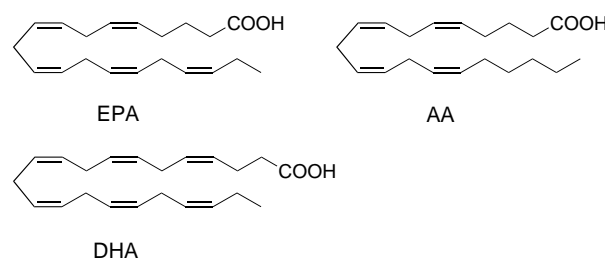


Biosynthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch Polyketid-Synthasen

Ursula Kaulmann und Christian Hertweck*

Die Virtuosität der Natur beim Verknüpfen und Modifizieren einfacher Carbonsäuremonomere, aus der die immense strukturelle Vielfalt der Polyketid- und Fettsäuremetabolite resultiert, ist seit den Arbeiten von Collie um die Jahrhundertwende ein faszinierendes Thema für interdisziplinäre Naturstoff-Forschung.^[1] In den letzten Jahrzehnten hat man dank moderner molekularbiologischer Methoden sehr viel über die Prozesse bei der Biosynthese von Fettsäuren und Polyketiden gelernt.^[2–4] Beide Biosynthesewege weisen starke Homologien auf, nicht nur bezüglich der chemischen Reaktionsmechanismen bei der Kettenverlängerung und des gemeinsamen Pools von einfachen Vorläufermolekülen (Acetyl-CoA, Malonyl-CoA),^[5, 6] sondern auch in dem Charakter der Enzyme, die für die Kettenverlängerung und Modifizierung verantwortlich sind.^[2, 7] Polyketide und Fettsäuren werden durch repetitive, decarboxylierende Claisen-Esterkondensationen einer Acyl-CoA Starterereinheit mit (Methyl)-Malonyl-CoA-Einheiten gebildet. Üblicherweise sind in diesen Prozess, der von einer β -Ketoacylsynthase (KS) katalysiert wird, auch (Malonyl)Acyltransferasen (MAT/AT) und Acyl-Carrier-Proteine (ACP) involviert. Nach diesen Kondensationsschritten wird bei der Fettsäurebiosynthese die β -Oxo-Funktionalität durch eine Ketoreduktase (KR), Dehydratase (DH) und Enoylreduktase (ER) so umgesetzt, dass im Allgemeinen ein vollständig gesättigtes Acyl-Rückgrat entsteht. Im Unterschied dazu werden bei der Polyketidbiosynthese reduktive Schritte teilweise oder ganz weggelassen, wodurch ein komplexeres Funktionalisierungsmuster entsteht. Die Elongations/Reduktions-Zyklen werden solange wiederholt, bis eine definierte Kettenlänge erreicht ist. Das Thioester-gebundene Substrat wird schließlich vom Enzymkomplex gelöst und weiteren Modifizierungen unterworfen, z.B. Desaturierung (häufig bei Fettsäuren), Oxidation, Glykosylierung oder Methylierung (häufig bei Polyketiden).^[8] Auf der Grundlage von genetischen Analysen und der Architektur der benötigten Proteine werden Fettsäuresynthasen (FAS) und Polyketid-Synthasen (PKS) grundsätzlich in zwei Klassen eingeteilt: Typ I, bei denen die aktiven Zentren linear auf einem großen Modul arrangiert sind, und Typ II, die aus einem nichtkovalenten Komplex aus kleinen, diskreten monofunktionalen Proteinen bestehen.^[9, 10] Trotz beachtlicher Ähnlichkeiten in Aufbau und Funktion unterscheiden sich FAS und PKS in ihrer typischen Aminosäuresequenz und werden – was noch entscheidender ist – dem Primär- und Sekundärmetabolismus zugeordnet. Es wird spekuliert, dass sich beide Biosynthesewege in einem frühen Stadium der Evolution getrennt haben.

