



Biokatalysator Hefe: Ein Modellsystem zum Studium des Fettstoffwechsels

The Biocatalyst Yeast: a Model System to Study Lipid Metabolism

Lipide (Fette) bilden eine wichtige biochemische Substanzklasse, die einerseits für den Aufbau zellulärer Strukturen (Organellen, biologische Membranen) benötigt wird und andererseits als Reservestoff für einen Organismus dient, der bei Bedarf mobilisiert wird. Die Arbeitsgruppen des Instituts für Biochemie der TU Graz beschäftigen sich seit mehr als zwei Jahrzehnten mit Problemen der Lipidsynthese, des Einbaus von Lipiden in Membranen und den biochemischen, biophysikalischen und zellbiologischen Auswirkungen von Defekten, die durch Abnormitäten im Lipidhaushalt hervorgerufen werden. Meine Arbeitsgruppe studiert seit vielen Jahren unterstützt durch den Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF) in Österreich grundlegende Aspekte der Biochemie, Zellbiologie und Molekularbiologie der Lipide am Modellsystem Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*). In den beiden Projekten „Lipidpartikel der Hefe“ (FWF 13669) und „Neutrallipide der Hefe“ (FWF 15141) wurden speziell die Synthese, die Depotbildung und die Mobilisierung von Triglyceriden und Sterolestern, den beiden wichtigsten Lipid-Reservestoffen in Hefe, untersucht.

Die Problemstellung

Bestimmte Substanzklassen der Lipide (Phospholipide, Sterole, Sphingolipide) spielen als Strukturelemente für biologische Membranen eine wichtige und zum Teil sogar essentielle Rolle. Sie bilden in den meisten Fällen Membrandoppelschichten, die die Zelle einerseits nach außen abgrenzen und andererseits innerhalb der Zelle bestimmte Kompartimente (Organellen) umschließen. Neben den genannten Lipidklassen kennt man zwei Kategorien der sog. Neutrallipide (so bezeichnet, da sie keine freie Ladung besitzen): die Triglyceride (Fettsäureester des Glycerins) und Sterolester (Fettsäureester der Sterole, wie z.B. Cholesterin). Diese Lipide bilden mehr oder weniger erwünschte Energiedepots. Sowohl Triglyceride (TG) als auch Sterolester (STE) gelten als Risikofaktoren, da ihre Akkumulation z.B. beim Menschen zu krankhaften Erscheinungsbildern wie etwa Arteriosklerose führen kann. Andererseits bilden Neutrallipide einen wichtigen Rohstoff für technologische Prozesse. Aus diesen Gründen ist ein grundlegendes Verständnis der Biosynthese dieser Substanzen, des molekularen Hintergrunds ihres Stoffwechsels sowie der Regulation der beteiligten Stoffwechselwege auf enzymatischer und zellulärer Ebene von größtem Interesse.

Das Modellsystem

Ein biochemisches Modellsystem, das in den letzten beiden Jahrzehnten große Bedeutung in Forschung und praxisorientierter Entwicklung biologischer Prozesse erlangte, ist die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dieses experimentelle System eignet sich sehr gut für Untersuchungen zu den oben beschriebenen Fragestellungen. Obwohl die Verwendung dieses Mikroorganismus, den man im täglichen Leben eher mit Bierproduktion oder Brotbacken in Zusammenhang bringt, für wissenschaftliche Untersuchungen banal klingen mag, besitzt er doch ein immenses Potenzial für den Bio-Wissenschaftler. Die Hefe weist nicht nur strukturell und funktionell sehr viele Parallelen zu den Zellen anderer sog. höherer Organismen (Eukaryonten) wie Pflanzen, Tiere und Mensch auf, sondern sie besitzt auch unschätzbare Vorteile im experimentellen Umgang. Einfache Anzucht, rasche Vermehrung, einfache Manipulierbarkeit durch Wachstumsbedingungen und Nährstoffe, sowie die Verfügbarkeit relativ einfacher molekularbiologischer Methoden zur Veränderung des Genoms und der Konstruktion von Mutanten zählen zu den wichtigsten Vorteilen

