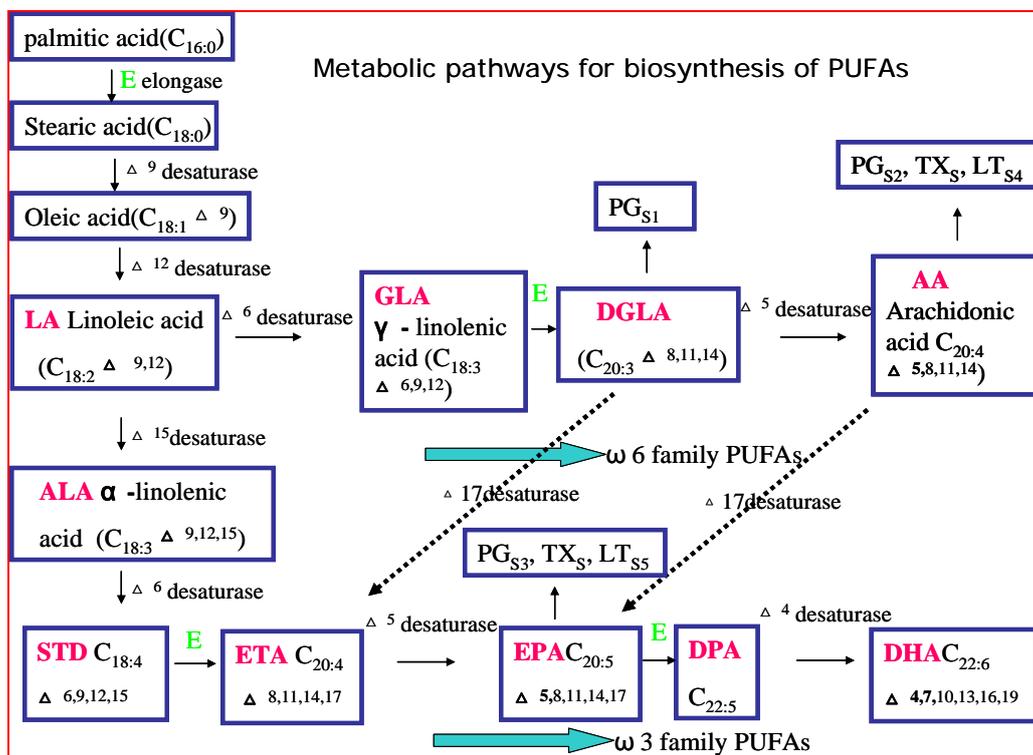


## Abschlussbericht FKZ 2794

# Konstruktion rekombinanter Fetthefen zur Biosynthese und Gewinnung essentieller Fettsäuren

### 1. Einleitung

Fettsäuren werden in allen Organismen synthetisiert und in gesättigte, einfach ungesättigte und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA = poly-unsaturated fatty acids) differenziert. PUFA sind wichtige Komponenten der Zellmembran und sind Vorläufer einer großen Anzahl von Metaboliten mit bedeutender biologischer Funktion (z.B. Blutdruck, Entzündungsreaktion). Ein Fehlen fördert Herz-Kreislaufkrankungen oder kann z.B. zu Problemen in der Immunantwort, im endokrinen und reproduktiven System führen. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass PUFA den Spiegel von LDL bzw. „schlechtem“ Cholesterin senkt und das Risiko für Herzinfarkt, Diabetes und verschiedene Krebserkrankungen mindert.



**Abb. 1:** Der Stoffwechselweg mehrfach ungesättigter Fettsäuren

Zwei wichtige Untergruppen der PUFA sind die ω-3 and ω-6 Fettsäuren. Der Mensch ist in der Lage alle PUFA zu synthetisieren, mit Ausnahme der kurzkettigen Linolsäure (LA) und α-Linolensäure (ALA) („essentielle Fettsäuren“), die mit der Nahrung aufgenommen werden

müssen (vgl. Abb. 1). Aufgrund der geringen Umsetzungsraten sollten längerkettige Fettsäuren wie EPA und DPA ebenfalls mit der Nahrung zugeführt werden. (Benatti et al., 2004; Herbige, 2003; Horrobin, 1992, 1993, 1997, 2000; Li, 2003; Warude et al., 2006).