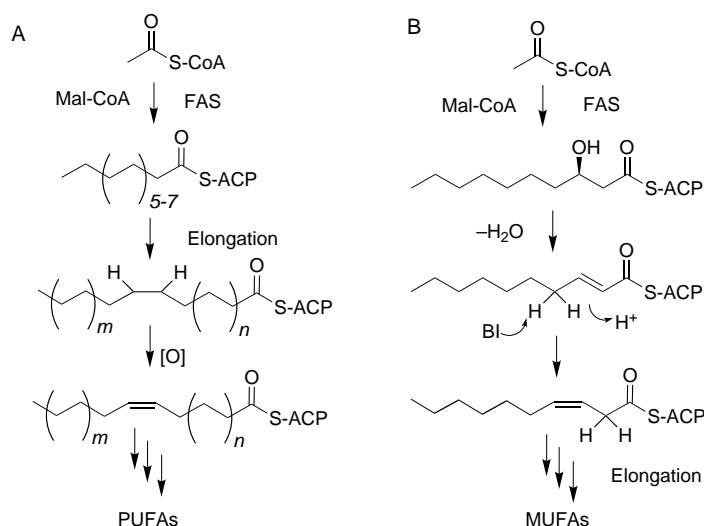
Mit diesem Wissen als Grundlage ist die vor kurzem gemachte Entdeckung, dass langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs) durch bakterielle Polyketidsynthasen biosynthetisiert werden können, eine bahnbrechende Neuigkeit.^[11] PUFAs sind seit langem als essentielle Bestandteile von Membranen in Hirn und Retina bekannt^[12, 13] sowie als Precursor von Signalmolekülen wie Prostaglandinen, Thromboxanen und Leukotrienen.^[14, 15] Bis vor kurzem wurde jedoch angenommen, dass diese Verbindungen ausschließlich von eukaryontischen Organismen gebildet werden können, und nicht von Bakterien. Erst in letzter Zeit haben einige Arbeitsgruppen unabhängig voneinander PUFAs wie Eicosa-pentaensäure (EPA, 20:5n3), Docosahexaensäure (DHA, 22:6n3) und Arachidonsäure (AA, 20:4n6) aus verschiedenen psychrophilen (kälteliebenden) Bakterien isoliert, z.B. aus *Shewanella hanedai*, *S. gelidimarina* und *Colwellia psycherythraea* (Schema 1).^[16–20] Im Rahmen eines Übersichtsartikels von Russell und Nichols wurde das lange existierende Dogma schließlich widerlegt, es blieb jedoch unerklärlich, wie diese bakteriellen Metabolite gebildet werden können.^[16]



Schema 1. Strukturen von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs), isoliert aus einigen psychrophilen marinen Bakterien und dem Protisten *Schizochytrium*.

Zur Einführung von Doppelbindungen in gesättigte Fettsäuren sind zwei zentrale Biosynthesewege bekannt. In Pflanzen, Säugetieren und Insekten können Doppelbindungen mit molekularem Sauerstoff als terminalen Elektronen-acceptor durch Positions-spezifische Desaturasen eingefügt werden (Schema 2, Route A). Über diesen Weg lassen sich sukzessive mehrere homokonjugierte Doppelbindungen herstellen.^[21] Anaerobe Bakterien hingegen können Doppelbindungen durch einen unvollständigen reduktiven Zyklus der FAS einbauen, wobei im Anschluss eine spezifische Isomerase-Aktivität eine 2,3-trans/cis-Umlagerung katalysieren kann (Schema 2, Route B). Im Unterschied zur aeroben Route können über diesen Mechanismus jedoch nur einfach ungesättigte Fettsäuren (MUFAs) gebildet werden.^[16] Obwohl sich die anaeroben und aeroben FAS-Biosynthesewege in einem einzelnen Organismus grundsätzlich nicht gegenseitig ausschließen,^[22] blieb die bakterielle PUFA-Biosynthese schleierhaft, da sie in vielen marinen Bakterien unter anaeroben Bedingungen gelingt. Einerseits ist es nicht

[*] Dr. C. Hertweck, Dr. U. Kaulmann
Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung
Beutenbergstr. 11a, 07745 Jena (Deutschland)
Fax: (+49) 3641-656-699
E-mail: hertweck@pmail.hki-jena.de