der Hefe gegenüber anderen zellulären Systemen. Hefe war die erste Eukaryontenzelle, deren Genom vollständig sequenziert worden war. Inzwischen existieren bereits Stammsammlungen, die Mutanten mit Defekten in jedem einzelnen der über 6000 Hefegene beinhalten. Diese Sammlungen, die auch für unsere Untersuchungen in hohem Maße herangezogen wurden, bilden eine wertvolle Grundlage für zellbiologische und biochemische Studien.

Die Resultate: Lipide, Organellen und Gene

Die beiden Projekte „Lipidpartikel der Hefe“ und „Neutrallipide der Hefe“ beschäftigen sich (i) mit molekularbiologischen, zellbiologischen und biochemischen Strategien zur Identifizierung von Genen und Genprodukten, die an der Biosynthese und dem Metabolismus von TG und STE der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beteiligt sind, sowie (ii) mit der Lokalisierung der entsprechenden Stoffwechselschritte in bestimmten Zellkompartimenten (Organellen). Ziel der Projekte ist es somit, die molekulare Basis der Depotbildung der Neutrallipide und deren Mobilisierung besser verstehen zu lernen.

Ein Organell, das von meiner Arbeitsgruppe in diesem Zusammenhang bereits seit einigen Jahren sehr genau untersucht wurde, ist das sog. Lipidpartikel der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (siehe Abb. 1). Lipidpartikel bestehen aus einem Kern von Neutrallipiden (TG und STE), der von einer Phospholipid-Membran umgeben ist, in welche einige wenige Proteine eingelagert sind. Lipidpartikel wurden bisher immer nur als Depot für TG und STE betrachtet. Im Zuge unserer Arbeiten konnten wir jedoch einige Lipidpartikel-Proteine als Enzyme der Lipid-Biosynthese identifizieren. Es handelt sich dabei vor allem um Enzyme der Biosynthese von Phosphatidsäure, Sterolen und TG. Phosphatidsäure ist ein wichtiges Zwischenprodukt und eine Vorstufe für die Bildung von Phospholipiden und TG. Unsere Studien zeigten, dass bestimmte Enzyme dieses Stoffwechselweges jedoch nicht nur in Lipidpartikeln, sondern auch in anderen Organellen, u.a. im endoplasmatischen Reticulum und in Mitochondrien vorkommen. Außerdem gibt es eine Reihe von Enzymen, sog. Isoenzyme, deren Strukturen zwar nicht identisch sind, die jedoch die gleiche biochemische Reaktion katalysieren. Unserer Arbeitsgruppe gelang es erstmals, ein Enzym der Phosphatidsäure-Biosynthese zu identifizieren, das einen wichtigen Schritt dieses Stoffwechselweges katalysiert, und dem entsprechenden Gen zuzuordnen. Defekte in diesem Stoffwechselschritt können z.B. beim Menschen zu Erbkrankheiten mit fatalen Folgen führen. Weiters konnten wir ein neues Gen bzw. Genprodukt der TG-Synthese identifizieren und charakterisieren. Dieses Enzym ist auch zum Großteil auf Lipidpartikeln lokalisiert und ebenfalls das erste seiner Art, das in Hefe beschrieben wurde. Gleichzeitig mit zwei ausländischen Forschergruppen konnten wir zeigen, dass mehrere Stoffwechselwege zur Bildung von TG führen.

