabe von 2 % (w/v) Galactose induziert. Während der Expression wurde dem Medium 500 μ M 18:3^{Δ6,9,12} beigefügt. Die Daten entsprechen den Flächenprozenten der in den Gaschromatogrammen in der Abbildung 3.12 detektierten Signale.

	pYES2	pY2ppPSE1
Fettsäuren	+ 18:3 ^{Δ6,9,12}	+ 18:3 ^{Δ6,9,12}
16:0	17,5	9,7
16:1 ^{Δ9}	6,5	4,1
18:0	9,5	12,2
18:1 ^{Δ9}	8,5	11,8
18:3 ^{Δ6,9,12}	57,8	51,3
20:3 ^{Δ8,11,14}	0,2	10,9

Mit 18 % ist der Umsatz von $18:3^{\Delta 6,9,12}$ in transgenen Hefen, die *piPSE1* exprimieren, wesentlich geringer als in solchen, die *ppPSE1* exprimieren (51 %; siehe Kapitel 3.5.2). Dies ist auf eine geringere Aktivität des *piPse1* Proteins zurückzuführen, da in dem Hefestamm Sc334 aufgrund der Mutation im *REG1*-Gen eine höhere Expression vermutet werden kann als in dem Stamm INVSc1. Durch Expression von *piPSE1* im Stamm INVSc1 konnte diese Vermutung bestätigt werden, da in diesen Zellen die Elongation von $18:3^{\Delta 6,9,12}$ mit nur 14 % noch geringer war (Daten nicht gezeigt).

3.5.6 Substratspezifität von *piPse1* aus *P. infestans*

Bei den Versuchen zur funktionalen Identifizierung von *piPSE1* konnte bereits gezeigt werden, dass *piPse1* aus *P. infestans* nicht nur in die Elongation von $18:3^{\Delta 6,9,12}$, sondern vermutlich auch in die der gesättigten Fettsäure 16:0 involviert ist. Eine weitergehende Bestimmung der Substratspezifität des rekombinanten *piPse1* erfolgte durch Hefe-Expressionsexperimente in Gegenwart verschiedener, einzeln applizierter PUFAs.



Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.13 zusammengefasst. Während in den Kontrollhefen, die den Leervektor pYES2 enthielten, keine der inkorporierten Fettsäuren elongiert wurde (Daten nicht gezeigt), konnten in Hefen, die das Expressionskonstrukt pY2*piPSE1* enthielten, mit allen applizierten C₁₈-PUFAs Elongationsprodukte detektiert werden. Mit Umsätzen von 18 % und 19 % hat das rekombinante *piPse1* eine Präferenz gegenüber den Δ^6 -PUFAs $18:3^{\Delta 6,9,12}$ und $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$. Allerdings werden auch die beiden Δ^9 -PUFAs $18:2^{\Delta 9,12}$ (5 %) und $18:3^{\Delta 9,12,15}$ (9 %) nicht unerheblich elongiert, so

dass piPse1 eine nicht so stark ausgeprägte Spezifität für Δ^6 -PUFAs hat wie ppPse1 aus *P. patens*. Obwohl *P. infestans* C₂₂-PUFAs synthetisiert, konnte in den piPSE1-exprimierenden Hefezellen keine Aktivität mit den C₂₀-PUFAs 20:3 ^{$\Delta^{8,11,14}$} und 20:4 ^{$\Delta^{5,8,11,14}$} nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt)

Die Tatsache, dass die Expression von piPSE1 in Hefezellen zur Elongation von sowohl Δ^6 - als auch Δ^9 -PUFAs führt, wirft die Frage nach dem Biosyntheseweg von 20:4 ^{$\Delta^{5,8,11,14}$} in *P. infestans* auf. Für das Moos *P. patens* kann aufgrund der Ergebnisse aus den Expressionsexperimenten von einer Biosynthese über Δ^6 -Desaturierung, Δ^6 -Elongierung und Δ^5 -Desaturierung ausgegangen werden (siehe Kapitel 3.5.3). In dem Pilz *P. infestans* besteht dagegen die Möglichkeit, dass neben dieser Reaktionsfolge ein alternativer Weg realisiert ist, der die Aktivitäten einer Δ^9 -Elongase, einer Δ^8 -Desaturase und einer Δ^5 -Desaturase erfordert (siehe Kapitel 1.3.1) und u. a. in *E. gracilis* verwirklicht ist (Wallis & Browse, 1999). Die ermittelte Spezifität von piPse1 deutet dabei darauf hin, dass das Enzym als Komponente der Δ^6 -Elongase und der Δ^9 -Elongase in beide Biosynthesewege involviert ist. Endgültige Aufklärung, ob tatsächlich beide Wege parallel in dem Pilz stattfinden, könnte die Klonierung der Δ^6 - sowie der Δ^8 -Desaturase bringen. Leider enthielt die EST-Datenbank der BASF Plant Science GmbH keine Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu bekannten *front end*-Desaturasen. Dagegen konnte über die Suche in Datenbanken öffentlicher EST-Sequenzierungsprojekte von *P. infestans* sowie *P. sojae* einige cDNA-Klone identifiziert werden, die möglicherweise für die Δ^6 -, Δ^8 - oder auch Δ^5 -Desaturase kodieren, deren exakte Funktionen und Spezifitäten aber noch nicht nachgewiesen sind.

3.5.7 Expression von tsPOE1 aus *Thraustochytrium* sp.

Die Expression von tsPOE1 aus *Thraustochytrium* sp. in *S. cerevisiae* INVSc1 in Gegenwart von 18:3 ^{$\Delta^{6,9,12}$} zeigt, dass dieser cDNA-Klon nicht für eine Komponente der Δ^6 -Elongase kodiert. In transgenen Hefen, die tsPOE1 exprimierten, konnten keine signifikanten Mengen des Elongationsproduktes 20:3 ^{$\Delta^{8,11,14}$} detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dennoch konnte eine neue Fettsäure nachgewiesen werden. Diese Fettsäure wies eine identische Retentionszeit wie 18:1 ^{Δ^{11}} auf. Durch die Wiederholung der Expressionsexperimente in Abwesenheit von exogenen Fettsäuren konnte dieses Ergebnis bestätigt werden (siehe Abbildung 3.17 und Tabelle 3.12). Die Akkumulation von 18:1 ^{Δ^{11}} in den tsPOE1-exprimierenden Hefezellen (24 % der Gesamtfettsäuren) ging zudem mit einer erheblichen Reduktion des Anteils von 16:1 ^{Δ^9} an den Gesamtfettsäuren einher (36 % in den Kontrollhefen; 19 % in den tsPOE1-exprimierenden Zellen), so dass tsPOE1 als Komponente einer 16:1 ^{Δ^9} -Elongase identifiziert werden konnte (POE1 = *p*almito*l*eic s*p*ecific *e*longase). Mit einem berechneten Umsatz von 56 % weist das rekombinante tsPoe1 eine sehr hohe Aktivität in den transgenen Hefen auf. Dagegen werden die gesättigte 16:0 und auch alle applizierten C₁₈-PUFAs nicht elongiert (Daten nicht gezeigt).

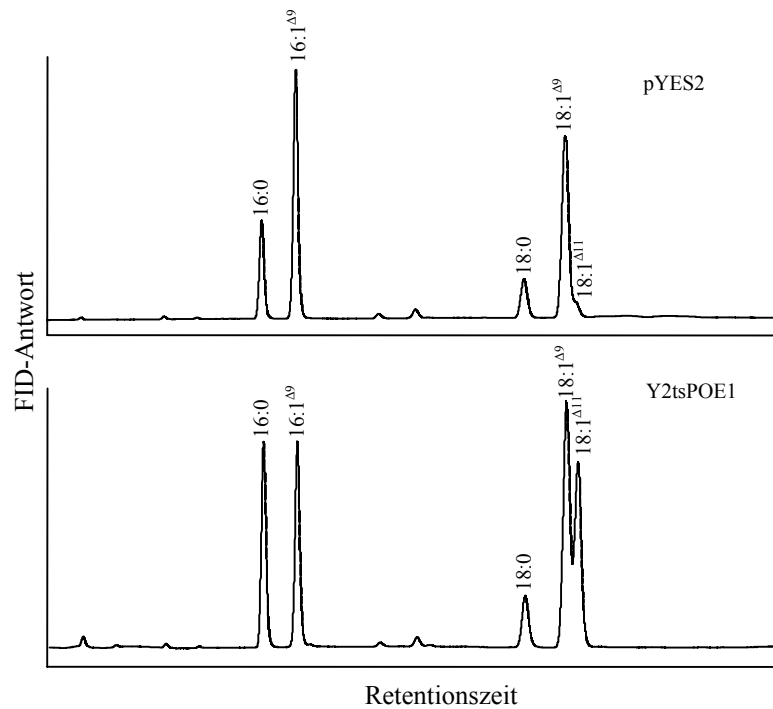


Abbildung 3.14. Fettsäure-Profile von *S. cerevisiae* INVSc1, die entweder den Leervektor pYES2 oder das Expressionskonstrukt pY2tsPOE1 enthielten. Die Hefen wurden in Minimalmedium kultiviert und die Expressionen durch 2 % (w/v) Galactose induziert. Die Synthese der Fettsäure-Methylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert. Die zugehörigen Flächenprozentage der Signale sind in Tabelle 3.11 aufgeführt.

Mit dem Gen *cePAE1* aus dem Nematoden *C. elegans* konnte bereits zuvor eine Elongase-Komponente isoliert werden, die in der Hefe zur Elongation von 16:1^{Δ9} führte. Allerdings war die Elongation von 16:1^{Δ9} eine unspezifische Nebenaktivität von *cePae1*, das als Komponente der Δ⁶-Elongase identifiziert wurde (Beaudoin *et al.*, 2000). Durch Hefe-Expressionsexperimente in Gegenwart von 18:2^{Δ9,12}, 18:3^{Δ9,12,15}, 18:4^{Δ6,9,12,15} und 20:4^{Δ5,8,11,14} konnte für *tsPOE1* aber eine Beteiligung an der Elongation jeglicher PUFAs ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Die Identifizierung von *tsPOE1* als Komponente der 16:1^{Δ9}-Elongase ist ein überraschendes Ergebnis. *Thraustochytrium* sp. enthält in seinen Lipiden neben den C₂₂-PUFAs nur größere Anteile 16:0 und auch 18:1 (Bajpai *et al.*, 1991). Möglicherweise handelt es sich bei der 18:1 um das Elongationsprodukt von *tsPoe1*, d. h. um 18:1^{Δ11} und nicht um das Δ⁹-Desaturierungsprodukt von 18:0, d. h. um 18:1^{Δ9}. Aufgrund der präsentierten Ergebnisse kann aber eine Involvierung von *tsPoe1* in die Biosynthese von VLC-PUFAs ausgeschlossen werden, da 18:1^{Δ9} und nicht 18:1^{Δ11} die Vorstufe für den anschließenden Desaturase/Elongase-Weg darstellt (siehe Kapitel 1.3.1). Offen bleibt hierbei die Funktion von 18:1^{Δ11}.

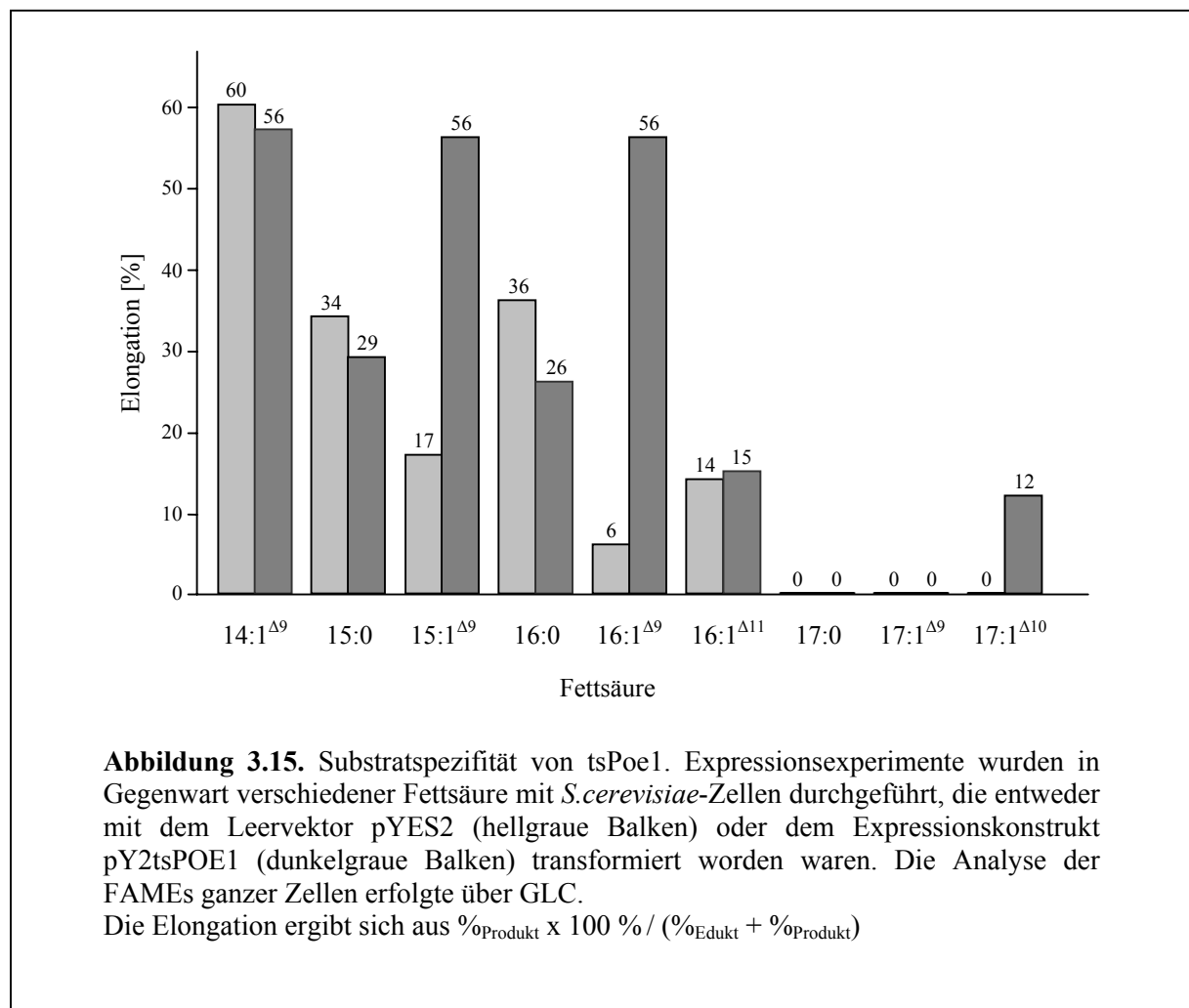
3.5.8 Substratspezifität von tsPoe1 aus *Thraustochytrium* sp.

Zur Bestimmung der Substratspezifität wurden die Hefe-Expressionsexperimente von tsPOE1 in Gegenwart einer Reihe gesättigter und einfach ungesättigter, mittel- und langkettiger Fettsäuren durchgeführt. Die Fettsäurezusammensetzungen der Hefen, die entweder mit dem Leervektor pYES2 oder dem Expressionskonstrukt pY2tsPOE1 transformiert worden waren, sind in der Tabelle 3.11 dargestellt. Die Interpretation der Ergebnisse ist in diesem Fall etwas schwieriger, da die applizierten und inkorporierten Fettsäuren zum Teil auch in den Kontrollhefen durch die Aktivitäten der Δ^9 -Desaturase und der hefeeigenen Elongasen umgesetzt werden und sich somit sehr komplexe Fettsäureprofile ergeben. Die ermittelten Umsätze, mit denen die verschiedenen Fettsäuren in den Kontrollhefen und den tsPOE1-exprimierenden Hefen elongiert werden, sind in Abbildung 3.15 aufgeführt.

Tabelle 3.12. Fettsäurezusammensetzung transgener Hefen, die entweder mit dem Leervektor pYES2 (YES) oder dem Expressionskonstrukt pY2tsPOE1 (POE) transformiert worden waren. Die Hefezellen wurden in Minimalmedium kultiviert und die Expressionen durch Zugabe von 2 % (w/v) Galactose in der frühen logarithmischen Wachstumsphase induziert. Zum gleichen Zeitpunkt erfolgte in einigen Fällen die Applikation von 0,5 mM einer exogenen Fettsäure (14:1 Δ^9 , 15:0, 17:0 oder 17:1 Δ^{10}). Die FAMES wurden aus ganzen Hefezellen durch saure Methanolyse hergestellt und über GLC analysiert.

	YES	POE	YES	POE	YES	POE	YES	POE	YES	POE
			+ 14:1 Δ^9		+ 15:0		+ 17:0		+ 17:1 Δ^{10}	
14:1 Δ^9	-	-	13,0	9,0	-	-	-	-	-	-
15:0	-	-	-	-	22,8	14,7	-	-	-	-
15:1 Δ^9	-	-	-	-	10,0	3,5	-	-	-	-
16:0	14,2	18,6	9,3	17,5	2,3	9,6	5,3	14,5	11,0	20,2
16:1 Δ^9	36,3	18,9	22,2	17,0	16,2	15,4	22,3	16,2	15,1	15,4
16:1 Δ^{11}	-	-	16,6	10,3	-	-	-	-	-	-
17:0	-	-	-	-	11,5	6,0	41,7	22,0	-	-
17:1 Δ^9	-	-	-	-	11,4	7,4	10,3	2,8	-	-
17:1 Δ^{10}	-	-	-	-	-	-	-	-	60,1	23,4
17:1 Δ^{11}	-	-	-	-	2,0	4,5	-	-	-	-
18:0	8,0	6,7	7,5	6,9	2,0	4,2	1,9	4,4	3,9	7,5
18:1 Δ^9	39,3	31,7	28,3	24,3	21,8	22,3	17,5	21,7	9,6	18,9
18:1Δ^{11}	2,2	24,1	0,4	13,1	-	12,5	1,0	18,5	0,4	11,5
18:1 Δ^{13}	-	-	2,7	1,8	-	-	-	-	-	-
19:1 Δ^{12}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2

Die Inkorporation von $14:1^{\Delta 9}$ führt in den Kontrollhefen zur Synthese von zwei neuen Fettsäuren, die identische Retentionszeiten wie $16:1^{\Delta 11}$ und $18:1^{\Delta 13}$ aufweisen. Insgesamt wurden 60 % der $14:1^{\Delta 9}$ zur $16:1^{\Delta 11}$ elongiert, von der wiederum 14 % zur $18:1^{\Delta 13}$ weiter umgesetzt wurden. Dagegen konnte in den *tsPOE1*-exprimierenden Zellen keine Zunahme der Elongationsaktivitäten gemessen werden, so dass $14:1^{\Delta 9}$ und $16:1^{\Delta 11}$ kein Substrate für *tsPoe1* zu sein scheinen. Im Fall der inkorporierten $15:0$ ist die Situation noch komplizierter. 44 % der gesättigten Fettsäure werden in den Kontrollhefen durch die Wirkung von *Ole1* zur einfach ungesättigten $15:1^{\Delta 9}$ desaturiert. Sowohl $15:0$ als auch $15:1^{\Delta 9}$ werden durch die Hefen elongiert, wobei die Hefe-Elongase die gesättigte $15:0$ (34 % Elongation) gegenüber der $15:1^{\Delta 9}$ (17 % Elongation) als Substrat bevorzugt. Die Expression von *tsPOE1* führte in den Hefen zu einer deutlichen Zunahme der Elongationsaktivität mit $15:1^{\Delta 9}$ (56 % Elongation), wogegen die Elongation von $15:0$ unbeeinflusst blieb. Eine ähnliche Situation ergibt sich bei den Expressionsexperimenten in Gegenwart von $17:0$ mit dem Unterschied, dass die Aktivität von *Ole1* mit dieser Fettsäuren nicht so groß ist (24 % Desaturierung). Weder in den Kontrollhefen noch in den *tsPOE1*-exprimierenden Zellen wurden die beiden Fettsäuren elongiert. Dagegen wurde die exogen applizierte $17:1^{\Delta 10}$ durch das rekombinante *tsPoe1* mit einem Umsatz von 12 % durchaus elongiert.



Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass es sich bei tsPoe1 um eine sehr spezifische Komponente der 16:1^{Δ9}-Elongase handelt, die nur die beiden strukturell sehr ähnlichen Fettsäuren 15:1^{Δ9} und 17:1^{Δ10} elongiert. Gesättigte Fettsäuren und PUFAs (Daten nicht gezeigt) werden durch tsPoe1 nicht elongiert. Die fehlende Aktivität mit 17:1^{Δ9} könnte seine Ursache in der geringen Desaturierung von 17:0 durch Ole1 haben, wodurch tsPoe1 nur geringe Substratmengen zur Verfügung stehen. Eine alternative Erklärung wäre, dass tsPoe1 ω⁶- und ω⁷- einfach ungesättigte Fettsäuren (15:1^{Δ9} bzw. 16:1^{Δ9} und 17:1^{Δ10}) als Substrate akzeptiert und ω⁸- Fettsäuren (17:1^{Δ9}) diskriminiert.

Darüber hinaus stellen die hier präsentierten Resultate die umfangreichsten Untersuchungen zur *in vivo*-Substratspezifität der Hefe-Elongase dar. Die Aktivität gegenüber den mittel- und langkettigen Fettsäuren ist vermutlich auf Elo1 zurückzuführen, da weitere messbare Elongationen unterbleiben, welche eine Beteiligung von Elo2 und Elo3 vermuten lassen würden. Aber erst eine qualitative und quantitative Untersuchung der Sphingolipide, d. h. eine Analyse ihrer Fettsäurezusammensetzung sowie ihres Anteils an den Gesamtlipiden, könnte Aufschluss darüber geben, ob die applizierten Fettsäuren und ihre Elongationsprodukte durch Elo2/Elo3 weiter elongiert werden. Dies ist im besonderen für die gesättigten Fettsäuren relevant. Eine Elongation einfach ungesättigter Fettsäuren durch Elo2 und Elo3 kann dagegen weitestgehend ausgeschlossen werden (Oh *et al.*, 1997).

Eine Elongation von 14:1^{Δ9} in *S. cerevisiae* wurde bereits durch Schneiter und Mitarbeiter demonstriert (Schneiter *et al.*, 2000), allerdings konnte in diesen Untersuchungen keine weitere Elongation des Produktes 16:1^{Δ11} nachgewiesen werden. Jedoch wurde durch diese Ergebnisse eindeutig gezeigt, dass die Elongation von 14:1^{Δ9} von Elo1 abhängt und nicht durch die Fettsäure-Synthase (Fas) der Hefe erfolgt, da jegliche Elongation von 14:1^{Δ9} in einer *Δelo1*-Deletionsmutante unterbleibt. Dagegen erfolgt die Biosynthese von 18:0 nicht ausschließlich durch Elo1 (Schneiter *et al.*, 2000), so dass möglicherweise auch die Elongation von 15:0 durch andere Systeme (Elo2/Elo3 oder Fas) erfolgt. Zusammen mit den in Kapitel 3.5.3 dargestellten Ergebnissen kann die Substratspezifität von Elo1p somit auf 15:1^{Δ9}, 16:1^{Δ11} und auch auf die PUFA 16:3^{Δ7,10,13} ausgeweitet werden.

3.5.9 Expression von ts093 und cc041 aus *Thraustochytrium* sp. und *C. cohnii*

Die Expression von ts093 aus *Thraustochytrium* sp. und cc041 aus *C. cohnii* in *S. cerevisiae* INVSc1 ergab keinen Aufschluss über mögliche Funktionen dieser beiden cDNA-Klone. Obwohl die Expressionsexperimente in Gegenwart einer Vielzahl verschiedener PUFAs durchgeführt wurden (18:2^{Δ9,12}, 18:3^{Δ6,9,12}, 18:3^{Δ9,12,15}, 18:4^{Δ6,9,12,15} und 20:4^{Δ5,8,11,14}), konnte mit keiner der applizierten Fettsäuren eine signifikante Elongationsaktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch die

Fettsäuren der Hefen (16:0, 16:1^{Δ9}, 18:0 und 18:1^{Δ9}) wurden in den *ts093*- und *cc041*-exprimierenden Zellen nicht elongiert.

Die Tatsache, dass die Expression von *cc041* in den Hefen nicht zum Auftreten einer neuen Elongationsaktivität führt, ist nicht verwunderlich, da der Klon mit großer Wahrscheinlichkeit nicht für ein vollständiges Protein kodiert. Da sich unter den 40 positiven Klonen, die bei der Isolierung der *cc041*-cDNA untersucht wurden, kein Volllänge-klon befand, kann davon ausgegangen werden, dass in der cDNA-Bank kein solcher enthalten ist (siehe Kapitel 3.4.1). Daher wäre die Synthese einer neuen cDNA-Bank von *C. cohnii* notwendig, um einen längeren Klon zu isolieren. Alternativ könnte dies auch durch 5'-RACE-Experimente erfolgen, die aber in einem ersten Versuch nicht erfolgreich waren (Daten nicht gezeigt). Ob das N-terminale Ende der Elo-Proteine tatsächlich essentiell für die katalytische Aktivität ist, oder ob es lediglich die Signalsequenz für eine korrekte Sortierung der Proteine in die ER-Membran umfasst, könnte anhand von Deletionsexperimenten aktiver Elo-Proteine nachgewiesen werden.

Das Fehlen einer nachweisbaren Elongationsaktivität in den *ts093*-exprimierenden Hefezellen lässt sich hingegen nicht auf die Unvollständigkeit des Proteins zurückführen. Mit 282 Aminosäuren hat das exprimierte Protein eine ähnliche Länge wie die identifizierten Elo-ähnlichen Proteine und ist somit wahrscheinlich vollständig. Aufgrund eines fehlenden Stopcodons vor dem putative Startcodons kann dies aber nicht mit 100%iger Sicherheit behauptet werden (siehe Kapitel 3.4.2). Möglicherweise handelt es sich bei *ts093* um ein *ELO2*- oder *ELO3*-homologes Gen und ist in die Biosynthese der gesättigten C₂₆-Fettsäuren involviert, die anschließend auf die NH₂-Gruppe der langkettigen Sphingobase übertragen werden (siehe Kapitel 1.1.4). Um diese Möglichkeit zu untersuchen, ist wiederum eine detaillierte Analyse der Sphingolipide notwendig. Die Synthese von C₂₆-Fettsäuren durch das rekombinante *ts093*-Protein könnte zu einer Zunahme des Anteils der C₂₆-Fettsäuren in den Sphingolipiden führen oder zu einer Zunahme des Anteil dieser Lipidklasse an den Gesamtlipiden. Alternativ könnte die Expression in der Hefemutante *slc1-1* durchgeführt werden, in der eine Mutation in dem *SLC1*-Gen, welches für eine Acyltransferase kodiert, zur Inkorporation von gesättigten VLCFAs in die sn-2 Position von Glycerolipiden führt (Nagiec *et al.*, 1993). Eine mögliche Zunahme der gesättigten VLCFAs in *ts093*-exprimierenden Zellen dieser Mutante wäre somit leichter nachweisbar.

3.5.10 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Hefe-Expressionsexperimenten

Von den 5 isolierten cDNA-Klonen mit Sequenzähnlichkeiten zu den *ELO*-Genen aus *S. cerevisiae* konnten 3 Klone durch heterologe Expression in Bäckerhefe als Komponenten von Fettsäure-Elongasen identifiziert werden. Das Auftreten der neuen Elongationsaktivitäten deutet darauf hin, dass diese Proteine die initierende Reaktion katalysieren, durch welche die Aktivität und Spezifität der

Elongasen bestimmt wird (Millar & Kunst, 1997). Die beiden Klone *ppPSE1* aus *P. patens* und *piPSE1* aus *P. infestans* sind in die Elongation von PUFAs involviert. Ein Vergleich der Spezifitäten der rekombinanten Proteine zeigt, dass *ppPse1* mit deutlicher Präferenz Δ^6 -PUFAs elongiert und Δ^9 -PUFAs diskriminiert, wohingegen die Expression von *piPSE1* in der Hefe zur Elongation von sowohl Δ^6 - als auch Δ^9 -PUFAs führt. Der Klon *tsPOE1* aus *Thraustochytrium* sp. ist nicht in die Elongation von PUFAs involviert, sondern kodiert für ein Protein, das in der Hefe zur Elongation von 16:1 ^{Δ^9} führt. Die Expression der beiden Klone *ts093* und *cc041* führte dagegen nicht zu deren funktionalen Identifizierung.

3.5.11 Gen-Deletion von *ppPSE1* in *P. patens*

Um einen weiteren Beweis für die Funktion von *ppPSE1* aus *P. patens* als Komponente der Δ^6 -Elongase zu erbringen, wurde das *ppPSE1*-Gen in dem Moos durch homologe Rekombination deletiert. Die dadurch erwartete Reduktion des Anteils von 20:4 ^{$\Delta^{5,8,11,14}$} an den Gesamtfettsäuren könnte bei Auftreten eines veränderten Phänotyps Rückschlüsse auf die Funktion der C₂₀-PUFAs in dem Moos geben.

3.5.11.1 Erstellung eines Deletionskonstruktes

Zur Erstellung des Gen-Deletionskonstruktes von *ppPSE1* wurde ein 221 bp-*HindIII*-Fragment aus dem offenen Leserahmen der *ppPSE1*-cDNA durch die *nptII*-Selektionskassette ersetzt. Diese diente wiederum der Selektion stabil transformierter Pflanzen und enthielt den offenen Leserahmen der Neomycin-Phosphotransferase flankiert vom CaMV 35S-Promotor und -Terminator.