Schema 2. Biosyntheserouten (FAS) für ungesättigte Fettsäuren. Route A: aerob, in Pflanzen und Tieren. Route B: anaerob, in Mikroorganismen.

möglich, über den anaeroben Weg mehr als eine Doppelbindung pro Fettsäure einzuführen, und andererseits kann der konventionelle aerobe Weg nicht in Betracht gezogen werden.^[16] Konsequenterweise wurde angenommen, dass ein anderer Mechanismus und/oder Elektronenacceptor als molekularer Sauerstoff verfügbar sein müsste, aber es war anscheinend zu gewagt darüber zu spekulieren, ob das Methylen-unterbrochene Doppelbindungsmuster über einen völlig anderen Weg gebildet werden könnte.

Wie wurde dieses Rätsel gelöst? Dank der Anstrengungen von Yazawa konnten geclusterte Gene, die für die Synthese von EPA verantwortlich sind, 1996 erstmalig isoliert werden.^[20] Er identifizierte fünf offene Leserahmen (open reading frames, ORFs) aus dem EPA-produzierenden Bakterium *Shewanella* sp. Stamm SCRC2738, die notwendig und hinreichend für die EPA-Produktion in *Escherichia coli*^[23] sowie in einem Cyanobakterium (*Synechococcus* sp.) sind.^[23, 24] Erst vor kurzem wurden Proteinprodukte, für die der EPA-Cluster kodiert, von Forschern der gleichen Gruppe vorgeschlagen. Metz et al. konnten elf Regionen innerhalb der fünf ORFs als putative Enzymdomänen identifizieren.^[11] Die lineare Organisation der katalytischen Zentren in den ORFs erinnert an die von iterativen PKS aus Pilzen oder Typ-I-FAS. Es war eine große Überraschung, dass anstelle von Genen, die für Fettsäurebiosynthese, Elongation und aerobe Desaturierung kodieren, wie es von anderen Forschern für die bakterielle PUFA-Biosynthese vorgeschlagen wurde,^[16] Gene gefunden wurden, die einen gemischten Polyketid/Fettsäure-Biosyntheseweg suggerieren. Tatsächlich sind sämtliche in die PUFA-Biosynthese involvierten Ketosynthasen Homologe von Ketosynthasen aus bakteriellen modularen Typ-I-PKS und nicht verwandt mit FAS-Ketosynthasen.^[11] Metz et al. zufolge kodiert ORF5 für vier PKS-verwandte Enzymdomänen, die als KS, MAT, ACP (sechs Kopien) und KR fungieren. Eine PKS-ähnliche Phosphopantethein-Transferase und eine PKS-ähnliche AT werden von ORF2 bzw. ORF6 kodiert. ORF7 umfasst zwei PKS-verwandte KS-Gene und zwei FAS-artige

Gene, die Homologe von der *E. coli* Dehydratase FabA sind. Während eine KS vollkommen intakt ist, fehlt interessanterweise das Cystein im katalytischen Zentrum der zweiten KS, die daher inaktiv sein muss. Diese Konstellation zeigt eine auffällige Ähnlichkeit zu den KS_α- und KS_β-Untereinheiten der iterativen Typ-II-PKS, wobei die letztere häufig auch als Kettenlängenfaktor (CLF) bezeichnet wird.^[25] ORF8 kodiert schließlich für eine FAS-verwandte putative Enoylreduktase.