Neben TG bilden STE die Lipiddepots der Hefe-Lipidpartikel. In Zusammenarbeit mit zwei ausländischen und einer Grazer Arbeitsgruppe wurde das Zusammenspiel der Organellen einer Hefezelle bei der Synthese von Sterolen und STE studiert. Die einzelnen Schritte dieser komplexen Biosynthesewege sind auf Lipidpartikel und das endoplasmatische Reticulum aufgeteilt. Offenbar scheint eine Koordination auf der Ebene der Organellen ein wichtiges Mittel zur Regulation der Lipidsynthese darzustellen. Ähnlich wie bei der Synthese von Phosphatidsäure und TG wird die Biosynthese der STE auch durch zwei in ihrer Funktionalität überlappende Enzyme katalysiert. Beide Enzyme sind in diesem Fall jedoch in ein und demselben Organell, dem endoplasmatischen Reticulum, lokalisiert. Die

unterschiedliche Spezifität dieser Enzyme erlaubt die Synthese eines breiten Spektrums an STE.

Wie TG und STE vom Ort ihrer Synthese in ihre Depots, die Lipidpartikel, gelangen, ist noch weitgehend ungeklärt. Eine sehr wahrscheinliche Hypothese besagt, dass die Depotbildung direkt mit der Synthese der beiden Lipidspezies verknüpft ist. TG und STE können bei Bedarf jedoch auch aus ihren Depots mobilisiert werden. Dieser Vorgang erfordert Katalyse durch bestimmte Enzyme (Lipasen, Hydrolasen). Identifizierung der entsprechenden Gene und Genprodukte, Charakterisierung der koordinierten Regulation des TG- und STE-Auf- und Abbaus durch Isoenzyme in verschiedenen Zellkompartimenten, sowie die zellbiologischen Konsequenzen des TG- und/oder STE-Mangels oder deren Überproduktion sind Gegenstand derzeit laufender Untersuchungen.

Die Relevanz der Forschungsergebnisse

Oft wird die Frage nach der Anwendbarkeit und der Bedeutung von Ergebnissen der Grundlagenforschung, wie sie meine Arbeitsgruppe hauptsächlich betreibt, gestellt. Unsere Arbeiten sind primär nicht darauf ausgerichtet, Substanzen im großen Maßstab zu produzieren oder technologische Prozesse zu konzipieren. Vielmehr sehe ich die Bedeutung unserer Studien in der Darstellung fundamentaler Erkenntnisse, die eine Basis für die Anwendung, z.B. in biotechnologischer oder medizinischer Hinsicht, bilden. Kann ein Modellsystem wie die Hefe diesen Anforderungen genügen? Können wir mit solchen zellbiologischen Modellen etwas über allgemein gültige Gesichtspunkte eines biologischen Sachverhalts lernen? Beide Fragen können mit ruhigem Gewissen positiv beantwortet werden. Die Querverbindungen zwischen experimentellen biologischen Systemen (Hefe, Pflanze, Tier, Mensch), die durch die rasante Entwicklung der Bioinformatik immer deutlicher werden, bestätigen diese Ansicht. Korrekterweise muss man natürlich feststellen, dass Hefe nicht einfach das getreue Mini-Abbild eines Säugetiers oder des Menschen ist. Trotzdem können unter kritischer Abschätzung der Randbedingungen sehr wohl physiologisch relevante Aussagen mit Untersuchungsergebnissen des Modellsystems Hefe für komplexere Systeme gemacht werden.

