

Vorkommen und Bedeutung mehrerer Isoformen des
mitochondrialen Acyl Carrier Proteins

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Hans-Georg Hennemann
aus Neuss

Düsseldorf 2000

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Referent: Prof. Dr. Hanns Weiss
2. Referent: PD Dr. Thomas Lisowsky

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 2000

In bunten Bildern wenig Klarheit,
Viel Irrtum und ein Fünkchen Wahrheit,
So wird der beste Trank gebraut,
der alle Welt erquickt und auferbaut.

Johann Wolfgang Goethe, Faust I

Alles Vergängliche
Ist nur ein Gleichnis.
Das Unzulängliche,
Hier wirds Ereignis,
Das Unausprechliche,
Hier ists getan.
Das Ewig-Weibliche
Zieht uns hinan.

Johann Wolfgang Goethe, Faust II

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Die Fettsäuresynthase in Pro- und Eukaryonten	3
2.2 Acyl Carrier Proteine und ihre Beteiligung an Biosynthesewegen	5
2.3 Mitochondriale Acyl Carrier Proteine	6
2.4 Die Beteiligung der bakteriellen und mitochondrialen Fettsäuresynthase an der Liponsäurebiosynthese	7
2.5 Das mitochondriale ACP als Untereinheit des Atmungsketten-Komplex I	9
2.6 Der Aufbau des Atmungsketten-Komplex I	10
2.7 Die Biosynthese des Komplex I in <i>Neurospora crassa</i>	12
2.8 Thema der Arbeit	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Lösungen, Puffer und Medien	16
3.2 Mikroorganismen und Vektoren	21
3.3 Zucht und radioaktive Markierung von Mikroorganismen	22
3.4 Transformation von Mikroorganismen	22
3.5 Umwandlung der Phagenbibliothek λ AD5 in die Plasmidgenbibliothek pYA-DE5	23
3.6 Isolation genomischer DNA	24
3.7 Allgemeine molekularbiologische Methoden	25
3.8 Bestimmung von Liponsäure	28
3.9 Präparation und Auftrennung von Mitochondrienmembranen aus <i>N. crassa</i>	28
3.10 Isolierung und Spaltung von Komplex I aus <i>N. crassa</i>	29
3.11 Präparation und Aktivitätsbestimmung der α -Ketoglutarat Dehydrogenase aus <i>N. crassa</i>	30
3.12 Verschiedene analytische Methoden	31
4 Ergebnisse	32

4.1	Liponsäuregehalt und α -Ketoglutarat Dehydrogenase-Aktivität des <i>N. crassa</i> Wildtyps und der mtACP-Deletionsmutante	32
4.2	Nachweis von mtACP2 durch <i>in vivo</i> Markierung von <i>N. crassa</i> mit [¹⁴ C]-Pantothensäure	35
4.3	Suche nach dem Gen für ein zweites mtACP	37
4.4	Codon-Gebrauch und Expressionshäufigkeit von mtACP	39
4.5	Versuch der Klonierung des Gens für mtACP2 in <i>N. crassa</i>	41
4.5.1	Versuch der Genidentifizierung über die DNA-Sequenz	42
4.5.2	Versuch der heterologen Komplementation der Δ acp-Mutante von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durch <i>Plasmid-Shuffling</i>	46
4.6	Untersuchung der Atmungsfähigkeit und des Liponsäuregehaltes verschiedener Deletionsmutanten von <i>S. cerevisiae</i> mit beeinträchtigter mitochondrialer FAS	51
5	Diskussion	56
5.1	Im Gegensatz zur Δ acp-Mutante von <i>S. cerevisiae</i> besitzt die <i>acp1</i> -Mutante von <i>N. crassa</i> Liponsäure in bioverfügbarer Form	56
5.2	Nachweis von mtACP2 in <i>N. crassa</i> durch [¹⁴ C]-Pantothentat-Markierung der Mutante <i>acp1</i>	57
5.3	Eukaryonten können mehrere mtACP-Gene enthalten	57
5.4	Die Bedeutung des mtACP für Komplex I	59
5.5	Die Bedeutung der mitochondrialen Fettsäuresynthese für die Atmung von <i>S. cerevisiae</i>	60
5.6	Gibt es weitere Funktionen des mtACP in <i>S. cerevisiae</i> ?	61
6	Literatur	63

1 Zusammenfassung

Die Fettsäuresynthasen (FAS) aller Organismen folgen einem einheitlichen Reaktionsmechanismus, unterscheiden sich jedoch in ihrem molekularen Aufbau. Die im Cytosol gelegene FAS der Vertebraten, Insekten und Pilze (FAS Typ I) sind als multifunktionelle Proteine organisiert. Die FAS der Prokaryonten und Plastiden höherer Pflanzen (FAS Typ II) hingegen bestehen aus strukturell getrennten Enzymen. In den vergangenen Jahren wurden in verschiedenen Eukaryonten mitochondriale Proteine bzw. deren Gene mit hohem Verwandtschaftsgrad zu den Enzymen der FAS Typ II gefunden. Dazu gehören das Acyl Carrier Protein, die Malonyl-CoA-ACP-Transferase, die β -Ketoacyl-ACP Synthase, die 3-Oxoacyl-ACP-Reduktase, die 3-Hydroxyacyl-Dehydratase und die Enoyl-Reduktase.

Das mitochondriale Acyl Carrier Protein (mtACP) wurde aus *Bos taurus* und *Neurospora crassa* als Untereinheit des Atmungsketten-Komplex I isoliert. Die genetische Inaktivierung dieses mtACP führte in dem obligat aeroben Pilz *N. crassa* zu einem Verlust von Komplex I, dessen Funktion von einem alternativen Atmungsenzym übernommen wurde. In der fakultativ aeroben Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die keinen Komplex I besitzt, liegt das mtACP als freies Matrix-Protein vor. Seine genetische Inaktivierung führte zum Verlust der Liponsäuresynthese und damit zu vollständiger Atmungsdefizienz.

Diese zu Beginn der Doktorarbeit vorliegenden Befunde ließen vermuten, daß das mtACP in *N. crassa* bzw. *S. cerevisiae* eine unterschiedliche Funktion ausübt. Um diese These zu belegen und die Funktion der mitochondrialen FAS weiter aufzuklären wurden verschiedene Ansätze verfolgt.

In *S. cerevisiae* wurden Deletionsmutanten verschiedener Enzyme der mitochondrialen FAS hergestellt und hinsichtlich ihrer Phänotypen miteinander verglichen. Es zeigte sich, daß die bei einigen Mutanten auftretende Atmungsdefizienz mit der Unterschreitung eines kritischen Schwellenwertes des Liponsäuregehaltes korreliert.

Für die mtACP-Deletionsmutante wurde ein zusätzlicher, von der Liponsäuresynthese unabhängiger Stoffwechseldefekt gefunden.

In der mtACP-Deletionsmutante von *N. crassa* wurde ein normaler Liponsäuregehalt gefunden. Durch *in vivo* Markierung mit [^{14}C]-Panthotenat wurde in diesem Organismus ein zweites mtACP identifiziert und mtACP2 genannt. Dieses liegt in der mtACP1-Deletions-

mutante sowohl als freies Matrix-Protein, als auch in kleinen Mengen mit Komplex I-Vorstufen assoziiert vor. Durch den Versuch der heterologen Komplementation der mtACP-Deletionsmutante von *S. cerevisiae* wurde das Gen für mtACP2 von *N. crassa* gesucht.

In den zur Zeit verfügbaren Genomdatenbanken anderer Eukaryonten wurden je nach Organismus bis zu drei verschiedene mtACP-Gene gefunden. Der Codon-Gebrauch jeweils eines dieser mtACP-Gene entspricht dem anderer Gene für Komplex I-Untereinheiten. Aus diesen Befunden wurde der Schluß gezogen, daß eukaryontische Organismen in der Regel zwei verschiedene Varianten des mtACP besitzen.

2 Einleitung

2.1 Die Fettsäuresynthese in Pro- und Eukaryonten

Die *de novo* Synthese von Fettsäuren wird von einem als Fettsäuresynthase (FAS) bezeichneten Enzym-Verbund katalysiert. In den Bakterien und den Chloroplasten höherer Pflanzen besteht dieser aus 6 bis 7 diskreten Enzymen, die zusammen als FAS vom Typ II bezeichnet werden (McCarthy & Hardie, 1984). Tiere und Pilze dagegen enthalten in ihrem Cytosol große multifunktionelle Enzyme, bei denen alle katalytischen Zentren in Nachbarschaft auf ein bis zwei Proteinketten lokalisiert sind. Diese werden FAS vom Typ I genannt. Beide FAS-Typen arbeiten nach dem gleichen Mechanismus (Abb. 1).

Ein Acetyl-CoA wird durch die Acetyl-CoA-Carboxylase zu Malonyl-CoA carboxyliert. Durch diesen Schritt erfolgt die Regulation der Fettsäurebiosynthese. Ein Acetyl- und ein Malonyl-Rest werden von der Acetyl- bzw. Malonyl-Transferase auf je ein Acyl-Carrier-Protein (ACP) übertragen, das diese Reste als Thioester an ein Panthethin bindet. (Wakil, 1970). Die Kondensation des Acetyl- und Malonyl-Restes zum ACP-gebundenen Acetoacetat wird durch die β -Ketoacyl-ACP Synthase katalysiert. Dabei wird das im ersten Schritt durch Carboxylierung eingeführte CO_2 -Molekül abgespalten, so daß nur die aus Acetyl-CoA stammenden Kohlenstoffatome zur Verlängerung der Fettsäurekette beitragen. Die β -Ketofunktion des ACP-gebundenen Acetoacetats wird durch die β -Ketoacyl-ACP-Reduktase unter NADPH-Oxidation zur Hydroxyl-Funktion reduziert. Es entsteht das β -Hydroxyacyl-ACP, dessen Hydroxyl-Gruppe nun durch die β -Hydroxyacyl-ACP-Reduktase als Wasser eliminiert wird. Es entsteht Enoyl-ACP, welches unter erneutem NADPH-Verbrauch durch die Enoyl-ACP-Reduktase zu Acyl-ACP reduziert wird. Damit ist der erste Syntheszyklus abgeschlossen. Die resultierende C_4 -Fettsäure wird in weiteren Zyklen durch Reaktion mit Malonyl-ACP verlängert. Fettsäuren mit mehr als sechzehn Kohlenstoffatomen sind kein Substrat mehr für die β -Keto-Acyl-ACP-Synthase. Die Fettsäuresynthese wird auf unterschiedliche Weise abgebrochen. In den meisten Eukaryonten werden die Fettsäuren durch spezifische Thioesterasen freigesetzt. In Pilzen, denen die Thioesterasen fehlen, wird die Termination durch die Malonyltransferase katalysiert, so daß Palmitoyl-ACP als Endprodukt entsteht (Lynen, 1980). In Bakterien werden ACP-gebundene Fettsäuren direkt für die anschließenden Reaktionen verwendet. Neben den Enzymen zur *de novo* Synthese von Fett-

säuren besitzen Zellen Elongasen, die schon synthetisierte oder aus dem umgebenden Medium aufgenommene Fettsäuren verlängern (Dittrich *et al.*, 1998). Unter den FAS vom Typ I

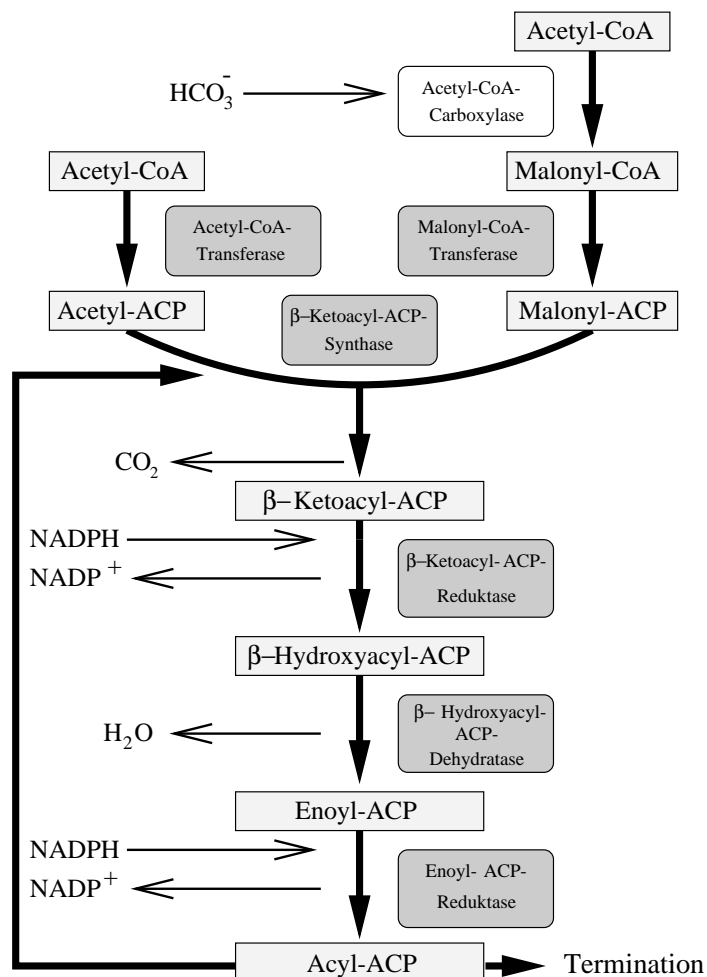


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Fettsäurebiosynthese

ist die der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* am besten untersucht. Das aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten bestehende Enzym hat eine $\alpha_6\beta_6$ -Struktur. Die beiden Untereinheiten β und α werden von den Genen *FAS1* und *FAS2* codiert (Stoops *et al.*, 1978). Elovson (1975) fand auch in *Neurospora crassa* einen entsprechend aufgebauten FAS-Multienzym-Komplex. Die α -Kette enthält in diesem Pilz als Domänen ein ACP, die β -Keto-Acyl-ACP-Synthase und die β -Ketoacyl-ACP-Reduktase. Die β -Kette enthält die Acetyl-CoA:ACP Transacylase, die Malonyl-CoA:ACP Transacylase, die Hydroxyacyl Dehydratase und die

Enoyl Reduktase.

Im Gegensatz zur FAS aus Pilzen besteht die FAS der Tiere aus zwei identischen Proteinketten, die eine α_2 -Struktur bilden. Jede der Ketten besitzt alle notwendigen katalytischen Zentren (Wakil, 1989). In *Euglena gracilis* existieren eine FAS vom Typ I im Cytosol und eine FAS vom Typ II in den Chloroplasten nebeneinander (Delo *et al.*, 1970; Hendren & Bloch, 1980). Höhere Pflanzen enthalten allein eine FAS vom Typ II in ihren Chloroplasten. Alle Enzyme der Fettsäuresynthese sind im Kern codiert. Eine Ausnahme bilden zwei ACP einzelliger Algen und eine β -Keto-Acyl-ACP-Synthase einer Rotalge, die im Plastidengenom codiert sind (Wang & Liu, 1991; Reith, 1993).

2.2 Acyl Carrier Proteine und ihre Beteiligung an Biosynthesewegen

Acyl Carrier Proteine (ACP) sind saure Proteine mit einer molekularen Masse von ca. 10 kDa. An einem konservierten Serin etwa in der Mitte des Polypeptids ist die prosthetische Gruppe 4'-Phosphopantethein gebunden. Die Struktur des ACP aus *Escherichia coli* wurde durch 2D-NMR-Spektroskopie bestimmt. Sie zeigt vier amphipatische Helices, von denen drei eine hydrophobe Tasche bilden. Am Boden dieser Tasche befindet sich das konservierte Serin mit dem Phosphopantethein, an dem die wachsende Acylgruppe synthetisiert wird (Holak *et al.*, 1988). *E. coli* besitzt nur ein einziges ACP, das außer der Fettsäuresynthese noch andere biosynthetische Funktionen hat (Cronan & Rock, 1986; Magnuson *et al.*, 1993). So sind die Lipid A-Synthese und die Synthese der Membranlipide in *E. coli* ACP-abhängig. In diesem Bakterium wurde auch die erste ACP-abhängige Proteinacylierung entdeckt, die Aktivierung von Prohaemolysin zum reifen Haemolysin (Issartel *et al.*, 1991). Neben ihrer Rolle bei der Fettsäuresynthese sind Acyl Carrier Proteine auch an der Synthese der heterogenen Stoffklasse der Polyketide beteiligt (Hopwood & Sherman, 1990). Im Gegensatz zur Fettsäuresynthese, bei der nach jedem Kondensationsschritt die neu hinzukommende β -Keto-Gruppe durch Reduktion, Dehydratisierung und erneute Reduktion zur Alkylgruppe umgewandelt wird, findet dies bei der Polyketidsynthese nicht oder nur zum Teil statt. Zu den Polyketiden gehören so verschiedene Stoffe wie die Flavonoide und Phytoalexine der Pflanzen, die Mycotoxine der Pilze und diverse in Actinomyceten synthetisierte Antibiotika. Auch die Produkte der *nod*-Gene, die die gegenseitige Erkennung von Rhizobien und Pflanzen bei der Nodulation vermitteln, sind Polyketide (Göttfert, 1993). Die Enzyme der Fettsäure- (FAS)

und Polyketidsynthase (PKS) zeigen ausgeprägte Verwandtschaften und können zum Teil ihre Funktion in beiden Biosynthesewegen ausüben. So läßt sich ein PKS-ACP durch ein FAS-ACP ersetzen (Khosla *et al.*, 1992). Das NodF-Genprodukt aus *Rhizobium leguminosarum* kann durch das ACP aus *E. coli* ersetzt werden, wenn die Signaldomäne von NodF, die die Anbindung des NodF-Genproduktes an die β -Keto-Acyl-ACP-Synthase ermöglicht, gentechnisch an das ACP aus *E. coli* angefügt wird (Ritsema *et al.*, 1997). In *Streptomyces glaucensis*, einem gram-positiven Bodenbakterium, kann eine Malonyl-CoA:ACP Transacylase (MAT) der Fettsäuresynthase das ACP der Polyketidsynthase mit Malonat beladen. Diese Polyketidsynthase produziert das aromatische Polyketid-Antibiotikum Tetracenomycin C. Es wird vermutet, daß die MAT an beiden Biosynthesewegen teilnimmt (Summers *et al.*, 1995). Acyl Carrier Proteine sind nicht nur Träger für Acylreste, sondern auch für Peptidreste bei der nicht-ribosomalen Synthese von Peptidantibiotika, wie Gramicidin und Tyrocidin (Lipmann, 1980; Gocht & Marahiel, 1994). Ein ACP wurde auch als Bestandteil der Citrat Lyase aus *Klebsiella aerogenes* identifiziert (Dimroth *et al.*, 1973).

2.3 Mitochondriale Acyl Carrier Proteine

Während die cytosolische FAS vom Typ I lange als einzige Fettsäuresynthase von Pilzen und höheren Eukaryonten galt, weiß man heute, daß in den Mitochondrien der Eukaryonten eine FAS vom Typ II existiert. Ein mitochondriales ACP (mtACP) wurde zuerst von Brody und Mikolajczek (1988) in *N. crassa* durch Markierung mit [¹⁴C]-Pantothenat identifiziert. Homologe Proteine oder deren Gene wurden später unter anderem in *Bos taurus* (Runswick *et al.*, 1991), *S. cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* (Shintani & Ohlrogge, 1994), *Caenorhabditis elegans* (Wilson *et al.*, 1994) und *Schizosaccharomyces pombe* (unveröffentlicht, Acc. No. Z69380) gefunden. Alle bisher identifizierten mtACPs werden durch Kerngene codiert und besitzen eine N-Terminale mitochondriale Importsequenz (von Heijne *et al.*, 1989). Im Zuge der verschiedenen eukaryontischen Genomprojekte und molekularbiologischen Untersuchungen an unserem Institut wurden neben dem mtACP in *S. cerevisiae*, *C. elegans* und *N. crassa* die Gene für eine mitochondriale β -Ketoacyl-ACP Synthase, sowie eine β -Ketoacyl-ACP Reduktase identifiziert (Schneider *et al.*, 1997; F. Bürger, Dissertation 1999 und diese Dissertation). In Hefe kommen Gene für mögliche weitere mitochondriale Fettsäuresynthese-Enzyme vor. Wegen der geringen Konservierung dieser Enzyme ist

eine eindeutige Zuordnung der Gene jedoch noch nicht möglich (Schneider *et al.*, 1997). Die Hefe-Mutante Δacp , bei der das mtACP-Gen inaktiviert wurde, bildet einen respiratorisch defizienten Phänotyp. Das gleiche wurde für die Mutanten Δcem und Δoar gefunden, denen die mitochondriale β -Ketoacyl-ACP Synthase bzw. mitochondriale β -Ketoacyl-ACP Reduktase fehlen. Alle diese Mutanten sind nicht mehr in der Lage, auf nicht vergärbaren C-Quellen wie Glycerin oder Lactat zu wachsen und schalten von Atmung auf Gärung um (Schneider *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1997). Dies konnte 1997 von Brody *et al.* erklärt werden als sich herausstellte, daß das mtACP in Hefe eine wichtige Rolle in der Liponsäurebiosynthese spielt.

2.4 Die Beteiligung der bakteriellen und mitochondrialen Fettsäuresynthase an der Liponsäurebiosynthese

Liponsäure ist ein schwefelhaltiger Co-Faktor verschiedener Multienzym-Komplexe wie der Glycin-Decarboxylase, der Branched-Chain-Keto-Acyl Dehydrogenase, der Pyruvat Dehydrogenase und der α -Ketoglutarat Dehydrogenase. Letztere sind Schlüsselenzyme des Citratcyclus. Die Carboxylgruppe der Liponsäure ist durch eine Amidbindung an die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes in der Acetyl-Transferase-Untereinheit (E_2) der Keto-Acyl Dehydrogenasen bzw. des H-Proteins der Glycin Decarboxylase gebunden (Reed, 1998; Douce *et al.*, 1994). Die Liponsäure dient dort der Übernahme des Acyl-Restes der benachbarten Untereinheit (E_1) bei der Decarboxylierungsreaktion. Weitere wichtige Funktionen der Liponsäure sind nach neueren Untersuchungen ihre antioxidante Wirkung gegenüber reaktivem Sauerstoff, sowie die Reduktion anderer Antioxidantien wie Vitamin C, Glutathion und Vitamin E (Packer *et al.*, 1995).