Im Detail wurde der von *BamHI*-Schnittstellen flankierte offene Leserahmen der *ppPSE1*-cDNA zunächst *blunt-end* in den *SmaI/EcoRV*-verdauten Vektor pBluescript II SK- liegt (pMPSE1). Dies war erforderlich, um die *HindIII*-Schnittstelle in der *multiple cloning site* (MCS) des Vektors zu deletieren und so die anschließende Insertion der *nptII*-Selektionskassette zu ermöglichen. Die Kassette wurde mit *HindIII* aus dem Vektor pRT101neo (Girke *et al.*, 1998) herausgeschnitten und in die beiden *HindIII*-Schnittstellen von *ppPSE1* kloniert. *XhoI*-Verdau ermöglichte schließlich die Selektion des Konstruktes pGPSE1, in dem die *nptII*-Kassette die gleiche Orientierung aufwies wie der offene Leserahmen von *ppPSE1* (siehe Abbildung 3.16). Vor der Transformation wurde das Disruptions-Konstrukt aus pGPSE1 mit *BamHI* herausgeschnitten, wodurch ein lineares Fragment (2,16 kb) entstand. Dieses Fragment enthielt die *nptII*-Selektionskassette, welche am 5'-Ende von einem 256 bp langen und am 3'-Ende von einem 411 bp langen Bereich der *ppPSE1*-cDNA flankiert war.

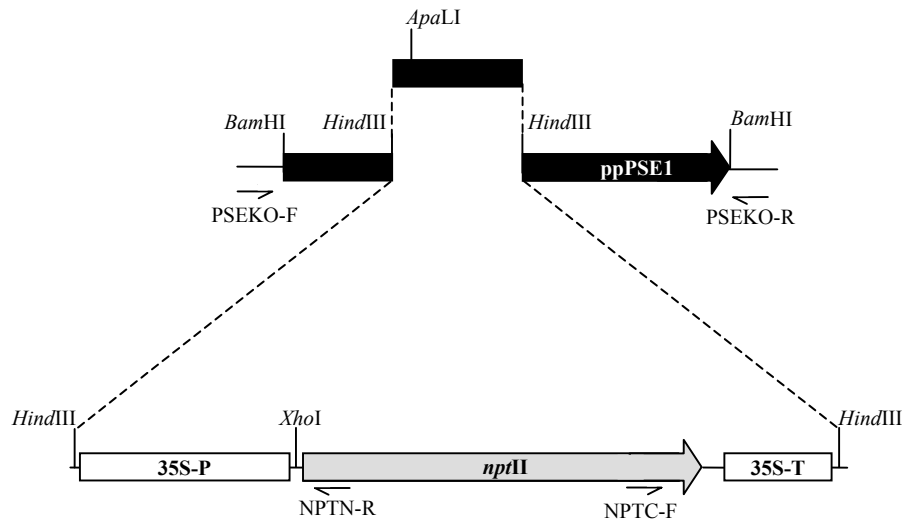


Abbildung 3.16. Klonierung des Gen-Disruptions-Konstruktes pGPSE1. Das Plasmid pGPSE1 entstand aus dem Vektor pMPSE1, bei dem das *HindIII*-Fragment des offenen Leserahmens von ppPSE1 durch die *nptII*-Kassette von pRT101neo (Girke *et al.*, 1998) substituiert wurde. Vor der Transformation wurde pGPSE1 mit *BamHI* verdaut, wodurch ein lineares Fragment entstand (2,16 kb). Dieses Fragment bestand aus der zentralen *nptII*-Kassette, welche am 5'-Ende von einem 256 bp langen und am 3'-Ende von einem 411 bp langen Bereich der ppPSE1-cDNA flankiert war. Die beschrifteten Pfeile kennzeichnen die Bindungsstellen der für die PCR-Analysen verwendeten Primerpaare PSEKO-F/NPTN-R und PSEKO-R/NPTC-F.

3.5.11.2 Transformation von *Physcomitrella patens*

Die Transformation und Selektion von *Physcomitrella patens* wurde wiederum von Dr. Hauke Holtorf aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Reski an der Universität Freiburg durchgeführt. Insgesamt wurden mir 89 G 418-resistente Moospflanzen zur Verfügung gestellt, die bis zu 3 Selektionsrunden überlebt hatten. Zur Detektion einer Deletionsmutante wurden zunächst die Fettsäureprofile der Transformanten über GLC analysiert, welche eine sehr schnelle Methode darstellt, um einen veränderten Phänotyp und somit eine putative Deletionsmutante zu identifizieren. Da sie außerdem nur wenig Pflanzenmaterial bedarf, wurde sie zunächst der molekularen Analyse vorgezogen.

Die Analyse der Fettsäureprofile der 89 G 418-resistenten Moospflanzen erfolgte über GLC ihrer Fettsäuremethylester wie in Kapitel 2.26.3 beschrieben. Fast alle untersuchten Pflanzen wiesen eine dem Wildtyp annähernd identische Fettsäurezusammensetzung auf und akkumulierten 25-30 % C₂₀-PUFAs (Daten nicht gezeigt). Bei diesen Pflanzen handelte es sich folglich um nicht stabile Transformanten oder um solche, bei denen das Gen-Disruptionskonstrukt unspezifisch in andere Bereiche des Moos-Genoms integrierte. Solche illegitimen Integrationen sind bereits bei anderen Rekombinationsexperimenten mit *P. patens* beschrieben worden (Strepp *et al.*, 1998). Nur in der Transformationslinie 46-2 (*pse1*) konnte ein vollständiger Verlust der C₂₀-PUFAs detektiert werden.

Diese Mutante sowie der Wildtyp wurden zur Überprüfung der spezifischen Integration des Gen-Deletionskonstruktes in das *ppPSE1*-Gen in Flüssigmedium kultiviert. Erst im Anschluss an diese molekulare Analyse wird detaillierter auf die Veränderungen der Fettsäureprofile in der Mutante eingegangen.

3.5.11.3 Molekulare Analyse der Mutante *pse1*

Die Frage, ob in der Moospflanze *pse1* eine spezifische Integration des Gen-Disruptionskonstruktes pGPSE1 in das *ppPSE1*-Gen stattgefunden hat, wurde sowohl über PCR-Experimente und sich anschließender Sequenzanalyse als auch durch Southern-Blot-Analyse überprüft.

PCR- und Sequenzanalyse

Für die PCR diente als Template genomische DNA der transgenen Linie *pse1* sowie des Wildtyps (WT), deren Isolierung wie in Kapitel 2.21 beschrieben erfolgte. Die verwendeten Primer wurden vom 5'- bzw. 3'-untranslatierten Bereich der *ppPSE1*-cDNA (PSEKO-F und PSEKO-R) und vom *nptII*-Gen (NPTN-R und NPTC-F) abgeleitet. Ihre genaue Lokalisation ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Bei den PCR-Experimenten konnte mit dem Primer-Paar PSEKO-F/NPTN-R lediglich aus genomischer DNA der Linie *pse1* ein Fragment amplifiziert werden (siehe Abbildung 3.17). Die gleichen Experimente mit genomischer Wildtyp-DNA fielen negativ aus. Die Größe des mit *pse1* gewonnenen Amplifikates entsprach mit ungefähr 0,9 kb der Größe, die man nach einer Substitution des *HindIII*-Fragmentes in der *ppPSE1*-cDNA erwarten würde. Dies deutet auf eine spezifische Integration der *nptII*-Kassette in das *ppPSE1*-Gen von *P. patens pse1* hin. Darüber hinaus zeigt die Größe des Amplifikates, dass sich in der unbekannten genomischen Sequenz zwischen dem 5'-untranslatierten Bereich, von dem der Primer KO1 abgeleitet wurde, und dem Beginn des offenen Leserahmens des *ppPSE1*-Gens kein Intron befindet. Dagegen konnte mit dem Primer-Paar PSEKO-R/NPTC-F weder mit genomischer DNA des Wildtyps noch mit der DNA von *pse1* ein Fragment amplifiziert werden. Neben methodischen Gründen könnte dies auf ein komplexeres Rekombinationsereignis am *ppPSE1*-Gen hindeuten. Alternativ bestünde die Möglichkeit, dass sich im 3'-untranslatierten Bereich der genomischen Sequenz ein langes Intron befindet, welches eine effiziente Amplifikation verhindert. Darüber hinaus ist es möglich, dass sich die Bindungsstelle des Primers PSEKO-R an einer Intron/Exon-Grenze befindet. Dies würde eine effiziente Hybridisierung des Primers PSEKO-R an die genomische DNA und somit eine Amplifikation verhindern.

Von der transgenen Linie *pse1* wurde das PSEKO-F/NPTN-R-Amplifikat kloniert und sequenziert. Ein Vergleich der Sequenz des PCR-Amplifikats mit den entsprechenden Regionen des Gen-Deletionskonstruktes (pGPSE1) ergab, dass diese über fast den gesamten Bereich identisch waren. Darüber hinaus enthielt das PCR-Amplifikat den stromaufwärts vom Startcodon gelegenen Bereich der *ppPSE1*-cDNA, den das Konstrukt pGPSE1 nicht enthielt. Dagegen fehlt dem PCR-Fragment der

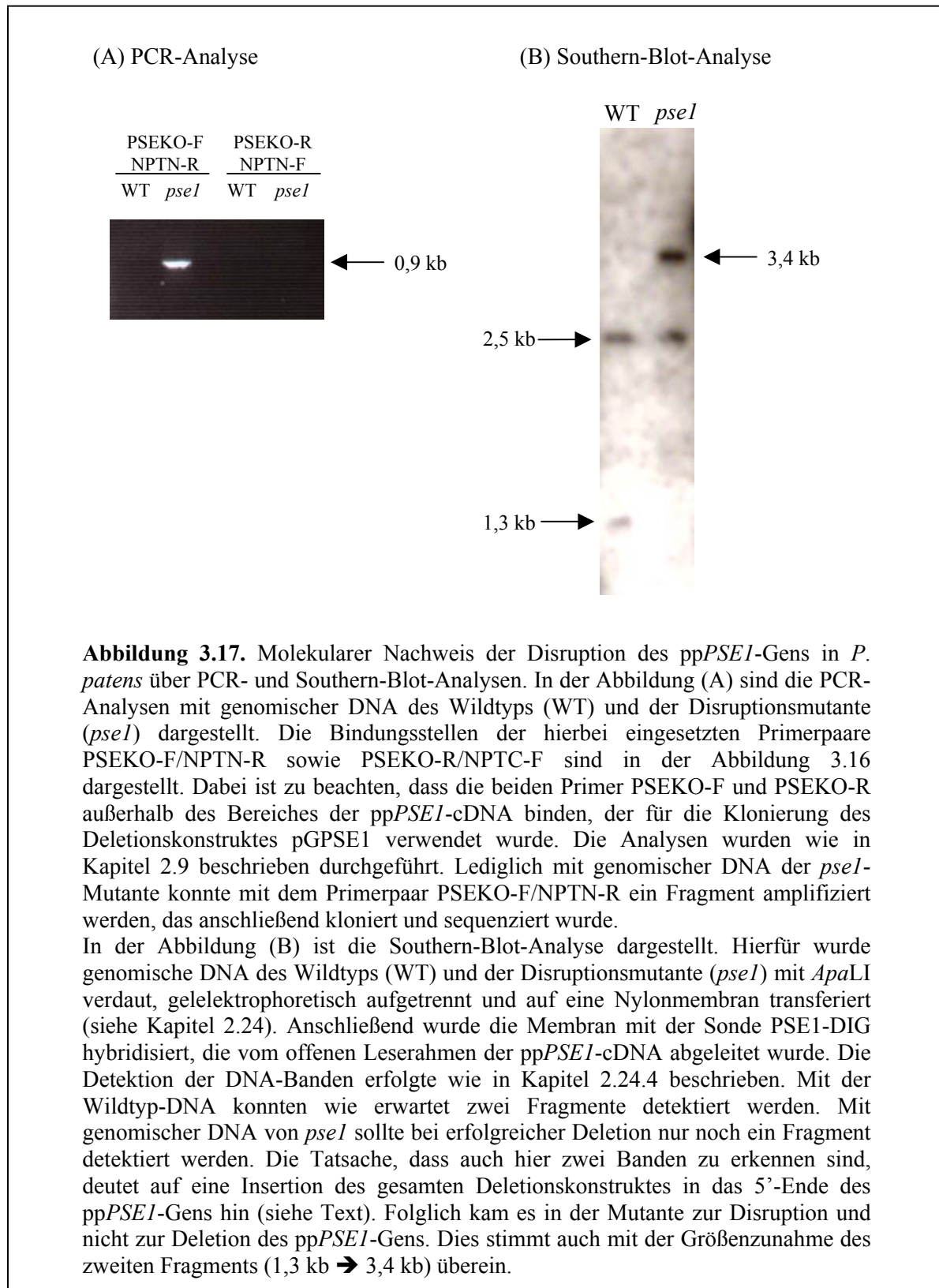
Teil, der bei der Klonierung des Deletionskonstruktes durch *HindIII*-Restriktion deletiert und durch die *nptII*-Kassette ersetzt worden war. Diese Daten belegen eindeutig, dass das transformierte Deletionskonstrukt mit dem 5'-Ende des *ppPSE1*-Gens rekombinierte und möglicherweise der *HindIII*-Bereich des Gens durch die *nptII*-Kassette ersetzt wurde.

Southern-Blot-Analyse

Zu diesem Zweck wurden jeweils 6 µg genomischer DNA der transgenen Linie *pse1* sowie des Wildtyps mit *ApaLI* verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kapitel 2.24). Durch Kapillar-Blot erfolgte anschließend der Transfer der restringierten DNA auf eine Nylonmembran, welche dann für die Hybridisierung mit der Sonde PSE1-DIG eingesetzt wurde (siehe Kapitel 2.24). Die Sonde PSE1-DIG ist dabei für den offenen Leserahmen der *PSE1*-cDNA spezifisch. Das Enzym *ApaLI* schneidet innerhalb der *PSE1*-cDNA ein Mal (siehe Abbildung 3.16), so dass für den Wildtyp bei der Southern-Hybridisierung mit PSE1-DIG zwei Banden erwarten werden. Da sich die *ApaLI*-Schnittstelle aber innerhalb des substituierten *HindIII*-Fragmentes von *ppPSE1* befindet, schneidet das Enzym nicht mehr innerhalb des Deletionskonstruktes. Bei vollständigem Ersatz des *ppPSE1*-Gens durch homologe Rekombination sollte somit für die transgene Linie *pse1* nur noch ein Fragment detektiert werden.

Das in Abbildung 3.17 dargestellte Lumigramm der *ApaLI*-verdauten DNA bestätigt das für den Wildtyp erwartete Ergebnis, da nur zwei Fragmente von 1,3 und 2,5 kb mit der Sonde PSE1-DIG hybridisieren. Dies zeigt, dass die Sonde PSE1-DIG mit keinen anderen Bereichen des Genoms von *P. patens* hybridisiert und folglich das *ppPSE1*-Gen nur einmal im haploiden Genom von *P. patens* vorkommt. Ein gleiches Ergebnis konnte mit *XbaI*-verdauter DNA des Wildtyps erzielt werden, bei der die Southern-Blot-Analysen unter geringeren Stringenzbedingungen durchgeführt wurden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den Elo-ähnlichen Proteinen um eine sehr heterogene Gruppe handelt, deren Sequenzen nur geringe Ähnlichkeiten zueinander aufweisen (siehe Kapitel 3.4.2), kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich im Genom von *P. patens* weitere Gene befinden, die zu dieser Gruppe gehören. Überraschenderweise wurden auch mit der *ApaLI*-verdauten genomischen DNA von *pse1* zwei Fragmente detektiert. Ein Fragment wies mit 2,5 kb die gleiche Größe auf wie eines der beiden mit dem Wildtyp detektierten Fragmente. Das zweite nach *ApaLI*-Restriktion gewonnene Fragment war mit 3,4 kb etwa 2,1 kb größer als das zweite Wildtyp-Fragment. Da die *ApaLI*-Schnittstelle in dem Klon *pse1* offensichtlich nicht deletiert wurde, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass nicht der gesamte Sequenzbereich des *ppPSE1*-Gens durch das Deletionskonstrukt ersetzt wurde. Vielmehr lassen die Ergebnisse die Vermutung zu, dass das Deletionskonstrukt in den 5'-Bereich des offenen Leserahmens des *ppPSE1*-Gens inserierte (wie durch die PCR- und Sequenzanalysen eindeutig belegt) und so eine Disruption des *ppPSE1*-Gens bewirkte. Übereinstimmend mit dieser Vermutung entspricht die Größenzunahme des detektierten Fragmentes

mit 2,1 kb in etwa der Größe des inserierten Deletionskonstruktes (siehe Abbildung 3.17). Solche Insertionen treten bei Rekombinationsereignissen in dem Moos mit etwa der gleichen Häufigkeit auf wie Deletionen, bei der das Zielgen durch das Deletionskonstrukt ersetzt wird (Schaefer, 2001). Wie die Konversion sollte aber auch die Insertion zu einem vollständigen Funktionsausfall des betroffenen Gens führen.



Die Rekombinationsrate in diesem Ansatz ist mit nur einem spezifischen Rekombinationsereignis am *ppPSE1*-Gen bei 89 G418-resistenten Moospflanzen sehr gering. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass es sich bei vielen Pflanzen um nicht-stabile Transformanten handelte. Eine andere Ursache könnte in den sehr kurzen homologen Sequenzabschnitten liegen, die die Selektionskassette flankieren. In anderen Disruptionsexperimenten mit *P. patens* konnten wesentlich höhere Rekombinationsraten erzielt werden. Bei der gezielten Zerstörung der Δ^6 -Desaturase zeigte die molekulare Analyse von fünf zufällig ausgewählten Transformanten, dass in allen ein spezifisches Rekombinationsereignis stattgefunden hatte. In diesem Ansatz wurden aber auch wesentlich längere genomische Sequenzabschnitte der Δ^6 -Desaturase für die Herstellung des Deletionskonstruktes verwendet (Girke *et al.*, 1998). In einem anderen Experiment wurde das *FTSZ1*-Gen deletiert, das für ein Tubulin kodiert und in die Teilung von Chloroplasten involviert ist (Strepp *et al.*, 1998). In diesem Ansatz stammten die homologen Sequenzabschnitte aus einer cDNA und waren wesentlich kürzer. Demzufolge konnte hier eine Rekombinationsrate von nur 14 % erzielt werden. Zwar können in dem Moos bereits Rekombinationsereignisse mit homologen Bereichen von nur 53-191 bp nachgewiesen werden, aber um höhere spezifische Rekombinationsraten zu erzielen, sind homologe Bereiche von 500-700 bp erforderlich (Schaefer, 2001). Die homologen Bereiche im Deletionskonstrukt *pGPSE1* waren mit 256 und 411 bp möglicherweise zu kurz, um eine hohe Rekombinationsrate zu erzielen. Darüber hinaus ergibt sich bei der Verwendung von cDNA-Fragmenten für die Klonierung von Deletionskonstrukten das Problem, dass die tatsächlichen homologen Bereiche aufgrund nicht bekannter Intronsequenzen in dem Ziel-Gen kürzer sind als die für die Klonierung verwendeten cDNA-Fragmente.

3.5.11.4 Analyse der Fettsäure-Profile von *P. patens* WT und *pse1*

Die ermittelten Fettsäureprofile des Wildtyps und der Deletionsmutante *pse1* sind in den Gaschromatogrammen der Abbildung 3.18 dargestellt, während die dazugehörigen Flächenprozentage der Signale in der Tabelle 3.12 aufgelistet sind. Die Identifizierung der Signale erfolgte wieder durch Vergleich ihrer Retentionszeiten mit denen bekannter Standards. Das Wildtyp-Moos akkumuliert wie erwartet große Mengen C_{20} -PUFAs mit $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ (22 %) als Hauptendprodukt der Biosynthese von VLC-PUFAs (Grimsley *et al.*, 1981). Darüber hinaus konnten geringe Mengen $20:2^{\Delta 11,14}$, $20:3^{\Delta 8,11,14}$ und $20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$ nachgewiesen werden (mit einem Anteil von je 1,1 %, 1,8 % bzw. 1,6 % an den Gesamtfettsäuren). Die beiden Substrate der Δ^6 -Elongase, $18:3^{\Delta 6,9,12}$ und $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$, waren hingegen nur in geringen Mengen vorhanden (1,6 % bzw. 0,1 %), was auf eine hohe Aktivität der Δ^6 -Elongase hindeutet.

Im Vergleich zum Wildtyp kam es in der Mutante *pse1* zu einem vollständigen Verlust der C_{20} -PUFAs. Dieser Verlust ging mit einer deutlichen Anhäufung von $18:3^{\Delta 6,9,12}$ und $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$ einher, welche die beiden Substrate der Δ^6 -Elongase darstellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Biosynthese

der C₂₀-PUFAs in der transgenen Pflanze komplett ausgefallen ist. Aufgrund der Veränderungen im Fettsäureprofil ist dies auf eine Reduktion der Elongation von 18:3^{Δ6,9,12} zu 20:3^{Δ8,11,14} und von 18:4^{Δ6,9,12,15} zu 20:4^{Δ8,11,14,17} zurückzuführen. Die Ursache für den Verlust der C₂₀-PUFAs in *pse1* liegt folglich in einem vollständigen funktionalen Ausfall der Δ⁶-Elongase.

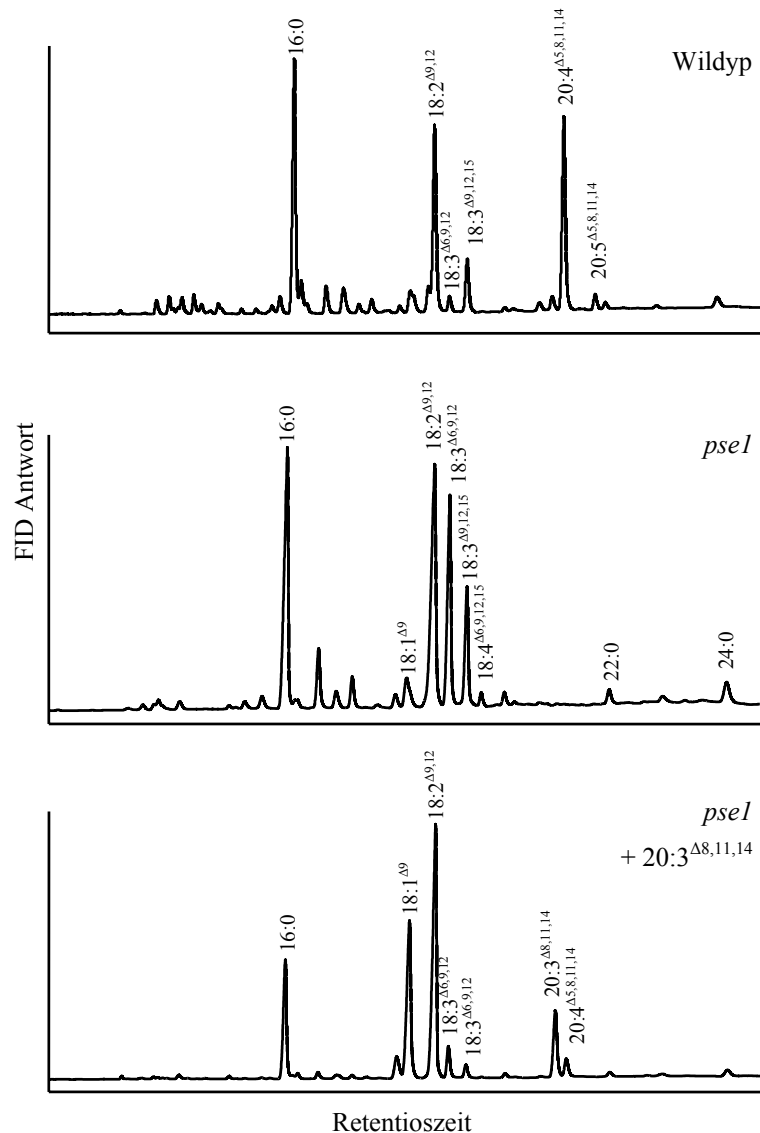


Abbildung 3.18. Fettsäure-Profile des *P. patens*-Wildtyps (WT) und der Disruptionsmutante (*pse1*). Die Fettsäuremethylester (FAMES) wurden durch saure Methanolyse aus 14 Tage alten Protonemakulturen gewonnen und über GLC analysiert. Das oberste Chromatogramm zeigt das Fettsäure-Profil des Wildtyps und das mittlere das Profil der Disruptionsmutante *pse1*. Das unterste Chromatogramm stellt das Fettsäure-Profil von *pse1* dar, welche in Gegenwart von 50 μM 20:3^{Δ8,11,14} kultiviert wurde. Die Flächenprozentage der detektierten FAMES der beiden oberen Chromatogramme sind in Tabelle 3.12 angegeben.

Der funktionale Ausfall der Δ^6 -Elongase in *pse1* ist direkt auf die spezifische Insertion des Disruptionskonstruktes in das 5'-Ende des *ppPSE1*-Gens zurückzuführen, wie bereits in der molekularen Analyse gezeigt werden konnte (siehe Kapitel 3.5.14). Zusammen mit den Ergebnissen aus den Expressionsexperimenten in *S. cerevisiae* (siehe Kapitel 3.5.2) ist es äußerst unwahrscheinlich, dass die veränderte Fettsäurezusammensetzung der *pse1*-Mutante auf regulatorische Unterschiede gegenüber dem Wildtyp zurückzuführen ist. Vielmehr belegt dies, dass *ppPSE1* für ein Protein kodiert, welches direkt an der Elongation von Δ^6 -PUFAs beteiligt ist.

Tabelle 3.12. Fettsäure-Zusammensetzung (in mol%) des *P. patens*-Wildtyps und der Disruptionsmutante *pse1*. Die angegebenen Werte entsprechen den Flächenprozenten der Signale in den beiden oberen Chromatogrammen der Abbildung 3.18.

Fettsäure	WT	<i>pse1</i>
16:0	25,2	23,3
18:0	0,8	1,3
18:1 ^{Δ^9}	2,0	3,9
18:2 ^{$\Delta^9,12$}	21,0	26,5
18:3 ^{$\Delta^6,9,12$}	1,6	17,5
18:3 ^{$\Delta^9,12,15$}	5,7	10,2
18:4 ^{$\Delta^6,9,12,15$}	0,1	1,2
20:2 ^{$\Delta^{11,14}$}	1,1	-
20:3 ^{$\Delta^8,11,14$}	1,8	-
20:4 ^{$\Delta^5,8,11,14$}	21,9	-
20:4 ^{$\Delta^5,8,11,14$}	1,6	-
Sonstige	17,2	16,1

Die Tatsache, dass die Disruption von *ppPSE1* zu einem Verschwinden aller C₂₀-PUFAs in der Mutante *pse1* führt, zeigt, dass im Moos nur ein einziges Elongationssystem vorhanden ist, welches für die Biosynthese der VLC-PUFAs verantwortlich ist und dessen Aktivität sowie Selektivität dabei durch das Genprodukt von *ppPSE1* bestimmt wird. Außerdem scheint diese durch *ppPse1* katalysierte Reaktion keine Redundanz aufzuweisen, wie es für die Δ^6 -Desaturierung aus *P. patens* gezeigt werden konnte (Girke *et al.*, 1998). Gesättigte VLCFAs sind dagegen in der Mutante weiterhin nachweisbar. Ihre Biosynthese erfolgt vermutlich durch andere Elongationssysteme, deren Spezifität möglicherweise durch die *KCS*-Genprodukte bestimmt wird (siehe Kapitel 3.3).

Um zu überprüfen, ob es in der Mutante *pse1* nur zu einem spezifischen Ausfall der Δ^6 -Elongase kam oder ob auch der Δ^5 -Desaturierungsschritt durch das Rekombinationsereignis betroffen war, wurden Fütterungsexperimente mit 20:3 ^{$\Delta^8,11,14$} durchgeführt. Hierzu wurde die Disruptionsmutante in Flüssigmedium in Gegenwart von 20:3 ^{$\Delta^8,11,14$} kultiviert, welches dem Medium in Form von Ammoniumsalzen in einer Endkonzentration von 50 μ M zugegeben wurde (siehe Kapitel 2.20). Das in Abbildung 3.18 im unteren Chromatogramm dargestellte Fettsäureprofil zeigt, dass die exogene

Fettsäure von dem Moos inkorporiert wurde. Darüber hinaus konnte eine weitere Fettsäure nachgewiesen werden, die die gleiche Retentionszeit wie 20:4^{Δ5,8,11,14} aufwies. Folglich führte die Disruption von *ppPSEI* nicht zu einem Verlust der Δ⁵-Desaturierungsaktivität. Die Δ⁵-Desaturase ist weiterhin in der Lage, 20:3^{Δ8,11,14} zu desaturieren. Allerdings ist die Aktivität, mit der die Δ⁵-Desaturase die exogene Fettsäure umsetzt, wesentlich geringer als die Umsatzrate mit der endogen synthetisierten 20:3^{Δ8,11,14}. Dies ist möglicherweise mit einer Kanalisierung der Fettsäure-Substrate von der Δ⁶-Desaturase zur Δ⁶-Elongase und weiter zur Δ⁵-Desaturase zu erklären, welche eine effiziente Produktion von 20:4^{Δ5,8,11,14} ermöglicht. Im Einklang hiermit können in dem Fettsäure-Profil des Wildtyps nur geringe Mengen der Intermediate (18:3^{Δ6,9,12} und 20:3^{Δ8,11,14}) dieses Biosyntheseweges nachgewiesen werden. Die Natur dieser Substratkanalisierung ist dabei unklar und wird in einem späteren Kapitel eingehender diskutiert (siehe Kapitel 3.7).