Da die natürlichen Ressourcen von PUFA, wie z.B. die Öle diverser Pflanzen oder Meeresfisch, begrenzt sind, hat der stetig wachsende Bedarf zur Suche nach alternativen Quellen geführt.

Eine dieser potentiellen Quellen stellen sog. Fetthefen dar, da sie hohe Konzentrationen von kurzkettigen PUFA wie z.B. Linolsäure (LA) in ihren Zellen anreichern und auf vergleichsweise kostengünstigen Substraten wie z.B. Abfallprodukten der Zucker- oder Biodiesel-Herstellung (Melassen, Glycerin) angereichert werden können. Langfristiges Ziel des Projektes ist daher die Entwicklung eines „Hefe-Bioreaktors“ zur Produktion von  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 Fettsäuren im industriellen Maßstab. Allerdings fehlen den Hefen verschiedene Enzyme (Desaturasen, Elongasen), um Linolsäure in die gewünschten längerkettigen PUFA umzusetzen. Ziel des vorliegenden Projektes war es daher, nach Auswahl geeigneter Fetthefen diese zunächst genetisch so zu manipulieren (rekombinante Fetthefen), dass sie zur genannten Umsetzung in der Lage sind.

## **2. Screening und erste Versuche zum Metabolic Engineering von Fetthefen**

Im ersten Teil des Projektes wurden Fetthefen aus einer institutseigenen Sammlung auf ihren Linolsäuregehalt gescreent. Sechs dieser Hefen mit besonders hohem Gehalt an LA wurden für die weiteren Analysen ausgewählt. Es handelte sich um Stämme der Hefen *Lipomyces lipofer*, *Hansenula anomala*, *Candida boidinii*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula.bacarum* und *Yarrowia lipolytica*.

Ein großer Nachteil für die genetische Manipulation besteht darin, dass nahezu alle der gescreenten Hefen kaum genetisch charakterisiert sind. Aus diesem Grund wurde versucht, ein Integrations/Expressionssystem zu etablieren, das nach Möglichkeit zur genetischen Veränderungen aller genannten Hefen genutzt werden kann („wide range host system“). Als Ausgangspunkt wurde der Vektor gewählt pMrL (zur Verfügung gestellt von Artes Botechnologie GmbH, Langenfeld), der nachweislich ein in verschiedensten Hefen funktionierendes Integrations/Expressionssystem aufweist (Klabunde et al., 2003). Das pMrL Konstrukt benutzt für die „universelle“ genomische Integration ein Segment der

hochkonservierten 18S ribosomalen DNA aus der Hefe *Hansenula polymorpha*. Zur Expression eines Fremdgens lässt sich eine Kasette nutzen, bei der das neue Gen zwischen den *TEF1* Promotor der Hefe *Arxula adenivorans* und einen *PHO5* Terminator aus *S. cerevisiae* kloniert werden kann. Zur Selektion der transformierten Hefen dient das eine Hygromycin Phosphotransferase kodierende *hph* Gen, das in vielen bekannten Mikroorganismen eine Resistenz gegen das Aminoglycosid-Antibiotikum Hygromycin B vermittelt. Mit Hilfe dieses Vektors wurden zwei Konstrukte erstellt. Im ersten Konstrukt wurde zur Kontrolle ein für die Expression in *Saccharomyces* optimiertes Derivat des Grünfluoreszierenden Proteins (*yECitrine*) (Sheff and Thorn, 2004) einkloniert, im zweiten Konstrukt ein bekanntes Desaturase-Gen aus *Saccharomyces kluyveri* (*Sk-FAD3*) (Oura and Kajiwara, 2004).