Liponsäure besteht aus Oktansäure, deren C_6 -Atom durch eine Disulfidbrücke mit dem C_8 -Atom verknüpft ist. In prokaryontischen Zellen wurde durch Markierungsexperimente gezeigt, daß Oktansäure eine direkte Vorstufe der Liponsäure ist (White, 1980). Die beiden Schwefelatome werden durch das *lipA*-Genprodukt, die Lipoat-Synthase, eingefügt. Das *lipB*-Genprodukt, die Lipoat-Ligase, überträgt die Liponsäure auf ein entsprechendes apo-Protein (Reed & Cronan, 1992; Abb. 2). Sie benötigt als Substrat Lipoyl-ACP (Jordan & Cronan, 1997). Eine weitere aus Bakterien bekannte Lipoat-Ligase ist das *lplA*-Genprodukt und


```

ncmtacp  MFRTAALTAARVARPAVASAVRAGVARPAFVQAVPKVA---AFQAVRFYSAGGHLKKDEV
scmtacp  MFRSVCRISSRVA-P---SAYRTIMGRSVMSN-----TILAQRFYSAN--LSKDQV
anmtacp  MFRSAVVRSLRASVPRAVKTAPPFQIRSSPVARPAQFAPRFAYQGVRLYSAPAGLNKDEV
          ***. . * . * . * . * . * * * * * * * * * * * * * * * * *
          . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *

ncmtacp  FSRIAQVLSGFDKVN---DPKNITETAHFANDLGLD[S]LDTVEVVMATIEEFSEIIPDK
scmtacp  SQRVIDVIKAFDKNSPNIANKQISSDTQFHKDLGLD[S]LDTVELLVAIEEFDIEIPDK
anmtacp  EGRIVNLLKNFDKVS---DASKINVASHFANDLGLD[S]LDTVEVVMATIEEFSEIIPDK
          * . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

ncmtacp  DADQIHSVDKAVEYILSQPDAN
scmtacp  VADELRSVGETVDYIASNP DAN
anmtacp  EADSIHSVDKAVEYILGQPD--
          ** . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Abbildung 3: Aminosäuresequenz des mtACP aus *N. crassa* (ncacp), *S. cerevisiae* (scacp) und *Aspergillus niger* (anacp). Die Sterne stehen für identische, die Punkte für ähnliche Aminosäuren. Das konservierte Serin, das den Phosphopantethein-Rest trägt, steht in eckigen Klammern [S].

gesichert, daß auch die Liponsäurevorstufe Oktanoyl-(mt)ACP mitochondrial synthetisiert wird. In *N. crassa* Mitochondrien wie auch im Cytosol von *E. coli* erfolgt die Ligation der Liponsäure an ein apo-Protein hauptsächlich durch die Lipoat-Ligase, die Lipoyl-ACP als Substrat benötigt (Jordan & Cronan, 1997; Abb. 2). Dies gilt nach neueren Untersuchungen auch für die Mitochondrien aus Erbsen (Gueguen *et al.*, 2000). Das mtACP übt damit gleich zwei wichtige Funktionen im Liponsäurestoffwechsel aus.

2.5 Das mitochondriale ACP als Untereinheit des Atmungsketten-Komplex I

In *N. crassa* und *B. taurus* wurde das mtACP als Untereinheit des Atmungsketten-Komplex I isoliert. Der größte Teil des mtACP in dieser Position trägt einen Hydroxymyristat-Rest (Sackmann *et al.*, 1991). Auch in *A. thaliana* findet man die größte Menge des mtACP acyliert und mit der mitochondrialen Membran assoziiert, während ein kleiner Teil deacyliert

frei in der mitochondrialen Matrix vorkommt, so daß auch hier auf eine Integration in den Komplex I geschlossen wird (Shintani & Ohlrogge, 1994). Es wird vermutet, daß das mtACP in allen Organismen eine Untereinheit des Komplex I ist, sofern sie ihn besitzen. Die Hefe *S. cerevisiae* besitzt keinen Komplex I, wohl aber ein mtACP, das frei in der mitochondrialen Matrix vorliegt (Cherét *et al.*, 1993). Dieses ist nur um eine Aminosäure länger als das aus *N. crassa*. Die Sequenzidentität zwischen beiden beträgt 45 %. Im Bereich von 20 Aminosäuren um den konservierten Serinrest herum beträgt die Sequenzidentität sogar 85 % (Abb. 3).

2.6 Der Aufbau des Atmungsketten-Komplex I

Die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (E.C. 1.6.99.3), der Komplex I der oxidativen Phosphorylierung, verbindet die Elektronenübertragung von NADH auf Ubichinon mit der Translokation von vier Protonen über die innere Mitochondrienmembran. Der Komplex kommt in der inneren Mitochondrienmembran der meisten Eukaryonten und in der Cytoplasmamembran vieler Eubakterien vor. Gut untersucht ist bisher der mitochondriale Komplex aus *B. taurus* (Walker, 1992) und *N. crassa* (Weiss *et al.*, 1991), sowie der bakterielle Komplex aus *E. coli* (Leif *et al.*, 1995) und *Paracoccus denitrificans* (Yagi *et al.*, 1993). Der Komplex I in Bakterien besteht aus 14 Untereinheiten. Diese sind in zwei Armen angeordnet, die eine L-förmige Struktur bilden (Guénebaut *et al.*, 1998, Abb. 4). Sieben hydrophobe Untereinheiten durchspannen die Cytoplasmamembran und bilden den sogenannten Membranarm. Die verbleibenden sieben Untereinheiten bilden den aus der Membran ins Cytoplasma ragenden peripheren Arm.

Der mitochondriale Komplex I enthält neben den 14 Homologen zu den bakteriellen Komplex I-Untereinheiten, die als minimale Untereinheiten bezeichnet werden, noch bis zu 28 sogenannte akzessorische Untereinheiten. Diese sind um das Grundgerüst aus den zum bakteriellen Komplex I homologen Untereinheiten angeordnet (Abb. 4).

Alle bisher im Komplex I identifizierten prosthetischen Gruppen sind auf den peripheren Untereinheiten lokalisiert. Es handelt sich dabei um ein Flavinmononukleotid (FMN) und bis zu sechs ESR-spektroskopisch sichtbare Eisen-Schwefel-Cluster (FeS-Cluster). Bis auf die Ubichinon-Bindestelle (Friedrich *et al.*, 1990) konnte den Untereinheiten des Membranarms keine eindeutige Funktion zugeordnet werden (Weiss *et al.*, 1991; Fearnley & Walker,

1992). UV-VIS-spektroskopische Untersuchungen vorangegangener Doktorarbeiten geben jedoch Hinweise auf das Vorhandensein einer weiteren, strukturell jedoch noch unbestimmten Redoxgruppe (Schulte *et al.*, 1999; Friedrich *et al.*, 2000; N. Amling, Dissertation 1996; A. Abelmann, Dissertation 1999; V. Haupt, Dissertation 1999).

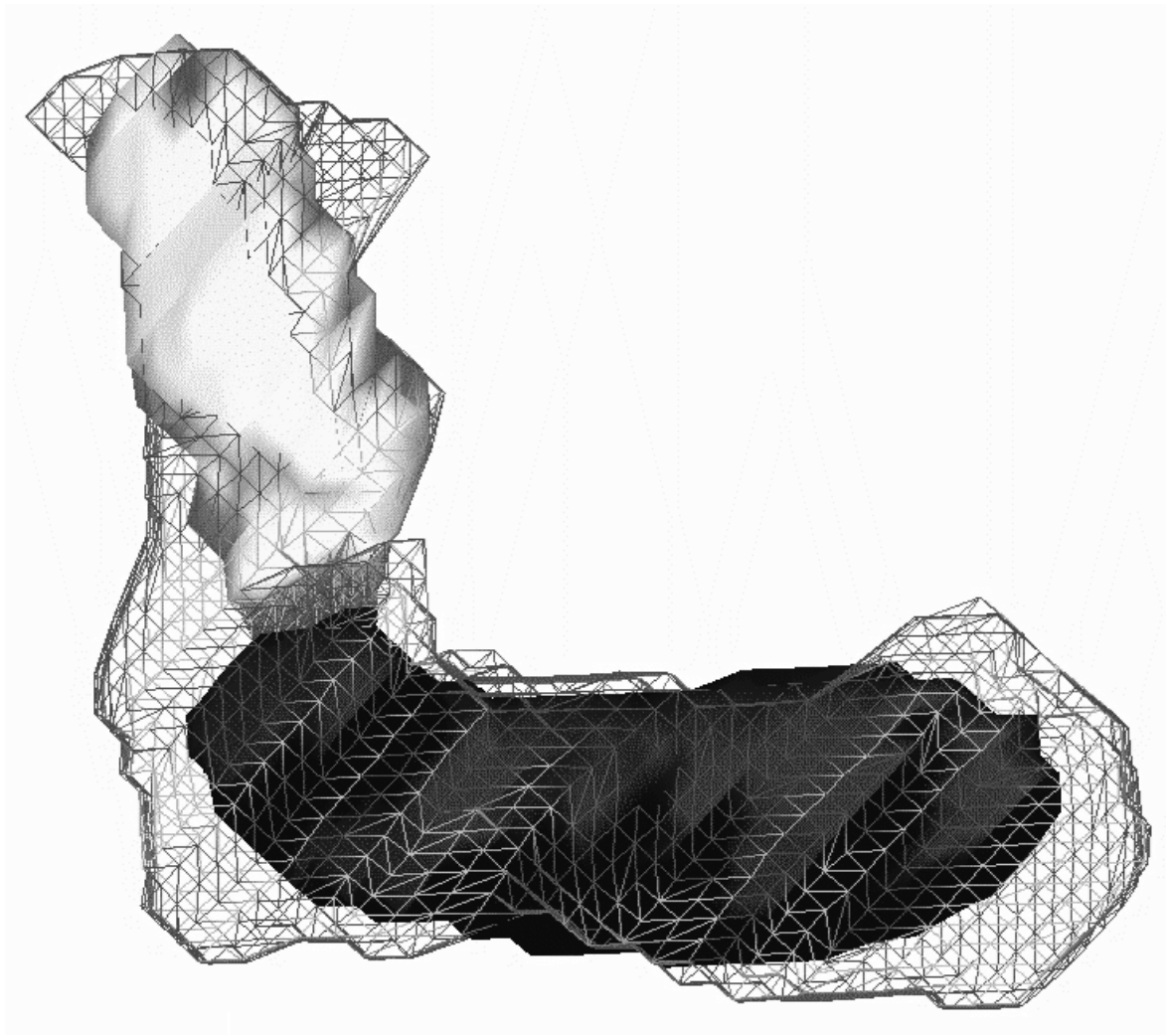


Abbildung 4: Überlagerung der aus elektronenmikroskopischen Bildern rekonstruierten dreidimensionalen Modelle des Komplex I aus *E. coli* (ausgefüllt) und *N. crassa* (Gittermodell). Der Membranarm ist dunkel, der periphere Arm hell dargestellt (nach Guénebaut *et al.*, 1998).

2.7 Die Biosynthese des Komplex I in *Neurospora crassa*

Der mitochondriale Komplex I ist dualen genetischen Ursprungs. Die Homologen zu den sieben die Membran durchspannenden Untereinheiten des bakteriellen Komplex I werden in Eukaryonten von der mitochondrialen DNA (mtDNA) codiert. Alle übrigen Untereinheiten sind im Kern codiert und werden nach ihrer Synthese an cytosolischen Ribosomen in die Mitochondrien transportiert. Die Assemblierung des Komplex I verläuft über die unabhängig gebildeten Teile Membranarm und peripherer Arm, die *en bloc* zusammengefügt werden. Der Membranarm seinerseits wird aus zwei zueinander komplementären Subkomplexen, der großen und der kleinen Vorstufe, gebildet (Schulte *et al.*, 1994; Abb. 5). Dieses Bild der

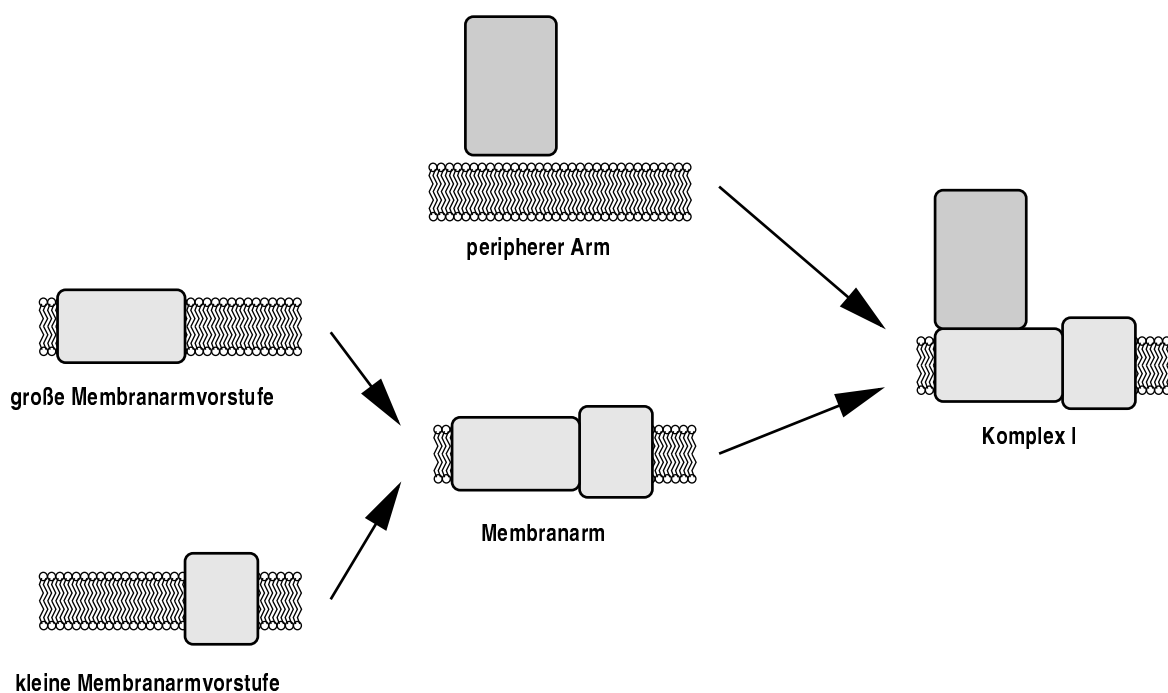


Abbildung 5: Schema zur Assemblierung von Komplex I in *N. crassa* (Schulte *et al.*, 1994).

Assemblierung des Komplex I ergab sich aus der Untersuchung von *N. crassa* Mutanten, in denen Gene von Komplex I-Untereinheiten ausgeschaltet worden waren (Nehls *et al.*, 1992). Diese Mutanten werden als *nuoX* bezeichnet, wobei sich *nuo* auf [N]ADH:[U]bichinon [O]xidoreduktase und *X* auf die molare Masse der betroffenen Untereinheit in kDa bezieht. Das Ausschalten von Genen von Untereinheiten des peripheren Arms führt zu Mutanten,

in denen die Assemblierung des Membranarms noch erfolgt, die des peripheren Arms jedoch unvollständig ist. Dies reicht vom Fehlen einzelner Untereinheiten wie in der Mutante *nuo51* (Fecke *et al.*, 1994) bis zum Fehlen des gesamten peripheren Arms in der Mutante *nuo49* (K. Cernus, Diplomarbeit). Das Ausschalten von Genen, die Untereinheiten des Membranarms codieren, führt zu einer gestörten Assemblierung des Membranarms. Der periphere Arm wird in solchen Mutanten noch vollständig gebildet. So reichert die Mutante *nuo20.9* die kleine Vorstufe des Membranarms an, die aus 7 kerncodierten und 2 mitochondrial codierten Untereinheiten besteht. Die Mutante *nuo21.3* bildet noch die große Vorstufe des Membranarms aus 6 kerncodierten und 5 mitochondrial codierten Untereinheiten, die kleine Vorstufe aber nur noch unvollständig. Die Anhäufung der Vorstufen in diesen Mutanten ermöglichte die Isolierung und biochemische Charakterisierung von Teilen des Komplex I.

Zwei der akzessorischen Untereinheiten des eukaryontischen Komplex I sind homolog zu biosynthetisch aktiven Proteinen. Eine 40 kDa große periphere Untereinheit zeigt Verwandtschaft zu einer heterogenen Familie von Reduktasen/Isomerasen und trägt wie diese einen NADPH-Co-Faktor, der nicht am Elektronentransport des Komplex I beteiligt ist (Walker, 1992; Schulte *et al.*, 1999). Eine Deletionsmutante, in der diese Untereinheit genetisch inaktiviert wurde, bildet einen bis auf diese Untereinheit vollständig assemblierten Komplex I mit intakter NADH Dehydrogenase Aktivität und allen bekannten prosthetischen Gruppen. Der Mutanten-Komplex I ist jedoch nicht in der Lage Ubichinon zu reduzieren. Es wird diskutiert, daß die 40 kDa Untereinheit an der Biosynthese eine im Membranarm gelegenen strukturell noch nicht bestimmten Redoxgruppe beteiligt ist (Schulte *et al.*, 1999). Eine ca. 10 kDa große akzessorische Untereinheit des peripheren Arms ist das oben beschriebene bisher bekannte mtACP von *N. crassa* (Sackmann *et al.*, 1991; Runswick *et al.*, 1991). In der Mutante *nuo9.6* oder *acp1*, bei der das Gen für das mtACP ausgeschaltet wurde, wird keiner der beiden Arme des Komplex I korrekt assembliert. Für dieses mtACP wird daher eine Funktion bei der Assemblierung beider Arme angenommen (Schneider *et al.*, 1995). Eine Übersicht über Komplex I-Mutanten in *N. crassa* gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Deletionsmutanten von Komplex I mit unvollständiger Assemblierung des Komplexes

Mutante	Lokalisation der ausgeschalteten Untereinheit	Akkumulierte Teile des Komplex I	Literatur
<i>nuo78</i>	Peripherer Arm	Membranarm, Reste des peripheren Arms	Harkness <i>et al.</i> , 1995; U. Wobschall, Dissertation 1997
<i>nuo51</i>	Peripherer Arm	Membranarm ohne 51 kDa Untereinheit	Fecke <i>et al.</i> , 1994
<i>nuo49</i>	Peripherer Arm	Membranarm	K. Cernus, Diplomarbeit
<i>nuo40</i>	Peripherer Arm	Komplex I ohne 40 kDa Untereinheit	W. Fecke, Dissertation 1993
<i>nuo29.9</i>	Peripherer Arm	Membranarm	Duarte <i>et al.</i> , 1995
<i>nuo21.3a</i>	Kleine Membranarmvorstufe	Peripherer Arm, große Membranarmvorstufe, kleine Membranarmvorstufe ohne 21.3 kDa Untereinheit	Nehls <i>et al.</i> , 1992
<i>nuo21.3b</i>	Peripherer Arm	Komplex I ohne 21.3 kDa Untereinheit	Alves & Videira, 1994
<i>nuo20.9</i>	Große Membranarmvorstufe	Peripherer Arm, kleine Membranarmvorstufe	C. Krüll, Dissertation 1995
<i>nuo12.3</i>	Membranarm	Peripherer Arm, Membranarm ohne die 12.3 kDa Untereinheit	Duarte <i>et al.</i> , 1995
<i>nuo10.4</i>	Große Membranarmvorstufe	Peripherer Arm, kleine Membranarmvorstufe	C. Krüll, Dissertation 1995
<i>nuo9.6 (acp1)</i>	Peripherer Arm	unvollständiger Membranarm	Schneider <i>et al.</i> , 1995

2.8 Thema der Arbeit

In *N. crassa* und *B. taurus* ist das mtACP eine periphere, akzessorische Untereinheit des Atmungsketten-Komplex I. Die genetische Inaktivierung des mtACP führt zu einer gestörten Assemblierung des Komplex I. Das Produkt eines Syntheseweges, an dem das mtACP beteiligt ist, scheint für die Assemblierung des Komplexes notwendig zu sein. Weitergehende Atmungsdefekte liegen in dieser *N. crassa*-Mutante nicht vor. Die Hefe *S. cerevisiae*, die ohne Komplex I auskommt, besitzt ein mtACP als freies Matrix-Protein. Seine Inaktivierung führt über den Verlust der Liponsäuresynthese zur vollständigen Atmungsdefizienz. Das bisher bekannte mtACP scheint demnach in *N. crassa* und *S. cerevisiae* eine unterschiedliche Funktion auszuüben. Da *N. crassa* auf eine eigene Liponsäuresynthese angewiesen ist, sollte dieser Pilz eine zweite mtACP-Isoform besitzen.

In dieser Arbeit sollte zunächst die Liponsäuresynthese in der *N. crassa* mtACP-Deletionsmutante untersucht werden. Durch *in vivo* Markierung mit [¹⁴C]-Panthotenat sollte eine zweite mtACP-Isoform nachgewiesen werden. Gene für mtACP-Isoformen sollten in den zugänglichen Genomdatenbanken gesucht werden.

Mit *S. cerevisiae* sollten Deletionsmutanten der anderen Enzyme der mitochondrialen FAS erzeugt werden. Die Beziehung zwischen dem Verlust der Atmung und der Liponsäurebiosynthese sollte geklärt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Lösungen, Puffer und Medien

Vogels-Minimalmedium (Vogel, 1956)

- 3 g/l Natrium-Citrat
- 5 g/l KH_2PO_4
- 2 g/l NH_4NO_3
- 0,2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 0,1 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 5 $\mu\text{g/l}$ Biotin
- 0,1 ml/l Spurenelementlösung
- 20 g/l Saccharose

Spurenelementlösung

- 50 g/l Citronensäure
- 50 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 2,5 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
- 0,5 g/l H_3BO_3
- 10 g/l $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
- 0,5 g/l MnSO_4

Kreuzungsmedium (Davis & de Serres, 1970)

- 1 g/l KNO_3
- 0,7 g/l KH_2PO_4
- 0,5 g/l KH_2PO_4
- 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 0,1 g/l CaCl_2

0,1 g/l NaCl
5 μ g/l Biotin
0,1 ml/l Spurenelementlösung
20 g/l Saccharose

PBS

50 mM Na-Phosphat, pH 7,2
0.9% NaCl

SSC

150 mM NaCl
15 mM Na-Citrat, pH 7,0

SM-Medium

100 mM NaCl
50 mM Tris-Cl (Tris[hydroxymethyl]-aminomethan)-Chlorid, pH 7,5
10 mM MgSO₄
0,01% (w/v) Gelatine

DNA-Probenpuffer 5x

10 mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat)
445 mM Tris-Borat, pH 8,3
0,25% (w/v) Bromphenolblau
0,25% (w/v) Xylencyanol
50% (v/v) Glycerin

Protein-Probenpuffer 4x

1 M Saccharose
200 mM Tris-Acetat, pH 6,8
5 mM EDTA
7 mM DTE (Dithioerythritol)
5% (w/v) SDS (Natriumdodecylsulfat)
0,1% (w/v) Bromphenolblau

Kammerpuffer

2 M Glycin
0,25 M Tris-Cl, pH 8,3
0,5% (w/v) SDS

TBE

89 mM Tris-Borat, pH 8,3
1 mM EDTA

Luria-Broth (LB)

10 g/l Casein-Hydrolysat (Pepton No. 140, Gibco)
5 g/l NaCl
5 g/l Hefe-Extrakt (Gibco), pH 7,5

TOP-Agarose

0,7% Agarose in LB

YP

1% (w/v) Hefe-Extrakt
2% (w/v) Bacto-Pepton
mit 2% Glucose (YPD) oder 3% Glycerin (YPG)

YNB

0,67% Yeast Nitrogen Base (Difco)

mit 2% Glucose (SD)

Aminosäuren und andere Supplemente je nach Auxotrophien

Sporulationsmedium

1% K-Acetat

0,1% Hefe-Extrakt

0,05% Glucose

Aminosäuren und andere Supplemente je nach Auxotrophien

BGM 2x - Basal Growth Medium (Herbert & Guest, 1970)

4 g/l Casein-Hydrolysat

14 g/l K_2HPO_4

6 g/l KH_2PO_4

1 g/l $Na_3 citrat \cdot 3 H_2O$

0,2 g/l $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$

2 g/l $(NH_4)_2SO_4$

8 g/l L-Asparaginsäure

0,2 g/l L-Arginin

0,2 g/l L-Glutaminsäure

0,2 g/l Glycin

0,2 g/l L-Histidin

0,2 g/l L-Prolin

0,36 g/l L-Tryptophan

0,16 g/l L-Cystein

0,2 g/l Na thioglycolat

200 mg/l Kanamycin

STET

50 mM Tris-Cl, pH 8,0

50 mM EDTA

8% Saccharose

5% Triton-X-100

TE

10 mM Tris-Cl, pH 8,0

1 mM EDTA

SOB (Hanahan, 1983)

2% Casein-Hydrolysat

1,5% Hefe-Extrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄, pH 6,7-7,0

TB

10 mM Pipes [1,4 Piperazinbis(ethansulfonsäure)]

55 mM MnCl₂

15 mM CaCl₂

250 mM KCl

Für feste Nährböden wurde 1,8% (w/v) Agar (SERVA) zugegeben. Ampicillin wie Kanamycin wurden zu einer Endkonzentration von 100 mg/l zugegeben. Leucin, Uracil, Tryptophan und Histidin wurden in Endkonzentrationen von 20 mg/l eingesetzt.

3.2 Mikroorganismen und Vektoren

Mikroorganismen

E. coli DH5 α (Hanahan, 1983)

E. coli MB 406 (Woodcock *et al.*, 1989)

E. coli KER 176 (van den Boom *et al.*, 1991)

E. coli BNN 132 (Elledge *et al.*, 1991)

N. crassa Wildtyp SL 74-OR23-1A & OR8-1a (FGSC 987 & 988)

N. crassa Mutante pan-2A & a (FGSC 4103 & 4104)

N. crassa Mutante *acp1* (Schneider *et al.*, 1995)

S. cerevisiae VW1 [MATa, Δ his3, leu2-3, ura3-52, trp1-289]

S. cerevisiae VW1 [2n, Δ his3, leu2-3, ura3-52, trp1-289] (zur Verfügung gestellt von KD Entian)

S. cerevisiae Mutante Δ *cem* (F. Bürger, Dissertation, 1999)

Vektoren

pT7T3 19U (Mead *et al.*, 1986 (Pharmacia)

YEp352, YEp351 (Hill *et al.*, 1986)

pSCmtACP-P/SX (Schneider R, Dissertation, 1995)

PTSCmtACP (Schneider R, Dissertation, 1995)

YCp50 (Rose *et al.*, 1987)

λ J1 (Orbach *et al.*, 1986)

λ AD5 (Brunelli *et al.*, 1993)

Oligonucleotide

HmtACP-AS3x 5'-GCTCTAGAGAYYTXGGXYTXGAYWSXY
TXGA-3' (W=A,T; R=A,G; Y=C,T; S=G,C)

HmtACP-C2e 5'-AAGAATTCATYTGRTCXGCRCTYTTTRTCX
GG-3'

leu2-R 5'-GTCAGAAACGGCCTTAACGACGTA-3'

3.3 Zucht und radioaktive Markierung von Mikroorganismen