Nach den genetischen und biochemischen Analysen liegt die Frage nahe, ob der vollständige Verlust der C₂₀-PUFAs in der *pseI*-Mutante zu einem vom Wildtyp abweichenden physiologischen oder morphologischen Phänotyp führt. In der zuvor beschriebenen Deletionsmutante von *P. patens*, bei der das Gen für die Δ⁶-Desaturase deletiert worden war, konnten keine Veränderungen im Erscheinungsbild unter Phytokammer-Bedingungen nachgewiesen werden. Diese Mutante war aber weiterhin in der Lage, geringe Mengen 20:4^{Δ5,8,11,14} zu synthetisieren. Die Autoren postulieren hierbei, dass das Ausbleiben einer wahrnehmbaren Veränderung im Phänotyp möglicherweise auf diese Restmengen von 20:4^{Δ5,8,11,14} zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu führt die Disruption von *ppPSEI* in dem Moos zu einem vollständigen Verlust sämtlicher C₂₀-PUFAs. Dennoch weist die *pseI*-Mutante unter den in der Phytokammer vorherrschenden Bedingungen keine Veränderungen im makroskopischen Erscheinungsbild auf. Die Pflanze unterschied sich weder im Aussehen noch in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit auf Fest- oder in Flüssigmedien vom Wildtyp. Demzufolge kann den C₂₀-PUFAs keine essentielle Funktion für das normale Wachstum von *P. patens* zugeschrieben werden. Hierin unterscheiden sich die VLC-PUFAs signifikant von den gesättigten VLCFAs. Für *S. cerevisiae* führt eine Reduktion von gesättigten VLCFAs zu mehreren phänotypischen Veränderungen. Als Beispiele seien hier eine Veränderung der Struktur der Kernmembran sowie ein Defekt in der Sortierung GPI-verankerter Proteine zu nennen (siehe Kapitel 1.1.4). Zudem ist der vollständige Verlust von gesättigten VLCFAs für die Bäckerhefe letal (Dittrich *et al.*, 1998). Auch in höheren Pflanzen ist eine Reduktion von gesättigten VLCFAs mit einer starken Veränderung im Erscheinungsbild verbunden. Pflanzen mit einem Defekt in der Biosynthese von gesättigten VLCFAs in den Epidermiszellen akkumulieren geringere Mengen von Wachsen und Wachskristallen an ihrer Oberfläche und zeichnen sich zudem durch männliche Sterilität aus (Millar *et al.*, 1999). Darüber hinaus werden VLCFAs in den Schließzellen mit der Regulation der Entwicklung von Spaltöffnungen in Verbindung gebracht (Gray *et al.*, 2000).

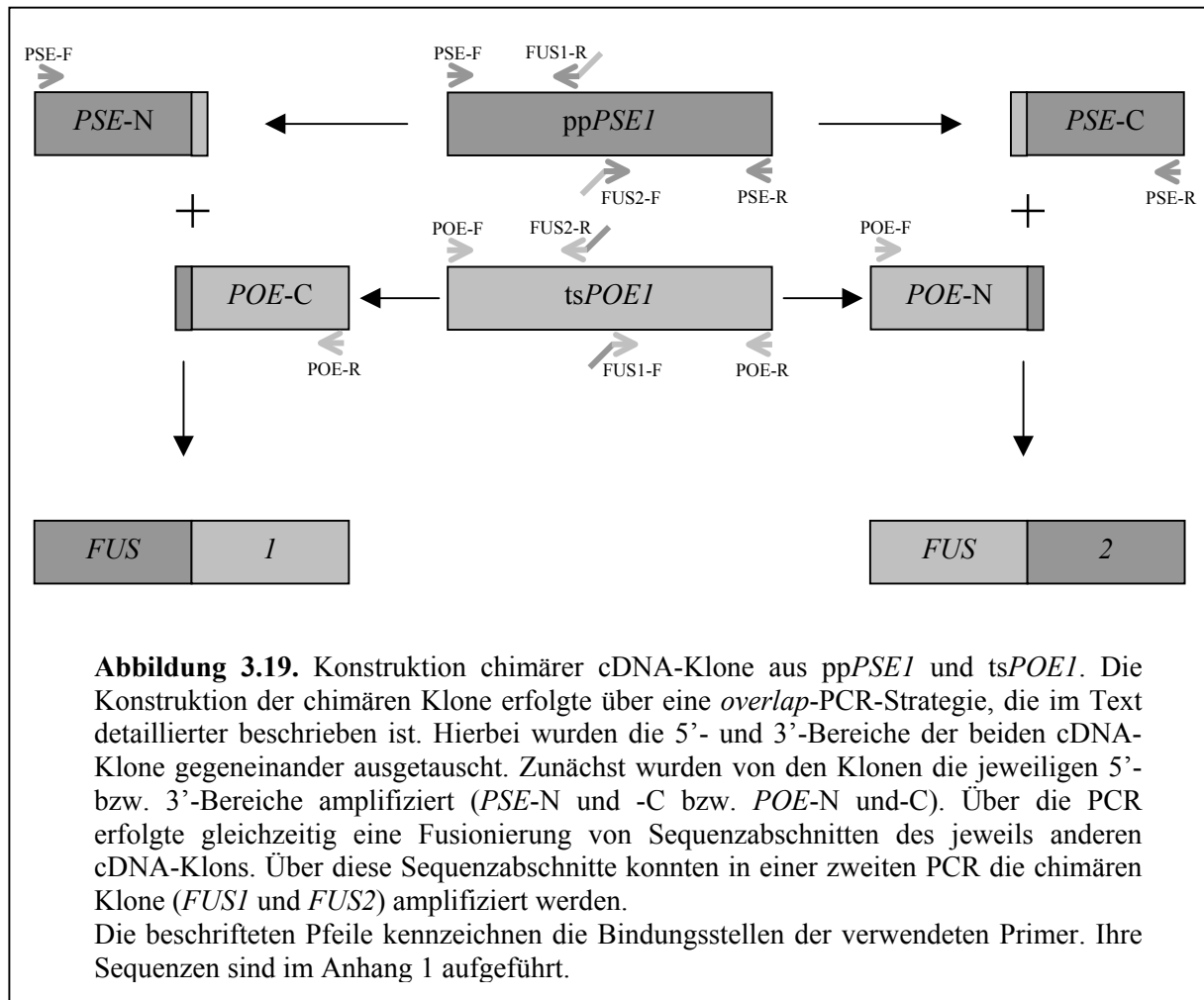
Zur Aufklärung der Funktion von VLC-PUFAs in Pflanzen gibt es bisher nur wenige Untersuchungen. Höhere Angiospermen enthalten in der Regel keine VLC-PUFAs, daher scheinen diese Fettsäuren nicht für ein Überleben in terrestrischen Lebensräumen notwendig zu sein. Algen, Moose und Farne synthetisieren dagegen VLC-PUFAs, aber eine Funktion konnte ihnen bisher nicht zugewiesen werden. In *P. patens* können die VLC-PUFAs v. a. in den Membranlipiden nachgewiesen werden (Grimsley *et al.*, 1981), wo sie möglicherweise eine strukturelle Funktion bei der Aufrechterhaltung der Membranintegrität wahrnehmen. Ein Verlust der C₂₀-PUFAs in den Membranen der *pse1*-Mutante von *P. patens* könnte möglicherweise durch C₁₈-PUFAs kompensiert werden und daher zu keiner sichtbaren Veränderung im Phänotyp unter den Phytokammer-Bedingungen führen. Um andere mögliche Funktionen von C₂₀-PUFAs in *P. patens* aufzudecken, ist es notwendig, das Wachstum, das Erscheinungsbild sowie verschiedene physiologische Prozesse in der Disruptionsmutante *pse1* unter verschiedenen Kulturbedingungen zu analysieren. Neben strukturellen Funktionen könnten den C₂₀-PUFAs in dem Moos auch spezifische Funktionen zugeschrieben werden. So ist es möglich, dass die C₂₀-PUFAs wie in den Säugetieren Vorstufen für Signalmoleküle (den Eicosanoiden) sind, die erst im Zuge der Antwort des Mooses auf Stressfaktoren synthetisiert werden. Ein den Eicosanoiden ähnlicher pflanzlicher Signalstoff ist z. B. die Jasmonsäure. Jasmonsäure ist ein pflanzlicher Wachstumsregulator mit einem ausgedehnten Wirkungsbereich (Creelman & Mullet, 1997). Sie wird aus der α -Linolensäure (18:3 ^{$\Delta^9,12,15$}) durch eine Reihe enzymatischer Reaktionen gebildet, die u. a. die Aktivität einer Lipxygenase erfordert. Um eine solche Involvierung der C₂₀-PUFAs in die Antwort von *P. patens* auf Stressfaktoren nachzuweisen, sind weitere Untersuchungen notwendig.

3.6 Weitergehende Versuche zur Charakterisierung der Elo-ähnlichen Proteine

3.6.1 Konstruktion chimärer Proteine

Mit ppPSE1 und tsPOE1 standen zwei cDNA-Klone zur Verfügung, die für Komponenten von Fettsäure-Elongasen unterschiedlicher Substratspezifitäten kodieren. Während ppPse1 spezifisch in die Elongation von Δ^6 -PUFAs involviert ist, führt die Expression von tsPOE1 in *S. cerevisiae* zur Elongation von 16:1 ^{Δ^9} . Zur Untersuchung der Frage, ob und welche Bereiche die Spezifität dieser Proteine determinieren, können chimäre Proteine eingesetzt werden. Hierbei wird ein bestimmter Teil eines Proteins durch den äquivalenten Teil eines Proteins anderer Substratspezifität ersetzt. Um solche chimären Proteine aus ppPse1 und tsPoe1 zu synthetisieren, wurde eine als *overlap*-PCR bezeichnete Strategie gewählt, die in Abbildung 3.19 schematisch dargestellt ist. In einem Ansatz wurde der N-terminale Teil von tsPoe1 durch den entsprechenden Teil von ppPse1 ersetzt (Fus1). Im anderen Ansatz wurde der N-terminal Teil von ppPse1 durch den entsprechenden Teil von tsPoe1 ersetzt (Fus2). Die Grenze zwischen N- und C-terminalem Bereich wurde dabei in der sehr konservierten Histidin-Box gewählt (siehe Kapitel 3.4.2), da vermutet wurde, dass diese Box in beiden Proteinen eine ähnliche Lage aufweist.

Für die Synthese von *FUS1* wurden in zwei ersten PCRs zunächst der entsprechende 5'-Bereich von der pp*PSE1*-cDNA (*PSE-N*) und der 3'-Bereich der ts*POE1*-cDNA *POE-C* amplifiziert. Die Fragmente wurde dabei so modifiziert, dass das 3'-Ende von *PSE-N* eine zum 5'-Endes von *POE1-C* identische Sequenz von 22 bp aufwies. Umgekehrt wurde dem 5'-Ende von *POE1-C* ein dem 3'-Ende von *PSE1-N* identische Sequenz von 27 bp angefügt. Insgesamt entstand so eine 49 bp lange Sequenz, die in beiden Fragmenten enthalten war. Bei der Synthese von *FUS2* erfolgte auf die gleiche Weise die Modifikation des 3'-Bereichs von pp*PSE1* (*PSE-C*) sowie des 5'-Bereichs von ts*POE1* (*POE-N*).



Die jeweils beiden Fragmente wurden aufgereinigt und anschließend in einer zweiten PCR als Template eingesetzt. Zunächst erfolgten 20 Zyklen aus Denaturierung, Renaturierung und Synthese in Abwesenheit zusätzlicher Primer. Hierdurch sollten die beiden Fragmente an den komplementären Überhängen hybridisieren und die fehlenden Sequenzen des jeweils anderen Fragments durch die Polymerase ergänzt werden, so dass es zu einer linearen Vervielfältigung der chimären Klone kam. Nach Zugabe von Primern, die an den jeweiligen 5'- und 3'-Enden der chimären Amplifikate binden und 25 weiteren PCR-Zyklen wurde schließlich die exponentielle Amplifizierung der Fragmente

erzielt. Die Primer enthielten wiederum Überhänge, die zu einer Schnittstelle zur Klonierung in den Vektor pYES2 (*KpnI* am 5'-Ende, *XbaI* am 3'-Ende) sowie am 5'-Ende die Hefe-Konsensussequenz für effiziente Translation enthielten. Die Fragmente wurden nach erneuter Aufreinigung und Restriktion in den *KpnI/XbaI*-geschnittenen Vektor pYES2 ligiert. Mit den so gewonnenen Expressionskonstrukten wurde schließlich *S. cerevisiae* INVSc1 transformiert und die Expression der chimären Klone wie in Kapitel 2.19 beschrieben durchgeführt. Um die Substratspezifität der beiden rekombinanten Proteine zu bestimmen, erfolgte die Expression der chimären Klone entweder in Abwesenheit von exogenen Fettsäuren (zur Messung der Aktivität gegenüber 16:1^{Δ9}) oder in Gegenwart von 500 μM 18:3^{Δ6,9,12} (dem von ppPse1p bevorzugten Substrat).

Leider führt die Konstruktion der chimären Proteine zu einem vollständigen Funktionsverlust der Enzyme. Dies trifft sowohl für Fus1 als auch für Fus2 zu. Weder das von tsPoe1 bevorzugte umgesetzte Substrat 16:1^{Δ9} noch die inkorporierte 18:3^{Δ6,9,12} wurden in den transgenen Hefen elongiert, die *FUS1* oder *FUS2* exprimierten. Folglich können anhand dieser Experimente keine Vermutungen getroffen werden, welche Bereiche innerhalb der Elo-ähnlichen Proteine ihre Substratspezifität bestimmen. Eine Ursache könnte in der unterschiedlichen Membrantopologie liegen, die für beide Proteine vorhergesagt wird (siehe Kapitel 3.4.2). Während ppPse1 sieben gleichmäßig über das Protein verteilte transmembrane Helices ausbildet, werden für tsPoe1 nur fünf solcher Membranhelices und ein hydrophiler zentraler Bereich vorhergesagt. Innerhalb dieses Bereichs liegt auch die konservierte Histidin-Box, die als Grenze zwischen den N- und C-terminalen Fragmenten bei der Synthese der Fusionsproteine gewählt wurde. Möglicherweise verhindert dieser Unterschied zwischen den beiden Proteinen eine korrekte Integration der chimären Proteine in die Membran oder die Ausbildung eines aktiven Zentrums.

In einem ähnlichen Ansatz konstruierten Libisch und Mitarbeiter chimäre Proteine aus der Δ^6 -Fettsäure-Desaturase und der Δ^8 -Sphingolipid-Desaturase von *Borago officinalis*, um spezifitätsbestimmende Regionen in der Δ^6 -Desaturase auszumachen. Durch funktionale Expression dieser Proteine in Hefe gelang es ihnen zu demonstrieren, dass die beiden N-terminalen transmembranen Helices der Δ^6 -Desaturase in die Bestimmung der Substratspezifität involviert sind. Aber auch hier ging der Austausch von Proteinbereichen der Δ^6 -Desaturase mit einem erheblichen Aktivitätsverlust einher (Libisch *et al.*, 2000). Cahoon und Mitarbeiter verwendeten eine andere Strategie zur Synthese chimärer Enzyme. Sie nutzten native oder eingefügte Restriktionsschnittstellen, um den zentralen Teil der Δ^6 -16:0-ACP-Desaturase aus *Thunbergia alata* durch den analogen Abschnitt der Δ^9 -18:0-ACP-Desaturase zu ersetzen (Cahoon *et al.*, 1997). In *in vitro* Assays konnten sie zeigen, dass dieser zentrale Bereich sowohl die Kettenlängenspezifität als auch die Position der eingefügten Doppelbindung determiniert. Gerichtete Mutagenisierung ermöglichte ihnen schließlich die Identifizierung einzelner spezifitätsbestimmender Aminosäure-Reste in diesem Bereich. Zusammen mit der Aufklärung der Kristallstruktur der Δ^9 -18:0-ACP-Desaturase aus *Ricinus communis* (Lindqvist

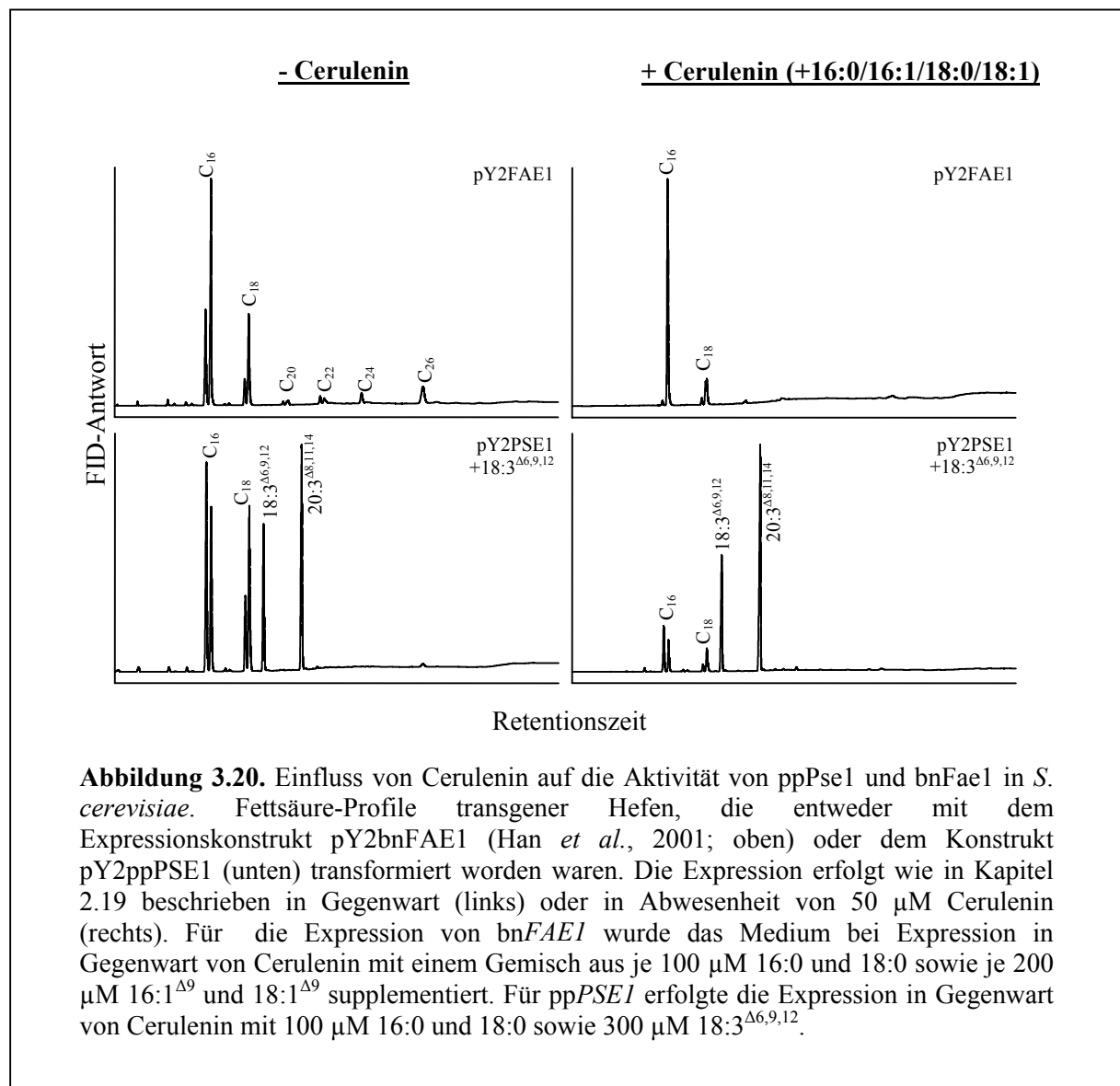
et al., 1996) gelang so ein eindrucksvolles Modell einer Substrattasche, an deren Boden Aminosäurereste die Kettenlängenspezifität der ACP-Desaturasen bestimmen. Die hydrophobe Natur der Elo-ähnlichen Enzyme und die damit einhergehenden Probleme bei der Proteinkristallisation beschränken die Möglichkeit, die Tertiärstruktur der Elongase-Proteine aufzuklären und ein ähnliches Modell zu entwickeln. Dennoch stellt die Konstruktion chimärer Proteine einen erfolgversprechenden Ansatz dar. So könnten in einem nächsten Versuch Enzymbereiche von Elo-Proteinen miteinander kombiniert werden, für die eine identische Membrantopologie vorhergesagt wird. Solche Proteine sind z.B. tsPoe1 und scElo1, für die beide 5 transmembrane Domänen vorhergesagt werden und die trotzdem in die Elongation verschiedener Fettsäuren involviert sind. Außerdem sollte sich die Synthese nicht auf den Austausch von C- und N-terminalen Bereichen beschränken, sondern auch auf den Ersatz interner Regionen ausweiten. Darüber hinaus stellt die gerichtete Mutagenese eine Möglichkeit dar, zu überprüfen, inwiefern konservierte Aminosäuren essentiell für die katalytische Aktivität der Elo-Proteine sind, wie dies bereits u.a. für verschiedene Desaturasen (Shanklin *et al.*, 1994; Avelange-Macherel *et al.*, 1995; Sayanova *et al.*, 1999; Sayanova *et al.*, 2001) und auch für eine β -Ketoacyl-CoA-Synthase (Ghanevati & Jaworski, 2001) erfolgte.

3.6.2 Einfluss von Cerulenin auf die Aktivität von Elo- und Kcs-ähnlichen Proteinen

Cerulenin, (2R)(3S)-2,3-Epoxy-4-oxo-7,10-dodecadienoylamid, ist ein Antibiotikum aus dem Pilz *Cephalosporium caeruleum* (Tomoda *et al.*, 1984), das die *de novo* Biosynthese von Fettsäuren in Bakterien, Hefen, Tieren und höheren Pflanzen inhibiert (Shimakata & Stumpf, 1983; Funabashi *et al.*, 1989; D'Agnolo *et al.*, 1973; Roberts & Leadlay, 1983). Aufgrund von Ergebnissen aus *in vitro*-Assays mit Membranpräparationen verschiedener Pflanzen konnte auch eine Hemmung der mikrosomalen Fettsäure-Elongation durch Cerulenin gezeigt werden (Agrawal *et al.*, 1984; Fehling *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 1993). Bei der Fettsäure-Biosynthese basiert die Wirkung von Cerulenin auf einer irreversiblen Hemmung der β -Ketoacyl-ACP-Synthase (KAS), die durch kovalente Bindung des Cerulenins mit der Sulfhydryl-Gruppe eines Cysteins im aktiven Zentrums erreicht wird (Roberts & Leadlay, 1983; Funabashi *et al.*, 1989). Auch für die pflanzliche Fettsäure-Elongation konnte eine direkte Hemmung des kondensierenden Enzyms gezeigt werden (Schneider *et al.*, 1993).

In einem Hefe-Expressionssystem sollte die Wirkung von Cerulenin auf die Aktivität von ppPse1 aus *P. patens* und bnFae1 aus *B. napus* untersucht werden. Das Gen bnFAE1 kodiert für eine samenspezifische β -Ketoacyl-CoA-Synthase einer Fettsäure-Elongase, die in Raps in die Elongation von 18:1 ^{Δ^9} involviert ist und nach Expression in Hefe zur Elongation von gesättigten (bis C₂₆) und einfach ungesättigten (bis C₂₂) Fettsäuren führt (Han *et al.*, 2001). Zu diesem Zweck wurden Expressionsexperimente mit transgenen Hefen durchgeführt, die entweder mit dem Leervektor pYES2, dem Expressionskonstrukt pY2ppPSE1 (siehe Kapitel 3.5.1) oder dem Expressionskonstrukt pY2bnFAE1 (Han *et al.*, 2001) transformiert worden waren. In zwei parallelen Ansätzen erfolgte die

Expression jeweils in Abwesenheit oder in Gegenwart von 50 μM Cerulenin. Im letzteren Fall wurde dem Medium eine Mischung aus gesättigten und einfach ungesättigten C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren zugefügt (Endkonzentrationen siehe Legende der Abbildung 3.20), um die gleichzeitige Hemmung der *de novo* Fettsäure-Biosynthese durch Cerulenin zu kompensieren. Die Expression von pY2ppPSE1 erfolgte zudem wiederum in Gegenwart von $18:3^{\Delta 6,9,12}$.



Die in Abbildung 3.20 dargestellten Chromatogramme zeigen die Fettsäureprofile der Hefen, die bnFAE1 und ppPSE1 exprimieren. Transgene Hefen, die die β -Ketoacyl-CoA-Synthase aus Raps mit bzw. ohne Cerulenin exprimieren, weisen erhebliche Unterschiede im Fettsäure-Profil auf. Während in Abwesenheit von Cerulenin eine deutliche Elongation der gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren zu erkennen ist, kann in Gegenwart von Cerulenin nur noch eine minimale Restaktivität

nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu scheint Cerulenin keinen Einfluss auf die Aktivität des rekombinanten ppPse1 zu haben. Sowohl mit als auch ohne Cerulenin werden über 50 % der inkorporierten 18:3^{Δ6,9,12} elongiert. Folglich konnte anhand dieser Experimente gezeigt werden, dass Cerulenin eine unterschiedliche Wirkung auf diese beiden Proteine hat. Während bnFae1 (als Vertreter der Kcs-Proteinfamilie) durch Cerulenin gehemmt wird, ist das rekombinante ppPse1 (als Vertreter der Elo-Proteinfamilie) insensitiv gegenüber dem Antibiotikum. Die Gründe für die verschiedenen Effekte auf die beiden Proteine könnten trivialer Natur sein und z. B. in einer unterschiedlichen Zugänglichkeit des Hemmstoffes zum aktiven Zentrum der jeweiligen Proteine liegen. So weisen auch die β -Ketoacyl-ACP-Synthasen KasI, KasII und KasIII der bakteriellen und plastidären Fettsäure-Synthase des Typs II eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Cerulenin auf. So ist KasI aus Spinat-Blättern mit einer 50%igen Hemmung in Gegenwart von 2 μ M Cerulenin am sensitivsten. Für die entsprechende Inaktivierung von KasII ist hingegen eine Hemmstoff-Konzentration von 50 μ M erforderlich (Shimakata & Stumpf, 1982). Dagegen ist KasIII aus *E. coli* und Spinatblättern, das die initiiierende Kondensation von Acetyl-CoA und Malonyl-ACP katalysiert, insensitiv gegenüber Cerulenin (Jackowski & Rock, 1987; Jaworski *et al.*, 1989). Möglicherweise liegt der Grund für die Insensitivität von KasIII gegenüber Cerulenin darin, dass das Antibiotikum aufgrund seiner Kettenlänge nicht in die Tasche des aktiven Zentrums passt und folglich das essentielle Cystein nicht erreicht.

Dennoch wird für alle drei Enzyme der Fettsäure-Biosynthese ein identischer Reaktionsmechanismus postuliert. Diese Reaktion umfasst drei distinkte Schritte (siehe Abbildung 1.6): Nukleophiler Angriff der Sulfhydryl-Gruppe eines Cysteins auf die Carbonyl-Gruppe von Acetyl-CoA oder Acyl-ACP unter Bildung des Acyl-Cystein-Thioesters, Decarboxylierung von Malonyl-ACP und schließlich die Bildung des β -Ketoacyl-ACPs durch nucleophilen Angriff des entstandenen Carbanions auf das Carbonyl-C-Atom des Thioesters des enzymgebundenen Acyl-Restes (Huang *et al.*, 1998; Abbadi *et al.*, 2000). Den β -Ketoacyl-CoA-Synthasen der Fettsäure-Elongasen ist wie den Kondensationsenzymen der Fettsäure-Synthasen ein konserviertes Cystein gemeinsam (siehe Kapitel 3.3.1). Ghanevati und Jaworski konnten durch gerichtete Mutagenese demonstrieren, dass dieses Cystein essentiell für die katalytische Aktivität der samenspezifischen β -Ketoacyl-CoA-Synthase Fae1p aus *A. thaliana* ist (Ghanevati & Jaworski, 2001). Dies deutet auf einen ähnlichen Reaktionsmechanismus bei den initiiierenden Kondensationsreaktionen der pflanzlichen Fettsäure-Elongation und der *de novo* Fettsäure-Biosynthese hin. Die Hemmung des rekombinanten bnFae1 in Hefe durch Cerulenin wäre somit möglicherweise auch auf eine kovalente Bindung an das Cystein im aktiven Zentrum zurückzuführen.