Gene mit großer Homologie zu dem *Shewanella*-Gencluster konnten in anderen marinen Bakterien, die PUFAs enthalten, gefunden werden. Das weist darauf hin, dass der neuartige PKS Biosyntheseweg unter diesen Organismen weit verbreitet ist. Im Jahr 1999 entdeckten Tanaka und Mitarbeiter vier ORFs in dem DHA-produzierenden Bakterium *Moritella marina* Stamm MP-1 (früher *Vibrio marinus* Stamm MP-1), die eine große Homologie zu den ORFs 5–8 des EPA-Biosynthesecusters aufweisen.^[26, 27] Zu dieser Zeit hatten Tanaka et al. bereits Informationen aus den Datenbanken genutzt und die Organisation der EPA- und DHA-Gencluster verglichen, die sich nur dadurch unterscheiden, dass der letztere zwei weitere für putative KS kodierende Regionen und fünf anstelle von sechs sich wiederholenden ACP-Motiven aufweist. Darüber hinaus konnte durch Gendisruption mit Hilfe der bekannten EPA-ORF3/4-Gensequenzen von *Shewanella* sp. SCRC2738 ein EPA-defizienter Stamm des Tiefseebakteriums *Photobacterium profundum* SS9 erfolgreich konstruiert werden, was ein weiterer Hinweis auf die allgemeine Verbreitung des neuartigen PUFA-Wegs bei psychrophilen marinen Bakterien ist.^[28] Aber auch für einen Eukaryonten, den marinen Protisten *Schizochytrium*, haben Metz et al. gezeigt, dass die DPA- und DHA-Biosynthese nicht notwendigerweise Membran-gebundene Desaturasen oder Fettsäure-Elongasen erfordert. Die auf drei ORFs lokalisierten Sequenzen zeigen Homologie zu acht der elf *Shewanella*-Domänen (Abbildung 1). Ein horizontaler Gentransfer erscheint daher wahrscheinlich.^[11]

Wie könnte ein gemischter PKS/FAS-Weg für die bakterielle PUFA-Biosynthese aussehen? In diesem Zusammenhang ist es nützlich, sich an die Funktion von FabA in *E. coli* zu erinnern.^[29] FabA ist eine von den zwei β -Hydroxyacyl-ACP-Dehydratasen, die an der Fettsäurebiosynthese in *E. coli* beteiligt sind. Nachdem die Acylkette eine Länge von zehn Kohlenstoffatomen erreicht hat, ist FabA dafür verantwortlich, den Fluss der Intermediate in den Biosynthesezweig der ungesättigten Fettsäuren zu steuern. Außer der Dehydratisierung katalysiert FabA auch die Isomerisierung von *trans*-2-Decenoyl-ACP zu *cis*-3-Decenoyl-ACP, welches den folgenden Reduktionsschritt (ER) übergeht. Das ungesättigte Acyl-ACP wird auf FabB geladen (eine von den zwei β -Ketoacyl-ACP-Synthasen), um den ersten Verlängerungszyklus der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren zu initiieren. Da die *Shewanella*-Dehydratasen eine große Homologie zu FabA aufweisen, werden vermutlich wenigstens einige der Doppelbindungen in EPA aus *Shewanella* sp. SCRC2738 über einen Dehydrase/Isomerase-Mechanismus eingeführt. Durch heterologe Expression des Clusters in *E. coli* wurde darüber hinaus gezeigt, dass die EPA-Biosynthese anaerob abläuft.^[11]

Ein plausibles Konzept, das von den bisherigen Kenntnissen abgeleitet werden könnte, wurde von Metz et al. vorge-

