

Die Fettsäure-Fabrik der Hefe

Thomas Kolter*

Stichwörter:

Fettsäuren · Lipide · Metabolismus ·
Proteinstrukturen · Röntgenbeugung

Im Cytoplasma von Hefen, Pilzen und Tieren werden Fettsäuren von sehr großen Proteinkomplexen gebildet. In zwei Veröffentlichungen wurden kürzlich die sehr ähnlichen Strukturen der 2.6 Megadalton großen Fettsäure-Synthasen (FAS) des Pilzes *Thermomyces lanuginosus*^[1] und der Hefe^[2] in 3.1 Å Auflösung beschrieben. Eine 4-Å-Struktur des Hefe-Enzyms erlaubte zusätzliche Einblicke.^[3] Die Strukturen ermöglichen ein tieferes Verständnis davon, wie diese riesigen molekularen Fabriken arbeiten.

Fettsäuren sind essenzielle Metabolite aller Organismen außer den Archaeobakterien und fungieren als strukturelle Bestandteile von Membranlipiden, als wichtigste Speicherform von Stoffwechselenergie sowie als Komponenten posttranslational modifizierter Proteine. Zwar nutzen verschiedene Organismen die gleiche Reaktionssequenz zur Biosynthese von Fettsäuren, allerdings unterscheidet sich die Organisation der dafür benötigten Enzymaktivitäten erheblich: Die Fettsäure-Synthasen vom Typ 1 (FAS I) im Cytoplasma von Hefen, Pilzen und Tieren, aber auch in einigen Bakterien wie Corynebakterien und Mykobakterien sind Megasyntasen, die die Enzymaktivitäten auf nur einer oder zwei Polypeptidketten beherbergen. In Prokaryoten, Pflanzen, aber auch in den Mitochondrien tierischer Zellen werden die verschiedenen Reaktionen, die zur Bildung von Fettsäuren führen, von unabhängigen Enzymen katalysiert, den so genannten Typ-II-Fettsäure-Synthasen (FAS II).^[4] Auch die Bildung sehr langkettiger Fettsäuren durch Verlängerung von Vorstufen mittlerer Kettenlänge wird durch individuelle Enzyme katalysiert, die im endoplasmatischen Reticulum, in den Mitochondrien und in den Peroxisomen der Zellen lokalisiert sind.

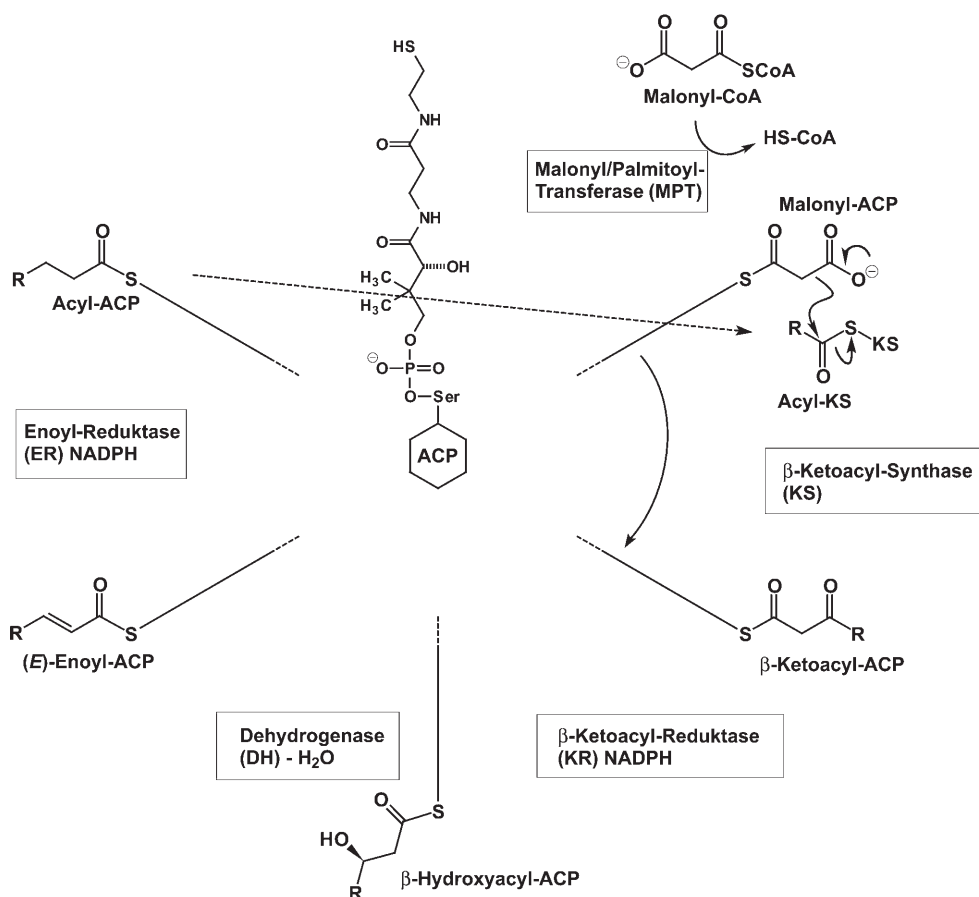
Die Architektur eukaryotischer FAS I von Tieren unterscheidet sich erheblich von derjenigen von Pilzen.^[5–8] Während es sich beim Säugetier-Enzym um ein X-förmiges Homodimer handelt, das von einem einzigen Gen codiert wird und ein Molekulargewicht von 540 kDa aufweist, bildet die Biosynthesemaschine von Hefen und Pilzen ein Hexamer