Dagegen kann in den Elo-ähnlichen Proteinen in der Primärstruktur kein konserviertes Cystein detektiert werden. Zusammen mit der Insensitivität von ppPse1 in Hefe gegenüber Cerulenin könnte dies auf einen Cystein-unabhängigen Reaktionsmechanismus hindeuten. Dies wirft die Frage nach einem alternativen Reaktionsmechanismus der Elo-ähnlichen Proteine auf, durch den ebenfalls ein β -

Ketoacyl-CoA entsteht (Moon *et al.*, 2001). Eine Möglichkeit bestünde in der kovalenten Bindung des Acyl-Restes an ein Serin. Ein solches Acyl-Enzym-Intermediat entsteht z. B. in der pflanzlichen Fettsäure-Biosynthese beim Transfer des Malonyl-Restes von Malonyl-CoA auf das Acyl-Carrier-Protein, welcher durch die Malonyl-CoA:ACP-Transacylase katalysiert wird (Ohlrogge & Browse, 1995). Mutagenisierungsexperimente mit KASIII aus *Cuphea wrightii*, in denen das Cystein durch ein Serin ersetzt wurde, zeigten tatsächlich, dass die Acylierung des Proteins dadurch nicht beeinträchtigt wird. Allerdings führte dies zu einem vollständigen Verlust der Kondensationsaktivität von KasIII (Abbadi *et al.*, 2000). Alternativ wäre es aber auch denkbar, dass die Elo-ähnlichen Proteine das Acyl-Substrat nicht kovalent binden. In einem solchen Fall könnten basische Aminosäure-Reste des aktiven Zentrums die Elektrophilie des Carbonyl-C-Atoms des Acyl-Substrates erhöhen und so einen nukleophilen Angriff durch das Carbanion ermöglichen. Um die Möglichkeit eines alternativen Reaktionsmechanismus zu überprüfen, sind auf jeden Fall weitere Untersuchungen mit anderen Proteinen dieser Proteinfamilie notwendig.

3.6.3 Konvergente Entwicklung der Kcs- und der Elo-Proteinfamilien

Aufgrund des derzeitigen Erkenntnisstandes und der hier präsentierten Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die initiiierende Kondensationsreaktion der Fettsäure-Elongation durch zwei unterschiedliche Enzymfamilien erfolgen kann, die keinerlei Sequenzähnlichkeiten aufweisen. Die Gene der als KCS bezeichneten Gruppe kodieren in Pflanzen für β -Ketoacyl-CoA-Synthasen und sind in die Elongation von gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren involviert. Diese Enzyme weisen Sequenzähnlichkeiten zu Proteinen auf, die in Pflanzen ebenfalls Kondensationsreaktionen bei der Fettsäure-Biosynthese oder der Biosynthese phenolischer Verbindungen katalysieren (Jaworski *et al.*, 1989; Schröder & Schröder, 1990). Ein konservierter und für die katalytische Aktivität essentieller Cystein-Rest sowie die in Kapitel 3.6.2 beschriebene Sensitivität von bnFaeI gegenüber Cerulenin deutet dabei auf einen Reaktionsmechanismus hin, der dem der Kas-Enzyme der Fettsäure-Biosynthese ähnlich ist (siehe Kapitel 1.2.2). In Pilzen und Tieren wird hingegen die spezifitätsbestimmende Reaktion der Fettsäure-Elongation durch die Elo-Proteine katalysiert. Im Gegensatz zu den Kcs-Proteinen werden durch Elo-ähnliche Proteine neben den gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren auch die PUFAs elongiert. Mit der Identifizierung von ppPseI als Komponente der Δ^6 -Elongase aus *P. patens* konnte in dieser Doktorarbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass in Pflanzen neben den Kcs-Proteinen auch Elo-Proteine in die Elongation von Fettsäuren involviert sind. Wie bei den Kcs-Proteinen entsteht durch die von den Elo-Proteinen katalysierte Reaktion ein β -Ketoacyl-CoA (Moon *et al.*, 2001). Möglicherweise erfolgt die Synthese dieses ersten Intermediates aber durch einen anderen Mechanismus als bei den Kcs-Proteinen, da weder ein in der Primärstruktur konserviertes Cystein noch eine Sensitivität gegenüber Cerulenin nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3.4.2 und 3.6.2).

Das in Abbildung 3.21 dargestellte Phylogramm wurde aus einem Aminosäure-Sequenzalignment Kcs- und der Elo-ähnlicher Proteine berechnet. Proteine, die in dieser Doktorarbeit charakterisiert wurden sowie einige funktional identifizierte Elongationsproteine aus anderen Organismen sind mit den entsprechenden Bezeichnungen gekennzeichnet. Die meisten anderen Proteine sind funktional noch nicht charakterisiert und stammen aus diversen genomischen Sequenzierungsprogrammen (u. a. *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *M. musculus*, *C. elegans*, *Leishmania major* und *A. thaliana*), wurden aber aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den beiden Proteinfamilien identifiziert. Die Accession-Nummern, mit denen die jeweiligen Sequenzen in die GenBank eingetragen wurden, sind im Anhang 4 aufgelistet. Sequenzen aus EST-Datenbanken sind nicht in den Sequenzvergleich einbezogen worden. Das Phylogramm verdeutlicht nochmals, dass die beiden Familien phylogenetisch keine Verwandtschaft zueinander aufweisen. Die beiden Proteinfamilien unterscheiden sich aber nicht nur in ihrer Primärstruktur sondern auch in ihrer Membrantopologie. Wie bereits in Kapitel 3.2.1 gezeigt, sind die Kcs-ähnlichen Proteine durch einen N-terminalen Anker in die Membran integriert, der sich aus 2 transmembranen Helices zusammensetzt (Abbildung 3.21, links unten). Dagegen handelt es sich bei den Elo-ähnlichen Enzymen um sehr hydrophobe Proteine. Sie bilden 5-7 transmembrane Helices aus, die sich über die gesamte Proteinsequenz erstrecken (siehe Kapitel 3.4.2 sowie Abbildung 3.21, rechts oben). Anders als bei den Desaturasen (Sperling & Heinz, 2001) können aufgrund von Sequenzähnlichkeiten innerhalb der Kcs- oder der Elo-Familie keine Rückschlüsse auf die Spezifität der Enzyme gezogen werden. Dies wird besonders durch das cePEA1-Gen deutlich, welches in *C. elegans* für eine Komponente der Δ^6 -Elongase kodiert. Dieses Protein fällt in dem Phylogramm in einen anderen Zweig als die beiden in dieser Doktorarbeit identifizierten Komponenten der Δ^6 -Elongasen aus *P. patens* und *P. infestans*. Die Spezifitäten drücken sich dementsprechend in Unterschieden aus, die in der Primärstruktur nicht eindeutig erkennbar sind.

Die Tatsache, dass die beiden Familien keinerlei Sequenzähnlichkeiten zueinander haben, deutet außerdem darauf hin, dass es sich um zwei monophyletische Gruppen handelt, die nicht aus einem gemeinsamen Ur-Gen entstanden sind. Die Entstehung von Enzymen unterschiedlicher Substratspezifitäten innerhalb der beiden Proteinfamilien könnte aber durchaus aus einem einzigen Ur-Gen erfolgt sein. Eine evolutionäre Entwicklung aus einem gemeinsamen Vorgänger wird z. B. für Gene diskutiert, die für Desaturasen unterschiedlicher Substratspezifität und Regioselektivität kodieren (Sperling & Heinz, 2001; Napier & Michaelson, 2001). Erste Voraussetzung hierfür ist die Duplikation von Genen, die anschließend unterschiedliche evolutionäre Entwicklungen durchmachen. Diese Vermutung wird durch die enge Nachbarschaft von Desaturase-Genen in dem Genom von *C. elegans* bestätigt (Napier & Michaelson, 2001). Solch eine enge Nachbarschaft konnte auch für die menschliche Δ^5 - und Δ^6 -Desaturase gezeigt werden (Leonard *et al.*, 2000), obwohl es sich hierbei um ein wesentlich komplexeres Genom handelt als bei *C. elegans*.

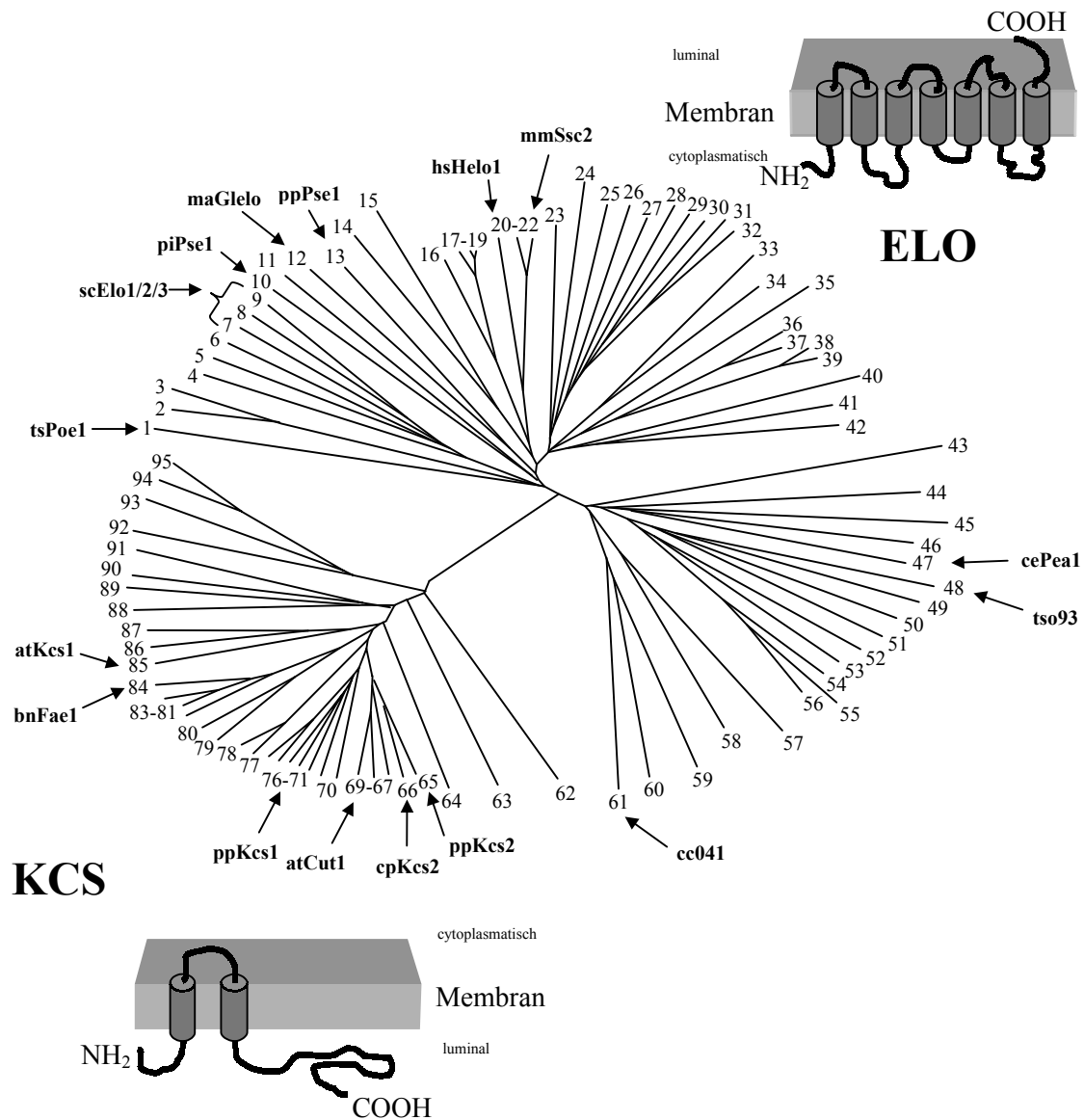


Abbildung 3.21. Phylogramm, das aus einem Aminosäure-Sequenzalignement von größtenteils funktional unidentifizierten Elo-ähnlichen (1-61) und Kcs-ähnlichen (62-95) Proteinen berechnet wurde. Die als Kcs-bezeichneten Proteine zeichnen sich dabei durch eine Verwandtschaft zu β -Ketoacyl-CoA-Synthasen aus, die in Pflanzen in die Elongation gesättigter und einfach ungesättigter Fettsäuren involviert sind. Die Elo-Proteine wurden dagegen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den Enzymen Elo1, Elo2 und Elo3 aus *S. cerevisiae* identifiziert. Beide Proteinfamilien weisen keinerlei Sequenzähnlichkeiten zueinander auf. Es ist hierbei hervorzuheben, dass Kcs-Proteine bisher ausschließlich in Pflanzen nachgewiesen wurden. Elo-Proteine sind dagegen bisher nur aus Hefen, Pilzen und Tieren charakterisiert worden. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Elo-Proteine auch in Pflanzen in die Elongation von Fettsäuren involviert sind. Die PUFA-Elongasen gehören zur Elo-Proteinfamilie. Die Accession-Nummern, mit denen die jeweiligen Proteine in die GenBank eingetragen wurden, sind im Anhang 4 aufgelistet. Einige Proteine, deren Funktionen nachgewiesen wurden, sind mit ihren jeweiligen Bezeichnungen gekennzeichnet. Die Herkunft dieser Proteine ist in den Legenden der Abbildungen 3.1 und 3.3 aufgeführt.

Darüber hinaus sind in der Abbildung schematisch die Membrantopologien von Kcs- (links unten) und Elo-Proteinen (rechts oben) dargestellt, wie sie durch das Programm TMHMM 2.0 vorhergesagt werden.

Aufgrund der nicht überlappenden Spezifität dieser Desaturasen scheint die Entwicklung in *C. elegans* und *H. sapiens* so weit vorangeschritten zu sein, dass tatsächlich neue hoch regiospezifische Desaturasen entstanden sind und dass dies nicht zu einer Redundanz der einzelnen Desaturierungsschritte führte. Im Gegensatz dazu ist nicht auszuschließen, dass die Redundanz der Δ^6 -Desaturierung im Moos *P. patens* (Girke *et al.*, 1998) auf einer solchen unspezifischen Restaktivität der bisher unidentifizierten Δ^5 -Desaturase beruht. So konnte kürzlich aus dem Zebrafisch *Danio rerio* ein cDNA-Klon isoliert werden, der nach Expression in Hefe sowohl zur Δ^6 -Desaturierung von C₁₈-PUFAs als auch zur Δ^5 -Desaturierung von C₂₀-PUFAs führte (Hastings *et al.*, 2001). Die evolutionäre Entwicklung von Proteinen unterschiedlicher Substratspezifitäten scheint auch innerhalb der Elo-Proteinfamilie auf ähnliche Weise erfolgt zu sein. So weisen auch die im Genom von *C. elegans* identifizierten zahlreichen *ELO*-ähnlichen Gene eine Tandem-Anordnung auf (Beaudoin *et al.*, 2000).

Neben dem Elo-ähnlichen ppPse1 konnten aus *P. patens* zwei Kcs-ähnliche Proteine isoliert werden. Auch wenn die Funktion dieser beiden Proteine nach heterologer Expression in *S. cerevisiae* nicht identifiziert werden konnte (siehe Kapitel 3.3.1), lässt die Existenz beider Proteinfamilien im Moos vermuten, dass beide Elongationssysteme in einem Organismus coexistieren. Auch im Genom von *A. thaliana* können neben zahlreichen und z.T. identifizierten Genen der KCS-Familie (siehe Kapitel 1.2.2) zwei *ELO*-ähnliche Gene detektiert werden, die wie die *ELO*-ähnlichen Gene in *C. elegans* in enger Nachbarschaft liegen. Dagegen kann aufgrund der abgeschlossenen genomischen Sequenzierungsprojekte von *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster* und *H. sapiens* ein Vorhandensein von Kcs-Proteinen in diesen nichtpflanzlichen Organismen ausgeschlossen werden. Auch die zahlreichen EST-Sequenzierungsprojekte nichtpflanzlicher Organismen führten bisher nicht zur Identifizierung von Kcs-Proteinen, wohingegen Vertreter beider Familien in pflanzlichen EST-Datenbanken (u. a. Mais, Baumwolle, Soja und Weizen) vorkommen. Möglicherweise ist die Kcs-Proteinfamilie auf Pflanzen beschränkt. Die Ursachen für die Coexistenz beider Genfamilien in Pflanzen sowie die möglichen unterschiedlichen Funktionen von Kcs- und Elo-Proteinen sind unklar. Ein hier vorgeschlagenes Modell basiert auf einer unterschiedlichen Verwendung der jeweiligen Elongationsprodukte. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden gesättigte VLCFAs zu geringen Anteilen in die Membranlipide eingebaut. Darüber hinaus werden sie in großen Mengen in den Epidermiszellen synthetisiert und für den Aufbau der Cuticula verwendet. Einige Ölsaaten akkumulieren zudem VLCFAs in ihren Speicherlipiden. Möglicherweise sind die Elo-Proteine für die Elongation von Fettsäuren verantwortlich, die anschließend in Membranlipide eingebaut werden. Wie aus Untersuchungen mit *S. cerevisiae* hervorgeht, sind gesättigte VLCFAs essentielle Komponenten eukaryoter Membranen (siehe Kapitel 1.1.4). Für Pflanzen würde dies eine konstitutive Expression der *ELO*-Gene in allen Pflanzenzellen implizieren. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, sind Elo-ähnliche Proteine auch für die Biosynthese von VLC-PUFAs verantwortlich, die ebenfalls u. a. in die Membranlipide inkorporiert werden. Der Aufbau der Cuticula und der Suberinsschicht sowie die

Biosynthese von Speicherlipiden in einigen Ölsaaten erfordert dagegen eine hohe Aktivität der Fettsäure-Elongasen in spezialisierten Geweben, um den Bedarf an gesättigten und/oder einfach ungesättigten VLCFAs zu decken. Für die Elongation dieser Fettsäuren könnten nach dem hier vorgeschlagenen Modell die Kcs-Proteine verantwortlich sein. Übereinstimmend hiermit ist die Expression verschiedener *KCS*-Gene auf bestimmte Pflanzengewebe beschränkt. So kodieren die *FAEI*-Gene aus *A. thaliana* und *B. napus* für samenspezifische β -Ketoacyl-CoA-Synthasen (Han *et al.* 2001; Rossak *et al.*, 2001), während Transkripte des *CUT1*-Gens ausschließlich in Epidermiszellen nachgewiesen werden können (Millar *et al.*, 1999). Die Expression des *HIC*-Gens, das ebenfalls für eine β -Ketoacyl-CoA-Synthase kodiert, ist in *A. thaliana* sogar ausschließlich auf die Schließzellen der Spaltöffnungen beschränkt (Gray *et al.*, 2000). Das Expressionsmuster der *ELO*-Gene ist in Pflanzen dagegen unbekannt. Weitere Untersuchungen über Northern-Blot- oder Mikroarray-Analysen sind notwendig, um ein Vorkommen von *ELO*-Transkripten in unterschiedlichen Pflanzengeweben zu bestätigen.

Interessanterweise führt die konstitutive Expression des *KCS*-ähnlichen *FAEI*-Gens aus *A. thaliana* in allen Zellen zu einer Akkumulation von VLCFAs in den Membranen (Millar *et al.*, 1998). Folglich scheint der normalerweise geringe Anteil der VLCFAs in den Membranen durch die Menge der synthetisierten VLCFAs und somit durch die Aktivität der Fettsäure-Elongasen limitiert zu sein. Dies könnte wiederum auf eine geringe Expression und/oder Aktivität der Elo-Proteine in den Pflanzen hindeuten. Dagegen ist in Zellen mit hohen Elongationsaktivitäten ein Ausschluss der VLCFAs aus den Membranen essentiell, da gezeigt wurde, dass die Akkumulation von gesättigten VLCFAs in Membranen zu einer gravierenden Veränderung in der Membranstruktur führt (Millar *et al.*, 1998). Die Entfernung der VLCFAs aus den Membranlipiden könnte zum einen durch spezifische Acyltransferasen oder Lipasen erreicht werden, die z. B. in den Samen von *Ricinus communis* auch einen Ausschluss der ungewöhnlicher Ricinolsäure (9-OH-18:0) aus den Membranlipiden gewährleisten (Frentzen, 1993; Ståhl *et al.*, 1995). Zum anderen ist in epidermalen Zellen aber auch eine Kanalisierung der elongierten Fettsäuren zu den Enzymen der Wachsbiosynthese denkbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle bisher charakterisierten pflanzlichen Kcs-Proteine in die Biosynthese gesättigter und/oder einfach ungesättigter VLCFAs involviert sind, die für die Produktion von Wachsen oder Speicherlipiden verwendet werden, die aber möglicherweise nicht in die Biosynthese von Membranlipiden eingehen. Elo-Proteine aus Hefen, Tieren und Pflanzen sind dagegen für die Biosynthese von gesättigten und einfach ungesättigten VLCFAs wie auch von VLC-PUFAs verantwortlich, die u. a. in Membranlipide eingebaut werden.

3.7 Zukunftsperspektiven

Zu Beginn dieser Doktorarbeit waren von den Enzymen, die in die Biosynthese von VLC-PUFAs involviert sind (siehe Abbildung 1.7), lediglich die Δ^6 - und die Δ^5 -Desaturase bekannt. Das Bindeglied zwischen den von diesen Enzymen katalysierten Reaktionen stellt die Elongation von $18:3^{\Delta 6,9,12}$ nach $20:3^{\Delta 8,11,14}$ dar. Verantwortlich für diesen Schritt ist die Δ^6 -Elongase, die sich aus vier Enzymaktivitäten zusammensetzt. Mit der Klonierung und Identifizierung der cDNA-Klone *ppPSE1* aus *P. patens* und *piPSE1* aus *P. infestans* als aktivitäts- und spezifitätsbestimmende Komponenten der Δ^6 -Elongase konnte in dieser Doktorarbeit das fehlende Glied im Biosyntheseweg von $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ geschlossen werden. Im gleichen Zeitraum gelang auch die Klonierung von Genen, die in *C. elegans* sowie *M. alpina* für homologe Proteine kodieren (Beaudoin *et al.*, 2000, Parker-Barnes *et al.*, 2000).

Die direkte Biosynthese von $22:6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ erfordert die zusätzliche Aktivität einer Δ^5 -Elongase und einer Δ^4 -Desaturase. Von diesen beiden Enzymen konnte bisher nur die Δ^4 -Desaturase aus *Thraustochytrium* sp. eindeutig identifiziert werden (Qiu *et al.*, 2001). Die Existenz einer spezifischen Δ^4 -Desaturase impliziert gleichzeitig das Vorhandensein einer Δ^5 -Elongase, die das Substrat für dieses Enzym zur Verfügung stellt. Leonard und Mitarbeiter konnten ein menschliches Gen identifizieren, das nach Expression in Hefe zur Elongation von $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ und $20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$ führt (Leonard *et al.*, 2000). Allerdings wies das Enzym ebenso hohe Aktivitäten mit anderen Fettsäuren wie $18:3^{\Delta 9,12,15}$ auf, deren Elongation bei der Synthese von PUFAs in Ölsaaten unterbleiben sollte. Darüber hinaus konnten Moon und Mitarbeiter mit dem Gen *mmSSC2* aus Maus in transgenen menschlichen Zelllinien eine spezifischere Elongation von C_{20} -PUFAs nachweisen (Moon *et al.*, 2001). Die eindeutige Identifizierung eines spezifischen Kondensationsenzym der Δ^5 -Elongase steht aber weiterhin aus.

Mit dem mittlerweile zur Verfügung stehenden Gen-Pool aus Δ^6 -Desaturasen, Δ^6 -Elongasen und Δ^5 -Desaturasen besteht aber die Möglichkeit einer Produktion von $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ und $20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$ in transgenen Ölsaaten wie Raps und Lein. Durch samenspezifische Co-Expression der Δ^{12} -Desaturase und der Δ^6 -Desaturase aus *M. alpina* konnte in *B. napus* bereits eine Synthese von $18:3^{\Delta 6,9,12}$ erzielt werden (Liu *et al.*, 2000). Diese neu synthetisierte Fettsäure akkumulierte dabei in den transgenen Pflanzen bis zu 45 % der Gesamtfettsäuren der Speicherlipide. Für die Synthese von $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ ist dagegen die zusätzliche Expression einer spezifitätsbestimmenden Komponente der Δ^6 -Elongase sowie einer Δ^5 -Desaturase erforderlich. Neben den sich daraus ergebenden Problemen bei der Klonierung, Transformation, gemeinsamen Integration und Expression aller transformierten Gene sind für die Verifizierung dieses Ziels vermutlich weitere, bisher unbekannte Faktoren zu berücksichtigen. Zum einen konnte bisher nicht gezeigt werden, dass heterolog exprimierte Elo-ähnliche Proteine in Pflanzen aktiv sind. Wie bereits in Kapitel 3.3.1 und 3.5.2 erwähnt, erfordert die Elongation von Fettsäuren in transgenen Hefen nicht nur die Aktivität des rekombinanten Kondensationsenzym. Gleichzeitig müssen die Nachfolgeenzyme der Hefe-Elongase das neu entstandene

Kondensationsprodukt als Substrat akzeptieren, um einen vollständigen Elongationszyklus zu gewährleisten. Aufgrund von Hefe-Expressionsexperimenten konnten neuartige Elongationsaktivitäten mit rekombinanten Proteinen sowohl der Elo- als auch der Kcs-Familie nachgewiesen werden (Leonard *et al.*, 2000; Parker-Barnes *et al.*, 2000; Beaudoin *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2001; Millar & Kunst, 1997). Auch in Pflanzen wird durch die alleinige Expression von KCS-Genen eine neue Elongationsaktivität erzeugt (Millar & Kunst, 1997). Für die Elo-Proteine konnte hingegen ein solcher Nachweis in Pflanzen noch nicht erbracht werden. Daher ist es notwendig die Aktivität dieser Proteine in pflanzlichen Expressionssystemen zu überprüfen.

Darüber hinaus muss für die Produktion von VLC-PUFAs in transgenen Pflanzen eine hohe Aktivität der rekombinanten Enzyme erzielt werden. Dies soll anhand eines kleinen Rechenbeispiels verdeutlicht werden. Für die Biosynthese von 22:6^{Δ4,7,10,13,16,19} sind ausgehend von 18:2^{Δ9,12} insgesamt 6 katalytische Schritte notwendig (siehe Kapitel 1.3.1). Die vier Teilreaktionen der Fettsäure-Elongation werden hierbei als ein Schritt betrachtet, da nur die erste Reaktion geschwindigkeitsbestimmend ist (Millar & Kunst, 1997). In Hoch-Linolsäure-Lein stehen mit 80 % 18:2^{Δ9,12} an den Gesamtfettsäuren große Mengen des Ausgangssubstrates zur Verfügung. Wenn nun jedes der 6 rekombinanten Enzyme im Lein ihr Substrat zu 50 % umsetzt, entstehen am Ende lediglich 1,25 % des Endproduktes 22:6^{Δ4,7,10,13,16,19}.

Ein weiteres Problem bei der Biosynthese von VLC-PUFAs in transgenen Ölsaaten stellt die Kooperativität der Enzyme des Biosynthesewegs von VLC-PUFAs dar. Dies wird durch die Ergebnisse von Domergue und Mitarbeitern verdeutlicht, die zeigen, dass die Elongation von 18:3^{Δ6,9,12} in transgenen Hefen, die ppPSE1 exprimieren, wesentlich von der Herkunft des 18:3-Substrates abhängt (Domergue *et al.*, 2001). In Hefen, die 18:3^{Δ6,9,12} durch die Aktivität einer rekombinanten Δ⁶-Desaturase aus *Phaeodactylum tricornutum* aus gefütterter 18:2^{Δ9,12} synthetisieren, ist der Umsatz, mit dem 18:3^{Δ6,9,12} durch ppPse1 elongiert wird, wesentlich niedriger, als wenn die Hefen direkt mit 18:3^{Δ6,9,12} gefüttert werden. Die gleiche Beobachtung lässt sich bei den Expressionsstudien von Beaudoin und Mitarbeitern machen, die durch Coexpression der Δ⁶-Desaturase und Δ⁶-Elongase aus *C. elegans* sowie der Δ⁵-Desaturase aus *M. alpina* ebenfalls den Biosyntheseweg von 20:4^{Δ5,8,11,14} und 20:5^{Δ5,8,11,14,17} in *S. cerevisiae* rekonstituieren konnten (Beaudoin *et al.*, 2000). Dies führte dazu, dass in den Hefen durch Coexpression der Δ⁶-Desaturase, der Δ⁶-Elongase-Komponente und der Δ⁵-Desaturase eine Akkumulation von 20:4^{Δ5,8,11,14} von nur 1 % erreicht wurde, obwohl in den Organismen (z. B. *M. alpina*), aus denen diese Gene isoliert wurden, C₂₀-PUFAs mit 20-30 % den Hauptanteil der Fettsäuren ausmachen (Yongmanitchai & Ward, 1989). In ihrem Artikel gingen die Autoren jedoch nicht auf dieses Phänomen ein.

Eine mögliche Ursache könnte in der unterschiedlichen Natur der Substrate der Δ⁶- und Δ⁵-Desaturase sowie der Δ⁶-Elongase liegen. Für viele Δ⁶- und Δ⁵-Desaturasen wird eine Wirkung auf Lipid-

gebundene Acyl-Substrate vermutet (Sperling & Heinz, 2001). Dagegen ist die Art des Substrates der Kondensationsenzyme von Elongasen noch unklar. Mit einer gereinigten β -Ketoacyl-CoA-Synthase aus *A. thaliana* konnte in einem *in vitro*-Enzymassay Kondensationsaktivität mit Acyl-CoA gemessen werden (Blacklock *et al.*, 2001). Für die Kondensationsenzyme der Elo-Proteinfamilie steht ein solcher Nachweis aber noch aus. Ein *in vitro*-Assay mit Mikrosomen transgener menschlicher Zelllinien, die Elo-ähnliche Proteine exprimieren, demonstrierte die Synthese eines β -Ketoacyl-CoAs aus Acyl-CoA (Moon *et al.*, 2001). Da es sich bei Mikrosomen aber um eine sehr komplexe Membranpräparation handelt, die zahlreiche Enzymaktivitäten enthält, ist eine eindeutige Identifizierung des Substrates hierdurch nicht möglich. Daher ist die Etablierung eines *in vitro*-Systems mit aufgereinigten Kondensationsenzymen der Elo-Familie (z. B. ppPse1 und piPse1) erforderlich, um die Natur des Substrates, den genauen Reaktionsmechanismus und die Notwendigkeit von Cofaktoren wie z. B. ATP für diese Proteine aufzuklären.