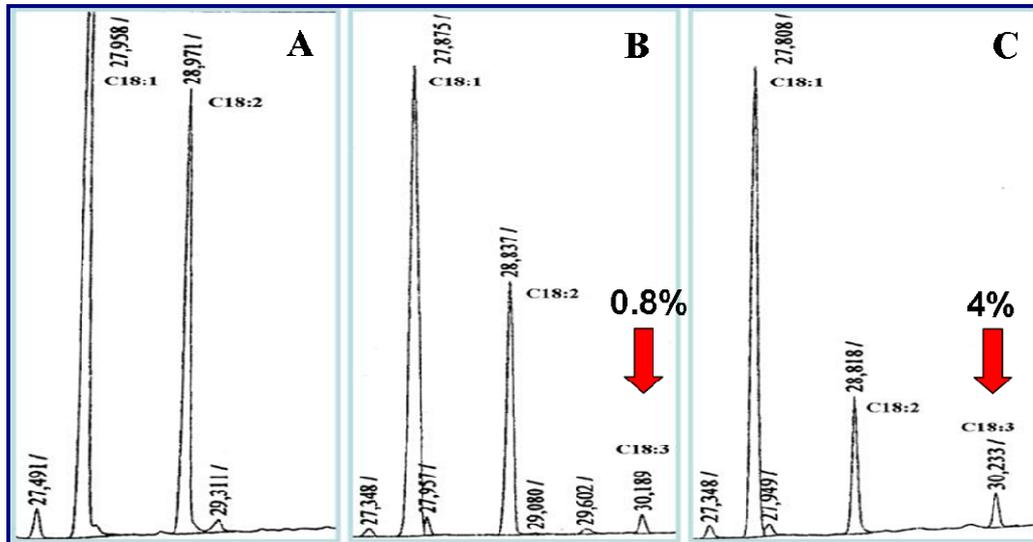
### 3. Metabolic Engineering der Fetthefe *Yarrowia lipolytica*

Obwohl eine Vielzahl unterschiedlicher Transformationsmethoden getestet wurde, konnten nur für die Fetthefe *Y. lipolytica* nachweislich integrative Transformanden generiert werden. Bei der gaschromatographischen (GC) Analyse des Fettsäurespektrums in den Desaturase-Transformanden konnte allerdings das gewünschte Umsetzungsprodukt  $\alpha$ -Linolensäure (ALA) nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde durch die fehlende Expression der *yECitrine* Kontrolle (Nachweis: Fluoreszenz-Mikroskopie, Western-Blotting) bestätigt. Beide klonierten Gene werden offensichtlich nicht bzw. nicht nachweisbar exprimiert. Mögliche Erklärungen hierfür sind, dass

- a) der *TEF1* Promotor aus *Arxula* in *Yarrowia* nur schlecht oder gar nicht erkannt wird.
- b) der Codon-Gebrauch in *Yarrowia* von dem in *Saccharomyces* abweicht (Madzak, et al., 2004) und daher wenig oder gar kein Volllänge-Protein gebildet wird, oder
- c) die von den beiden Genen in *Yarrowia* realisierten vollständigen Proteine nicht in aktiver Form vorliegen.

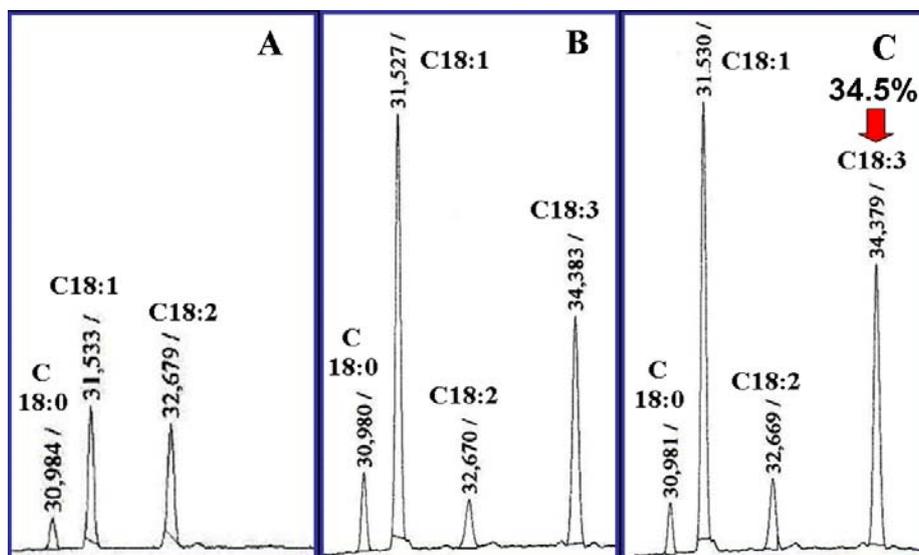
Für die weiteren Versuche wurde der Vektor daher so umgebaut, dass das Desaturase Gen von einem homologen *Yarrowia* Promotor (*TEF* bzw. *Hp4d*) exprimiert werden konnte. Des Weiteren wurde ein für *Yarrowia* codon-optimiertes *Sk-FAD3* Gen eingesetzt. Auf der Grundlage dieser Veränderungen konnten erste Expressionserfolge erzielt werden. Je nach verwendetem Promotor und Stamm konnte ein Anteil von bis zu 4% C18:3 Fettsäuren (ALA)

bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt erzielt werden (vgl. Abb. 2), wobei der *TEF* Promotor durchweg die besseren Ergebnisse lieferte.



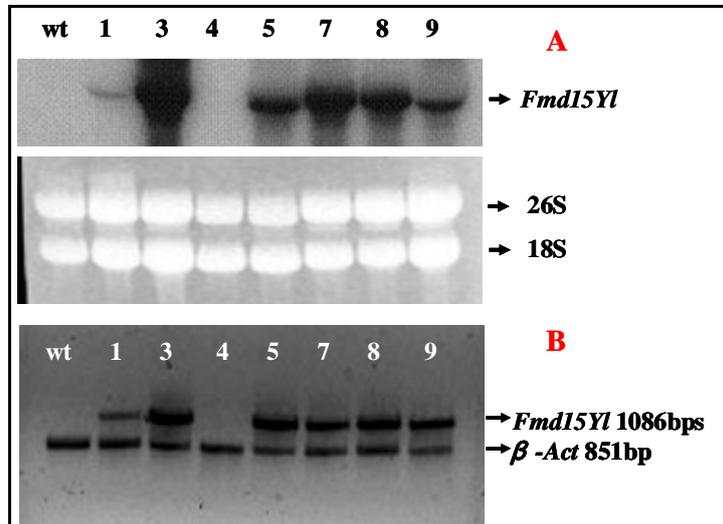
**Abb. 2:** GC-Analyse des C18 Fettsäurespektrums von *Y. lipolytica* Wildtyp (A), einer pMrL-Hp4d-SkFAD3 Transformante (B) und einer pMrL-TEF-SkFAD3 Transformante (C).

Um weitere Ausbeutesteigerungen zu erzielen, wurde auf der Basis der  $\Delta 15$  Desaturase aus dem Pilz *Fusarium moniliforme*, für die hohe Umsatzraten beschrieben worden sind (Damude et al., 2006), ein synthetisches, für *Y. lipolytica* optimiertes Gen generiert (*Fmd15YI*) und hinter dem *Yarrowia TEF* Promotor zur Expression gebracht. Mit Hilfe dieses Genkonstrukts konnte der Anteil der C18:3 Fettsäuren um mehr als das 8-fache auf maximal 34,5% des Gesamtfettsäureanteils gesteigert werden (Abb. 3), was einer Umsetzungsrate von LA zu ALA von 84% entspricht.



**Abb. 3:** GC Analyse des C18 Fettsäurespektrums von *Y. lipolytica* Wildtyp (A) und zwei pMrL-TEF-Fmd15YI Transformanten (B, C).

Darüber hinaus konnte durch RNA-Analysen (Northern-Hybridisierung und RT-PCR) von *Fmd15Yl* gezeigt werden, dass der Gehalt an C18:3 Fettsäuren in den einzelnen Transformanten mit der Transkripthäufigkeit korreliert, die ihrerseits von der Anzahl der integrierten Genkopien abhängt (vgl. Abb. 4).