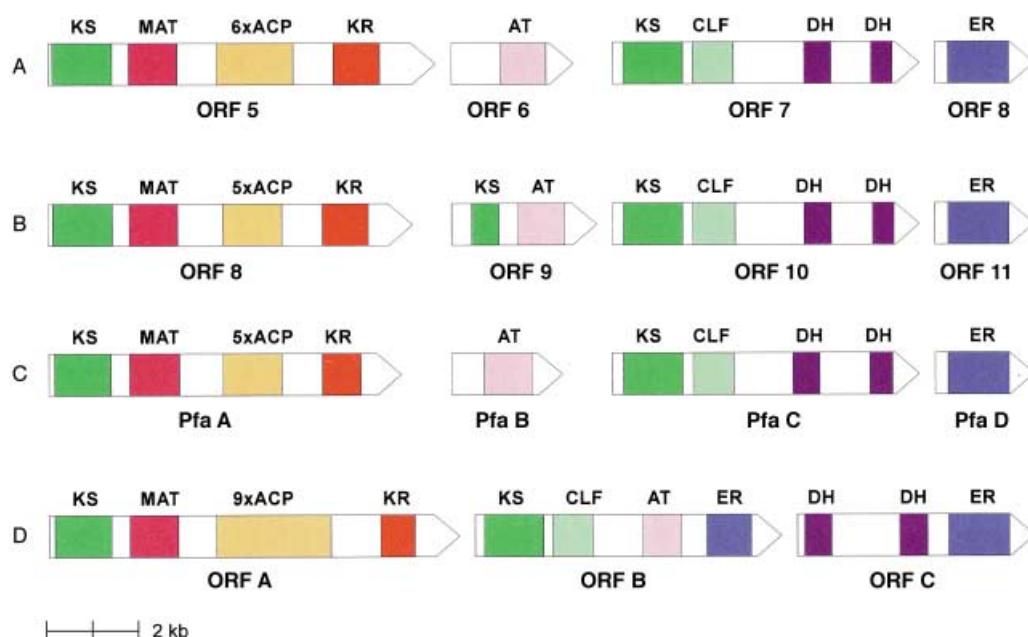


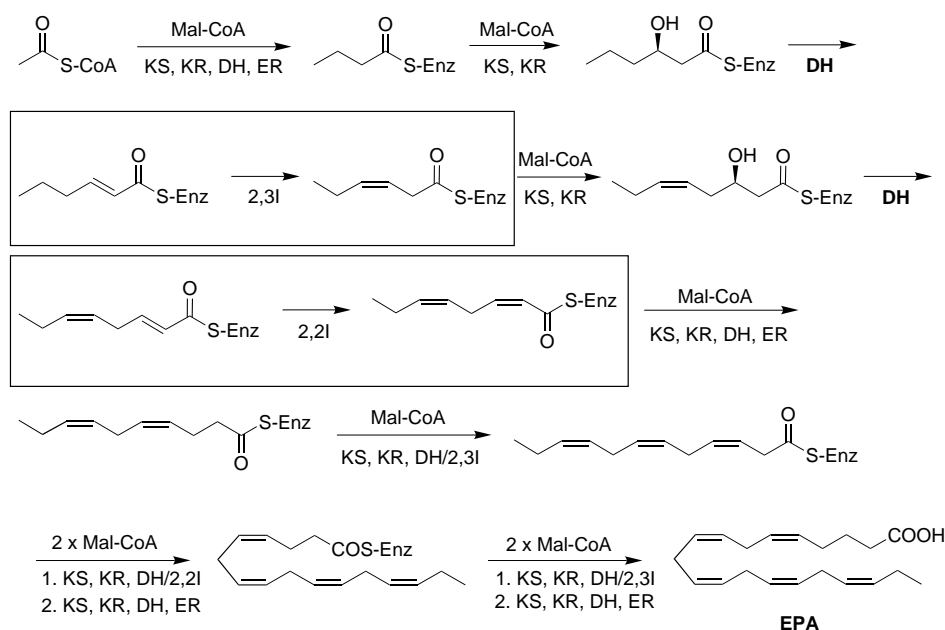
Abbildung 1. Organisation der Kernregionen von PUFA Biosynthese Genclustern; A: *Shewanella* sp. SCRC-2738 (GenBank Zugangsnr.: U73935.1);^[11] B: *Moritella marinus* Stamm MP-1 (GenBank Zugangsnr.: AB025342.1);^[26, 27] C: *Photobacterium profundum* Stamm SS9 (GenBank Zugangsnr.: AF409100, unveröffentlichte Daten); D: *Schizochytrium* (GenBank Zugangsnr.: AF378327, AF378328, AF378329).^[11]

schlagen (Schema 3): Der erste Elongationsschritt mit einem putativen Acetyl-CoA-Startermolekül und Malonyl-CoA sowie ein vollständiger reduktiver Zyklus werden von KS, KR, DH und ER katalysiert. Der nächsten Kettenverlängerung schließt sich eine Ketoreduktion zum β -Hydroxyester an. Die FabA-ähnliche bifunktionelle Dehydratase/Isomerase würde dann sowohl die Dehydratisierung als auch die *trans*-2,3-*cis*-Umlagerung des Acyl-ACP-Intermediates katalysieren. In Analogie zu dem Bedarf an einer speziellen