Wenn ppPse1 und piPse1 Acyl-CoAs als Substrat akzeptieren, erfordert die alternierende Wirkung von Desaturasen und Elongasen die Existenz einer zusätzlichen Aktivität, die die Acyl-Substrate in die jeweils notwendige Substratform, d.h. Lipid-gekoppelt oder mit CoASH verestert, überführt. Ein solches Enzym könnte die bisher noch nicht klonierte Lyso-PC-Acyltransferase (LPCAT) darstellen, die in einer reversiblen Reaktion Fettsäuren aus Acyl-CoAs mit der *sn*2-Position von Lyso-PC verestert (Choy *et al.*, 1992). Auch in *S. cerevisiae* konnte bereits eine solche Aktivität nachgewiesen werden (Richard & McMaster, 1998). Möglicherweise beschränkt eine geringe Aktivität der LPCAT mit PUFAs einen effizienten Austausch der neusynthetisierten Fettsäuren zwischen dem PC- und dem CoA-Pool und verhindert so eine hohe Akkumulation von C₂₀-PUFAs in den transgenen Hefen. Die Identifizierung und Klonierung von Genen, die in C₂₀- oder C₂₂-PUFA-produzierenden Organismen für eine solche Aktivität kodieren, sollte nach Co-Expression mit der Δ^6 - und Δ^5 -Desaturase sowie der Δ^6 -Elongase zu einer effizienteren Produktion von 20:4 ^{$\Delta^5,8,11,14$} in den transgenen Hefen führen. Ob die Situation in der Bäckerhefe auf die Pflanzen übertragbar ist, muss noch untersucht werden. So könnte die pflanzliche LPCAT eine größere Aktivität mit PUFAs aufweisen, so dass die alleinige Expression der Desaturasen und Elongasen für eine Akkumulation ausreicht. Die bei der Hefe-Expression auftretenden Probleme verdeutlichen aber, dass auch bei der gentechnischen Modifizierung von Ölsaaten Faktoren zu berücksichtigen sind, die auf den ersten Blick nicht erkennbar sind. Mit der Verfügbarkeit von Genen, die in die Biosynthese von VLC-PUFAs involviert sind, besteht aber nun die Möglichkeit, diese Faktoren zu identifizieren und zu analysieren.

4 Zusammenfassung

Höhere Pflanzen synthetisieren langkettige Fettsäuren mit 16 oder 18 Kohlenstoffatomen und bis zu vier Doppelbindungen sowie sehr langkettige Fettsäuren (VLCFAs) mit 20 oder mehr Kohlenstoffatomen und höchstens einer Doppelbindung. Dagegen sind u. a. viele Mikroorganismen, Moose, Farne und Gymnospermen in der Lage, zusätzlich sehr langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren (VLC-PUFAs) zu synthetisieren. Diese Fettsäuren haben eine Kettenlänge von 20 bzw. 22-Kohlenstoffatomen und enthalten vorwiegend 4 bis 6 Doppelbindungen. Aufgrund ihrer gesundheitsfördernden Wirkung sind VLC-PUFAs wie Arachidonsäure (20:4^{Δ5,8,11,14}) und Docosahexaensäure (22:6^{Δ4,7,10,13,16,19}) wichtige, aber seltene Bestandteile der menschlichen Nahrung, die hauptsächlich durch den Verzehr mariner Fische aufgenommen werden. Um der Gefahr einer zunehmenden Ausbeutung der Meere durch Überfischung vorzubeugen, werden seit einigen Jahren zahlreiche gentechnologische Anstrengungen unternommen, alternative Quellen für die Produktion von VLC-PUFAs zu entwickeln. Dies erfordert u. a. die Identifizierung und Isolierung von Genen, die in die Biosynthese von VLC-PUFAs involviert sind und die nach Expression in transgenen Ölsaaten zur Akkumulation dieser Fettsäuren führen sollen.

Für die Biosynthese von VLC-PUFAs aus C₁₈-PUFAs über Desaturierungen und Elongationen, werden neben den Desaturasen zwei verschiedene Fettsäure-Elongasen benötigt. Die Δ⁶-Elongase katalysiert die Elongation von C₁₈-PUFAs mit einer Δ⁶-Doppelbindung, während die Δ⁵-Elongase für die Elongation von C₂₀-PUFAs mit einer Δ⁵-Doppelbindung verantwortlich ist. Die Elongation von Fettsäuren erfolgt dabei in einem Reaktionszyklus aus vier Teilreaktionen, die denen der *de novo* Fettsäure-Biosynthese ähnlich sind. Die Teilreaktionen werden dabei durch verschiedene Enzyme katalysiert, die zusammen als Fettsäure-Elongase bezeichnet werden. Die Aktivität und Spezifität der Fettsäure-Elongasen wird durch die β-Ketoacyl-CoA-Synthase bestimmt, welche die initiiierende Reaktion des Elongationszyklus katalysiert. In Pflanzen werden diese Enzyme durch die *KCS*-Gene kodiert. In Hefen und Tieren sind dagegen die phylogenetisch mit den *KCS*-Genen nicht verwandten *ELO*-Gene für die Elongation von Fettsäuren verantwortlich.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten die unbekannten aktivitäts- und spezifitätsbestimmenden Komponenten von Δ⁶- und Δ⁵-Elongasen aus verschiedenen VLC-PUFA-produzierenden Organismen isoliert und charakterisiert werden. Zum einen wurden hierfür zwei PCR-Fragmente von Dr. Thomas Girke zur Verfügung gestellt, deren entsprechende cDNA-Klone durch die BASF Plant Science GmbH isoliert wurden. Zum anderen wurden 6 EST-Klone mit Sequenzähnlichkeiten zu den *KCS*- oder den *ELO*-Genen identifiziert. Die Isolierung der entsprechenden cDNA-Klone erfolgte teilweise durch die BASF Plant Science GmbH und teilweise im Rahmen dieser Doktorarbeit. Drei der acht kodierten Proteine aus den Moosen *Physcomitrella patens* und *Ceratodon purpureus* wiesen große

Sequenzähnlichkeiten zu pflanzlichen β -Ketoacyl-CoA-Synthasen auf (Kcs-ähnliche Proteine). Die anderen fünf Proteine aus *P. patens* sowie den Mikroorganismen *Phytophthora infestans*, *Thraustochytrium* sp. und *Cryptocodinium cohnii* waren dagegen den Elo-Proteinen aus *S. cerevisiae* ähnlich (Elo-ähnliche Proteine).

Um die Funktion der cDNA-Klone aufzuklären, wurden verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen erfolgte die Expression der offenen Leserahmen in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Zu diesem Zweck wurden die transgenen Hefen in Gegenwart verschiedener PUFAs kultiviert, die potentielle Substrate für die Δ^6 - bzw. Δ^5 -Elongase darstellen. Über diesen Ansatz erfolgte die funktionale Identifizierung von Elo-ähnlichen Proteinen aus *P. patens* und *P. infestans* als Komponenten der Δ^6 -Elongasen. In beiden Fällen führte die Expression zu einer Elongation von C₁₈-PUFAs. Während das Protein aus *P. patens* sehr spezifisch und selektiv nur die Δ^6 -PUFAs 18:3 ^{$\Delta^{6,9,12}$} und 18:4 ^{$\Delta^{6,9,12,15}$} als Substrate akzeptiert, ist das Protein aus *P. infestans* sowohl in die Elongation von Δ^6 -PUFAs als auch von Δ^9 -PUFAs (18:2 ^{$\Delta^{9,12}$} und 18:3 ^{$\Delta^{9,12,15}$}) involviert. Dagegen konnte für keines der beiden Proteine eine Aktivität mit C₂₀-PUFAs nachgewiesen werden, so dass sie keine Komponenten der Δ^5 -Elongase sind. Eine umfangreichere Analyse der Spezifität des Proteins aus *P. patens* ergab, dass die Positionen der Doppelbindungen in 18:3-PUFAs eine signifikante Determinante darstellt, inwieweit sie von dem Protein als Substrat akzeptiert werden. Je weiter der Block der drei methylenunterbrochenen Doppelbindungen in Richtung Methyl- oder Carboxylende der Fettsäuren verschoben ist, desto geringer ist die Rate, mit der diese Fettsäuren durch ppPseI elongiert werden. Dagegen scheint der Abstand der Doppelbindungen zueinander keinen großen Einfluss auf die Elongationsaktivität zu haben.

Neben diesen beiden Komponenten der Δ^6 -Elongase konnte ein Elo-ähnliches Protein aus *Thraustochytrium* sp. funktional identifiziert werden. Dieses Protein führt in *S. cerevisiae* zur Elongation von 15:1 ^{Δ^9} , 16:1 ^{Δ^9} und 17:1 ^{Δ^{10}} . Kürzer- und längerkettige einfach ungesättigte Fettsäuren sowie gesättigte Fettsäuren wurden aber nicht elongiert. Die Expression der drei Kcs-ähnlichen Proteine sowie der beiden Elo-ähnlichen Proteine ts093 aus *Thraustochytrium* sp. und cc041 aus *Cryptocodinium cohnii* ergab keinen Hinweis auf ihre mögliche Funktion.

In einem alternativen Ansatz zur Aufklärung der Funktion des Elo-ähnlichen Proteins aus *P. patens* wurde das entsprechende Gen in dem Moos durch Insertion eines Selektionsmarkers über homologe Rekombination zerstört. Zu diesem Zweck wurde ein Konstrukt hergestellt, in dem ein Teil des offenen Leserahmens der cDNA durch einen positiven Selektionsmarker ersetzt wurde. Die Transformation und Selektion wurde von Dr. Hauke Holtorf und Prof. Dr. Ralf Reski durchgeführt. Die Analyse der Fettsäureprofile von über 100 transformierten Moospflanzen führte zur Identifikation einer Mutante, die keine C₂₀-PUFAs (u. a. 20:4 ^{$\Delta^{5,8,11,14}$}) mehr synthetisierte. Dieser Verlust ging mit einer deutlichen Zunahme von 18:3 ^{$\Delta^{6,9,12}$} sowie 18:4 ^{$\Delta^{6,9,12,15}$} einher. Die molekulare Analyse zeigte,

dass diese Veränderung im biochemischen Phänotyp auf eine spezifische Insertion des gesamten Deletionskonstruktes in den 5'-Bereich des Gens zurückzuführen ist, welches für das Elo-ähnliche Protein kodiert. Somit wurde über diesen Ansatz die Funktion des Elo-ähnlichen Proteins als Komponente der Δ^6 -Elongase bestätigt. Interessanterweise führte der Verlust der C₂₀-PUFAs nicht zu einer Veränderung im makroskopischen Erscheinungsbild der Insertionsmutante, so dass eine essentielle Funktion von C₂₀-PUFAs für das Wachstum von *P. patens* unter den gewählten Bedingungen ausgeschlossen werden kann.

Mit der Isolierung des Elo-ähnlichen Proteins aus dem Moos *P. patens* gelang zum ersten Mal die Identifizierung und Charakterisierung einer Komponente der Δ^6 -Elongase aus einem pflanzlichen Organismus. Darüber hinaus konnte erstmals gezeigt werden, dass in Pflanzen neben den Kcs-ähnlichen Proteinen auch Elo-ähnliche Proteine in die Elongation von Fettsäuren involviert sind.

5 Literatur

- Aarts, M. G., Keijzer, C. J., Stiekema, W. J. & Pareira, A.** (1995) Molecular characterization of the CER1 gene of *Arabidopsis* involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *Plant Cell* **7**, 2115-2127
- Abbadì, A., Brummel, M., Schütt, B. S., Slabaugh, M. B., Schuch, R. & Spener, F.** (2000) Reaction mechanism of recombinant 2-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase III from *Cuphea wrightii* embryo, a fatty acid type II condensing enzyme. *Biochem. J.* **345**, 153-160
- Agrawal, V. P. & Stumpf, P. K.** (1985) Characterization and solubilization of an acyl chain elongation system in microsomes of leek epidermal cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **240**, 154-165
- Agrawal, V. P., Lessire, R. & Stumpf, P. K.** (1984) Biosynthesis of very long chain fatty acids in microsomes from epidermal cells of *Allium porrum* L. *Arch. Biochem. Biophys.* **230**, 580-589
- Aki, T., Shimada, Y., Inagaki, K., Higashimoto, H., Kawamoto, S., Shigeta, S., Ono, K. & Suzuki, O.** (1999) Molecular cloning and functional characterization of rat Δ^6 fatty acid desaturase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 575-579
- Allen, E. E., Facciotti, D. & Bartlett, D. H.** (1999) Monounsaturated but not polyunsaturated fatty acids are required for growth of the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9 at high pressure and low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1710-1720
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410
- Andersson, H., Kappeler, F. & Hauri, H. P.** (1999) Protein targeting to endoplasmatic reticulum by dilysine signals in addition to retrieval. *J. Biol. Chem.* **274**, 15080-15084
- Arao, T. & Yamada, M.** (1994) Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry* **35**, 1177-1181
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., Albright, L. M., Coen, D. M. and Varki, A.** (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons.
- Avelange-Macherel, M.-H., Macherel, D., Wada, H. & Murata, N.** (1995) Site directed mutagenesis of histidine residues in the Δ^{12} acyl-lipid desaturase of *Synechocystis*. *FEBS Lett.* **361**, 111-114
- Bagnat, M., Keränen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A. & Simons, K.** (2000) Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 3254-3259
- Bajpai, P. K., Bajpai, P. & Ward, O. P.** (1991) Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**, 509-514
- Bakken, A. M. & Farstad, M.** (1992) The activities of acyl-CoA:1-acyl-lysophospholipid acyltransferase(s) in human platelets. *Biochem. J.* **288**, 763-770
- Barrett, P. B. & Harwood, J. L.** (1998) Characterization of fatty acid elongase enzymes from germinating pea seeds. *Phytochemistry* **48**, 1295-1304

- Bau, X., Pollard, M., & Ohlrogge, J.** (1998) The Biosynthesis of erucic acid in developing embryos of *Brassica rapa*. *Plant Physiol.* **118**, 183-190
- Beaudoin, F., Michaelson, L. V., Hey, S. J., Lewis, M. J., Shewry, P. R., Sayanova, O. & Napier, J. A.** (2000). Heterologous reconstitution in yeast of the polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6421-6426
- Beeler, T. J., Fu, D., Rivera, J., Monaghan, E., Gable, K. & Dunn, T. M.** (1997) *SUR1* (*CSG1/BCL21*), a gene necessary for growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of high Ca^{2+} concentrations at 37 °C, is required for mannosylation of inositolphosphorylceramide. *Mol. Gen. Genet.* **255**, 570-579
- Beeler, T., Bacikova, D., Gable, K., Hopkins, L., Johnson, C., Slife, H. & Dunn, T.** (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* *TSC10/YBR265w* gene encoding 3-ketosphinganine reductase is identified in a screen for temperature-sensitive suppressors of the Ca^{2+} -sensitive *csg2Δ* mutant. *J. Biol. Chem.* **273**, 30688-30694
- Beeler, T., Gable, K., Zhao, C. & Dunn, T.** (1994) A novel protein, CSG2p, is required for Ca^{2+} regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269** 7279-7284
- Bernert, J. T., Jr. & Sprecher, H.** An analysis of partial reactions in the overall chain elongation of saturated and unsaturated fatty acids by rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **252**, 6763-6744
- Bernerth, R. & Frentzen, M.** (1990) Utilisation of erucoyl-CoA by acyltransferases from developing seeds of *Brassica napus* (L.) involved in triacylglycerol biosynthesis. *Plant Sci.* **67**, 21-28
- Bird, C. R. & Ray, J. A.** (1991) Manipulation of plant gene expression by antisense RNA. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **9**, 207-227
- Blacklock, B., Ghanevati, M. & Jaworski, J. G.** (2001) Substrate specificity of *Arabidopsis* 3-ketoacyl-CoA synthases. In NPLC symposium on biochemistry and molecular biology of plant glycerolipid biosynthesis, Abstract Book: P7, 25
- Bohn, M., Heinz, E. & L  thje, S.** (2000) Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots. *Arch. Biochem. Biophys.* **387**, 35-40
- Brough, C. L., Coventry, J. M., Christie, W. W., Kroon, J. T. M., Brown, A. R., Barsby, T. L. & Slabas, A. R.** (1996) Towards the genetic engineering of triacylglycerols of defined fatty acid composition: major changes in erucic acid content at the *sn*-2 position affected by the introduction of a 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Limnanthes douglasii* into oil seed rape. *Mol. Breed.* **2**, 133-142
- Brown, R. E.** (1998) Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *J. Cell Sci.* **111**, 1-9
- Browse, J. A., McCourt, P. J. & Somerville, C. R.** (1985) A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplast-specific lipid. *Science* **227**, 763-765
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M.** (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-glucosidase selection. *Biotechnology* **5**, 376-378
- Cahoon, E. B., Lindqvist, Y., Schneider, G. & 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., Marillia, E. F., Stecca, K. L., Hall, S. E., Taylor, D. C. & Kinney, A. J.** (2000) Production of fatty acid components of meadowfoam oil in somatic soybean embryos. *Plant Physiol.* **124**, 243-251
- Campbell, J. W. & Crownan, Jr., J. E.** (2001) Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug discovery. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 305-332
- Cavener, D. R. & Ray, S. C.** (1991) Eukaryotic start and stop translation sites. *Nucleic Acid Res.* **19**, 3185-3192
- Cho, H. P., Nakamura, M. & Clarke, S. D.** (1999b) Cloning, expression and fatty acid regulation of the human Δ^5 desaturase. *J. Biol. Chem.* **274**, 37335-37339
- Cho, H. P., Nakamura, M. T. & Clarke, S. D.** (1999a) Cloning, expression and nutritional regulation of the mammalian Δ^6 desaturase. *J. Biol. Chem.* **274**, 471-477
- Choi, J. Y., Stuke, J., Hwang, S. Y. & 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
- Moon, H., Smith, M. & Kunst, L.** (2001) A condensing enzyme from the seeds of *Lesquerella fendleri* that specifically elongates hydroxy fatty acids. *Plant Physiol.* **127**, 1635-1643
- Choy, P. C., Tardi, P. G. & Mukherjee, J. J.** (1992) Lysophosphatidylcholine acyltransferase. *Methods Enzymol.* **209**, 80-86
- Créach, A. & Lessire, R.** (1993) Solubilization of acyl-CoA elongases from developing rapeseed (*Brassica napus* L.). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 1129-1133
- Creelman, R. A. & Mullet, J. E.** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 355-381
- Cronan, J. E., Jr., Li, W. B., Coleman, R., Narasimhan, M., de Mendoza, D. & Schwab, J. M.** (1988) Derived amino acid sequence and identification of active site residues of *Escherichia coli* β -hydroxydecanoyl thioester dehydrase. *J. Biol. Chem.* **263**, 4641-4646
- D'Agnolo, G., Rosenfeld, I. S., Awaya, J., Omura, S. & Vagelos, P.** (1973) Inhibition of fatty acid synthesis by antibiotic cerulenin. *Biochim. Biophys. Acta* **326**, 155-166
- Dahlqvist, A., Ståhl, U., Lenman, M., Banas, A., Lee, M., Sandager, L., Ronne, H. & Stymne, S.** (2000) Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme catalyses the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6487-6492
- David, D., Sundarababu, S. & Gerst, J. E.** (1998) Involvement of long chain fatty acid elongation in the trafficking of secretory vesicles in yeast. *J. Cell Biol.* **143**, 1167-1182
- Dembitsky, V. M.** (1993) Lipids of bryophytes. *Prog. Lipid Res.* **32**, 281-356
- Demirkapi, N., Carreau, J. P. & Ghesquier, D.** (1991) Evidence against cytochrome *b*₅ involvement in liver microsomal fatty acid elongation. *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 49-56
- Depicker, A. & Montagu, M. V.** (1997) Post-transcriptional gene silencing in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 373-382

- Desfarges, L., Durrens, P., Juguelin, H., Cassagne, C., Bonneu, M. & Aigle, M.** (1993) Yeast mutants affected in viability upon starvation have a modified phospholipid composition. *Yeast* **9**, 267-277
- Dickson, R. C. & Lester, R. L.** (1999) Yeast sphingolipid. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 347-357
- Dickson, R. C.** (1998) Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison to mammals. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 27-48
- Dickson, R. C., Nagiec, E. E., Skrzypek, M., Tillman, P., Wells, G. B. & Lester, R. L.** (1997a) Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*. *J. Biol. Chem.* **272**, 30196-30200
- Dickson, R. C., Nagiec, E. E., Wells, G. B., Nagiec, M. M. & Lester, R. L.** (1997b) Synthesis of mannose-(inositol-P)₂-ceramide, the major sphingolipid in *Saccharomyces cerevisiae*, requires the *IPT1* (*YDR072c*) gene. *J. Biol. Chem.* **272**, 29620-29625
- Dickson, R. C., Wells, G. B., Schmidt, A. & Lester, R. L.** (1990) Isolation of mutant *Saccharomyces cerevisiae* strains that survive without sphingolipids. *Mol. Cell Biol.* **10**, 2176-2181
- Dittrich, F., Zajonc, D., Huhne, K., Hoja, U., Ekici, A., Greiner, E., Klein, H., Hofmann, J., Bessoule, J. J., Sperling, P. & Schweizer, E.** (1998) Fatty acid elongation in yeast. Biochemical characteristics of the enzyme system and isolation of elongation-defective mutants. *Eur. J. Biochem.* **252**, 477-485
- Domergue, F., Bessoule, J.-J., Moreau, P., Lessire, R. & Cassagne, C.** (1998) Recent advances in plant fatty acid elongation. In *Plant Lipid Biosynthesis*, (Harwood, J. L., ed.), Cambridge University Press, pp. 185-220
- Domergue, F., Chevalier, S., Santarelli, X., Cassagne, C. & Lessire, R.** (1999) Evidence that oleoyl-CoA and ATP-dependent elongation coexist in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Eur. J. Biochem.* **263**, 464-470
- Domergue, F., Lerchl, J., Zank, T. K. & Heinz, E.** (2001) *Phaeodactylum tricornutum* as a source of genes for implementation of polyunsaturated fatty acids in crops. In DGF symposium on plant lipid metabolism (Meisdorf, 2001), Abstract Book
- Donahue, T. F. & Cigan, A. M.** (1990) Sequence and structural requirements for efficient translation in yeast. *Methods Enzymol.* **185**, 366-372
- Dunn, T. M., Haak, D., Monaghan, E. & Beeler, T. J.** (1998) Synthesis of monohydroxylated inositolphosphorylceramide (IPC-C) in *Saccharomyces cerevisiae* requires Scs7p, a protein with both a cytochrome *b5*-like domain and a hydroxylase/desaturase domain. *Yeast* **14**, 311-321
- Evenson, K. J. & Post-Beittenmiller, D.** (1995) Fatty acid-elongating activity in rapidly expanding leek epidermis. *Plant Physiol.* **109**, 707-716
- Fan, Y.-Y. & Chapkin, R. S.** (1998) Importance of dietary γ -linolenic acid in human health and nutrition. *J. Nutr.* **128**, 1411-1414
- Fehling, E. & Mukherjee, K. D.** (1991) Acyl-CoA elongase from a higher plant (*Lunaria annua*): metabolic intermediates of very-long-chain acyl-CoA products and substrate specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **1082**, 239-246.
- Fehling, E., Lessire, R., Cassagne, C. & Mukherjee, K. D.** (1992) Solubilization and partial purification of constituents of acyl-CoA elongases from *Lunaria annua*. *Biochim. Biophys. Acta* **1126**, 88-94

- Fiebig, A. Mayfield, J. A., Miley, N. L., Chau, S., Fischer, R. L. & Preuss, D.** (2000) Alteration in *CER6*, a gene identical to *CUT1*, differentially affect long-chain lipid content on the surface of pollen and stems. *Plant Cell* **12**, 2001-2008
- Flaman, J. M., Frebourg, T., Moreau, V., Charbonnier, F., Martin, C., Ishioka, C., Friend, S. H. & Iggo, R.** (1994) A rapid PCR fidelity assay. *Nucleic Acids Res.* **22**, 3259-3260
- Frentzen, M.** (1993) Acyltransferases and triacylglycerols. In T. S. Moore, Jr., ed., *Lipid Metabolism in Plants*. CRC Press, pp. 195-231
- Froehlich, J. E., Benning, C. & Dörmann, P.** (2001) The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGD1 is inserted into the outer envelope membrane of chloroplasts in a manner independent of the general import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 31806-31812
- Funabashi, H., Kawaguchi, A., Tomoda, H., Omura, S., Okuda, S. & Iwasaki, S.** (1989) Binding site of cerulenin in fatty acid synthase. *J. Biochem. (Tokyo)* **105**, 751-755
- Gable, K., Slife, H., Bacikova, D., Monaghan, E. & Dunn, T. M.** (2000) Tsc3p is an 80-amino acid protein associated with serine palmitoyltransferase and required for optimal enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **275**, 7597-7603
- Gärtner, J.** (2000) Organelle disease: peroxisomal disorders. *Eur. J. Pediatr.* **159**(Suppl. 3), S236-S239
- Gärtner, J., Braun, A., Holzinger, A., Roerig, P., Lenard, H. G. & Roscher, A. A.** (1998) Clinical and genetic aspects of X-linked adrenoleukodystrophy. *Neuropediatr.* **29**, 3-13
- Geisbrecht, B. V., Zhu, D., Schulz, K., Nau, K., Morrell, J. C., Geraghty, M., Schulz, H., Erdmann, R. & Gould, S. J.** (1998) Molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Δ^3 - Δ^2 -enoyl-CoA isomerase. *J. Biol. Chem.* **273**, 33184-33191
- Gellerman, J. L. & Schlenk, H.** (1979) Methyl-directed desaturation of arachidonic to eicosapentaenoic acid in the fungus, *Saprolegnia parasitica*. *Biochim. Biophys. Acta* **573**, 23-30
- Ghanevati, M. & Jaworski, J. G.** (2001) Active-site residues of a plant membrane-bound fatty acid elongase β -ketoacyl-CoA synthase, FAE1 KCS. *Biochim. Biophys. Acta* **1530**, 77-85
- Girke, T.** (1998) Funktionale Charakterisierung einer neuartigen Desaturase aus *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. Dissertation, Universität Hamburg
- Girke, T., Schmidt, H., Zähringer, U., Reski, R. & Heinz, E.** (1998) Identification of a novel Δ^6 -acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. *Plant J.* **15**, 39-48
- Gonzalez, C. I. & 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
- Gray, J. G., Holroyd, G. H., van der Lee, F. M., Bahrami, A. R., Sijmons, P. C., Woodward, F. I., Schuch, W. & Hetherington, A. M.** (2000) The *HIC* signalling pathway links CO₂ perception to stomatal development. *Nature* **408**, 713-716
- Griffiths, G., Stobart, A. K. & Stymne, S.** (1988). Δ^6 - and Δ^{12} -desaturase activities and phosphatidic acid formation in microsomal preparations from the developing cotyledons of common borage (*Borago officinalis*). *Biochem. J.* **252**, 641-647

- Grimsley, N. H., Grimsley, J. M., & Hartmann, E.** (1981). Fatty acid compositions of mutants of the moss *Physcomitrella patens*. *Phytochemistry* **20**, 1519-1524
- Guillas, I., Kirchman, P. A., Chuard, R., Pfefferli, M., Jiang, J. C., Jazwinski, S. M. & Conzelmann, A.** (2001) C26-CoA-dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* is operated by Lag1p and Lac1p. *EMBO J.* **20**, 2655-2665
- Gunstone, F. D.** (1992) γ -Linolenic acid – occurrence and physical and chemical properties. *Prog. Lipid Res.* **31**, 145-161
- Haak, D., Gable, K., Beeler, T. & Dunn, T.** (1997) Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p. *J. Biol. Chem.* **272**, 29704-29710
- Hamamoto, T., Takata, N., Kudo, T. & 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
- Hamamoto, T., Takata, N., Kudo, T. & Horikoshi, K.** (1995) Characteristic presence of polyunsaturated fatty acids in marine psychrophilic vibrios. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**, 51-56
- Han, J., Lühs, W., Sonntag, K., Zahringer, U., Borchardt, D. S., Wolter, F. P., Heinz, E. & Frentzen, M.** (2001). Functional characterization of beta-ketoacyl-CoA synthase genes from *Brassica napus* L. *Plant Mol. Biol.* **46**, 229-239
- Hannoufa, A., Mcnevin, J. & Lemieux, B.** (1993) Epicuticular waxes of eceriferum mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **33**, 851-855
- Haschke, H. P., Kaiser, G., Martinoia, E., Hammer, U., Teucher, T., Dorne, A. J. & Heinz, E.** (1990) Lipid profiles of leaf tonoplasts from plants with different CO₂-fixation mechanisms. *Bot. Acta* **103**, 32-38
- Hastings, N., Agaba, M., Tocher, D. R., Leaver, M. J., Dick, J. R., Sargent, J. R. & Teale, A. J.** (2001) A vertebrate fatty acid desaturase with $\Delta 5$ and $\Delta 6$ activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14304-14309
- Hay, B. & Short, J. M.** (1992) ExAssist™ helper phage and SOLR™ cells for lambda ZAP II excision. *Strategies* **5**, 16-18
- Hechtberger, P., Zinser, E., Saf, R., Hummel, K., Paltauf, F. & Daum, G.** (1994) Characterization, quantification and subcellular localization of inositol-containing sphingolipids in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **225**, 641-649
- Hlousek-Radojcic, A., Evenson, K. J., Jaworski, J. G. & Post-Beittenmiller, D.** (1998) Fatty acid elongation is independent of acyl-Coenzyme A synthetase activities in leek and *Brassica napus*. *Plant Physiol.* **116**, 251-258
- Hlousek-Radojcic, A., Imai, H. & Jaworski, J. G.** (1995) Oleoyl-CoA is not an immediate substrate for fatty acid elongation in developing seeds of *Brassica napus*. *Plant J.* **8**, 803-809
- Hofmann, K., Bucher, P., Falquet, L. & Bairoch, A.** (1999) The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* **27**, 215-219
- Horrocks, L. A. & Yeo, Y. K.** (1999) Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol. Res.* **40**, 211-225