Zur Zucht von *E. coli* wurden die Bakterien 16 h bei 37 °C geschüttelt. Für Stammkulturen wurden 0,5 ml steriles 80 % Glycerin mit 300 µl einer Bakterienkultur vermischt, bei -196 °C schockgefroren und bei -70 °C aufbewahrt. Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte bei 30 °C in Batch-Kulturen von 50 ml. Stammkulturen wurden wie bei *E. coli* angelegt. Die Zucht von *N. crassa* erfolgte über einen Zeitraum von 20 bis 40 h bei 28 °C in mit Pressluft (20 l/min) belüfteten 8 l Batch-Kulturen oder in 100 ml Schüttelkulturen in Vogels-Medium (Weiss *et al.*, 1970; Davis & de Serres, 1970). Zur radioaktiven Markierung wurden 5 µCi [¹⁴C]-Pantothensäure (BioTrend) in 100 ml Medium gegeben. Zur Verfolgung der Abnahme der Aktivität im Medium wurden 100 µl des Mediums mit 1 ml Quicksafe A (Zinser) gemischt und in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Zur Gewinnung von Makrokonidien wurden 8 ml Schrägagarröhrchen (3 ml Vogelsmedium mit 1,5 % Agar) oder 350 ml Weithals Erlenmeyerkolben (100 ml Vogels-Medium mit 1,5 % Agar) mit Makrokonidien angeimpft und 5-10 Tage unter Belichtung bei 30 °C inkubiert. Die Gewinnung von Ascosporen erfolgte in Petrischalen mit Kreuzungsmedium. Die Agarplatten wurden mit Makrokoniden der beiden Stämme unterschiedlicher Paarungstypen an gegenüberliegenden Seiten angeimpft und 21 Tage im Dunkeln bei 22 °C und anschließend für 7 Tage bei 30 °C unter Belichtung inkubiert. Die an den Deckeln der Petrischalen haftenden Ascosporen wurden mit 1 ml sterilem Wasser abgewaschen und bei 4 °C gelagert. Zur Vereinzelung homokaryonter Pilze wurden Ascosporen auf Vogels-Agarplatten ausplattiert, 2 h bei 60 °C hitzeaktiviert und anschließend über Nacht bei 30 °C inkubiert. Einzelne ausgekeimte Ascosporen wurden mit einer sterilen Platinnadel auf Schrägagarröhrchen übertragen.

3.4 Transformation von Mikroorganismen

Zur Gewinnung kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 1000 ml SOB-Medium mit 200 µl einer Übernachtskultur in LB-Medium angeimpft und bei 18 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 ange-

zogen. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4 °C und 2500 g abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 80 ml TB resuspendiert, erneut nach zehnmütiger Inkubation auf Eis abzentrifugiert und in 20 ml TB aufgenommen. Nach Zugabe von DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Die Transformation erfolgte nach Inoue *et al.* (1990). 200 µl tiefgefrorene, kompetente Zellen wurden aufgetaut und mit 10-200 ng DNA in maximal 10 µl Volumen für mindestens 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Eppendorfgefäß für 90 s auf 42 °C erwärmt, dann auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium 60 min bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden kurz abzentrifugiert, in 50-150 µl LB-Medium resuspendiert und ausplattiert.

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach Soni *et al.* (1993) in Gegenwart von Lithiumacetat. 1,5 ml einer Übernachtskultur von Hefe wurden für 5 min bei 5000 g abzentrifugiert. Die zu transformierende DNA und 50 µg Herings-Sperma-DNA wurde in möglichst kleinem Volumen zum Zellsediment gegeben und gut mit diesem gemischt. Anschließend wurden 0,5 ml 40 % Polyethylenglycol 3350 (Sigma), 100 mM Li-Acetat, 10 mM Tris-Cl, pH 7,5, 1 mM EDTA und DMSO bis zu einer Endkonzentration von 10 % zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 15 min bei 42 °C inkubiert, abzentrifugiert, in TE gewaschen und nach Resuspendieren in TE ausplattiert.

Diploide Hefe wurde nach der Transformation zur Erhaltung haploider Mutanten der Tetradenanalyse unterzogen. Dazu wurde die Hefe auf Sporulations-Agar durch mehrtägige Inkubation bei 30 °C zur Sporulation gebracht. Eine kleine Zellmenge wurde in 50 µl Wasser resuspendiert und nach Zugabe von 5 µl Zymolase-Lösung (10 mg/ml) 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in einem schmalen Streifen auf einer YPD-Platte ausgestrichen. Mit einem Mikromanipulator wurden die einzelnen Sporen einer Tetrade separiert und an definierten Punkten auf der Platte abgelegt.

3.5 Umwandlung der Phagenbibliothek λAD5 in die Plasmidgenbibliothek pYADE5

In dieser Arbeit wurde die exprimierende *N. crassa* cDNA-Genbibliothek λAD5 verwendet. Sie kombiniert die Vorteile einer Genbibliothek im Phagen λ, wie leichte Vermehrung,

hohe Infektionsrate und effiziente *in vitro*-Verpackung, mit der Möglichkeit, durch *cre/lox*-vermittelte automatische Subklonierung Plasmide zu erhalten, die zur Transformation sowohl von *E. coli* als auch *S. cerevisiae* eingesetzt werden können. Die *in vivo* Plasmid-Excision wird durch die katalytische Aktivität der *cre*-Rekombinase vermittelt, die durch ortsspezifische Rekombination an 24 Bp langen, sogenannten *lox*-Sequenzen die Plasmid-Komponente des Phagen λ AD5 mit dem cDNA-Insert herausschneidet und zum Plasmidring schließt. Den erhaltenen Plasmiden fehlt eine *lox*-Sequenz (Brunelli & Pall, 1993).

Eine Einzelkolonie des *cre*-Rekombinase produzierenden *E. coli* Stamms BNN 132 wurde in 100 ml LB, 10 mM MgSO₄, 0,2 % Maltose über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden bei 5000 g sedimentiert und zu einer OD₆₀₀ von 1,0 in 10 mM MgSO₄ resuspendiert. 1 ml dieser Bakteriensuspension wurde mit 10⁸ Phagen bei 30 °C für 30 min infiziert. Nach Zugabe von 2 ml LB wurde bei 30 °C für 1 h geschüttelt. Dann wurde ein Aliquot der Suspension zur Bestimmung der Infektionseffizienz auf einer LB-Platte mit Ampicillin ausplattiert. Der Rest der Bakterien wurde in 1000 ml LB mit der halben üblichen Ampicillinkonzentration bei 28 °C angezogen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit dem QIAGEN Midi Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift isoliert und zur Transformation von *S. cerevisiae* eingesetzt.

3.6 Isolation genomischer DNA

Zur Isolation genomischer DNA aus *N. crassa* wurden 300-500 mg (Feuchtmasse) frisches oder tiefgefrorenes Mycel in flüssigem Stickstoff fein gemörsert. 200-300 mg wurden in 2 ml Safelock-Eppendorf-Gefäßen mit 0,9 ml Lysepuffer (50 mM EDTA, pH 8,0, 0,2 % SDS, 100 µg/ml RNase A) versetzt und geschüttelt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit ca. 1 Volumen äquilibriertem (0,1 M Tris-Cl, pH 8,0) Phenol und einmal mit Chloroform extrahiert. Anschließend wurde die DNA mit ca. 1 Volumen Isopropanol gefällt und mit einer Pasteurpipette ausgewickelt. Nach Waschen in 70 % Ethanol und Abzentrifugation der DNA wurde das Sediment kurz an der Luft getrocknet und in 50-200 µl Wasser aufgenommen. Die Ausbeute betrug 10-30 µg.

Zur Isolation von genomischer und Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* wurde die Methode nach Hoffmann & Winston (1987) verwendet. 10 ml einer Übernacht-Kultur von Hefe in YPD wurde abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Hefe im Rest des Me-

diums resuspendiert. Nach Zugabe von 0,3 g Glasperlen (\emptyset 0,5 mm), 200 μ l Quick-Lysepuffer (2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8,0, 1 mM EDTA) und 200 μ l Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1), wurden die Zellen für 5 min auf dem Vortex aufgeschlossen. Die Trümmer wurden durch 10 min Zentrifugation bei 12 000 g sedimentiert und die DNA aus der wässrigen Phase mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt. Die DNA wurde für 10 min bei 12 000 g zentrifugiert, kurz an der Luft getrocknet und in 50 μ l Wasser aufgenommen. 5 μ l dieser DNA-Lösung wurden zur Transformation von *E. coli* eingesetzt. Für einen Southernblott wurden 20 μ l der DNA-Lösung verwendet.

3.7 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Für die Plasmidisolierung aus Bakterien wurde die "Boiling-Lysis"-Methode verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). 1,5 ml einer Übernacht-Kultur von *E. coli* wurden abzentrifugiert und das Sediment in 0,5 ml STET resuspendiert. Nach Zugabe von 20 μ l Lysozymstammllösung (50 mg/ml) wurde 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 3,5 min in einem kochenden Wasserbad erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Nach 10 min Zentrifugation bei 12 000 g wurde das Sediment mit einem Zahnstocher aus dem verwendeten Eppendorf-Gefäß entfernt. Der Überstand wurde mit 0,5 ml Isopropanol versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde 10 min bei 12 000 g abzentrifugiert und kurz an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 50 μ l Wasser aufgenommen. Die präparative Plasmid-Isolation wurde aus 50 ml Bakterienkultur mit dem QIAGEN Midi Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift durchgeführt.

Zur Suche nach genomischen Fragmenten wurde eine genomische Genbibliothek im Bakteriophagen λ J1 (Orbach *et al.*, 1986) verwendet. Der *E. coli*-Stamm MB 406 wurde über Nacht bei 37 °C in 50 ml LB-Medium mit 0,2 % Maltose angezogen. Nach 5 min Zentrifugation bei 5000 g wurde das Bakteriensediment in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt. Je 150 μ l der Bakteriensuspension wurden mit 2×10^4 Phagen in 10-100 μ l SM 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend mit 5 ml TOP-Agarose auf LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bidyne A Membran wurde für 3 min auf die Platten gelegt und die Lage der Filter auf den Platten markiert. Von jedem Filter wurde durch Auflegen einer weiteren Membran eine Kopie hergestellt. Die Nylonmembranen wurden dann 5 min mit 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl benetzt und dann mit

2 x SSC neutralisiert. Nach dem Trocknen für 60 min wurde die DNA durch Bestrahlen mit UV-Licht (254 nm) für 3 min auf den Membranen fixiert. Die Nylonmembranen wurden mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert. Plaques mit positiven Signalen wurden durch Autoradiographie mit dem BioAnalyzing-System BAS 1800 der Firma Fuji identifiziert. Solche Plaques wurden ausgestochen, mit 500 μ l SM und einem Tropfen Chloroform über Nacht inkubiert und erneut zur Infektion von *E. coli* verwendet, bis einzelne positive Klone identifiziert werden konnten. Diese wurden ebenfalls ausgestochen und in 200 μ l SM Medium mit einem Tropfen Chloroform inkubiert und zur Isolation von Phagen-DNA eingesetzt.

Phagen-DNA wurde aus Flüssig-Lysaten isoliert (Lockett, 1990). 1 ml einer Übernachtskultur MB 406 in LB mit 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO₄ wurden mit 50 μ l der Phagensuspension aus den als positiv identifizierten Einzelplaques versetzt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in 100 ml LB Medium mit 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO₄ gegeben und bei 37 °C geschüttelt. Die OD₆₀₀ wurde verfolgt, bis sie nach dem ersten Anstieg auf 0,3-0,4 gesunken war. 100 ml dieses Flüssig-Lysates wurden mit 250 μ l Chloroform und NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0,9 M versetzt und geschüttelt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterienreste durch 10 min Zentrifugation bei 10 000 g entfernt. Nach Zugabe von 7,5 g Polyethylenglycol 6000 und 30 min Inkubation auf Eis wurden die präzipitierten Phagen 10 min bei 12 000 g abzentrifugiert. Das Phagensediment wurde in 2,5 ml SM resuspendiert. Zur Entfernung bakterieller Nukleinsäuren wurden 50 μ g RNase A und 12,5 μ g DNase zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zum Aufschluß der Phagenköpfe wurden 2,5 ml 300 mM Tris-Cl, pH 9,0, 100 mM EDTA, 1,25 % SDS zugegeben und 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 2,5 ml eiskaltes 3 M Kaliumacetat, pH 4,8 zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Gefällte Proteine wurden bei 10 min bei 12 000 g abzentrifugiert. 7 ml des Überstandes wurden mit 5 ml Isopropanol versetzt und die DNA 5 min bei 12 000 g abzentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 150 μ l TE gelöst.

Restriktionsverdau von 0,2-2 μ g Plasmid-DNA wurden in 20 μ l Gesamtvolumen mit 1-10 U Enzym für 1-2 h nach Herstellerangaben durchgeführt. Größere Mengen DNA, sowie Phagen- und genomische DNA wurden in 50-100 μ l Gesamtvolumen verdaut. Die Dephosphorylierung von DNA wurde mit alkalischer Phosphatase (CIP, Roche), die Ligation

von DNA mit T4 DNA-Ligase (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur DNA-Fragment-Isolation wurde die DNA mit dem jeweiligen Restriktionsenzym geschnitten und in einem Agarosegel aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde die gewünschte Bande lokalisiert und mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gelblock wurde mit dem QIAEX-II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift durchgeführt.

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde nach Feinberg & Vogelstein (1983) durchgeführt. Für die Markierung wurde [$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP (3 Ci/mmol, ICN) eingesetzt. Die Aufreinigung markierter DNA-Fragmente erfolgte durch Gelfiltration über eine Sephadex-G50 Säule. Es wurden spezifische Aktivitäten von 5×10^8 cpm/ μg DNA erzielt.

Der Transfer von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen auf Nylonmembranen (Biodyne A für Plasmid- und Phagen-DNA, Biodyne B für genomische DNA, Fa. Pall) erfolgte in 0,4 M NaOH über Nacht bei Raumtemperatur (Southern, 1975). Bei Verwendung von Biodyne A wurde die DNA durch eine kurze UV-Bestrahlung (254 nm, 10 W, 15 cm Abstand, 3 min) auf der Membran fixiert.

Zur Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA wurde die Nylonmembran in 250 mM Na-Phosphat, pH 7,2, 7 % SDS und 2,5 mM EDTA 1 h bei 65 °C prähybridisiert. Nach Zugabe der hitzedenaturierten, radioaktiv markierten DNA-Sonde und 10 ml frischer Hybridisierungslösung wurde über Nacht unter den gleichen Bedingungen hybridisiert (Church & Gilbert, 1984). Die Nylonmembranen wurden anschließend dreimal mit 2 x SSC, 0,3 % SDS bei Raumtemperatur gewaschen. Die autoradiographische Analyse erfolgte mit einer ImagePlate (BAS-IP MP 2025, Fuji) und dem elektronischen BioAnalyzer Fuji BAS 1800.

Die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde mit einem GeneAmp 2400 Thermocycler (Perkin-Elmer) in einem Gesamtvolumen von 50 μl in dünnwandigen Reaktionsgefäßen durchgeführt. Reaktionspuffer, dNTPs und Taq-Polymerase wurden dem QIAGEN Taq Core Kit (Qiagen Hilden) entnommen und nach Herstellervorschrift eingesetzt. Als DNA-Matrize dienten 250 ng genomischer oder Plasmid-DNA. Primer wurden in einer Endkonzentration von je 2 μM eingesetzt. Folgendes Programm zum unspezifischen Primer-Annealing wurde verwendet: [94 °C 5 min]; [37 °C 0:45 min] [72 °C 3:00 min] [94 °C 0:45 min] 3 \times ; [55 °C 0:45 min] [72 °C 3:00 min] [94 °C 0:45 min] 30 \times ; [55 °C 2:00 min] [72 °C 7:00 min] [4 °C].

3.8 Bestimmung von Liponsäure

Die Bestimmung des Liponsäuregehaltes von Hefe und *N. crassa* wurde nach der Vorschrift von Herbert & Guest (1970) durchgeführt. Verschiedene Hefe-Mutanten wurden in YPD bei 30 °C für 24-36 h bis in die stationäre Phase ihres Wachstums angezogen und durch Abzentrifugieren geerntet. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser wurde das Feuchtgewicht bestimmt. *N. crassa*-Hyphen wurden in 100 ml Batchkulturen in Vogelsmedium über Nacht angezogen und anschließend getrocknet. Die Zellen wurden in 2 ml 9 N H₂SO₄ für 2 h bei 121 °C autoklaviert. Das Hydrolysat wurde mit 10 N NaOH neutralisiert und mit Wasser auf ein definiertes Volumen gebracht. Die Zellreste wurden grob durch Glaswolle abfiltriert und das Filtrat anschließend durch einen 0,25 µm-Sterilfilter gedrückt. Unterschiedliche Mengen der Lysate wurden in Doppelbestimmungen als Supplement für den liponsäureauxotrophen *E. coli*-Stamm KER 176 eingesetzt: 1 ml Basal-Growth-Medium (BGM) wurde mit 100 µl 1 M Na-Succinat, pH 7,0 und einer definierten Lysatmenge versetzt und mit Wasser auf 1990 µl aufgefüllt. Eine Übernacht-Kultur von KER 176 in 2 ml BGM und Succinat mit 20 ng Liponsäure wurde abzentrifugiert und dreimal mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Das Sediment wurde in 0,9 % NaCl-Lösung aufgenommen und auf eine OD₆₀₀ von 1,0 gebracht. Jede Meßkultur wurde mit 10 µl dieser Bakteriensuspension angeimpft. Gleichzeitig wurden Eichkulturen mit bekannten Liponsäuremengen angesetzt. Nach 40 h Wachstum wurden die optischen Dichten der Kulturen bei 600 nm bestimmt.

3.9 Präparation und Auftrennung von Mitochondrienmembranen aus *N. crassa*

Zur Isolierung von Mitochondrien wurden 2-6 g Hyphen mit 30 ml Isolationsmedium aus 50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 15 % Saccharose und 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) für 3 x 20 s in einem Glasperlen-Homogenisator (Braun-Melsungen) aufgeschlossen. Hyphenmengen bis 50 g wurden in 8-10 Portionen verarbeitet. Die Mitochondrien wurden durch differentielle Zentrifugation isoliert (Nehls *et al.*, 1992). Zur Isolation größerer Mitochondrienmengen wurde 400 g tiefgefrorene Hyphen mit einem Hammer zerschlagen und in insgesamt 3 l Isolationsmedium (s.o.) in einem Küchenmixer homogenisiert. Die Zellen wurden dann mit einer Korundmühle aufgeschlossen (Weiss *et al.*, 1970) und die Zelltrüm-