β -Ketoacyl-ACP-Synthase in *E. coli* für die Verlängerung des 3-*cis*-Acyl-ACP-Intermediates, könnte eine definierte KS für die weitere Verlängerung der Kette verantwortlich sein. Nach anschließenden Reduktions- und Dehydratisierungsschritten würde ein homokonjugiertes Doppelbindungssystem eine *trans*-2,2-*cis*-Isomerisierung erfordern. Eine vergleichbare Reaktion ist für die Regenerierung von 11-*cis*-Retinol bekannt. Für die EPA-Biosynthese würden die gleichen Reaktionssequenzen zweimal wiederholt, wobei der letzten 2,3-

Isomerisierung ein Verlängerungsschritt mit vollständiger Reduktion folgen würde (Schema 3). Ganz ähnlich könnten die Bildung von DHA und AA erklärt werden. Der vorgeschlagene Biosyntheseweg muss jedoch auf jeden Fall verifiziert und detaillierter durch biochemische Analysen untersucht werden. Wie bei den iterativen Typ-I-PKS aus Pilzen ist es vollkommen unklar, wie Kettenlänge und Grad der Reduktion bei spezifischen Schritten kontrolliert werden. Ebenso ist die Funktion der multiplen ACPs (5–9 Kopien!) bei der PUFA-Biosynthese rätselhaft.

Welchen Nutzen können wir aus der Entdeckung von PUFA-Genclustern ziehen? Die Identifizierung und die funktionelle Analyse dieser neuartigen Gencluster ist aufgrund folgender Gründe relevant: Sie lassen sich



Schema 3. Vorgeschlagener Biosyntheseweg von EPA in *Shewanella* sp. mit putativen Intermediaten und involvierten katalytischen Aktivitäten. Mal-CoA: malonyl-CoA; KS: Ketosynthase; KR: Ketoreduktase; DH: Dehydratase; ER: Enoylreduktase; 2,3I: 2,3-Isomerase; 2,2I: 2,2-Isomerase.

für die biotechnologische Erzeugung von PUFAs aus marinen Bakterien nutzen. Da medizinische Studien zeigen, dass PUFAs nachweislich unter anderem Arteriosklerose und Herzkrankheiten vorbeugen, besteht ein großer Bedarf an solchen Wirkstoffen.^[16, 30] Psychrophile Bakterien könnten als primäre PUFA-angereicherte Futterquelle für künstliche Nahrungsketten in der Aquakultur-Industrie dienen und somit den natürlichen Fischbestand schonen. Gentransfer in industriell relevante Produzenten wäre eine weitere Möglichkeit, den PUFA-Bedarf zu decken.^[24] Abgesehen von den kommerziellen Aspekten könnten PUFA-Gene dazu beitragen, alte Klassifikationen der Taxonomie von Bakterien neu zu definieren, neue Einteilungen zu schaffen und die Evolution zurückzuverfolgen.^[17, 31] Neue Stämme mit aktiven oder stillen Kopien von PUFA-Genen könnten sich mit molekularbiologischen Werkzeugen identifizieren lassen, und es könnte mehr über die weltweite Verbreitung von Stämmen mit PUFA-Biosynthese-Genclustern und ihre ökologische Bedeutung erfahren werden.^[18, 32] Schließlich könnten die Gene der PUFA-Biosynthese, die sich sowohl in Struktur als auch in Mechanismus von bereits bekannten PKS unterscheiden (insbesondere die neuartigen putativen Dehydratasen/Isomerasen), neue Werkzeuge für die kombinatorische Biosynthese von Polyketid-Antibiotika bereitstellen.^[33–35]