- Hovland, P., Flick, J., Johnston, M. & Sclafani, R. A.** (1989) Galactose as a gratuitous inducer of *GAL* gene expression in yeasts growing on glucose. *Gene* **83**, 57-64
- Huang, S. M., Bisogno, T., Petros, T. J., Chang, S. Y., Zavitsanos, P. A., Zipkin, R. E., Sivakumar, R., Coop, A., Maeda, D. Y., De Petrocellis, L., Burstein, S., Di Marzo, V. & Walker, J. M.** (2001) Identification of a new class of molecules, the arachidonyl amino acids, and characterization of one member that inhibits pain. *J. Biol. Chem.* **276**, 42639-42644
- Huang, W., Jia, J., Edwards, P., Dehesh, K., Schneider, G. & Lindqvist, Y.** (1998) Crystal structure of β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *E. coli* reveals the molecular architecture of condensing enzymes. *EMBO J.* **17**, 1183-1191
- Huang, Y. S., Chaudhary, S., Thurmond, J. M., Bobik, E. G., Jr., Yuan, L., Chan, G. M., Kirchner, S. J., Mukerji, P. & Knutzon, D.S.** (1999) Cloning of Δ^{12} - and Δ^6 -desaturases from *Mortierella alpina* and recombinant production of gamma-linolenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids* **34**, 649-659
- Hunt, A. G.** (1994) Messenger RNA 3'-end formation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 47-60
- Infante, J. P. & Huszagh, V. A.** (1997) On the molecular etiology of decreased arachidonic (20:4n-6), docosapentaenoic (22:5n-6) and docosahexaenoic (22:6n-3) acids in Zellweger syndrome and other peroxisomal disorders. *Mol. Cell. Biochem.* **168**, 101-115
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28
- Jackowski, S. & Rock, C. O.** (1987) Acetoacetyl-acyl carrier protein synthase, a potential regulator of fatty acid biosynthesis in bacteria. *J. Biol. Chem.* **262**, 7927-7931
- James, D. W. Jr., Lim, E., Keller, J., Plooy, I., Ralston, E. & Dooner, H. K.** (1995) Directed tagging of the *Arabidopsis* FATTY ACID ELONGATION1 (FAE1) gene with the maize transposon activator. *Plant Cell* **7**, 309-319
- Jamieson, G. R. & Reid, E. H.** (1976) The fatty acid composition of fern lipids. *Phytochemistry* **15**, 1731-1734
- Jang, G. F., McBee, J. K., Alekseev, A. M., Haeseleer, F. & Palczewski, K.** (2000) Stereoisomeric specificity of the retinoid cycle in vertebrate retina. *J. Biol. Chem.* **275**, 28128-28138
- Jaworski, J. G., Clough, R. C. & Barnum, S. R.** (1989) A cerulenin insensitive short chain 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase in *Spinacia oleracea* leaves. *Plant Physiol.* **90**, 41-44
- Jenkins, G. M. & Hannun, Y. A.** (2001) Role for *de novo* sphingoid biosynthesis in the heat-induced transient cell cycle arrest of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**, 8574-8581
- Johns, R. B. & Perry, G. J.** (1977) Lipids of the bacterium *Flexibacter polymorphus*. *Arch. Microbiol.* **114**, 267-271
- Johnson, R. W. & Fritz, E.** (1989) Fatty acids in industry. (New York: Marcel Dekker)
- Kaneda, T.** (1991) Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* **55**, 288-302

- Kang, Z. B., Ge, Y., Chen, Z., Cluette-Brown, J., Laposata, M., Leaf, A. & 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
- Karlsson, K. A.** (1989) Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 309-50
- Kendrick, A. & Ratledge, C.** (1992) Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Lipids* **27**, 15-20
- Kerstiens, G.** (1996) Signalling across the devide: a wider perspective of cuticular structure-function relationship. *Trends Plant Sci.* **1**, 125-129
- Khosla, C., Gokhale, R. S., Jacobsen, J. R. & Cane, D. E.** (1999) Tolerance and specificity of polyketide synthases. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 219-253
- Khozin, I., Adlerstein, D., Bigongo, C., Heimer, Y. M. & Cohen, Z.** (1997) Elucidation of the biosynthesis of eicosapentaenoic acid in the microalga *Porphyridium cruentum*. *Plant Physiol.* **114**, 223-230
- Knutzon, D. S., Thurmond, J. M., Huang, Y. S., Chaudhary, S., Bobik, E. G., Jr., Chan, G. M., Kirchner, S. J. & Mukerji, P.** (1998). Identification of Δ^5 -desaturase from *Mortierella alpina* by heterologous expression in Bakers' yeast and canola. *J. Biol. Chem.* **273**, 29360-29366
- Kohlwein, S. D., Eder, S., Oh, C. S., Martin, C. E., Gable, K., Bacikova, D. & Dunn, T.** (2001). Tsc13p is required for fatty acid elongation and localizes to a novel structure at the nuclear-vacuolar interface in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **21**, 109-125
- Kolattukudy, P. E.** (1980) Cutin, suberin and waxes. In *The Biochemistry of Plants*, P. K. Stumpf, E. E. Conn, eds., New York, Academic Press, pp. 571-645
- Kolattukudy, P. E., Rogers, L. M., Li, D., Hwang, C.-H. & Flaishman, M. A.** (1995) Surface signaling in pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4080-4087
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. L.** (2001) Predicting transmembrane topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**, 567-580
- Kyte, J. & Doolittle, R. F.** (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **5**, 105-132
- Laoteng, K., Mannontarat, R., Tanticharoen, M. & 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
- Lardizabal, K. D., Metz, J. G., Sakamoto, T., Hutton, W. C., Pollard, M. R. & Lassner, M. W.** (2000) Purification of a jojoba embryo wax synthase, cloning of its cDNA, and production of high levels of wax in seeds of transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **122**, 645-655
- Lassner, M. W., Lardizabal, K. & Metz, J. G.** (1996) A jojoba β -Ketoacyl-CoA synthase cDNA complements the canola fatty acid elongation mutation in transgenic plants. *Plant Cell* **8**, 281-292
- Lassner, M. W., Levering, C. K., Davies, H. M. & Knutzon, D. S.** (1995). Lysophosphatidic acid acyltransferase from meadowfoam mediates insertion of erucic acid at the *sn*-2 position of triacylglycerol in transgenic rapeseed oil. *Plant Physiol.* **109**, 1389-1394

- Leipelt, M., Warnecke, D., Zähringer, U., Ott, C., Müller, F., Hube, B. & Heinz, E. (2001) Glucosylceramide synthesis, a gene family responsible for the biosynthesis of glucosphingolipids in animals, plants and fungi. *J. Biol. Chem.* **276**, 33621-33629
- 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. & Mukerji, P. (2000). 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. & Mukerji, P. (2000) cDNA cloning and characterization of human Δ^5 -desaturase involved in the biosynthesis of arachidonic acid. *Biochem. J.* **347**, 719-724
- Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Laine, A. C., Gomord, V. & Faye, L. (1998) N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol. Biol.* **38**, 31-48
- Lessire, R. & Cassagne C. (1979) Long chain fatty acid CoA-activation by microsomes from *Allium porrum* epidermal cells. *Plant Sci. Lett.* **16**, 31-39
- Lessire, R., Bessoule, J.-J. & Cassagne, C. (1989) Involvement of a β -ketoacyl-CoA intermediate in acyl-CoA elongation by an acyl-CoA elongase purified from leek epidermal cells. *Biochim. Biophys. Acta* **239**, 35-40
- Lester, R. L., Wells, G. B., Oxford, G. & Dickson, R. C. (1993) Mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae* lacking sphingolipids synthesize novel inositol glycerophospholipids that mimic sphingolipid structures. *J. Biol. Chem.* **268**, 845-856
- Libisch, B., Michaelson, L. V., Lewis, M. J., Shewry, P. R. & Napier, J. A. (2000) Chimeras of Δ^6 -fatty acid and Δ^8 -sphingolipid desaturase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 779-785
- Lindqvist, Y., Huang, W., Schneider, G. & Shanklin, J. (1996) Crystal structure of Δ^9 -stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. *EMBO J.* **15**, 4081-4092
- Liu, J.-W., Huang, Y.-S., DeMichele, S., Bergana, M., Bobik, Jr., E., Hastilow, C., Chuang, L.-T., Mukerji, P. & Knutson, D. (2000) Evaluation of the seed oils from a canola plant genetically transformed to produce high levels of γ -linolenic acid. In *γ -Linolenic acid: Recent Advances in Biotechnology and Clinical Applications*, (Y.-S. Huang, V. A. Ziboh, eds.), AOCS press., Champaign, Illinois, pp. 61-71
- Lohr, D., Venkov, P. & Zlatanova, J. (1995) Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *FASEB J.* **9**, 777-787
- Loof, B. & Appleqvist, L. (1972) Plant breeding for improved yield and quality. In *Rapeseed*, (Appleqvist, L. & Ohlson, R., eds.), Amsterdam, Holland: Elsevier, pp. 101-122
- Lynch, D. V. (1993) Sphingolipids. In *Lipid Metabolism in Plants* (Moore, T.S., Jr., ed.). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 286-308
- Mao, C., Xu, R., Bielawska, A., Szulc, Z. M. & Obeid, L. M. (2000) Cloning and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* alkaline ceramidase with specificity for dihydroceramide. *J. Biol. Chem.* **275**, 31369-31378
- Mariani, C. & Wolters-Arts, M. (2000) Complex waxes. *Plant Cell.* **12**, 1795-1798

- Mekhedov, S., Martínez de Iláduya, O. & Ohlrogge, J.** (2000) Towards a functional catalog of the plant genome. A survey of genes for lipid biosynthesis. *Plant Physiol.* **122**, 389-401
- Metz, J. G., Pollard, M. R., Anderson, L., Hayes, T. R. & Lassner, M. W.** (2000) Purification of a jojoba embryo fatty acyl-coenzyme A reductase and expression of its cDNA in high erucic acid rapeseed. *Plant Physiol.* **122**, 635-644
- Metz, J. G., Roessler, P., Facciotti, D., Levering, F., Dittrich, F., Lassner, M., Valentine, R., Lardizabal, K., Domergue, F., Yamada, A., Yazawa, K., Knauf, V. & Browse, J.** (2001) Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eucaryotes. *Science* **293**, 290-293
- Michaelson, L. V., Lazarus, C. M., Griffiths, G., Napier, J. A. & 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. & Stobart, A. K.** (1998b). Functional identification of a fatty acid Δ^5 -desaturase gene from *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* **439**, 215-218
- Millar, A. A. & 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
- Millar, A. A., Clemens, S., Zachgo, S., Giblin, E. M., Taylor, D. C. & Kunst, L.** (1999) *CUT1*, an *Arabidopsis* gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *Plant Cell* **11**, 825-838
- Millar, A. A., Smith, M. A. & Kunst, L.** (2000) All fatty acids are not equal: discrimination in plant membrane lipids. *Trends Plant Sci.* **5**, 95-101
- Millar, A. A., Wrisher, M. & Kunst, L.** (1998) Accumulation of very-long-chain fatty acids in membrane glycerolipids is associated with dramatic alterations in plant morphology. *Plant Cell* **10**, 1889-1902
- Miwa, T. K.** (1971) Jojoba oil wax esters and derived fatty acids and alcohols: Gas chromatographic analyses. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **48**, 259-264
- Mongrand, S., Cassagne, C. & Bessoule, J.-J.** (2000) Import of lyso-phosphatidylcholine into chloroplasts likely at the origin of eukaryotic plastidial lipids. *Plant Physiol.* **122**, 845-852
- Moon, Y. A., Shah, N. A., Mohapatra, S., Warrington, J. A. & Horton, J. D.** (2001). Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 45358-45366
- Morita, N., Tanaka, M. & Okuyama H.** (2000) Biosynthesis of fatty acids in the docosahexaenoic acid-producing bacterium *Moritella marina* strain MP-1. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 943-945
- Moser, H. W.** (1997) Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain* **120**, 1485-1508
- Mosser, J., Douar, A. M., Sarde, C. O. Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A. M., Mandel, J. L. & Aubourg, P.** (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene share unexpected homology with ABC transporters. *Nature* **361**, 726-730
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A.** (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350

- Muñiz, M. & Riezman, H.** (2000) Intracellular transport of GPI-anchored proteins. *EMBO J.* **19**, 10-15
- Munro, S.** (1998) Localization of proteins to the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol.* **8**, 11-15
- Murata, N. & Tasaka, Y.** (1997) Glycerol-3-phosphate acyltransferases in plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1348**, 10-16
- Murata, N., Sato, N. & Takahashi, N.** (1984) Very-long-chain saturated fatty acids in phosphatidylserine from higher plant tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **795**, 147-150
- Murphy, D. J.** (1996) Engineering oil production rapeseed and other oil crops. *Trends Biotechnol.* **14**, 206-213
- Nagi, M., Cook, L., Prasad, M. R. & Cinti, D. L.** (1983) Site of participation of cytochrome *b*₅ in hepatic microsomal fatty acid chain elongation. Electron input in the first reduction step. *J. Biol. Chem.* **258**, 14823-14828
- Nagiec, M. M., Baltisberger, J. A., Wells, G. B., Lester, R. L. & Dickson, R. C.** (1994) The *LCB2* gene of *Saccharomyces* and the related *LCB1* gene encode subunits of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7899-7902
- Nagiec, M. M., Nagiec, E. E., Baltisberger, J. A., Wells, G. B., Lester, R. L. & Dickson, R. C.** (1997) Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by the *AUR1* gene. *J. Biol. Chem.* **272**, 9809-9817
- Nagiec, M. M., Wells, G. B., Lester, R. L. & Dickson, R. C.** (1993) A supressor 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. & Kanehisa, M.** (1992) A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* **14**, 897-911
- Napier, J. A., Hey, S. J., Lacey, D. J. & 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
- Napier, J. A. & Michaelson, L. V.** (2001) Genomic and functional characterization of polyunsaturated fatty acids biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Lipids* **36**, 761-766
- Nichols, D. S., Nichols, P. D., Russel, N. J., Davies, N. W. & McMeekin, T. A.** (1997) Polyunsaturated fatty acids in the psychrophilic bacterium *Shewanella gelidimarina* ACAM 456^T: molecular species analysis of major phospholipids and biosynthesis of eicosapentaenoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1347**, 164-176
- Nugteren, D. H.** (1965) The enzymatic chain elongation of fatty acids by rat-liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* **106**, 280-290
- Oh, C. S., Toke, D. A., Mandala, S. & Martin, C. E.** (1997). *ELO2* and *ELO3*, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* *ELO1* gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J. Biol. Chem.* **272**, 17376-17384
- Ohlrogge, J. & Browse, J.** (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 957-970

- Okayasu, T., Nagao, M., Ishibashi, T. & Imai, Y.** (1981) Purification and partial characterization of linoleoyl-CoA desaturase from rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **206**, 21-28
- Olsen, I. & Jantzen, E.** (2001) Sphingolipids in bacteria and fungi. *Anaerobe* **7**, 103-112
- Parker-Barnes, J. M., Das, T., Bobik, E., Leonard, A. E., Thurmond, J. M., Chaung, L. T., Huang, Y. S. & 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
- Pinto, W. J., Srinivasan, B., Shepherd, S., Schmidt, A., Dickson, R. C. & Lester, R. L.** (1992) Sphingolipid long-chain-base auxotrophs of *Saccharomyces cerevisiae*: genetics, physiology, and a method for their selection. *J. Bacteriol.* **174**, 2565-2574
- Pollard, M. R., McKeon, T., Gupta, L. M. & Stumpf, P. K.** (1979) Studies on biosynthesis of waxes by developing jojoba seed. II. The demonstration of wax biosynthesis by cell-free homogenates. *Lipids* **14**, 651-662
- Post-Beittenmiller, D.** (1996) Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* **47**, 405-430
- Poulos, A.** (1995) Very long chain fatty acids in higher animals – a review. *Lipids* **30**, 1-14
- Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G. & Davies, R. W.** (1993) A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev.* **7**, 974-985
- Pruitt, R. E., Vielle-Calzada, J.-P., Ploense, S. E., Grossniklaus, U. & Lolle, S. J.** (2000) *FIDDLEHEAD*, a gene required to suppress epidermal cell interactions in *Arabidopsis*, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1311-1316
- Pugh, E. L. & Kates, M.** (1977) Direct desaturation of eicosatrienoyl lecithin to arachidonoyl lecithin by rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **10**, 68-73
- Pugh, E. L. & Kates, M.** (1979) Membrane-bound phospholipid desaturases. *Lipids* **14**, 159-165
- Qi, B., Beaudoin, F., Fraser, T., Stobart, A. K., Napier, J. A. & Lazarus, C. M.** (2001) 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.* **25631**, 1-7
- Qiu, X., Hong, H. & MacKenzie, S. L.** (2001) Identification of a Δ^4 fatty acid desaturase from *Thraustochytrium* sp. involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*. *J. Biol. Chem.* **276**, 31561-31566
- Reggiori, F., Cenivenc-Gansel, E. & Conzelmann, A.** (1997) Lipid remodeling leads to the introduction and exchange of defined ceramides on GPI proteins in the ER and Golgi of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **16**, 3506-3518
- Reski, R. & Abel, W. O.** (1985) Induction of budding chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopenentenyladenine. *Planta* **165**, 354-358
- Richard, M. G. & McMaster, C. R.** (1998) Lysophosphatidylcholine acyltransferase activity in *Saccharomyces cerevisiae*: regulation by a high-affinity Zn^{2+} binding site. *Lipids* **33**, 1229-1234
- Riggs, K. G. & McLachlan, A.** (1986) A simplified screening procedure for large number of miniprep. *Biotechnology* **4**, 310-313

- Ringø, E., Sinclair, P. D., Birbeck, H. & Barbour, A.** (1992) Production of eicosapentaenoic acid (20:5n-3) by *Vibrio pelagius* isolated from turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3777-3778
- Roberts, G. & Leadlay, P. F.** (1983) [³H]Tetrahydrocerulenin, a specific reagent for radio-labelling fatty acid synthases and related enzymes. *FEBS Lett.* **159**, 13-16
- Rogers, S. O. & Bendich, A. J.** (1988) Extraction of DNA from plant tissue. In *Plant Molecular Biology Manual* (Gelvin, S.B., Schillerpoort, R.A. and Verma, D.P.S., eds.), Section A6. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 1-10
- Roscoe, T. J., Lessire, R., Puyaubert, J., Renard, M. & Delseny, M.** (2001) Mutations in the fatty acid elongation 1 gene are associated with a loss of β -ketoacyl-CoA synthase activity in low erucic acid rapeseed. *FEBS Lett.* **492**, 107-111
- Rossak, M., Smith, M. & Kunst, L.** (2001) Expression of the *FAEI* gene and *FAEI* promoter activity in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **46**, 717-725
- Rothstein, R.** (1991) Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol.* **194**, 72-77
- Russel, N. J. & Nichols, D. S.** (1999) Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria – a dogma rewritten. *Microbiology* **145**, 767-779
- Russell, N. J.** (1989) Functions of lipids: structural roles and membrane functions. In C. Ratledge, S. G. Wilkinson, eds. *Microbial Lipids*, vol. 2, Academic Press, 279-365
- Sakaki, T., Zähringer, U., Warnecke, D. C., Fahl, A., Knogge, W. & Heinz, E.** (2001) Sterol glycosides and cerebrosides accumulate in *Pichia pastoris*, *Rhynchosporium secalis* and other fungi under normal conditions or under heat shock and ethanol stress. *Yeast* **18**, 679-695
- Sakuradani, E., Kobayashi, M. & Shimizu, S.** (1999) Δ^6 -Fatty acid desaturase from an arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus. Gene cloning and its heterologous expression in a fungus, *Aspergillus*. *Gene* **238**, 445-53
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandager, L. & Stymne, S.** (2000) Characterisation of enzymes determining fatty acid chain length in developing seeds of *Limnanthes douglasii*. *J. Plant Physiol.* **156**, 617-622
- Sanger, F., Nickle, S. & Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
- Sayanova, O., Beaudoin, F., Libisch, B., Castel, A., Schewry, P. R. & 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., Shewry, P. R. & Napier, J. A.** (1999) Histidine-41 of the cytochrome *b₅* domain of borage Δ^6 -fatty acid desaturase is essential for enzyme activity. *Plant Physiol.* **121**, 641-646
- Sayanova, O., Smith, M. A., Lapinskas, P., Stobart, K. A., Dobson, G., Christie, W. W., Shewry, P. R. & 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 Δ^6 -desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4211-4216

- Schaefer, D. G. & Zryd, J. P.** (1997) Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.* **11**, 1195-1206
- Schaefer, D. G.** (2001) Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 143-150
- Schneider, F., Lessire, R., Bessoule, J. J., Juguelin, H. & Cassagne, C.** (1993) Effect of cerulenin on the synthesis of very-long-chain fatty acids in microsomes from leek seedlings. *Biochim. Biophys. Acta.* **1152**, 243-252
- Schneider, J. C. & Roessler, P.** (1994) Radiolabeling studies of lipids and fatty acids in *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), an oleaginous marine alga. *J. Phycol.* **30**, 594-598
- Schneider, J. C., Livne, A., Sukenik, A. & Roessler, P. G.** (1995) A mutant of *Nannochloropsis* deficient in eicosapentaenoic acid production. *Phytochemistry* **40**, 807-814
- Schneiter, R., Brugger, B., Sandhoff, R., Zellnig, G., Leber, A., Lampl, M., Athenstaedt, K., Hrastnik, C., Eder, S., Daum, G., Paltauf, F., Wieland, F. T. & Kohlwein, S. D.** (1999) Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **146**, 741-754
- Schneiter, R., Hitomi, M., Ivessa, A. S., Fasch, E.-V., Kohlwein, S. P. & Tartakoff, M.** (1996) A yeast acetyl coenzyme A carboxylase mutant links very-long-chain fatty acid synthesis to the structure and function of the nuclear membrane-pore complex. *Mol. Cell Biol.* **16**, 7161-7172
- Schneiter, R., Tatzer, V., Gogg, G., Leitner, E., & Kohlwein, S. D.** (2000). Elo1p-dependent carboxy-terminal elongation of C14:1^{Δ9} to C16:1^{Δ11} fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **182**, 3655-3660
- Schreiber, L., Skrabs, M., Hartmann, K., Becker, D., Cassagne, C. & Lessire, R.** (2000) Biochemical and molecular characterization of corn (*Zea mays* L.) root elongases. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 647-649
- Schröder J. & Schröder G.** (1990) Stilbene and chalcone synthases: related enzymes with key functions in plant-specific pathways. *Z. Naturforsch.* **45**, 1-8
- Scott, B. L. & Baznan, N. G.** (1989) Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2903-2907
- Seubert, W. & Podack, E. R.** Mechanism and physiological role of fatty acid chain elongation in microsomes and mitochondria. *Mol. Cell. Biochem.* **1**, 29-40
- Shanklin, J., Achim, C., Schmidt, H., Fox, B. G. & Münck, E.** (1997) Mössbauer studies of alkane ω-hydroxylase: Evidence for diiron cluster in an integral-membrane enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**
- Shanklin, J., Whittle, E. & 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
- Shimakata, T. & Stumpf, P. K.** (1982) Isolation and function of spinach leaf β-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5808-5812
- Shimakata, T. & Stumpf, P. K.** (1983) Purification and characterization of β-ketoacyl-ACP synthase I from *Spinacia oleracea* leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* **220**, 39-45

- Simons, K. & Ikonen, E.** (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572
- Simons, K. & van Meer, G.** (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**, 6197-202
- Sipos, G., Reggiori, F., Vionnet, C. & Conzelmann, A.** (1997) Alternative lipid remodelling pathways for glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **16**, 3494-3505
- Smith, S. W. & Lester, R. L.** (1974) Inositol phosphorylceramide, a novel substance and the chief member of a major group of yeast sphingolipids containing a single inositol phosphate. *J. Biol. Chem.* **249**, 3395-3405
- Somerville, C. & Browse, J.** (1991) Plant lipids: metabolism, mutants and membranes. *Science* **252**, 80-87
- Sperling, P. & Heinz, E.** (2001) Desaturases fused to their electron donor. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **103**, 158-180
- Sperling, P., Lee, M., Girke, T., Zähringer, U., Stymne, S. & Heinz, E.** (2000) A bifunctional Δ^6 -fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss *Ceratodon purpureus*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 3801-3811
- Sperling, P., Libisch, B., Zähringer, U., Napier, J. A. & Heinz, E.** (2001a) Functional identification of a Δ^8 -sphingolipid desaturase from *Borago officinalis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **388**, 293-298
- Sperling, P., Ternes, P., Moll, H., Franke, S., Zähringer, U. & Heinz, E.** (2001b) Functional characterization of sphingolipid C4-hydroxylase genes from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **494**, 90-94
- Sperling, P., Zähringer, U. & 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.* **19**, 219-231
- Spychalla, J. P., Kinney, A. K. & Browse, J.** (1997) Identification of an animal ω -3 fatty acid desaturase by heterologous expression in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1142-1147
- Ståhl, U., Banas, A. & Stymne, S.** (1995) Plant microsomal phospholipid acyl hydrolases have selectivities for uncommon fatty acids. *Plant Physiol.* **107**, 953-962
- Stefansson, B. R., Houghen, F. W. & Downey, R. K.** (1961) Note on the isolation of rape plants with seed oils free from erucic acid. *Can. J. Plant Sci.* **41**, 218-219
- Strepp, R., Scholz, S., Kruse, S., Speth, V. & Reski, R.** (1998). Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homolog of the bacterial cell division protein FtsZ, an ancestral tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4368-4373
- Stukey, J. E., McDonough, V. M. & Martin, C. E.** (1990). The *OLE1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the Δ^9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene. *J. Biol. Chem.* **265**, 20144-20149
- Stymne, S. & Stobart, 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

- Stymne, S. & Stobart, A. K.** (1986). Biosynthesis of gamma-linolenic acid in cotyledons and microsomal preparations of the developing seeds of common borage (*Borago officinalis*). *Biochem. J.* **240**, 385-393
- Suggs, S. V., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E. H., Johnson, M. J., Itakura, K. & Wallace, R. B.** (1981) Use of synthetic oligodesoxyribonucleotides for the isolation of cloned DNA sequences. In D. D. Brown, C. F. Fox, eds., *Developmental Biology Using Purified Genes*. Academic Press, pp. 683-693
- Sütterlin, C., Doering, T. L., Schimmoller, F., Schroder, S. & Riezman, H.** (1997) Specific requirements for the ER to Golgi transport of GPI-anchored proteins in yeast. *J. Cell Sci.* **110**, 2703-2714
- Tanaka, M., Ueno, A., Kawasaki, K., Yumoto, I., Ohgiya, S., Hoshino, T., Ishizaki, K., Okuyama, H. & Morita, N.** (1999) Isolation of clustered genes that are notably 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. & Jackson, M. R.** (1996) Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmatic reticulum and the Golgi apparatus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 27-54
- Tocher, D. R., Leaver, M. J. & Hodgson, P. A.** (1998) Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases. *Progr. Lipid Res.* **37**, 73-117
- Todd, J., Post-Beittenmiller, D. & Jaworski, J. G.** (1999). *KCS1* encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. J.* **17**, 119-130
- Toke, D. A. & Martin, C. E.** (1996). Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 18413-18422
- Tomoda, H., Kawaguchi, A., Omura, S. & Okuda, S.** (1984) Cerulenin resistance in a cerulenin-producing fungus II. Characterization of fatty acid synthetase from *Cephalosporium caerulens*. *J. Biochem. (Tokyo)* **95**, 1705-1712
- Trotter, P. J.** (2001) The genetics of fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Nutr.* **21**, 97-119
- Tvrđik, P., Westerberg, R., Silve, S., Asadi, A., Jakobsson, A., Cannon, B., Loison, G. & Jakobsson, A.** (2000) Role of a new mammalian gene family in the biosynthesis of very long chain fatty acids and sphingolipids. *J. Cell Biol.* **149**, 707-718
- van de Loo, F. J., Fox, B. G. & Somerville, C.** (1993) Unusual fatty acids. In T. S. Moore, Jr., ed., *Lipid Metabolism in Plants*. CRC Press, pp. 91-126
- Venkateswari, J., Kanrar, S., Kirti, P. B., Malathi, V. G. & Chopra, V. L.** (1999) Molecular cloning and characterization of *FATTY ACID ELONGATION1* (*bjFAE1*) gene in *Brassica juncea*. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* **8**, 53-55
- Verenet, T., Dignard, D. & Thomas, D. Y.** (1987) A family of yeast expression vectors containing the phage fl intergenic region. *Gene* **52**, 225-233
- Villena, J. F. Dominguez, E., Stewart, D. & Heredia, A.** (1999) Characterization and biosynthesis of non-degradable polymers in plant cuticles. *Planta* **208**, 181-187