zweier verschiedener Polypeptid-Ketten mit der Stöchiometrie $\alpha_6\beta_6$. Dabei handelt es sich um eine riesige, fassförmige Fabrik mit einem Molekulargewicht von 2.6 Megadalton. Obwohl die Typ-I-Synthasen von Tieren und Pilzen seit vielen Jahren untersucht wurden,^[9,10] gelang es erst 2006 der Arbeitsgruppe von Ban, röntgenographisch Strukturen der Enzyme mit 5 Å Auflösung zu erhalten.^[5,6] Dies ermöglichte einen detaillierten Vergleich der Enzyme von Tieren und Pilzen oder Hefen.^[7,8]

Im Cytoplasma von Pilzen und Hefen sind zur Biosynthese von Fettsäuren zwei Enzyme erforderlich: eine Malonyl-Coenzym-A-Synthase sowie der Fettsäure-Synthase-Komplex, der acht verschiedene Enzymaktivitäten umfasst (Schema 1). Die Bildung des Coenzym-A-Derivats von Palmitinsäure, dem Hauptprodukt der Synthase, erfordert acht Moläquivalente Acetyl-Coenzym A, von denen sieben Moläquivalente zu Malonyl-Coenzym A carboxyliert werden müssen, bevor sie von der Synthase genutzt werden können. 14 Moläquivalente NADPH werden in den Reduktionsschritten bei der Synthese von Palmitoyl-CoA verbraucht.

FAS I verwenden eine begrenzte Zahl aktiver Zentren in iterativer Weise und modifizieren Substrate zunehmender Kettenlänge. Bevor die Fettsäure-Synthese beginnen kann, wird eine Phosphopantetheinyl-Transferase (PPT) für die posttranslationale Übertragung eines 18 Å langen Phosphopantethein-„Arms“ von Coenzym A auf das Acyl-Carrier-Protein (ACP) benötigt. In Pilzen und Hefen befindet sich diese Aktivität am C-Terminus der α -Untereinheit, während sie beim Menschen auf einem individuellen Enzym lokalisiert ist.^[11] Die ACP-Domäne transportiert die Thioester-gebundenen Reaktionsintermediate zwischen den verschiedenen aktiven Zentren. Der Reaktionszyklus beginnt mit der Priming-Reaktion: dem Transfer eines Acetylrestes von Acetyl-CoA auf den Thiol-Rest des ACP-Arms. In Hefen und Pilzen wird dieser Vorgang durch die Acetyl-Transferase (AT) katalysiert. Der Acetylrest wird anschließend auf eine Cystein-Seitenkette der β -Ketoacyl-Synthase(KS)-Domäne übertragen. Danach bewegt sich das ACP zur Malonyl/Palmitoyl-Transferase(MPT)-Domäne, empfängt einen Malonylrest und bringt ihn zurück zur KS-Domäne. KS, ein Enzym der Thiolase-Superfamilie,^[12] katalysiert die Bildung der C-C-Bindung durch eine decarboxylierende Claisen-Kondensation.^[13] Nach Decarboxylierung verdrängt das ACP-gebundene Thioester-Enolat KS vom Acetylrest. Der resultierende β -Ketoacyl-Rest ist nun an den Arm des ACP gebunden. Nach einer Folge dreier Schritte – der NADPH-abhängigen Reduktion