- [1] R. Bentley, J. W. Bennett, *Annu. Rev. Microbiol.* **1999**, 53, 411.
- [2] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rev.* **2001**, 18, 380.
- [3] D. O'Hagan, *The Polyketide Metabolites*, Ellis Horwood, Chichester, **1991**.
- [4] J. W. Campbell, J. E. J. Cronan, *Annu. Rev. Microbiol.* **2001**, 55, 305.
- [5] B. J. Rawlings, *Nat. Prod. Rep.* **1998**, 15, 275.
- [6] B. S. Moore, C. Hertweck, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 70.
- [7] M. P. Crump, J. Crosby, C. E. Dempsey, J. A. Parkinson, M. Murray, D. A. Hopwood, T. J. Simpson, *Biochemistry* **1997**, 36, 6000.
- [8] C. Khosla, R. S. Gokhale, J. R. Jacobsen, D. E. Cane, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 219.
- [9] D. A. Hopwood, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 2465.

- [10] J. L. Harwood, N. J. Russell, *Lipids in Plants and Microbes*, George Allen and Unwin, London, **1984**.
- [11] J. G. Metz, P. Roessler, D. Facciotti, C. Levering, F. Dittrich, M. Lassner, R. Valentine, K. Lardizabal, F. Domergue, A. Yamada, K. Yazawa, V. Knauf, J. Browse, *Science* **2001**, 293, 290.
- [12] L. Lauritzen, H. S. Hansen, M. H. Jorgensen, K. F. Michaelsen, *Prog. Lipid Res.* **2001**, 40, 1.
- [13] M. McConn, J. Browse, *Plant J.* **1998**, 15, 521.
- [14] A. Heller, T. Koch, J. Schmeck, K. van Ackern, *Drugs* **1998**, 55, 487.
- [15] R. A. Creelman, J. E. Mullet, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1997**, 48, 355.
- [16] N. J. Russell, D. S. Nichols, *Microbiology* **1999**, 145, 767.
- [17] D. Nichols, J. Bowman, K. Sanderson, C. Mancuso Nichols, T. Lewis, T. McMeekin, P. D. Nichols, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, 10, 240.
- [18] F. DeLong, A. A. Yayanos, *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, 51, 730.
- [19] K. Watanabe, C. Ishikawa, I. Ohtsuka, M. Kamata, M. Tomita, K. Yazawa, H. Muramatsu, *Lipids* **1997**, 32, 975.
- [20] K. Yazawa, *Lipids* **1996**, 31, S297.
- [21] H. Sprecher, Q. Chen, *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* **1999**, 60, 317.
- [22] M. Wada, N. Fukunaga, S. Sasaki, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1991**, 37, 355.
- [23] R. Yu, A. Yamada, K. Watanabe, K. Yazawa, H. Takeyama, T. Matsunaga, R. Kurane, *Lipids* **2000**, 35, 1061.
- [24] H. Takeyama, D. Takeda, K. Yazawa, A. Yamada, T. Matsunaga, *Microbiology* **1997**, 143, 2725.
- [25] B. J. Rawlings, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 425.
- [26] M. Tanaka, A. Ueno, K. Kawasaki, I. Yumoto, S. Ohgiya, T. Hoshino, K. Ishizaki, H. Okuyama, N. Morita, *Biotechnol. Lett.* **1999**, 21, 939.
- [27] N. Morita, M. Tanaka, H. Okuyama, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28, 943.
- [28] E. E. Allen, D. Facciotti, D. H. Bartlett, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65, 1710.
- [29] R. J. Heath, C. O. Rock, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 27795.
- [30] R. S. Lees, *Food Sci. Technol.* **1990**, 37, 1.
- [31] D. S. Nichols, P. D. Nichols, N. J. Russell, N. W. Davies, T. A. McMeekin, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1347, 164.
- [32] D. S. Nichols, P. Hart, P. D. Nichols, T. A. McMeekin, *Aquaculture* **1996**, 147, 115.
- [33] L. Rohlin, M. K. Oh, J. C. Liao, *Curr. Opin. Microbiol.* **2001**, 4, 330.
- [34] P. F. Leadlay, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, 1.
- [35] M. Chartrain, P. M. Salmon, D. K. Robinson, B. C. Buckland, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, 11, 209.