mer durch eine Zentrifugation für 5 min bei 6000 g abgetrennt. Der Überstand wurde 60 min bei 14 000 g zentrifugiert, wobei die Mitochondrien sedimentierten. Das Mitochondriensediment wurde in 180 ml 0,2 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,5 aufgenommen, in einem Teflon-in-Glas-Homogenisator resuspendiert und auf 220 ml aufgefüllt. Diese Suspension wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -70 °C gelagert.

Die Auftrennung der Mitochondrienproteine wurden 300-500 µl der Mitochondriensuspension durch Zugabe von 20 % Triton X-100 auf eine Detergenzkonzentration von 5 % gebracht und nach Homogenisation 20 min bei 4 °C inkubiert. Unlösliches wurden für 15 min bei 12 000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf einen Dichtegradienten von 10-30 % Saccharose in 50 mM Tris-Cl, pH 7,5 und 0,1 % Triton X-100 aufgetragen. Nach 16 h Zentrifugation bei 150 000 g (36 000 rpm, Rotor SW40Ti, Ultrazentrifuge L7-65, Fa. Beckmann) wurden die Gradienten in 0,6 ml Portionen fraktioniert. Größere Mengen Mitochondrienextrakt wurden auf bis zu sechs Gradienten aufgetragen.

3.10 Isolierung und Spaltung von Komplex I aus *N. crassa*

Komplex I wurde aus dem Extrakt der Mitochondrienmembranen isoliert. Nach der Zuckergradienten-Zentrifugation und Fraktionierung des Gradienten wurde die Position von Komplex I durch Messen der NADH:Ferricyanid-Redoxaktivität bestimmt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und Komplex I durch Anionenaustausch-Chromatographie an einer 4 ml Resource Q-Säule (Amersham-Pharmacia) weiter gereinigt. Die Säule war zuvor mit 50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 0,1 % Dodecyl β-D-maltosid oder Triton X-100 und 50 mM NaCl mit 0,5 ml/min äquilibriert worden. Die Proteine wurden mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf die Säule gepumpt, mit einem kontinuierlichen NaCl-Gradienten von 50-400 mM NaCl eluiert und in 0,5 ml Fraktionen aufgefangen. Komplex I-haltige Fraktionen wurde wiederum durch Messung der NADH:Ferricyanid-Redoxaktivität festgestellt. Die Gipfelfraktionen wurden vereinigt und mit kristallinem Kalium-Rhodanid auf eine Endkonzentration von 0,6 M KSCN gebracht. Die Proteinlösung wurde anschließend auf einen 12 ml Zuckergradienten von 10-30 % Saccharose in 50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 0,1 % Triton X-100 und 0,6 M KSCN aufgetragen und 16 h bei 150 000 g zentrifugiert. Der Gradient wurde mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,6 ml/min durch eine Durchflußküvette in 600 µl Proben fraktioniert. Kontinuierlich wurden Spektren mit einem Diodenarray-Spektrometer mit

Lichtleiteroptik der Firma J&M Analysetechnik (Aalen) von 200-600 nm mit einer Integrationszeit von 50 ms und einem Intervall von 4 s über eine Meßzeit von 30 min aufgenommen. Die Gipffractionen des Membranarms wurden vereinigt, eingengt und nach Bedarf auf einer 14-ml-TSK-Gel-G4000SW-Säule (Fa. TosoHaas) weiter aufgereinigt. Die Säule wurde zuvor mit einem Säulenvolumen 50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 0,1 % Triton X-100 und 200 mM NaCl equilibriert. Das Eluat wurde in 0,5 ml-Fractionen gesammelt.

3.11 Präparation und Aktivitätsbestimmung der α -Ketoglutarat Dehydrogenase aus *N. crassa*

Die Präparation von α -Ketoglutarat Dehydrogenase aus Mitochondrien wurde nach der Vorschrift von Mareck *et al.* (1986) durchgeführt. In einer Mitochondriensuspension wurde mit kristallinem Digitonin ein Digitonin:Protein-Verhältnis von 0,5 (w/w) eingestellt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien in einem Handhomogenisator aufgeschlossen. Die Suspension wurde mit 2 Volumen Extraktionspuffer aus 10 mM Tris-Cl, pH 7,2, 440 mM Saccharose, 10 mM MgCl₂, 100 mM NH₄Cl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF und 1,5 μ M Leupeptin verdünnt und 15 min mit 15 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde portionsweise auf eine Endkonzentration von 3 % Polyethylenglycol (PEG) 6000 gebracht und 20 min bei Raumtemperatur auf einem Rollenschüttler inkubiert. Nach Abzentrifugieren der ausgefällten Proteine für 10 min bei 15 000 g wurde der Überstand auf 5 % PEG 6000 gebracht und wiederum 20 min bei Raumtemperatur auf dem Rollenschüttler inkubiert. Die ausgefallenen Proteine wurden für 10 min bei 15 000 g abzentrifugiert und in 50 mM KH₂PO₄, pH 7,4, 8 mM MgCl₂, 0,05 mM CaCl₂, 0,05 mM TPP, und 0,5 mM PMSF resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Biuret festgestellt.

Die Bestimmung der α -Ketoglutarat Dehydrogenase erfolgte durch spektrometrische Verfolgung der NADH-Bildung durch den Umsatz von α -Ketoglutarat. In einer Küvette wurden 990 μ l des Meßpuffers aus 50 mM KH₂PO₄, pH 7,4, 0,8 mM DTE, 0,05 mM CaCl₂ 8 mM MgCl₂, 0,2 mM Co-Enzym A, 0,4 mM TPP und 2 mM NAD⁺ mit 5 μ l der α -Ketoglutarat Dehydrogenase-Suspension gemischt und die Reaktion mit 5 μ l einer 1 M α -Ketoglutarat-Lösung gestartet. Die Extinktion bei 340 nm wurde über 600 s verfolgt. Zur Auswertung wurde mit einem molarer Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{340} = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ gerechnet.

3.12 Verschiedene analytische Methoden

Routinemäßig wurde die Aktivität von Komplex I mit Hilfe der NADH:Ferricyanid-Redoxaktivität, einer artifiziellen Aktivität des peripheren Arms von Komplex I, bestimmt. In 50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 0,1 % Triton X-100, 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,1 mM NADH wurde bei 20 °C die Extinktionsänderung bei 410 nm gemessen. Es wurde der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{410} = 1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ verwendet (Friedrich *et al.*, 1989).

Zur Immunpräzipitation wurden 150-500 μl der Fraktionen eines Zuckergradienten mit 700 μl 100 mM Na-Phosphat, pH 7,3, 0,05 % Triton X-100, 10 μl Antiserum und 50 μl einer Suspension aus 50 mg/ml Protein A-Sepharose Cl-4B (Amersham-Pharmacia) in 100 mM Na-Phosphat gemischt. Der Ansatz wurde 3-5 h bei 4 °C auf einem Kippeschüttler inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren wurde dreimal mit 100 mM Na-Phosphat, pH 7,3, 0,05 % Triton X-100 gewaschen. Die Sedimente wurden mit 50 μl Protein-Probenpuffer für 30 min auf einem Schüttler bei 20 °C inkubiert. Die Lösung wurde auf einem 16 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE) (Lämmli, 1970). Proben von Zuckergradienten, die SDS-Gel-elektrophoretisch analysiert und autoradiographiert werden sollten, wurden erst über Nacht gegen 10 mM Tris-Cl, pH 7,5 dialysiert und anschließend lyophilisiert, um das Protein aufzukonzentrieren. Das trockene Protein wurde in Probenpuffer aufgenommen und auf das SDS-Gel aufgetragen.

Proteinkonzentrationen wurden spektrometrisch oder nach der Methode von Biuret (Beisenherz *et al.*, 1953) bestimmt. Als Standard diente Rinderserumalbumin.

Zur Elution von Protein aus getrocknetem SDS-Polyacrylamid-Gel wurde die interessante Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit wenig Wasser rehydriert. Das Gel wurde abzentrifugiert und das Wasser abgesaugt. Nach Zusatz von 200 μl 50 mM Na_2HPO_4 , pH 8,0, 10 mM EDTA und 0,2 % SDS wurde für 30 min bei 40 °C inkubiert. Das Gel wurde abzentrifugiert und der Überstand gegen 10 mM Tris-Cl pH 8,0 dialysiert. Das Dialysat wurde anschließend lyophilisiert.

Zur Deacylierung von ACP wurde die Proteinprobe nach Lyophilisieren mit 50 mM DTT, 100 mM Na_2CO_3 , pH 10 für 90 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Reaktion wurde der Ansatz mit Salzsäure neutralisiert und der SDS-PAGE-Analyse zugeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Liponsäuregehalt und α -Ketoglutarat Dehydrogenase-Aktivität des *N. crassa* Wildtyps und der mtACP-Deletionsmutante

Das Gen für das mitochondriale Acyl Carrier Protein in *N. crassa* war in einer vorangegangenen Doktorarbeit inaktiviert worden (Schneider *et al.*, 1995; R. Schneider, Dissertation 1995). Dieses Gen besteht aus vier Exons, von denen in der mtACP-Deletionsmutante *acp1* drei durch das bakterielle Gen für die Hygromycin B Phosphotransferase ersetzt sind. Hyphen dieser Mutante und des Wildtyps wurden getrocknet, hydrolysiert und in verschiedenen Mengen als Supplement für den Liponsäure-auxotrophen *E. coli*-Stamm KER 176 eingesetzt.

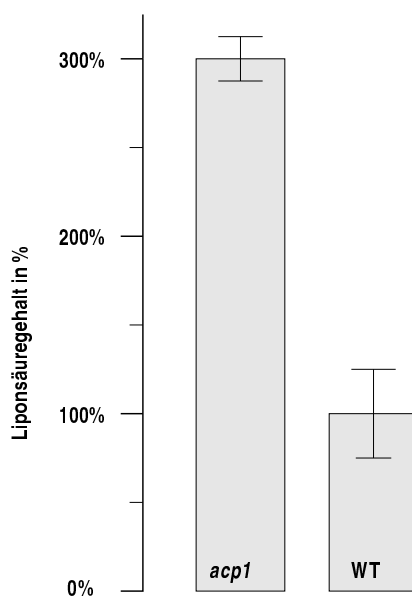


Abbildung 6: Relativer Liponsäuregehalt der Mutante *acp1* und des Wildtyps (WT) von *N. crassa*. Der Liponsäuregehalt des Wildtyps wurde gleich 100 % gesetzt.

Die optische Dichte der Bakterienkulturen wurde mit Eichkulturen, in denen definierte Mengen an Liponsäure zugesetzt wurden, verglichen und daraus der Liponsäuregehalt der Hyphen errechnet. Genauso wurde mit isolierten Mitochondrien aus Wildtyp und Mutante *acp1* von *N. crassa* verfahren. Es zeigte sich, daß die Absolutwerte der Liponsäuregehalte

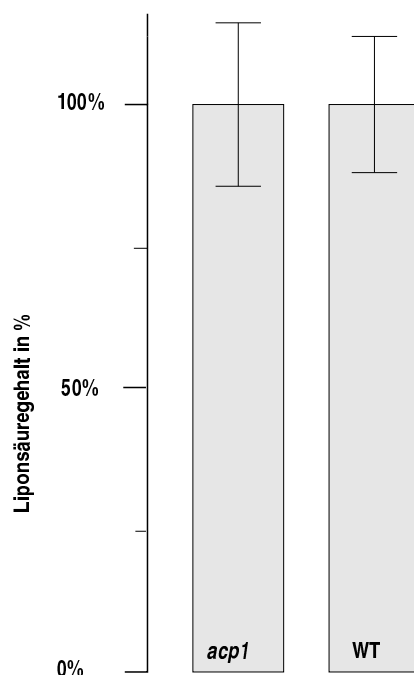


Abbildung 7: Relativer Liponsäuregehalt isolierter Mitochondrien der Mutante *acp1* und des Wildtyps (WT) von *N. crassa*. Der Liponsäuregehalt der Wildtypmitochondrien wurde gleich 100 % gesetzt.

von Messung zu Messung in einem weiten Bereich schwankten. Die Verhältnisse der Liponsäuregehalte verschiedener Mutanten waren innerhalb einer Messreihe jedoch immer gleich. Solche Schwankungen sind auch in der Literatur zu finden, wo verschiedene Autoren unterschiedliche Absolutwerte für den Liponsäuregehalt in Hefe beschreiben (Sulo & Martin, 1993), Brody *et al.*, 1997). Aus diesem Grund sind alle hier gezeigten Daten als relative Werte angegeben. Der Liponsäuregehalt des Wildtyps wurde gleich 100 % gesetzt. Die Zellen der Mutante *acp1* enthielten dreimal soviel Liponsäure wie die des Wildtyps (Abb. 6). Die Mitochondrien zeigten jedoch in beiden Fällen die gleichen Liponsäuregehalte (Abb. 7). Vermutlich besitzt die Mutante *acp1* mehr Mitochondrien als der *N. crassa* Wildtyp.

Um die biologische Verfügbarkeit der Liponsäure in Wildtyp- und *acp1*-Mitochondrien zu untersuchen, wurde die Aktivität der α -Ketoglutarat Dehydrogenase bestimmt. Die Mitochondrienmembranen wurden dazu durch Digitoninbehandlung zerstört und abzentrifu-

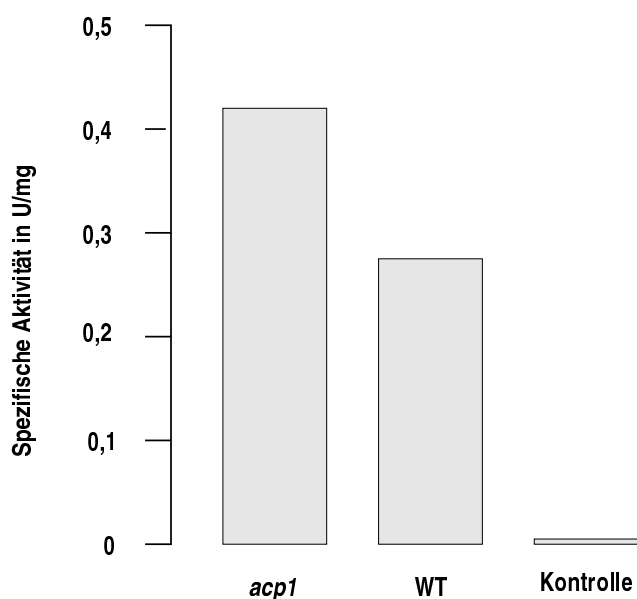


Abbildung 8: Spezifische α -Ketoglutarat Dehydrogenase Aktivität der Mitochondrienextrakte der Mutante *acp1* und Wildtyp (WT) von *N. crassa*. Als Kontrolle wurde der Wildtyp Extrakt für 5 Minuten Hitze-inaktiviert und vermessen.

giert. Durch fraktioniertes Fällern mit PEG 6000 wurde die α -Ketoglutarat Dehydrogenase ausgefällt. Diese Schritte wurden für Wildtyp und Mutante *acp1* parallel mit den selben Puffern und Geräten durchgeführt. Die Sedimente nach der PEG-Fällung wurden resuspendiert und ihre Proteinkonzentration nach der Biuret-Methode bestimmt. Anschließend wurden die α -Ketoglutarat Dehydrogenase Aktivitäten durch Messung der zeitabhängigen NADH-Zunahme nach Zusatz von α -Ketoglutarat bei 340 nm festgestellt. Aus den Mitochondrien der Mutante *acp1* konnte α -Ketoglutarat Dehydrogenase mit einer spezifischen Aktivität von 0,42 U/mg extrahiert werden. Der Extrakt aus Wildtyp-Mitochondrien hatte eine spezifische Aktivität von 0,27 U/mg (Abb. 8). Die Kontrolle durch hitzedenaturierte α -Ketoglutarat Dehydrogenase-Präparation aus dem Wildtyp zeigt, daß die gemessenen Werte auf enzymatische Aktivität zurückzuführen sind. Die Mutante *acp1* besitzt also Liponsäure in bioverfügbarer Form. Die Vermutung lag nahe, daß *N. crassa* ein zweites Gen für ein mtACP enthält und das Produkt dieses Gens für die Liponsäuresynthese zuständig ist.

4.2 Nachweis von mtACP2 durch *in vivo* Markierung von *N. crassa* mit [¹⁴C]-Pantothersäure

Um die effiziente Aufnahme von [¹⁴C]-Pantothersäure zu gewährleisten, wurde die *N. crassa* Mutante *acp1* zuvor mit der Pantothenat-auxotrophen Mutante *pan2* (FGSC 4103) gekreuzt. Die Doppelmutante *acp1 x pan2* wurde anhand ihrer Pantothersäure-Auxotrophie und des Selektionsmarkers identifiziert. Die Doppelmutante wurde in Vogelmedium in Gegenwart von [¹⁴C]-Pantothersäure angezogen. Nach 20 h Wachstum wurden die Hyphen geerntet und die Mitochondrien isoliert. Die Mitochondrienproteine wurden mit Triton X-100 solubilisiert und durch Zuckergradientenzentrifugation der Größe nach aufgetrennt. Die Zentrifugationsbedingungen wurden so gewählt, daß Komplex I in das untere Drittel des Gradienten sedimentieren würde. NADH:Ferricyanid-Redoxaktivität konnte in diesem Bereich des Gradienten erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden, da die *N. crassa* Mutante *acp1* keinen Komplex I mehr bilden kann (Schneider *et al.*, 1995). Die Proteine der Gradientenfraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, die Gele getrocknet und für 14 Tage auf einer ImagePlate (BAS-IP MP 2025, Fuji) exponiert, die in einem BioAnalyser (BAS 1800, Fuji) ausgelesen wurde. Das Ergebnis der radioaktiven Markierung zeigt Abb. 9. Im vorderen Teil des Gradienten wurden vier Proteine mit einer scheinbaren molekularen Masse zwischen 12 und 18 kDa gefunden. Die Bande mit der kleinsten Molmasse zieht sich durch den gesamten Gradienten hindurch. Da die Mutante *acp1 x pan2* das Gen für das mtACP1 nicht mehr besitzt, muß es sich hier um ein anderes Pantothersäure-haltiges Protein handeln. Zum Nachweis, daß es sich bei dem markierten Protein tatsächlich um ein ACP handelt, wurden die markierten Banden der letzten fünf Fraktionen des Zuckergradienten aus dem Gel (Abb. 9) ausgeschnitten und das Protein eluiert. Ein Teil des Proteins wurde alkalisch deacyliert, während der andere unbehandelt als Kontrolle diente. Die Proteine wurden lyophilisiert und anschließend erneut auf einem SDS-PAGE aufgetrennt. Die Autoradiographie ist in Abb. 10 gezeigt. Wie für Acyl Carrier Proteine bekannt war, erhöhte sich die scheinbare Molmasse des markierten Proteins durch Deacylierung von ca. 12 kDa auf ca. 18 kDa (Shintani & Ohlrogge, 1994). Den gleichen Befund ergab die Deacylierung der in Abb. 9 gezeigten [¹⁴C]-Pantothersäure-markierten Proteinbanden aus dem vorderen Drittel des Zuckergradienten. Damit handelt es sich bei allen markierten Banden um ein mtACP in verschiedenen Acylierungsstufen. Das gefundene Protein wurde mtACP2 genannt.

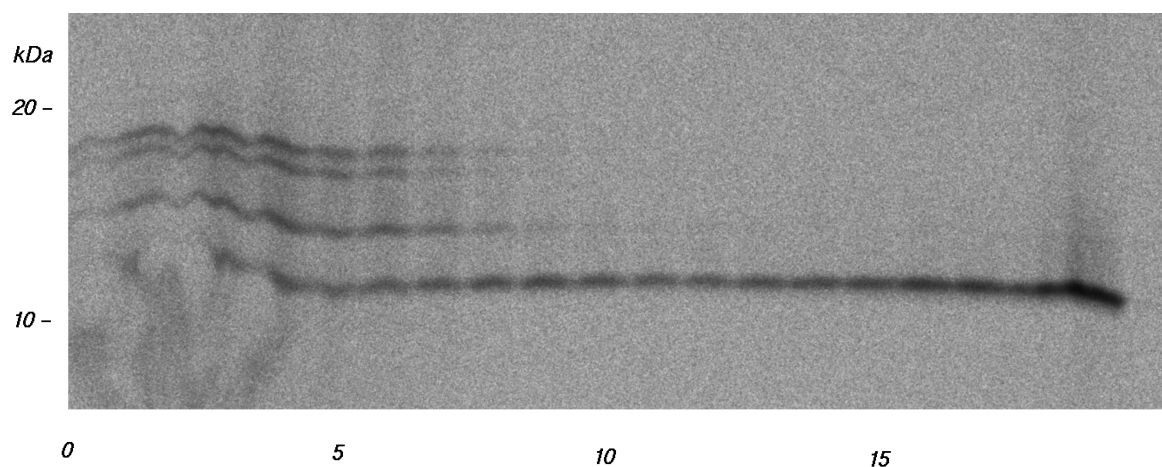


Abbildung 9: Verteilung von [^{14}C]-Pantothensäure markiertem Protein nach Zuckergradienten-Zentrifugation und anschließender SDS-PAGE von Triton X-100 solubilisierten Mitochondrien aus der Mutante *acp1 x pan2* in *N. crassa*.

Mit Antiseren gegen die 21.3 kDa bzw. 49 kDa Komplex I Untereinheiten wurde versucht, markiertes Protein aus den Zuckergradientenfraktionen (vgl. Abb. 9) zu präzipitieren. Das Ergebnis ist in Abb. 11 gezeigt.

Mit beiden Antiseren konnte mtACP2 präzipitiert werden. Das mtACP2 muß daher in Protein-Cluster assembliert sein, die einmal die Komplex I-Untereinheit Nuo21.3 und zum anderen mal Nuo49 enthalten. Das Position des erstgenannten Clusters im Zuckergradienten entspricht dem Sedimentationsverhalten von teilweise aggregiertem Membranarm. Markiertes Protein, das mit der 49 kDa Untereinheit assoziiert ist, ist in dem Bereich des Zucker-

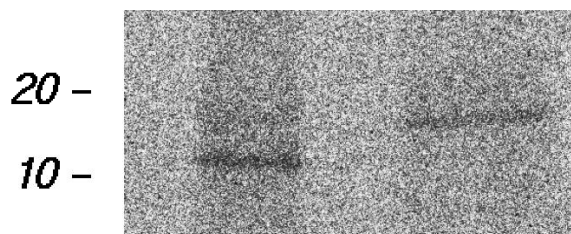


Abbildung 10: Deacylierung des [^{14}C]-Pantothensäure-markierten Proteins aus der Mutante *acp1*. Links ist das Protein vor und rechts nach der Deacylierung gezeigt.

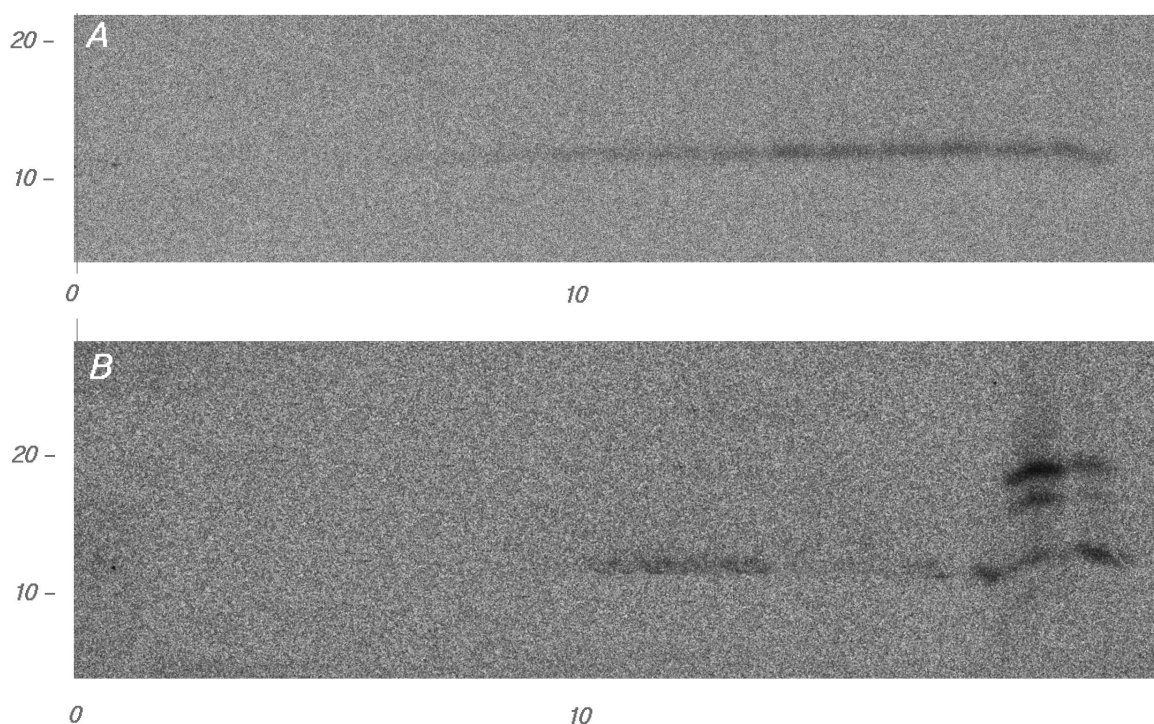


Abbildung 11: Immunpräzipitation solubilisierter Proteine aus [^{14}C]-Pantothensäuremarkierten Mitochondrien von *acp1 x pan2*. Verwendet wurde Antiserum gegen die 21.3 kDa (A) bzw. die 49 kDa (B) Untereinheit von Komplex I.

gradienten zu finden, in dem der periphere Arm erwartet würde, sowie in den letzten Fraktionen des Gradienten. Hier sedimentieren hochaggregierte Proteine. Nur hier wurde das mit anderen Komplex I Untereinheiten assoziierte mtACP2 in mehr als einer Acylierungsstufe identifiziert (Abb. 11(B)).

4.3 Suche nach dem Gen für ein zweites mtACP

Mit dem Programm BLAST (Altschul *et al.*, 1990) wurde in den bis Oktober 2000 zugänglichen Protein- und Genomdatenbanken verschiedener Eukaryonten nach einem zweiten Gen für ein mtACP gesucht. Die Proteinsequenz des mtACP aus Hefe wurde als Anfrage eingesetzt. Neben Sequenzidentitäten und -ähnlichkeiten ist das Vorhandensein einer mitochondrialen Importsequenz das wichtigste Kriterium für die Identifizierung eines weiteren

mtACP. Kennzeichnend dafür ist eine N-terminale Präsequenz, in der saure Aminosäuren vermieden, aber Arginin, Alanin und Serin bevorzugt verwendet werden. Ein Argininrest ist fast immer zwei und/oder zehn Positionen vor der reifen Proteinsequenz zu finden und scheint der Erkennung durch eine Protease zur Abspaltung der Importsequenz zu dienen (Heijne *et al.*, 1988). Es wurden tatsächlich verschiedene Genprodukte mit Ähnlichkeit zum mtACP aus Hefe identifiziert.