[*] Priv.-Doz. Dr. T. Kolter
LiMES – Life and Medical Sciences
Program Unit Membrane Biology and Lipid Biochemistry
Universität Bonn
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
Fax: (+49) 228-73-7778
E-Mail: tkolter@uni-bonn.de
Homepage: <http://www.uni-bonn.de/~tkolter>



Schema 1. Reaktionen, die durch die Fettsäure-Synthasen (FAS) von Hefen und Pilzen katalysiert werden. Die Aktivierung von ACP durch PPT ist nicht gezeigt.

des Ketons (β -Ketoacyl-Reduktase, KR), Dehydratisierung (Dehydrogenase, DH) und NADPH-abhängiger Reduktion der resultierenden Doppelbindung (Enoyl-Reduktase, ER) – ist der ACP-gebundene Acyl-Rest für die weitere Elongation durch Wiederholung der Reaktionssequenz vorbereitet. Er wird vom ACP auf das KS-Cystein übertragen, mit Malonyl-CoA kondensiert und durchläuft so lange den Elongationszyklus, bis eine Kettenlänge von 16 Kohlenstoff-Atomen erreicht ist. Der Palmitoyl-Rest wird dann von der MPT-Untereinheit des Pilz-Enzyms auf Coenzym A transferiert, während das Enzym von Tieren durch Thioesterase-vermittelte Hydrolyse des Palmitoyl-ACP die freie Fettsäure freisetzt. Andere Unterschiede zwischen FAS I von Tieren und der Fettsäure-Synthase von Hefen und Pilzen bestehen darin, dass bei Tieren in der Priming-Reaktion Acetyl-CoA und Malonyl-CoA durch dieselbe Enzymaktivität auf das ACP übertragen werden – die Malonyl-CoA/Acetyl-CoA-ACP-Transacylase – und dass bei Tieren die PPT-Untereinheit nicht Teil der FAS-I-Polypeptid-Kette ist.

Die FAS-I-Fabrik enthält vier funktionelle Domänen pro Untereinheit: ACP, KR, KS und PPT auf der α -Kette sowie AT, ER, DH und MPT auf der β -Kette. Jede Kette ist sechsmal im Komplex enthalten, sodass pro FAS 48 aktive Zentren vorhanden sind. Mit Ausnahme von ACP und PPT wurden die Domänen bereits zuvor mithilfe von Kryoelektronenmikroskopie, biochemischen Daten und Röntgenbeu-

gungsdaten niedrigerer Auflösung auf der dreidimensionalen Proteinstruktur lokalisiert.

Die Struktur von FAS I von *Thermomyces lanuginosus* im Festkörper wurde mit 3.1 Å Auflösung bestimmt.^[1] Dabei ermöglichte die Kenntnis der Strukturen der einzelnen bakteriellen FAS-II-Proteine die Interpretation der Elektronendichtekarten. Der Kristall mit der Raumgruppe $P2_1$ hatte eine Elementarzelle mit einem Volumen von $216 \times 414 \times 222 \text{ Å}^3$, einen Lösungsmittelinhalt von 66 % und enthielt ein FAS-Molekül pro Elementarzelle. 21 127 Aminosäure-Reste (89 %) waren aufgelöst, zusätzlich sechs Flavinmononucleotid-Einheiten und – im Falle eines zweiten, mit NADP^+ behandelten Kristalls – zwölf NADP^+ -Moleküle in den aktiven Zentren von KR und ER. Das Protein hat eine Fass-ähnliche Struktur von 270 Å Länge und 250 Å Durchmesser. Die Struktur kann aufgefasst werden, als bestehe sie aus einem zentralen Rad mit D_3 -Symmetrie, das von den sechs α -Untereinheiten gebildet wird, und zwei C_3 -symmetrischen Kappen, die sich über und unter der Ebene des Rads befinden. Die Kappen werden jeweils von drei β -Untereinheiten gebildet, aber auch von Teilen (3×94 Aminosäuren) des N-Terminus dreier α -Ketten (Abbildung 1).^[1] Die Reaktionskammern ober- und unterhalb des Rads sind über Öffnungen in der Außenseite zugänglich, etwas, das zuvor in einer anderen molekularen Maschine, dem Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, gesehen wurde. Die ACP-Domäne, die über flexi-

