

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 unbekanntes 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 länger-kettige 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.