- Vioque, J. & Kolattukudy, P. E.** (1997) Resolution and purification of an aldehyde-generating and an alcohol-generating fatty acyl-CoA reductase from pea leaves (*Pisum sativum* L.). *Arch. Biochem. Biophys.* **340**, 64-72
- von Wettstein-Knowles, P. M.** (1993) Waxes, cutin, and suberin. In *Lipid Metabolism in Plants*, (Moore, T. S. Jr., ed.). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 127-166
- Wada, M., Fukunaga, N. & Sasaki, S.** (1991) Aerobic synthesis of unsaturated fatty acids in a psychrophilic bacterium *Pseudomonas* sp. E-3, having two mechanisms for unsaturated fatty acid synthesis. *J. Genet. Appl. Microbiol.* **37**, 355-362
- Wallis, J. G. & Browse, J.** (1999) The Δ^8 -desaturase of *Euglena gracilis*: An alternate pathway for the synthesis of 20-carbon polyunsaturated fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 307-316
- Warnecke, D., Erdmann, R., Fahl, A., Hube, B., Muller, F., Zank, T., Zahringer, U. & Heinz, E.** (1999). Cloning and functional expression of *UGT* genes encoding sterol glucosyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*, and *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **274**, 13048-13059
- Watts, J. L. & Browse, J.** (1999) Isolation and characterization of a Δ^5 -fatty acid desaturase from *Caenorhabditis elegans*. *Arch. Biochem. Biophys.* **362**, 175-182
- Weier, D., Hanke, C., Eichelkamp, A. Lühs, W., Dettendorfer, J., Schaffert, E., Möllers, C., Friedt, W., Wolter, F. P. & Frentzen, M.** (1997) Trierucoylglycerol biosynthesis in transgenic plants or rapeseed (*Brassica napus* L.). *Fett/Lipid* **99**, 160-165
- Wells, G. B & Lester, R. L.** (1983) The isolation and characterization of a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* that requires a long chain base for growth and for synthesis of phosphosphingolipids. *J. Biol. Chem.* **258**, 10200-10203
- Wojciechowski, Z. A.** (1991) Biochemistry of phytosterol conjugates. In *Physiology and Biochemistry of Sterols*, (Patterson, G. W. & Nes, W. D., eds.) American Oil Chemists Society, pp. 361-395
- Wolff, R. L., Christie, W. W., Pedrono, F. & 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., Lavialle, O., Pedrono, F., Pasquier, E., Deluc, L. G., Marpeau, A. M. & Aitzetmüller, K.** (2001) Fatty acid composition of pinaceae as taxonomic markers. *Lipids* **36**, 439-451
- Wolff, R. L., Pedrono, F., Pasquier, E. & Marpeau, A. M.** (2000). General characteristics of *Pinus* spp. seed fatty acid compositions, and importance of Δ^5 -olefinic acids in the taxonomy and phylogeny of the genus. *Lipids* **35**, 1-22
- Wynn, J. P. & Ratledge, C.** (2000) Evidence that the rate-limiting step for the biosynthesis of arachidonic acid in *Mortierella alpina* is at the level of the 18:3 to 20:3 elongase. *Microbiology* **146**, 2325-2331
- Xia, Y., Nikolau, B. J. & Schnable, P. S.** (1997) Developmental and hormonal regulation of the *Arabidopsis CER2* gene that codes for a nuclear-localized protein required for the normal accumulation of cuticular waxes. *Plant Physiol.* **115**, 925-937
- Xu, X., Dietrich, C. R., Delledonne, M., Xia, Y., Wen, T. J., Robertson, D. S., Nikolau, B. J., Schnable, P. S.** (1997) Sequence analysis of the cloned *glossy8* gene of maize suggests that it may

code for a β -ketoacyl reductase required for the biosynthesis of cuticular waxes. *Plant Physiol.* **115**, 501-510

Yanisch-Perron, C., Vierra, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-109

Yazawa, K. (1996) Production of eicosapentaenoic acid from marine bacteria. *Lipids* **31**(Suppl.), S297-S300

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

Yongmanitchai, W. & Ward, O. P. (1989) Omega-3 fatty acids: alternative sources of production. *Proc. Biochem.* **24**, 117-125

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

Anhang 1. Sequenzen der Oligonucleotide, die im Rahmen dieser Doktorarbeit bei PCR-Experimenten eingesetzt wurden. In der Tabelle ist außerdem angegeben, ob es sich bei den Oligonucleotiden um Sense- (→) oder Antisense-Primer (←) handelte und von welchen DNA-Templates sie abgeleitet wurden. Nicht hybridisierende Bereiche der Primer sind unterstrichen. Die Schmelztemperaturen (T_m) wurden nach der Formel $T_m = 2^\circ\text{C} \Sigma(\text{dA} + \text{dT}) + 4^\circ\text{C} \Sigma(\text{dG} + \text{dC})$ berechnet (Suggs *et al.*, 1981).

Oligonucleotide			
Primer	Sequenz	T_m	Template
KCS1-F	→ <u>GGATCCACATAATGGCGCCATCGCCGATCC</u>	64°C	ppKCS1
KCS1-R	← <u>GGATCCTTAACTAACTTTTTGAATATCGTCC</u>	64°C	ppKCS1
KCS2-F	→ <u>GAATTCACATAATGTCGAGGCCCGCCCGGTG</u>	74°C	ppKCS2
KCS2-R	← <u>CTCGAGCTACGAGATATTCGCGTAAGTAGG</u>	70°C	ppKCS2
CPEX1-F1	→ <u>GGATCCACATAATGGGCACGAGCAGTGGCGATGGGAGGG</u>	86°C	cpKCS1
CPEX1-F2	→ <u>GGATCCACATAATGTCGCGCCCGCGCCGGT</u>	72°C	cpKCS1
CPEX1-R	← <u>GGATCCCTAGGAGATGTTAGCATAGGTG</u>	68°C	cpKCS1
PPEX-F	→ <u>GGATCCACATAATGGAGGTCGTGGAGAGATTC</u>	64°C	ppPSE1
PPEX-R	← <u>GAATCCTCACTCAGTTTTAGCTCCCTTTTGC</u>	72°C	ppPSE1
PIEX-F	→ <u>CGGGGTACCACATAATGTCGACTGAGCTACTGCAG</u>	64°C	piPSE1
PIEX-R	← <u>CACTAGTCTAGATTACAACCTTCTTCTTCGATTCC</u>	60°C	piPSE1
TS1EX-F	→ <u>ACATAATGATGGAGCCGCTCGACAGGTAC</u>	76°C	tsPOE1
TS1EX-R	← <u>CTATGCCTTCTTGGTTTTTGC</u>	72°C	tsPOE1
TS2EX-F1	→ <u>GGATCCACATAATGGTCATTTTCGGGCTCGACCTTC</u>	78°C	ts093
TS2EX-F2	→ <u>GGATCCACATAATGAAGTTCGACACTGCCGAAGTTG</u>	74°C	ts093
TS2EX-R	← <u>CTCGAGTTAGTTTGTCTTCTTGGCCGCGGCGT</u>	84°C	ts093
CCEX-F	→ <u>ACATAATGGTCTACGCTGCCAGAAGACC</u>	72°C	cco41
CCEX-R	← <u>TCACTTGAGGTGCTTGGCTACC</u>	68°C	cco41
NPT1-F	→ <u>GGTTCTTTTTGTCAAGACCGACC</u>	68°C	nptII
NPT1-R	← <u>GTCGGTCTTGACAAAAAGAACC</u>	64°C	nptII
NPT2-F	→ <u>TCGTGCTTTACGGTATCGCC</u>	62°C	nptII
NPT2-R	← <u>GCGATACCGTAAAGCACGAGGAAG</u>	74°C	nptII
KCSKO-F	→ <u>ATGGCGCCATCGCCGATCC</u>	64°C	ppKCS1
KCSKO-R	← <u>TTAACTAACTTTTTGAATATCGTCC</u>	64°C	ppKCS1
PSEKO-F	→ <u>GAGCTGCTTCGTCTCATCTTGGG</u>	72°C	ppPSE1
PSEKO-R	← <u>ACTTGCAGACCACGCCACAC</u>	68°C	ppPSE1
PPDIG-F	→ <u>GAAAGCAGCTCGAGAGGAGGCCCGAG</u>	86°C	ppPSE1
PPDIG-R	← <u>GTATGCAAGCTCGTACCAGATCGAAG</u>	78°C	ppPSE1
PIDIG-F	→ <u>CACACCATCATGTACACTTACTAC</u>	68°C	piPSE1
PIDIG-R	← <u>CAACTTCTTCTTCGATTCTCCAC</u>	70°C	piPSE1
TSDIG-F	→ <u>ATGAGCGTGCATAACCTCGGGCTC</u>	76°C	tsPOE1
TSDIG-R	← <u>CTATGCCTTCTTGGTTTTTGC</u>	68°C	tsPOE1
CCDIG-F	→ <u>ATGACACATGACCGAGAAGAGG</u>	66°C	cco41
CCDIG-R	← <u>TCACTTGAGGTGCTTGGCTACC</u>	68°C	cco41
FUS1-F	→ <u>GAAGCGCAGCACCAGGCAAATAAGCTTCCTGCACGTCTTGACCACGCCAC</u>	88°C	tsPOE1
FUS1-R	← <u>CCAAAAGGTGCGTGGCGTGGTGCAAGACCTGCAGGAAGCTTATTTGCCTGGTG</u>	66°C	ppPSE1
FUS2-F	→ <u>GCTCCTCATCGTCAAGGGCAACAAGCTCCGCTTCCTCCACGTTTATCATCAT</u> <u>TCTTC</u>	80°C	ppPSE1
FUS2-R	← <u>GAAGAATGATGATAAACGTGGAGGAACGGGAGCTTGTTGCCCTTGACGATGA</u> <u>GGAGC</u>	94°C	tsPOE1
PSE-F	→ <u>CGGGGTACCACATAATGGAGGTCGTGGAGAGATTC</u>	64°C	ppPSE1
PSE-R	← <u>GGCTCTAGATCACTCAGTTTTAGCTCCCTTTTGC</u>	64°C	ppPSE1
POE-F	→ <u>CGGGGTACCACATAATGATGGAGCCGCTCGACAGGTAC</u>	76°C	tsPOE1
POE-R	← <u>GCCTCTAGACTATGCCTTCTTGGTTTTTGC</u>	72°C	tsPOE1

Anhang 2. Nucleotid- und Aminosäuresequenzen der cDNA-Klone, die im Rahmen dieser Doktorarbeit isoliert wurden.

Organismus: *Physcomitrella patens*
Bezeichnung: ppKCS1
Länge: 1192 bp

CTTGGGTTTCGTGATTCTTGAGAGGGTTTGAGATGGGGGTGAGTTGGATTGGAGCGTTGATAGTCATGAGAA

ATGAATGAGGCTGTGGGGAAGGTTGCGACCGTTGTCGGTGAGGGAGGATTCGGAGCCGCGGGTAGGACTGTG
ACAGTTGAGCCATCGACGGCGCTAGGTTGCGAGTGGTAGAGATCAGGCGCATTGTCTCATTATTTCTCAGTG

AGGAGGGAGAATCTACGCGCAGCAGACCACCATGGCGCCATCGCCGATCCAGGAGGCTCCCACAAGAGAGGC

M A P S P I Q E A P T R E A

GGAGCGTGTCTCAGTGACGTATCCCCCGGCGTCGTCTTCTGACTTCTTGCAATCTGTGAATCTCAAGTA

E R V S V H V S P R R R L P D F L Q S V N L K Y
TGTGAAGCTCGGATAACCATTACTTGATCACGCACTTACTCACGCTCCTCTTCATCCCGCTTCTGTTGGCCAT

V K L G Y H Y L I T H L L T L L F I P L L L A I
CCTCCTGGAAGCCGGCCGTATGGGCCCTGAAGACTTGTGGCAGCTCTGGGAGAATCTGCAGTTCAATTTGGT

L L E A G R M G P E D L W Q L W E N L Q F N L V
TAGTGTGATTGCATGCTCTGCCCTCTTGGTGTTTGTGGGAACTGTCTACTTCATGTCGCGCCCCAGGCCCAT

S V I A C S A L L V F V G T V Y F M S R P R P I
CTTTCTCGTGGACTTTGCATGCTATCTCCCGACGAGAAGTTACAAGTCTCGGTCCCGTTGTTTCATGGAGCG

F L V D F A C Y L P D E K L Q V S V P L F M E R
CACACGGCTCGCGGGTTCTTCGACGAGAAGAGCATGGAGTTTCAGGAGAAGATTTTGGAGAGGTCGGGTCT

T R L A G F F D E K S M E F Q E K I L E R S G L
TGGTGCCAAGACTTACCTACCCGCGGCGATGCACTCCCTGCCTCCTTGCCCGAGCATGAAAGCAGCTCGAGA

G A K T Y L P A A M H S L P P C P S M K A A R E
GGAGGCCGAGCAGGTCATGTTTCGGGTGCCTCGACGAACTTTTCGAGAAGACGAAGATCAAACCTAAAGATGT

E A E Q V M F G C L D E L F E K T K I K P K D V
TGGTGTCTCGTCGTGAACTGTTCTCTCTTCAACCCACGCCTTCCCTCTCCGCCATGATCGTGAACAAGTA

G V L V V N C S L F N P T P S L S A M I V N K Y

CCACATGCGTGGCAACATCCGTACCTACAATCTAGGCGGAATGGGATGCAGCGCAGGCGTGATTGCGATCGA
H M R G N I R T Y N L G G M G C S A G V I A I D
CCTTGCCAGAGACATGCTCCAAGTGCACGGCAACACCTACGCCATTGTTGTGAGTACCGAAAACATCACACA
L A R D M L Q V H G N T Y A I V V S T E N I T Q
GAACTGGTACTTCGGCAACCGGAGATCCATGCTCATCCCTAATTGCTTGTTCCGCGTCGGTGGGGCCGCGAT
N W Y F G N R R S M L I P N C L F R V G G A A I
CTTGCTATCTAACAAGCGGAGAGATGGCTCCCGGTCCAAGTACCAGCTCAACCACGTCGTGAGGACCCACAA
L L S N K R R D G S R S K Y Q L N H V V R T H K
GGGCGCTGATGACAAGTGCTACAATTGCGTTTACCAAGAGCAGGACGAGCAGGGCAACATGGGTGTCTCCCT
G A D D K C Y N C V Y Q E Q D E Q G N M G V S L

CTCCAAGGACCTCATGGCAATAGCTGGAGAGACTTTGAAAGCCAACATCACCACGCTAGGCCCCGCTCGTGCT
S K D L M A I A G E T L K A N I T T L G P L V L
TCCTCTCTCCGAACAGCTGCTCTTTTTTCAGCACCCCTCGTCGCTCGGAAAGTCTTCAACATGAAGGTCAAGCC
P L S E Q L L F F S T L V A R K V F N M K V K P
TTATATTCCTGATTTCAAGCTGGCCTTCGACCACTTCTGCATCCACGCCGGCGGGAGGGCCGTGATCGACGA
Y I P D F K L A F D H F C I H A G G R A V I D E
GCTTGAGAAGAACCTGCAACTCACTCCCGGACACTGTGAGCCGTCACGAATGACCCTCCACAGATTTGGTAA
L E K N L Q L T P G H C E P S R M T L H R F G N
TACGTCTTCCTCTTCGATCTGGTACGAGCTTGCATACATGGAGGCCAAGGGGCGCATGCGGCGAGGCAACCG
T S S S S I W Y E L A Y M E A K G R M R R G N R
AGTGTGGCAAATTGCCTTTGGGAGCGGGTTTAAGTGCAATAGCGCTGTCTGGCAGGCATTGCGAAACATCAA
V W Q I A F G S G F K C N S A V W Q A L R N I K
GCCCTCGGAGAAGTCGCCGTGGGCTCATTGTATCGATGAGTACCCTCAACATGTGGACGATATTCAAAAAGT
P S E K S P W A H C I D E Y P Q H V D D I Q K V
TAGTTAAGAGCTCGATTGTTTTGAAACGGGTGACATTTTATTGGCAACAAACCTTGTTGTGATGGAGCTGT
S *

GAAGGCTGTGAATTGGCCTTCTGGAGTTGTCTCCGATTGTTTGCAAGAACCTGTTTGCGACTTCGACCTGGA

TCTCGTCGTTCAAGAAGCTACAAGCTCACTGATCAGGCCAGAGTAGACATGTTTGAACAACGCCTGCGTGGC
TTTGTTGTTGCGATTATAAAAGGGAACGAAGCACTTGCCATGACCTTTCACATTGATCATATAATGACTGTC
TGCGGCAACTAATTGTGCTTCTATTCATGATCAGCTTTGCTGCATAAGAAAAAA

Organismus: *Physcomitrella patens*
Bezeichnung: ppKCS2
Länge: 1791 bp

GTAGAGTTTGGCCGGCTGGGGCGGGATGACATTTTGCAACTGTGGGACCATCTCCAGTATAACCTTGTGAGT
v e f g r l g r d d i l q l w d h l q y n l v s

GTCTTGGCCTGTTCCGGGGCGTTGGTGTGTTGTGGCCACCTTGTATTTTATGTCGAGGCCCGCCCGGTGTAT
v l a c s g a l v f v a t l y f **M** S R P R P V Y

CTTGTAGACTTTTCGTGTTACAAGCCCCGAGGATGAGAGGAAGGTGACCATGCAGACTTTTATCCAGCGATCT
L V D F S C Y K P E D E R K V T M Q T F I Q R S

ATCGAAGCTGGGAAGTTCGATGAGAAAAGCTTGGAGTTTCAGAAGAAGATTATCGAGAGGTCGGGGTTGGGT
I E A G K F D E K S L E F Q K K I I E R S G L G

CAGGAGACCTACCTTCCGCGCGCTGTGGTCAGTGCGCCTCCCAATCCTTGCATGAAGGAGGCGCGTCTGGAG
Q E T Y L P R A V V S A P P N P C M K E A R L E

GCAGAGCAAGTGATGTTTGGCGCTCTTGACGAGCTTTTCGAGAAGACAGGCGTGAAGCCGAAGGACATTGGA
A E Q V M F G A L D E L F E K T G V K P K D I G

GTGTTGGTCGTCAACTGCAGTTTGTTCACCCCACTCCTTCTCTTCTGCCATGATTGTCAACCACTACAAG
V L V V N C S L F N P T P S L S A M I V N H Y K

ATGCGTGGTAATATCCAGAGTTTGAATCTTGGAGGTATGGGGTGCTCTGCTGGTGTTCATCGCCATCGATCTG
M R G N I Q S L N L G G M G C S A G V I A I D L

GCGAAAGACTTGCTCCAAGTGCACGGAGGATCCTACGCCATCGTTGTCTCTATGGAGAACATTACCTTGAAC
A K D L L Q V H G G S Y A I V V S M E N I T L N

TGGTACTTTGGCAATGACAGATCGAAGCTCGTGTCCAAGTGCATCTTTAGAATGGGAGGAGCTGCAATCATG
W Y F G N D R S K L V S N C I F R M G G A A I M

CTTTCTAACAAGCGGTCGGAAAGGAGGAGGGCGAAGTACGAGCTCGTACACACTGTGAGAACCCACAAGGGC
L S N K R S E R R R A K Y E L V H T V R T H K G

GCGGATGAGAAATGCTTCCGATGTGTATTTCAAGAAGAGGATTGAGAAGGCACAATGGGCGTGTGCTCTCC
A D E K C F R C V F Q E E D S E G T M G V S L S

CGGGAGCTCATGGGAGTAGCCGGAGATGCCTTGAAAGCCAATATTACCACGCTGGGTCCCCTTGTCTCTCCC
R E L M G V A G D A L K A N I T T L G P L V L P

CTCTCTGAGCAGCTTCTGTTCTTTGCTACCTTGGTTGCCAGGAAGTTCTTGAACATGAAGGTCAAGCCTTAC
L S E Q L L F F A T L V A R K F L N M K V K P Y

ATTCTGACTTCAAGCTGGCTTTTCGATCACTTCTGTATTACGCGGGAGGGAGAGCCGTTCTCGACGAGATT
I P D F K L A F D H F C I H A G G R A V L D E I

GAGAAAACTTGAGCCTCTCCCAGTGGCACATGGAGCCCTCTCGGATGACTCTCTACAGGTTTGGTAACACC
E K N L S L S Q W H M E P S R M T L Y R F G N T

TCTAGCAGCTCGCCTTGGTATGAACTTGCGTACACGGAAGCAAAAGGCAGGGTGCGTCGCGGTGACAAGGTA
S S S S P W Y E L A Y T E A K G R V R R G D K V

TGGCAAATTGCGTTTGGTTCTGGATTCAAGTGCAACAGTGCTGTGTGGAGAGCACTCCGGACTGTTAAGCCC
W Q I A F G S G F K C N S A V W R A L R T V K P

TCACAGTACAGTCCCTGGAGGGATTGCATAGACAAATTGCCTGTTGAAGTTCCTACTTACGCGAATATCTCG
S Q Y S P W R D C I D K L P V E V P T Y A N I S

TAGGTCGTACTTTACCGGAGAAGTCTGTTTTGGAAGCTTACTATGCTTTATCTGCTTATCACAAGAGCAGAG
*

ACTGTTGCGTCTCTTTGCTTCAGTCCTGCCGTGCAGCAAAGTGTCGGAATGGTTTGTAGAGGAGATTGGTGA
TAATTGACTCAAAGTCTAAAAATTTACAGGCAGTTGATTCTCATTTTTAGATTTTTGGATTGGGAACATGGC
GACTTTGCAAATCGCCTGGTTCAAGCAATACTCAGGCACCCATTGTACCTGGTAACAGTCCCTGTTGGATTT
TGTAATTGTACATCGGTACATCAAAGACATTCAGATGGGCCAGCCTTTTTTTCTTTTAGTGAAAACTGCAA
GACCCTTACAAACTTGCTATTATGACATTTGATCAATGACAATAAAGTAGAAGGTCACGTGTCAAAAAAAAA
AA

Organismus: *Ceratodon purpureus*
Bezeichnung: cpKCS1
Länge: 1972 bp

CAGTGGCGATGGGAGGGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGCCTGCGGTGCAGATTCGGGTGCGGCAGCGGTTGCC
s g d g r g s g s g s g p a v q i r v r q r l p
TGATTTTCTGCAGTCGGTGAACCTGAAGTATGTGAAGCTGGGATACCACTATGTGGTGTGCATGCGCTGTT
d f l q s v n l k y v k l g y h y v v s h a l f
TCTGTTTCGTGTTGCCGTTGTTGTTGGCAGTGGCGGTGGAGTTCGGGCGGCTCGGGAGGGACGACATTGTGCA
l f v l p l l l a v a v e f g r l g r d d i v q
GCTATGGACGCACTTGCAGTACAATCTGGTGAGTGTGCTGGCGTGCTCGGGGGCGTTGGTGTTCGTGGCCAC
l w t h l q y n l v s v l a c s g a l v f v a t
GTTGTATTTTCATGTGCGCCCCGCGGCCGTTGTATCTGGTGGACTTTGCGTGTTACAAGCCGGAGGAGGAGCG
l y f **M** S R P R P V Y L V D F A C Y K P E E E R
GAAGGTGACGATGCAGACGTTTATTCAGAAGAGTTTGGAGGCGGGGAAGTTCGATGAGAAGAGTATGGAGTT
K V T M Q T F I Q K S L E A G K F D E K S M E F
TCAGAAGAAGATTATCGAGAGGTCGGGGCTGGGGCATGAGACGTATTTGCCGCGCGCCGTTGTGAGCTCGCC
Q K K I I E R S G L G H E T Y L P R A V V S S P
GCCTAATCCGTGTATGAAGGAGGCGCGTTTGGAGGCGGAGCAGGTGATGTTTCGGGGCGCTGGATGAGCTGTT
P N P C M K E A R L E A E Q V M F G A L D E L F
CGAGAAGACGGGTGTGAAGCCTAAGGATGTTGGTGTGTTGGTTGTCAACTGCAGCTTGTTCAACCCACGCC
E K T G V K P K D V G V L V V N C S L F N P T P
GTCTTTGTCTGCTATGATTGTGAACCACTATAAGATGCGTGGAAATGTTTCAGAGCTTAAATCTTGGTGGTAT
S L S A M I V N H Y K M R G N V Q S L N L G G M
GGGGTGCTCGGCTGGTGTATTGCCATCGACCTGGCGAAAGACTTGCTTCAAGTGCACGGGGGGTCGTATGC
G C S A G V I A I D L A K D L L Q V H G G S Y A
CATTGTGGTGTCCATGGAGAATATTACGTTGAACTGGTACTTCGGCAATGATAGATCGAAGCTCGTGTCCAA
I V V S M E N I T L N W Y F G N D R S K L V S N
CTGCATTTTCAGAATGGGAGGCGCTGCGATCTTGCTCTCCAACAAGCGGTCTGAGAGAAGACGGGCGAAGTA
C I F R M G G A A I L L S N K R S E R R R A K Y

CCAGCTCGTGCACACGGTGAGAACTCACAAGGGCGCGGATGAGAAATGCTTCCGGTGTGTGTTCCAAGAAGA
Q L V H T V R T H K G A D E K C F R C V F Q E E
AGATGAAAACGGCACGATGGGAGTTTCGCTGTCCCGGGAGCTCATGGGAGTAGCCGGGGATGCGTTGAAAGC
D E N G T M G V S L S R E L M G V A G D A L K A
GAACATCACCACCTTGGGCCCCCTCGTGCTTCCCCTGTCCGAGCAGATCCTCTTCTTCGCCACTCTAGTCGC
N I T T L G P L V L P L S E Q I L F F A T L V A
TCGCAAGTTCCTCAACATGAAGGTGAAACCCTACATCCCGGATTTCAAGCTCGCGTTCGACCATTTCTGCAT
R K F L N M K V K P Y I P D F K L A F D H F C I
CCACGCCGGAGGCAGGGCGGTCTTGATGAGATGGAGAAGAACTTGCAGCTCTCGGAGTGGCACATGGAGCC
H A G G R A V L D E M E K N L Q L S E W H M E P
CTCTCGCATGACGCTCTACAGATTCGGCAACACCTCCAGCAGCTCCCCGTGGTACGAACTCGCATAACACGGA
S R M T L Y R F G N T S S S S P W Y E L A Y T E
GGCGAAGGGCAGAGTGCCTCGCGGTGATAAGGTGTGGCAAATTGCATTCGGTTCGGGATTCAAGTGCAACAG
A K G R V R R G D K V W Q I A F G S G F K C N S
TGCTGTGTGGAGAGCACTTCGGACCGTGAAGCCTCCCAAGTACAGCCCATGGTCCGATTGCATCGACAAATT
A V W R A L R T V K P P K Y S P W S D C I D K L
GCCCCGTCGAAGTACCCACCTATGCTAACATCTCCTAGGTGAGTCGAAATTCTTTTGGTGGTAGCTTATTTTT
P V E V P T Y A N I S *
TCACATGACGAGGCCAATGACGAAGAACCGACACCGAGTTTTGTGTCTCCTTCAATTTATCCCGGTGATGCA
CTGGGCAGTTTTTGATGAACCTAGCTCGACGAGAGTTGATTCTTTTTGTGAAATGACAGAAGGGAGTTCATT
CTTAGAAGTTAAGTTCACGGAAGCATGGTGATTGATTATTCCTCAATTGCCTGGTTCAATCAAGCAGTGTA
TGTACAGGCACCCATTGTTCTGGTACACCTCGCTGTTGGACATTGTAATTTTATTCATTTCGGCACATGAAG
AAAACAGACTTCAGCAGCCGCTCTTGGTCAAGACTGTAGACTGCCATTCTGAATCCTGACATGATATGACCC
CTGTATGAGCTTAATTTCAATAAAAAAAGTGCGGCACGAGCGGCACGAGAGTACTTCTAGAGCGGCCGC