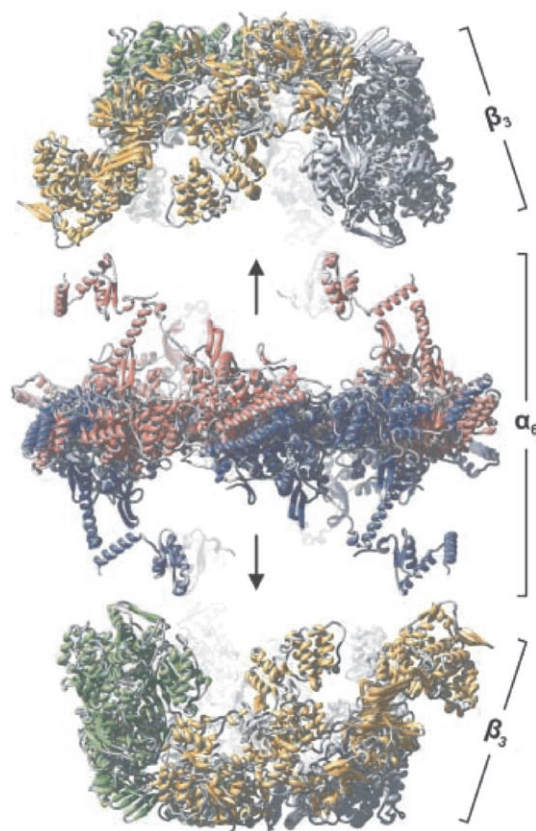


Abbildung 1. Seitenansicht auf die Quartärstruktur und Untereinheiten-Verteilung der Pilz-FAS I.^[1] Der Übersichtlichkeit wegen wurden das zentrale Rad und die Kapfen voneinander entfernt dargestellt. Die α -Untereinheiten sind in Blau und Pink, die β -Untereinheiten in Grün, Braun und Grau wiedergegeben.

ble Linker mit der Kappe und dem Rad verbunden ist, ist in der Struktur nicht sichtbar. Elektronendichte, die zeitgemittelten Positionen der ACP-Domäne zugeordnet werden kann, wurde mit Kryoelektronenmikroskopie in 18 Å Auflösung bestimmt.^[1] Für ein Modell jedoch, wie sich diese Domäne während der Katalyse bewegt, standen nur die relativen Positionen der ACP-Ankerpunkte und der aktiven Zentren zur Verfügung. Auch die PPT-Domäne ist in der Struktur nicht sichtbar.

Die Struktur der Hefe-Synthase lieferte Informationen über das ACP, das in der Struktur des Pilz-Enzyms nicht aufgelöst war.^[2] Die Struktur wurde durch molekularen Ersatz (molecular replacement) mithilfe der Koordinaten des *T. lanuginosus*-Enzyms gelöst. Das Hefe-Protein kristallisierte in der Raumgruppe $P4_12_12$; die Elementarzelle hatte ein Volumen von $231 \times 231 \times 784 \text{ Å}^3$. Trotz unterschiedlicher Raumgruppen zeigten beide Strukturen nur geringfügige Unterschiede. Ein bemerkenswerter Unterschied betrifft das ACP, das in der Struktur des Pilz-Enzyms ungeordnet vorlag, im Hefe-Enzym aber an die KS-Domäne fixiert war. Anders als bei der später publizierten Struktur niedrigerer Auflösung^[3] war der Phosphopantethein-Arm posttranslational ans ACP gebunden. Die Phosphat- und Pantoinsäure-Einheit des Arms, nicht aber der terminale Cysteamin-Rest und die β -Alanin-Einheit, waren aufgelöst. Durch Modellieren des

fehlenden Teils konnte eine Struktur erhalten werden, in der der Arm in die katalytische Spalte der KS ragt und neben dem Cystein-Rest der katalytischen CHH-Triade endet. Dieser Arm transportiert die wachsende Acylkette zwischen den aktiven Zentren und war möglicherweise wegen der höheren Affinität zur KS dort im Kristall lokalisiert. Die Autoren konnten aus den Koordinaten einen „Klappmesser“-Mechanismus ableiten, durch den sich der Substrat-beladene Arm von einer hydrophoben Fläche auf dem ACP zum aktiven Zentrum der KS bewegen kann.