```

centacp(A)      MKEPHSFRRVKMFGRRVGRVFRRTASVVVQRRSVSASVPQMVKLVAPSVNFIQTRGSKIE
centacp(B)      -----MLRVAVSAALRTVSVRALSNSASVQQR-VITPILLSAQKPSFQIR
                . ** . * * * . * . * . * . *
                . * . * . * . * . * . * . * . *

centacp(A)      VFGPFDPKQLTFKQVEDRVLKAVRSWDRFPADKESLLKLDADLSKDFGFD[S]LDQVEI
centacp(B)      QYSAKAP---LTKKTLLEERIVLVLSLYDKIDAKK---LTMSDFSKDLGLD[S]LDHVEV
                . | * ** * . * . * . * . * * * * * * * * * * * *

centacp(A)      VMALEDEFGFIEIPLQSDKFKTIRDAFKYICEREDVYE
centacp(B)      VMAMEEEFGFEIPDGDADRFKTPRDIFQYIADKEDVFE
                *** . * . ***** * . * . *** * * * . * . * . * . * . *

```

Abbildung 12: CLUSTAL W-Alignment von mtACP1 (EMBL U00033) und mtACP2 (EMBL AL132860) in *Caenorhabditis elegans*. Die vermutete erste Aminosäure des reifen Proteins ist mit | markiert.

Das Genom von *C. elegans* enthält zwei mtACP-Gene (Abb. 12). Die Benennung der zugehörigen Proteine mit mtACP1 und 2 erfolgte willkürlich. Die Aminosäuresequenz um das Aktive Zentrum zeigt gute Übereinstimmung. Die Sequenzidentität beträgt hier 42 %. *A. thaliana* besitzt sogar drei Gene für Acyl Carrier Proteine, die ihrer Sequenz nach nicht zu den plastidären, sondern zu den mitochondrialen gehören (Abb. 13). Zwei Positionen vor dem Serin im aktiven Zentrum besitzen plastidäre ACPs in *A. thaliana* ein hochkonserviertes Alanin, während alle bekannten mitochondrialen Acyl Carrier Proteine an dieser Stelle einen Leucinrest besitzen (vgl. Abb. 13, Position [-2]). Ebenso besitzen plastidäre *A. thaliana* ACPs neun Positionen hinter dem das Phosphopantethein tragenden Serin einen hochkonservierten Glycinrest, der in allen bekannten mtACPs durch ein Alanin ersetzt ist (vgl. Abb.

13, Position [+9]; Shintani & Ohlrogge, 1994). In den drei gefundenen Sequenzen werden an den entsprechenden Positionen die für mtACPs typischen Aminosäurereste gefunden. Für *Drosophila melanogaster* wurde während der Anfertigung dieser Arbeit bekannt, daß durch alternatives Splicen eines einzigen Genes zwei verschiedene mRNA-Formen für mtACPs hergestellt werden (Ragone *et al.*, 1999). Im Genom von *Aspergillus niger* konnte durch Datenbank-Suche bisher nur ein Gen für ein mtACP identifiziert werden (Abb. 16).

4.4 Codon-Gebrauch und Expressionshäufigkeit von mtACP

Für die Codierung der 20 möglichen Aminosäuren in einem Protein stehen 61 verschiedene Codons zur Verfügung. Diese werden jedoch nicht gleichmäßig benutzt. Jeder Organismus verwendet, abhängig von der Häufigkeit seiner verschiedenen tRNAs, einen Satz optimaler Codons. Dieser kann wie bei *A. thaliana* Gewebe- oder Wachstumsstadien-abhängig sein (Chiapello *et al.*, 1998). Im Genom von *C. elegans* ist die Expressionshäufigkeit der Proteine jedoch eng an die Verwendung optimaler Codons in ihren Genen gekoppelt (Stenico *et al.*, 1994). Hohe Werte für den *Codon Bias Index* (CBI; Bennetzen & Hall, 1982) und die *Frequency of optimal codons* (Fop; Ikemura, 1981) eines Gens sind Zeichen für die häufige Verwendung optimaler Codons und somit für eine hohe Expressionsrate des entsprechenden Proteins. Der Fop-Wert ist das Verhältnis der Summe optimaler Codons eines Gens zur Summe der Aminosäuren des zugehörigen Proteins. Der größt mögliche Wert ist 1,0 für die ausschließliche Benutzung optimaler Codons. Bei völliger Vermeidung optimaler Codons ist der Fop-Wert gleich Null.

Der CBI ist der Fop ähnlich, benutzt jedoch eine andere Skalierung. Die Vermeidung optimaler Codons äußert sich hier in negativen Werten, während die alleinige Verwendung optimaler Codons einen CBI-Wert von 1,0 liefert.

Der Codon-Gebrauch verschiedener mtACP-Gene wurde mit dem Programm CodonW (John Peden, CMLEUN, Dept. of Genetics, University of Nottingham; <http://www.molbiol.ox.ac.uk/cu/codonW.html>) untersucht (Stenico *et al.*, 1994). Da vermutlich bei *C. elegans* wie bei *N. crassa* ein mtACP mit Komplex I assoziiert ist, wurden zum Vergleich einige Gene für Komplex I-Untereinheiten mit in die Untersuchung einbezogen (Tabelle 2). Die mtACP-homologen Gene in *C. elegans* unterscheiden sich nach den zur Verfügung stehenden Daten deutlich in ihrem Codon-Gebrauch. Das mtACP1 wird dieser Analyse zufolge

```

                                     |
atmtacp1    -MALRNAILRHLRVPVQTLGLN--QSKIGFLGT-IRSFSSHDD--HLSREAVVDRVLDVV
atmtacp2    -MAARGAMLRYLRVNVNPTIQNPRECVL PFSIL-LRRFSEEV RGSFLDKSEVTDRVLSVV
atmtacp3    MHCIRSSILQHLLRVSVRPTSLLQNGFKSIGIFNFTSEAAA-DGGQDQILSRVIELV
             . * ..* . ** . * | . * . * . . ** . *

atcpacp1    <DLGAD[S]LDTVEIVMGLEEEF>
             ^           ^

atmtacp1    KSFQKVDPSKVTPEVHFQNDLGLD[S]LDTVEIVMAIEEEFKLEIPDKEADKIDSCSLAI
atmtacp2    KNFQKVDPSKVTPKANFQNDLGLD[S]LDSVEVVMAL EEEFGFEIPDNEADKIQSIDLAV
atmtacp3    KKYDKTNTSEVTERADFQKDL SLD[S]LDKTELVMAL EEEFSIEIPDEKADKLTCCGDVA
             * . * * ** ** ** * ** * .*** .***** **** ** .
             -2           +9

atmtacp1    EYVYNHPMSS----
atmtacp2    DFIASHPQAK----
atmtacp3    TYILSETPTKASES
             .. .

```

Abbildung 13: CLUSTAL W-Alignment von mtACP1 (AAC27139.1; Shintani & Ohlrogge, 1994), mtACP2 (AAC27464.1) und mtACP3 (BAB090989.1) aus *A. thaliana*. Für mtACP1 und mtACP2 liegt die vermutete erste Aminosäure des reifen Proteins im Alignment an der gleichen Position. Sie ist für alle drei mtACP mit | markiert. Mit atcpacp1 ist eine typische Sequenz für das aktive Zentrum der plastidären Acyl Carrier Proteine von *A. thaliana* gezeigt. Die Pfeile kennzeichnen in plastidären und mitochondrialen ACP verschiedene, aber jeweils hoch konservierte Aminosäuren an den Positionen [-2] und [+9] relativ zum Phosphopantethin-tragenden Serin im aktiven Zentrum.

Tabelle 2: Untersuchung des Codon-Gebrauchs der Gene der beiden mtACP im Vergleich zu Genen für verschiedene Komplex I-Untereinheiten (nuo14.8 bis nuo78) und der mitochondrialen β -Keto-Acyl-ACP-Synthase (mtcem) in *C. elegans*. Die Komplex I-Untereinheiten sind mit "nuo" für [N]ADH:[U]bichinon [O]xidoreduktase bezeichnet. Die angegebene Zahl beschreibt die Molmasse der jeweiligen Untereinheit in kDa. Die Spalte CBI gibt den *Codon Bias Index* an (Bennetzen & Hall, 1982). Fop steht für *Frequency of optimal codons* (Ikemura, 1981). Die Größen werden genauer im Text beschrieben.

Gen	CBI	Fop
nuo10.5 (CAB02765.1)	-0,009	0,328
nuo14.8 (CAB16513.1)	0,416	0,656
nuo19.3 (CAB02132.1)	0,146	0,455
nuo51 (CAA90435.1)	0,305	0,573
nuo78 (AC006768)	0,217	0,504
mtcem (CAB02284.1)	-0,187	0,231
cemtacp1 (U00033)	0,227	0,512
cemtacp2 (AL132860)	0,074	0,404

deutlich stärker exprimiert als mtACP2. Für mtACP1 werden etwa mit gleicher Häufigkeit optimale Codons verwendet wie für die Komplex I-Untereinheiten Nuo51 und Nuo78. Eine Untersuchung für die entsprechenden Gene in *N. crassa*, in dem das Gen für mtACP2 bisher nicht identifiziert werden konnte, zeigt die gleiche Tendenz (Tabelle 3).

Eine Untersuchung der genauen Funktion der gefundenen Gene und ihre Genprodukte durch Konstruktion von *knock-out*-Mutanten erfolgte bisher weder in *A. thaliana* noch in *C. elegans*. Beide Organismen sind molekularbiologisch nicht in ausreichendem Maße zugänglich. Das Gen für ein zweites mtACP wurde daher in *N. crassa* gesucht.

4.5 Versuch der Klonierung des Gens für mtACP2 in *N. crassa*

Das Genom von *N. crassa* war bis zur Fertigstellung dieser Doktorarbeit nur zu 30 % bekannt. Zur Identifizierung des Gens für ein zweites mtACP wurden deshalb andere Metho-

Tabelle 3: Untersuchung des Codon-Gebrauchs des Gens für das mtACP im Vergleich mit Genen für verschiedene Komplex I-Untereinheiten (nuo14.8 bis nuo78) und für die mitochondriale β -Keto-Acyl-ACP-Synthase (mtcem) in *N. crassa*.

Gen	CBI	Fop
nuo10.5 (X69929.1)	0,258	0,554
nuo14.8 (X76344.1)	0,307	0,600
nuo19.3 (AJ001520)	0,361	0,627
nuo51 (X56227.1)	0,494	0,716
nuo78 (X57602.1)	0,380	0,634
mtcem (AF021234.1)	0,214	0,524
ncmtacp1 (X83578)	0,578	0,742

den versucht, die in den folgenden Kapiteln beschrieben sind. Keine dieser Methoden führte zur Klonierung der gesuchten DNA-Sequenz.

4.5.1 Versuch der Genidentifizierung über die DNA-Sequenz

Mit Hilfe eines radioaktiv markierten, 102 Bp langen *Psh* AI/*Sal* I-Fragmentes aus der cDNA von mtACP1 aus *N. crassa* wurde die genomische Genbibliothek λ J1 durch heterologe Hybridisierung durchsucht. Das Fragment codiert für den das aktive Zentrum umgebenden Bereich. Um die geeignete Hybridisierungstemperatur zu ermitteln, wurde genomische DNA des Wildtyps und der Mutante *acp1* mit *Eco* RI geschnitten und in einem Southernblott bei verschiedenen Temperaturen mit der Sonde hybridisiert (Abb. 14).

Bei stringenter Hybridisierung wurde ein 9 kBp-Fragment im Wildtyp und ein 2kBp-Fragment in der Mutante von der Sonde erkannt. Die Sonde hybridisierte im Wildtyp mit dem dritten und vierten Exon des Gens für das mtACP1. Die Mutante *acp1* besitzt lediglich das vierte Exon, das von der Sonde erkannt wurde. Durch das eingesetzte Hygromycin B-Gen wurde eine zusätzliche *Eco* RI-Schnittstelle in das Genom des Pilzes eingefügt, so daß das von der Sonde erkannte DNA-Fragment sehr viel kleiner ist als das im Wildtyp. Bei einer Hybridisierungstemperatur von 47 °C wurde in beiden Genomen ein zusätzliches DNA-Fragment mit einer Länge von ca. 3,3 kBp erkannt. Das Gen für die cytosolische FAS, die

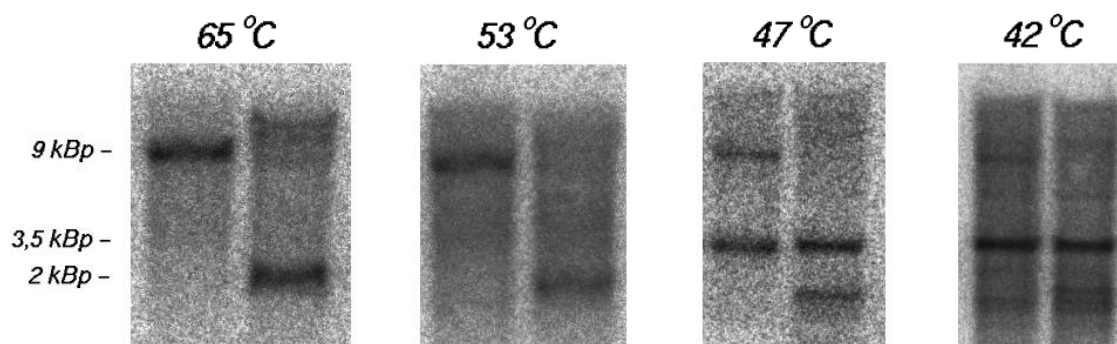


Abbildung 14: Southernblott von genomischer DNA des Wildtyps (links) und der Mutante *acp1* (rechts) von *N. crassa*. Die DNA wurde mit *Eco RI* geschnitten und bei verschiedenen Temperaturen mit einer 102 Bp Sonde aus der cDNA des mtACP1 hybridisiert.

eine ACP-Domäne besitzt, welche ebenfalls von der Sonde erkannt werden könnte, würde auf einem *Eco RI*-Fragment von mehr als 9 kbp Länge liegen (B. Brors, persönliche Mitteilung). Dieses wurde jedoch bei keiner der gewählten Hybridisierungstemperaturen markiert. Bei der gefundenen Hybridisierungstemperatur von 47 °C wurden ca. 150 000 Phagenklone der Genbank λ J1 durchsucht. 18 Klone hybridisierten mit der Sonde. Fünf davon enthielten das Gen für mtACP1. Keiner der anderen enthielt jedoch ein Gen mit Ähnlichkeit zu einem ACP-Gen.

In einem zweiten Experiment wurde die Klonierung des gesuchten mtACP2-Gens durch PCR versucht. Aus der Aminosäuresequenz der mtACP aus den Pilzen *A. niger*, *N. crassa* und *S. cerevisiae* wurden die degenierten Primer HmtACP-AS3x und HmtACP-C2e abgeleitet (Abb. 16) und zur Amplifikation von Teilen der genomischen DNA der Mutante *acp1* und des Wildtyps von *N. crassa* verwendet (Abb. 15). Als interne Positiv-Kontrolle diente die Amplifikation eines Teils des Gens für mtACP1 zu einem PCR-Produkt von 240 Bp Länge bei Verwendung von genomischer Wildtyp-DNA als Template.

Dieses Fragment besteht nicht nur aus codierender DNA, sondern enthält ein Intron (Abb. 16) von 156 Bp Länge. Die durchschnittliche Introngröße für filamentöse Pilze liegt zwischen 100 und 200 Bp (Gurr *et al.*, 1987), so daß auch ein PCR-Produkt mit Sequenzteilen eines Gens für ein zweites mtACP zwischen 150 und 300 Bp lang sein sollte. Ein solches PCR-Fragment wurde jedoch nicht identifiziert. Das nächst größere PCR-Produkt war ein

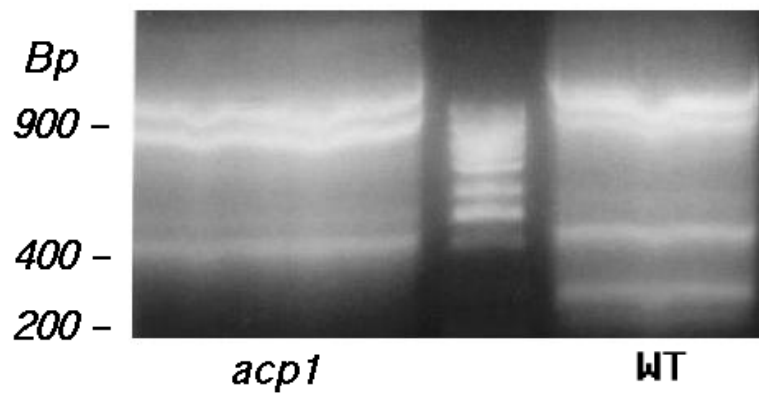


Abbildung 15: Mit degenerierten Primern (Abb. 16) erhaltene PCR-Produkte. Genomische DNA der Mutante *acp1* (links) und des Wildtyps (rechts) von *N. crassa* wurden als Template verwendet. Ein 240 Bp-Fragment in der WT-Spur wird für mtACP1 erwartet und fehlt in der Spur der Mutante *acp1*.

400 Bp-Fragment. Dieses wurde kloniert und sequenziert. Die erhaltene Sequenz enthielt keine verwertbare Strukturinformation.