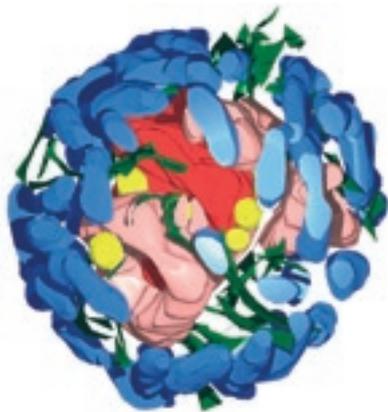


Abb 1.: Ein Blick in eine Hefezelle

Von etwa 40 seriellen Einzel-Ultradünnschnitten durch eine Hefezelle werden elektronenmikroskopische Bilder angefertigt, die durch geeignete Computerprogramme in Form einer 3-dimensionalen Struktur rekonstruiert werden. Nach Abstraktion der Zellwand und Zellmembran durch den Computer werden die einzelnen Organellen im Inneren der Zelle wie z.B. Zellkern, Mitochondrien, Endoplasmatisches Reticulum, Vakuole in verschiedenen Farben sichtbar. Die Depots der Triglyceride und Sterolester, die sog. Lipidpartikel, sind hier in gelber Farbe als kompakte globuläre Strukturen dargestellt. (Mit freundlicher Genehmigung von G. Zellnig und A. Perktold, Institut für Pflanzenphysiologie, KFU Graz).

Biocatalyst Yeast: a Model System to Study Lipid Metabolism

*During the last twenty years the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has become a well established experimental system for biochemical, cell biological and molecular biological studies. The early availability of the complete sequence of the yeast genome, the ease of manipulation of this microorganism by nutrients and growth conditions, and the standardized methods of yeast genetics and molecular biology contributed to the acceptance of yeast as a reliable model for eukaryotic cells.*

Our laboratory uses yeast to study certain aspects of lipid metabolism and assembly of lipids into biological membranes. Lipids are an important class of biochemical molecules which are required as structural elements (e.g., phospholipids, sterols, and sphingolipids) for the formation of membranes. Such membranes form the surface of the cell and an osmotic barrier to the environment, but also surround intracellular compartments, the organelles. In addition, certain lipids (triacylglycerols, steryl esters) serve as energy depots which can be mobilized upon requirement.

The two projects "Lipid Particles of the Yeast" (FWF13669) and "Neutral Lipids of the Yeast" (FWF15141), which are financially supported by the Austrian Science Foundation, aim at addressing problems of the synthesis of triacylglycerols (TAG) and steryl esters (STE), their storage within the cell, and their mobilization from depots in the yeast. Molecular biological, cell biological and biochemical strategies are employed to (i) identify genes and gene products involved in the biosynthesis and metabolism of TAG and STE, and (ii) to attribute steps of the respective pathways to organelles. Thus, this project aims at a better understanding of formation and mobilization of lipid depots at the molecular level.

An organelle which is highly involved in formation and storage of TAG and STE is the so-called lipid particle. These particles harbor a core of TAG and STE surrounded by a membrane monolayer consisting of phospholipids with a small amount of proteins embedded. During our studies we demonstrated that certain enzymes of the TAG biosynthetic pathway, especially enzymes required for the formation of phosphatidic acid, a TAG precursor, are at the surface of lipid particles. Moreover, we were able to show that most of these enzymes exist as duplicates (isoenzymes), sometimes with dual localization in lipid particles and in the endoplasmic reticulum. One gene of the yeast phosphatidic acid biosynthetic pathway was identified as the first enzyme of this kind in all eukaryotic cells. A new gene and the respective gene product, which is involved in the formation of TAG, was also identified and characterized. It was shown that TAG biosynthetic routes are redundant. Most likely three independent pathways exist in the yeast which lead to the formation of TAG.

In addition to TAG, STE are the second form of storage lipids in the yeast. In collaboration with three other groups we showed that enzymes of the complex sterol biosynthetic pathway are distributed among lipid particles and the endoplasmic reticulum. Similar to phosphatidic acid, STE are formed by two isoenzymes with overlapping substrate specificity. Both enzymes are at the endoplasmic reticulum. The question remains how TAG and STE migrate from their site(s) of synthesis to their site of storage, the lipid particles. As a hypothesis, biosynthesis of TAG and STE and formation of depots are believed to be tightly linked processes. Mobilization of TAG and STE from lipid particles requires lipases and hydrolases. Work is in progress to identify such genes and gene products and to study the cell biological consequences of TAG and/or STE depletion or over-production.

In summary, the model system yeast is a powerful tool to get insight into fundamental processes of the cell biology of lipids. This knowledge may provide a valuable basis for various applications in biotechnology or medicine.