Die 4-Å-Struktur der FAS I von Hefe^[3] wurde mit Kristallen bestimmt, die durch Zufall erhalten wurden, als die Autoren versuchten, die ribosomale 40S-Untereinheit der Hefe zu kristallisieren. In dieser Struktur konnten sowohl die ACP- als auch die PPT-Domäne den Elektronendichtekarten zugeordnet werden. Es wurden zwei Kristalle der Raumgruppen $P2_1$ und $P4_32_12$ analysiert. Neunfache nichtkristallographische Mittelung ermöglichte die Entwicklung eines Modells, das die Rückgrate von 1687 der 1887 Aminosäuren der α -Untereinheit enthielt, sämtlicher der β -Untereinheit und etwa 50 % der Seitenketten. Entsprechend diesem Modell finden die Priming-, Elongations- und Terminationsreaktionen in sechs Reaktionskammern statt, drei oberhalb und drei unterhalb des zentralen Rads. Jede Reaktionskammer enthält sieben katalytische Zentren von zwei α - und zwei β -Untereinheiten. Wiederum war der ACP-Rest an die KS-Domäne gebunden; allerdings war die PPT-Domäne außerhalb des FAS-Partikels lokalisiert. Da sie dem ACP nicht zugänglich war, scheint diese Domäne in einer inaktiven Konformation vorzuliegen, und vermutlich muss das Anheften des Phosphopantethein-Arms an das ACP vor dem Zusammenbau des Komplexes erfolgen.

Was können wir von diesen Strukturen lernen? Eine Frage ist, wie man sich den Substrat-Transport zwischen den verschiedenen aktiven Zentren durch das ACP vorstellen kann. Einem von den Autoren vorgeschlagenen Modell zufolge^[3] senkt sich das ACP nach AT-vermitteltem Acyltransfer von der Decke der Reaktionskammer und bringt dabei die Substrate in der Reihenfolge $KS \rightarrow MPT \rightarrow KS \rightarrow KR \rightarrow DH \rightarrow ER$ zu den aktiven Zentren. Das Andocken an die aktiven Zentren wird durch elektrostatische Wechselwirkung zwischen komplementär geladenen Flächen auf dem ACP und in der Nähe der katalytischen Zentren vermittelt.^[1–3] Das aktive Zentrum der AT-Domäne ist enger als das der MPT; darüber hinaus fehlt ihm ein positiv geladener Rest, wodurch die bevorzugte Bindung von Acetyl-CoA gegenüber Malonyl-CoA bei der Priming-Reaktion verständlich wird. Eine weitere Frage, der sich die Autoren zugewandt haben, ist die, wie die Elongation der Substrate auf der Stufe einer Kettenlänge von 16–18 Kohlenstoff-Atomen terminiert wird. Dies geschieht auf der Stufe von ACP-gebundenen Palmitoyl- oder Stearoyl-Resten, die anschließend auf Coenzym A transferiert werden. Die Strukturen zeigen einen hydrophoben Hohlraum in der Nähe der MPT-Terminationsstelle von etwa 24 Å Länge (Abbildung 2). Eine stabile Assoziation des Substrats an diese Stelle sollte eine kritische Mindestkettenlänge erfordern, bevor ein Acyltransfer auf Coenzym A stattfinden kann. Wie vor mehr als dreißig Jahren postuliert,^[14] wird die Alkylkettenlänge des Produkts durch Vergleich mit einem