```

<
ncmtacp  MFRTAALTAARVARPAVASAVRAGVARPAFVQAVPKVA---AFQAVRFYSAGGHLKKDEV
scmtacp  MFRSVCRISSRVA-P---SAYRTIMGRSVMSN-----TILAQRFYSAN--LSKDQV
anmtacp  MFRSAVVRSLRASVPRAVKTPAPFQIRSSPVARPAQFAPRFAYQGVRLYSAPAGLNKDEV
          ***. . * . * . * . * . * * * * * * * * * * * * *
          >< >< >< ><
ncmtacp  LKKDEV FSRIAQVLSGFDKVN---DPKNITETAHFANDLGLDSLDTVEVVMAlEEEEFSI
scmtacp  LSKDQV SQRVIDVIKAFDKNSPNIANKQISSDTQFHKDLGLDSLDTVELLVAIEEEFDI
anmtacp  LNKDEV EGRIVNLLKNFDKVS---DASKINVASHFANDLGLDSLDTVEVVMAlEEEEFSI
          * * * . * . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          _____

>
ncmtacp  EIPDKDADQIHSVDKAVEYILSQPDAN
scmtacp  EIPDKVADELRSVGETVDYIASNPAN
anmtacp  EIPDKEADSIHSVDKAVEYILGQPD--
          ***** ** ..** ..** ..** ..**
          _____

```

Abbildung 16: Position degenerierter Primer für die Amplifikation des Gens für mtACP2 durch PCR. Zum Design wurden die bekannten Sequenzen für mtACP von *A. niger* (anmtacp), *N. crassa* (ncmtacp) und *S. cerevisiae* (scmtacp) herangezogen. Die Pfeile (<>) kennzeichnen die Exons der *N. crassa*-Sequenz. Aminosäuresequenzen, die den gewählten Primern entsprechen, sind unterstrichen.

4.5.2 Versuch der heterologen Komplementation der Δacp -Mutante von *Saccharomyces cerevisiae* durch Plasmid-Shuffling

Da das gesuchte Gen auf DNA-Ebene nicht identifiziert werden konnte, wurde die Gensuche auf der Ebene des Proteins fortgesetzt. Im Gegensatz zu heterologen Hybridisierungsmethoden wird zur heterologen Komplementation nicht die Ähnlichkeit der DNA-Sequenz zur Identifizierung des gesuchten Gens herangezogen, sondern die Funktion des zugehörigen Proteins. Das entsprechende Gen wird in *S. cerevisiae* inaktiviert und der Phänotyp der erhaltenen Mutante untersucht. Nach Transformation der Hefe-Mutante mit einer exprimierenden *N. crassa*-Genbibliothek werden Klone gesucht, bei denen der Wildtyp-Phänotyp wieder hergestellt ist. Diese Klone enthalten ein Gen aus *N. crassa*, das für ein Protein codiert, das den Defekt in der Hefe komplementieren kann.

Die Δacp -Mutante in Hefe ist wie die anderen Deletionsmutanten, die Enzyme der mitochondrialen FAS betreffen, nicht mehr in der Lage zu atmen. Während die Deletionsmutante Δcem der mitochondrialen β -Ketoacyl-ACP Synthase durch Transformation mit dem entsprechenden Gen aus *N. crassa* in einem geeigneten Expressionsvektor ihre Atmungsfähigkeit wiedererlangt (F. Bürger, Dissertation 1999), tut die Mutante Δacp dies nicht. Sie gibt zu schnell ihre mtDNA und damit jede Möglichkeit zum Wiedererlangen der Atmung auf. Die Auswirkung der Δacp -Mutation scheint schwerer zu wiegen als die der Δcem -Mutation.

Eine Transformation mit der exprimierenden *N. crassa*-Genbibliothek kann nur dann zur Identifizierung eines zweiten mtACP in *N. crassa* dienen, wenn die Hefe bis zur Expression der *N. crassa*-cDNA nicht auf ihr eigenes mtACP verzichten muß und so ihre mtDNA erhält. Dazu wurde die mtACP-Deletionsmutante in diploider Hefe erzeugt, so daß ein intakter Chromosomensatz den Δacp -Defekt des mutierten intern homolog komplementiert. Eine zweite intakte Genkopie für das mtACP in einem geeigneten Expressionsvektor, der als Selektionsmarker das *URA3*-Gen trägt, wurde zusätzlich in die Hefe eingebracht. Die diploide Mutante wurde nun zur Sporulation gebracht und die gebildeten Tetraden mit einem Mikromanipulator zerlegt. Anwachsende, haploide Sporen, die die defekte Genkopie im Genom und das komplementierende Plasmid im Cytosol besitzen, wurden mit der exprimierenden *N. crassa*-Genbibliothek transformiert. Die Transformanten wurden auf 5-Fluoro-Orotsäure inkubiert. Diese Substanz ist eine modifizierte Uracil-Vorstufe, die durch das Genprodukt des *URA3*-Gens in ein toxisches Uracil-Analogon umgewandelt wird. Damit wird ein Selektions-

tionsdruck aufgebaut, der die Hefe veranlaßt, das homolog komplementierende Plasmid, das zur Selektion das *URA3*-Gen trägt, aufzugeben (Boeke *et al.* 1984). Hefezellen, die diese Behandlung überleben, sollten nur noch das Plasmid der *N. crassa*-Genbibliothek besitzen. Eine Selektion auf Atmungskompetenz zeigt nun, welche Klone eine cDNA aus *N. crassa* besitzen, die den Defekt in der Δacp -Mutante in Hefe komplementieren kann. Das Prinzip dieses "Plasmid Shuffling" genannten Prozesses ist in Abb. 17 zusammengefaßt.

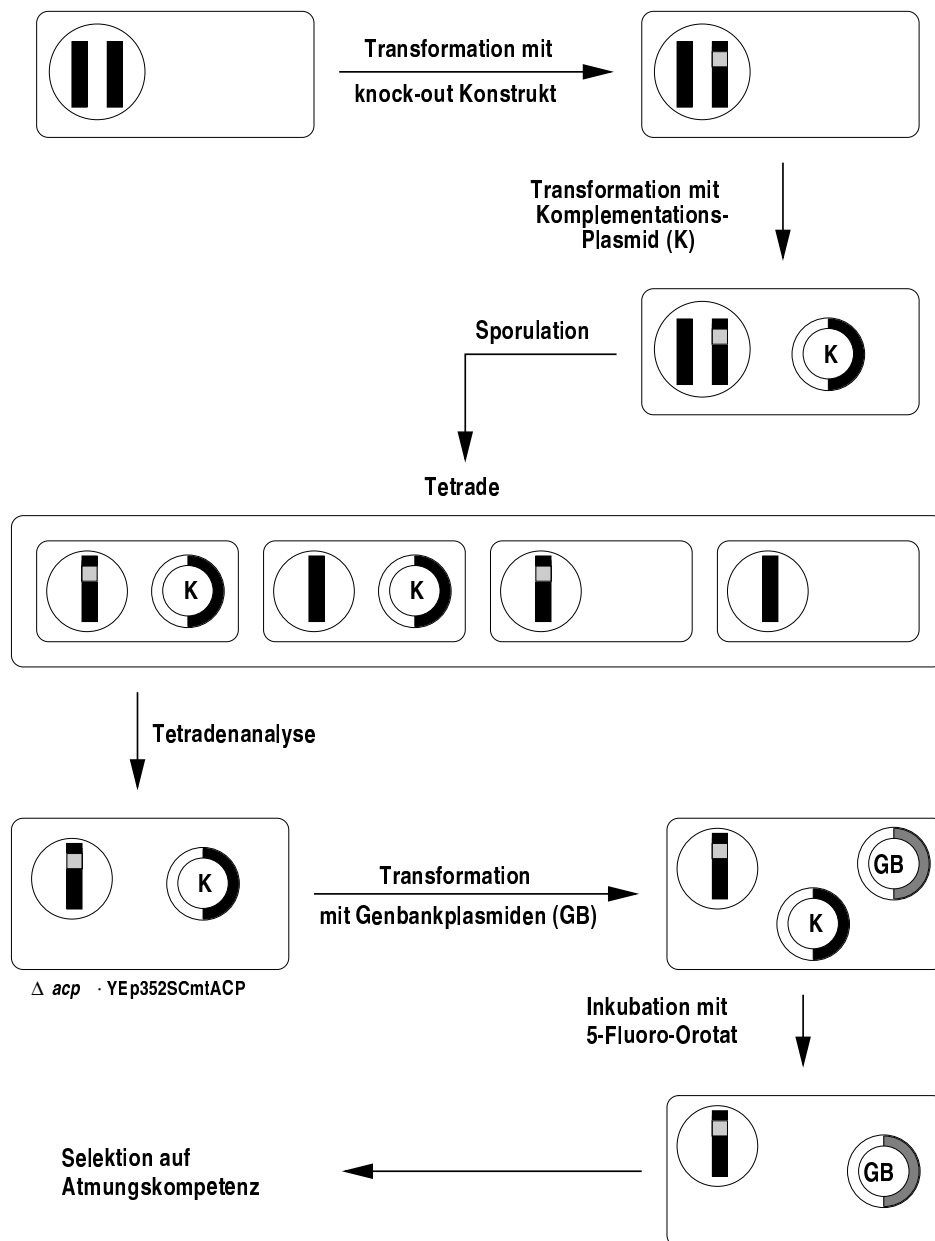


Abbildung 17: Schematische Darstellung des *Plasmid Shufflings* zur Identifizierung einer Δacp -komplementierenden cDNA von *N. crassa*. Mit "K" ist das komplementierende Plasmid YEp352SCmtACP und mit "PB" ein Plasmid der Genbibliothek pYADE5 bezeichnet.

Das Plasmid pTSCmtACP (Abb. 18), in dem das Hefe-Gen für das mtACP teilweise durch das *LEU2*-Gen ersetzt worden war, wurde mit *Hpa* I/*Sac* I geschnitten und in den diploiden Hefestamm VW1 eingebracht. Die Transformanten wurden auf Leucin-Prototrophie selektiert. Homologe Rekombinationsereignisse wurden durch Southernblott-Analyse nachgewiesen. Genomische DNA der Transformanten wurde mit *Pst* I verdaut und mit einem radioaktiv markierten *Hinc* II/*Eco* RI-Fragment aus dem Vektor pSCmtACP-P/SX hybridisiert (Schneider *et al.*, 1995; Abb. 19).

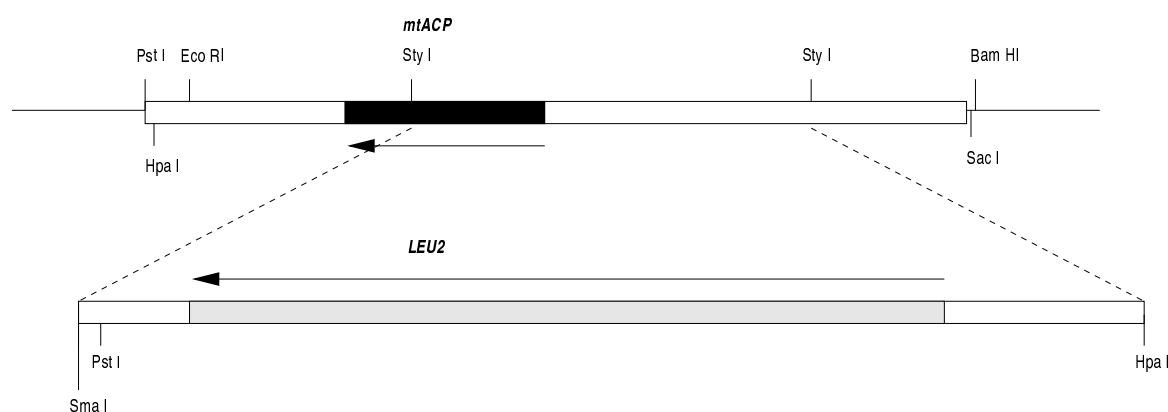


Abbildung 18: Replacementvektor pTSCmtACP zur Inaktivierung des mtACP-Gens von *S. cerevisiae*. Aus dem Vektor pSCmtACP-P/SX (oben) wurde ein zentrales *Sty* I-Fragment entfernt und die überstehenden Enden geglättet. Das *LEU2*-Gen auf einem *Sma* I/*Hpa* I-Fragment aus YEp351 wurde eingesetzt. Die Transformation wurde mit einem *Hpa* I/*Sac* I-Fragment durchgeführt (Schneider *et al.*, 1995). Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an.

Zur zunächst notwendigen homologen Komplementation des Gen-Defektes wurde das mtACP-Gen zusammen mit seinem Promotor als *Eco* RI/*Bam* HI-Fragment aus dem Plasmid pSCmtACP-P/SX (Abb. 18) geschnitten und in den *Eco* RI/*Bam* HI linearisierten Vektor YEp352 ligiert. YEp352 besitzt das *URA3*-Gen als Selektionsmarker. Das fertige Komplementations-Plasmid wurde YEp352SCmtACP genannt und in die diploide mtACP-Mutante $\Delta acp2n$ transformiert. Eine Uracil-prototrophe Transformante wurde zur Sporulation gebracht und die einzelnen Sporen separiert. Durch Selektion auf gleichzeitige Leucin- und Uracil-Prototrophie wurden 10 haploide Δacp -Mutanten mit dem homolog komplementierenden Plasmid YEp352SCmtACP identifiziert. Alle 10 wuchsen auf Glycerin als Kohlen-

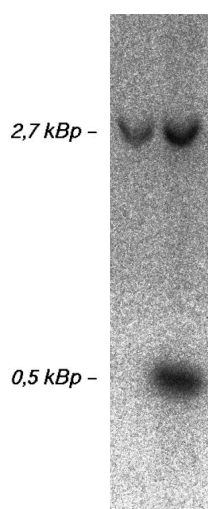


Abbildung 19: Southernblott der diploiden Hefe-Mutante $\Delta acp2n$. Genomische DNA wurde mit *Pst* I verdaut und mit einem radioaktiv markierten *Hinc* II/*Eco* RI-Fragment aus dem Vektor pSCmtACP-P/SX hybridisiert. In *Pst* I-gespaltener DNA repräsentiert ein 2,7 kBp-Fragment das intakte Gen. Das defekte Gen wurde durch eine zusätzliche *Pst* I-Schnittstelle in ein 0,5 kBp und ein 3,1 kBp Fragment gespalten. Die Sonde hybridisierte nur mit dem 0,5 kBp Fragment. Links ist genomische DNA aus dem Wildtyp und rechts aus einer diploiden Mutante $\Delta acp2n$ aufgetragen.

stoffquelle und waren damit in der Lage zu atmen. Die intern komplementierte Mutante $\Delta acp \cdot YEp352SCmtACP$ wurde zur weiteren Gensuche eingesetzt.

Zur Identifizierung der *acp2*-cDNA aus *N. crassa* wurde zunächst die Genbibliothek im Phagen $\lambda AD5$ in die Plasmid-cDNA-Bibliothek pYADE5 umgewandelt. Hierzu wurde der spezielle *E. coli* Wirtstamm BNN 132 mit dem Phagen $\lambda AD5$ infiziert. BNN 132 enthält das Gen der *cre*-Rekombinase, die durch ortsspezifische Rekombination an sogenannten *lox*-Sequenzen die in den Phagen enthaltene Plasmidkomponente mit den cDNA-Inserts heraus-schneidet und zum zirkulären Plasmid schließt. Die *in vivo* aus dem Phagen ausgeschnittenen Plasmide enthalten *N. crassa* cDNA-Inserts als *Eco* RI/*Xho* I Fragmente und das *TRP1* Gen aus Hefe als Selektionsmarker (Brunelli & Pall, 1993; Elledge *et al.*, 1991).

Die Genbibliothek pYADE5 wurde in die Hefemutante $\Delta acp \cdot YEp352SCmtACP$ transformiert und anschließend auf Tryptophan-Prototrophie selektioniert. Ca. 250 000 Transformanten, die auf dem entsprechenden Selektions-Medium anwuchsen, wurden von den Plat-

ten genommen und nach Resuspendieren auf SD-Medium ohne Leucin-Supplementierung mit 5-Fluoro-Orotsäure ausplattiert. Hefezellen, die auf diesem Medium anwachsen, sollten das komplementierende Plasmid verloren haben und nur noch das Plasmid der exprimierenden *N. crassa*-Genbibliothek besitzen. Wenn dieses ein Gen trägt, daß den Defekt im Genom der Hefe-Mutante komplementiert, kann die entsprechende Zelle auf Glycerin als Kohlenstoffquelle wachsen. Auf dem 5-Fluoro-Orotsäure-Medium anwachsende Zellen wurden von den Platten genommen und auf YPG-Medium mit 5-Fluoro-Orotsäure ausplattiert. Hierauf wachsende Kolonien wurden von der Platte genommen und nochmals auf Leucin-, Uracil- und Tryptophan-Prototrophie getestet. Hefeklonen, die Leucin- und Tryptophan-prototroph sowie Uracil-auxotroph waren und dennoch atmeten, wurden in Flüssigkultur angezogen. Ihre Plasmid-DNA wurde isoliert und *E. coli* damit transformiert. Durch Restriktionskartierung wurde festgestellt, welche Plasmide identische Inserts trugen. 48 von 64 Plasmiden enthielten nach Restriktionskartierung kein cDNA-Insert. Von den 16 übrigen Plasmiden wurden die Inserts sequenziert. Keines hatte jedoch Ähnlichkeit mit dem Gen eines Acyl Carrier Proteins. Nach Retransformation der gefundenen Plasmide in die $\Delta acp2n$ -Mutante und anschließender Tetradenanalyse waren in allen Fällen nur zwei der vier Sporen in der Lage zu atmen. Das scheinbare Erhalten der Atmungsfähigkeit durch heterologe Komplementation war damit artifiziell (Boeke *et al.*, 1984).

4.6 Untersuchung der Atmungsfähigkeit und des Liponsäuregehaltes verschiedener Deletionsmutanten von *S. cerevisiae* mit beeinträchtigter mitochondrialer FAS

Die Hefe ist in der Lage ihren Stoffwechsel auf Gärung umzustellen und kann damit auch ohne Atmung auskommen. So ist sie ein sehr geeigneter eukaryontischer Modell-Organismus um die Abhängigkeit der Atmungsfähigkeit vom Liponsäuregehalt zu untersuchen. Neben der Δacp -Mutante existieren in unserem Institut die Mutanten Δcem und Δoar . Bei Δcem fehlt das Gen der mitochondrialen β -Ketoacyl-ACP Syntase (Harrington *et al.*, 1993), die auch [C]ondensing [E]nzyme with [M]itochondrial function genannt wird. Die β -Ketoacyl-ACP Reduktase (Abb. 1), die auch als 3-[O]xoacyl-[A]CP [r]eductase bezeichnet wird, fehlt in der Mutante Δoar (Schneider *et al.*, 1997). Von der Hefe-Mutante Δcem war bekannt, daß

sie sich auch heterolog mit dem entsprechenden Gen aus *N. crassa* komplementieren läßt (Tabelle 4).

Eine heterologe Komplementation der Hefe-Mutante Δacp mit dem mtACP1-Gen aus *N. crassa* wurde in dieser Arbeit versucht. Dazu wurde die cDNA in einem YCp50-Plasmid, das das *URA3*-Gen als Selektionsmarker enthält, hinter einen ADH-Promotor kloniert (Schneider, persönlich Mitteilung). Mit diesem Plasmid (pYCp50ADH-NCmtACP) wurde die diploide Hefe-Mutante Δacp^{2n} transformiert. Die Transformanten wurden auf Uracil-Prototrophie selektioniert und zur Sporulation gebracht. Nach Tetradenanalyse wurden die ausgekeimten Sporen auf gleichzeitige Uracil- und Leucin-Prototrophie selektioniert. Von acht zerlegten Tetraden zeigten nur insgesamt zwei angewachsene Sporen beide Prototrophien. Die erhaltene Mutante ($\Delta acp \cdot$ YCp50ADH-NCmtACP) war nicht in der Lage auf Glycerin als Kohlenstoffquelle zu wachsen.

Von den drei Hefe-Mutanten Δacp , Δcem und Δoar , sowie den heterolog komplementierten Mutanten $\Delta acp \cdot$ YCp50ADH-NCmtACP und $\Delta cem \cdot$ pYPGE15-*cem1*, und der homolog komplementierten Mutante $\Delta cem \cdot$ pYCp50-*CEM1* wurden die Liponsäuregehalte gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Auch hier sind die relativen Werte angegeben, bei denen der Wildtyp-Liponsäuregehalt 100 % gesetzt wurde (vgl. 4.1).

Tabelle 4: Liponsäuregehalt und Atmungsfähigkeit verschiedener Hefestämme. Der Liponsäuregehalt des Wildtyps wurde 100 % gesetzt. Die Mutanten wurden nach der Reihenfolge der betroffenen Enzyme in der Fettsäuresynthese geordnet. Die Bezeichnungen der Mutanten sind im Text erklärt.

Mutante	Liponsäuregehalt	Atmungsfähigkeit	Literatur
WT (VW1a)	100%	+	
Δacp	<5%	-	Schneider <i>et al.</i> , 1995
Δacp · YCp50ADH-NCmtACP (heterolog komplementiert)	50%	-	diese Arbeit
Δcem	<5%	-	Harington <i>et al.</i> , 1993
Δcem · pYCp50-CEM1 (homolog komplementiert)	80%	+	Bürger, Dissertation 1999
Δcem · pYPGE15-cem1 (heterolog komplementiert)	65%	+	Bürger, Dissertation 1999
Δoar	55%	-	Bürger, Diplomarbeit 1997

Interessanterweise war das *N. crassa*-mtACP in der Hefe-Mutante Δacp zwar in der Lage, die Liponsäuresynthese wieder herzustellen, führte jedoch nicht zur Atmungsfähigkeit der Hefe.

Die beiden Mutanten Δacp und Δcem unterscheiden sich in den bisher untersuchten Eigenschaften nicht. Sie sind nicht in der Lage zu atmen und besitzen keine Liponsäure. Trotzdem verliert Δacp ihre mtDNA schneller als Δcem , so daß der Verlust des mtACP schwerer zu wiegen scheint als der der β -Ketoacyl-ACP Synthase.

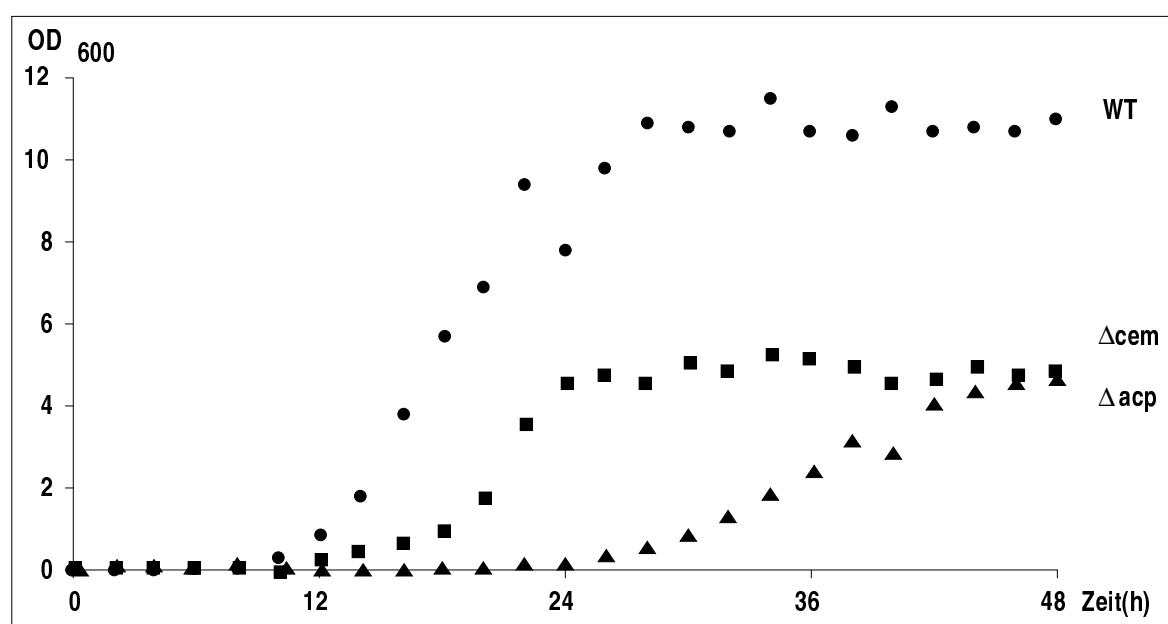


Abbildung 20: Wachstumskurven des Hefe-Wildtyps und der beiden Mutanten Δacp und Δcem in Hefe-Vollmedium (YP) mit Glucose als Kohlenstoffquelle. Die Optische Dichte bei 600 nm wurde gemessen.

Wie in der Einleitung beschrieben wurde, können Acyl Carrier Proteine an sehr verschiedenen Stoffwechselwegen beteiligt sein. Für die β -Ketoacyl-ACP Synthasen sind außer der Fettsäuresynthese nur die Polyketidsynthese ein beschriebener Wirkungsbereich. Um die Defekte in den beiden Mutanten Δacp und Δcem genauer zu charakterisieren, wurde das Wachstum dieser Mutanten und das des Wildtyps verglichen. Ein-Liter-Kulturgefäße wurden mit 750 ml YPD-Medium gefüllt, mit gleichen Mengen Zellmaterial aus einer YPD-Vorkultur in der stationären Phase angeimpft und bei 30 °C gut gerührt sowie steril belüftet. Alle zwei

Stunden wurde die optische Dichte einer Probe bestimmt (Abb. 20). Während der Wildtyp nach 10 h sein logarithmisches Wachstum begann, dauerte das bei der Δcem -Mutante 16 h und bei der Δacp -Mutante sogar 30 h. Der Wildtyp und die Δcem -Mutante zeigten innerhalb der logarithmischen Phase ein vergleichbares Wachstum, während Δacp langsamer wuchs. Die Verdopplungszeiten betragen für den Wildtyp 120 min, für Δcem 140 min und für Δacp 210 min. Der Wildtyp erreichte in der stationären Phase eine optische Dichte von 11, die Mutanten Δacp und Δcem jedoch nur von 4. Das deutlich langsamere Wachstum der Mutante Δacp deutet auf einen zusätzlichen Stoffwechseldefekt hin, der in der Mutante Δcem nicht vorliegt.

5 Diskussion

5.1 Im Gegensatz zur Δacp -Mutante von *S. cerevisiae* besitzt die *acp1*-Mutante von *N. crassa* Liponsäure in bioverfügbarer Form

Das mtACP ist in der Hefe *S. cerevisiae* essentiell für die Synthese von Liponsäure (Brody *et al.*, 1997) und deren Bindung an die E₂-Untereinheit der Pyruvat Dehydrogenase bzw. α -Ketoglutarat Dehydrogenase (Jordan & Cronan, 1997). Die mtACP-Deletionsmutante Δacp enthält deswegen keine Liponsäure und ist atmungsdefizient. Die genetische Inaktivierung von mtACP1 in *N. crassa* führt hingegen nicht zur Atmungsdefizienz. Der Liponsäuregehalt der *acp1*-Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp nicht verringert und funktionsfähige α -Ketoglutarat Dehydrogenase ist in ihr nachweisbar. Die Synthese von Liponsäure und deren Bindung an die entsprechenden apo-Enzyme verlaufen in *N. crassa* also unabhängig von mtACP1. Die Ligation wird möglicherweise wie in Bakterien von einer ACP-unabhängigen Lipoat-Transferase katalysiert (Abb. 2). Das dazu notwendige, zum bakteriellen *lplA* homologe Gen ist im *Neurospora*-Genom vorhanden (b8b20.410; CAB 91488.1). In einer anderen Doktorarbeit an unserem Institut wurde gezeigt, daß der Verlust der mitochondrialen β -Ketoacyl-ACP Synthase für *N. crassa* tödlich ist. Die entsprechende Deletionsmutante konnte nicht isoliert werden (F. Bürger, Dissertation 1999). Es scheint *N. crassa* somit nicht möglich zu sein, cytosolisch synthetisierte Oktansäure in den Mitochondrien als Vorstufe von Liponsäure zu verwenden. Eine entsprechende Beobachtung war schon früher in Hefe gemacht worden (Harington *et al.*, 1994).