**Abb. 4:** Northern-Hybridisierung und RT-PCR des Wildtys (wt) und ausgewählter Transformanten (Nr. 1, 3, 4, 5, 7, 8, und 9) von *Y. lipolytica*. **(A)** Northern-Analyse der *Fmd15Yl* Expression (oben) und Gesamt-RNA Präparation (unten). **(B)** RT-PCR mit Amplifikation eines 1086 bp großen Fragments aus *Fmd15Yl*. Als Expressions-Standard wurde eine RT-PCR zur Amplifikation eines 851 bp großen Fragments des  $\beta$ -actin durchgeführt.

#### 4. Ausblick

Die in diesem Abschlussbericht dargestellten Versuche zum Metabolic Engineering von Fetthefen zeigen, dass diese Gruppe von Hefen durchaus als alternative Quelle für die in Ernährung und Gesundheit so wichtigen PUFAs erschlossen werden und so in den Focus der biotechnologischen Anwendung rücken kann. Eine wichtige Erkenntnis dieser Arbeiten ist aber auch, dass erfolgversprechende Ansätze eng mit einer vorhergehenden genetischen Charakterisierung der ausgewählten Hefen verbunden sind. Metabolic Engineering ist vor allen Dingen dann effektiv und erfolgreich möglich, wenn die Genetik des Zielorganismus bekannt ist, die genetischen Werkzeuge vorhanden sind und auch die Methoden zur genetischen Modifizierung etabliert sind. Sind diese Voraussetzungen erfüllt, können auch weitere, in dieser Arbeit nicht erfolgreich untersuchte Fetthefen zur Produktion gewünschter Fettsäuren herangezogen werden.

## Literatur

- Benatti, P., Peluso, G., Nicolai, R. and Calvani, M. (2004). Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *J Am Coll Nutr* 23, 281-302.
- Damude, H. G., Zhang, H., Farrall, L., Ripp, K. G., Tomb, J. F., Hollerbach, D. and Yadav, N. S. (2006). Identification of a bifunctional delta12/omega3 fatty acid desaturases for improving the ratio of omega3 to omega6 fatty acids in microbes and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9446-51.
- Herbige, L. S. (2003). Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids* 38, 323-341.
- Horrobin, D. F. (1992). Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Prog Lipid Res* 31, 163-94.
- Horrobin, D. F. (1993). Fatty acid metabolism in health and disease: the role of delta-6-desaturase. *Am J Clin Nutr* 57, 732S-736S; discussion 736S-737S.
- Horrobin, D. F. (1997). Essential fatty acids in the management of impaired nerve function in diabetes. *Diabetes* 46 Suppl 2, S90-3.
- Horrobin, D. F. (2000). Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema. *Am J Clin Nutr* 71, 367S-72S.
- Klabunde, J., Kunze, G., Gellissen, G. and Hollenberg, C. P. (2003). Integration of heterologous genes in several yeast species using vectors containing a Hansenula polymorpha-derived rDNA-targeting element. *FEMS Yeast Res* 4, 185-93.
- Li, D. (2003). omega-3 fatty acids and non-communicable disease. *Chinese Medical Journal* 116, 453-358.
- Madzak, C., Gaillardin, C. and Beckerich, J. M. (2004). Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J Biotechnol* 109, 63-81.
- Matsuda, O., Sakamoto, H., Hashimoto, T. and Iba, K. (2005). A temperature-sensitive mechanism that regulates post-translational stability of a plastidial omega-3 fatty acid desaturase (FAD8) in *Arabidopsis* leaf tissues. *J Biol Chem* 280, 3597-604.
- Oura, T. and Kajiwara, S. (2004). *Saccharomyces kluyveri* FAD3 encodes an omega3 fatty acid desaturase. *Microbiology* 150, 1983-90.
- Sheff, M. A. and Thorn, K. S. (2004). Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21, 661-70.
- Warude, D., Joshi, K. and Harsulkar, A. (2006). Polyunsaturated fatty acids: biotechnology. *Crit Rev Biotechnol* 26, 83-93.