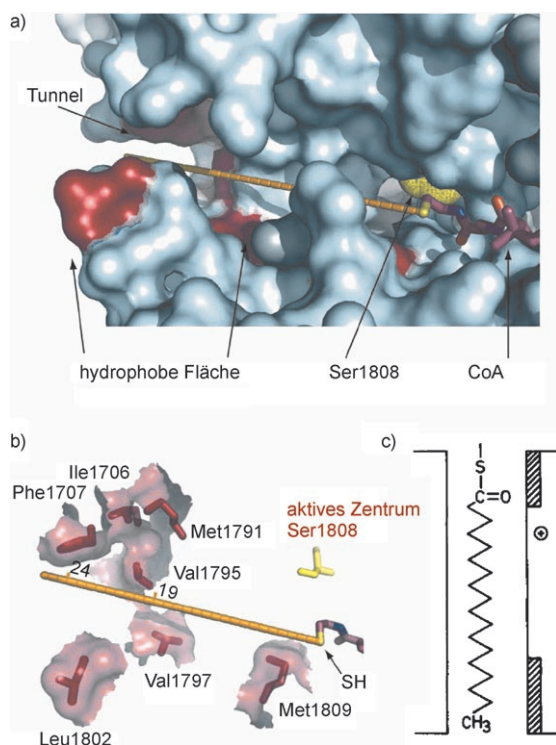


Abbildung 2. a) Die Terminationsstelle auf der MPT-Domäne und b) hydrophobe Flächen. Der orangefarbene Stab verdeutlicht die Position des hydrophoben Tunnels; der Abstand von der SH-Gruppe des Coenzym A ist darauf in Å angegeben.^[3] c) Modell dieser Region einschließlich der hydrophoben Bereiche (schraffiert), wie sie von Lynen postuliert wurden.^[10]

Maßstab bestimmt, der durch die Länge der hydrophoben Spalte gegeben ist.

Darüber hinaus wird der Zugang von Malonyl-CoA zum aktiven Zentrum der MPT-Domäne in Gegenwart eines langkettigen Coenzym A behindert. Dies bedeutet, dass der

freie Schwingarm nur mit Acetyl-CoA durch die AT-Domäne und nicht mit Malonyl-CoA beladen werden kann, wodurch die Termination eines Reaktionszyklus mit dem Start eines neuen Zyklus synchronisiert wird.

Die Strukturen sind nicht nur erstaunliche Beispiele für einen Biokatalysator – Strukturunterschiede zwischen der FAS-I-ER-Domäne von Tieren und Pilzen könnten auch zur Entwicklung neuer Fungizide genutzt werden. Die zitierten Arbeiten^[1–3] zeichnen hochaufgelöste Bilder einer der Maschinen, die mithilfe einer beweglichen Domäne oder eines Schwenkarms vielstufige Reaktionen katalysieren,^[15] wie etwa der Pyruvat-Dehydrogenase, der Polyketid-Synthasen oder nichtribosomaler Peptid-Synthetasen.

Online veröffentlicht am 9. August 2007

- [1] S. Jenni, M. Leibundgut, D. Boehringer, C. Frick, B. Mikolásek, N. Ban, *Science* **2007**, *316*, 254–261.
- [2] M. Leibundgut, S. Jenni, C. Frick, N. Ban, *Science* **2007**, *316*, 288–290.
- [3] I. B. Lomakin, Y. Xiong, T. A. Steitz, *Cell* **2007**, *129*, 319–332.
- [4] S. W. White, J. Zheng, Y. M. Zhang, C. O. Rock, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 791–831.
- [5] S. Jenni, M. Leibundgut, T. Maier, N. Ban, *Science* **2006**, *311*, 1263–1267.
- [6] T. Maier, S. Jenni, N. Ban, *Science* **2006**, *311*, 1258–1262.
- [7] S. Smith, *Science* **2006**, *311*, 125–126.
- [8] J. E. Cronan, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 232.
- [9] N. Kresge, R. D. Simoni, R. L. Hill, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, e5–e7.
- [10] F. Lynen, *Eur. J. Biochem.* **1980**, *112*, 431–442.
- [11] A. K. Joshi, L. Zhang, V. S. Rangan, S. Smith, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 33142–33149.
- [12] A. M. Haapalainen, G. Meriläinen, R. K. Wierenga, *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 64–71.
- [13] R. J. Heath, C. O. Rock, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 581–596.
- [14] M. Sumper, D. Oesterheld, C. Riepertinger, F. Lynen, *Eur. J. Biochem.* **1969**, *10*, 377–387.
- [15] R. N. Perham, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 961–1004.