Diesen Ergebnissen zufolge sollte die *N. crassa* Mutante *acp1* auch ohne das Komplex I-assozierte mtACP1 eine funktionierende mitochondriale FAS besitzen. Die bisher bekannten mtACP-Formen von Hefe und *N. crassa* sind also funktionell verschieden. Damit muß es entweder eine weitere mtACP-Isoform von *N. crassa* geben, welche in die Liponsäuresynthese eingebunden ist, oder einen anderen Liponsäuresyntheseweg.

5.2 Nachweis von mtACP2 in *N. crassa* durch [¹⁴C]-Pantothanat-Markierung der Mutante *acp1*

Durch *in vivo* Einbau von [¹⁴C]-markierter Pantothersäure wurden in den Mitochondrien der *N. crassa*-Doppelmutante *acp1* × *pan2* vier Proteine mit einer scheinbaren Molmasse zwischen 12 und 18 kDa markiert und durch alkalische Behandlung in ein einheitliches Protein der scheinbaren molekularen Masse von 18 kDa überführt. Dieser Befund ist charakteristisch für Acyl Carrier Proteine. Sie verlieren durch Hydrolyse den am Phosphopantethein gebundenen Acylrest, der bei SDS-PAGE durch vermehrte SDS-Bindung zu einer schnelleren Wanderung führt als es dem tatsächlichen Molekulargewicht entspricht. Die vier [¹⁴C]-Pantothanat-markierten Proteine stellen also mtACP-Formen in verschiedenen Acylierungsstufen dar. Das scheinbar leichteste Protein trägt den längsten Acyl-Rest. Da in der untersuchten Mutante das Gen für mtACP1 inaktiviert ist, muß es sich hier um ein zweites mtACP handeln, das mtACP2 genannt wurde (Abb. 9).

5.3 Eukaryonten können mehrere mtACP-Gene enthalten

In *N. crassa* und *B. taurus* ist das mtACP1 eine Untereinheit von Komplex I. Für *A. thaliana* und *Homo sapiens* gibt es Hinweise auf eine ähnliche Organisation des mtACP1 (Shintani & Ohlrogge, 1994; Triepels *et al.*, 1999), so daß nahe liegt, daß der Komplex I jedes Eukaryonten ein mtACP als Untereinheit besitzt. Mit der *N. crassa*-Mutante *acp1* wurde klar gezeigt, daß die Funktion von mtACP1 mit der Biogenese von Komplex I und nicht mit der Liponsäuresynthese verknüpft ist. Alle Eukaryonten, die einen Komplex I haben, sollten demnach ein zweites mtACP (mtACP2) besitzen. Dafür gibt es verschiedene Hinweise.

D. melanogaster erzeugt durch alternatives Splicen eines Gens zwei verschiedene mRNA-Varianten für zwei verschiedene mtACP (Ragone *et al.*, 1999).

Im Genom von *C. elegans* kommen zwei mtACP-Gene mit verschiedenem Codon-Gebrauch vor. Danach wird eines der beiden Gene, das für mtACP1, in relativ großen Mengen, entsprechend den Komplex I-Untereinheiten, exprimiert. Das andere codiert für ein Minoritäts-Protein, das mtACP2, das in ähnlichen Mengen wie z.B. die mitochondriale β -Ketoacyl-ACP Synthase vorliegt (Tabelle 2). Dieser Befund entspricht dem von *N. crassa*. Gene für die Komplex I-Untereinheiten Nuo51, Nuo78 und mtACP1 zeigen gleichermaßen

hohe Werte für CBI und Fop (Tabelle 3), während die entsprechenden Werte für das Gen der β -Ketoacyl-ACP Synthase sehr viel niedriger sind. Aufgrund dieser Daten ist es wahrscheinlich, daß in *C. elegans* mtACP1 in den Komplex I integriert ist, während mtACP2 für die Liponsäurebiosynthese sorgt.

In *A. thaliana* kommen gleich drei mtACP-Gene vor. Die Existenz eines mtACP in *A. thaliana* wurde erstmals 1994 von Shintani & Ohlrogge beschrieben. Die Autoren nannten das Protein mtACP1. Durch Westernblot-Analyse wiesen sie nach, daß viermal soviel mtACP mit der mitochondrialen Membran assoziiert ist, wie frei in der Matrix vorliegt. Die Membranassoziation wurde als Hinweis auf eine Integration in Komplex I gewertet. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß der im Westernblot verwendete Antikörper mit allen drei Translationsprodukten der mtACP-Gene kreuzreagierte, so daß unklar bleibt, welches mtACP tatsächlich in den Komplex I integriert ist. Die Autoren weisen darauf hin, daß ein Antikörper z.B. gegen das mtACP1 aus *N. crassa* Kreuzreaktionen selbst mit entsprechenden Proteinen aus Erbsblätter- und Kartoffelknollenmitochondrien zeigt. Hinweise darauf, welches mtACP Komplex I-assoziiert vorliegt, können auch durch Untersuchungen des Codon-Gebrauchs der entsprechenden Gene nicht gewonnen werden, da die Expressionshäufigkeit von Genen in *A. thaliana* nicht direkt an den Codon-Gebrauch gekoppelt ist (Chiapello *et al.*, 1998).

In *N. crassa* wurde das Gen für das zweite mtACP bisher nicht gefunden. In einem genomischen Southernblott mit einem radioaktiv markierten Fragment aus der cDNA für mtACP1 wurde unter nicht-stringenten Bedingungen neben dem für mtACP1 erwarteten DNA-Fragment ein weiteres Fragment gefunden. Dieses konnte als Hinweis für das mtACP2-Gen gewertet werden, auch wenn in der durchsuchten Phagen-Genbibliothek λ J1 kein entsprechender Klon gefunden wurde. Es ist jedoch damit zu rechnen, daß das Gen innerhalb der nächsten Monate im Rahmen des *Neurospora*-Genomprojektes identifiziert wird.

Überraschenderweise wurde im Genom von *A. niger* nur ein einziges mtACP-Gen identifiziert, obwohl dieser Pilz einen Komplex I besitzt. Das Genom wurde im *shot-gun*-Verfahren flächendeckend sequenziert. Auch wenn es möglich ist, daß ein zweites mtACP-Gen in den vorhandenen Daten nicht erfaßt wurde, ist eher davon auszugehen, daß dieser Organismus nur ein mtACP besitzt. Dies deckt sich mit dem Ergebnis einer früheren Doktorarbeit in unserem Institut, in der es nicht gelang, eine Mutante von *A. niger* zu konstruieren, der das Komplex I-assoziierte mtACP fehlt (R. Schneider, persönliche Mitteilung). Möglicherweise

ist in *A. niger* nicht jedes mtACP-Molekül fest an den Komplex I gebunden, so daß eine kleine Menge frei in der mitochondrialen Matrix vorliegt und dort an der Liponsäuresynthese beteiligt ist.

Auch wenn die bisher nur aus Sequenzdaten abgeleitete Expression und Zielsteuerung dieser Acyl Carrier Proteine noch biochemisch nachgewiesen werden muß, erhärtet sich die Annahme, daß Eukaryonten mit Komplex I in der Regel wenigstens zwei mtACP-Isoformen besitzen.

5.4 Die Bedeutung des mtACP für Komplex I

Für die Biogenese des Atmungsketten-Komplex I in *N. crassa* ist das mtACP1 zwingend erforderlich. Weder der periphere Arm, noch der Membranarm des Komplex I werden in der *N. crassa*-Mutante *acp1* korrekt assembliert.

Während in der Mutante *nuo49*, in der das Gen für die 49 kDa-Untereinheit des peripheren Arms von Komplex I inaktiviert wurde, der Membranarm von Komplex I korrekt assembliert wird (Tabelle 1), kann die Mutante *acp1* nur unvollständige, zur Aggregation neigende Teile des Membranarms zusammenbauen. Wie durch Markierung mit [¹⁴C]-Pantothenat gezeigt wurde, ist das mtACP1 in der Mutante *nuo49* vorhanden und liegt frei in der mitochondrialen Matrix vor (R. Schneider, Dissertation 1995). Der Schluß liegt nahe, daß mtACP1 eine katalytische Funktion bei der Biogenese des Membranarms von Komplex I ausübt. Da mtACP1 eine Untereinheit des peripheren Arms von Komplex I ist, kann dessen gestörte Assemblierung in der Mutante *acp1* auf eine fehlende strukturelle Komponente zurückgeführt werden. Zum korrekten Zusammenbau des peripheren Arms sind stöchiometrische Mengen von mtACP1 notwendig. Katalytische Mengen würden nicht ausreichen.

Diese Annahmen werden durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche der Co-Immunpräzipitation untermauert. Damit wurde gezeigt, daß mtACP2 in der Mutante *acp1* mit der Komplex I-Untereinheit Nuo49 im einen bzw. Nuo21.3 im anderen Fall assoziiert ist. Nach der Position der präzipitierbaren Komplexe im Zuckergradienten handelt es sich dabei um kleine Mengen von peripherem bzw. aggregiertem Membranarm. Da mtACP1 in der Mutante *acp1* nicht vorhanden ist, übernimmt mtACP2 möglicherweise dessen Rolle bei der Biogenese von Komplex I, ohne seine komplette Funktion ausüben zu können. Vermutlich ist mtACP2 nicht in der Lage, die zur Membranarmbildung nötige Katalyse zu unterstützen,

so daß die Assemblierung stehenbleibt, der Membranarm instabil wird und aggregiert. Vom peripheren Arm werden nur sehr kleine Mengen gefunden, die durch die NADH:Ferricyanid Reduktaseaktivität dieses Teils von Komplex I nicht nachgewiesen werden können. Vermutlich entsteht durch die zu geringe Expression des mtACP2-Gens zu wenig mtACP für die Bildung des peripheren Arms.

Es ist weiterhin unklar, welche katalytische Funktion das mtACP1 für die Bildung des Komplex I ausübt. Es wurde angenommen, daß die mitochondriale FAS mtACP1-abhängig ist und ein zur Assemblierung von Komplex I notwendiges Produkt bereitstellt. Wie anhand der Liponsäuresynthese in der mtACP-Deletionsmutante gezeigt wurde, funktioniert die mitochondriale FAS auch ohne mtACP1. Neben der mitochondrialen FAS kommen jedoch noch andere ACP-abhängige Synthesewege für die Bereitstellung eines Komplex I-spezifischen Produktes in Frage. UV-VIS-spektroskopische Untersuchungen geben Hinweise auf eine strukturell noch unbestimmte Redoxgruppe im Membranarm von Komplex I, für die eine chinoide Struktur angenommen wird (Schulte *et al.*, 1999; Friedrich *et al.*, 2000). Eine solche Gruppe könnte auch über eine mtACP-abhängige Polyketidsynthese oder nichtribosomalen Peptidsynthese bereitgestellt werden. Über das Vorhandensein solcher Synthesysteme in den Mitochondrien von Eukaryonten ist jedoch bisher nichts bekannt.

5.5 Die Bedeutung der mitochondrialen Fettsäuresynthese für die Atmung von *S. cerevisiae*

Die bekannte Funktion der mitochondrialen FAS in *S. cerevisiae* ist die Bereitstellung von Octanoat-Resten zur Liponsäuresynthese (Brody *et al.*, 1997). Veränderungen im Enzymverbund der mitochondrialen FAS führen zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Verminderung des Liponsäuregehaltes der Hefezellen. Die mit dem Gen für mtACP1 von *N. crassa* heterolog komplementierte Δacp -Mutante besitzt 50 % des Liponsäuregehaltes des Wildtyps, ist jedoch nicht in der Lage zu atmen. Der Verlust der mitochondrialen β -Ketoacyl-ACP Reduktase führt ebenfalls zu einem um etwa 50 % reduzierten Liponsäuregehalt. Offensichtlich wurde die verlorengegangene Reduktase-Aktivität durch die eines anderen, weniger effizienten Enzyms ersetzt. Auch diese Mutante ist atmungsdefizient. Die mit dem Gen für die β -Ketoacyl-ACP Synthase von *N. crassa* heterolog komplementierte Hefe-Mutante Δcem

enthält noch 65 % des normalen Liponsäuregehaltes und ist in der Lage zu atmen. Demnach liegt zwischen 50 % und 65 % des Normalwertes ein kritischer Liponsäure-Schwellenwert, bei dessen Unterschreitung die Hefe atmungsdefizient wird.

Verschiedene Autoren vermuten mindestens eine weitere Funktion der mitochondrialen FAS, die unabhängig vom Liponsäuregehalt für die Erhaltung der Atmung notwendig ist (Hoja *et al.*, 1998). Diese Annahme ist jedoch fraglich, da für die Synthese eines weiteren FAS-Produktes die gleichen Enzyme verwendet werden müßten wie für die Synthese der Liponsäure-Vorstufe Oktansäure. Ist der Liponsäuregehalt einer Hefe-Mutante durch einen Fehler in der mitochondrialen FAS verringert, sollte jedes andere Produkt dieses Syntheseweges ebenfalls in reduzierter Menge vorliegen. Wenn die Atmungskompetenz tatsächlich an ein weiteres Produkt der mitochondrialen FAS gekoppelt wäre, sollte es deshalb auch hier einen ähnlichen kritischen Schwellenwert geben, dessen Unterschreitung zur Atmungsdefizienz führt. Der Grund für das Einstellen der Atmung bei Unterschreitung des Schwellenwertes für Liponsäure ist vermutlich auf die verringerte Aktivität des Citratcyclus und den damit absinkenden NADH-Spiegel in den Mitochondrien zurückzuführen.

Die heterologe Komplementation der Δacp -Mutante von Hefe schien zur Identifizierung des mtACP2-Gens von *N. crassa* die geeignete Methode zu sein. Dieses Verfahren setzt die Ausprägung eines zur Selektion geeigneten Phänotyps der komplementierten Mutante voraus. Die atmungsdefiziente Mutante Δacp verliert jedoch ihre mtDNA so schnell, daß die Wiederherstellung der Atmung durch Transformation mit *N. crassa*-DNA nicht möglich ist. Dieses Problem sollte durch die Anwendung des *Plasmid Shufflings* umgangen werden. Daß selbst dabei keine durch Komplementation atmungskompetente Δacp -Mutante identifiziert werden konnte, ist ein weiterer Hinweis auf die Existenz eines kritischen Liponsäure-Schwellenwertes. Dieser wird durch die möglicherweise erfolgte Expression des mtACP2 von *N. crassa* in der Hefe-Mutante nicht erreicht.

5.6 Gibt es weitere Funktionen des mtACP in *S. cerevisiae*?

Das Wachstum der Δacp -Mutante unterscheidet sich deutlich von dem der Δcem -Mutante, obwohl beide gleichermaßen keine Liponsäure synthetisieren können (Abb. 20). Im Vergleich zu Δcem hat Δacp eine verlängerte lag-Phase, wie auch eine längere Verdopplungszeit. Das deutet auf eine zusätzliche Störung in der Δacp -Mutante hin, der nicht in der mitochon-

drialen FAS liegt. Welcher Stoffwechselweg betroffen ist, bleibt unklar. Möglicherweise ist der Verlust dieser zusätzlichen mtACP-Funktion in Hefe auch verantwortlich für die auffällige Instabilität der mtDNA.

In *A. thaliana* wurden drei Gene für mtACP-Isoformen gefunden. In diesem Organismus erfolgte offensichtlich im Laufe der Evolution eine weiter fortgeschrittene Aufteilung der Funktionen von einem mtACP auf drei Isoformen. Eine dieser Isoformen ist mit Komplex I assoziiert und für dessen Biogenese erforderlich. Eine zweite ist für die Synthese von Liponsäure und deren Übertragung auf ein entsprechendes apo-Enzym notwendig, während die dritte mtACP-Isoform eine noch unbekannte Funktion hat (Abb. 21).

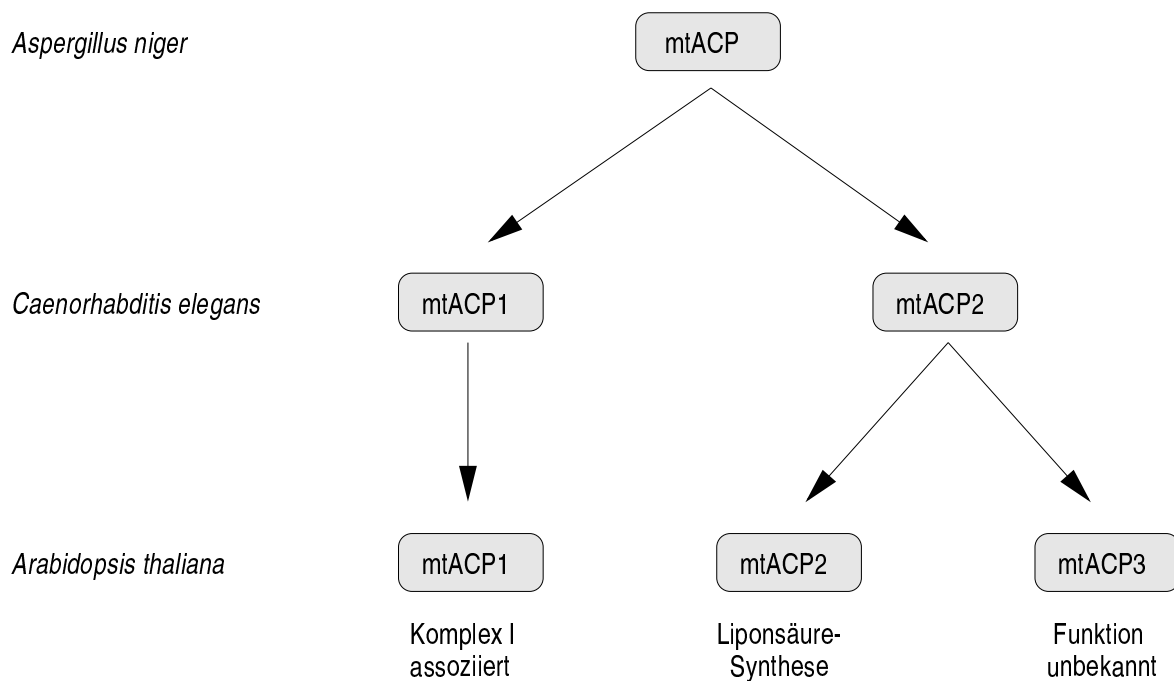


Abbildung 21: Schematische Darstellung einer evolutionären Funktionsaufspaltung von einem mtACP auf drei verschiedene Isoformen.

6 Literatur

- Abelmann A (1999) Inaugural-Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Amling N (1996) Inaugural-Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool.
J Mol Biol **215** (3), 403-410.
- Alves PC, Videir A (1994) Disruption of the gene coding for the 21.3 kDa-subunit of the peripheral arm of complex I from *Neurospora crassa*.
J Biol Chem **269**, 7777-7784.
- Bathey JF & Ohlrogge JB (1990) Evolutionary and tissue-specific control of expression of multiple acyl-carrier protein isoforms in plants and bacteria.
Planta **180**, 352-356.
- van den Boom TJ, Reed KE & Cronan JE jr (1991) Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: isolation of null mutants defective in lipoic acid biosynthesis, molecular cloning and characterization of the *E.coli lip* locus, and identification of the lipoated protein of the glycyl cleavage system.
J Bacteriol **173** (20), 6411-6420.
- Beisenherz G, Boltze HJ, Bücher T, Czok R, Garbade KH, Meyer-Arendt E & Pfeider G (1953) Phosphofructo-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z Naturforsch **8b**, 555-577.
- Bennetzen JL & Hall BD (1982) Codon selection in yeast.
J Biol Chem **257**, 3026-3031.

- Boeke JD, LaCroute F & Fink GR (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet* **197**, 345-346.
- Brody S & Mikolajczyk S (1988) *Neurospora* mitochondria contain an acyl-carrier protein. *Eur J Biochem* **173**, 353-359.
- Brody S, Oh C, Hoja U, Schweitzer E (1997) Mitochondrial acyl carrier protein is involved in lipoic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **408**, 217-220.
- Brunelli JP & Pall ML (1993) A series of Yeast/*Escherichia coli* λ expressionvectors designed for directional cloning of cDNA and *cre/lox*-mediated plasmid excision. *Yeast* **9**, 1309-1318.