Organismus: *Physcomitrella patens*
Bezeichnung: ppPSE1
Länge: 1192 bp

CTGCTTCGTCTCATCTTGGGGGTGTGATTCGGGAGTGGGTTGAGTTGGTGGAGCGCAATGGAGGTCGTGGAG
* M E V V E

AGATTCTACGGTGAGTTGGATGGGAAGGTCTCGCAGGGCGTGAATGCATTGCTGGGTAGTTTTGGGGTGGAG
R F Y G E L D G K V S Q G V N A L L G S F G V E

TTGACGGATACGCCACTACCAAAGGCTTGCCCTCGTTGACAGTCCCACACCCATCGTCCTCGGTGTTTCT
L T D T P T T K G L P L V D S P T P I V L G V S

GTATACTTGACTATTGTCATTGGAGGGCTTTTGTGGATAAAGGCCAGGGATCTGAAACCGCGCGCCTCGGAG
V Y L T I V I G G L L W I K A R D L K P R A S E

CCATTTTGTCTCCAAGCTTTGGTGCTTGTGCACAACCTGTTCTGTTTTGCGCTCAGTCTGTATATGTGCGTG
P F L L Q A L V L V H N L F C F A L S L Y M C V

GGCATCGCTTATCAGGCTATTACCTGGCGGTACTCTCTCTGGGGCAATGCATACAATCCTAAACATAAAGAG
G I A Y Q A I T W R Y S L W G N A Y N P K H K E

ATGGCGATTCTGGTATACTTGTTCTACATGTCTAAGTACGTGGAATTCATGGATACCGTTATCATGATACTG
M A I L V Y L F Y M S K Y V E F M D T V I M I L

AAGCGCAGCACCAGGCAAATAAGCTTCCTCCACGTTTATCATCATTTCTTCAATTTCCCTCATTTGGTGGGCT
K R S T R Q I S F L H V Y H H S S I S L I W W A

ATTGCTCATCACGCTCCTGGCGGTGAAGCATATTGGTCTGCGGCTCTGAACTCAGGAGTGCATGTTCTCATG
I A H H A P G G E A Y W S A A L N S G V H V L M

TATGCGTATTACTTCTTGGCTGCCTGCCTTCGAAGTAGCCCAAAGTTAAAAAATAAGTACCTTTTTTGGGGC
Y A Y Y F L A A C L R S S P K L K N K Y L F W G

AGGTACTTGACACAATTCCAAATGTTCCAGTTTATGCTGAACTTAGTGCAGGCTTACTACGACATGAAAACG
R Y L T Q F Q M F Q F M L N L V Q A Y Y D M K T

AATGCGCCATATCCACAATGGCTGATCAAGATTTTGTCTACTACATGATCTCGTTGCTGTTTCTTTTCGGC
N A P Y P Q W L I K I L F Y Y M I S L L F L F G

AATTTTACGTACAAAAATACATCAAACCCTCTGACGGAAAGCAAAAGGGAGCTAAACTGAGTGAGCTGTA
N F Y V Q K Y I K P S D G K Q K G A K T E *

TCAAGCCATAGAACTCTATTATGTTAGAACCTGAAGTTGGTGCTTTCTTATCTCCACTTATCTTTTAAGCA
GCATCAGTTTTGAAATGATGTGTGGGCGTGGTCTGCAAGTAGTCATCAATATAATCGGCCTGAGCACTTCAG
ATGGATTGTTAGAACATGAGTAAAAGCGGTTATTACGGTGTTTATTTTGTACCAAATCACCGCACGGGTGAA
TTGAAATATTTTCAGATTTGATCAATTTTCATCTGAAAAAACCTGCAGCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAG
CGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCT

Organismus: *Phytophthora infestans*
Bezeichnung: piPSE1
Länge: 1054 bp

GTTCGCACGTCCATCGTCTACTCACCAACAAGAAGTCATGTGCGACTGAGCTACTGCAGAGCTACTACGCGTG
M S T E L L Q S Y Y A W
GGCCAACGCCACGGAGGCCAAGCTGCTGGACTGGGTCGACCCTGAGGGCGGCTGGAAGGTGCATCCTATGGC
A N A T E A K L L D W V D P E G G W K V H P M A
AGACTACCCCTAGCCAACCTTCTCCAGCGTCTACGCCATCTGCGTCGGATACTTGCTCTTCGTAATCTTCGG
D Y P L A N F S S V Y A I C V G Y L L F V I F G
CACGGCCCTGATGAAAATGGGAGTCCCCGCCATCAAGACCAGTCCATTACAGTTTGTGTACAACCCCATCCA
T A L M K M G V P A I K T S P L Q F V Y N P I Q
AGTCATTGCCTGCTCTTATATGTGCGTGGAGGCCGCCATCCAGGCCTACCGCAACGGCTACACCGCCGCCCC
V I A C S Y M C V E A A I Q A Y R N G Y T A A P
GTGCAACGCCTTTAAGTCCGACGACCCCGTCATGGGCAACGTTCTGTACCTCTTCTATCTCTCCAAGATGCT
C N A F K S D D P V M G N V L Y L F Y L S K M L
CGACCTGTGCGACACAGTCTTCATTATCCTAGGAAAGAAGTGGAACAGCTTTCCATCTTGCACGTGTACCA
D L C D T V F I I L G K K W K Q L S I L H V Y H
CCACCTTACCGTGCTTTTTCGTCTACTATGTGACGTTCCGCGCCGCTCAGGACGGGGACTCATATGCTACCAT
H L T V L F V Y Y V T F R A A Q D G D S Y A T I
CGTGCTCAACGGCTTCGTGCACACCATCATGTACACTTACTACTTCGTGAGCGCCACACGCGCAACATTTG
V L N G F V H T I M Y T Y Y F V S A H T R N I W
GTGGAAGAAGTACCTCACGCGCATTACAGCTTATCCAGTTCGTGACCATGAACGTGCAGGGCTACCTGACCTA
W K K Y L T R I Q L I Q F V T M N V Q G Y L T Y
CTCTCGACAGTGCCCAGGCATGCCTCCTAAGGTGCCGCTCATGTACCTTGTGTACGTGCAGTCACTCTTCTG
S R Q C P G M P P K V P L M Y L V Y V Q S L F W
GCTCTTCATGAATTTCTACATTTCGCGCGTACGTGTTTCGCCCCAAGAAACCGGCCGTGGAGGAATCGAAGAA
L F M N F Y I R A Y V F G P K K P A V E E S K K
GAAGTTGTAACGGCGCTTGTTAAAAAGTCTAACCTCGCTGTGGCAACTCGTGTAGAAATGCAGCATGCCCAT
K L *
CAAATACATCCCGTATGATTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Organismus: *Thraustochytrium* sp.
Bezeichnung: tsPOE1
Länge: 943 bp

AGCGCGGGAGCGGAGACCTCGGCCGCGATGATGGAGCCGCTCGACAGGTACAGGGCGCTGGCGGAGCTCGC
M M E P L D R Y R A L A E L A
CGCGAGGTACGCCAGCTCGGCGGCCTTCAAGTGGCAAGTCACGTACGACGCCAAGGACAGCTTCGTCTGGGCC
A R Y A S S A A F K W Q V T Y D A K D S F V G P
CCTGGGAATCCGGGAGCCGCTCGGGCTCCTGGTGGGCTCCGTGGTCCTCTACCTGAGCCTGCTGGCCGTGGT
L G I R E P L G L L V G S V V L Y L S L L A V V
CTACGCGCTGCGGAACTACCTTGGCGGCCTCATGGCGCTCCGCAGCGTGCATAACCTCGGGCTCTGCCTCTT
Y A L R N Y L G G L M A L R S V H N L G L C L F
CTCGGGCGCCGTGTGGATCTACACGAGCTACCTCATGATCCAGGATGGGCACTTTCGCAGCCTCGAGGCGGC
S G A V W I Y T S Y L M I Q D G H F R S L E A A
AACGTGCGAGCCGCTCAAGCATCCGCACTTCCAGCTCATCAGCTTGCTCTTTGCGCTGTCCAAGATCTGGGA
T C E P L K H P H F Q L I S L L F A L S K I W E
GTGGTTCGACACGGTGCTCCTCATCGTCAAGGGCAACAAGCTCCGCTTCCTGCACGTCTTGACACCAGCCAC
W F D T V L L I V K G N K L R F L H V L H H A T
GACCTTTTGGCTCTACGCCATCGACCACATCTTTCTCTCGTCCATCAAGTACGGCGTCGCGGTCAATGCTTT
T F W L Y A I D H I F L S S I K Y G V A V N A F
CATCCACACCGTCATGTACGCGCACTACTTCCGCCCATTCCCGAAGGGCTTGCGCCCGCTTATTACGCAGTT
I H T V M Y A H Y F R P F P K G L R P L I T Q L
GCAGATCGTCCAGTTCATCTTCAGCATCGGCATCCATACCGCCATCTACTGGCACTACGACTGCGAGCCGCT
Q I V Q F I F S I G I H T A I Y W H Y D C E P L
CGTGCATACCCACTTTTGGGAATACGTCACGCCCTACCTCTTCGTGCGTCCCTTCCTCATCCTCTTTCTCAA
V H T H F W E Y V T P Y L F V V P F L I L F L N
TTTCTACCTGCAGCAGTACGTCCTCGCGCCCGCAAAAACCAAGAAGGCATAGCCACGTAACAGTAGACCAGC
F Y L Q Q Y V L A P A K T K K A *
AGCGCCGAGGACGCGTGCCGCGTTATCGCGAAGCACGAAATAAAGAAGATCATTTGATTCAAAAAAAAAAAAA

AAAAAAA

Organismus: *Thraustochytrium* sp.
Bezeichnung: TS093
Länge: 952 bp

GTCATTTGCGGCCTCGACCTTCTCCCCGTGCTCTCGTGGGAGACTATGAAGTTCGACA
v i s g l d l l p v l s w e t **M** K F D T

CTGCCGAAGTTGTCTCGGTCTGGCTGCGCACGCACATGTGGGTCCCCTTCCTGATGTGCTTCATCTACCTGG
A E V V S V W L R T H M W V P F L M C F I Y L V

TCGTCATCTTCGGCATCCAGTACTACATGGAGGACCGCAAGGAGTTCGATCTGCGCAAGCCGCTGGCCGCCT
V I F G I Q Y Y M E D R K E F D L R K P L A A W

GGAGCGCCTTCTTGCCATTTTCAGCATCGGCGCCTCCATCCGCACCGTGCCCGTCCTGCTCAAGATGCTCT
S A F L A I F S I G A S I R T V P V L L K M L Y

ACGAAAAGGGCACGCACCACGTGCTCTGCGGCGACACGCGCAACGACTGGGTCAATTGACAACCCGGCCGGCG
E K G T H H V L C G D T R N D W V I D N P A G V

TCTGGACCATGGCCTTTATCTTTTCCAAGATTCCCGAGCTCATCGACACCCTCTTTATCGTGCTCCGCAAGC
W T M A F I F S K I P E L I D T L F I V L R K R

GCAAGCTCATCACCTCCACTGGTACCACCACGTGACCGTGCTCCTGTTCTGCTGGCACGCCTGGGCCACCT
K L I T L H W Y H H V T V L L F C W H A W A T F

TTGCGCTCACCGGCATCGTCTTTGCCGCCATCAACGCCTCGGTGCACGCCATCATGTACGCCTATTACGCCT
A L T G I V F A A I N A S V H A I M Y A Y Y A F

TCACGGCCCTCGGCTACCGACCAACCTCGTACGCCATCTACATTACGCTCATTCAGATCATGCAGATGGTCG
T A L G Y R P T S Y A I Y I T L I Q I M Q M V V

TCGGCACCGCCGTCACCTTTTACATTGGCTACGACATGGCCTTTGTACAGCCGCAGCCCTTCCGCCTTGACA
G T A V T F Y I G Y D M A F V T P Q P F R L D M

TGAAACTCAACTGGGACCCGCTCAGCAAGGGCGAGAACACCGAGCCCACCTGCAAGGGCGCCAACTCCTCCA
K L N W D P L S K G E N T E P T C K G A N S S N

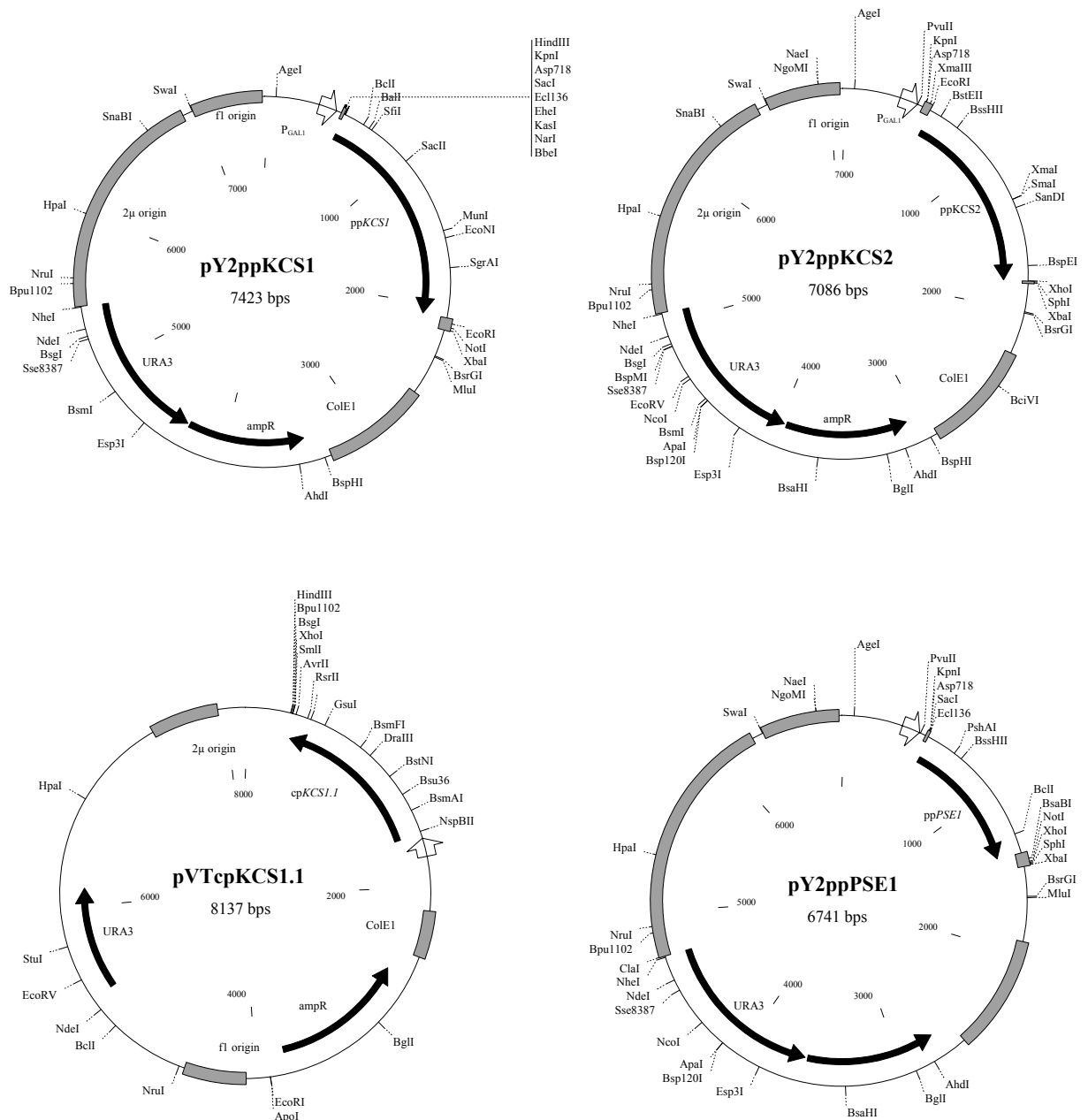
ACGCCATCTTCGGCGTCATCATGTACGCCTCGTACCTCTACCTCTTCTGCCTCTTCTTCTACATGGCCTACC
A I F G V I M Y A S Y L Y L F C L F F Y M A Y L

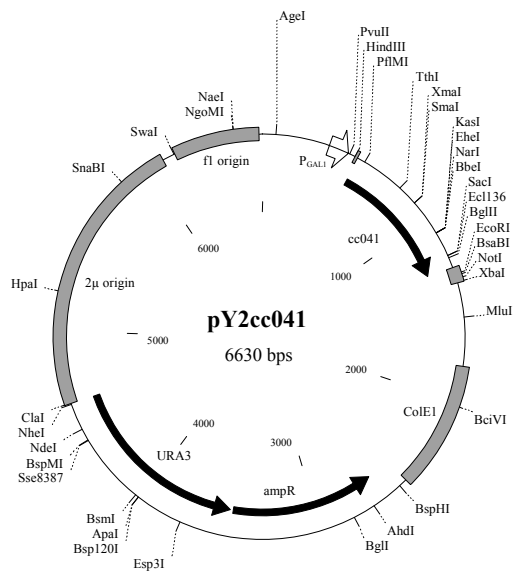
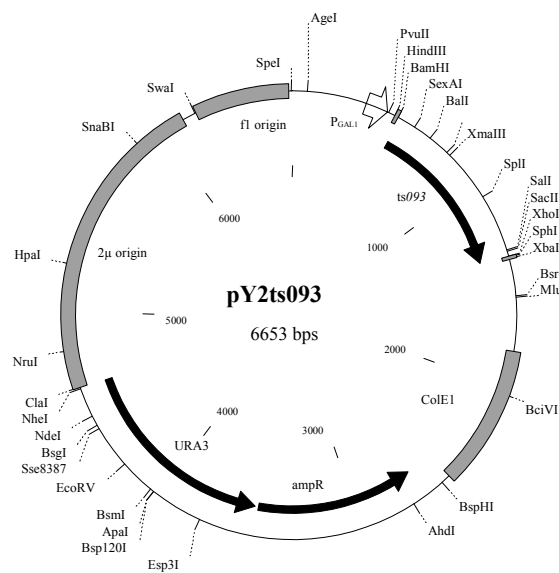
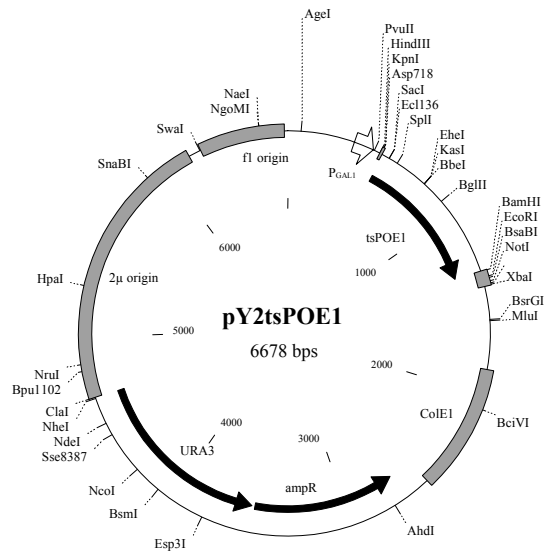
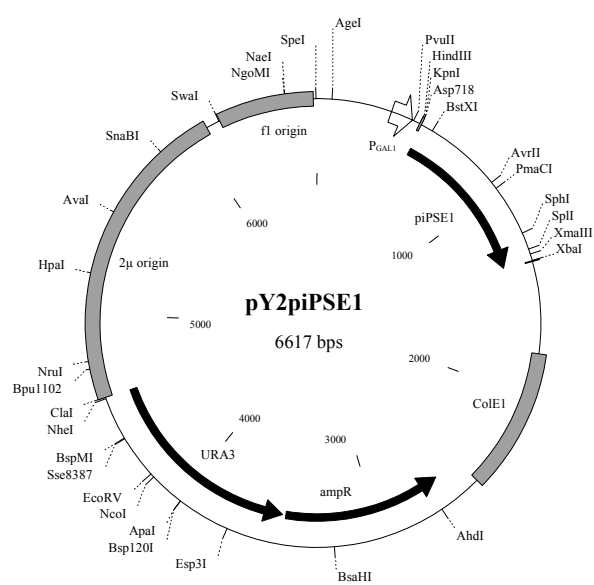
TGCGCCCGAAGAAGTCGACGCCCCGCGGCCAAGAAGACAACTAATCGCACACTACCAAACAATCTTCCACTC
R P K K S T P A A K K T N *

GACCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

172

Anhang 3. Konstrukte, die im Rahmen dieser Doktorarbeit zur Expression der isolierten cDNA-Klone in *Saccharomyces cerevisiae* kloniert wurden. Als Vektoren dienten hierbei pYES2 und pVT102U (siehe Kapitel 2.2). Die verwendeten Bezeichnungen haben folgende Bedeutungen: P_{GAL1}: GAL1-Promotor; P_{ADH}: ADH-Promotor; URA3: URA3-Gen; 2 μ origin: 2 μ Replikationsursprung; ColE1 origin: Replikationsursprung für *E. coli*; ampR: Ampicilin-Resistenzgen; fl origin: fl-Replikationsursprung. Die Klonierungsstrategien der verschiedenen Expressionskonstrukte sind in „Ergebnisse und Diskussion“ erläutert.





Anhang 4. Accession-Nummern, mit denen Aminosäure-Sequenzen in der GenBank eingetragen wurden, die für die Erstellung des Phylogramms in der Abbildung 3.21 verwendet wurden. Auch die in dieser Arbeit charakterisierten Proteine sind aufgeführt.

ELO-Sequenzen			KCS-Sequenzen		
Nr.	Organismus	Acc. Nr.	Nr.	Organismus	Acc. Nr.
1	<i>Thraustochytrium sp.</i>	tsPoe1	62	<i>Z. mays</i>	CAC17746
2	<i>A. thaliana</i>	AAF08569	63	<i>Dunaliella. salina</i>	AAK11266
3	<i>A. thaliana</i>	AAF08570	64	<i>Sorghum bicolor</i>	AAD27560
4	<i>S. pombe</i>	T37734	65	<i>P. patens</i>	ppKcs2
5	<i>M. alpina</i>	AAF71789	66	<i>C. purpureus</i>	cpKcs1
6	<i>S. pombe</i>	T50139	67	<i>A. thaliana</i>	AAF79428
7	<i>S. cerevisiae</i>	NP_013476	68	<i>A. thaliana</i>	AAD22309
8	<i>S. cerevisiae</i>	NP_009963	69	<i>A. thaliana</i>	T05271
9	<i>S. cerevisiae</i>	NP_012339	70	<i>Simmondsia chinensis</i>	AAC49186
10	<i>P. infestans</i>	piPse1	71	<i>Limnanthes douglasii</i>	AAG28600
11	<i>Leishmania major</i>	AAF68674	72	<i>P. patens</i>	ppKcs1
12	<i>M. alpina</i>	AAF70417	73	<i>A. thaliana</i>	AAB95298
13	<i>P. patens</i>	AF428243	74	<i>Z. mays</i>	CAC01441
14	<i>D. melanogaster</i>	AAF50100	75	<i>A. thaliana</i>	AAK59535
15	<i>D. melanogaster</i>	AAF50101	76	<i>A. thaliana</i>	T04771
16	<i>Fowlpox virus</i>	NP_039011	77	<i>A. thaliana</i>	AAD37122
17	<i>M. musculus</i>	AAG47667	78	<i>A. thaliana</i>	AAG50800
18	<i>H. sapiens</i>	NP_073563	79	<i>A. thaliana</i>	AAD03366
19	<i>Macaca fascicularis</i>	BAB60806	80	<i>A. thaliana</i>	T04771
20	<i>H. sapiens</i>	NP_068586	81	<i>L. fendleri</i>	AAK62348
21	<i>H. sapiens</i>	NP_060240	82	<i>A. thaliana</i>	T05272
22	<i>M. musculus</i>	NP_062296	83	<i>B. juncea</i>	CAA71898
23	<i>D. melanogaster</i>	AAF56018	84	<i>B. napus</i>	AAK64213
24	<i>D. melanogaster</i>	AAF58877	85	<i>A. thaliana</i>	AAC69929
25	<i>D. melanogaster</i>	AAF56072	86	<i>A. thaliana</i>	AAF26470
26	<i>D. melanogaster</i>	AAF57646	87	<i>Haemerocallis hybrid cultivar</i>	AAC34858
27	<i>D. melanogaster</i>	AAF57647	88	<i>A. thaliana</i>	AAF73979
28	<i>D. melanogaster</i>	AAF54462	89	<i>A. thaliana</i>	T49095
29	<i>D. melanogaster</i>	AAF54460	90	<i>A. thaliana</i>	AAG51695
30	<i>D. melanogaster</i>	AAF54461	91	<i>A. thaliana</i>	BAB10089
31	<i>D. melanogaster</i>	AAF54463	92	<i>A. thaliana</i>	T48449
32	<i>D. melanogaster</i>	AAF54464	93	<i>Oryza sativa</i>	AAG16863
33	<i>D. melanogaster</i>	AAF52122	94	<i>A. thaliana</i>	AAD24372
34	<i>D. melanogaster</i>	AAF54172	95	<i>A. thaliana</i>	AAF75082
35	<i>H. sapiens</i>	XP_041700			
36	<i>M. musculus</i>	BAB31310			
37	<i>H. sapiens</i>	BAB15697			
38	<i>H. sapiens</i>	XP_002040			
39	<i>M. musculus</i>	NP_062295			
40	<i>D. melanogaster</i>	AAF56020			
41	<i>D. melanogaster</i>	AAF56015			
42	<i>D. melanogaster</i>	AAF56019			
43	<i>C. elegans</i>	T22791			
44	<i>C. elegans</i>	T20786			
45	<i>C. elegans</i>	AAK29808			
46	<i>C. elegans</i>	AAK29807			
47	<i>C. elegans</i>	T22789			
48	<i>Thraustochytrium sp.</i>	ts093			
49	<i>C. elegans</i>	P49191			
50	<i>C. elegans</i>	CAB61069			
51	<i>C. elegans</i>	Q03574			
52	<i>D. melanogaster</i>	AAF75771			
53	<i>H. sapiens</i>	NP_076995			
54	<i>H. sapiens</i>	AAG17875			
55	<i>M. musculus</i>	BAB23656			
56	<i>M. musculus</i>	NP_031729			
57	<i>L. major</i>	CAC18864			
58	<i>L. major</i>	CAC18863			
59	<i>L. major</i>	CAC29458			
60	<i>L. major</i>	CAC29459			
61	<i>C. cohnii</i>	cc041			

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom Dezember 1998 bis Januar 2002 in der Abteilung für Pflanzenphysiologie des Institutes für Allgemeine Botanik und Botanischer Garten der Universität Hamburg unter Anleitung von Professor Dr. E. Heinz durchgeführt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ernst Heinz für die interessante Themenstellung und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Seine intensive Betreuung, sein großes Interesse sowie die vielen anregenden und motivierenden Diskussionen haben einen außerordentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

Herrn Dr. Jens Lerchl und Frau Dr. Petra Cirpus von der BASF PlantScience GmbH danke ich für die sehr gute Kooperation und die Hilfsbereitschaft während der letzten drei Jahre.

Herrn Prof. Dr. Ralf Reski und Herrn Dr. Hauke Holtorf danke ich für die Durchführung der Transformation und Selektion von *Physcomitrella patens*.

Bei Herrn PD Dr. Ulrich Zähringer bedanke ich mich für die Durchführung der GC-MS-Analysen.

Herrn Prof. Dr. Wilhelm Boland und Herrn Dr. Christoph Beckmann danke ich für die Synthese und Bereitstellung von Fettsäuren für die Hefe-Expressionsexperimente.

Bei Herrn PD Dr. Ivo Feussner bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats.

Darüber hinaus danke ich allen Labormitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ernst Heinz für die angenehme Laboratmosphäre in den letzten drei Jahren sowie für die Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Herrn Dr. Dirk Warnecke danke ich für viele interessante Diskussionen während des Verfassens dieser Dissertation.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Indrè für ihre Liebe und Toleranz sowie meinen Eltern für ihre Liebe, Verständnis und Unterstützung.

Publikation

Zank, T. K., Zähringer, U., Lerchl, J. & Heinz, E. (2000) Cloning and functional expression of the first plant fatty acid elongase specific for Δ^6 -polyunsaturated fatty acids. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 654-658

Patente

Neues Elongasegen und Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren (2000)

DE 10005973.2: Zank, T. K., Heinz, E., Zähringer, U. & Lerchl, J.

DE 10023893.9: Zank, T. K., Heinz, E., Lerchl, J. & Renz, A.

DE 10063387.0: Zank, T. K., Heinz, E., Zähringer, U., Lerchl, J. & Renz, A.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Quellen entnommen sind, habe ich als Entlehnung kenntlich gemacht.

Ich versichere ebenfalls, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Hamburg, den 08.01.2002

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Thorsten Zank
Geburtsdatum: 26.10.1970
Geburtsort: Hamburg-Harburg
Familienstand: verheiratet

Ausbildung:

1977-1981	Grundschule in Hochdahl/Millrath
1981-1983	Orientierungsstufe Hittfeld/Seevetal
1983-1990	Gymnasium Hittfeld/Seevetal mit Abschluss Abitur
1991-1992	Zivildienst im Club 68 e.V. Verein für Schwerbehinderte und ihre Freunde
1992-1998	Biologie-Studium an der Universität Hamburg
1993-1994	studentische Hilfskraft am Institut für Angewandte Botanik der Universität Hamburg: „ <i>in vitro</i> - und <i>ex vitro</i> -Arbeiten mit <i>Baptisia tinctoria</i> “
1998	Zuerkennung des Grades Diplom-Biologe mit den Prüfungsfächern Genetik/Molekularbiologie, Biochemie und Allgemeine Botanik. Titel der schriftlichen Diplomarbeit: Klonierung und Expression neuartiger Sterol-Glucosyltransferasen
seit 1998	Promotion am Institut für Allgemeine Botanik und Botanischer Garten der Universität Hamburg unter Anleitung von Prof. Dr. E. Heinz