- Bürger F (1999) Inaugural-Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Cherét G, Mattheakis LC & Sor F (1993) DNA sequence analysis of the YCN2 region of chromosom XI in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**, 661-667.
- Chiapello H, Lisacek F, Caboche M, Hénaut A (1998) Codon usage and gene function are related in sequences of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **209**, 1-38.
- Church GM & Gilbert Wc (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 1991-1995.
- Cronan Jr JE & Rock CO (1986) Biosynthesis of membrane lipids
In Neidhardt FC, Ingrahm JL, Low KB, Magasnik B, Schaechter M & Umberger HE (ed) *Escherischia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, CD 474-497.
- Delo J, Ernst-Fonberg ML & Bloch K (1970) Fatty acid sythetases from *Euglena gracilis*. *Arch Biochem Biophys* **143**, 384-391.

- Davis RH & de Serres FJ (1970) Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*.
Methods Enzymol **17A**, 79-143.
- Dimroth P, Dittmar W, Walther G, Eggerer H (1992) The acyl-carrier protein of citrat lyase.
Eur J Biochem **37**, 305-315.
- Dittrich F, Zajonc D, Hühne K, Hoja U, Ekici A, Greiner E, Klein H, Hofmann J, Bessoule JJ, Sperling P & Schweizer E (1998) Fatty acid elongation in yeast. Biochemical characteristics of the enzyme system and isolation of elongation-defective mutants.
Eur J Biochem **252**, 477-485.
- Douce R, Bourguignon J, Macherel D, Neuburger M (1994) The glycine decarboxylase system in higher plant mitochondria: structure, function and biogenesis.
Biochem Soc Trans **22** (1), 184-188.
- Duarte, Sousa R, Videira A (1995) Inactivation of genes encoding subunits of the peripheral and membrane arms of *Neurospora crassa* mitochondrial complex I and effects on enzyme assembly.
Genetics **139**, 1211-1221.
- Elledge SJ, Mulligan JT, Ramer SW, Spottswood M & Davis RW (1991) λ YES: A multifunctional cDNA expression vector for the isolation of genes by complementation of yeast and *Escherichia coli* mutants.
Proc Natl Acad Sci USA **88**, 1731-1735.
- Elovson J (1975) Purification and properties of fatty acid synthase complex from *Neurospora crassa*, and the nature of the *fas*⁻ mutation.
J Bacteriol **124**, 524-533.
- Fearnley IM & Walker JE (1992) Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins.
Biochim Biophys Acta **1140**, 105-134.
- Fecke W (1993) Inaugural-Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- Fecke W, Sied VD, Onishi T, Weiss H (1994) Disruption of gene encoding the NADH-binding subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase in *Neurospora crassa*. Formation of a partially assembled enzyme without FMN and the iron sulfur cluster N-3. Eur J Biochem **229**, 551-558.
- Feinberg AP & Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling endo-nuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem **132**, 6-13.
- Friedrich T, Hofhaus G, Ise W, Nehls U, Schmitz B & Weiss H (1989) A small isoform of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) without mitochondrially encoded subunits is made in chloramphenicol-treated *Neurospora crassa*. Eur J Biochem **180**, 173-180.
- Friedrich T, Strohdeicher M, Hofhaus G, Preis D, Sahm H & Weiss H (1990) The same domain motif for ubiquinone reduction in mitochondrial or chloroplast NADH dehydrogenase and bacterial glucose dehydrogenase. FEBS Lett **265**, 37-40.
- Friedrich T, Brors B, Hellwig P, Kintscher L, Rasmussen T, Scheide D, Schulte U, Mantele W, Weiss H (2000) Characterization of two novel redoxgroups in the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). Biochim Biophys Acta **1459** (2-3), 305-309.
- Gocht M & Marahiel (1994) Analysis of core sequences in the D-Phe activating domain of the multifunctional peptide synthetase Tyc A by site-directed mutagenesis. J Bacteriol **176**, 2654-2662.
- Göttfert M (1993) Regulation and function of rhizobial nodulation genes. FEMS Microbiol Rev **104**, 39-64.
- Gueguen V, Macherel D, Jaquinod M, Douce R & Bourguignon J (2000) Fatty Acid and Lipoic Acid Biosynthesis in Higher Plant Mitochondria. J Biol Chem **275** (7), 5016-5025.

- Guénebaut V, Schlitt A, Weiss H, Leonard K & Friedrich T (1998) Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Mol Biol* **276**, 105-112.
- Gurr SJ, Unkles SE & Kinghorn JR (1987) The structure and organisation of nuclear genes of filamentous fungi.
In Kinghorn, JR (ed) Gene structure in eukaryotic microbes. IRL Press Oxford 93-139.
- Hanahan D (1982) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J Mol Biol **166**, 557-565.
- Harkness TAA, Rothery RA, Weiner JH, Werner S, Azevedo, JE, Videira A, Nargang FE (1995) Disruption of the gene encoding the 78-kDa subunit of the peripheral arm of complex I in *Neurospora crassa* by repeat induced point mutation.(RIP)
Curr Genet **27**, 339-350.
- Harinton A, Herbert CJ, Tung B, Getz GS & Slonimsk PP (1993) Identification of a new nuclear gene (CEM1) encoding a protein homologous to a β -ketoacyl synthase which is essential for mitochondrial respiration in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol Microbiol **9**, 545-555.
- Haupt V (1999) Inaugural-Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- von Heijne G & Herrmann RG (1989) Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides.
Eur J Biochem **180**, 535-545.
- Herbert AA & Guest JR (1970) Turbidimetric and polarographic assays for lipoic acid using mutants of *Escherichia coli*.
Methods Enzymol **18**, 269-272.
- Hill JE, Myers AM, Koerner TJ & Tzagaloff A (1970) Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites.
Yeast **2**, 163-167.

- Hoffman, Winston (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast.
Gene **57**, 267-272.
- Hoja U, Wellein C, Greiner E, Schweizer E (1998) Pleiotropic phenotype of acetyl-CoA-carboxylase-defective yeast cells.
Eur J Biochem **254** (3), 520-6.
- Holak T, Nilges M, Prestegard JH, Gronenborn AM & Clore M (1988) Three-dimensional structure of acyl carrier protein in solution determined by nuclear magnetic resonance and the combined use of dynamical simulated annealing and distance geometry.
Eur J Biochem **175**, 9-15.
- Hopwood DA & Sherman DH (1990) Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis.
Annu Rev Genet **24**, 37-66.
- Ikemura T (1981) Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* system.
J Mol Biol **151**, 389-409.
- Inoue H, Nojima H & Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
Gene **96**, 23-28.
- Jordan SW & Cronan Jr EJ (1997) A new metabolic link.
J Biol Chem **272** (29), 17903-17906.
- Krüll C (1995) Inaugural-Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Lämmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**, 680-685.

- Leif H, Sled' VD, Ohnishi T, Weiss H & Friedrich T (1995) Isolation and characterisation of the proton-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **230**, 538-548.
- Lipmann F (1980) Bacterial production of antibiotic polypeptides by thiol-linked synthesis on protein templates. *Adv Microb Physiol* **21**, 227-166.
- Lockett, DJ (1990) A bacteriophage λ DNA purification procedure suitable for the analysis of DNA from either large or multiple small lysates. *Anal Biochem* **185**, 230-234.
- Magnuson K, Jackowski S, Rock CO & Cronan Jr JE (1993) Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **57**, 522-542.
- Mareck A, Bessam H, Delattre P, Foucher B (1986) Purification of the 2-oxoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase complexes of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochimie* **68**, 1175-1180.
- McCarthy AD & Hardy DG (1984) Fatty acid synthase - an example of protein evolution by gene fusion. *Trends Biochem Sci* **9**, 60-62.
- Mead DA, Szczesna-Scorupa E & Kemper B (1986) Single stranded DNA 'blue' T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. *Protein Engineering* **1**, 67-74.
- Morris TW, Reed KE, Cronan JE (1994) Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: the *lplA* and *lipB* genes define redundant pathways for ligation of lipoy groups to apoprotein. *J Bacteriol* **177** (1), 1-10.

- Nehls U, Friedrich T, Schmiede A, Onishi T, Weiss H (1992) Characterisation of assembly intermediates of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) accumulated in *Neurospora crassa* mitochondria by gene disruption.
J Mol Biol **227**, 1032-1042.
- Ohlrogge JB (1982) Fatty acid synthase: plants and bacteria have similar organization.
Trends Biochem Sci **7**, 386-387.
- Orbach MJ, Porro EB & Yanowsky C (1986) Cloning and characterization of the gene for β -tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selection marker.
Mol Cell Biol **6**, 2452-2461.
- Packer L, Witt EH, Tritschler HJ (1995) alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant.
Free Radic Biol Med **19** (2), 227-250.
- Parry RJ (1980) Stable isotope studies on the biosynthesis of lipoic acid in *Escherichia coli*.
Biochemistry **19** (1), 15-19.
- Plesofsky N, Gardner N, Videira A, Bramble R (1999) NADH dehydrogenase in *Neurospora crassa* contains myristic acid covalently linked to the ND5 subunit peptide.
Biochim Biophys Acta **1495** 223-230.
- Ragone G, Caizzi R, Moschetti R, Barsanti P, De Pinto V, Caggese C (1999) The *Drosophila melanogaster* gene for the NADH:ubiquinone oxidoreductase acyl carrier protein: developmental expression analysis and evidence for alternatively spliced forms.
C Mol Gen Genet **261** (4-5), 690-697.
- Reed LJ (1998) From lipoic acid to multi-enzyme complexes.
Prot Sci **7**, 220-224.
- Reed KE, Cronan JE (1992) Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: Sequencing and functional characterisation of the *lipA* and *lipB* genes.
J Bacteriol **175** (5), 1325-1336.

- Reith M (1993) A β -keto-acyl-acyl carrier protein synthase III gene (*fabH*) is encoded in the chloroplast genome of the red alga *Porphyra umbilicalis*.
Plant Mol Biol **21**, 185-189.
- Ritsema T, Gehring AM, Stuitje AR, van der Drift KMGM, Dandal I, Lambalot RH, Walsh CT, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJJ, Spaink HP (1998) Functional analysis of an interspecies chimera of acyl carrier proteins indicates a specialized domain for protein recognition.
Mol Gen Genet **257**, 641-648.
- Rose MD, Novick P, Thomas JH, Botstein D & Fink GR (1987) A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector.
Gene **60**, 237-243.
- Runswick MJ, Fearnley IM, Skehel JM & Walker JE (1991) Presence of an acyl carrier protein in NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart.
FEBS Lett **286**, 121-124.
- Sackmann U, Zensen R, Röhlen R, Jahnke U & Weiss H (1991) The acyl-carrier protein in *Neurospora crassa* mitochondria is a subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I).
Eur J Biochem **200**, 463-469.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Schneider R (1995) *Inaugural-Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Schneider R, Massow M, Lisowsky T & Weiss H (1995) Different respiratory defective phenotypes of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae* after inactivation of gene encoding the mitochondrial acyl carrier protein.
Curr Genet **29**, 10-17.

- Schneider R, Brors B, Massow M, Weiss H (1997) Mitochondrial fatty acid synthesis: a relic of endosymbiotic origin and a specialized means for respiration. FEBS Lett **407**, 249-252.
- Schulte U, Fecke W, Krüll C, Nehls U, Schmiede A, Schneider R, Onishi T, Weiss H (1994) *in vivo* dissection of the mitochondrial respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). Biochim Biophys Acta **1187**, 121-124.
- Schulte U, Haupt V, Fecke W, Brors B, Rasmussen T, Friedrich T & Weiss H (1999) A reductase/isomerase subunit of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) carries a NADPH and is involved in the biogenesis of the complex I. J Mol Biol **292** (3), 569-580.
- Schwitzguébel JP & Palmer JM (1982) Properties of mitochondria as a function of the growthstage of *Neurospora crassa*. J Bacteriol **149**, 612-619.
- Shintani DK & Ohlrogge JB (1994) The characterisation of a mitochondrial acyl carrier protein isoform isolated from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol **104** (4), 1221-1229.
- Siedow JN (1990) Perspectives in biochemical and genetic regulation of photosynthesis. In Zeltich I (ed) Plant biology **10** Wilea-Liss New York.
- Soni R, Carmichael JP & Murray JAH (1993) Parameter affecting lithium acetate-mediated transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and development of a rapid and simplified procedure. Curr Genet **24**, 455-459.
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol **98**, 503-517.

- Stenico M, Lloyd AT, Sharp MP (1994) Codon usage in *Caenorhabditis elegans*: delineation of translational selection and mutational biases.
Nucleic Acid Res **22** (13), 2437-2446.
- Stoops LK, Awad ES, Arslanian MJ, Gunsberg S, Wakil SJ & Oliver RM (1978) Studies on the yeast fatty acid synthase.
J Biol Chem **253**, 4464-447.
- Sulo P & Martin NC (1993) Isolation and characterisation of *Lip5*.
J Biol Chem **268** (23), 17634-17638.
- Summers RG, Ali A, Shen B, Wessel WA & Hutchinson CR (1995) Malonyl-coenzyme A:acyl carrier protein acyltransferase of *Streptomyces glaucensis*: A possible link between fatty acid and polyketide biosynthesis.
Biochemistry **34**, 9389-9402.
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.
Nucleic Acid Res **22**, 4673-4680.
- Triepels R, Smeitink J, Loeffen J, Smeets R, Buskens C, Triejbels F, van den Heuvel L (1999) The human nuclear-encoded acyl carrier subunit (NDUFAB1) of the mitochondrial complex I in human pathology.
J Inher Metab Dis **22** (2), 163-73.
- Tzagoloff A & Diekmann CL (1990) *PET* Genes of *Saccharomyces cerevisiae*.
Microbiol Rev **54** (9), 211-225.
- Vogel HJ (1956) A convenient growth media of *Neurospora crassa*.
Microbiol Genet Bull **13**, 42-47.
- Wakil SJ (1970) Fatty Acid Metabolism.
In Wakil SJ (Hrsg.) Lipoid Metabolism.

- Wakil SJ (1989) Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme.
Biochemistry **28**, 4523-4530.
- Walker JE (1992) The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains.
Quarterly Rev Biophys **25**, 253-324.
- Wang S & Liu XQ (1991) The plastid genome of *Cryptomonas phi* encodes a hsp70-like protein, a histone-protein, and an acyl carrier protein.
Proc Natl Acad Sci USA **88** (23), 10783-10787.
- Weiss H, von Jagow G, Klingenberg M & Bücher T (1970) Characterization of *Neurospora crassa* mitochondria: preparation with a grind-mill.
Eur J Biochem **14**, 75-82.
- Weiss H, Friedrich T, Hofhaus G & Preis D (1991) The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria.
Eur J Biochemistry **197**, 563-576.
- Wilson R, Ainscough R, Anderson K *et al.* (1994) 2,2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosom III of *C. elegans*.
Nature **368**, 32-38.
- Wobschall U (1997) Inaugural-Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ, Graham MW (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants.
Nucleic Acid Res **17** (9), 3469-78.
- Wright F (1990) The effective number of codons used in a gene.
Gene **87**, 23-29.
- Yagi T, Yano T, Matsuno-Yagi A (1993) Characteristics of the energy-transducing NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans* as revealed by biochemical, bio-

physical and molecular biological approach.

J Bioenerg Biomembr **25**, 339-345.

Yasuno R & Wada H (1998) Biosynthesis of Lipoic Acid in *Arabidopsis*: Cloning and Characterisation of the cDNA for Lipoic Acid Synthase.

Plant Physiol **118**, 935-943.

Ja! diesem Sinne bin ich ganz ergeben,
Das ist der Weisheit letzter Schluß:
Nur der verdient sich Freiheit wie das Leben,
Der täglich sie erobern muß.

Johann Wolfgang Goethe, Faust II